

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA**

LUCILENE YUMI ISHIDA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ANÁLISE QUANTITATIVA DOS
OLIGOELEMENTOS EM DENTES HUMANOS POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR
ENERGIA DISPERSA PARA INFERÊNCIA FORENSE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CURITIBA

2018

LUCILENE YUM ISHIDA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ANÁLISE QUANTITATIVA DOS
OLIGOELEMENTOS EM DENTES HUMANOS POR ESPECTROSCOPIA DE
FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSA PARA INFERÊNCIA
FORENSE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Alexandre de Faria

Co-orientadora: Profa. Dra. Frieda Saicla Barros

CURITIBA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

179c Ishida, Lucilene Yumi

Caracterização química e análise quantitativa dos oligoelementos em dentes humanos por espectroscopia de fluorescência de raios-X por energia dispersa para inferência forense / Lucilene Yumi Ishida — 2018.

158 f. : il.

Disponível via World Wide Web.

Texto em português com resumo em inglês.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. Curitiba, 2018.

Bibliografia: f. 139-152.

1. Engenharia biomédica - Dissertações. 2. Elementos traços - Análise. 3. Dentes - Composição. 4. Química analítica quantitativa. 5. Espectroscopia de raios X. 6. Espectroscopia de fluorescência. 7. Microscopia eletrônica de varredura. 8. Raios X - Espalhamento. 9. Odontologia legal. I. Faria, Rubens Alexandre de, orient. II. Barros, Frieda Saicla, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

CDD: Ed. 23 – 610.28



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação

TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº116

A Dissertação de Mestrado intitulada "Caracterização química e análise quantitativa dos oligoelementos em dentes humanos por Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersa para inferência forense", defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) Lucilene Yumi Ishida, no dia 13 de dezembro de 2018, foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

BANCA EXAMINADORA:

Frieda Saicla Barros, Dra – UTFPR

Jose Carlos Pereira Coninck, Dr – UTFPR

Sergei Anatolyevich Paschuk, Dr – UTFPR

Eduardo Christiano Caregnatto de Moraes, Dr – UFPR

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Dedico este trabalho aos meus avós *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida.

Ao Prof. Dr. Rubens, pela orientação, apoio e confiança depositada no trabalho.

À Profa. Dra. Saicla, pela co-orientação, incentivo, confiança.

Ao Prof. Dr. Sergei e à Profa. Dra. Janine, que gentilmente cederam o Laboratório de Física Nuclear Aplicada, para a realização das análises.

Ao Prof. Dr. Jose Carlos, pela disponibilidade junto ao Laboratório do DAMAT, pela imensa colaboração, apoio, confiança, empenho, para o desenvolvimento do trabalho.

Aos Prof. Dr. Tiago, ao Dr. João Renato, ao Prof. Dr. Vinicius, à UFPR pela contribuição das amostras.

À Daniele e à Catarina, amigas formadas no laboratório, pelo incentivo, apoio e colaboração para a realização desse estudo.

À todas as amigas conquistadas durante esse longo trajeto, por todos os obstáculos que me ajudaram a ultrapassar.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

ISHIDA, Lucilene Yumi. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ANÁLISE QUANTITATIVA DOS OLIGOELEMENTOS EM DENTES HUMANOS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSA PARA INFERÊNCIA FORENSE, 2018.158 folhas. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

Os dentes são estruturas extremamente duras e calcificadas. O composto mineral é a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, onde há ocorrência de substituições iônicas na matriz de hidroxiapatita, por íons como Sr, Mg, Zn, Pb entre outros, sendo estes denominados elementos traço. Esses últimos elementos são incorporados na estrutura mineral do dente, durante o seu processo de formação, bem como processos cumulativos derivados de contribuições externas ao longo da vida do indivíduo. O presente trabalho analisou a estrutura de esmalte e dentina em 30 dentes humanos permanentes, com o objetivo de caracterizar os elementos traço e correlacionar com o sexo, tipos de dentes e idade. Para a caracterização elementar foi utilizada a técnica do EDXRF, que possibilita a aquisição de resultados qualitativos. O arranjo experimental consiste no tubo de raios-X, modelo Mini-X, com alvo de Au e Ag, com detector X-123SDD (AMPTEK). Adicionalmente, foi utilizado outro método da espectroscopia de energia dispersa (EDS) para a caracterização elementar. Na análise qualitativa e caracterizações para as medições com os diferentes alvos, o uso do alvo de Au e colimador de 1 mm mostrou melhor eficácia. Para a análise semi quantitativa foi utilizado o *software* FXTM (AMPTEK), para identificar as concentrações dos elementos: Ca, Sr, Fe, Zn e Pb. Para estudo estatístico utilizou-se o *software* R, e elaborou-se o design de experimentos em grupos, com a finalidade de analisar as estruturas de esmalte, dentina, sexo, tipos de dentes e idade. Para análise desses dados, foram verificadas as médias das concentrações e a análise das variâncias (Anova). Constatou-se que há diferenças entre os elementos traço analisados entre os sexos ($p \ll 5\%$), e os grupos dentários ($p \ll 5\%$). O teste Tukey confirmou que o elemento cálcio é majoritário. Os elementos Ca, Sr, Fe e Pb foram identificados com a média das concentrações maiores em dentina para ambos os sexos, enquanto que o elemento Zn foi identificado com maiores médias das concentrações no esmalte para feminino (0.052 g/cm^2) e em dentina para masculino (0.046 g/cm^2). Com a técnica k-means foi possível observar o comportamento de cada elemento traço de acordo com a idade, sendo observados que Pb, Sr e Fe aumentam suas médias das concentrações com a idade. O uso da técnica da EDS confirmou os resultados do EDXRF para o elemento Ca, como sendo majoritário. A análise dos elementos traço nos dentes e a sua interação entre os sexos, estruturas de esmalte, dentina e idade, é de considerável importância para os aspectos da bioquímica do dente, e também do ponto de vista antropológico e forense, podendo obter-se inferências a respeito de hábitos alimentares, poluições ambientais e patologias associadas.

Palavras-chave: Dentes humanos, elementos traço, oligoelementos, fluorescência de raios X, EDXRF, odontologia forense.

ABSTRACT

ISHIDA, Lucilene Yumi. CHEMICAL CHARACTERIZATION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF TRACE ELEMENTS IN HUMAN TEETH BY ENERGY DISPERSIVE X-RAY FLUORESCENCE FOR FORENSIC INFERENCE, 2018.158 folhas. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2018.

The teeth are extremely hard and calcified structures. The mineral compound is the hydroxyapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, where there is the occurrences of ionic substitutions in the matrix of hydroxyapatite, by ions such as Sr, Mg, Zn, Pb among others, these being called trace elements. These latter elements are incorporated in the mineral structure of the tooth during its formation process as well as cumulative processes derived from external contributions throughout the life of the individual. The present study analyzed the enamel and dentin structure in 30 permanent human teeth, with the aim of characterizing the trace elements and correlating with sex, tooth types and age. For the elementary characterization, was used EDXRF technique, which allows the acquisition of qualitative and quantitative results. The experimental arrangement consists of the X-ray tube, Mini-X model, with Au and Ag target, with detector X-123SDD (AMPTEK). In addition, another dispersive energy spectroscopy (EDS) method was used for the elementary characterization. In the qualitative analysis and characterizations for the measurements with the different targets, the use of the Au target and 1 mm collimator showed better efficacy. For the semi quantitative analysis the FXTM software (AMPTEK) was used to identify the concentrations of the elements: Ca, Sr, Fe, Zn and Pb, analyzed in this study. The statistical analysis was performed using R software. It was elaborated design of experiments in groups and used for the analysis of enamel, dentin, sex, tooth types and age. For the analysis of these data, the means of the concentrations and the analysis of variances (Anova) were verified. It was found that there are differences between the trace elements analyzed between the sexes ($p << 5\%$), and dental groups ($p << 5\%$). The Tukey test confirmed that the calcium element is the major one. The Ca, Sr, Fe and Pb elements were identified with the mean of the highest dentin concentrations for both sexes, while the Zn element was identified with higher mean concentrations of enamel for females (0.052 g / cm^2) and dentin for male (0.046 g / cm^2). With the k-means technique, it was possible to observe the behavior of each trace elements according to age, with Pb, Sr and Fe increasing their mean concentration with age. The use of the EDS technique confirmed the results of the EDXRF for the Ca element, as the majority. The analysis of the trace elements in the teeth and their interaction between the sexes, enamel and dentin structures, and age, are of considerable importance for the aspects of the biochemistry of the tooth, and also from the anthropological and forensic point of view, being possible to obtain inferences with regard to eating habits, environmental pollution and associated pathologies.

Keywords: Human teeth, trace elements, x-ray fluorescence, EDXRF, forensic dentistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de um tubo de raios-x.	20
Figura 2: Esquema das transições eletrônicas	27
Figura 3: Rendimento da fluorescência	28
Figura 4: Arranjo experimental EDXRF	30
Figura 5: Diagrama simplificado das possíveis transições energéticas	30
Figura 6: Estruturas do Microscópio Eletrônico de Varredura	33
Figura 7: Microscópio eletrônico de varredura EVO MA 15	34
Figura 8: Estruturas do dente permanente	34
Figura 9: Eletromicrografia de transmissão do esmalte humano em planos de corte	37
Figura 10: Corte longitudinal do dente	38
Figura 11: Ilustração das estrias ou linhas de Retzius e periquimácias	38
Figura 12: Eletromicrografia de varredura do dente em corte transversal.	39
Figura 13: Estágios de desenvolvimento dos dentes	41
Figura 14: Diagrama da dentição permanente	42
Figura 15: Ilustração de maxila e mandíbula para dentes decíduos	43
Figura 16: Ilustração de maxila e mandíbula para dentes permanentes	43
Figura 17: Identificação das amostras de dentes	54
Figura 18: Anatomia dental	55
Figura 19: Diagrama para análise no EDXRF	56
Figura 20: Determinação dos pontos nas estruturas de esmalte e dentina analisadas	56
Figura 21: Ilustração do equipamento de XRF experimenter kit (Amptek) e posicionamento da amostra	57
Figura 22: Ilustração dos espectros obtidos com os alvos de Au e Ag	59
Figura 23: Ilustração dos espectros obtidos com os alvos de Au e Ag	60
Figura 24: Ilustração dos espectros com alvo de Au para parâmetros com 40 keV e 30 keV	61
Figura 25: Ilustração dos espectros nas escalas linear e logarítmica da amostra ERV17(esmalte).	63
Figura 26: Ilustração dos espectros nas escalas linear e logarítmica da amostra ERV17(dentina)	64
Figura 27: Fluxograma para as análises estatísticas	66
Figura 28: Croqui para as análises	69
Figura 29: Croqui dos grupos dentários e elementos químicos para masculino e feminino	70
Figura 30: Croqui dos grupos dentários e elementos químicos para esmalte e dentina	72
Figura 31: Dendograma do elemento cálcio	85
Figura 32: Matriz de correlação para o elemento cálcio	86
Figura 33: Matriz de correlação do elemento estrôncio	96

Figura 34: Dendograma para o estrôncio	97
Figura 35: Matriz de correlação do elemento ferro	108
Figura 36: Dendograma do elemento ferro	109
Figura 37: Matriz de correlação para o elemento zinco	120
Figura 38: Dendograma do elemento zinco	120
Figura 39: Matriz de correlação do elemento chumbo	130
Figura 40: Dendograma do elemento chumbo	131
Figura 41: Relatório da composição química pela técnica EDS	133
Figura 42: Fotomicrografias das estruturas de esmalte e dentina	139

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca	<i>Cálcio</i>
Sr	<i>Estrôncio</i>
Zn	<i>Zinco</i>
Fe	<i>Ferro</i>
Pb	<i>Chumbo</i>
P	<i>Fósforo</i>
Co	<i>Cobalto</i>
Ni	<i>Níquel</i>
Ar	<i>Argônio</i>
Cl	<i>Cloro</i>
Br	<i>Bromo</i>
V	<i>Vanádio</i>
Cu	<i>Cobre</i>
Hg	<i>Mercúrio</i>
Al	<i>Alumínio</i>
Mg	<i>Manganês</i>
K	<i>Série de orbitais com o número quântico principal</i>
L	<i>Série de orbitais com o número quântico principal</i>
K α	<i>Linhas mais intensas da série K</i>
L α	<i>Linhas mais intensas da série L</i>
h	<i>Constante de Planck</i>
ω	<i>Rendimento da fluorescência</i>
I ₀	<i>Intensidade inicial do feixe</i>
I _x	<i>Intensidade transmitida pelo material absorvedor</i>
μ	<i>Coefficiente linear de atenuação</i>
M	<i>Masculino</i>
F	<i>Feminino</i>
I	<i>Incisivo</i>
PM	<i>Pré molar</i>
M	<i>Molar</i>
3M	<i>Terceiro molar</i>
Ag	<i>Prata</i>
Au	<i>Ouro</i>
Z	<i>Número atômico</i>
Si	<i>Silício</i>
N.S	<i>Não significativo</i>
S.	<i>Significativo</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Análise do experimento para masculino e feminino (ANOVA)	70
Tabela 2: Análise do experimento para feminino (ANOVA)	71
Tabela 3: Análise do experimento para masculino (ANOVA)	71
Tabela 4: Análise do experimento para Esmalte e Dentina (ANOVA)	73
Tabela 5: Análise do experimento para esmalte (ANOVA)	73
Tabela 6: Análise do experimento para dentina (ANOVA)	74
Tabela 7: Relação das concentrações de cálcio (g/cm^2), para os sexos	77
Tabela 8: Diferença nas estruturas dentárias com relação ao sexos	79
Tabela 9: Análise estatística para média e variâncias no esmalte	81
Tabela 10: Análise estatística para média e variâncias na dentina	82
Tabela 11: Análise das médias e variâncias conforme os boxplots	84
Tabela 12: Análise comparativa entre os grupos dentários (estruturas) com os gêneros	84
Tabela 13: Relação das médias e variâncias para o estrôncio	87
Tabela 14: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de estrôncio	90
Tabela 15: Análise comparativa entre gêneros com grupos dentários em esmalte	91
Tabela 16 Análise comparativa entre gêneros com grupos dentários em dentina	92
Tabela 17: Análise das médias e variâncias do estrôncio nos grupos dentários	95
Tabela 18: Análise comparativa entre os grupos dentários (estruturas) com os sexos	96
Tabela 19 Relação das concentrações do elemento ferro	99
Tabela 20: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de ferro	102
Tabela 21: Análise comparativa entre sexos com grupos dentários em esmalte	103
Tabela 22: Análise comparativa entre sexos com grupos dentários em dentina	104
Tabela 23: Análise das médias e variâncias do elemento ferro	107
Tabela 24: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de ferro	107
Tabela 25: Relação das médias e variâncias do elemento Zinco	110
Tabela 26: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de zinco (esmalte+dentina)	112
Tabela 27: Análise comparativa entre sexos com grupos dentários em esmalte	113
Tabela 28: Análise comparativa entre sexos com grupos dentários em dentina	114

Tabela 29: Análise das médias e variâncias	118
Tabela 30: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de zinco	119
Tabela 31: Relação das médias e variâncias para o elemento chumbo	121
Tabela 32: Análise do chumbo em relação ao grupos dentários (esmalte + dentina)	124
Tabela 33: Análise comparativa entre sexos com grupos dentários em esmalte	125
Tabela 34: Análise comparativa entre sexos com grupos dentários em dentina	126
Tabela 35: Análise das médias e variâncias	129
Tabela 36: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de chumbo	129
Tabela 37: Análise comparativa entre os sexos em relação à concentração de cálcio pela técnica EDS	136
Tabela 38: Análise do elemento cálcio em esmalte, pela técnica EDS	135
Tabela 39: Análise do cálcio em dentina, pela técnica EDS	136

LISTA DE ABREVIATURAS

EDXRF	Fluorescência de Raios-X Dispersiva em Energia
<i>XRF</i>	Fluorescência de Raios-X
<i>SDD</i>	Silicon Drift Detector
HA	Hidroxiapatita
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Análise Tukey para masculino e feminino	71
Gráfico 2: Análise Tukey para esmalte e dentina	74
Gráfico 3: Dispersão da média da concentração de cálcio para masculino e feminino	77
Gráfico 4: Dispersão de cálcio para dentina e esmalte	78
Gráfico 5: Dispersão do elemento cálcio para os sexos com K-means	79
Gráfico 6: Média da concentração do cálcio no esmalte em relação aos grupos dentários	80
Gráfico 7: Relação das médias da concentrações do cálcio com os grupos dentários	81
Gráfico 8: Boxplots com as concentrações de cálcio distribuídas nos grupos dentários	82
Gráfico 9: Distribuição das médias das concentrações de cálcio nos grupos dentários de acordo com as estruturas de esmalte e dentina.	84
Gráfico 10: Relação da densidade x concentração do estrôncio para masculino e feminino	86
Gráfico 11: Dispersão da média da concentração de estrôncio na dentina e esmalte para masculino e feminino.	88
Gráfico 12: Dispersão de estrôncio no grupo masculino (em dentina e esmalte) e no grupo feminino(em dentina e esmalte).	89
Gráfico 13: Média das concentrações de estrôncio em relação ao grupos dentários (esmalte + dentina).	90
Gráfico 14: Média da concentração do estrôncio no esmalte em relação aos grupos dentários.	91
Gráfico 15: Média da concentração do estrôncio na dentina em relação aos grupos dentários.	91
Gráfico 16: Dispersão do elemento estrôncio para os sexos com K-means	92
Gráfico 17: Boxplots com as concentrações de estrôncio distribuídas nos grupos	93
Gráfico 18: Média das concentrações de estrôncio para esmalte e dentina nos gêneros masculino e feminino.	95
Gráfico 19: Relação da densidade x concentração do ferro para masculino e feminino	98
Gráfico 20: Dispersão da média da concentração de ferro para masculino e feminino	99
Gráfico 21: Dispersão de ferro para dentina e esmalte	99
Gráfico 22: Média das concentrações de Ferro em relação ao grupos dentários (esmalte + dentina).	101
Gráfico 23: Média da concentração do Ferro no esmalte em relação aos grupos dentários.	102
Gráfico 24: Média da concentração do Ferro na dentina em relação aos grupos dentários.	103
Gráfico 25: Dispersão do elemento Ferro para os sexos com K-means	104

Gráfico 26: Boxplot com as concentrações de Ferro distribuídas nos grupos dentários	105
Gráfico 27: Relação das médias das concentrações do cálcio com os grupos dentários.	107
Gráfico 28: Relação da densidade x concentração do zinco para masculino e feminino	109
Gráfico 29: Dispersão da média da concentração de zinco para masculino e feminino.	110
Gráfico 30: Dispersão de zinco para dentina e esmalte	111
Gráfico 31: Média das concentrações de Zinco em relação aos grupos dentários (esmalte + dentina).	112
Gráfico 32: Média da concentração do Zinco no esmalte em relação aos grupos dentários.	113
Gráfico 33: Média da concentração do Zinco na dentina em relação aos grupos dentários	114
Gráfico 34: Dispersão do elemento zinco para os sexos com K-means	115
Gráfico 35: Boxplots com as concentrações de Zinco distribuídas nos grupos dentários	116
Gráfico 36: Relação das médias das concentrações do Zinco com os grupos dentários.	119
Gráfico 37: Relação da densidade x concentração do chumbo para masculino e feminino	120
Gráfico 38: Dispersão da média da concentração de chumbo para masculino e feminino	121
Gráfico 39: Dispersão de chumbo para dentina e esmalte	122
Gráfico 40: Média das concentrações de chumbo em relação aos grupos dentários (esmalte + dentina).	123
Gráfico 41: Média da concentração do chumbo na dentina em relação aos grupos dentários.	124
Gráfico 42: Média da concentração do chumbo na dentina em relação aos grupos dentários.	125
Gráfico 43: Dispersão do elemento chumbo para os sexos com K-means	126
Gráfico 44: Boxplot com as concentrações de chumbo distribuídas nos grupos dentários	128
Gráfico 45: Relação das médias das concentrações do Chumbo com os grupos dentários.	129
Gráfico 46: Relação das médias das concentrações do elemento cálcio nas estruturas (esmalte+ dentina), comparada entre feminino e masculino.	133
Gráfico 47: Média da concentração do cálcio no esmalte em relação aos grupos dentários pela técnica EDS	134
Gráfico 48: Média da concentração do cálcio na dentina, em relação aos grupos dentários	135

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Relação das amostras de dentes	53
Quadro 2: Resumo dos testes exploratórios com o alvo de Ag	58
Quadro 3: Resumo dos testes exploratórios com o alvo de Au	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 MOTIVAÇÕES	21
1.2 OBJETIVOS	22
1.2.1 Ojetivo Geral	22
1.2.2 Ojetivos Específicos	22
1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	23
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	24
2.1 PRODUÇÃO DE RAIOS X	24
2.2 INTERAÇÃO COM A MATÉRIA	26
2.2.1 Efeito Fotoelétrico	26
2.2.2 Efeito Auger	26
2.2.3 Rendimento da Fluorescência	27
2.2.4 Espalhamento Compton e Rayleigh	28
2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR DISPERÇÃO DE ENERGIA (EDXRF)	29
2.4. PRINCÍPIOS DE MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA- MEV	31
2.4.1 Elétrons secundários(Secondary electron- SE)	31
2.4.2 Elétrons retroespalhados(backscattering electron- BSE)	32
2.5. DENTES HUMANOS	34
2.5.1 Esmalte	35
2.5.2 Dentina	35
2.5.3 Polpa	36
2.5.4 Cimento	36
2.5.2 FORMAÇÃO DOS DENTES HUMANOS - MINERALIZAÇÃO	36
2.5.3 CRONOLOGIA DE ERUPÇÃO DOS DENTES	40
2.5.4 DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS DOS DENTES	41
2.6. ELEMENTOS TRAÇO	44
2.6.1 Principais elementos	44
2.6.1.1 Alumínio (Al)	45
2.6.1.2 Fósforo (P)	45
2.6.1.3 Cloro (Cl)	45
2.6.1.4 Potássio (K)	46
2.6.1.5 Cálcio (Ca)	46
2.6.1.6 Ferro (Fe)	47
2.6.1.7 Cobre (Cu)	47
2.6.1.8 Zinco (Zn)	48
2.6.1.9 Estrôncio (Sr)	48
2.6.1.10 Chumbo (Pb)	49
2.6.2 ELEMENTOS TRAÇO EM DENTES HUMANOS	49
2.6.3 APLICAÇÕES ANTROPOLÓGICAS DA ANÁLISE DO ELEMENTO TRAÇO	50

3. METODOLOGIA.	52
3.1 Metodologia para coleta das amostras	53
3.1.1 Definição do grupo amostral	54
3.1.2 Preparo das amostras	55
3.2 ETAPA EXPLORATÓRIA NO EDXRF	57
3.2.1 Calibração do equipamento	57
3.2.2 Testes dos parâmetros para as medições nas amostras	57
3.2.3 Resultado dos testes	58
3.2.4 Definição do protocolo para medidas nas amostras	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
4.1 Resultados da análise da caracterização elementar pela técnica de EDXRF	62
4.2 Etapa exploratória para análises estatísticas	66
4.2.1 Planejamento de experimentos	67
4.2.2 Análise de grupo experimentais	67
4.2.2.1 Análise conjunta (geral)	68
4.2.2.2 Dentro dos locais	69
4.3 Resultados das análises estatísticas para os elementos: Ca, Sr, Fe, Zn e Pb	75
4.3.1 Análise estatística	75
4.3.2 Análise de agrupamentos	75
4.4 RESULTADOS DO ELEMENTO CÁLCIO	76
4.4.1 Análise geral	76
4.4.2 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas	81
4.4.2.1 Esmalte: comparação entre sexos	81
4.4.2.2 Dentina: comparação entre sexos	82
4.4.2 Análise dos grupos dentários em relação ao elemento cálcio para feminino e masculino	82
4.4.3 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os gêneros	84
4.4.4 Dendograma para o elemento cálcio	85
4.4.5 Matriz de correlação para o elemento Cálcio	86
4.5 RESULTADOS DO ELEMENTO ESTRÔNCIO	86
4.5.1 Análise Geral	86
4.5.1.1 Análise Geral, considerando o dente como um todo (esmalte+dentina)	90
4.5.2 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas	91
4.5.2.1 Esmalte: comparação entre sexos	91
4.5.2.2 Dentina: comparação entre sexos	92
4.5.3 Análise dos grupos dentários em relação ao elemento estrôncio para feminino e masculino	94
4.5.4 Matriz de correlação	97
4.5.5 Dendograma para o elemento estrôncio	97
4.6 RESULTADOS PARA O ELEMENTO FERRO	98
4.6.1 Análise geral	98

4.6.2 Análise Geral, considerando o dente como um todo (esmalte+dentina)	101
4.6.3 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas	102
4.6.3.1 Esmalte: comparação entre sexos	103
4.6.3.2 Dentina: comparação entre sexos	103
4.6.4 Análise dos grupos dentários em relação ao elemento chumbo para feminino e masculino	106
4.6.5 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os sexos	107
4.6.6 Matriz de correlação	108
4.6.7 Dendograma do elemento ferro	109
4.7 RESULTADOS PARA O ELEMENTO ZINCO	109
4.7.1 Análise geral	109
4.7.2 Análise Geral, considerando o dente como um todo (esmalte+dentina)	112
4.7.3 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas	113
4.7.3.1 Esmalte: comparação entre sexos	113
4.7.3.2 Dentina: comparação entre sexos	114
4.7.4 Análise dos grupos dentários em relação ao elemento zinco para feminino e masculino	117
4.7.5 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os gêneros	119
4.7.6 Matriz de correlação	120
4.7.7 Dendograma Zinco	121
4.8 RESULTADOS PARA O ELEMENTO CHUMBO	121
4.8.1 Análise geral	121
4.8.2 Análise Geral, considerando o dente como um todo (esmalte+dentina)	124
4.8.3 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas	125
4.8.3.1 Esmalte: comparação entre sexos	126
4.8.3.2 Dentina: comparação entre sexos	126
4.8.4 Análise dos grupos dentários em relação ao elemento chumbo para feminino e masculino	128
4.8.5 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os gêneros	129
4.8.6 Matriz de correlação	130
4.8.7 Dendograma para o elemento chumbo	131
4.9 RESULTADOS PARA ANÁLISES PELO MEV	131
4.9.1 Comparação entre Feminino e Masculino.	136
4.9.2 Análise das estruturas esmalte e dentina separada	137
4.9.2.1 Esmalte: comparação entre sexos	137
4.9.2.2 Dentina: comparação entre sexos	138
5. CONCLUSÕES	137
5.1 Sugestão para trabalhos futuros	139
REFERÊNCIAS	140

APÊNDICE A - Resultado comparativo da análise das intensidades das linhas de emissão $K\alpha$, para o elemento cálcio, pela técnica EDXRF com tubo de Raios-X com alvo de Au e Ag e colimador de 1 mm	154
APÊNDICE B - Descrição dos outros elementos traço	155
APÊNDICE C - Relatório dos pontos analisados nas amostras masculino e feminino pela técnica EDS	158
ANEXO A - Protocolo do Software R	159

1 INTRODUÇÃO

Os dentes são importantes por diversas características. Diacronicamente, o surgimento dos dentes nos animais possibilitou-lhes novos tipos de dietas, com a integração de estruturas mais rígidas, servindo também como mais um elemento de defesa contra predadores e outros animais. Os dentes possuem importância no registro fóssil, pela sua alta durabilidade, e podem resistir ao tempo e podendo ser estudado posteriormente. Também podem ser empregados como determinantes da dieta. São utilizados para traçar o percurso evolutivo (HIDELBRAND & GOSLOW, 2006).

O esmalte que reveste a coroa dentária é de origem ectodérmica, desprovido de células e incapaz de reparar-se ou remodelar-se, porém podem ocorrer interações iônicas com a cavidade bucal e mudanças em sua estrutura cristalina. É o mais duro dos tecidos mineralizados do corpo humano, apresentando 95% em peso de conteúdo inorgânico, associado a 4% de água e 1% de material orgânico. Sua espessura varia conforme a região considerada num mesmo dente, além de variar consideravelmente de um tipo de dente para o outro (GWINNETT, 1992; NANCI, 2001).

A porção mineral é representada por fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e apatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3[\text{OH ou F}]$), nas formas hidroxicarbonatada ou fluoretada. Os elementos químicos que compõem a base do esmalte são o Ca e o P, mas variações secundárias ocorrem na sua composição e elementos químicos como Al, Ba, Sr, Mg, Pb e V, também podem ser incorporados aos cristais, quando presentes durante a sua formação (GWINNETT, 1992). A matriz orgânica consiste em uma família característica de proteínas do esmalte, basicamente proteica de natureza não colágena, contendo alguns lipídios e carboidratos (NANCI, 2013).

A disposição estrutural (regiões intercristalinas e interprismáticas) viabiliza o dinamismo do esmalte com o meio bucal, tornando-o uma estrutura semipermeável (POOLE ET AL., 1963), capaz de realizar trocas de água e íons por meio uma fina rede de vias de difusão de água e íons, que são chamadas de microporos ou poros do esmalte (SILVERSTONE, 1970; CEVC ET AL., 1980).

Os elementos traço ou oligoementos caracterizam-se por serem elementos químicos que, em quantidades reduzidas, são conhecidos por se acumularem nos tecidos. Estes elementos podem ser essenciais, ou não essenciais para o

organismo vivo. Ao determinar o perfil elementar de estruturas mineralizadas, como o dente, é possível pré-determinar sobre os hábitos alimentares e ainda condições ambientais. O padrão de difusão de alguns elementos podem conceder informações sobre doenças, condições de trabalho e classe social e para determinar a toxicidade de elementos traço no organismo, como no caso do chumbo. Atualmente, pesquisadores utilizaram técnicas de fluorescência de raios-X (XRF) para determinar a toxicidade de elementos traço no organismo (CARVALHO ET AL, 1998, PEMMER ET AL, 2013, CHEVALLIER ET AL, 2005, BARANOWSKA ET AL, 2004).

1.2 MOTIVAÇÕES

O principal composto mineral dos dentes é formado por cristais de hidroxiapatita de fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, incorporados em uma matriz proteica orgânica (FEATHERSTONE & LUSSI, 2006; HANĆ, ET AL., 2013). A hidroxiapatita permite a incorporação de elementos nos tecidos dentários devido às reações de substituição e pela análise elementar dos dentes, é possível determinar a caracterização química dos oligoelementos (PEEDIKAYIL, ET AL., 2013). A qualidade e quantidade da composição elementar dos dentes depende de vários fatores como o local de residência, sexo, tipo de dente, hábitos tabágicos e dieta (FISCHER ET AL., 2009) que é influenciada pelo meio oral, estilo de vida e idade da pessoa ao longo do tempo, devido ao longo período que se estende desde a erupção à extração do dente (TANAKA ET AL, 2004). Os elementos alcalino-terrosos (Mg, Sr, Ca) são incorporados em quantidades significativas durante a vida, enquanto os metais de transição bivalentes (Zn, Cu e Fe) são incorporados em menor extensão (REYNARD & BALTER, 2014).

A fluorescência de raios-X (XRF) está atualmente bem disseminada na comunidade científica devido às suas vantagens como a capacidade de realizar análises químicas multielementares, em diversos tipos de amostras, de uma forma rápida, não destrutiva e baixo custo operacional (BORJESSON ET AL., 2003; POTTS ET AL., 2003; ALEXANDRE & BUENO, 2006, SANTOS, ET AL., 2013) sendo considerado um dos métodos mais comuns para análise elementar com fins qualitativos ou quantitativos (ALOMARY, ET AL., 2012). A sua capacidade de detecção multielementar, por mais reduzidas que sejam as suas concentrações,

providencia uma ferramenta importante para o estudo dos elementos traço (CARVALHO, ET AL., 1998).

Apesar dos avanços na saúde e das técnicas analíticas para a determinação elementar nos tecidos mineralizados, ainda existe grande falta de informações sobre os elementos traço encontrados nesses tecidos. Assim sendo, este trabalho pretendeu investigar, as composições dos elementos traço encontrados em dentes humanos, contribuindo para auxiliar e compreender sobre o comportamento dos elementos traço nas estruturas mineralizadas de esmalte e dentina, correlacionando com gênero, tipos de dentes e idade. Com o propósito de fornecer uma diretriz para estudos futuros. Além disso, a determinação dos elementos traço permitem presumir à respeito de hábitos alimentares, poluições ambientais, patologias, e possível inferência de origem geográfica. Por consequência, essas informações são de grande importância para os estudos antropológicos e forenses.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar a caracterização elementar e análise quantitativa dos elementos traço encontrados em dentes humanos pela técnica de EDXRF e análise das superfícies de esmalte e dentina pela técnica do MEV.

1.1.2 Objetivo Específico

- Verificar os elementos químicos, elementos traço encontrados na dentina e no esmalte em dentes humanos, de acordo com: grupos dentários, sexo, idade.
- Analisar quantitativamente os elementos: Ca, Zn, Sr, Fe, Pb encontrados em dentes do sexo feminino e masculino.
- Analisar quantitativamente os elementos: Ca, Zn, Sr, Fe, Pb encontrados nas amostras e correlacionar com os grupos dentários
- Analisar quantitativamente os elementos: Ca, Zn, Sr, Fe, Pb encontrados nos dentes e correlacionar com a idade.

- Avaliar a superfície dos dentes e apresentar dados da composição química elementar das estruturas de dentina e esmalte com o auxílio da sonda EDS.

1.3 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A dissertação está organizada em cinco capítulos, descritos a seguir:

O capítulo 1 apresenta a introdução, uma contextualização e enquadramento teórico do tema a abordar, os objetivos gerais e específicos, bem como as motivações.

O capítulo 2 apresenta uma explanação dos princípios físicos em que se baseiam as técnicas analíticas utilizadas neste trabalho, e os principais pontos da literatura científica relacionados à proposta deste trabalho, apresentando de forma sucinta com propósito de agregar conhecimentos necessários para proporcionar e alicerçar a metodologia de pesquisa utilizada.

O capítulo 3 apresenta a metodologia da pesquisa, com a descrição das etapas para a elaboração da análise das amostras, materiais e métodos utilizados para a construção da proposta.

O capítulo 4 expõe alguns princípios estatísticos para as devidas análises nos resultados obtidos experimentalmente, bem como as devidas discussões baseada em análises quantitativas.

O capítulo 5 apresenta as conclusões, correlacionando com os objetivos propostos e sugestões para trabalhos futuros. Finalmente, são apresentados as referências, apêndices e anexos, que contêm detalhes técnicos desta pesquisa.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 PRODUÇÃO DE RX

Os raios X são ondas eletromagnéticas descobertas em 1895 por Wilhelm Conrad Röntgen, que observou durante um experimento com descargas elétricas, a sensibilização de chapas fotográficas deixadas próximas ao tubo de raios X (CUNHA & SILVA, ET. AL. 2004). Essa radiação possui propriedades semelhantes às da luz como propagação retilínea, porém com alta capacidade de penetração, insensibilidade a campos magnético (MARTINS, 1998).

O intervalo do comprimento de onda dos raios X situa-se entre os raios gama e a radiação ultravioleta, de 0.01 a 10 nm (aproximadamente 0.125 a 125 keV), (ALS-NIELSEN & MCMORROW, 2011).

O tubo de Crookes (Figura 1) são tubos catódicos usados por Röntgen, que são recipientes de fechados e preenchidos com um gás em baixa pressão. Em suas extremidades são colocadas duas placas de metal, ligadas a uma fonte de tensão elétrica. O cátodo (pólo negativo), quando aquecido por uma corrente elétrica, cria uma nuvem eletrônica ao seu redor. Ao aplicar alta tensão entre os eletrodos, surge um campo elétrico no tubo que acelerará os elétrons dessa nuvem em direção ao ânodo (pólo positivo), que se propagarão como um feixe de elétrons. Esse feixe constitui uma radiação conhecida como raios catódicos. Os elétrons desse feixe têm altas velocidades, e propagam-se em linha reta em direção ao ânodo (MARTINS, 1998).

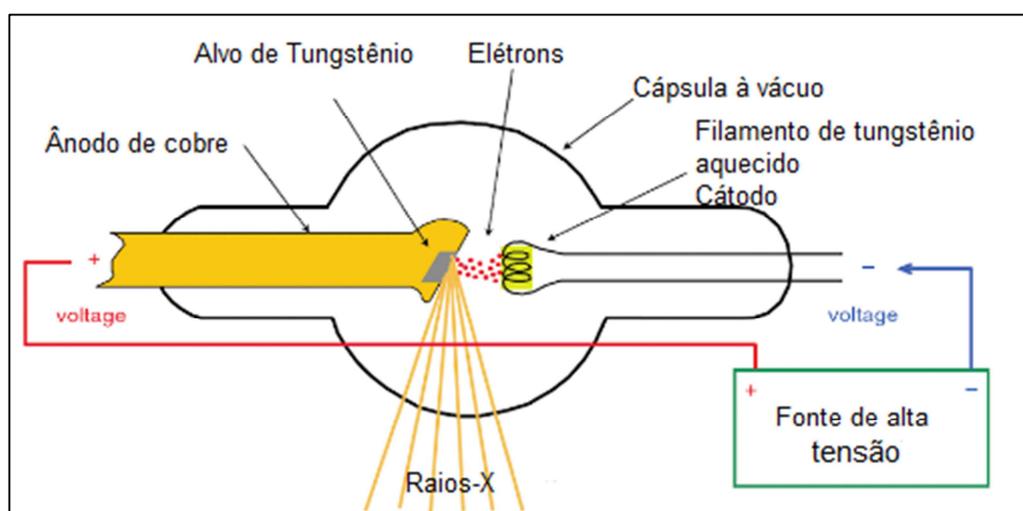


Figura1: Diagrama de um tubo de raios X
Fonte: Adaptado Bushberg et al, 2012

A análise por meios de raios X baseia-se no fato que todos os elementos emitem uma radiação característica quando submetidos a uma fonte de excitação. A produção de raios X pode ocorrer por três mecanismos: I) desaceleração de partículas carregadas (elétrons, prótons, íons e partículas α), II) transições eletrônicas de elétrons nas camadas mais internas dos átomos, III) decaimento de fontes radioativas (BRUKER, 2011).

A produção de raios X ocorre quando há a excitação de um certo elemento, processo esse, em que são ejetados elétrons das camadas mais internas dos níveis dos átomos. Com isto, os elétrons das camadas mais externas saltam para as camadas mais internas liberando energia na forma de fóton de raios X, com energia característica para cada componente da amostra. Assim sendo, a análise por fluorescência de raios X é composto por três fases essenciais : I) excitação da amostra a ser analisada pelos raios X, II) liberação de raios X característicos dos elementos constituintes da amostra e III) detecção desses raios X (MANICA, 2006).

Os raios X representam uma parte do espectro eletromagnético, tendo sua origem em dois processos físicos distintos: ou pela desaceleração de um feixe de elétrons de alta energia, em tubos de raios X (tubos de raios catódicos), onde parte ou toda a energia cinética dos elétrons é convertida em raios X (radiação de “Bremsstrahlung”), ou pela transição de elétrons entre as camadas mais internas dos átomos. Os raios X, constituem um espectro contínuo de distribuição de energia, que são produzidos pela desaceleração de um feixe de elétrons. E estão diretamente relacionados à alta tensão aplicada ao tubo. Os raios X originados pela transição de elétrons, contudo, formam um espectro discreto de distribuição de energia, diretamente relacionado ao número atômico do elemento (raios X característicos) (TIPLER ET AL., 2001).

A radiação contínua, ou de Bremsstrahlung é originada pelos elétrons que, ao interagirem com os núcleos dos átomos do alvo, sofrem desaceleração e desvios na direção do seu movimento, originando uma emissão contínua de fótons de raios X, cuja energia pode ser calculada através da Equação(1):

$$E_c = h\nu = K_i - K_f \quad (1)$$

Onde E_c é a energia cinética; h corresponde à constante de Planck, ν corresponde à frequência da radiação e K_i e K_f representam, respetivamente, a energia cinética inicial e final do elétron (SVANBERG, 2001).

2.2 INTERAÇÃO DOS RAIOS X COM A MATÉRIA

Existem diversos processos através dos quais os fótons de raios X interagem com a matéria, podendo ter diversos comportamentos com diferentes probabilidades: não interagirem todo, podem ser completamente absorvidos pela matéria, ou dispersos com ou sem perda de energia, segundo a Equação (2).

$$I_x = I_0 \cdot e^{-\left(\frac{\mu}{\rho}\right)\rho x} \quad (2)$$

Onde: I_0 é o número de fótons incidentes no material; μ é o coeficiente de atenuação linear do material para uma determinada energia (cm^{-1}), ρ é a densidade do material (g/cm^3) e I_x é o número de fótons que emergem do material, x é a espessura do material absorvedor.

2.2.1 EFEITO FOTOELÉTRICO

O efeito fotoelétrico é o processo de interação dominante dos raios X com a matéria. Processo em que necessita da energia de um fóton incidente, a camada mais interna do átomo, seja maior ou superior à energia de ligação do elétron (VAN GRIEKEN & MARKOWICZ, 2002).

O efeito fotoelétrico é um processo através do qual o átomo absorve toda a energia do fóton incidente. O fóton desaparece e a sua energia é utilizada para ejetar um elétron orbital. Este elétron passa a ser designado como fotoelétron e tem energia cinética igual à diferença de energias do fóton incidente e a energia de ligação da orbital da qual foi ejetado. A ejeção do elétron só ocorre se a energia do fóton exceder a energia de ligação do respectivo orbital. Se esta condição se verificar, o elétron é ejetado criando uma lacuna no orbital, ionizando o átomo (KREBS ET AL., 2014).

2.2.2 EFEITO AUGER

A emissão de fótons de raios X característicos e a emissão de elétrons Auger, são dois processo existentes que predispõe a criação da vacância., pois um átomo excitado, desloca-se para ejetar outros elétrons da camada mais interna dos níveis dos átomos, e conseqüentemente ocorre a absorção de fótons nos níveis internos, com isso resultando na efetivação de um salto quântico para preencher a vacância (MANICA, 2006).

A emissão dos elétrons Auger, ilustrado na Figura 2, decorre nos elementos de número atômico baixo, por possuírem uma ligação mais fraca, os fótons característicos são absorvidos com maior facilidade. Isso caracteriza em uma desvantagem devido a deficiência na sensibilidade nos experimentos com número atômico baixo (OLIVEIRA, 2000).

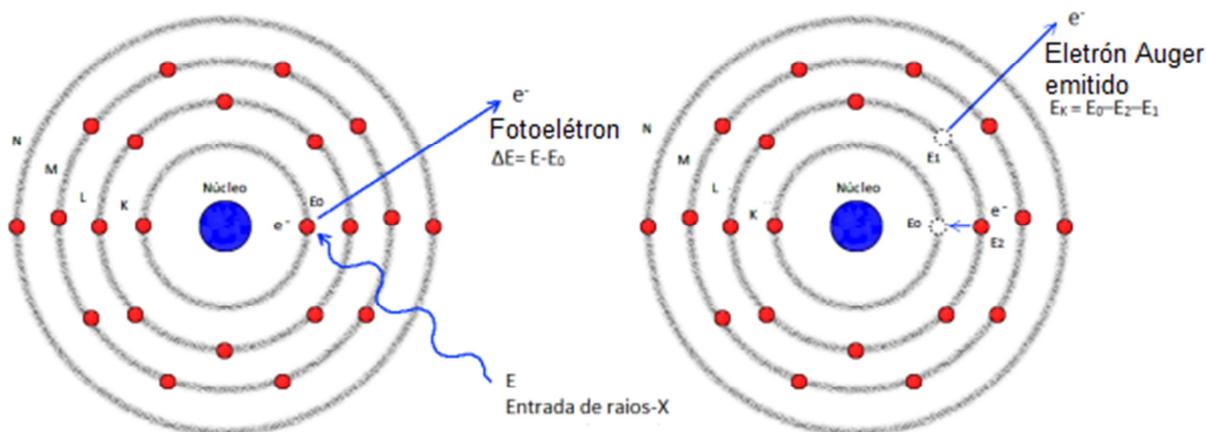


Figura 2: Esquema das transições eletrônicas
Fonte: Adaptado de Chavez, 2011

2.2.3 RENDIMENTO DA FLUORESCÊNCIA

O rendimento da fluorescência (ω), é a probabilidade de uma lacuna nas camadas interiores ser preenchida por uma transição eletrônica (SALGUEIRO & FERREIRA, 1970), e pode ser definida como a razão entre o número de transições radiativas ou não radiativas, no mesmo intervalo de tempo e o número de átomos ionizados nesse mesmo nível (VAN GRIEKEN & MARKOWICZ, 2002).

O rendimento da fluorescência de acordo com o número atômico, é demonstrado na Figura 3. As linhas K (alpha) possuem maior expressividade do que as linhas L (alpha), sendo explicado na diferença para o rendimento das transições tipo K e L. Na espectrometria de raios-X, utiliza-se as linhas K para mensurar os elementos com número atômico baixo a médio, à proporção que muda-se para as

linhas L na medição dos elementos pesados, ou mesmo para as linhas de M.

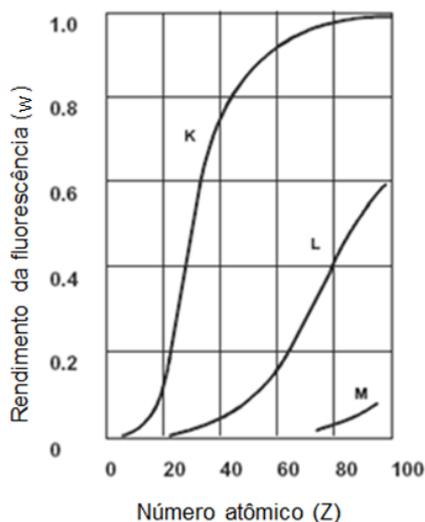


Figura 3: Ilustração do rendimento da fluorescência em função do número atômico
Fonte: Adaptado Manual ARL 9900, 2007.

2.2.4 ESPALHAMENTO COMPTON E RAYLEIGH

O fenômeno de espalhamento de raios X é importante em espectroscopia, pois é responsável pela intensidade da radiação de fundo (*background*) de uma determinada medida. O espalhamento total é a soma de dois tipos de espalhamento, o espalhamento coerente (espalhamento elástico, ou Rayleigh) e o espalhamento incoerente (espalhamento inelástico, ou Compton). O espalhamento afeta medidas de espectroscopia por raios X, por exemplo, aumentando a quantidade de radiação espalhada conforme aumenta o número atômico do material alvo devido ao aumento no número de elétrons (MULLER, 1972, RACHETTI, 1986).

O espalhamento elástico, ou Rayleigh, é um processo de interação no qual um fóton interage com os elétrons do átomo, sem variação da energia. Deste modo, a radiação é remetida com a mesma energia da radiação incidente, não sendo possível a ionização ou excitação do átomo (VAN GRIEKEN & MARKOWICZ, 2002).

A probabilidade de ocorrência desse fenômeno é maior para baixas energias e números atômicos elevados (Z), onde os elétrons estão fortemente ligados (JENKINS, 2003). O espalhamento Rayleigh não contribui para a identificação da amostra pela emissão da radiação característica (GAUGLITZ & VO-DINH, 2003).

O espalhamento inelástico, ou Compton, ocorre quando um fóton interage com um elétron menos ligado ao átomo, transferindo parte de sua energia. O fóton resultante é difundido em todas as direções, com energia inferior à do fóton incidente (MULLER, 1986).

Esse fenômeno torna-se mais provável ocorrer com o aumento da energia de radiação incidente, ou quando a energia de ligação do elétron é desprezível em relação à energia do fóton incidente (VAN GRIEKEN & MARKOWICZ, 2002).

2.3 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDXRF)

A técnica de análise pelo EDXRF, refere-se a uma técnica analítica nuclear, instrumental, multielementar e simultânea, sendo baseada na medição das intensidades de raios X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra, a partir de excitação por meio de um feixe de raios X. Na técnica EDXRF, que utiliza energia dispersiva, concerne à técnica de detecção dos raios X emitidos, que é efetuada por um detector de silício (Si), que gera um espectro de intensidade em função da energia. A intensidade da energia característica emitida pelos componentes da amostra está relacionada à concentração de cada elemento presente na amostra (ALEXANDRE & BUENO, 2006).

A fluorescência de raios X é um método não destrutivo de análise elementar qualitativa e quantitativa que fornece um meio de identificação de um elemento ($Z > 13$), através da medição do seu comprimento de onda ou energia de emissão de raios X característicos (NASCIMENTO FILHO, 1999).

Este mecanismo baseia-se no princípio de ionização de um átomo e no fato de que todos os elementos emitem uma radiação característica quando submetidos a uma fonte de excitação externa (BRUKER, 2011).

A energia da radiação de fluorescência identifica o elemento, enquanto que a sua intensidade (número de raios X emitidos por unidade de tempo) permite que seja medida a sua concentração na amostra analisada (FERRETTI, 2009).

A técnica da espectroscopia de fluorescência de raios X por dispersão de energia, com arranjo experimental representado na Figura 4, possibilita a detecção simultânea de vários elementos em baixas concentrações, tornando-se uma boa

ferramenta para analisar o conteúdo de elementos traço em amostras de tecido biológico (CARVALHO ET AL., 1998).

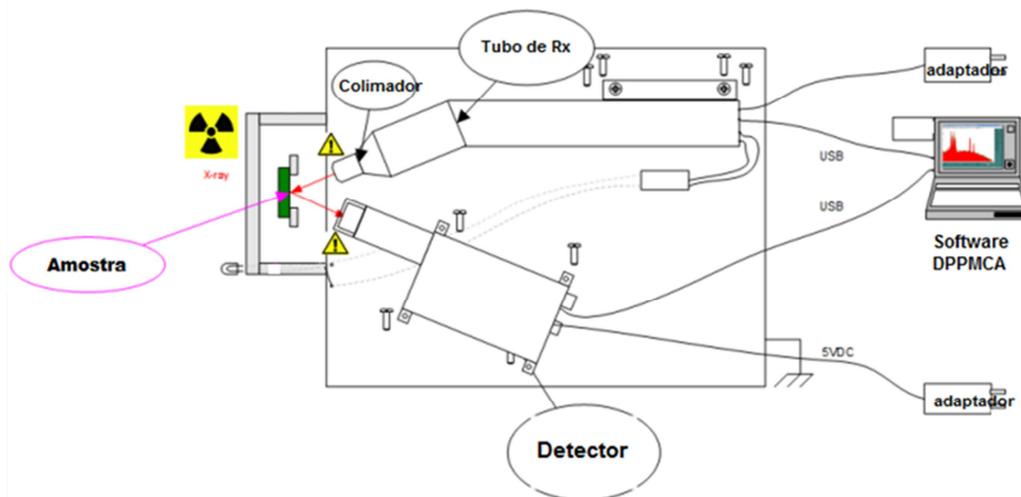


Figura 4: Arranjo experimental EDXRF
Fonte: Adaptado de <http://amptek.com>

A notação usada para designar as transições são as normalmente usadas na espectrometria de raios X onde: as letras K, L, M, N, designam a camada em que ocorreu a ionização, de onde foi retirado o elétron, as letras gregas minúsculas α , β , γ , designam a camada a partir da qual saiu o elétron para preencher o vazio deixado pela ionização, sendo α a mais provável transição, representado na Figura 5.

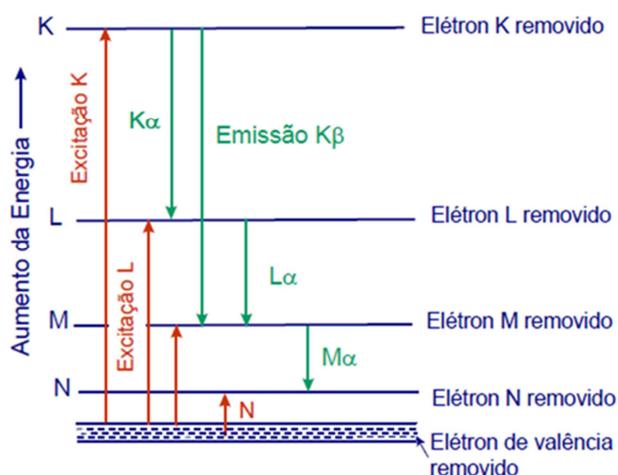


Figura 5: Diagrama simplificado das possíveis transições energéticas
Fonte: Adaptado de Kestenbach, 1994.

2.4 PRINCÍPIOS DE MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA- MEV

A microscopia eletrônica de varredura é a técnica de caracterização microestrutural plurivalente acessível. É comum, sua utilização em diversos ramos da indústria química, farmacêutica, metalúrgica, odontológica, além de ser frequentemente empregada na biologia, geologia, medicina e física. (MANNHEIMER ET AL., 2002). A interação de um fino feixe de elétrons que focaliza sobre uma área, ou um microvolume a ser analisado da amostra, origina vários sinais que podem ser utilizados para caracterizar propriedades das amostras, tais como composição, superfície, cristalografia e topografia.

Os sinais de maior interesse referem-se usualmente às imagens de elétrons secundários e de elétrons retroespalhados, ao passo que as microondas eletrônicas, o sinal de maior interesse corresponde aos raios X característicos, resultante do bombardeio do feixe de elétrons sobre a amostra, permitindo a definição qualitativa e quantitativa dos elementos químicos presentes em um microvolume. O uso desta técnica fornece informações de detalhes da superfície do material, com aumentos de até 100.000 vezes, resultando assim em imagens com aparência tridimensional (KESTENBACH & BOTTA, 1989).

Os dois sinais mais comuns utilizados em estudos de superfícies são os provenientes dos elétrons retroespalhados e secundários (DEDAVID ET AL, 2007; KESTENBACH & BOTTA, 1994).

2.4.1 Elétrons secundários (*Secondary electron- SE*)

A interação do feixe eletrônico com os elétrons fracamente ligados, resultam em elétrons secundários. Estes elétrons resultantes são de baixa energia (<50 eV), e formarão imagens com resolução de 3 a 5 nm. O contraste na imagem é fornecido, principalmente, pelo relevo da amostra analisada, tornando-se a principal maneira de formação de imagem no MEV. Os elétrons secundários, elétrons de baixa energia, são gerados pelas interações elétron-átomo da amostra, têm um livre caminho médio de 2 a 20 nm. Por essa razão, somente aqueles gerados junto à superfície podem ser reemitidos e, mesmo estes, são muito vulneráveis à absorção

pela topografia da superfície. (GOODHEW ET AL., 2001, KESTENBACH & BOTTA, 1994. DEDAVID ET AL., 2007).2.4.2 Elétrons retroespalhados (*Backscattering electron- BSE*)

O sinal de *Backscattering electron- BSE* é decorrente das interações ocorridas no interior da amostra e oriundo de uma região do volume de interação englobando um diâmetro maior do que o diâmetro do feixe primário. As imagens e diferentes informações em relação ao contraste que apresentam, são geradas por essa interação dos elétrons, e também podem fornecer uma imagem topográfica (contraste em função do relevo) e obtém-se uma imagem de composição (contraste em função do número atômico dos elementos presentes na amostra). (GOODHEW ET AL., 2001, KESTENBACH & BOTTA, 1994, NEWBURY ET AL., 1992).

A técnica de espectrômetro de energia dispersiva (EDS) proporciona os picos de emissão de raios X da amostra analisada, que são bombardeadas pelo feixe, em uma faixa ampla de energia. Esta técnica viabiliza fornecer a composição química elementar de um ponto da amostra, ou região da superfície da amostra analisada, possibilitando a identificação de praticamente qualquer elemento presente. Com finalidade de caracterizar qualitativamente e quantitativamente a composição da amostra em um determinado ponto ou região. Apresenta como característica a obtenção de um espectro rápido que apresenta os picos característicos de raios X emitidos em função da interação inelástica do feixe eletrônico com a amostra. Para essa avaliação as amostras devem ser sólidas, sem umidade e compostas por material condutor. Caso contrário, devem ser recobertas com ouro ou carbono (GOLDSTEIN ET AL., 2003).

O microscópio eletrônico de varredura é composto por: canhão eletrônico, coluna composta por várias lentes eletrônicas, uma câmara para amostras, detectores e sistema de vácuo. Emprega-se um feixe de elétrons, que explora a superfície da amostra analisada de ponto a ponto, fazendo uma varredura, através de uma bobina de deflexão o feixe pode ser guiado e o sinal da imagem é resultante da interação deste feixe com a superfície da amostra. O detector recebe o sinal e o modula, proporcionando a observação, conforme observa-se na Figura 6 (DEDAVID ET AL., 2007).

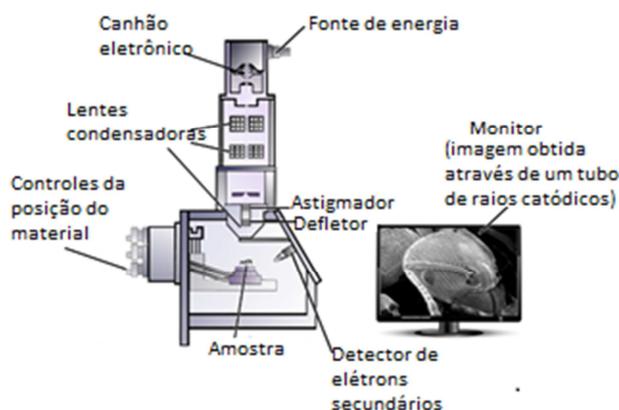


Figura 6: Estruturas do Microscópio Eletrônico de Varredura
Fonte: <http://lab-siviero.icb.usp.br/biocel/modulos>

Devido à sua resolução excelente, o MEV, que operam com valores da ordem de 2 a 5 nm, resultando dessa forma em uma ferramenta valiosa em atividades de pesquisas (NAGATANI ET AL, 1987).

A facilidade na preparação da amostra analisada, a ampla variedade de magnitude, a alta profundidade de campo, a acessibilidade da interpretação das micrografias geradas e a diversidade do tipo de informação, são as principais vantagens. A dificuldade de examinar amostras isoladas e a impraticabilidade em examinar amostras líquidas, são as desvantagens do MEV (JAMES, 2009).

O microscópio marca Zeiss, modelo EVO MA 15 do Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais - CMCM da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), ilustrado na Figura 7, utilizado nesse trabalho.



Figura 7: Microscópio eletrônico de varredura EVO MA 15 (CMCM-UTFPR)
Fonte: CMCM-UTFPR

2.5 OS DENTES

O dente, esquematizado na Figura 8, é constituído por quatro componentes principais: esmalte, dentina, cemento e polpa (CURREY, 2002), dividido em duas partes: coroa e raiz (ANJOS, ET AL., 2004).

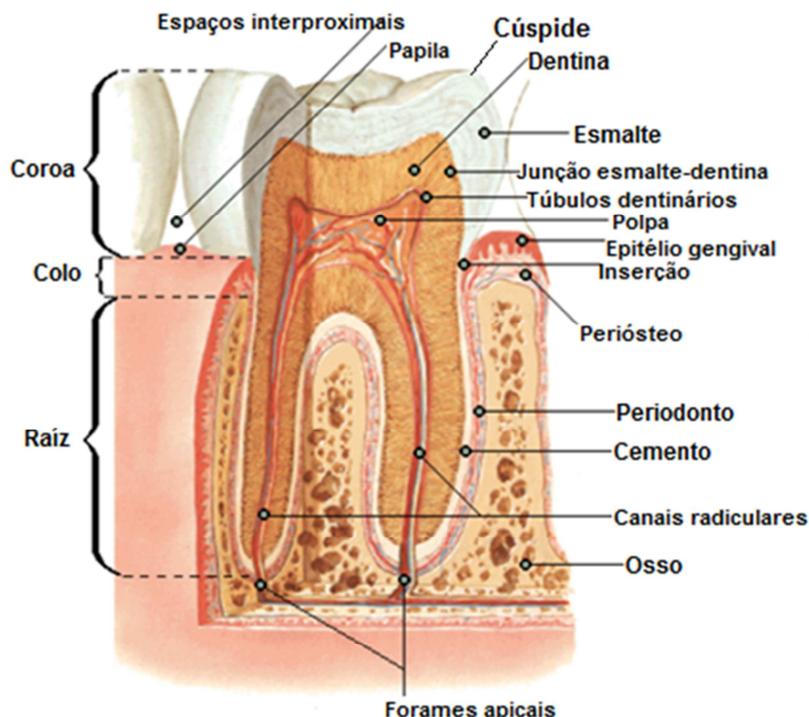


Figura 8: Estruturas do dente permanente.

Fonte: Adaptado de Netter, 2011.

2.5.1 ESMALTE

O esmalte é considerado o material mais duro e denso do corpo humano (CURREY, 2002). O esmalte define a forma e contorno da coroa, cobrindo a parte do dente exposta ao meio oral (SHASHIKIRAN, ET AL., 2007) e, tem como função, proteger o tecido subjacente que é a dentina (ANJOS, ET AL., 2004).

O esmalte é constituído por 96% de matéria inorgânica, maioritariamente hidroxiapatita (HA); 4% de matéria orgânica, que consiste essencialmente em proteínas e concentrações menores de proteoglicanos e lípidos; e água (CATE, 1994, KHAN & MACKAY 2001, CURREY, 2002, HANĆ, ET AL., 2013). A fase inorgânica do esmalte é também constituída por elementos incorporados, tais como Na, Mg, K, Cl, Zn, Fe e Sr (CASTRO ET AL 2010). A presença de vários oligoelementos no esmalte pode causar alterações nas suas propriedades (SHASHIKIRAN, REDDY, & HIREMATH, 2007).

O esmalte sendo o tecido mais mineralizado e mais duro do corpo humano e, por apresentar na sua composição baixas concentrações de compostos orgânicos, raramente ocorrem reações metabólicas neste tecido após a formação dentária (ENOMOTO, ET AL., 2012).

O esmalte tem uma espessura que pode variar em cerca de 1 a 2,3 mm ao longo da superfície dentária e frequentemente é mais espessa nas cúspides e mais fina na zona do colo do dente (BERKOVITZ ET AL., 2011). A sua estrutura é constituída por prismas de secção hexagonal e diâmetro que pode variar entre 3 a 6 µm. Os prismas são compostos por cristais de hidroxiapatita (JANDT, 2006).

2.5.2 DENTINA

A dentina é constituída por 70% de matéria inorgânica mineralizada, 20% de matéria orgânica e 10% de água (HANĆ, ET AL., 2013). Comparado ao esmalte, é um tecido menos duro e menos mineralizado (CASTRO, ET AL., 2010). A dentina é menos densa que o esmalte e mais dura que o osso, e como consequência destas propriedades diferentes, os processos diagenéticos ocorrem mais lentamente no esmalte que na dentina e no osso. (BEHRENSMEYER, 1988).

2.5.3 POLPA

A polpa dentária consiste em tecido mole. Cada tecido pulpar localiza-se na câmara, rodeada por dentina que contém os prolongamentos de células que a formaram (NANCI, 2013 AMR & HELAL, 2010). As células principais da polpa são os odontoblastos, fibroblastos, células ectomesenquimais indiferenciadas, macrófagos e outras células imunocompetentes (NANCI, 2013).

2.5.4 CEMENTO

O cimento é composto por 50% de matéria inorgânica, maioritariamente hidroxiapatita (HA), 45% de substâncias orgânicas e 5% de água (HANĆ, ET AL., 2013). A porção orgânica é caracterizada por 90% de colágeno tipo I, sendo o resto preenchido por proteínas não colágenas, que inclui as glicoproteínas e proteoglicanos, lípidos (KIM, ET AL., 2013).

2.5.2 FORMAÇÃO DOS DENTES HUMANOS - MINERALIZAÇÃO

Os dentes começam o seu desenvolvimento durante a vida fetal (FISCHER, ET AL., 2013), ocorrendo em um padrão de mineralização incremental bem definido (ARORA, ET AL., 2006). Este processo ocorre em tempos diferentes, de acordo com o tipo de dente. São nas etapas iniciais da vida que a composição elementar começa a estabilizar (CASTRO, ET AL., 2010). Esta incorporação de elementos deve-se à presença dos mesmos no meio ambiente durante e após o período de mineralização dos tecidos dentários (SHASHIKIRAN, ET AL., 2007) que, na fase de erupção, apresentam aproximadamente 30% de mineralização (HANĆ, ET AL., 2013).

O desenvolvimento dos dentes decíduos inicia-se na 10^a semana após a fertilização, enquanto os dentes permanentes começam a se desenvolver por volta da 16^a semana, continuam durante a gravidez e após o parto (DEUTCH & PETER, 1982, HILLSON, 1996). O primeiro molar permanente começa a se formar em torno da 30^a semana no útero. Os incisivos permanentes (exceto o incisivo superior) começam a se desenvolver em torno de 3-4 meses após o nascimento, os caninos cerca de 4-5 meses após o nascimento, e o segundo incisivo superior começa a se formar ao redor do final do primeiro ano após o nascimento. Os pré-molares e segundos molares começam a se desenvolver sequencialmente ao longo do final do segundo ano e até ao terceiro ano (HILLSON 1996; KAMENOV & GULSON, 2014).

Uma vez que o órgão do esmalte se desenvolve, na forma precursora do dente, começa a diferenciação celular e o esmalte e a dentina se desenvolvem separadamente. A secreção do esmalte é realizada por ameloblastos em camadas minúsculas e periódicas (HILLSON, 1996, HAMMARSTROM, 1997, FINCHAM ET AL. 1999). Durante este estágio de secreção, o esmalte é aproximadamente 1/3 orgânico e 2/3 mineral inorgânico. No estágio de maturação o componente orgânico é substituído por crescentes cristais de hidroxiapatita, que se expandem até o esmalte estar quase totalmente inorgânico (HILLSON, 1996).

O esmalte maduro é caracterizado em três diferentes padrões de hidroxiapatita e distribuição de prismas, o mais comum dos quais é descrito como um "buraco de fechadura" (HILLSON, 1996, FINCHAM ET AL. 1999). Observa-se na Figura 9, a orientação dos prismas, segundo o plano de corte; em (A) longitudinal e (B) transversal.

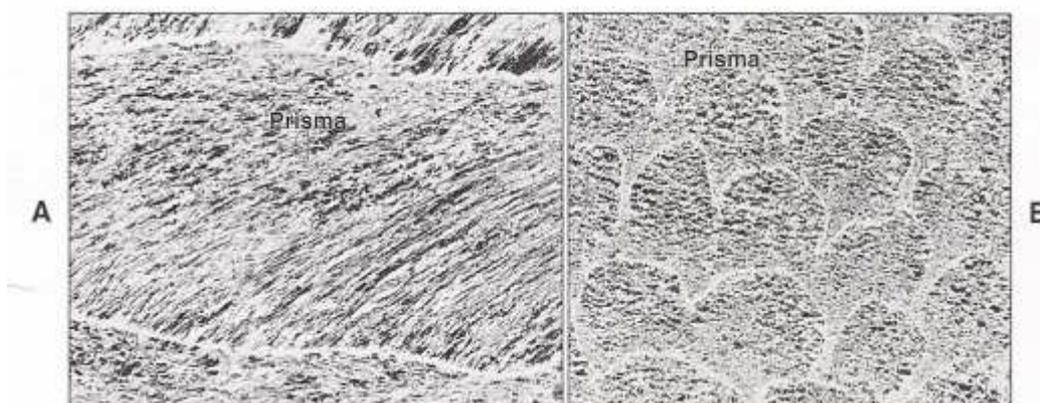


Figura 9: Eletromicrografia de transmissão do esmalte humano em planos de corte
Fonte: Nanci, 2013

As estrias marrons de Retzius indicam descontinuidades em estrutura de esmalte, que reflete a periodicidade dos processos de formação. A primeira estria de Retzius para desenvolver é a linha neonatal, que é aparente em dentes decíduos e o primeiro molar permanente e indica uma interrupção nos processos de formação como resultado do estresse fisiológico do nascimento (WHITTAKER & RICHARDS 1978). As estrias de Retzius são visíveis na superfície do esmalte na forma de periquimáceas. A Figura 10, apresenta o corte no sentido longitudinal por desgaste, mostrando a disposição das estrias de Retzius, com o uso de microscopia de luz polarizada. A estria mais larga corresponde à linha neonatal.

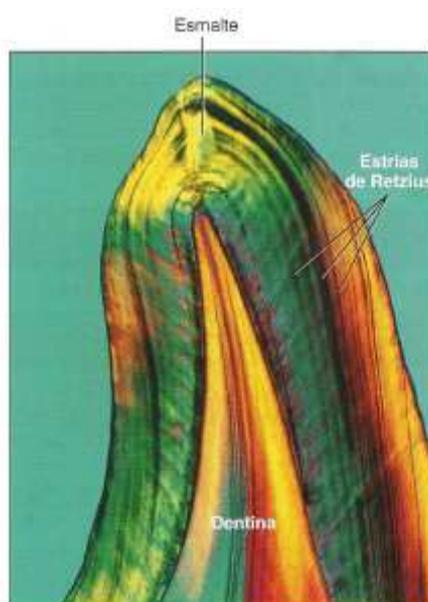


Figura 10: Corte longitudinal do dente
Fonte: Adaptado de Nanci, 2013

As estrias de Retzius são visualizadas na Figura 11B, em um dente cortado longitudinalmente. Na Figura 11A, observam-se as extremidades externas das estrias, formando as periquimácias. Na Figura 11C, as periquimácias são visualizadas pela face vestibular.

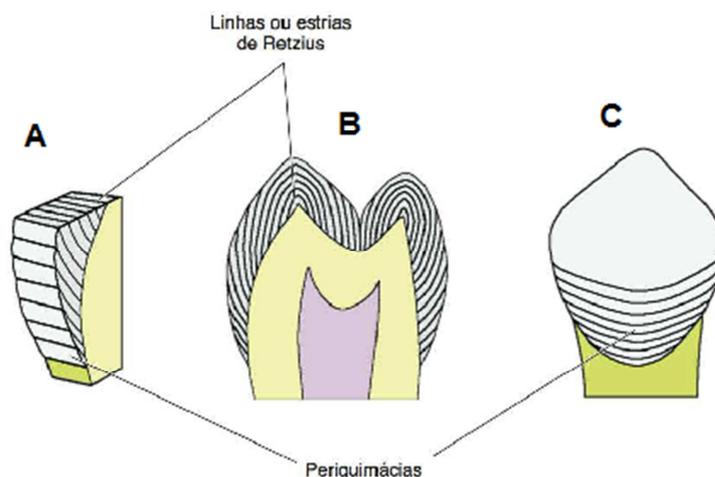


Figura 11: Ilustração das estrias ou linhas de Retzius e periquimácias
 Fonte: Adaptado Katchburian & Arana, 2012.

A hidroxiapatita é o componente inorgânico constituinte de osso, cimento, dentina e esmalte, ocasionalmente alterações na matriz de fosfato de cálcio. Substituições ocorrem durante a formação, como as células formadoras de matriz são nutridas pelo sangue que transporta contaminantes elementares. Substituições de matriz também são encontradas perto da superfície do esmalte como resultado da absorção de contaminantes da saliva e alimentos. A maioria dos elementos não mostram uma concentração comprovadamente maior na camada superficial do esmalte, provavelmente porque eles estão presentes muito raramente em concentrações muito baixas para a absorção de superfície alimentos e saliva, ou porque devem ser metabolicamente separados antes de se tornarem incorporadas ao esmalte. HILLSON (1996) observou que enquanto o esmalte é frequentemente usado em análises químicas de populações arqueológicas devido à sua robustez, refletindo apenas a dieta durante a primeira infância, que pode ter sido diferente das dietas de adultos.

O esmalte pode ser dividido em dois tipos: esmalte interprismático e prismático. O esmalte interprismático circunda cada prisma, conforme a Figura 12. O esmalte interprismático constitui a camada mais superficial, enquanto na parte mais

interna do esmalte maduro humano se encontra o esmalte prismático, que se estende até à dentina (BERKOVITZ, 2004).

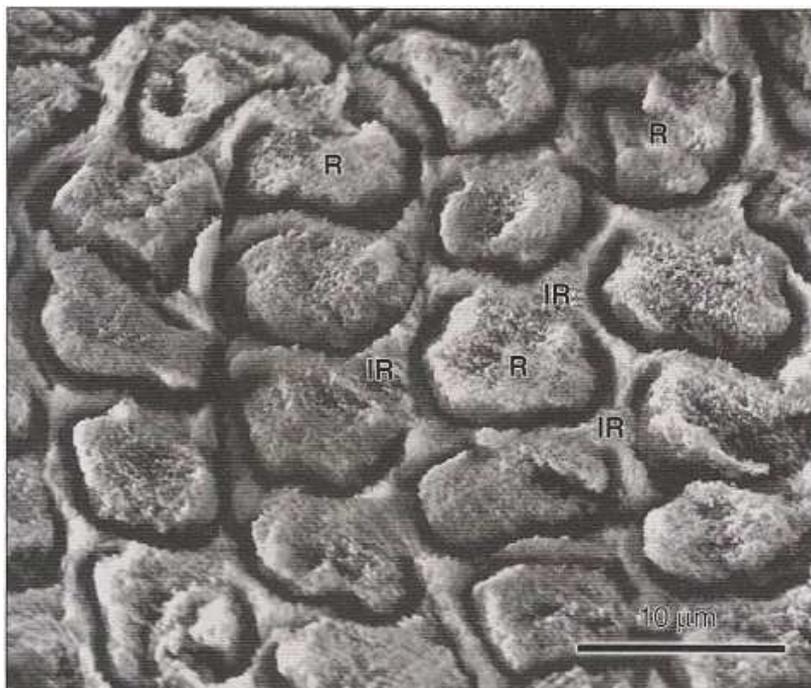


Figura 12: Eletromicrografia de varredura do dente em corte transversal. IR: esmalte interprismático; R: prisma
Fonte: Adaptado de Nanci, 2013

O desenvolvimento do esmalte interprismático bem ordenado é condicionado pelo processo de amelogênese (processo de biomineralização dinâmico, coordenado e bastante complexo, que resulta na formação do esmalte dentário), e pelos ameloblastos (células responsáveis pela regulação deste processo), enquanto o esmalte prismático é menos regulado deste ponto de vista (BERKOVITZ, 2004).

A disposição estrutural (regiões inter cristalinas e interprismáticas) viabiliza o dinamismo do esmalte com o meio bucal, tornando-o uma estrutura semipermeável (POOLE ET AL., 1963), capaz de realizar trocas de água e íons por meio uma fina rede de vias de difusão de água e íons, chamadas de microporos ou poros do esmalte (SILVERSTONE, 1970; CEVC ET AL., 1980). Durante a maturação do esmalte, os cristais expandem-se gradualmente no sentido lateral e longitudinalmente, ocorrendo uma diminuição gradativa dos espaços entre eles, tornando o esmalte mais denso e menos permeável. Interações iônicas e mudanças em sua estrutura cristalina (maturação pós-eruptiva) podem ocorrer após o irrompimento do dente na cavidade bucal (EISENMANN, 2001). O processo de formação do esmalte do dente permanente é lento, podendo levar de 4 a 5 anos para se completar na coroa de molares, sendo que aproximadamente dois terços

deste período corresponde à fase de maturação do tecido (SHELLIS, 1984; SMITH, 1998).

O esmalte pode ser considerado um sólido microporoso composto por cristais firmemente unidos, o que lhe dá uma aparência semelhante ao vidro, por causa do alto conteúdo mineral e características estruturais. A translucidez característica do esmalte permite, de acordo com a variação da sua espessura, que o dente apresente a cor da dentina (GWINNETT, 1992).

2.5.3 CRONOLOGIA DE ERUPÇÃO DOS DENTES

Os humanos geralmente têm 20 dentes primários (decíduos) e 32 dentes permanentes (adultos) (ASH, 2002).

Os dentes são classificados como incisivos (I), caninos (C), pré-molares (PM) e molares (M). O cronograma de desenvolvimento é muito diferente entre cada tipo de dente. Cada um seu próprio cronograma de estágio de desenvolvimento (ASH, 2002; WHITE & FOLKENS, 2005).

Erupção dentária em humanos é um processo de desenvolvimento dos dentes em que estes dentes nascem na boca e se tornam visíveis. Cada tipo de dente tem seu próprio tempo de erupção, conforme a Figura 13. Por exemplo, os terceiros molares irrompem entre os 17 e os 21 anos de idade (ASH, 2002).

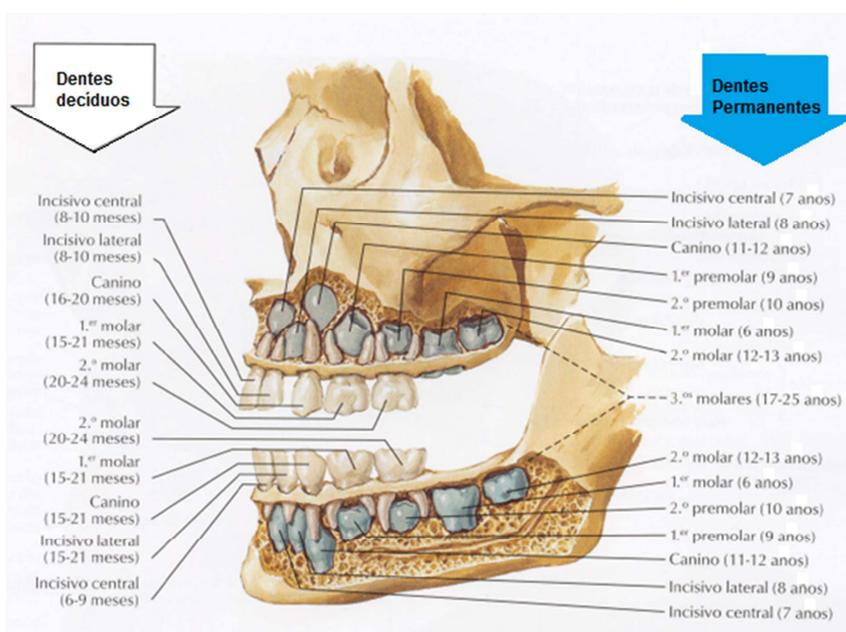


Figura 13: Estágios de desenvolvimento dos dentes
Fonte: Adaptado de Netter, 2011

2.5.4 DIFERENÇAS MORFOLÓGICAS DOS DENTES

Na dentição permanente existem quatro tipos de dentes: incisivos, caninos, pré-molares e molares, ilustrado na Figura 14. Os incisivos representam oito dentes que têm forma espatulada. Ao lado dos incisivos, são encontrados os caninos, com uma forma losango, totalizando quatro caninos na maxila e mandíbula. Os dentes seguintes são os pré-molares: dois em cada arcada, perfazendo um total de oito pré-molares. Os molares são a categoria final dos dentes. Estes dentes são os maiores e utilizados para esmagar e moer alimentos com sua grande superfície de mastigação. São doze molares presentes: três molares em cada quadrante da arcada. (HILLSON 1996, WHITE & FOLKENS 2005).

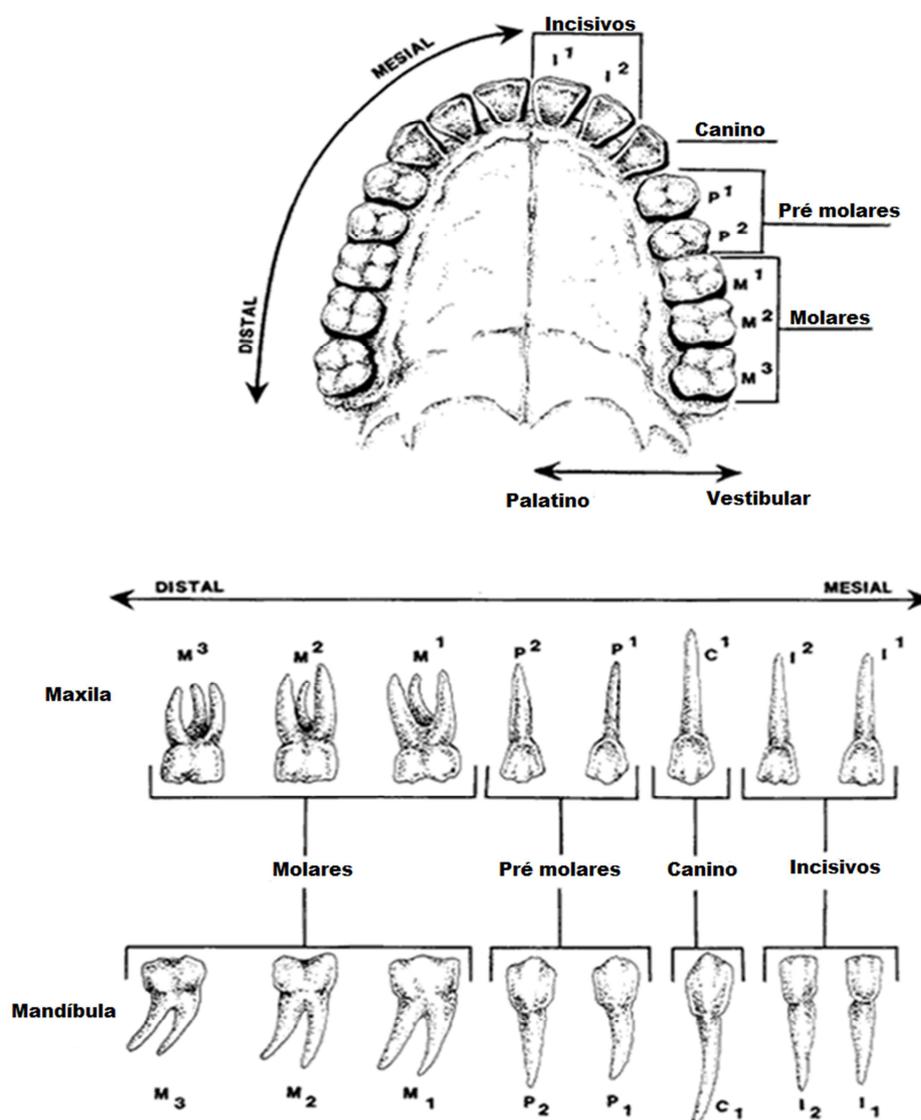


Figura 14: Diagrama da dentição permanente
Fonte: Adaptado de White & Folkens, 2005

Algumas características são usadas para categorizar os dentes. A coroa de um incisivo é plana e semelhante a uma lâmina. Os caninos possuem as raízes geralmente mais longas que as raízes de outros dentes na mesma dentição. Os pré-molares possuem a coroa mais redondas e raízes mais curtas que os caninos, e menores que os molares. Geralmente os pré-molares possuem duas cúspides. Os molares são maiores, mais quadrados e têm mais cúspides do que outros dentes, e geralmente têm múltiplas raízes (WHITE & FOLKENS 2005).

A dentição decídua diferencia-se da dentição permanente. A dentição permanente possui 32 dentes no total, e na dentição decídua tem apenas 20 dentes (Figura 15). Os dentes presentes em cada quadrante de uma dentição decídua são: dois incisivos, um canino e dois molares. Durante a infância, esses dentes são sistematicamente substituído por dentes permanentes. Existem alguns critérios para identificar um dente decíduo de um dente permanente. Os dentes decíduos possuem a coroa menor comparado aos dentes permanentes. As raízes dos dentes decíduos são mais finas e mais curtas. No molar decíduo, as raízes são mais divergentes. As coroas decíduas são mais bulbosas (WHITE E FOLKENS 2005).

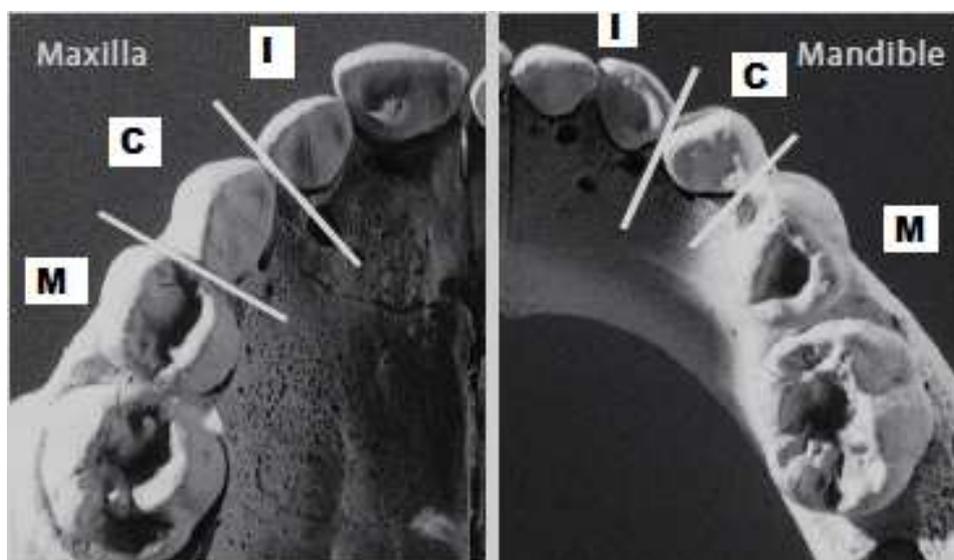


Figura 15: Ilustração de maxila e mandíbula representadas por hemi arcadas para dentes decíduos

Fonte: Adaptado de White et al. 2011

Os dentes presentes em uma dentição permanente são: dois incisivos, um canino, dois pré-molares e três molares em cada quadrante, como mostra a Figura 16.

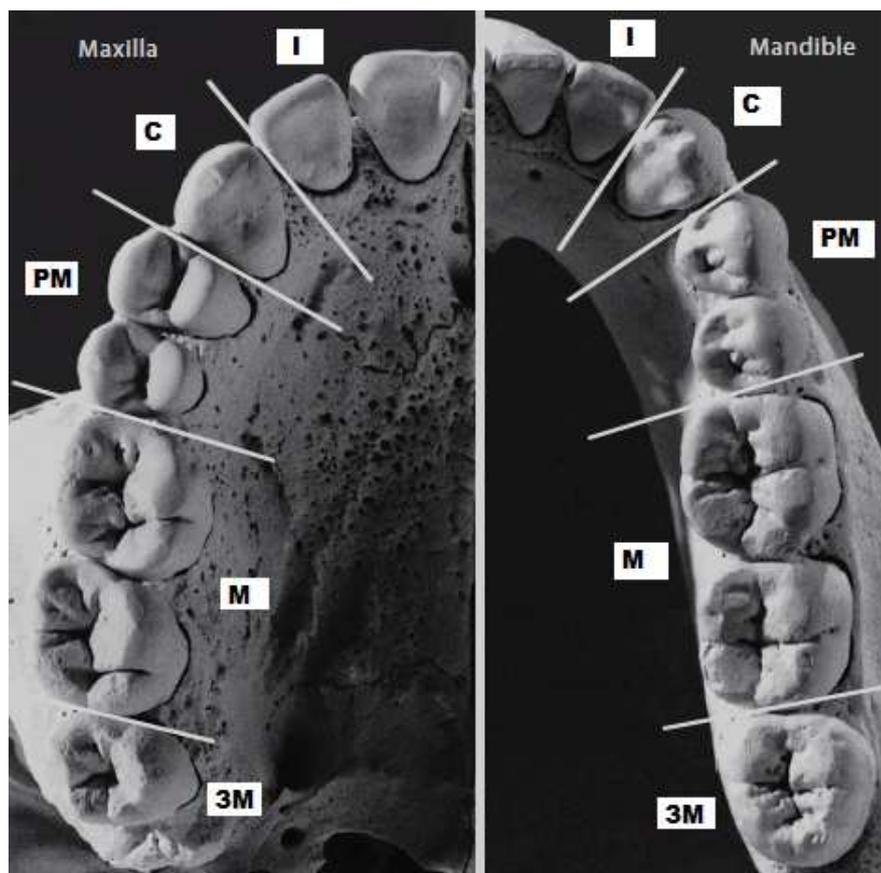


Figura 16: Ilustração de maxila e mandíbula representadas por hemi arcadas para dentes permanentes

Fonte: Adaptado de White et al. 2011

2.6 ELEMENTOS TRAÇO

No organismo humano encontram-se inúmeros elementos químicos que são essenciais para o bom funcionamento do sistema biológico. A carência destes elementos pode causar deficiências nas funções metabólicas de um organismo, que podem ser reversíveis, se este voltar às concentrações adequadas (ALMEIDA, 2007).

Os minerais essenciais para o ser humano dividem-se em: macroelementos, microelementos e elementos traço, ou oligoelementos (SIZER & WHITNEY, 2013).

Os elementos traço são definidos como substâncias inorgânicas presentes nos tecidos animais em quantidades mínimas, independentemente da sua abundância no meio ambiente (PEEDIKAYIL ET AL., 2013).

Os elementos traço podem ser absorvidos pela pele, ingestão de água, e alimentos, sendo distribuídos pelo organismo, podendo incorporar-se à estrutura da hidroxiapatita (GHADIMI, ET AL., 2013).

Os elementos traço desempenham um papel importante e complexo no metabolismo humano, podendo ser benéficos ou prejudiciais para a saúde, apesar das suas baixas concentrações (LI, ET AL., 2013) e são reconhecidos como fatores importantes com influência na vida (CARVALHO ET AL., 1998; THYLTRUP, 1987, BALLANTINE, 1995).

O esmalte dentário é constituído essencialmente por cristais de hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ com elementos traço incorporados. Estes últimos são incorporados na estrutura mineral do dente durante o seu processo de formação e, maioritariamente, devido à processos cumulativos derivados de contribuições externas ao longo da vida do indivíduo, como, por exemplo, local de residência ou trabalho (poluição ambiental), género, tipo de dente, hábito de fumar ou dieta (FISCHER ET AL, 2009, KATCHBURIAN, 2012).

2.6.1. PRINCIPAIS ELEMENTOS

É importante explicar as características inerentes a cada um dos elementos considerados essenciais em termos alimentares e também os mais comuns na estrutura dentária e no organismo do ser humano em geral. Por conseguinte, descrevem-se os principais elementos encontrados, abrangendo os majoritários (Ca e P) e os elementos traço (Cl, Sr, Zn, Fe, K, Al e Cu) abundantes na estrutura dentária (FISCHER, ET AL., 2009). Os demais elementos estão descritos no Apêndice B.

2.6.1.1 ALUMÍNIO (Al)

É um elemento que existe em grandes quantidades no meio ambiente, e é um elemento não-essencial (WATANABE, ET AL., 2011, GREGER 1993). Muitos estudos epidemiológicos, laboratoriais e em animais, indicam que o alumínio possa ter um papel cariostático (TANAKA, ET AL., 2004), devido à inibição que exerce sobre o crescimento bacteriano e a respetiva capacidade de colonização do esmalte (WATANABE, ET AL., 2011). É encontrado em pequenas quantidades na maioria dos alimentos, embora em algumas frutas e vegetais, possam estar associados a uma concentração de alumínio mais alta no solo cultivado (GREGER, 1993). As principais fontes de ingestão pelo ser humano são em forma de água, aditivos

alimentares industriais e alguns alimentos naturais (SIZER & WHITNEY, 2013). Os níveis de alumínio biologicamente disponíveis variam de acordo com a litosfera, atributos da área em que as plantas são cultivadas, sugerindo que alumínio pode ser útil para região de diferenciação de origem (UNDERWOOD, 1977).

2.6.1.2 FÓSFORO (P)

É o segundo mineral mais abundante no corpo humano, sendo que cerca de 85% encontra-se combinado com o Ca na estrutura óssea e dentária (RIYAT & SHARMA, 2010). A carência deste elemento pode conduzir ao raquitismo, tornando ossos porosos, frágeis e quebradiços (ANDERSON & GARNER, 1996) e o excesso pode levar a uma escassez de cálcio (VALSAMI-JONES, 2004). É um componente do material genético, pois integra as nucleoproteínas e, por isso, aparece associado principalmente a alimentos ricos em proteínas como, por exemplo, trigo, carne, ovos, leite e cereais (SIZER & WHITNEY, 2013).

2.6.1.3 CLORO (Cl)

É o principal íon negativo do corpo humano, acompanhando o sódio no meio extracelular, atua na manutenção do equilíbrio eletrolítico e encontra-se principalmente no sal mas é comum a todo o tipo de dietas, ou seja, é ingerido diariamente pelo ser humano (SIZER & WHITNEY, 2013).

2.6.1.4 POTÁSSIO (K)

Possui um papel importante na transmissão nervosa, regulação da contração muscular e pressão arterial (SIZER & WHITNEY, 2013). Atua também na manutenção do equilíbrio dos fluidos e eletrólitos e, conseqüentemente, na integridade celular (MARKOWITZ, 2013). É um elemento obtido pela ingestão de alimentos como verduras, chá e farinha de trigo (SIZER & WHITNEY, 2013).

2.6.1.5 CÁLCIO (Ca)

O cálcio apresenta-se no plasma sob três formas físico-químicas (RIZZOLI & BONJOUR, 2006): cerca de 50% estão ionizado, 40% ligado às proteínas (albumina e globulinas), e 10% formando complexos com íons difusíveis como lactato, fosfato, citrato e bicarbonato.

O estado biologicamente ativo é o cálcio livre, iônico ou ionizado. Sendo um cátion bivalente, a sua ligação com proteínas, possuem uma dependência do pH. Desse modo, em situações de alcalose, há redução do cálcio livre devido a um aumento na ligação. O inverso ocorre nas situações de acidose, com aumento do cálcio ionizado (FOGH-ANDERSEN ET AL., 1993; KRAGH-HANSEN & VORUM, 1993). Do ponto de vista intracelular, o cálcio atua fisiologicamente na contração muscular, na secreção de hormônio, no metabolismo do glicogênio e na divisão celular. Do ponto de vista extracelular, promove a mineralização óssea, coagulação sanguínea e o potencial de membrana plasmática.

O cálcio é o mineral mais abundante distribuído no organismo, estando com cerca de 99% em osso e dentes nos seres humanos adultos (BROWN, ET AL., 2004, PEMMER ET AL., 2013), sendo o elemento mais abundante na estrutura mineral dos tecidos dentários (FISCHER, ET AL., 2013). O conteúdo de cálcio é relativamente constante ao longo do tempo e existe em maior concentração no esmalte, quando comparado à dentina, porque é mais denso e tem maior conteúdo mineral (SOUZA-GUERRA, ET AL., 2014).

O ser humano obtém este elemento de diferentes fontes alimentares como, por exemplo, produtos lácteos, legumes e cereais e a sua absorção pode ser comprometida pela deficiência em vitamina D, ou distúrbios intestinais (SIZER & WHITNEY, 2013).

2.6.1.6 FERRO (Fe)

É um dos elementos traço mais importantes da dieta (WILLIAMS & SIEGELE, 2014), dos que existe em maior concentração no organismo e é amplamente distribuído por todo o corpo humano (HALLBERG, 1981; WATANABE, ET AL., 2011). Está presente em todas as células e realiza inúmeras funções vitais: transporta oxigênio sob a forma de hemoglobina; armazena e facilita o uso de oxigênio nos músculos sob a forma de mioglobina; intervém no transporte de

elétrons dentro das células sob a forma de citocromos; integra reações enzimáticas em vários tecidos (ALOMARY, ET AL., 2012).

As carnes orgânicas, gema de ovo, leguminosas, cacau, melão de cana e salsa, são fontes ricas de ferro na dieta humana (SIZER & WHITNEY, 2013). As fontes intermediárias são carnes musculares, peixes e aves, nozes, vegetais verdes e farinha integral. Finalmente as fontes pobres incluem leite, açúcar branco, farinha branca, arroz, sagu, batatas e frutas frescas (HALLBERG, 1981).

2.6.1.7 COBRE (Cu)

É um elemento traço essencial para o desenvolvimento do tecido conjuntivo, revestimento de nervos e ossos. Sendo necessário também para a manutenção química do sangue (FRAGA, 2005).

O cobre é considerado um elemento essencial pela importância das suas funções, onde se destaca a interação com o metabolismo do Fe, nomeadamente na formação da hemoglobina e, também, a formação de elastina, tecido conjuntivo e colágeno (SIZER & WHITNEY, 2013).

As mais ricas fontes alimentares de Cu são crustáceos e mariscos, carnes de órgãos, nozes, legumes, frondosos legumes, frutas secas de pedra e cacau. Fontes intermediárias incluem vegetais, a maioria das frutas frescas e cereais refinados, enquanto as fontes pobres incluem laticínios produtos, açúcar branco e mel (FRAGA, 2005; SIZER & WHITNEY, 2013).

É um constituinte normal dos tecidos humanos, incluindo o esmalte dentário (PEEDIKAYIL, ET AL., 2013). Pensa-se que possa inibir a produção de ácidos pelas bactérias acidogênicas, impedindo a desmineralização da hidroxiapatita, podendo, por isso, possuir capacidade cariostática, caso exista em concentrações elevadas (WATANABE, ET AL., 2009). A deficiência de cobre é rara podendo levar à anemia, enfermidades dos ossos e graves quadros de má nutrição mas, por outro lado, quando consumido em concentrações elevadas, acumula-se no sangue, fígado e rins causando vômitos, náuseas, diarreia e doença de Wilson (ALOMARY, ET AL., 2012).

2.6.1.8 ZINCO (Zn)

O zinco realiza uma função fundamental em muitos processos biológicos, sendo um componente primordial na atividade de várias enzimas, funcionando como cofator de das mesmas e que regulam o crescimento celular, níveis hormonais e apresentam função importante na formação e metabolismo de tecidos mineralizados (ALOMARY ET AL., 2012; GONZALES-RODRIGUEZ & FOWLER, 2013), considerado também um indicador de hábitos alimentares (GONZALES-RODRIGUEZ & FOWLER, 2013). As ostras, seguidas por outros frutos do mar, carne muscular e nozes, são fontes dietéticas ricas de zinco (CARVALHO ET AL., 2000, CARVALHO ET AL., 2004); SIZER & WHITNEY, 2013).

A ingestão em excesso de zinco, pode causar pancreatite, anemia, mialgias, insuficiência renal aguda e morte, também pode resultar em uma taxa de crescimento reduzida (ALOMARY, ET AL., 2012, FRAGA, 2005).

2.6.1.9 ESTRÔNCIO (Sr)

É um elemento que tem sido alvo de inúmeras investigações desde os anos 70/80, pelo seu possível efeito cariostático, devido às semelhanças que apresenta com o cálcio, como por exemplo o raio iônico (LIPPERT & HARA, 2013, CARVALHO ET AL., 2000, CARVALHO ET AL. 2007, CARVALHO ET AL. 2004). Assim, quimicamente, apresenta capacidade de substituir o cálcio na estrutura dentária (LI, ET AL., 2013). O Sr é um elemento que, embora se encontre nos organismos de seres vivos, ainda carece de conhecimentos maiores sobre a sua importância nutricional (LIPPERT & HARA, 2013). O estrôncio pode substituir o cálcio na estrutura da apatita e na camada superficial de esmalte (CURZON, 1983), bem como na placa dentária (PEARCE E SISSONS, 1987) está fortemente relacionado à prevalência de cárie. Uma interação entre estrôncio e flúor, que podem afetar na prevenção da cárie, também foi demonstrado (CURZON E CUTRESS, 1983). São encontradas em proteínas de origem marítima, legumes e produtos lácteos (ALMEIDA, 2007).

2.6.1.10 CHUMBO (Pb)

Pode existir na forma orgânica (presente na gasolina) sendo considerado mais tóxico que a forma inorgânica (tintas, canos, munições, cerâmicas), pois o organismo humano absorve-o mais facilmente (AGENCY TOXIC SUBSTANCE, 2007). O chumbo é um análogo biológico do Ca (ERICSON ET AL., 1991), uma vez que os íons Pb^{+2} podem substituir os íons Ca^{+2} no organismo humano, por longos períodos.

A exposição do ser humano ao chumbo advém da dieta alimentar e da sua inalação direta (GONZALEZ-REIMERS ET AL., 1999; RUBIO ET AL., 2005). A principal toxicidade se manifesta no sistema nervoso, tanto em adultos como em crianças. Altos níveis desse metal podem causar anemia, conduzir a danos severos nos rins e cérebro, podendo levar à morte (AGENCY TOXIC SUBSTANCE, 2007).

2.6.2 ELEMENTOS TRAÇO EM DENTES HUMANOS

Os elementos são considerados essenciais se estiverem presentes em todos os tecidos saudáveis de todos os seres vivos animais. A falta de elementos essenciais produz anormalidades previsíveis. A adição reverte ou previne anormalidades, que estão associadas a alterações bioquímicas. Vários outros oligoelementos podem ser detectados em tecidos animais, considerados não essenciais. Eles incluem Al, Ti, Ge, Rb, Sr, Zr, Ag, Cd, Au, Hg, Pb, Bi e outros. Acredita-se que eles são adquiridos pelo corpo do animal como contaminantes ambientais e refletem o contato do organismo com seu meio ambiente. A concentração de elementos essenciais é controlado por mecanismos biológicos, enquanto a concentração de elementos não essenciais é controlado pelos níveis ambientais (UNDERWOOD, 1997).

Nos anos 1930, DREAL, LOWATER & MURRAY relataram que os dentes contêm uma variedade de elementos menores, ou traços (DREAL, 1936; LOWATER & MURRAY 1937). À medida que instrumentos e métodos analíticos mais sensíveis foram desenvolvidos, mais informações sobre elementos traços e suas funções nas diferentes partes dos dentes foram investigadas. Os dentes são acreditados para preservar grandes informações através de uma vida útil, variando com exposições

ambientais. A análise histológica de dentes decíduos ou permanentes tem sido frequentemente utilizada para fins ambientais e arqueológicos (LOWATER, 1937; REITZNEROVÁ, 2000; FALLA-SOTELO, 2005; MALARA, 2006; CHAO, 2009).

As características dos tecidos dentários e a sua composição elementar proporcionam uma promissora perspectiva acerca da interação entre o ser humano e o meio ambiente (OPREA, SZALANSKI, GUSTOVA, OPREA, & BUZGUTA, 2009). A análise química das concentrações elementares, amplia o conhecimento da etiologia das doenças dentárias e pode ser utilizada para fins de diagnóstico, prevenção e tratamento (ZAICHICK, 2009). Por este motivo, o estudo da incorporação dos oligoelementos nos tecidos dentários é considerada de elevada importância, devido às suas aplicações em nível clínico (OPREA, ET AL., 2009).

2.6.3 APLICAÇÕES ANTROPOLÓGICAS DA ANÁLISE DO ELEMENTO TRAÇO

COOK & HEIZER (1947) foram pioneiros na aplicação da análise de oligoelementos para a pesquisa em ossos humanos, em uma amostra de um sítio pré-histórico na região central da Califórnia (USA), quando tentaram quantificar a degradação de componentes orgânicos de ossos como método de estimar a idade, Na(sódio), Ca(cálcio) e P(fósforo), foram examinados.

STITCH (1957) foi um dos primeiros pesquisadores a examinar quantitativamente elementos em tecidos humanos, incluindo ossos. Foram avaliadas concentrações de 17 elementos (Ag, Al, Au, Be, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Rb, Sn, Ti, Zr).

Na década de 1970, os pesquisadores começaram a aplicar a análise de elementos-traço em questões antropológicas, preocupados com a dieta e sua relação status social (SANDFORD & WEAVER, 2000).

KUHNLEIN & CALLOWAY (1977) examinaram a dentina de dentes decíduos, com o objetivo de avaliar se as diferenças dietéticas se refletiam nos dentes. Os elementos examinados foram Pb, Sr, Zn, Cu e Hg. Os elementos Pb, Zn e Cu foram encontrados concentrações mais elevadas nas amostras contemporâneas, como resultado do uso de contaminações de automóveis, tintas, água encanada, utensílios de cozinha e alimentos processados.

BROWN & BLAKELY (1985) hipotetizaram que os oligoelementos poderiam revelar dieta variada e mais saudável, que por sua vez poderia estar ligada ao status social. Eles testaram essa hipótese sobre uma população do Mississippi no noroeste da Geórgia. Foram examinados 13 elementos: Al, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, Mn, Mg, Ni, Se, Sr, V e Zn. Os autores não encontraram variação significativa nas concentrações elementares entre indivíduos de baixo e alto status. Eles interpretaram isso como significando que tanto indivíduos com status alto quanto baixo consumiram mesma dieta.

BUMSTED (1985) publicou uma revisão geral da análise química no contexto de reconstrução paleodietária, onde propôs um modelo de traçador químico da alimentação humana, sistema em que os fatores que contribuem para a composição química do corpo humano são divididos em várias categorias: o conjunto ambientalmente determinado de alimentos disponíveis, o subconjunto culturalmente determinado daquele alimento que é consumido, o metabolismo e processos fisiológicos do corpo que incorporam seletivamente diferentes elementos, e os processos diagenéticos de *post mortem* mudam para o corpo.

3 METODOLOGIA

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Física Nuclear Aplicada e no Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais – CMCM, ambos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Curitiba-PR.

A metodologia foi dividida em três etapas e foram utilizados dois equipamentos e duas técnicas.

A primeira etapa, consistiu na determinação e configuração amostral por conveniência. Foram utilizados 30 dentes, incluindo incisivos, pré-molares, molares e terceiros molares. A amostra foi dividida em dois grupos: masculino e feminino, cada grupo contendo 15 dentes (3 incisivos, 3 pré-molares, 6 molares e 3 terceiros molares). Os dentes foram doados por indivíduos, de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 18 a 69 anos de idade.

Na segunda etapa, de caráter exploratório, foram realizados testes para a elaboração de um protocolo para as análises de caracterização elementar nas amostras de dentes. Nesta etapa foi utilizada a técnica de EDXRF, com diversos parâmetros (kV, μ A, colimares, alvos de Au e Ag, tempo), que por sua vez possibilitou através destes testes determinar um parâmetro ideal para a análise pela técnica de EDXRF nas amostras de dentes.

Na terceira etapa, foi utilizada a técnica EDS para a caracterização elementar, a fim de proporcionar uma comparação em relação ao elemento cálcio com o EDXRF.

Os experimentos de microscopia eletrônica de varredura foram feitos no Centro Multiusuário de Caracterização de Materiais - CMCM da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), utilizando um microscópio marca Zeiss, modelo EVO MA 15. Todas as amostras de dentes necessitaram ser metalizadas com uma camada de Au e fixadas no porta amostras com uma fita de carbono, com o intuito de dissipar as cargas elétricas.

A interdisciplinaridade esteve presente nesta pesquisa, em virtude da utilização de conhecimentos relacionados à física, através das técnicas de análise e princípios à respeito de radiações ionizantes e suas interações com a matéria, para possibilitar a caracterização elementar das amostras estudadas neste trabalho. E empregou-se os conhecimentos referentes à bioquímica, estruturas, e composição

dos dentes para correlacionar com os elementos traço encontrados na caracterização elementar com sexo, idade, estruturas de esmalte e dentina.

3.1 METODOLOGIA PARA COLETA DAS AMOSTRAS

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- CEP-UTFPR (78799817.9.0000.5547).

Os dentes foram fornecidos por meio de doação (amostragem por conveniência), pelas clínicas odontológicas da cidade de Curitiba e região metropolitana. Os doadores responderam a um breve questionário para auxílio e colaboração neste estudo, portanto todos os dentes são rastreáveis, sendo identificados, com nome do doador, sexo, dente extraído, idade, ilustrado no Quadro 1. Os dentes utilizados foram extraídos por motivos periodontais, ortodônticos ou protéticos.

Identificação da amostra	Elemento Dental	Idade	Gênero
JOM33	Canino inferior esquerdo	69 anos	Masculino
DAC12	Incisivo lateral superior direito	40 anos	Masculino
OSV43	Canino inferior direito	54 anos	Masculino
JOM35	Pré molar inferior esquerdo	69 anos	Masculino
JOM34	Pré molar inferior esquerdo	69 anos	Masculino
AAC44	Pré molar inferior direito	54 anos	Masculino
DAC16	Primeiro molar superior direito	40 anos	Masculino
JLM36	Primeiro molar inferior esquerdo	64 anos	Masculino
CJC37	Segundo molar inferior esquerdo	42 anos	Masculino
SO16	Primeiro molar superior direito	66 anos	Masculino
SO47	Segundo molar inferior direito	66 anos	Masculino
ABF37	Segundo molar inferior esquerdo	66 anos	Masculino
PTS18	Terceiro molar superior direito	36 anos	Masculino
CEB38	Terceiro molar inferior esquerdo	18 anos	Masculino
SMS48	Terceiro molar inferior direito	22 anos	Masculino
RAM41	Incisivo inferior	48 anos	Feminino
RAM42	Incisivo inferior	48 anos	Feminino
MSM31	Incisivo inferior	53 anos	Feminino
JUA24	Pré molar superior esquerdo	63 anos	Feminino
MSM44	Pré molar inferior direito	53 anos	Feminino
MS15	Pré molar superior direito	36 anos	Feminino
ERV17	Segundo molar superior direito	58 anos	Feminino
CAO26	Primeiro molar superior esquerdo	38 anos	Feminino
NOP27	Segundo molar superior esquerdo	58 anos	Feminino
SAB17	Primeiro molar superior direito	45 anos	Feminino
SAB26	Primeiro molar superior esquerdo	45 anos	Feminino
SAB27	Segundo molar superior esquerdo	45 anos	Feminino
GS48	Terceiro molar inferior direito	24 anos	Feminino
LFF38	Terceiro molar inferior esquerdo	35 anos	Feminino
GS38	Terceiro molar inferior esquerdo	24 anos	Feminino

Quadro 1: Relação das amostras de dentes
Fonte: Autoria própria

3.1.1 DEFINIÇÃO DO GRUPO AMOSTRAL

Foram selecionados grupos dentários compreendendo: incisivos, pré-molares, molares e terceiros molares, dos sexos masculinos e femininos adultos, como ilustra a Figura 17.



Figura 17: Identificação das amostras de dentes
Fonte: Autoria própria

3.1.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas “*in natura*”, sem qualquer tipo de procedimento químico ou esterilização em autoclaves. Após a extração, o dente foi lavado com água deionizada e escova dental para remover excessos de tecidos moles e outros resíduos. Foi realizado o procedimento de remoção de sujidades, resíduos de placa, cálculos salivares, osso ou restos de tecidos moles com o auxílio de curetas periodontais. Nos dentes que possuíam materiais restauradores, estes foram removidos com broca diamantada. O procedimento de profilaxia foi finalizado com escova dental e água deionizada. Após o procedimento de limpeza, os dentes foram seccionados no sentido longitudinal (ocluso-apical), com o auxílio do disco de corte diamantado, e posteriormente tendo sido removidos os resíduos com água deionizada. A Figura 18, ilustra o corte no sentido ocluso-apical realizado nas amostras.

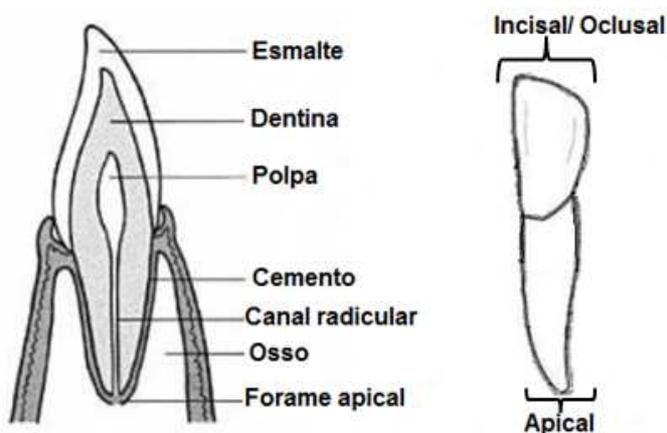


Figura 18: Anatomia dental
Fonte: Adaptado de White & Folkens 2005

Os dentes foram seccionados no sentido longitudinal, sendo separadas em lado 1 e lado 2, como mostra a Figura 19. Para cada lado (1 e 2) foram analisados dois pontos específicos nas estruturas de esmalte e dentina, totalizando quatro pontos analisados para cada dente.

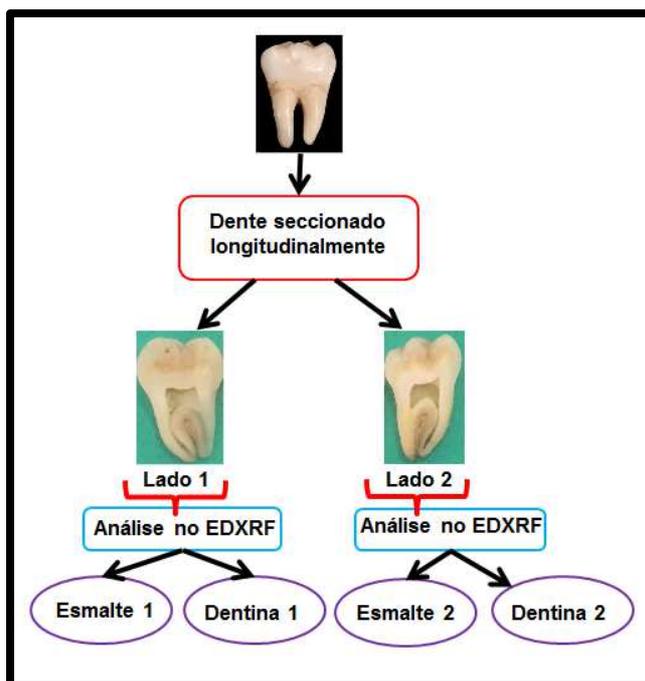


Figura 19: Diagrama para análise no EDXRF
 Fonte: Autoria própria

Na dentina foram escolhidos pontos com proximidade entre 1 a 2 mm, distância da junção amelodentinária à câmara pulpar; e no esmalte foram escolhidos pontos com proximidade entre 1 a 2 mm, distância da junção amelodentinária à região de cúspides, como mostra a Figura 20. O esmalte humano tem uma espessura que pode variar em cerca de 1 a 2,3 mm ao longo da superfície dentária e frequentemente é mais espessa nas cúspides e mais fina na zona do colo do dente (BERKOVITZ ET AL, 2011).

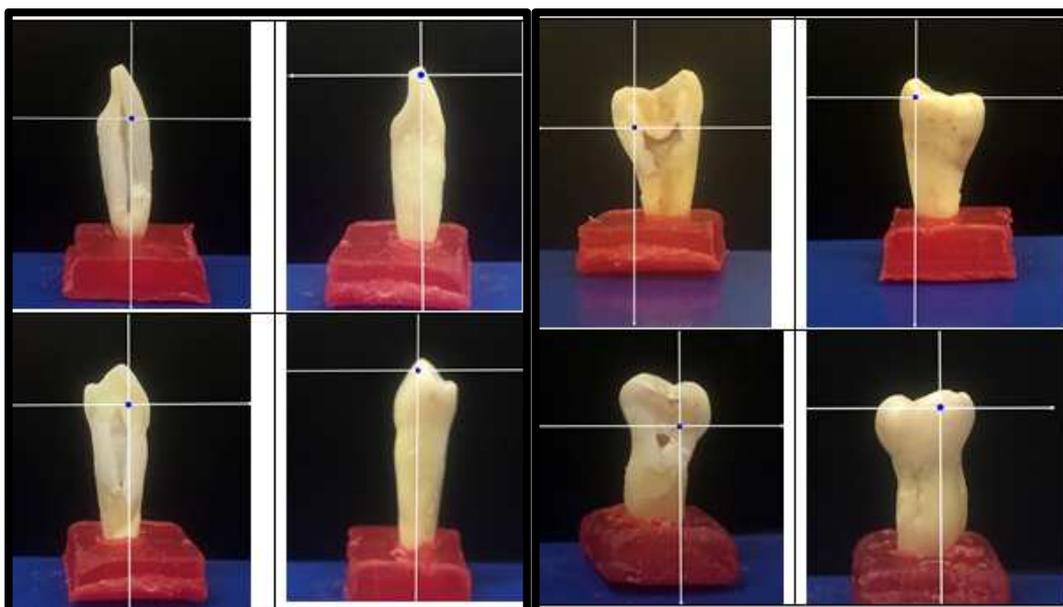


Figura 20: Determinação dos pontos nas estruturas de esmalte e dentina analisadas
 Fonte: Autoria própria

3.2 ETAPA EXPLORATÓRIA

Nesta etapa, foram realizados testes com parâmetros (kV, μA , colimadores, alvos de Au e Ag), com objetivo de explorar e determinar o método mais adequado para analisar as amostras, com a técnica de EDXRF.

3.2.1 Calibração do equipamento:

Para a calibração do equipamento foram seguidos os parâmetros: 30 keV, 30 μA e 200 s, com uma placa de calibração (316SS) certificada pelo NIST (*National Institute of Standards and Technology*, Maryland, EUA) que acompanha o kit EDXRF(Amptek), utilizada para fornecer parâmetros para análise quantitativa. No caso do presente trabalho, a análise passa a ser semi quantitativa, devido à placa de calibração ser de uma matriz diferente (metálica) das amostras.

3.2.2 Testes dos parâmetros para as medições nas amostras

Para as análises pela técnica de EDXRF, nesta etapa exploratória, foram utilizados o equipamento XRF *experimenter kit*, formado por tubos Mini-X com ânodos de Au e Ag, ambos operam com tensão de 10 a 50 kV, corrente de 5 μA a 200 μA e o tempo de exposição é selecionado pelo operador. O sistema de detecção utiliza um detector de Si(Li) modelo 123SDD, da marca Amptek. A Figura 21 ilustra os equipamentos citados e o posicionamento da amostra.

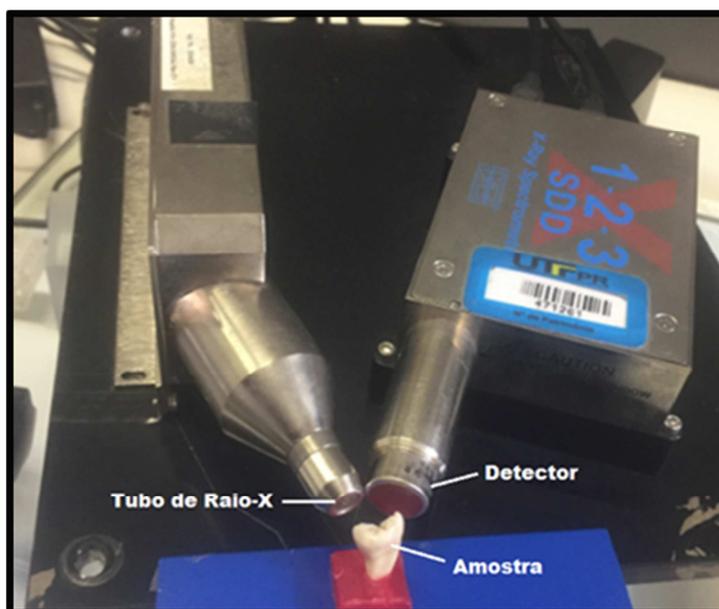


Figura 21: Ilustração do equipamento de XRF *experimenter kit* (Amptek) e posicionamento da amostra
Fonte: Autoria própria

Os testes iniciais da etapa exploratória foram realizados da seguinte forma:

- A amostra foi selecionada aleatoriamente. A estrutura da dentina foi selecionada para os testes.
- Com relação aos tubos Mini-X, foram utilizados os tubos com alvos de Au e Ag. Todas as medições foram realizadas primeiro com o alvo de Ag e posteriormente com o alvo de Au.
- Foram utilizados os colimadores de 0.5 mm e 1 mm na saída do tubo de raios X, para os testes.
- Para os parâmetros de operação dos tubos: foram selecionadas as tensões de 20 keV, 30 keV e 40 keV. E com as correntes de 10 μ A e 15 μ A.
- O tempo de exposição usados foram de 180 s, 600 s, e 900 s.
- A finalidade dos testes foram estabelecer um parâmetro ideal para as medições nas amostras de dentes. Os Quadros 2 e 3 mostram o resumo dos testes exploratórios com os alvos de Ag e Au, respectivamente. Na análise da caracterização elementar, pode-se observar que os resultados dos testes com alvo de Au demonstraram uma caracterização elementar mais eficiente.

3.2.3 Resultado dos testes

Testes com alvo de Ag		
	Parâmetros	Caracterização Elementar
Teste 1	20keV, 10 μ A, 180s, 0.5mm	P, Ar, Ca
Teste 2	20keV, 10 μ A, 180s, 1mm	P, Cl, Ar, Ca
Teste 3	30keV, 10 μ A, 600s, 1mm	Mg, P, Cl, Ar, Ca, Fe, Cu, Zn, Sr
Teste 4	30keV, 10 μ A, 900s, 1mm	Mg, P, Cl, Ar, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Hg
Teste 5	40keV, 10 μ A, 600s, 0.5mm	P, Cl, Ar, Ca, Zn, Sr
Teste 6	40keV, 10 μ A, 600s, 1mm	Mg, P, Cl, Ar, Ca, Zn, Sr
Teste 7	40keV, 10 μ A, 900s, 0.5mm	Mg, Al, P, Ar, Cl, Ca, Zn, Sr
Teste 8	40keV, 10 μ A, 900s, 1mm	Mg, Al, P, Cl, Ar, K, Ca, Fe, Ni, Zn, Sr
Teste 9	40keV, 15 μ A, 600s, 0.5mm	P, Cl, Ar, Ca, Zn, Sr
Teste 10	40keV, 15 μ A, 600s, 1mm	Mg, P, Cl, Ar, Ca, Zn, Sr, Pb
Teste 11	40keV, 15 μ A, 900s, 0.5mm	Mg, Al, P, Cl, Ar, Ca, Zn, Sr
Teste 12	40keV, 15 μ A, 900s, 1mm	Mg, Al, P, Cl, Ar, Ca, Ti, Cr, Fe, Ni, Zn, Sr, Hg

Quadro 2: Resumo dos testes exploratórios com o alvo de Ag

Fonte: Autoria própria

Teste com alvo de Au		
	Parâmetros	Caracterização Elementar
Teste 1	20keV, 10 μ A, 180s, 0.5mm	P, Ar, Ca
Teste 2	20keV, 10 μ A, 180s, 1mm	P, Cl, Ar, Ca, Zn, Sr
Teste 3	30keV, 10 μ A, 600s, 1mm	Al, P, Ar, K, Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr
Teste 4	30keV, 10 μ A, 900s, 1mm	Al, P, Ar, K, Ca, V, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr
Teste 5	40keV, 10 μ A, 600s, 0.5mm	Al, P, Ar, K, Ca, Ti, Cr, Cu, Zn, Sr
Teste 6	40keV, 10 μ A, 600s, 1mm	Mg, P, Al, Ar, K, Ca, Ti, Cr, Ni, Zn, Sr, Pb
Teste 7	40keV, 10 μ A, 900s, 0.5mm	Al, P, Ar, K, Ca, Zn, Sr
Teste 8	40keV, 10 μ A, 900s, 1mm	Al, P, Ar, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Zn, Sr
Teste 9	40keV, 15 μ A, 600s, 0.5mm	Al, P, Cl, Ar, K, Ca, Ti, Ni, Fe, Cu, Zn, Sr
Teste 10	40keV, 15 μ A, 600s, 1mm	Mg, Al, P, Cl, Ar, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cr, Ni, Zn, Sr, Hg, Pb
Teste 11	40keV, 15 μ A, 900s, 0.5mm	Mg, Al, P, Cl, Ar, K, Ca, Ti, Fe, Cu, Ni, Zn, Sr, Hg
Teste 12	40keV, 15 μ A, 900s, 1mm	Mg, Al, P, Cl, Ar, K, Ca, Ti, Co, Cr, Mn, Ni, Zn, Sr, Hg, Pb

Quadro 3: Resumo dos testes exploratórios com o alvo de Au

Fonte: Autoria própria

Em relação às Figuras 22 e 23, representam a aquisição dos espectros para cada parâmetro testado. Notou-se que os espectros com alvo de Au demonstram melhor eficácia das linhas de emissão para os elementos: P, Ca, Fe, Zn e Sr, quando comparada com os espectros realizados com alvo de Ag, sendo comprovados nas análises qualitativas e posteriormente nas quantitativas.

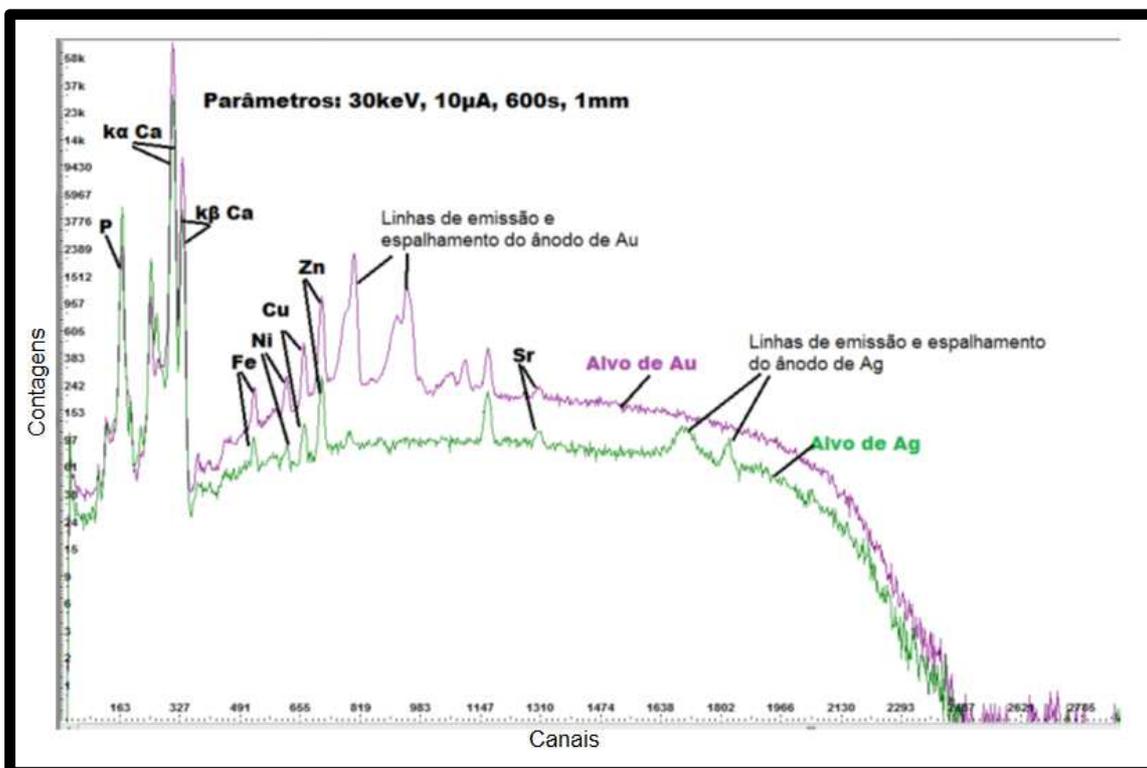


Figura 22: Ilustração dos espectros obtidos com os alvos de Au e Ag

Fonte: Autoria própria

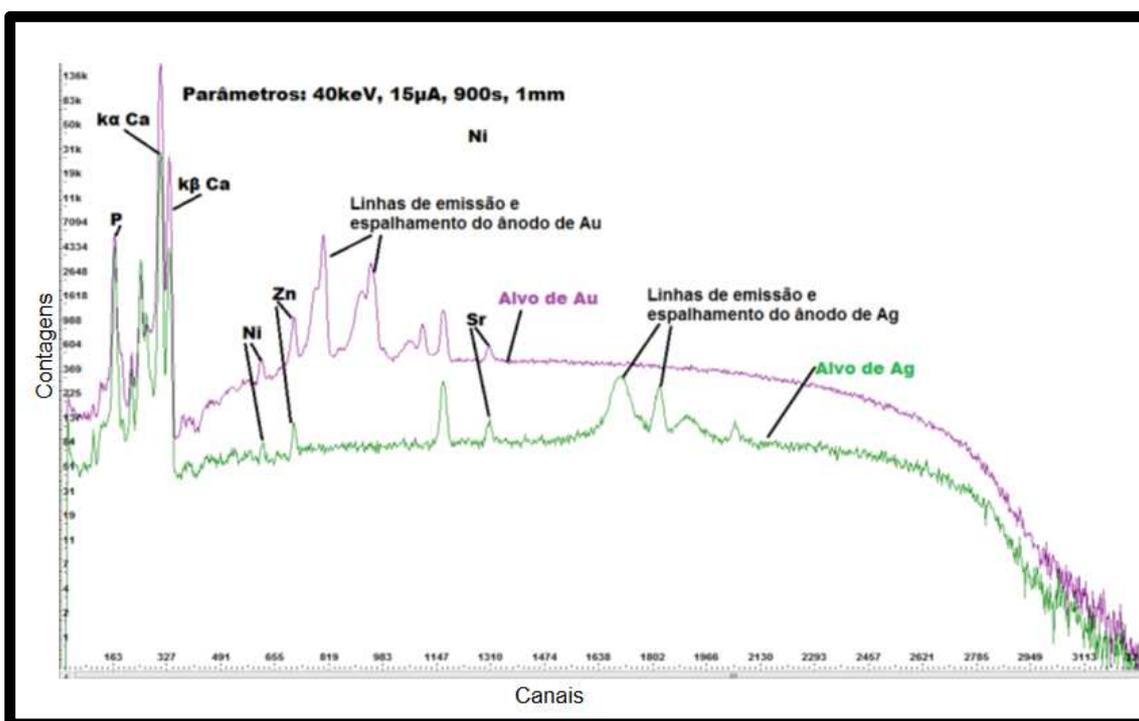


Figura 23: Ilustração dos espectros obtidos com os alvos de Au e Ag

Fonte: Autoria própria

A comparação entre os testes com os parâmetros: 40 keV, 15 μ A, 900 s, 1 mm e 30 keV, 10 μ A, 900 s, 1 mm, ilustrada na Figura 24. Nestes testes, foram levados em consideração o kV, μ A, tipo do colimador, o tempo de análise e as linhas de emissão a serem quantificadas para cada elemento. Foram observadas que as linhas $K\alpha$ do elemento cálcio possuem maior expressividade nos espectros com o alvo de Au, quando comparadas com o alvo de Ag. A aquisição dos espectros com o tubo com alvo de Au obtiveram melhores caracterizações elementares.

A escolha do tempo de análise focou a rapidez e eficiência da mesma, tendo sido testados tempos em 180 s, 600 s e 900 s. O tempo de 180 s caracterizou poucos elementos em ambos os alvos. O tempo de 600 s caracterizou mais elementos no alvo de Au. O tempo de 900 s foi o que melhor atendeu a relação rapidez/menor erro possível, e foi então definido como tempo padrão para a análise das amostras.

O colimador de 1mm apresentou melhores resultados em relação à caracterização elementar do que o colimador de 0.5 mm. A corrente aplicada ao sistema é o fator de maior influência no número de fótons produzidos pelos tubos de raios x. As correntes de 10 μ A e 15 μ A foram selecionadas para os testes, visando

obter um “*dead time*” do detector de até 7%. O resultado mostrou-se positivo, e durante os testes nenhum dos ensaios realizados houve saturação do detector.

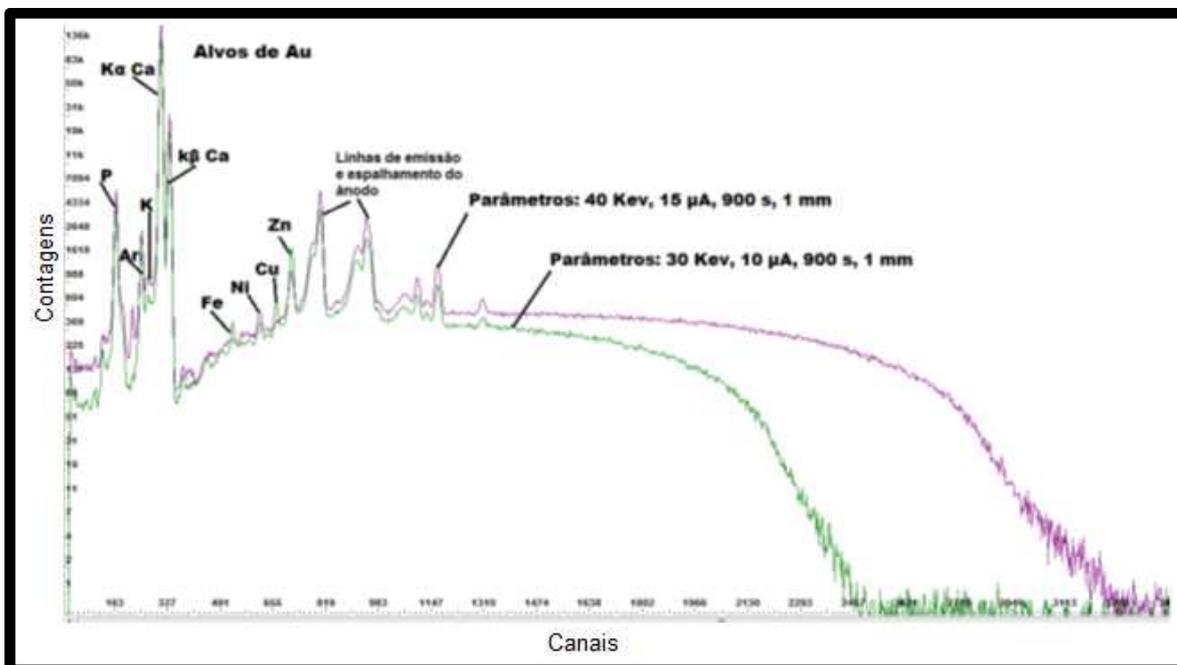


Figura 24: Ilustração dos espectros com alvo de Au para parâmetros com 40 keV e 30 keV
Fonte: Autoria própria

3.2.4 Definição do protocolo para medidas das amostras

De acordo com os resultados, o parâmetro 40 keV, 15 μA , 900 s, 1 mm demonstrou melhor eficiência, porém no decorrer das análises para aquisição do espectro, o equipamento apresentou um *dead time* alto, que pode interferir em erro de leitura e a aquisição do espectro. Por esse motivo, optou-se por adotar um novo parâmetro, que, de acordo com os testes realizados, não afetaria na caracterização elementar das amostras, pois apresentou um *dead time* dentro dos padrões de normalidade assegurados pelo fabricante e não sobrecarregaria o equipamento. Para que as linhas de interesse no espectro fossem excitadas e o tubo de raios-X fosse preservado, a tensão escolhida foi de 30 keV. Enfim, com os resultados obtidos através dos testes realizados, elaborou-se o seguinte protocolo, utilizando os parâmetros: energia de 30 keV, 10 μA , tempo de 900 s, colimador de 1 mm e alvo de Au.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados estão organizados em quatro etapas:

- 4.1 Resultados da análise da caracterização elementar pela técnica de EDXRF;
- 4.2 Etapa exploratória de testes para elaboração do planejamento para análises probabilísticas dos resultados semi-quantitativos da técnica de EDXRF;
- 4.3 Resultados das análises estatísticas para os elementos: Ca, Sr, Fe, Zn e Pb;
- 4.4 Resultados das análises estatísticas para o elemento Ca pela técnica EDS.

4.1 Resultados da análise da caracterização elementar pela técnica de EDXRF

A fluorescência de Raios-X (XRF) está atualmente bem disseminada na comunidade científica, devido às suas vantagens como a capacidade de realizar análises químicas multielementares, em diversos tipos de amostras, de uma forma rápida, não destrutiva, com baixo custo operacional (SANTOS, ET AL., 2013), considerado um método frequentemente utilizado para análise elementar com fins qualitativos ou quantitativos (ALOMARY, ET AL., 2012). Baseia-se na medição da intensidade dos raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra, quando esta é excitada por partículas como elétrons, prótons ou íons (SANTOS, ET AL., 2013). A sua capacidade de detecção multielementar, por mais reduzidas que sejam as suas concentrações, providencia uma ferramenta importante para o estudo dos oligoelementos (CARVALHO, ET AL., 1998).

É necessário ter em consideração a variabilidade biológica intrínseca de cada dente. O esmalte é um material natural e a sua composição e propriedades variam ligeiramente de dente para dente e de indivíduo para indivíduo. (FEATHERSTONE ET AL, 2006).

A composição dos tecidos dentários não é estática, podendo alterar com a idade, meio ambiental, pH do meio oral e presença de cárie (KUMAGAI, ET AL., 2012).

Nas amostras de dentes analisadas, foram obtidos os seguintes elementos na caracterização elementar: Mg, Al, P, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br,

Sr, Ba, Hg, Pb. Os resultados corroboram com os estudos de ZAICHICK (2009) que avaliou as concentrações médias dos mesmos elementos em dentes permanentes saudáveis. FISCHER e colaboradores (2009) mediram as concentrações médias de vários elementos em dentes decíduos e permanentes saudáveis, tendo detectado, maioritariamente, nestes últimos, os elementos do Ca, Mg, K e Zn. Assim, os resultados obtidos encontram-se dentro do esperado.

Os elementos Ca, Fe, Ni, Cu, Zn e Sr obtiveram as linhas de emissão $K\alpha$ com maior expressividade nos espectros analisados e posteriormente confirmados na análise semi-quantitativa pelo *software* FXP da AMPTEK, fornecendo as concentrações dos elementos na unidade: g/cm^2 . Os demais elementos foram identificados nos espectros, porém com pouca expressividade nos espectros das linhas de emissão $K\alpha$ ou $L\alpha$ para os elementos Pb e Hg, sendo confirmadas na análise semi-quantitativa em quantidade mínima, ou nenhuma concentração e acordo com a amostra analisada, como pode-se observar nas Figuras 25 e 26.

Desta forma, a análise estatística foi realizada para os seguintes elementos: Ca, Sr, Fe, Zn e Pb.

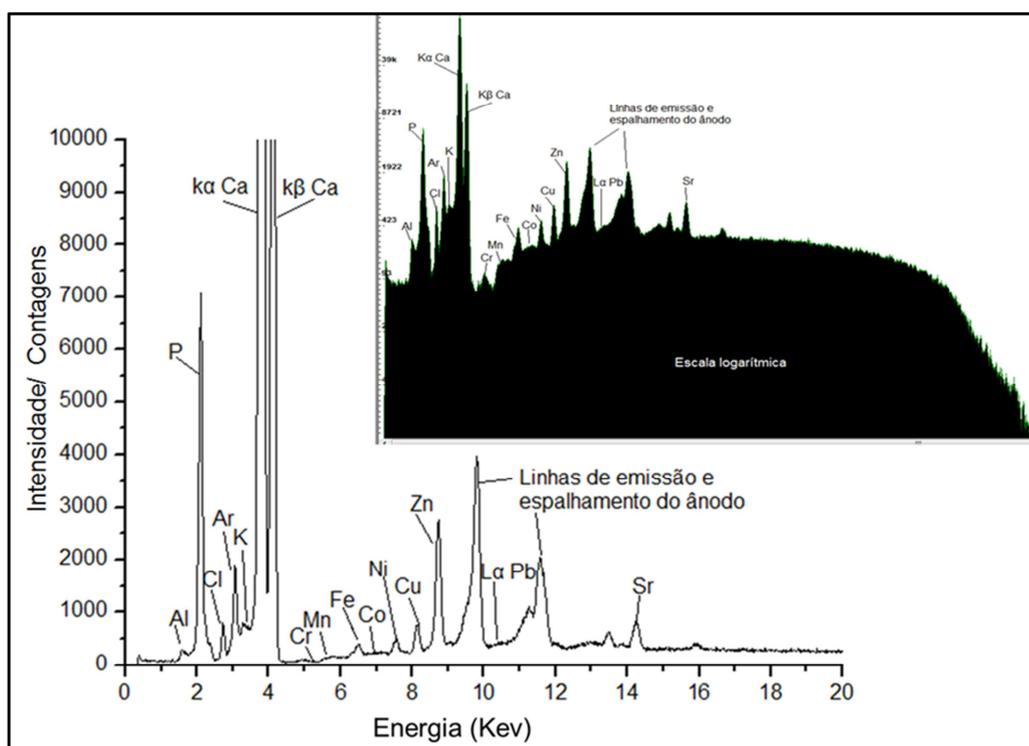


Figura 25: Ilustração dos espectros nas escalas linear e logarítmica da amostra ERV17(esmalte)
Fonte: Autoria própria

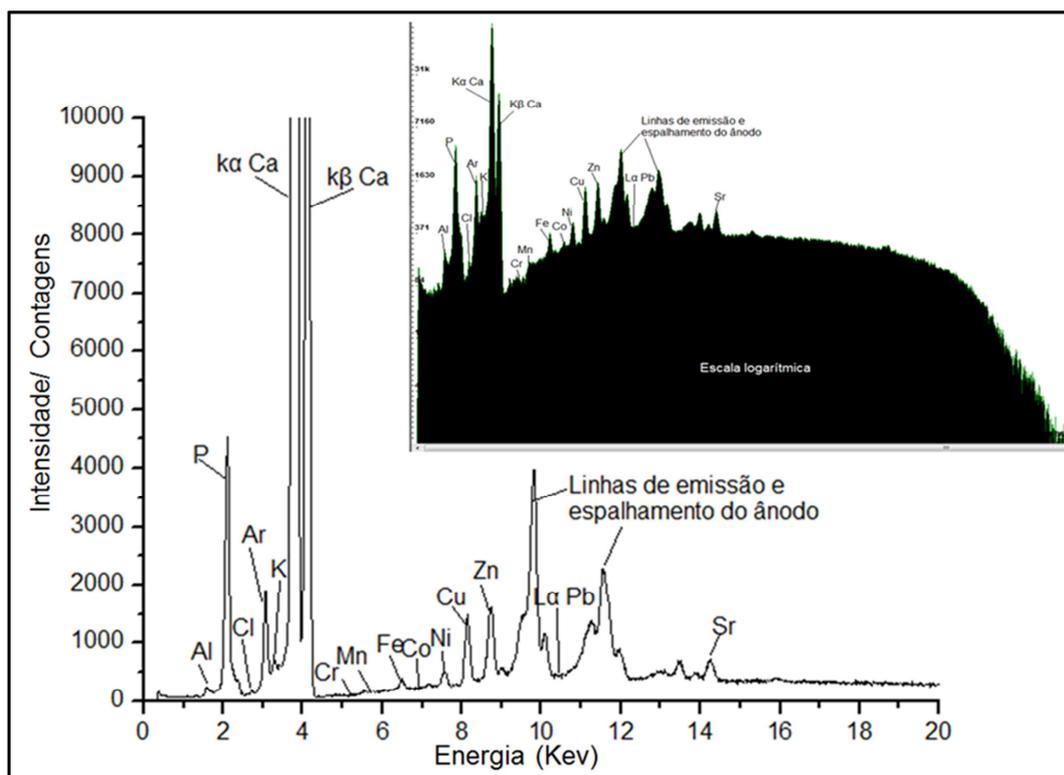


Figura 26: Ilustração dos espectros nas escalas linear e logarítmica da amostra ERV17(dentina)
Fonte: Autoria própria

O cálcio é o elemento encontrado em maior quantidade em dentes saudáveis, sendo confirmado nos estudos de OPREA e colaboradores (2009).

A eficiência da absorção do cálcio pelo organismo humano é influenciada, entre demais fatores, pela idade, genética e estado hormonal (DAWSON-HUGHES, 2006).

A absorção do cálcio é realizada indiretamente pelo hormônio do crescimento (GH). Refere-se à um mecanismo importante durante a fase de crescimento, em que o ganho de massa óssea é rápido (estirão pubertário) (FLEET, 2006; BAILEY ET AL., 1999).

Durante a fase da menopausa, com à redução do hormônio estrogênio, a absorção do cálcio pode ser ineficaz (FLEET, 2006). Há evidências de que esse hormônio apresenta efeito direto na absorção do cálcio (CIFUENTES ET AL., 2002). A absorção de cálcio diminui com a idade e sendo mais acentuada após os 75 anos (NORDIN ET AL., 2004).

O estrôncio é um elemento alcalino-terroso, tal como o cálcio e, por essa razão, apresentam muitas semelhanças como, por exemplo, o raio iônico (LIPPERT & HARA, 2013). No entanto, por ser mais reativo (RIYAT & SHARMA, 2010), o

estrôncio incorpora a hidroxiapatita por troca iônica com os íons Ca^{+2} perdidos durante o fenômeno de desmineralização-remineralização (LIPPERT & HARA, 2013).

O estrôncio é um elemento utilizado em pastas dentífricas há mais de 40 anos, pois acredita-se nas suas características preventivas em relação à cárie dentária, e também em relação à hipersensibilidade. Uma revisão literária sobre a eficácia de pastas de estrôncio e outras de potássio, realizada por KARIM & GILLAM (2013), revela que ambas apresentam capacidade de redução da cárie.

O zinco é um elemento que está presente de forma natural em todos os tecidos do organismo, inclusive nos dentes (CHASAPIS ET AL., 2011), incorporando-se a hidroxiapatita principalmente antes da erupção, apesar de poder ocorrer também no período pós-eruptivo devido à exposição salivar (ALOMARY, ET AL., 2012). Deste modo, considera-se normal ter sido detectado neste estudo.

Segundo os estudos de Lane & Peach (1995), o cobre e o ferro apresentam-se em quantidades ligeiramente inferiores nas mulheres, o que eles associaram, com a perda de sangue durante a menstruação. O Ca, Co e Ni também foram ligeiramente inferiores em mulheres mais idade, hipótese de ser indicativo de alterações na menopausa.

A fonte mais importante de poluição de chumbo é encontrada na gasolina, uma vez que a maior parte deste chumbo é emitido para a atmosfera. (RUTTER & JONES, 1983). O chumbo acumula-se nos ossos e dentes nos seres humanos (CURZON E CUTRESS, 1983). Nestes tecidos calcificados o chumbo é incorporado na hidroxiapatita, onde os íons chumbo substituem parcialmente os íons cálcio. (DALLEMAGNE, 1964). O chumbo encontrado nos ossos sofrem remodelação e são sujeitas a perdas, apatitas ósseas são retiradas por reabsorção para atender as necessidades fisiológicas. Esse processo não ocorre nos dentes, onde os depósitos de chumbo são considerados praticamente permanentes. STREHLOV & KNEIP (1969) encontraram que o teor de chumbo nos dentes é consideravelmente maior que no osso.

O estudo de BRUDEVOLD ET AL. (1977), demonstra que o teor de chumbo na dentina na região de coroa e dentina na raiz provavelmente estão relacionadas à inalação de chumbo devido ao teor de chumbo pela queima de combustíveis (gasolina) e conseqüente emissão na atmosfera. A principal origem do chumbo em todos os dentes estudados e pelo sangue pulpar. A diferença menos significativa no

esmalte está provavelmente relacionado ao fato de que o conteúdo de chumbo da saliva é inferior à do sangue.

Os dentes têm sido usados como um biomarcador para a exposição cumulativa ao chumbo (TVINNEREIM ET AL., 1997, URYU ET AL., 2004, BUDD ET AL., 2000, ALMEIDA ET AL., 2008, BUDD ET AL., 2004).

A análise química pode ser usada em conjunto com análises de paleopatologia para melhor entender a relação entre dieta, deficiências nutricionais e doenças em populações passadas (PRICE ET AL., 1985).

Os elementos traço incorporados ao organismo humano são representativos do meio ambiente, influenciados pelo consumo de água, alimentação, inalação de poeira, esporos e fumos. Foi hipotetizado que existem três fontes de oligoelementos no esmalte dentário, através de elementos intrínsecos incorporados durante a formação do dente, e elementos obtidos da troca com o suprimento de sangue da cavidade pulpar ou com saliva. Eles sugeriram que as duas últimas fontes seriam muito lentas e teriam contribuição mínima (LANE & PEACH, 1995).

4.2 Etapa exploratória para análises estatísticas

Os dentes foram divididos em masculino e feminino. Cada grupo foi dividido em incisivos, pré-molares, molares e terceiros molares (I, PM, M, 3M) para masculino e feminino, como ilustrado na Figura 27. Os dentes foram seccionados no sentido longitudinal, sendo separados em lado direito(1) e esquerdo(2), para análise do esmalte lado direito(1), esmalte lado esquerdo(2), dentina lado direito(1) e dentina lado esquerdo(2), posteriormente sendo atribuídos à essa sequência de estudo para cada grupo dentário.

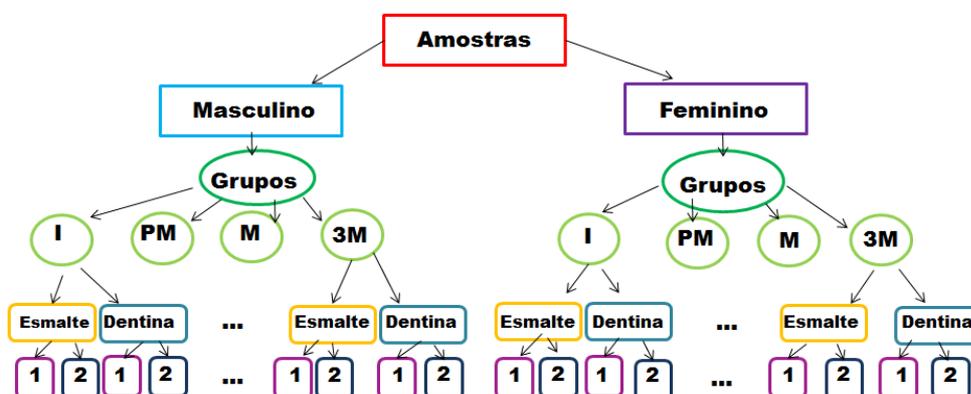


Figura 27: Diagrama para as análises estatísticas
Fonte: Autoria própria

4.2.1 Planejamento de experimentos

O planejamento de experimentos têm como finalidades: i) estabelecer os fatores que induzem na saída do processo, ii) regular e consolidar os fatores vulneráveis para obtenção de respostas de acordo com os valores esperados. É utilizado para aprimorar o processo, harmonizando os valores de saída aos requisitos nominais. Por consequência, restringir a mutabilidade e os custos. (BOX ET AL,1978; MONTGOMERY,2005).

A amostragem por conveniência (SILVA, 2004) foi selecionada para o estudo inicial, devido às restrições para a obtenção das unidades experimentais (dentes humanos), em relação à questão tempo: tempo de análise no equipamento para cada estrutura da unidade experimental (totalizando cerca de 72 minutos para cada unidade), disponibilidade/horário do equipamento, *dead time* do equipamento, tempo para análise dos espectros (qualitativamente e quantitativamente). Objetivando um estudo analítico, com complexidade de dados multivariáveis, formando-se um conglomerado da unidade amostral, estratificada e hierarquizada. A partir da amostragem por conveniência (SILVA, 2004), obteve-se um piloto gerando um plano amostral (definição dos grupos dentários/ estruturas/ gêneros/idades/ elementos químicos), resultando em amostras não probabilísticas (considerando as unidades amostrais como sendo homogêneas).

Para esse estudo foi selecionado o tratamento em blocos: planejamento em que os componentes experimentais são distribuídas em grupos ou blocos, priorizando para que fiquem o mais uniforme possível dentro de cada bloco. Os tratamentos são caracterizados aos componentes aleatoriamente, ocasionando a casualização feita dentro de cada bloco. (MONTGOMERY, 2005).

4.2.2 ANÁLISE DE GRUPOS EXPERIMENTAIS

A unidade experimental é o dente humano classificados por gênero masculino e feminino em dois grupos de estruturas dentárias: esmalte e dentina. Os tratamentos são as concentrações (g/cm^2) dos seguintes elementos químicos: Ca, Cu, Fe, Pb, Sr, e Zn.

Para o caso da análise de grupos experimentais (caso homocedástico), foram propostas as seguintes hipóteses:

$$\begin{cases} H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n \quad \forall i \\ H_1 : \exists \mu_i \neq \mu_j \quad \forall i \neq j \end{cases}$$

Onde: μ é a média das concentrações dos elementos químicos

A interpretação do teste estatístico foi realizada com base no nível de significância de $\alpha=5\%$. Os critérios padrões para a decisão das hipóteses, define a rejeição da hipótese nula H_0 quando o p-valor é inferior ao nível de significância pré-estabelecido

4.2.2.1 Análise conjunta (geral)

Essa análise refere-se à todo o experimento de forma completa. O modelo geral estatístico pode ser escrito por (3) (MONTGOMERY, 2005):

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{j(k)} + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + \epsilon_{ijk} \quad (3)$$

Onde: μ : constante; α : efeito do i-ésimo tratamento; $\beta_{j(k)}$: efeito do j-ésimo bloco dentro do k-ésimo local; τ_k : efeito do k-ésimo local; $(\alpha\tau)_{ik}$: interação entre a i-ésimo tratamento e o k-ésimo local γ . Com distribuições supostamente Gaussianas, independentes e identicamente distribuídas (IID), tal que $\epsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2_\epsilon)$.

Onde:

- **Locais:** referem-se à
 1. Primeiro experimento: masculino e feminino
 2. Segundo experimento: dentina e esmalte
- **Blocos:** referem-se aos
 1. Primeiro experimento: grupos dentários (I, PM, M, 3M)
 2. Segundo experimento: grupos dentários (I, PM, M, 3M)
- **Tratamentos:** referem-se aos
 1. Primeiro experimento: elementos químicos: Ca, Cu, Fe, Pb, Sr, e Zn
 2. Segundo experimento: elementos químicos: Ca, Cu, Fe, Pb, Sr, e Zn

Ou seja, foram executados dois experimentos para a verificação da disseminação dos elementos químicos nos dentes, tanto em relação ao gênero (masculino/feminino), quanto à sua estrutura (esmalte/dentina). O objetivo é verificar quantitativamente se há diferença entre a média das concentrações de cada elemento químico nas estruturas dentárias (esmalte e dentina) e nos gêneros (masculino e feminino).

4.2.2.2 Dentro dos locais

Nessa análise cada local (k), contém um experimento em particular, cujo modelo específico é dado pela Equação (4)

$$y_{ij(k)} = \mu + \tau_i + \beta_{j(k)} + \epsilon_{ij(k)} \quad (4)$$

Onde: μ : constante; τ : efeito do i -ésimo tratamento; $\beta_{j(k)}$: efeito do j -ésimo bloco dentro de cada local (k).

No croqui, representado pela Figura 28, estão identificados os locais, blocos e tratamentos para a realização das análises conjunta e dentro dos locais.

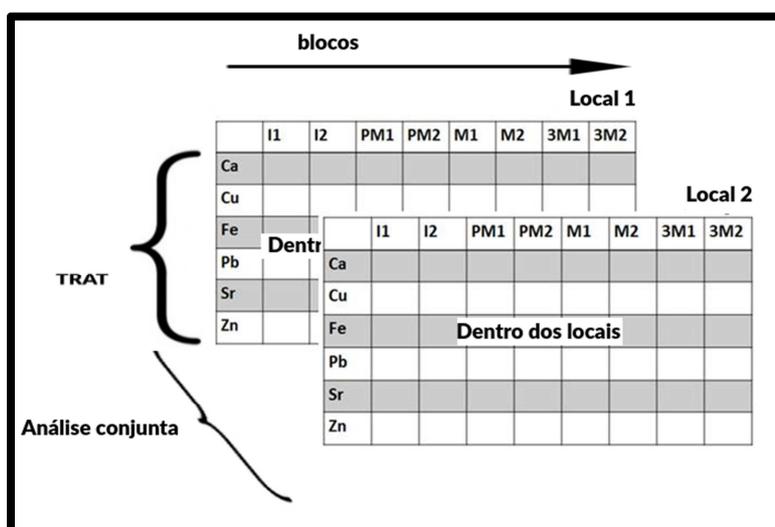


Figura 28: Croqui para as análises
Fonte: Autoria própria

Experimento 1: para feminino e masculino

Para a análise em conjunto, foi realizado um planejamento definido para a variável local (τ_k), como ilustra o croqui da Figura 29, pela variável sexo feminino (F) e masculino (M). São considerados os tratamentos (α) os elementos químicos: Ca,

Cu, Fe, Pb, Sr, e Zn, bloqueados pelos grupos dentários incisivos (I), pré-molares (PM), molares (M), e terceiros molares (3M). A proposta da análise é verificar se há diferença entre a concentração dos elementos químicos (tratamentos) e os locais (masculino e feminino), ilustrado na Figura 29. Foram configurados dois blocos: um referente ao grupo masculino e outro bloco feminino. Em cada bloco foram colocados no eixo horizontal os grupos dentários (I, PM, M, e 3M, lados 1 e 2), e no eixo vertical os elementos químicos (Ca, Cu, Fe, Pb, Sr, e Zn).

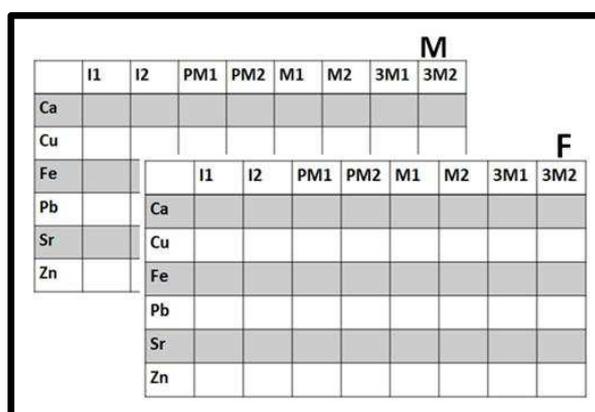


Figura 29: Croqui dos grupos dentários e elementos químicos para masculino e feminino
Fonte: Autoria própria

A Tabela 1 de ANOVA para o experimento geral mostra que há diferença significativa entre os elementos químicos (tratamentos). Isto é, sugere que algum ou vários diferem-se entre si (p -valor $\ll 0,05$). Por outro lado, os sexos (masculino e feminino) sugerem não apresentar diferenças.

Tabela1: Análise do experimento para masculino e feminino (ANOVA)

Fontes de variação	GL	SumSQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
local	1	1.070e+05	1.070e+05	0.048	0.827
trat	5	1.032e+11	2.064e+10	9181.370	<2e-16 ***
local:dente	14	5.000e+07	3.571e+06	1.588	0.077
local:trat	5	5.351e+05	1.070e+05	0.048	0.999
Residuals	649	1.560e+09	2.248e+06		

Fonte: Autoria própria

Ao analisar dentro dos locais (masculino e feminino), demonstrado nas Tabelas 2 e 3, foram observados que a diferença está nos tratamentos (elementos químicos) (p -valor $\ll 0,05$), não nos blocos (grupos dentários). Isso confirma a análise antecedente em que, pelo menos um elemento químico diferencia-se dos demais, independentemente do sexo.

Tabela 2: Análise do experimento para feminino (ANOVA)

Fontes de variação: F	GL	SumSQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
bloco	7	8.6935e+06	1.2419e+06	0.5383	0.8053
trat	5	5.1845e+10	1.0369e+10	4494.3470	<2e-16 ***
Residuals	347	8.0056e+08	2.3071e+06		

Fonte: Autoria própria

Tabela 3: Análise do experimento para masculino (ANOVA)

Fontes de variação: M	GL	SumSQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
bloco	7	4.1306e+07	5.9008e+06	2.6947	0.009908 **
trat	5	5.1375e+10	5.9008e+06	4692.2335	<2e-16 ***
Residuals	347	7.5985e+08	2.1898e+06		

Fonte: Autoria própria

O Teste de Tukey, verifica quais os pares que diferenciam-se entre si. Tais pares são *Ca-Pb*, *Ca-Sr*, *Ca-Fe*, *Ca-Cu*, *Ca-Zn*, com o cálcio com maior concentração do que os demais elementos químicos. Verificou-se que os pares combinados com o elemento Ca, possuem maior diferença, ao fato, de que o cálcio é o elemento majoritário e em maior concentração. Essa análise é esperada, pois na composição do dente, seu conteúdo mineral é composto por cristais de hidroxiapatita (HA), de fórmula química: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, incorporados em uma matriz proteica orgânica (NANCI, 2013).

O Gráfico 1, demonstra o local (M/F), onde foi verificada a presença de uma linha contínua vertical vermelha, que indica a presença da diferença nula (“zero”), indicando que não há diferença nas concentrações de pares de elementos químicos. Como houve essa interceptação pelo zero, significa que não houve diferença entre os sexos masculino e feminino (variável local). No gráfico do tratamento, os elementos químicos que interceptaram o zero, significam que não houve diferença entre eles, resultando em concentrações equivalentes, enquanto que nos elementos que não interceptaram o valor nulo, tais como: *Ca-Pb*, *Ca-Sr*, *Ca-Fe*, *Ca-Cu*, *Ca-Zn*, houve diferença significativa nas concentrações entre eles, vide gráfico 1.

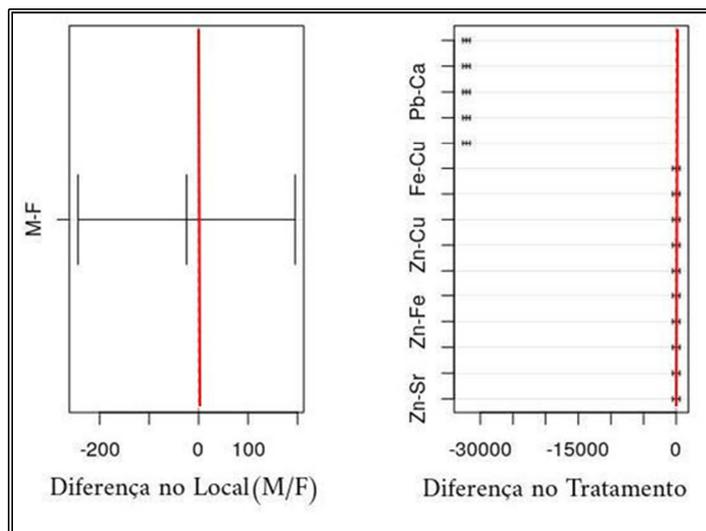


Gráfico 1 : Análise Tukey para masculino e feminino
Fonte: Autoria própria

Experimento 2: esmalte e dentina

Para a análise em conjunto, foram configurados dois blocos para esmalte e dentina, representado pelo croqui na Figura 30: um bloco referente ao esmalte e outro bloco para dentina. Em cada bloco foram colocados no eixo horizontal os grupos dentários (I, PM, M, e 3M, lados 1 e 2), e no eixo vertical os elementos químicos (Ca, Cu, Fe, Pb, Sr, e Zn), conforme o croqui apresentado na figura 30.

		E							
		I1	I2	PM1	PM2	M1	M2	3M1	3M2
Ca									
Cu									
		D							
		I1	I2	PM1	PM2	M1	M2	3M1	3M2
Fe									
Pb	Ca								
Sr	Cu								
Zn	Fe								
	Pb								
	Sr								
	Zn								

Figura 30: Croqui dos grupos dentários e elementos químicos para esmalte e dentina
Fonte: Autoria própria

Na análise de variância observa-se que há diferença significativa entre os grupos dentários (esmalte e dentina) (p -valor= 0.003).

Em ambos os grupos, para esmalte e dentina, há diferença significativa nos tratamentos (elementos químicos), como podemos observar para um p-valor $\ll 5\%$.

Essa diferença é constatada, pois o esmalte dentário é constituído por uma parte orgânica e uma parte inorgânica (GHADIMI, ET AL., 2013), sendo o tecido calcificado mais duro do corpo humano, composto por 96% de matéria inorgânica, predominantemente de hidroxiapatita; e 4% de matéria orgânica (HANĆ, ET AL., 2013). Os elementos como: Na, Mg, K, Cl, Zn, Fe e Sr, são incorporados na parte inorgânica do esmalte. (CASTRO ET AL., 2010). A dentina é formada por 70% de matéria inorgânica mineralizada, e de matéria orgânica correspondendo a 20% (HANĆ, ET AL., 2013). Comparando-se a dentina com o esmalte, a dentina é um tecido menos duro e menos mineralizado que o esmalte (CASTRO, ET AL., 2010).

Tabela 4 de análise ANOVA para o experimento geral mostra que há diferença significativa entre os elementos químicos (tratamentos), isto é, sugere que algum ou vários diferem-se entre si (p-valor $\ll 0,05$). Da mesma forma o grupo das estruturas (dentina e esmalte) parecem apresentar diferenças significativa.

Tabela 4: Análise do experimento para Esmalte e Dentina (ANOVA)

Fontes de variação: E/D	GL	SumSQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
grupo	1	1.803e+07	1.803e+07	8.509	0.00365 **
trat	5	1.032e+11	2.064e+10	9743.775	<2e-16 ***
grupo:dente	14	3.255e+07	2.064e+10	1.097	0.35624
grupo:trat	5	9.013e+07	1.803e+07	8.508	7.87e-08 ***
Residuals	694	1.470e+09	2.119e+06		

Fonte: Autoria própria

Ao analisar dentro dos locais (esmalte e dentina), como mostrado nas Tabelas 5 e 6, foram observados que a diferença está nos tratamentos (elementos químicos), com p-valor $\ll 0,05$, e também nos blocos (dente). Isso significa que pelo menos um elemento químico ou/e um grupo dentário diferencia-se dos demais, independentemente do sexo.

Tabela 5: Análise do experimento para esmalte (ANOVA)

Fontes de variação: E	GL	SumSQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
dente	7	1.3241e+07	1891544	0.7998	0.5879
trat	5	4.8604e+10	9720840455	4110.0608	<2e-16 ***
Residuals	347	8.2070e+08	2365133		

Fonte: Autoria própria

Tabela 6: Análise do experimento para dentina (ANOVA)

Fontes de variação: D	GL	SumSQ	Mean SQ	F value	Pr(>F)
dente	7	1.9307e+07	2.7582e+06	1.4733	0.1756
trat	5	5.4704e+10	1.0941e+10	5843.9350	<2e-16 ***
Residuals	347	6.4965e+08	1.8722e+06		

Fonte: Autoria própria

O Teste de Tukey obteve a mesma resposta do experimento 1, nos quais os pares que diferenciam-se entre si foram *Ca-Pb*, *Ca-Sr*, *Ca-Fe*, *Ca-Cu*, *Ca-Zn*. De fato, o cálcio têm maior concentração do que os demais elementos químicos. O Gráfico 2 mostra-nos diferença na concentração dos elementos químicos entre o esmalte (E) e a dentina (D). Como no experimento anterior, os elementos que não interceptaram o zero foram os mesmos.

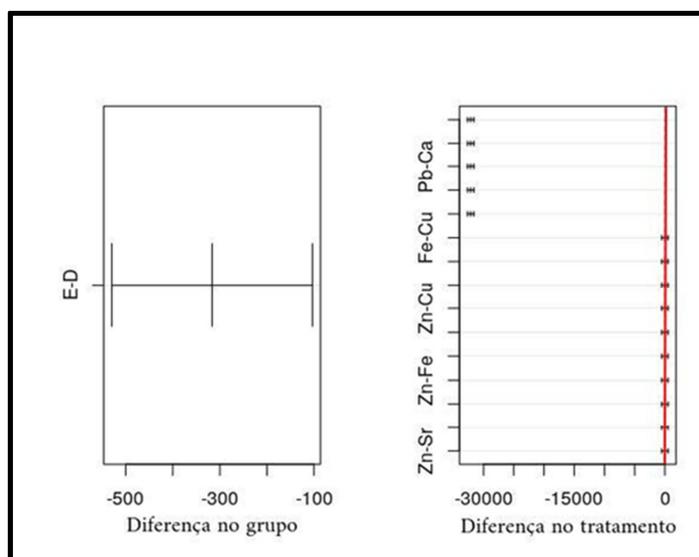


Gráfico 2: Análise Tukey para esmalte e dentina
Fonte: Autoria própria

Após os resultados dos experimentos 1 e 2, foram observados inicialmente que não houve diferenças significativas para os grupos masculino e feminino em relação aos dentes analisados, mas detectou-se diferença significativa entre os elementos químicos que compõe o dente masculino e feminino ($p < 0.05$).

Em relação às estruturas dentárias esmalte e dentina, foram observadas diferenças significativas tanto na estrutura quanto nos elementos químicos analisados ($p < 0.05$). Através desses resultados de variâncias, utilização do teste Tukey, a verificação da homocedasticidade das amostras pelo teste Hartley, verificou-se a existência da normalidade e independência das amostras, sendo possível desenvolver as análises seguintes.

4.3 Resultados das análises estatísticas para os elementos: Ca, Sr, Fe, Zn e Pb

4.3.1 Análise estatística

Para a análise probabilística foram desenvolvidas as seguintes hipóteses:

- Hipótese para a média

$$H_0: \mu_F = \mu_M \text{ (masculino e feminino)}$$

$$H_1: \mu_F \neq \mu_M \text{ (masculino e feminino)}$$

$$H_0: \mu_E = \mu_D \text{ (esmalte e dentina)}$$

$$H_1: \mu_E \neq \mu_D \text{ (esmalte e dentina)}$$

- Hipótese para a variância

$$H_0: \sigma^2_F = \sigma^2_M \text{ (masculino e feminino)}$$

$$H_1: \sigma^2_F \neq \sigma^2_M \text{ (masculino e feminino)}$$

$$H_0: \sigma^2_E = \sigma^2_D \text{ (esmalte e dentina)}$$

$$H_1: \sigma^2_E \neq \sigma^2_D \text{ (esmalte e dentina)}$$

Com isso, foi estabelecido uma diretriz para as análises do elementos: Ca, Sr, Fe, Zn e Pb

- Inicialmente foram verificadas na análise geral as médias e variâncias, considerando as concentrações totais das amostras (esmalte + dentina), dos grupos dentários (I, PM, M e 3M), comparando com masculino e feminino;
- Foram analisadas as médias de concentrações e as variâncias para
 1. Os elementos para masculino e feminino
 2. As estruturas esmalte e dentina
- Foram analisadas, independentemente as estruturas de esmalte e dentina;
- Foram analisados os elementos químicos, correlacionando-os com as estruturas de esmalte, dentina e os grupos dentários

4.3.2 Análise de agrupamentos

A análise de agrupamentos foi executada por duas técnicas diferentes: k-means e dendograma. A técnica k-means têm como objetivo particionar um conjunto

de dados em subgrupos próximos entre si, gerando assim os “*Clusters*”. É um algoritmo heurístico de procura (WU, 2012). A finalidade é classificar elementos pertencente ao grupo mais próximo possível de sua informação. A outra técnica utilizada foi o dendograma. Nada mais do que uma apresentação hierárquica da proximidade das variáveis, criando-se assim uma árvore de elementos parecidos (HAIR ET AL., 2012). Ambas as técnicas de agrupamentos foram usadas nesse trabalho, a fim de identificar grupos parecidos entre si.

- Foram analisadas as dispersão pela técnica de agrupamento *k-means* do elemento correlacionando com os grupos dentários e idade.

4.4 RESULTADOS PARA O ELEMENTO CÁLCIO

4.4.1 Análise geral

Na análise geral, considerando-se todos os dentes do grupo amostral dessa pesquisa, tanto para masculino e feminino, pelo teste t-Student, não houve diferença significativa em relação ao elemento cálcio, resultando no p-valor=0.2231 e no teste variacional não houve diferença significativa com p-valor=0.6818.

Na análise geral, foi encontrado concentração máxima de 38.66 g/cm² de cálcio no grupo feminino, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7: Relação das concentrações de cálcio (g/cm²), para os gêneros

Cálcio	mínimo	máximo	média	desvio padrão
Masculino	26.55	37.53	31.52	3.429
Feminino	26.42	38.66	32.41	3.641

Fonte: Autoria própria

A média da concentração de cálcio comparada para todos os dentes, independente do gênero, na dentina foi de 32.89540 g/cm² e para o esmalte foi de 31.03031 g/cm². Essa diferença de concentração é significativa quando comparada na estrutura dentária.

Ambas as médias da concentração de cálcio na dentina e no esmalte diferem entre si conforme o teste t-Student para a hipótese da igualdade das médias:

$$H_0: \mu_{\text{dentina}} = \mu_{\text{esmalte}} \text{ (p-valor=0.009265).}$$

Por outro lado, não há diferença significativa em sua variabilidade, conforme o teste F-Snedecor para:

$$H_0: \sigma^2_{\text{dentina}} = \sigma^2_{\text{esmalte}} \text{ (p-valor= 0.5217).}$$

Na segunda etapa, mantendo fixas as estruturas de dentina e esmalte, comparando entre os gêneros masculino e feminino, tem-se que a concentração de cálcio encontrada para o sexo masculino na dentina foi 32.45433 g/cm² e no esmalte foi de 30.58600 g/cm².

No caso feminino, os resultados encontrados foram 33.33646 g/cm² e 31.47462 g/cm² para a dentina e esmalte, respectivamente, No Gráfico 3 mostra a dispersão do elemento cálcio em relação aos grupos masculino e feminino.

Considerando-se o grupo amostral dessa pesquisa, observa-se que a média da concentração do elemento cálcio, tanto em esmalte e dentina, é relativamente maior no grupo feminino, quando comparado ao masculino.

Essa diferença de $\Delta Ca \approx 0,8821$ para dentina e $\Delta Ca \approx 0,88862$ para o esmalte são relevantes para o feminino, correspondendo com 2,7% da maior concentração de cálcio.

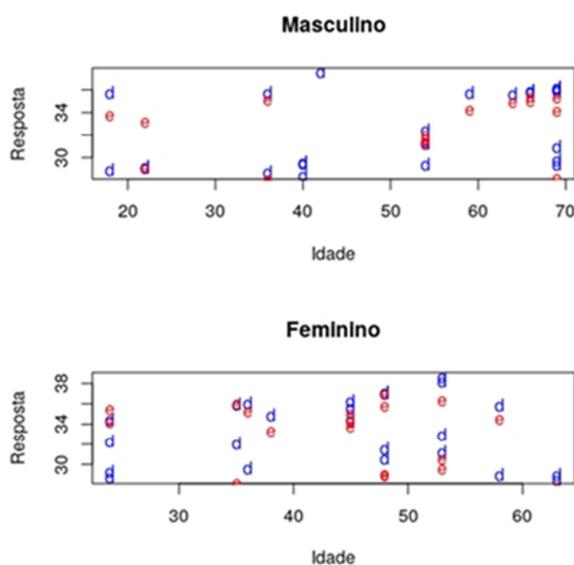


Gráfico 3: Dispersão da média da concentração de cálcio para masculino e feminino.
Fonte: Autoria própria

De acordo com o teste t-Student para averiguar a hipótese:

$$H_0: \mu_{dentina} = \mu_{esmalte},$$

Para as médias da dentina e do esmalte, com relação ao elemento cálcio para masculino e feminino, praticamente não existe diferença significativa entre ambas as médias no grupo amostral analisado, resultando em um p-valor = 0.05825 para masculino e p-valor de 0.07637 para feminino, não conclusivo para esse grupo

amostral analisado. O Gráfico 4, apresenta a dispersão do elemento cálcio para as estruturas de dentina e esmalte.

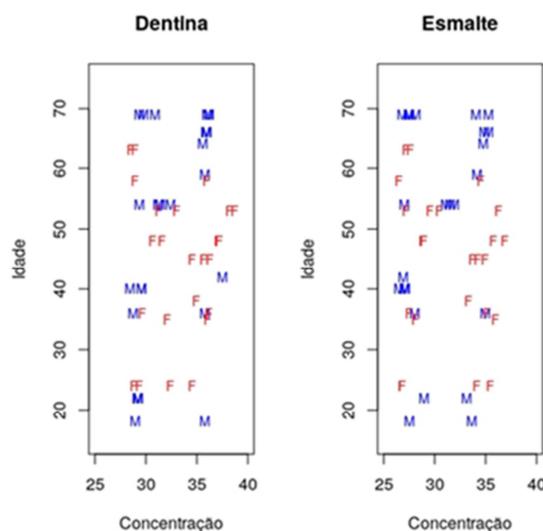


Gráfico 4: Dispersão de cálcio para dentina e esmalte
Fonte: Autoria própria

Na análise comparativa entre as dentinas para os sexos masculino e feminino e a análise comparativa entre esmaltes para masculino e feminino foram realizados o teste t-Student para verificar a média da concentração do elemento cálcio na estrutura da dentina e esmalte para os gêneros poderá ser verificada na Tabela 8. Embora ambas as diferenças com relação ao gênero feminino são maiores proporcionalmente, esses valores são não significativos para o esmalte e dentina respectivamente.

Tabela 8: Diferenças nas estruturas dentárias com relação ao gênero

	Média M	Média F	p-valor	Diferença com relação ao gênero feminino
Esmalte	30,58600	31,47462	0.3978	+ 2,9% mas não significativo
Dentina	32,45433	33,33646	0.3561	+ 2,7% mas não significativo

Fonte: Autoria própria

O Gráfico 5, determina os pontos referentes aos terceiros molares (preto), incisivos (vermelho), molares (azul) e pré-molares (verde), subdividido em grupos por gênero. A análise k-mens selecionou, para $R^2=95\%$, quatro grupos masculinos e cinco grupos femininos, em ambos os gêneros masculino e feminino. Os terceiros molares apresentam concentração de Ca na faixa etária entre os 20 anos em ambos os gêneros (considerando que as amostras de dentes cedidos pelos doadores concentravam-se na faixa entre 18 e 28 anos). Os incisivos apresentaram

distribuição na faixa entre os 40 até 70 no masculino, enquanto no feminino está mais concentrado nas faixas entre 45 a 55 anos.

Os pré-molares apresentam concentração de Ca na faixa dos 40 anos e posteriormente na faixa entre 60 e 70 anos no sexo masculino. Nas mulheres o comportamento da concentração de Ca em pré-molares apresenta-se de maneira distribuída nas faixas etárias entre 35 a 60 anos.

Os molares demonstram maior concentração na faixa acima dos 60 anos no gênero masculino, Já no feminino presumem comportamento semelhante aos pré molares, com distribuição englobando as faixas etárias entre 35 a 65 anos.

Considerando-se o grupo amostral dessa pesquisa, pode-se supor que as concentrações médias de Ca ocorrem em concentrações maiores nos dentes molares, pré-molares e terceiros molares no sexo masculino, podendo ser observado o mesmo comportamento no sexo feminino, porém compreendendo faixas etárias diferentes para ambos os sexos. Adicionalmente, de acordo com média das concentrações de Ca entre os sexos, nota-se uma oscilação no grupo amostral feminino, enquanto no masculino sugere um comportamento crescente em relação à idade.

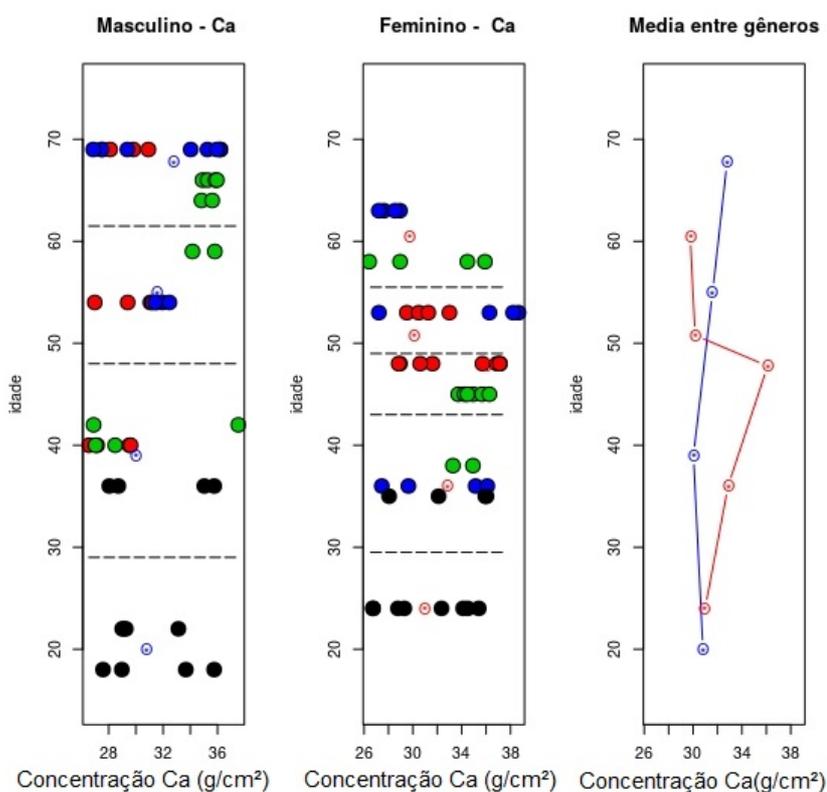


Gráfico 5: Dispersão do elemento cálcio para os sexos com K-means
Fonte: Autoria própria

A hipótese nula, em que não há diferença entre a concentração média de cálcio em ambos os sexos, não foi rejeitada a um p-valor de 0.2231. Isso implica em dizer que a concentração de cálcio no masculino foi de 31.52017 g/cm², enquanto no feminino foi de 32.40554 g/cm². Não há variação da concentração de cálcio entre os sexos. O Gráfico 6, apresenta as médias das concentrações do elemento cálcio em relação à idade. O grupo feminino apresenta oscilação compreendendo a faixa entre 35 a 50 anos, enquanto no masculino nota-se um crescimento com a idade.

4.3.2 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas

Nesta etapa foram analisadas as médias das concentrações e variâncias de forma independente, separando-se as estruturas de esmalte e dentina.

4.3.2.1 Esmalte: comparação entre sexos

Considerando-se o grupo amostral analisado, observa-se pouca diferença significativa na média da concentração do elemento cálcio no esmalte em incisivos ($p=0.05536$). Não houve diferença significativa na variabilidade entre os grupos de dentes analisados, demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9: Análise estatística para média e variâncias no esmalte

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	27.980	31.729	0.05536	N.S.*	0.1599	N.S.
Pré-molares	31.106	30.158	0.6819	N.S.	0.6819	N.S.
Molares	32.181	32.845	0.7598	N.S.	0.6167	N.S.
3 ^o Molares	31.075	31.165	0.9689	N.S.	0.5036	N.S.

Fonte: Autoria própria. (*) não decisivo para 5%.

O Gráfico 6, evidencia uma discreta diferença na média das concentrações (g/cm²) nos incisivos, apresentando maior média das concentrações no feminino, para o elemento cálcio.

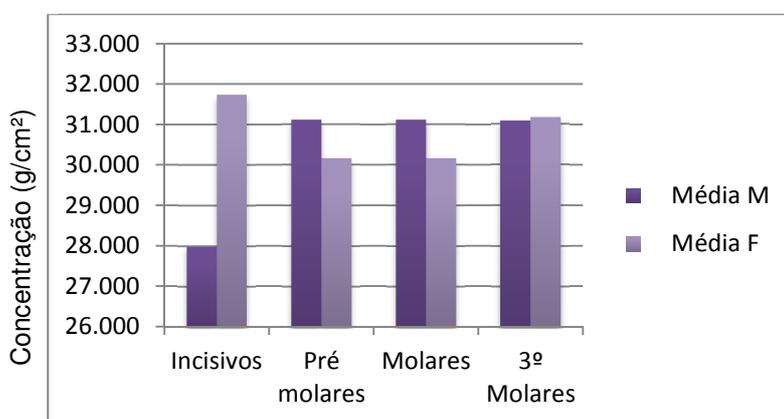


Gráfico 6: Média da concentração do cálcio no esmalte em relação aos grupos dentários.

Fonte: Autoria própria

4.3.2.2 Dentina: comparação entre sexos

A Tabela 10 mostra uma diferença significativa na média das concentrações e na variabilidade do elemento cálcio no esmalte em incisivos quando comparado entre feminino e masculino.

Tabela 10: Análise estatística para média e variâncias na dentina

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	30.084	33.454	0.03711	S.	0.01117	S.
Pré-molares	33.600	33.348	0.9155	N.S.	0.3001	N.S.
Molares	31.691	34.366	0.7762	N.S.	0.7329	N.S.
3º Molares	31.263	32.176	0.6607	N.S.	0.667	N.S.

Fonte: Autoria própria

O Gráfico 7, traz a diferença na média das concentrações no grupos dos incisivos, na análise em dentina, sendo maior no grupo feminino. Demonstra também a presença de maiores médias das concentrações de cálcio no grupos dos molares para ambos os sexos.

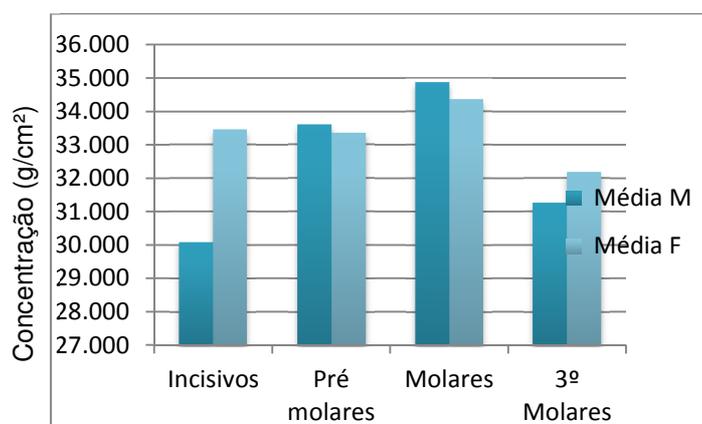


Gráfico 7: Relação das médias da concentrações do cálcio na dentina
Fonte: Autoria própria

4.3.3. Análise dos grupos dentários em relação ao elemento cálcio para feminino e masculino

O Gráfico 8, apresenta os boxplots com as médias das concentração de cálcio para os gêneros masculino e feminino. Foi observado que na dentina é superior que o esmalte para ambos os gêneros. Verifica-se que as maiores dispersões dos dados estão no M- feminino e M -masculino.

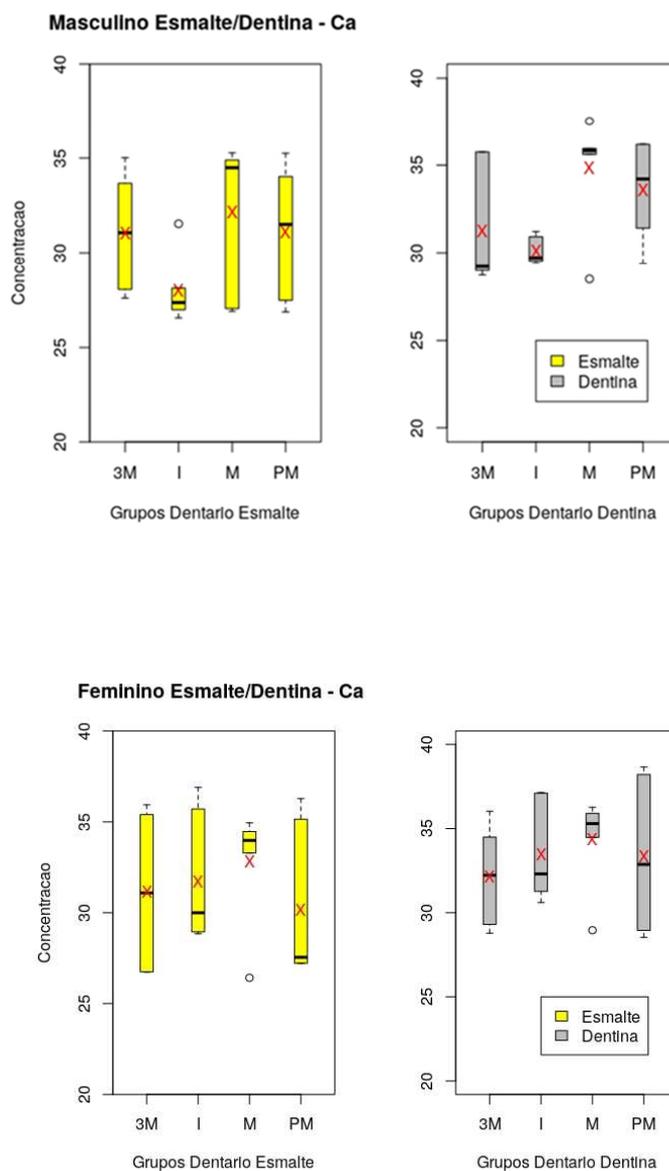


Gráfico 8: Boxplots com as concentrações de cálcio distribuídas nos grupos dentários, e suas respectivas médias em x vermelho.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 11 representa os boxplots masculino e feminino numericamente, observa-se que o grupo masculino apresentou uma diferença significativa na média das concentrações nos incisivos ($p=0.03646$). E no grupo feminino não houve diferença significativa na média e na variabilidade.

Tabela 11: Análise das médias e variâncias conforme os boxplots

Feminino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	33.454	31.729	0.3869	N.S.	0.6677	N.S.
Pré-molares	34.366	30.158	0.2549	N.S.	0.8182	N.S.
Molares	33.348	32.845	0.3971	N.S.	0.7359	N.S.
3º molares	32.176	31.165	0.6497	N.S.	0.3469	N.S.
Masculino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	30.084	27.980	0.03646	S.*	0.00869	S.*
Pré-molares	33.600	31.106	0.2036	N.S.	0.7544	N.S.
Molares	34.869	32.181	0.2331	N.S.	0.6195	N.S.
3º molares	31.263	31.075	0.9248	N.S.	0.8734	N.S.

Fonte: Autoria própria. (*) Não decisivo para 5%.

4.3.4 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os gêneros

Considerando-se o grupo amostral analisado, a Tabela 12 mostra, uma diferença significativa na média das concentrações do cálcio em dentina nos incisivos ($p=0.037$), e na variabilidade em dentina nos incisivos ($p=0.011$), quando compara-se feminino e masculino.

Tabela 12: Análise comparativa entre os grupos dentários (estruturas) com os gêneros

	Média M	Média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Esmalte I	27.980	31.729	0.055	N.S.	0.159	N.S.
Dentina I	30.084	33.454	0.037	S.	0.011	S.
Esmalte PM	31.106	30.158	0.681	N.S.	0.610	N.S.
Dentina PM	33.600	33.348	0.915	N.S.	0.300	N.S.
Esmalte M	32.181	32.845	0.759	N.S.	0.616	N.S.
Dentina M	34.869	34.366	0.776	N.S.	0.732	N.S.
Esmalte 3M	31.075	31.165	0.968	N.S.	0.503	N.S.
Dentina 3M	31.263	32.176	0.629	N.S.	0.660	N.S.

Fonte: Autoria própria

A média das concentrações apresenta-se maior nos molares na estrutura da dentina para ambos os sexos. A menor quantidade pode ser observada em incisivos masculino na estrutura de esmalte, demonstrado no Gráfico 9.

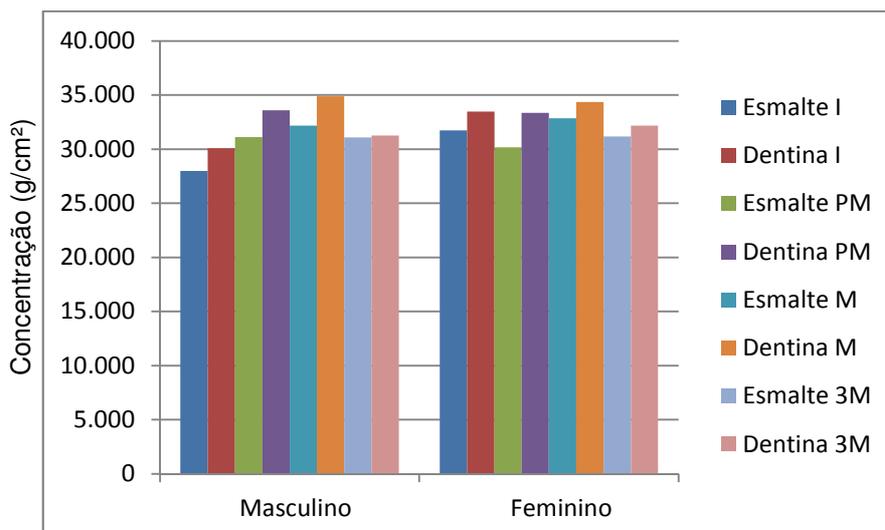


Gráfico 9: Distribuição das médias das concentrações de cálcio nos grupos dentários de acordo com as estruturas de esmalte e dentina.

Fonte: Autoria própria

4.3.5 Dendograma para o elemento cálcio

A relação da distribuição de peso do cálcio em relação às estruturas esmalte e dentina nos incisivos, pré-molares, molares e terceiros molares nos sexos masculino e feminino, ilustrada na Figura 31. No masculino observa-se que a soma dos pesos das médias das concentrações de cálcio no molares (dentina) e pré molares(esmalte), possuem maior peso em comparação aos demais grupos dentários. No feminino a média da concentração de cálcio possui peso maior em pré molares.

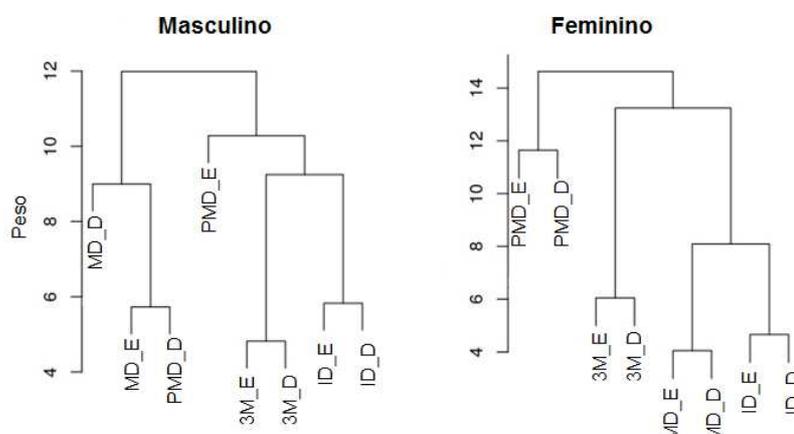


Figura 31: Dendograma do elemento cálcio

Fonte: Autoria própria

4.3.6 Matriz de correlação:

A correlação entre os dentes analisados em função do elemento cálcio pode ser observada na Figura 32. Quanto maior os círculos, maior é a correlação. Quando tendem à cor vermelha mais negativa é, enquanto a tendência para a cor azul será positiva. Observa-se que existe uma maior correlação do elemento cálcio no grupo masculino, comparado ao grupo feminino.

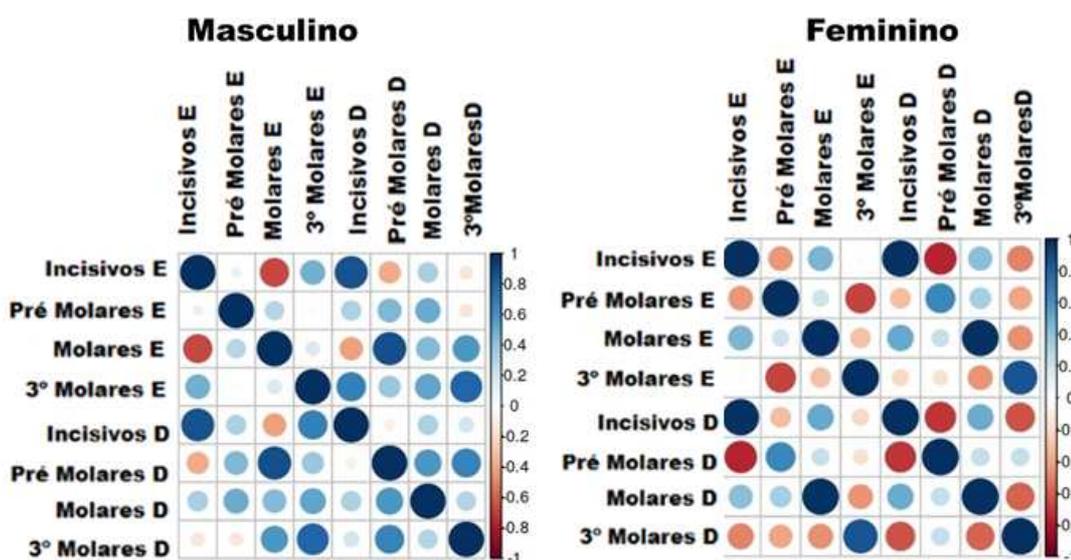


Figura 32: Matriz de correlação para o elemento cálcio
Fonte: Autoria própria

4.4 RESULTADOS PARA O ELEMENTO ESTRÔNCIO

4.4.1 Análise geral

Na análise geral, considerando-se todos os dentes do grupo amostral dessa pesquisa tanto para masculino e feminino, não houve diferença significativa em relação ao elemento estrôncio resultando no $p=0.5054$ e no teste variacional houve diferença significativa com $p=0.008736$. No Gráfico 10, foram observadas dispersões semelhantes para os sexos, em relação ao elemento estrôncio.

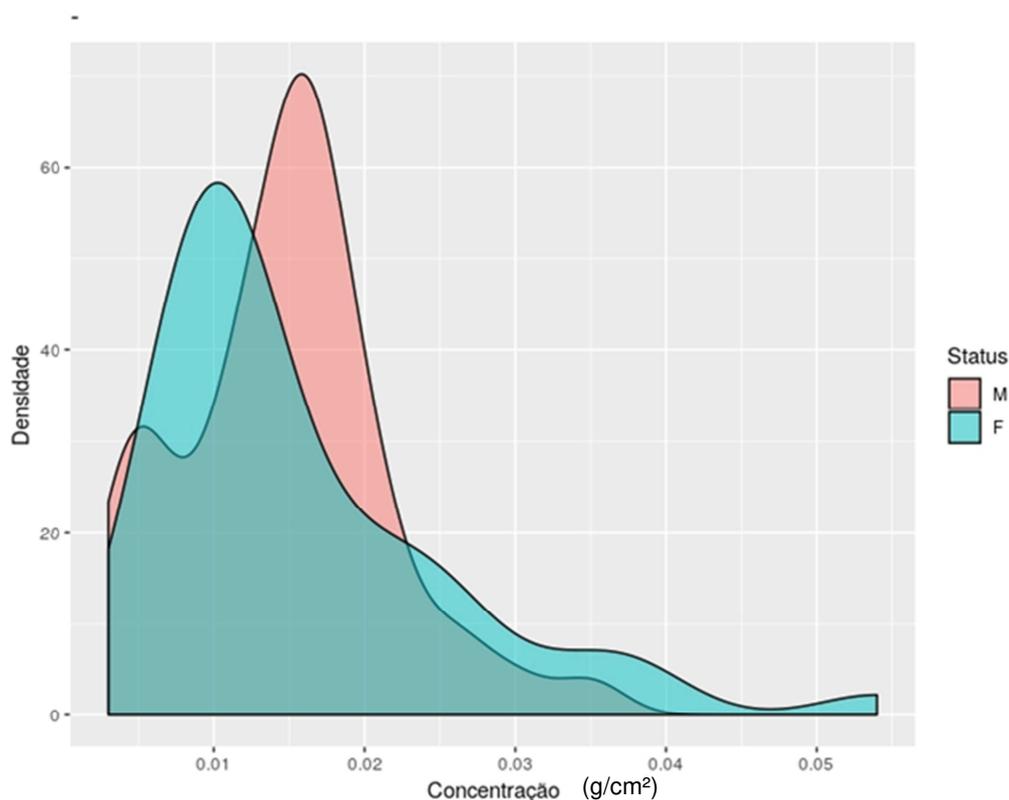


Gráfico 10: Relação da densidade x concentração (g/cm²) do estrôncio para masculino e feminino

Fonte: Autoria própria

Na análise geral, foram encontrados com concentração máxima de 0.05 g/cm² de cálcio no grupo feminino, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13: Relação das concentrações de estrôncio (g/cm²), para os sexos

Estrôncio	mínimo	máximo	média	desvio padrão
Masculino	0.00300	0.03500	0.01500	0.006898935
Feminino	0.00500	0.05400	0.01200	0.01018203

Fonte: Autoria própria

A média da concentração de estrôncio comparada para todos os dentes masculino na dentina é de 0.01666667 g/cm². Para o esmalte foi de 0.01262500 g/cm². A concentração de dentina e esmalte diferem entre si com p-valor= 0.04141 pelo teste t-Student, ou seja, há ganho de 24,25% da concentração de estrôncio na dentina quando comparada ao esmalte é sim significativo. Porém, ainda se encontra na margem de decisão, necessitando de um número maior amostral.

Com relação às amostras feminina, a média das concentrações de estrôncio na dentina foi de 0.01925000 g/cm² e para o esmalte foi de 0.01241667 g/cm², implicando um ganho maior de 35,4% no caso feminino. A concentração de dentina

e esmalte, considerando ambos os sexos, diferem entre si com p-valor= 0.0198 pelo teste t-Student.

De fato, parece haver maior concentração de estrôncio nas amostras de dentina que no esmalte, Em média uma diferença de $\mu_{M_dentina} - \mu_{M_esmalte} = 0.00404167$ para o masculino e uma diferença $\mu_{F_dentina} - \mu_{F_esmalte} = 0.00683333$ para o feminino, ambos com 95% de confiança. Com relação aos gêneros, a diferença na concentração de estrôncio independente da estrutura, não é significativa, denotando p-valor =0.6459.

A análise da variância refere-se ao sexo masculino para dentina e esmalte o p-valor foi de 0.2324, enquanto no feminino o p-valor foi de 0.001943. Esse resultado é esperado, pois houve a diferença das médias entre a dentina e o esmalte. O caso masculino, quase não apresentou diferença, conforme indica a variabilidade com p-valor>5%. Por outro lado, no caso feminino, essa diferença nas médias implicou também a uma diferença significativa p-valor >5%.

Essas características gerais para a dentina do Sr (dentina)=0.01795833 ± 0.01008466 recaem a um coeficiente variacional, Equação (5), no estrôncio de 56,15%, enquanto para o esmalte Sr (esmalte)= 0.01252083 ± 0.005932204 um C.V. de 47,37% para o esmalte considerando geral independente dos sexos. Tais medidas exploratórias indicam que, de fato existe maior concentração de estrôncio na dentina do que no esmalte independente do sexo.

$$CV\% = \frac{\sigma}{\mu} \cdot 100 \% \quad (5)$$

Onde: CV representa o coeficiente variacional, σ : desvio padrão, μ : média dos dados (EVERITT, 1998).

Considerando uma incerteza maior na dentina em relação ao esmalte, de acordo com a literatura, é mais confiável a análise no esmalte do que na dentina, como afirmam vários autores, mesmo sob grandes distorções dada pela incerteza na medida. A análise do esmalte é preferível que à do osso, porque é altamente resistente à mudança diagenética em uma escala de tempo forense (BUDD ET AL, 1998, HOPPE ET AL. 2003, SPONHEIMER & LEE-THORPE 2006, MONTGOMERY ET AL. 2010, KOLOBINKO, 2012). Tal incerteza deve-se ao tamanho da amostra. Para futuras análises deve-se aumentar o tamanho amostral para respeitar a Lei dos

Grandes Números (SHELDON, 2010), isso implica em encontrar resultados com incertezas cada vez menores e maior confiabilidade no resultado.

Na comparação da dentina e o esmalte, entre os sexos masculino e feminino, tem-se que no masculino a média de concentração para Sr (dentina) = 0.01666667 g/cm² e para o Sr (esmalte) = 0.01262500 g/cm². No feminino tal média é Sr (dentina)= 0.001154048 g/cm² e para o Sr (esmalte) = 0.012512618 g/cm², o Gráfico 11, apresenta a dispersão do elemento estrôncio para os sexos masculino e feminino.

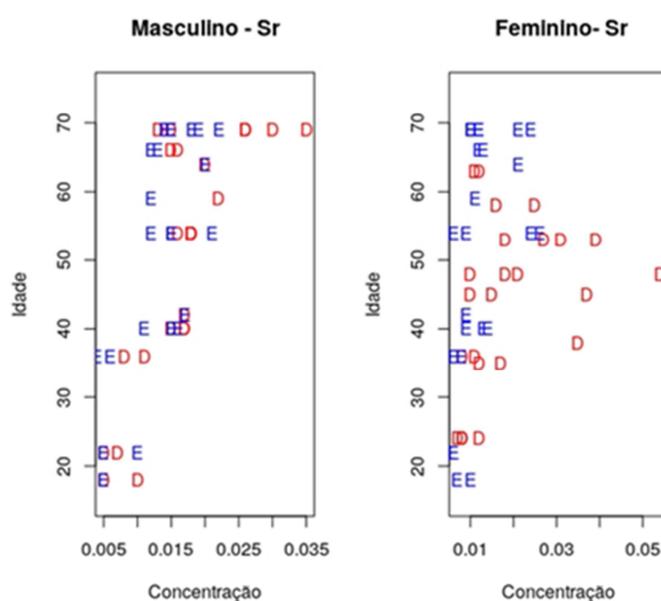


Gráfico 11: Dispersão da média da concentração (g/cm²) de estrôncio para masculino e feminino

Fonte: Autoria própria

Considerando o grupo amostral dessa pesquisa, observa-se que a média na concentração do elemento estrôncio, em dentina, é relativamente maior no grupo masculino em comparação ao feminino, como foi demonstrado anteriormente. Na estrutura de esmalte foi encontrada uma média de concentração semelhante. O Gráfico 12, mostra a dispersão do elemento estrôncio de acordo com as estruturas de esmalte e dentina.

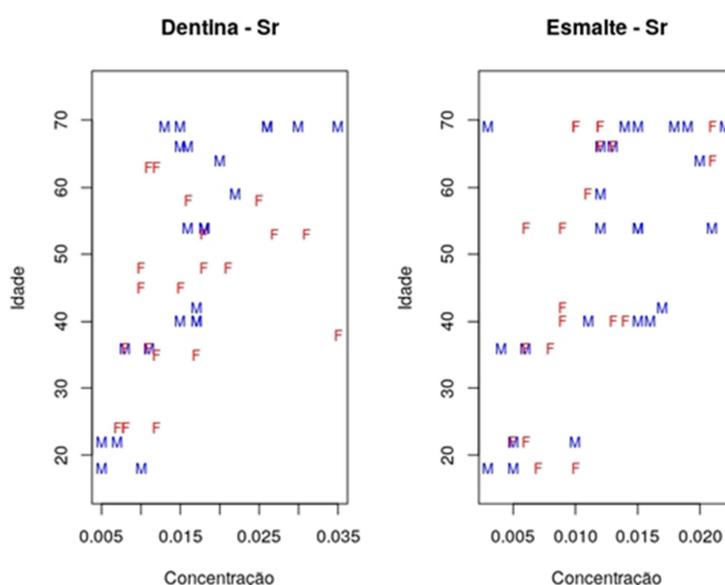


Gráfico 12: Dispersão de estrôncio em dentina e esmalte
Fonte: Autoria própria

4.4.2 Análise Geral, considerando o dente como um todo(esmalte+dentina) comparação entre Feminino e Masculino.

Considerando-se o grupo amostral analisado, na Tabela 14, traz uma diferença não significativa na média da concentração do estrôncio em pré-molares com $p=0.07729$ e em terceiros molares ($p=0.08392$). E diferença significativa na variância da concentração do estrôncio em incisivos e molares com $p=0.01312$, $p=0.00278$, respectivamente.

Tabela 14: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de estrôncio

	μ Masculino	μ Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.01708333	0.02241667	0.2326	N.S.	0.01312	S.
Pré-molares	0.01908333	0.01391667	0.07729	N.S.	1	N.S.
Molares	0.01583333	0.01816667	0.4384	N.S.	0.00278	S.
3º Molares	0.006583333	0.008833333	0.08392	S.	0.3902	N.S.

Fonte: Autoria própria

No Gráfico 13, a média das concentrações de estrôncio nos incisivos femininos é maior quando comparada com os demais grupos, Os terceiros molares apresentam menor média das concentrações para ambos os sexos.

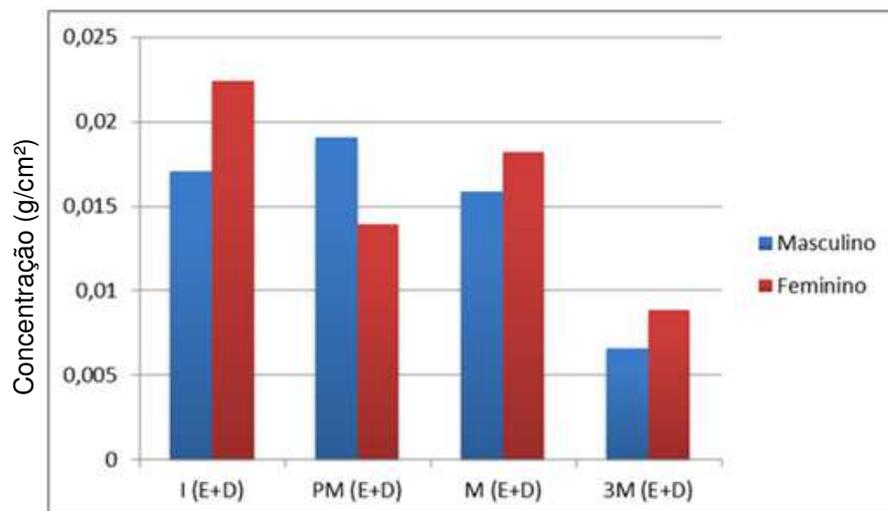


Gráfico 13: Média das concentrações de estrôncio em relação ao grupos dentários(esmalte + dentina).

Fonte: Autoria própria

4.4.3 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas

Nesta etapa foram analisadas as médias das concentrações e variâncias de forma independente, separando-se as estruturas de esmalte e dentina.

4.4.3.1 Esmalte: comparação entre sexos

A tabela 15 exhibe, que a diferença não é significativa na variabilidade da concentração do estrôncio no esmalte em pré-molares com $p=0.08725$, não havendo diferença significativa das médias de concentração do elemento estrôncio.

Tabela 15: Análise comparativa entre gêneros com grupos dentários em esmalte

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.01416667	0.01600000	0.6459	N.S.	0.7781	N.S.
Pré -molares	0.01666667	0.01333333	0.3401	N.S.	0.08725	N.S.
Molares	0.0141667	0.01333333	0.7157	N.S.	0.7452	N.S.
3º Molares	0.0055	0.0070	0.2300	N.S.	0.5182	N.S.

Fonte: Autoria própria

A presença de maior média das concentrações nos pré-molares masculino e a menor em terceiros molares masculino, como mostra no Gráfico 14.

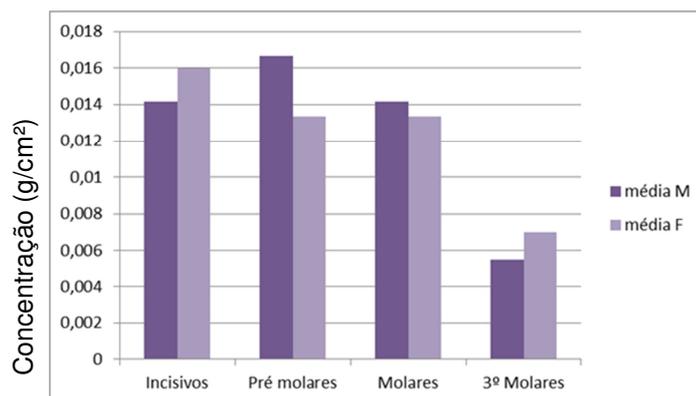


Gráfico 14: Média da concentração do estrôncio no esmalte em relação aos grupos dentários.
Fonte: Autoria própria

4.4.3.2 Dentina: Comparação entre sexos

A Tabela 16 apresenta a diferença significativa na variabilidade da concentração do estrôncio em incisivos ($p=0.0177$) e em molares ($p=0.009783$), quando compara-se o grupo feminino e masculino.

Tabela 16 Análise comparativa entre sexos com grupos dentários em dentina

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.02000000	0.02883333	0.2424	N.S.	0.0177	S.
Pré-molares	0.0215	0.0145	0.1608	N.S.	0.6052	N.S
Molares	0.0175	0.0230	0.2904	N.S.	0.009783	S.
3º Molares	0.007666667	0.010666667	0.1406	N.S.	0.3876	N.S.

Fonte: Autoria própria

Nota-se no Gráfico 15, maior média das concentrações de estrôncio na dentina em incisivos feminino e a menor em terceiros molares masculino, porém não significativo.

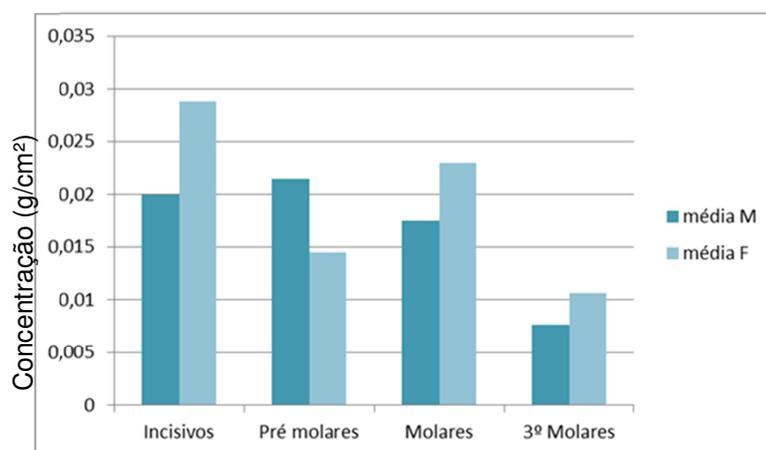


Gráfico 15: Média da concentração do estrôncio na dentina em relação aos grupos dentários.
Fonte: Autoria própria

Na análise geral, considerando o dente como um todo (esmalte + dentina), foi constatado que houve diferença nas médias das concentrações em terceiros molares, havendo diferença na variabilidade entre os incisivos e molares quando comparados os sexos, demonstrado na Tabela 14. Com relação à análise em estruturas do esmalte e dentina separadas, tanto no esmalte quanto na dentina não foram observadas diferenças nas médias das concentrações de estrôncio entre masculino e feminino, porém foi observada uma diferença entre os grupos dentários, mostrado nas Tabelas 15 e 16.

O Gráfico 16, determina os pontos terceiros molares (preto), incisivos (vermelho), molares (azul) e pré-molares (verde), subdividido em grupos por gênero. A análise k-mens selecionou para $R^2 > 95\%$ quatro grupos masculinos e quatro grupos femininos.

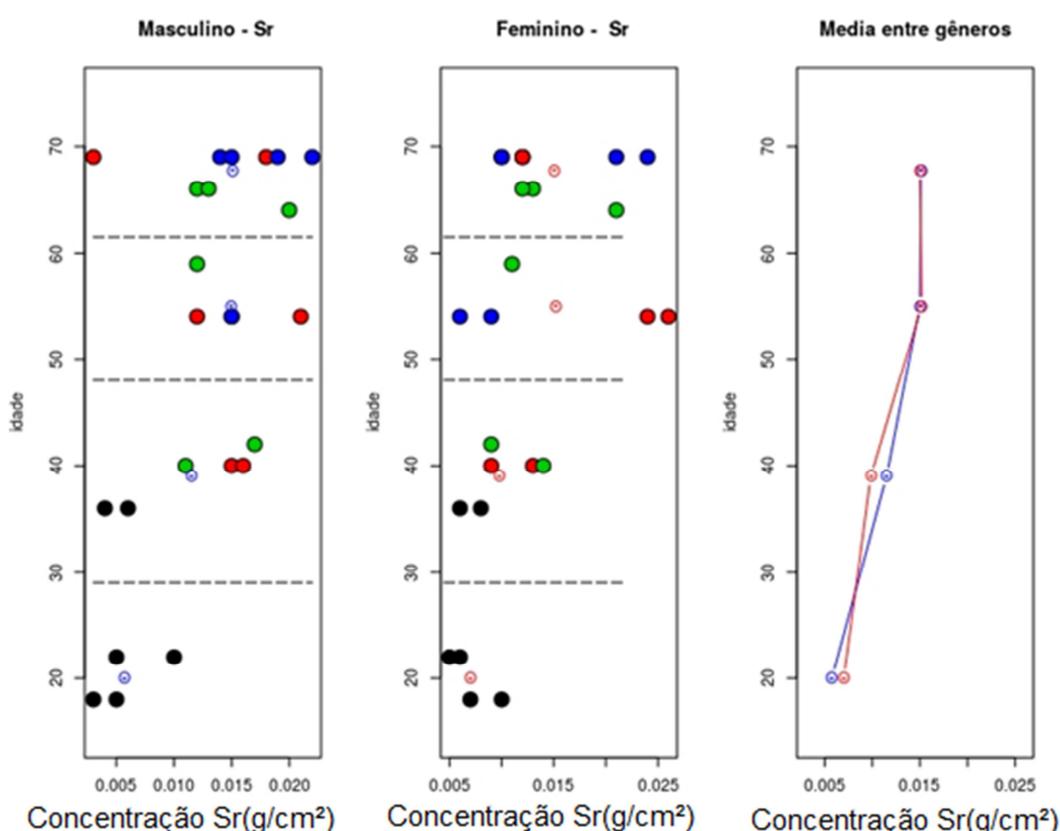


Gráfico 16: Dispersão do elemento estrôncio para os sexos com K-means

Fonte: Autoria própria

De acordo com o Gráfico 16, os grupos dos molares, em ambos sexos, apresentam maior concentração de estrôncio e este aumenta com a idade. No grupo amostral feminino observa-se uma concentração maior em incisivos na faixa etária

acima dos 55 anos. A concentração de estrôncio no grupo de pré molares sugere uma dispersão semelhante na faixa etária dos 40 à 65 anos, tanto no masculino quanto no feminino. Os terceiros molares apresentam uma concentração menor em comparação aos demais grupos dentários, sendo observados o mesmo comportamento em ambos os sexos.

A hipótese nula, em que não há diferença entre a concentração média de estrôncio em ambos os sexos, não foi rejeitada a um p-valor de 0.9047. Isso implica em dizer que a concentração de estrôncio no gênero masculino foi de 0.01262500 g/cm², enquanto no feminino foi de 0.01241667 g/cm². Há um ganho de concentração do masculino de 1,65%, o que não é significativo. Não há variação da concentração de estrôncio entre os sexos, p-valor: 0.7342. No Gráfico 17, da média da concentração do elemento estrôncio para os sexos feminino e masculino possuem uma semelhança das médias e apresentam um aumento com a idade.

4.4.4. Análise dos grupos dentários em relação ao elemento estrôncio para feminino e masculino

O Gráfico 17, apresenta os boxplots referentes ao grupo feminino e masculino, na qual foi observado que a concentração de estrôncio é maior na dentina para ambos os sexos. Verificou-se que as maiores dispersões dos dados estão no I- feminino e PM –masculino.

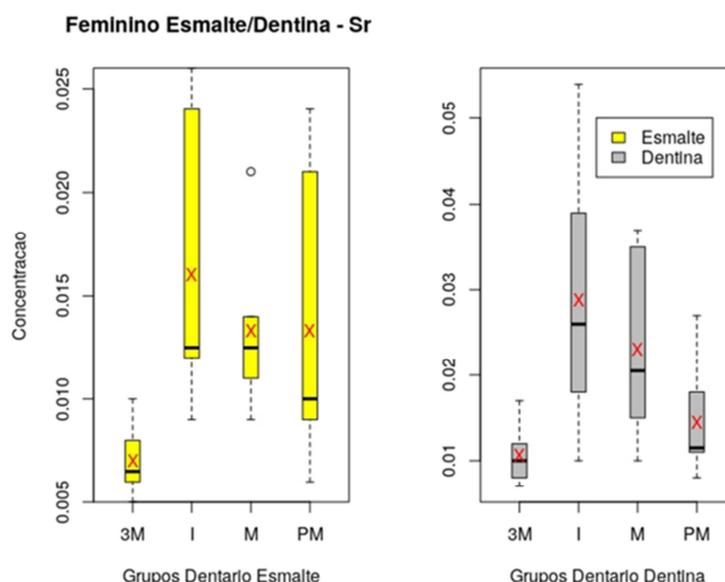


Gráfico 17: Boxplots com as concentrações de estrôncio distribuídas nos grupos dentários e suas respectivas médias em x vermelho.

Fonte: Autoria própria

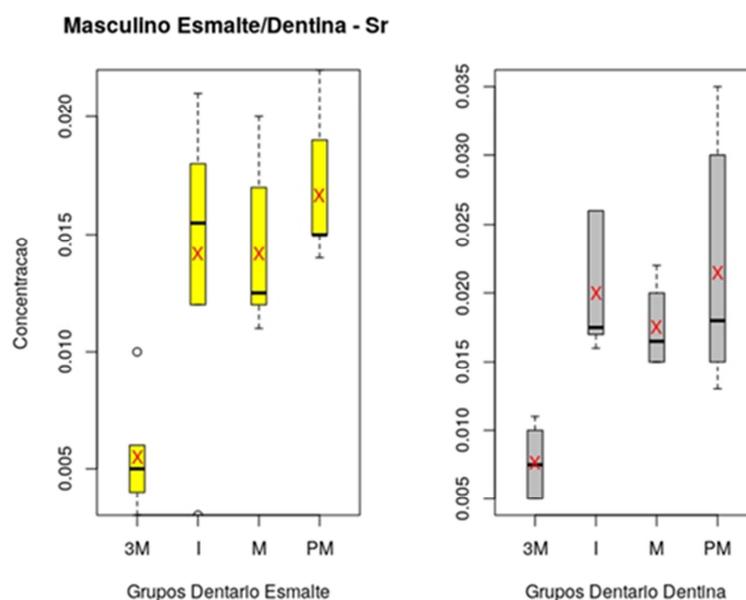


Gráfico 17: Boxplots com as concentrações de estrôncio distribuídas nos grupos dentários e suas respectivas médias em x vermelho.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 17, expressa numericamente os gráficos dos boxplots masculino e feminino. O grupo masculino apresentou uma diferença na variabilidade nos pré-molares ($p=0.03975$). E nas médias as concentrações de estrôncio em relação aos grupos dentários para feminino e masculino não houve diferença significativa.

Tabela 17: Análise das médias e variâncias do estrôncio nos grupos dentários

Feminino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	0.01600000	0.02883333	0.1158	N.S.	0.1012	N.S.
Pré-molares	0.01333333	0.01450000	0.7828	N.S.	0.9139	N.S.
Molares	0.01333333	0.02300000	0.09179	N.S.	0.04736	N.C*
3º molares	0.00700000	0.01066667	0.06797	N.S.	0.1266	N.S.
Masculino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	0.013011132	0.001344466	0.09949	N.S.	0.5456	N.S.
Pré-molares	0.01666667	0.02150000	0.2535	N.S.	0.03975	S.*
Molares	0.01416667	0.01750000	0.1054	N.S.	0.6601	N.S.
3º molares	0.005500000	0.007666667	0.1591	N.S.	0.9489	N.S.

Fonte: Autoria própria. (*) Não decisivo para 5%.

4.4.5 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os gêneros

Considerando-se o grupo amostral analisado, a Tabela 18 mostra, a diferença significativa na variabilidade do estrôncio em dentina nos incisivos ($p=0.017$), em dentina nos molares ($p=0.009$), quando compara-se feminino e masculino. Não houve diferença nas médias da concentração de estrôncio masculino e feminino.

Tabela 18: Análise comparativa entre os grupos dentários (estruturas) com os gêneros

	Masculino	Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Esmalte I	0.014	0.016	0.6459	N.S.	0.778	N.S
Dentina I	0.020	0.02883333	0.2424	N.S.	0.017	S
Esmalte PM	0.016	0.013	0.3401	N.S	0.087	N.S.
Dentina PM	0.021	0.014	0.160	N.S	0.605	N.S
Esmalte M	0.014	0.013	0.7157	N.S	0.745	N.S
Dentina M	0.017	0.023	0.290	N.S	0.009	S
Esmalte 3M	0.005	0.007	0.253	N.S	0.518	N.S
Dentina 3M	0.007	0.010	0.140	N.S	0.387	N.S

Fonte: Autoria própria

Na análise das médias das concentrações de estrôncio em esmalte e dentina para masculino e feminino, demonstrada no Gráfico 18. Foi encontrada maior média na dentina em molares, seguido pela dentina em pré-molares, enquanto que as menores médias das concentrações foram encontradas em esmalte em terceiros molares para ambos os sexos.

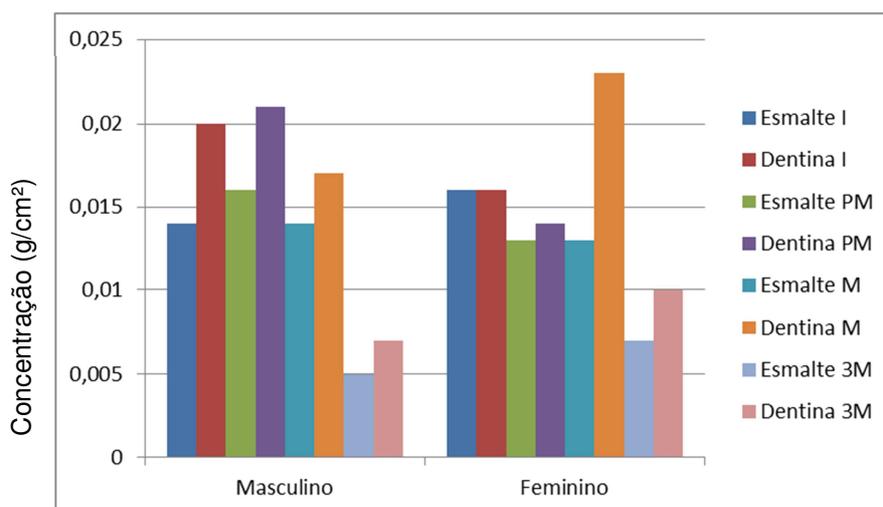


Gráfico 18: Média das concentrações de estrôncio para esmalte e dentina nos sexos masculino e feminino.

Fonte: Autoria própria

4.4.6 Matriz de correlação

A Figura 33, ilustra a correlação entre os dentes analisados de acordo com o elemento estrôncio para os grupos masculino e feminino. Quanto maior os círculos, maior a correlação direta. Quando tendem à cor vermelha mais negativa é, enquanto a tendência para a cor azul será positiva.

Pode ser observada que existe uma correlação positiva no grupo feminino (presença de maior quantidade de círculos azuis e vários diâmetros) comparado ao grupo masculino.

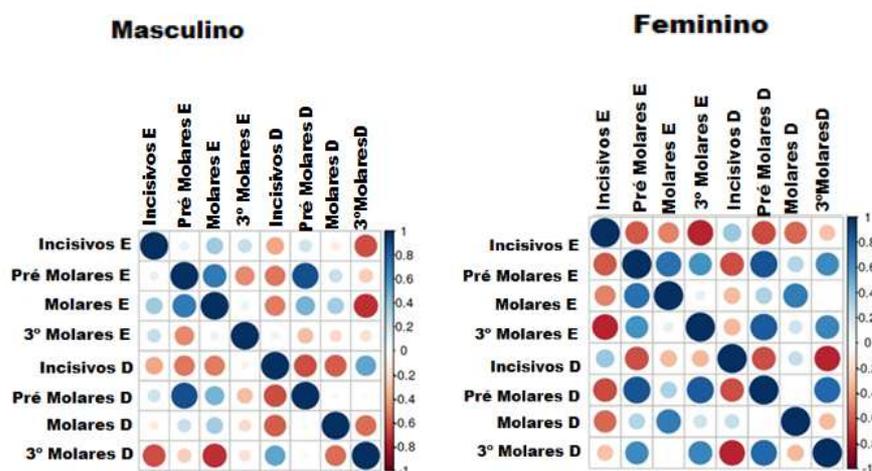


Figura 33: Matriz de correlação do elemento estrôncio

Fonte: Autoria própria

4.4.7 Dendograma para o elemento estrôncio

Relação da distribuição em peso do estrôncio em relação às estruturas esmalte e dentina nos incisivos, pré-molares, molares e terceiros molares nos sexos masculino e feminino, ilustrado na Figura 34. No masculino, a soma dos pesos das médias das concentrações de estrôncio dos terceiros molares equivale ao peso das médias das concentrações dos dentes molares (dentina), pré-molares (esmalte), molares (esmalte). No grupo feminino, o peso da média da concentração de estrôncio encontrado nos incisivos (dentina), demonstra ser maior que a soma das médias das concentrações dos demais elementos dentários, nesse grupo amostral analisado.

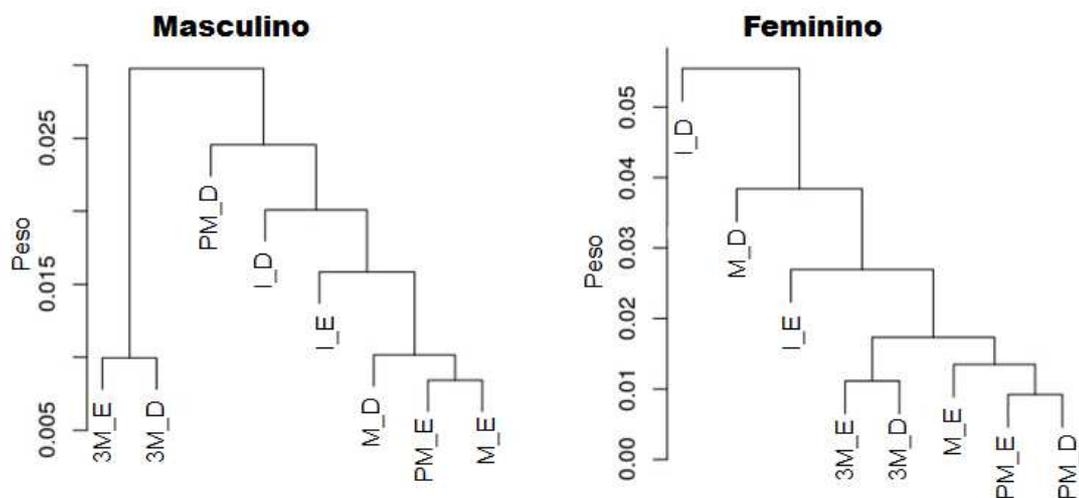


Figura 34: Dendrograma para o estrôncio
Fonte: Autoria própria

4.5 RESULTADOS PARA O ELEMENTO FERRO

4.5.1 Análise geral

Na análise geral, considerando-se todos os dentes do grupo amostral dessa pesquisa tanto para masculino e feminino, não houve diferença significativa em relação ao elemento ferro resultando no $p=0.8286$. No teste variacional não houve diferença significativa com $p=0.462$. O Gráfico 19, mostra a densidade de acordo com a concentrações do elemento ferro, onde ambos os sexos demonstram comportamento semelhante.

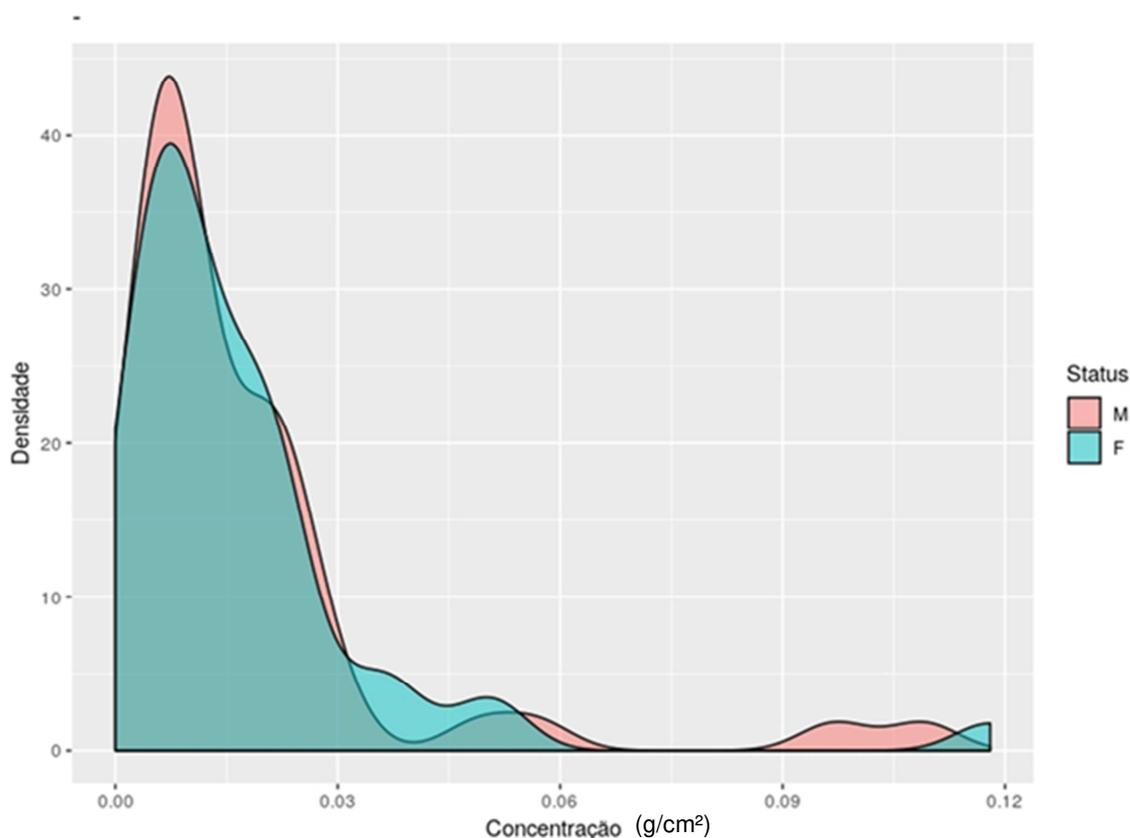


Gráfico 19: relação da densidade x concentração do ferro para masculino e feminino
Fonte: Autoria própria

Conforme demonstra a Tabela 19, concentração máxima foi observada em feminino com 0.118 g/cm².

Tabela 19 Relação das concentrações de ferro (g/cm²), para os sexos

Ferro	mínimo	máximo	média	desvio padrão
Masculino	0.00000	0.10900	0.01050	0.02126925
Feminino	0.00000	0.11800	0.01665	0.01909271

Fonte: Autoria própria

A média da concentração de ferro comparada a todos os dentes masculino na dentina é de 0.01991667 g/cm² e para o esmalte foi de 0.01516667 g/cm². A concentração de dentina e esmalte não diferem entre si com p-valor= 0.4463 pelo teste t-Student. Ou seja, o ganho de 23,84% da concentração de ferro na dentina, quando comparada ao esmalte, é não significativo. O Gráfico 20 mostra a dispersão do elemento ferro para masculino e feminino. Porém, ainda está na margem de decisão necessitando de um número maior amostral.

Nas amostras femininas, a dentina foi de 0.01845833 g/cm² e para o esmalte 0.01483333 g/cm², implicando um ganho de 19,63% no caso feminino.

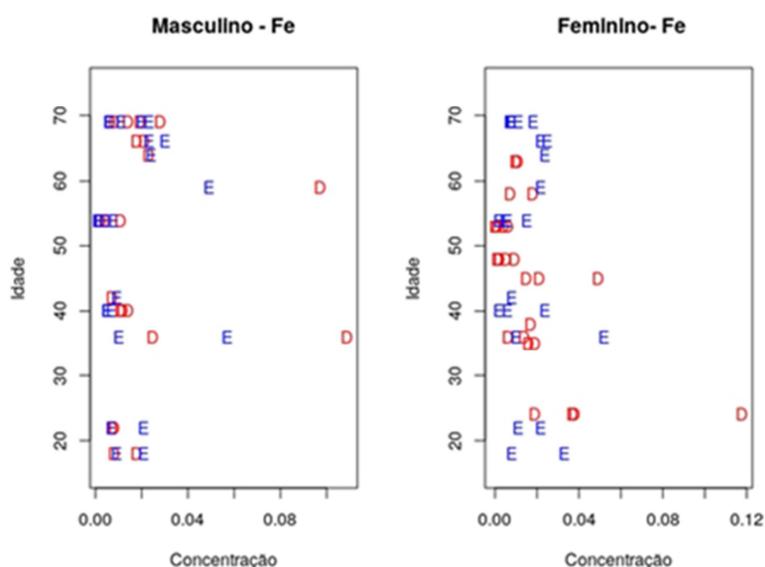


Gráfico 20: Dispersão da média da concentração de ferro para masculino e feminino.

Fonte: Autoria própria

A concentração de dentina e esmalte, considerando ambos os sexos, diferem entre si com $p\text{-valor} = 0.0198$ pelo teste t-Student. De fato, há maior concentração de ferro das amostras na dentina do que no esmalte, em média uma diferença de $\mu_{M_dentina} - \mu_{M_esmalte} = 0.00475$ para o masculino e uma diferença $\mu_{F_dentina} - \mu_{F_esmalte} = 0.003625$ para o feminino, ambos com 95% de confiança. O Gráfico 21, exibe a dispersão do elemento ferro nas estruturas de dentina e esmalte.

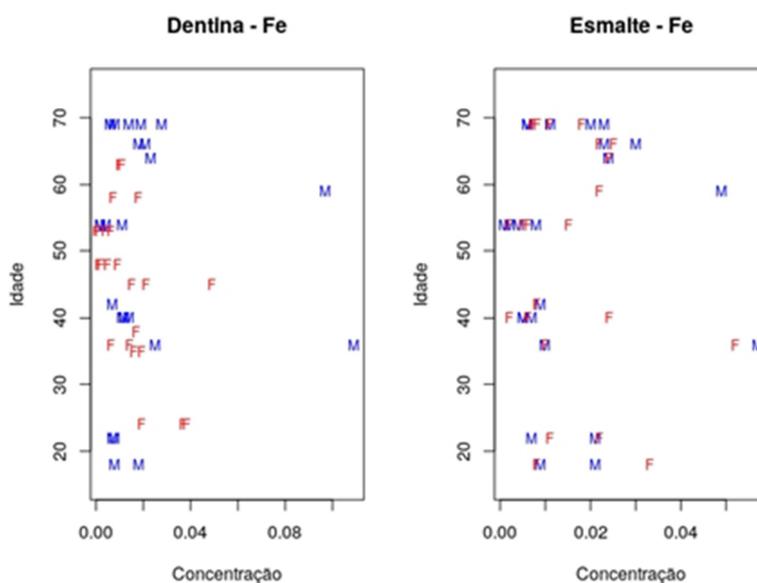


Gráfico 21: Dispersão de ferro em esmalte e dentina

Fonte: Autoria própria

Comparando a dentina e o esmalte nos gêneros masculino e feminino, tem-se que para o masculino a média de concentração para Fe(dentina)= 0.01991667 g/cm² e para o Fe(esmalte) = 0.01516667 g/cm². No feminino tal média é Fe (dentina)= 0.01845833 g/cm² e para o Fe (esmalte) = 0.01483333 g/cm². Considerando o grupo amostral dessa pesquisa, observa-se que a média da concentração do elemento ferro em dentina e esmalte são semelhantes, implicando que não há significância para ambos os sexos.

Na análise da variância no sexo masculino para a dentina e esmalte o p-valor foi de 0.003972, enquanto no feminino o p-valor foi de 0.003972. Esse resultado foi esperado, pois há diferença nas médias entre a dentina e o esmalte, no caso masculino, dado que há variabilidade com p-valor>5%.

No caso feminino, essa diferença nas médias implicou também em diferença significativa p-valor >5%. Essas características gerais para a dentina do Fe(dentina)=0.0191875 ± 0.02536177 recaem a um coeficiente variacional (C.V.) no ferro em 132%, enquanto para o esmalte Fe (esmalte)= 0.015 ± 0.01285103, um C.V. de 85% considerando geral independente do sexo. Tais medidas exploratórias indicam que, de fato, existe maior concentração de ferro na dentina do que no esmalte independente do sexo.

Tal incerteza é devida ao tamanho da amostra. Para futuras análises deve-se aumentar o tamanho amostral para respeitar a Lei dos Grandes Números (SHELDON, 2010), isso implica em dizer que pode-se encontrar resultados com incertezas cada vez menores e maior confiabilidade no resultado. Por outro lado, a incerteza na dentina é maior do que no esmalte e isso pode ser devido à leitura experimental, durante o processo de aquisição dos espectros pela técnica de EDXRF.

4.5.2 Análise Geral, considerando o dente como um todo (esmalte + dentina) comparação entre Feminino e Masculino.

De acordo com o grupo amostral analisado, a Tabela 20 mostra, que não houve diferença na média da concentração, mas houve significativa diferença na variância do ferro nos pré-molares (p=0.002424) e nos molares (p=0.008496).

Tabela 20: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de ferro

	Masculino	Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.007000000	0.005166667	0.3246	N.S.	0.1645	N.S.
Pré-Molares	0.0115	0.0085	0.3065	N.S.	0.002424	S.
Molares	0.026666667	0.021000000	0.4819	N.S.	0.008496	S.
3Molares	0.025000000	0.031916667	0.5791	N.S.	0.976	N.S.

Fonte: Autoria própria

O gráfico 22 exibe a média das concentrações de ferro nas estruturas (esmalte + dentina), encontra-se em maior concentração em terceiros molares. Nota-se que há maior concentração nos grupos dentários: incisivos, pré-molares e molares no masculino. Segundo os estudos de LANE & PEACH (1997), o Cu e Fe tendem a ser ligeiramente inferiores nas mulheres, o que eles associaram, com a perda de sangue durante a menstruação.

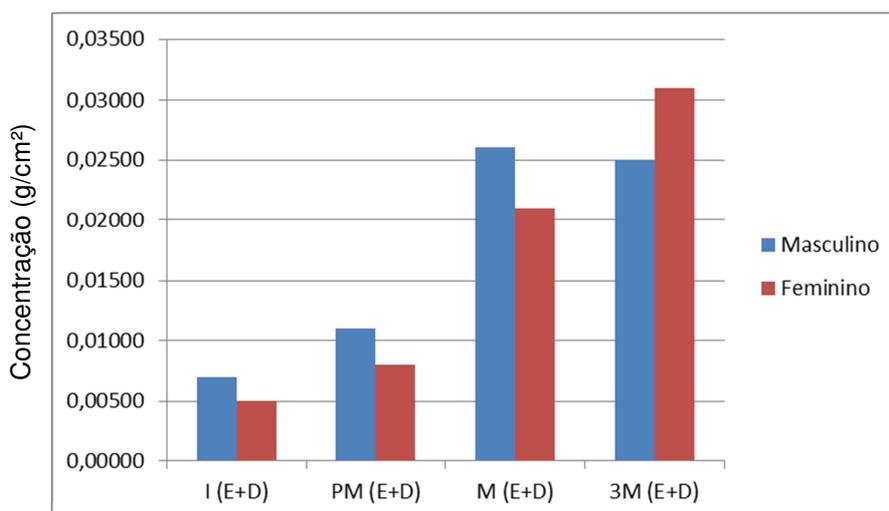


Gráfico 22: Média das concentrações de Ferro em relação ao grupos dentários(esmalte + dentina).

Fonte: Autoria própria

4.5.3 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas

Nesta etapa foram analisadas as médias das concentrações e variâncias de forma independente, separando-se as estruturas de esmalte e dentina.

4.5.3.1 Esmalte: comparação entre sexos

Na Tabela 21, considerando-se o grupo amostral analisado, observa-se uma diferença significativa na variância do ferro no esmalte em incisivos ($p=0.02504$), pré-molares($p=0.02504$), e molares($p=0.07797$).

Tabela 21: Análise comparativa entre gêneros com grupos dentários em esmalte

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.0053333333	0.0073333333	0.479	N.S.	0.02504	Indeciso*
Pré-molares	0.0053333333	0.0073333333	0.479	N.S.	0.02504	Indeciso*
Molares	0.023666667	0.020833333	0.6892	N.S.	0.07797	Indeciso*
3º Molares	0.020833333	0.022666667	0.8634	N.S.	0.855	N.S.

Fonte: Autoria própria. (*) Não decisivo para 5%.

No Gráfico 23, observa-se maiores medias das concentrações de ferro em esmalte nos molares masculino, e em seguida nos terceiros molares feminino.

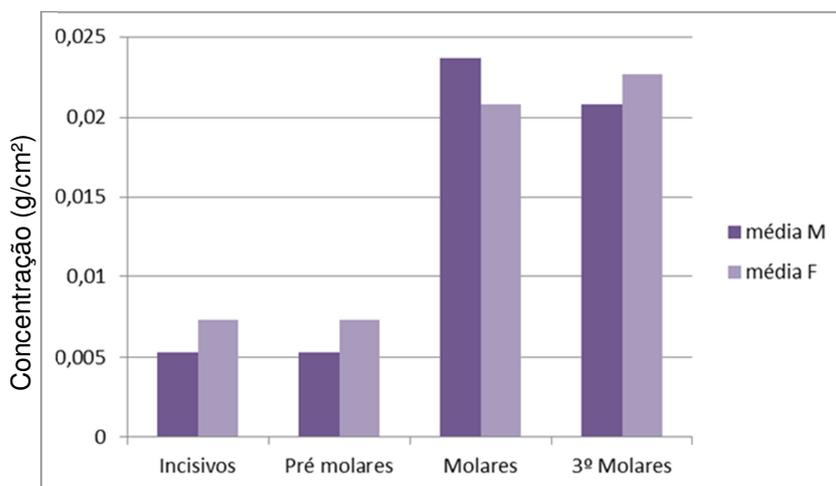


Gráfico 23: Média da concentração do ferro no esmalte em relação aos grupos dentários.

Fonte: Autoria própria

4.5.3.2 Dentina: comparação entre sexos

Na Tabela 22, considerando-se o grupo amostral analisado, foi observada uma diferença significativa na média do ferro na dentina nos incisivos ($p=0.0231$), e houve diferença significativa na variância nos pré-molares ($p=0.0473$) e molares ($p=0.088$).

Tabela 22: Análise comparativa entre gêneros com grupos dentários em dentina

	média M	média F	p-valor μ	conclusão1	p-valor δ	conclusão2
Incisivos	0.008666667	0.003000000	0.0231	S.	0.7812	N.S.
Pré-molares	0.01216667	0.00850000	0.4407	N.S.	0.0473	Indeciso*
Molares	0.02966667	0.02116667	0.5866	N.S.	0.088	Indeciso*
3º Molares	0.02916667	0.04116667	0.6085	N.S.	0.9609	N.S.

Fonte: Autoria própria. (*) não decisivo para 5%.

A média das concentrações de ferro em dentina foi observada em maior concentração em terceiros molares femininos, seguido dos molares masculino, como mostra o Gráfico 24. Verifica-se também que há uma predominância de concentrações ligeiramente maiores no sexo masculino para os grupos dentários de incisivos, pré-molares e molares.

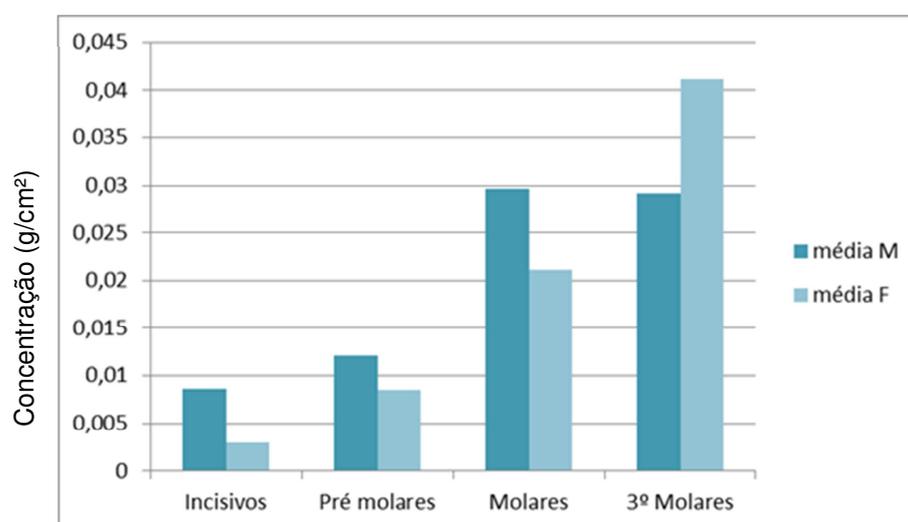


Gráfico 24: Média da concentração do ferro na dentina em relação aos grupos dentários.

Fonte: Autoria própria

Na análise geral, considerando o dente como um todo (esmalte+dentina), observa-se que não houve diferença na médias das concentrações, porém, houve diferença na variabilidade entre os pré-molares e molares, quando comparou-se os gêneros. Na análise em estruturas esmalte e dentina separadas, no esmalte não foi observada diferença nas médias das concentrações de ferro, e já na dentina houve diferença significativa na média da concentração nos incisivos.

No Gráfico 25, determina os pontos dos terceiros molares (preto), incisivos (vermelho), molares (azul) e pré-molares (verde), estão subdivididos em grupos e por gênero. A análise k-mens selecionou para $R^2 > 95\%$ quatro grupos masculinos e quatro grupos femininos.

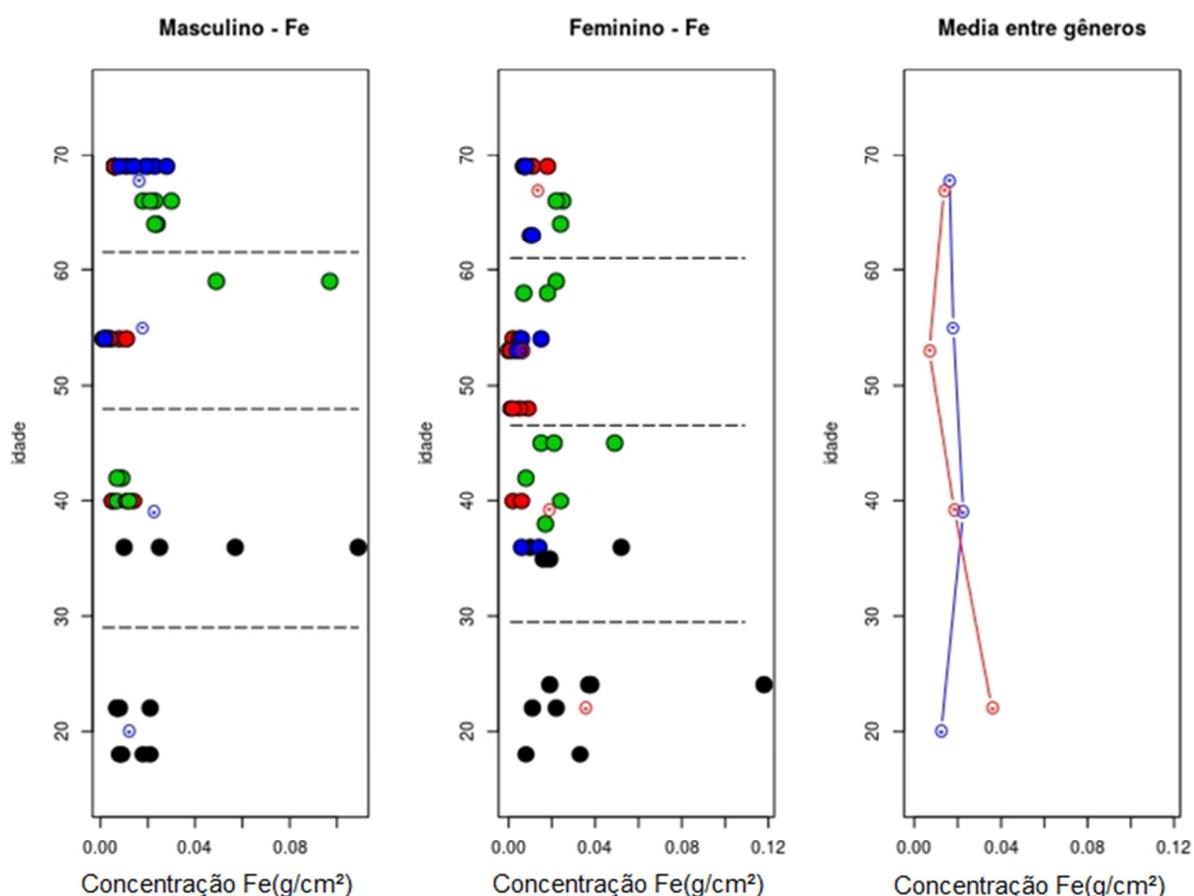


Gráfico 25: Dispersão do elemento Ferro para os sexos com K-means
Fonte: Autoria própria

O Gráfico de dispersão 26 demonstra que os pré-molares e terceiros molares apresentam uma média de concentração maior que os demais dentes, em ambos os sexos. Os pré-molares e molares apresentam uma dispersão maior em relação à idade no grupo feminino, compreendendo na faixa etária entre os 40 aos 65 anos.

No grupo masculino a presença do ferro nos pré-molares foi observada com maior concentração na faixa dos 40 anos e acima dos 60 anos. Os incisivos apresentam-se na faixa acima dos 50 anos no masculino, enquanto que no feminino há uma dispersão entre as faixas dos 40 anos a 70 anos.

A hipótese nula, em que não há diferença entre a concentração média de ferro em ambos os gêneros, não foi rejeitada a um p-valor de 0.8286. Isso implica em dizer que a concentração de ferro no sexo masculino foi de 0.01754167 g/cm², enquanto no feminino foi de 0.01664583 g/cm². Não há variação da concentração de ferro entre os sexos, p-valor= 0.4621. No Gráfico 25, da média entre sexos, dada a

comparação das médias dos grupos, o grupo feminino apresenta uma diminuição do elemento ferro nas faixas etárias entre 40 a 60 anos.

4.5.5 Análise dos grupos dentários em relação ao elemento chumbo para feminino e masculino

O Gráfico 26 apresenta os boxplots para masculino e feminino na correspondente ao elemento ferro. A concentração de ferro no esmalte é superior que na dentina para ambos os sexos. Verificou-se que as maiores dispersões dos dados estão no 3M- feminino e M -masculino.

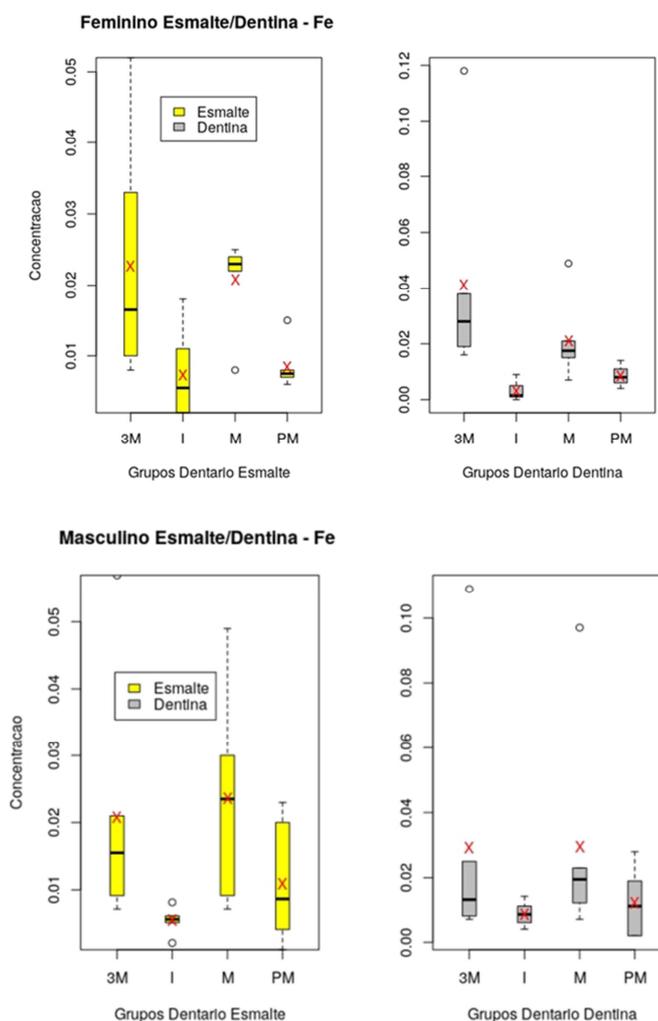


Gráfico 26: Boxplots com as concentrações de ferro distribuídas nos grupos dentários e suas respectivas médias em x vermelho.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 23 exibe numericamente os boxplots dos sexos. O grupo feminino apresentou uma diferença não significativa e inconclusiva na variabilidade dos

terceiros molares ($p=0.09808$). E no grupo masculino não houve uma diferença significativa na variabilidade nos molares ($p=0.1112$), terceiros molares ($p=0.1245$). E nas médias as concentrações de ferro em relação aos grupos dentários para feminino e masculino não houve diferença significativa.

Tabela 23: Análise das médias e variâncias do elemento ferro

Feminino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	0.007333333	0.003000000	0.1723	N.S.	0.2162	N.S.
Pré-molares	0.0085	0.0085	1	N.S.	0.7581	N.S.
Molares	0.02083333	0.02116667	0.9602	N.S.	0.09883	N.S.
3º molares	0.02266667	0.04116667	0.3221	N.S.	0.09808	S.
Masculino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	0.005333333	0.008666667	0.1004	N.S.	0.1618	N.S.
Pré-molares	0.01083333	0.01216667	0.815	N.S.	0.7706	N.S.
Molares	0.02083333	0.02916667	0.6562	N.S.	0.1112	S.
3º molares	0.05733333	0.02616667	0.03249	S.	0.1245	S.

Fonte: Autoria própria

4.5.6 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os sexos

Na Tabela 24, considerando-se o grupo amostral analisado, foi constatada diferença significativa na variabilidade do ferro em esmalte nos incisivos ($p=0.02504$), em esmalte nos pré-molares ($p=0.0458$), e em dentina nos pré-molares ($p=0.0473$).

Tabela 24: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de ferro

	μ Masculino	μ Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Esmalte I	0.005333333	0.007333333	0.479	N.S.	0.02504	S.
Dentina I	0.008666667	0.003000000	0.0231	S.	0.7812	N.S.
Esmalte PM	0.01083333	0.00850000	0.5688	N.S.	0.0458	Indeciso*
Dentina PM	0.01216667	0.00850000	0.4407	N.S.	0.0473	Indeciso*
Esmalte M	0.02366667	0.02083333	0.6892	N.S.	0.07797	Indeciso*
Dentina M	0.02966667	0.02116667	0.5866	N.S.	0.088	S Indeciso*
Esmalte 3M	0.02083333	0.02266667	0.8634	N.S.	0.855	N.S.
Dentina 3M	0.02916667	0.04116667	0.6085	N.S.	0.9609	N.S.

Fonte: Autoria própria. (*) Não decisivo para 5%.

A média das concentrações de ferro na dentina de terceiros molares feminino apresentou maior concentração, enquanto a estrutura da dentina em incisivos apresentou a menor concentração de ferro, exibida no Gráfico 27.

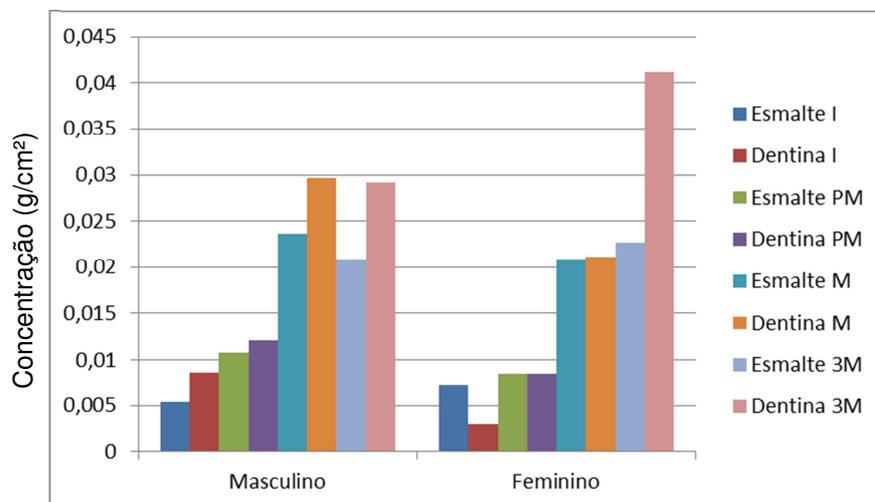


Gráfico 27: Relação das médias da concentrações do ferro com os grupos dentários
Fonte: Autoria própria

4.5.7 Matriz de correlação

A correlação do elemento ferro com os dentes analisados, ilustrada na Figura 35, indica que quanto maior os círculos, maior a correlação, e quando tendem à cor vermelha mais negativa é, enquanto a tendência para a cor azul será positiva. O elemento ferro possui uma correlação positiva com os grupos dentários analisados tanto no masculino quanto no feminino.

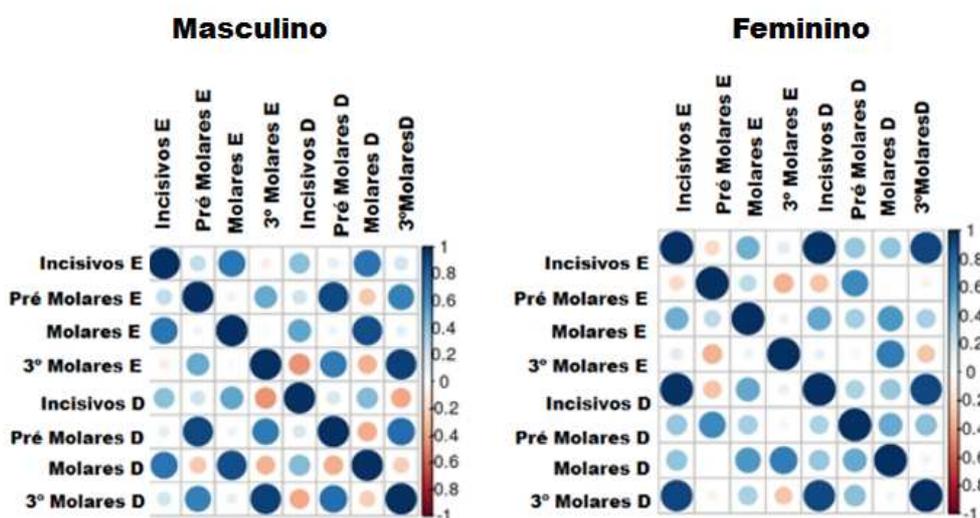


Figura 35: Matriz de correlação do elemento ferro

Fonte: Autoria própria

4.5.8 Dendograma do elemento ferro

A relação da distribuição em peso do ferro em relação às estruturas esmalte e dentina nos incisivos, pré-molares, molares e terceiros molares nos gêneros masculino e feminino, ilustrada na Figura 36. Tanto no masculino quanto no feminino, foram observados, que o ferro foi encontrado em relação ao peso na estrutura da dentina em terceiros molares, correspondendo a soma em peso dos demais dentes e estruturas.

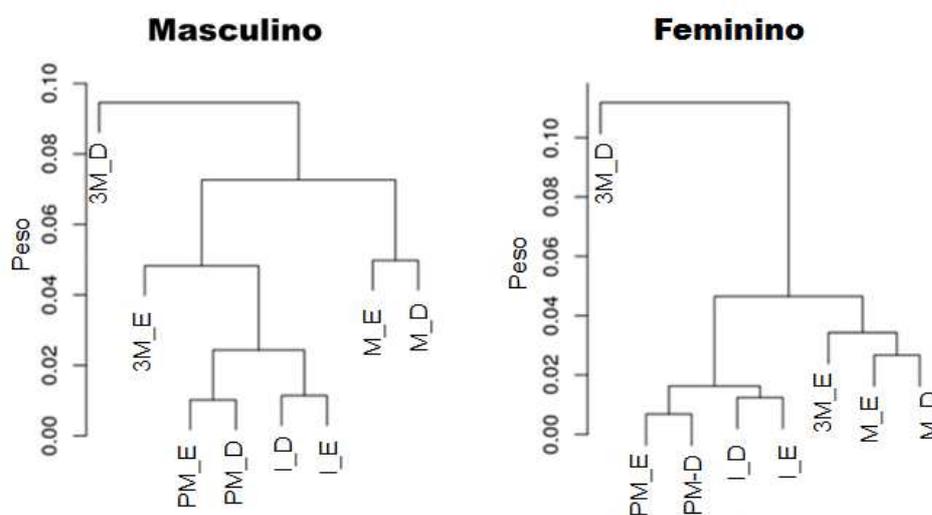


Figura 36: Dendograma do elemento ferro

Fonte: Autoria própria

4.6 RESULTADOS PARA O ELEMENTO ZINCO

4.6.1 Análise geral

Na análise geral, considerando-se todos os dentes do grupo amostral dessa pesquisa tanto para masculino e feminino, não houve diferença significativa em relação ao elemento zinco resultando no $p=0.7698$ e no teste variacional não houve diferença significativa com $p=0.2227$. O Gráfico 28, representa a densidade de acordo com as concentrações do zinco para masculino e feminino, possuem um comportamento semelhante.

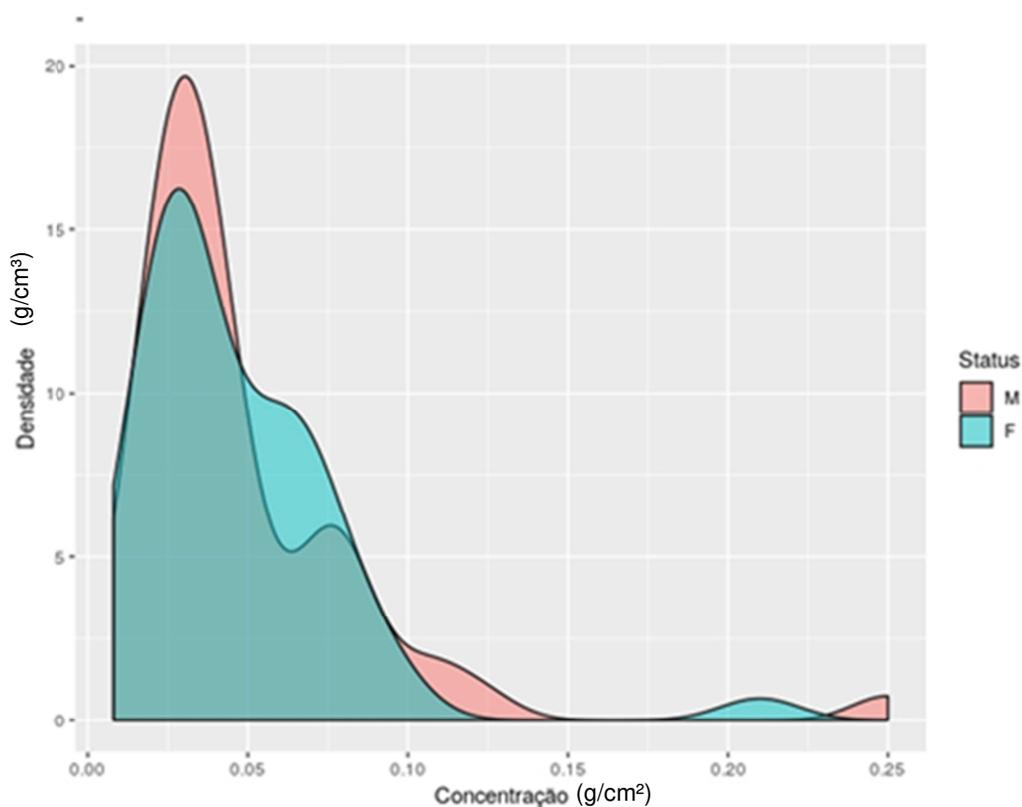


Gráfico 28: Relação da densidade x concentração do zinco para masculino e feminino

Fonte: Autoria própria

A concentração máxima foi verificada no grupo masculino com 0.25 g/cm^2 , como mostra a Tabela 25. A menor concentração verificou-se no grupo feminino com 0.008 g/cm^2 .

Tabela 25: Relação das concentrações de zinco (g/cm²), para os sexos

Zinco	mínimo	máximo	média	desvio padrão
Masculino	0.01200	0.25000	0.04865	0.03962403
Feminino	0.00800	0.21000	0.04646	0.03312

Fonte: Autoria própria

A média da concentração de zinco comparada para todos os dentes masculino na dentina é de 0.04675000 g/cm² e para o esmalte foi de 0.05054167 g/cm². A concentração de dentina e esmalte não diferem entre si com p-valor= 0.7446 pelo teste t-Student. Ou seja, essa perda de -7,5% da concentração de zinco na dentina quando comparada ao esmalte, não é significativa. Porém, ainda está na margem de decisão necessitando de um número maior amostral.

As amostras femininas apresentaram, na dentina 0.04070833 g/cm² e no esmalte 0.05220833 g/cm², implicando um ganho maior de 22,05% no caso feminino. O Gráfico 29 mostra a dispersão do elemento zinco para masculino e feminino. A concentração de dentina e esmalte, considerando ambos os gêneros, não diferem entre si com p-valor > 5% pelo teste t-Student. De fato, há maior concentração de zinco das amostras na esmalte do que no dentina, em média uma diferença de $\mu_{M_dentina} - \mu_{M_esmalte} = 0,41695833$ g/cm² para o masculino e uma diferença $\mu_{F_dentina} - \mu_{F_esmalte} = 0,0115$ g/cm² para o feminino, ambos com 95% de confiança. Com relação aos gêneros, a diferença da concentração de zinco independente da estrutura, não é significativa com p-valor >5%.

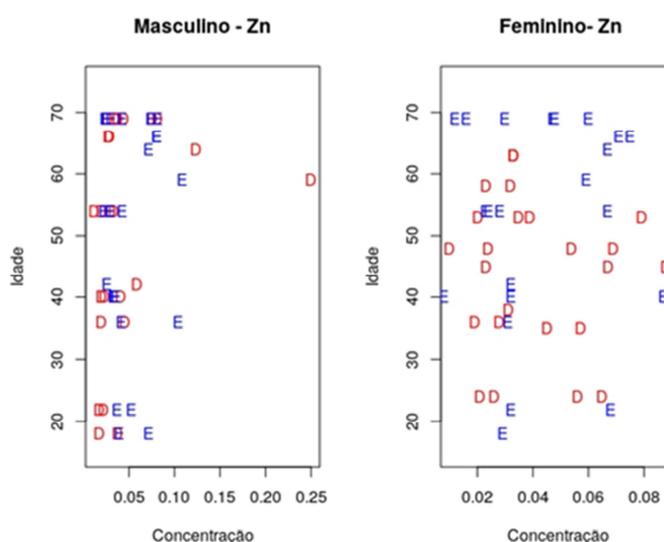


Gráfico 29: Dispersão da média da concentração de zinco para masculino e feminino.

Fonte: Autoria própria

Comparando a dentina e o esmalte entre masculino e feminino, tem-se que para o masculino a média de concentração para Zn (dentina) = 0.04675000g/cm² e para o Zn (esmalte) = 0.05054167g/cm². No feminino tal média é Zn (dentina)= 0.04070833g/cm² e para o Zn (esmalte) = 0.05220833g/cm². Considerando-se o grupo amostral dessa pesquisa, observa-se que a média da concentração do elemento zinco em dentina e esmalte possuem a média de concentração semelhante. Para a verificar a variância, foi realizado o F-Snedecor entre dentina e esmalte nos sexos masculino e feminino, houve uma diferença significativa para o masculino (p=0.003127) e no feminino(p=0.002038). No Gráfico 30, exibe a dispersão do elemento zinco nas estruturas de dentina e esmalte.

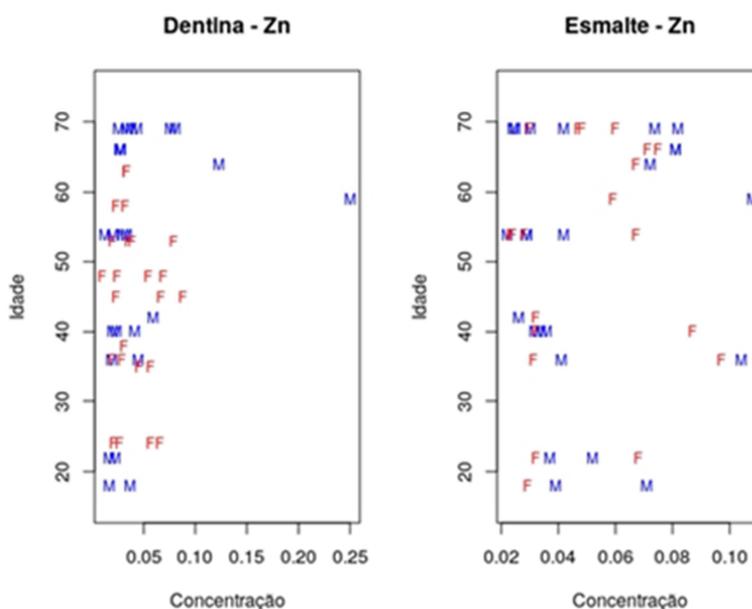


Gráfico 30: Dispersão de zinco nas estruturas de esmalte e dentina
Fonte: Autoria própria

4.6.2 Análise Geral, considerando o dente como um todo (esmalte + dentina) comparação entre Feminino e Masculino.

A Tabela 26 exibe que não houve diferença na média da concentração e nem na variância do zinco na estruturas de esmalte e dentina.

Tabela 26: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de zinco (esmalte+dentina)

	μ Masculino	μ Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	concl são
Incisivos	0.020	0.016	0.645	N.S.	0.017	S.
Pré-Molares	0.016	0.013	0.681	N.S.	0.087	N.S.
Molares	0.014	0.013	0.759	N.S.	0.745	N.S.
3Molares	0.005	0.007	0.253	N.S.	0.518	N.S.

Fonte: Autoria própria

Os molares masculinos apresentaram maior média das concentrações de ferro, em seguida os terceiros molares femininos, como mostra o Gráfico 31.

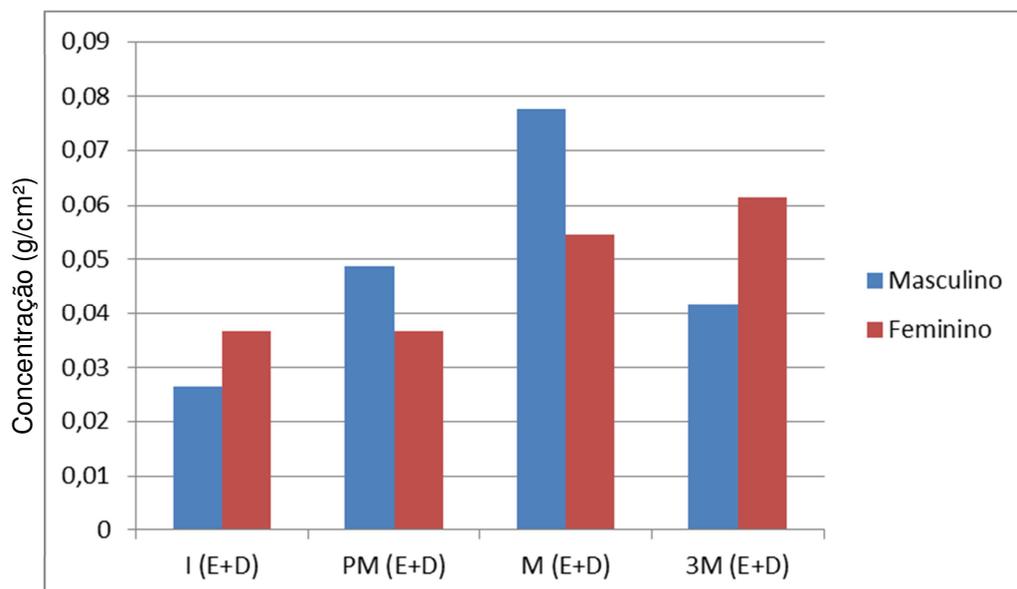


Gráfico 31: Média das concentrações de zinco em relação ao grupos dentários(esmalte + dentina)

Fonte: Autoria própria

4.6.3 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas

Nesta etapa foram analisadas as médias das concentrações e variâncias de forma independente, separando-se as estruturas de esmalte e dentina.

4.6.3.1 Esmalte: comparação entre sexos

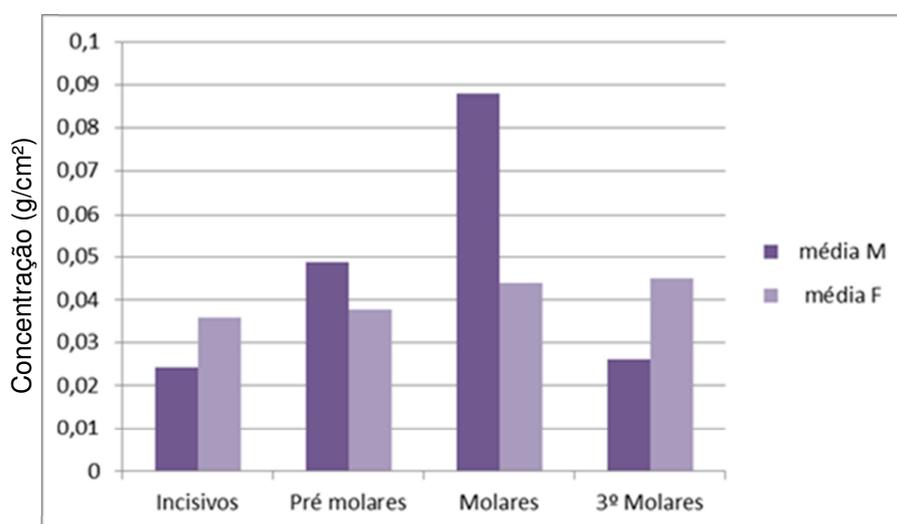
De acordo com a Tabela 27, notou-se diferença significativa na variância do zinco no esmalte em incisivos ($p=0.027$), pré-molares ($p=0.027$), e terceiros molares ($p=0.04897$).

Tabela 27: Análise comparativa entre sexos com grupos dentários em esmalte

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.02900000	0.03033333	0.8467	N.S.	0.027	Indeciso*
Pré- molares	0.02900000	0.03033333	0.8467	N.S.	0.027	Indeciso*
Molares	0.06700000	0.06516667	0.9047	N.S.	0.2856	N.S.
3º Molares	0.05733333	0.07783333	0.526	N.S.	0.04897	Indeciso*

Fonte: Autoria própria. (*) Não decisivo para 5%.

A média das concentrações de zinco em esmalte foi maior em molares e pré molares masculino, observada no Gráfico 32.

**Gráfico 32: Média da concentração do zinco no esmalte em relação aos grupos dentários**

Fonte: Autoria própria

4.6.3.2 Dentina: comparação entre sexos

A diferença significativa na variância do zinco na dentina dos incisivos ($p=0.03651$), e molares ($p=0.02277$), conforme a seguinte tabela 28.

Tabela 28: Análise comparativa entre gêneros com grupos dentários em dentina

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.02416667	0.03600000	0.2651	N.S.	0.03651	S.
Pré-molares	0.04866667	0.03783333	0.4301	N.S.	0.7435	N.S.
Molares	0.088	0.044	0.2818	N.S.	0.02277	S.
3º Molares	0.02616667	0.04500000	0.06147	N.S.	0.3917	N.S.

Fonte: Autoria própria

A média das concentrações de zinco na dentina apresentou maiores concentrações em terceiros molares feminino e em seguida de molares masculino e feminino, como mostra o Gráfico 33.

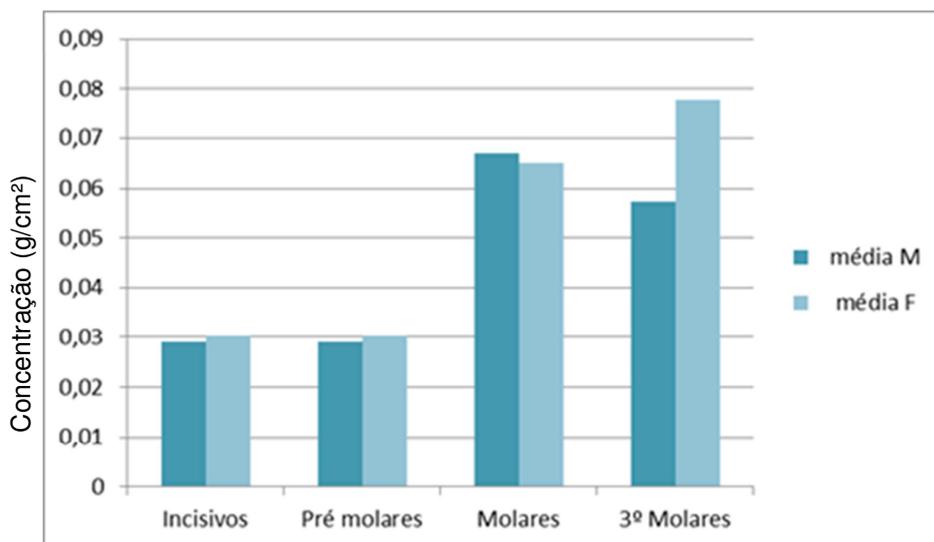


Gráfico 33: Média da concentração do zinco na dentina em relação aos grupos dentários

Fonte: Autoria própria

Na análise geral, considerando o dente como um todo (esmalte + dentina), observamos que não houve diferença na médias das concentrações. Na análise em estruturas esmalte e dentina separadas, tanto no esmalte quanto na dentina não foram observadas diferenças nas médias das concentrações de zinco para masculino e feminino, porém houve diferença na média das concentrações em relação aos grupos dentários.

Alguns pesquisadores já confirmaram que, os indivíduos fumantes apresentam níveis mais elevados de zinco, do que os indivíduos não fumantes (BARANOWSKA ET AL., 2004).

O Gráfico 34 determina os pontos, terceiros molares (preto), incisivos (vermelho), molares (azul) e pré-molares (verde), estão subdividido em grupos e por gênero. A análise k-mens selecionou para $R^2 > 95\%$ quatro grupos masculinos e quatro grupos femininos.

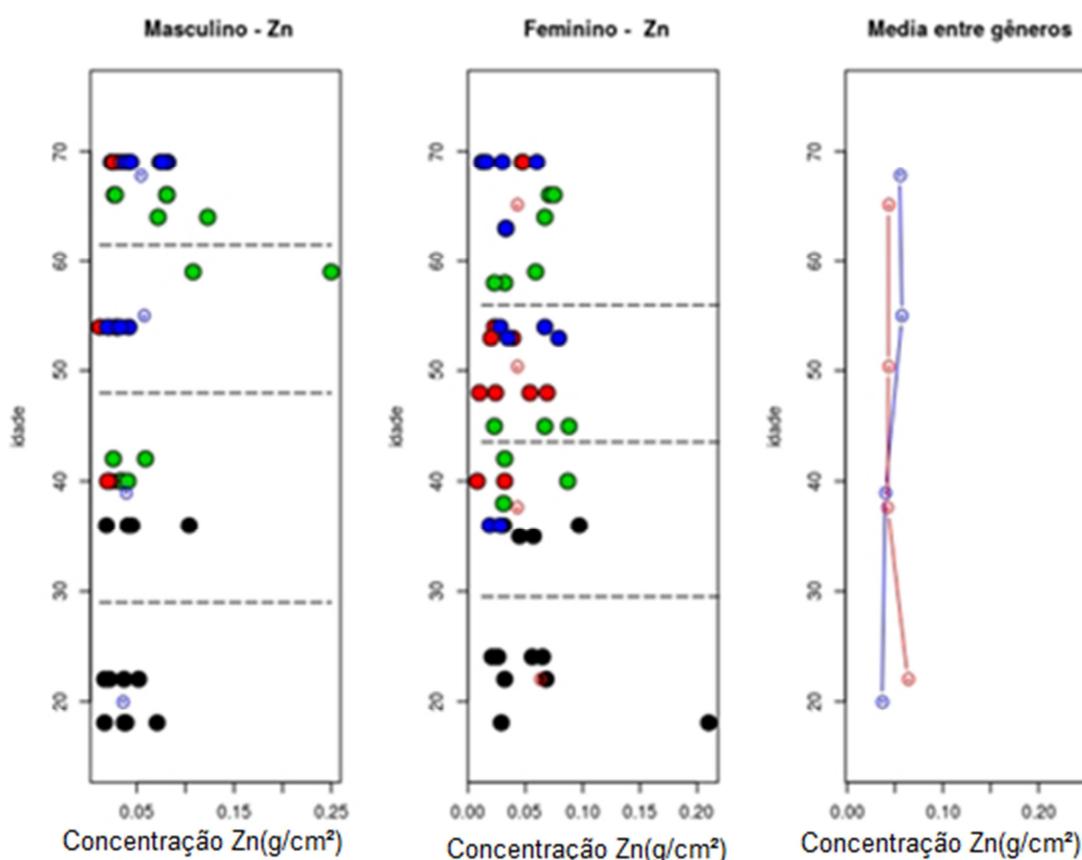


Gráfico 34: Dispersão do elemento zinco para os sexos com K-means
Fonte: Autoria própria

No Gráfico 34 de dispersão acima mostrado, observa-se que a média das concentrações do zinco encontram-se de forma mais dispersa entre os grupos dentários no feminino, comparado com o masculino. Os pré-molares, molares apresentam-se dispersos na faixa etária entre os 40 anos a 70 anos no feminino, enquanto que nos masculino os pré molares encontram-se na faixa dos 40 anos e posteriormente na faixa acima dos 60 anos e o grupo dos molares compreende a faixa etária entre os 55 anos aos 70 anos.

Os incisivos apresentam-se dispersos no feminino, enquanto que nos masculino apresentam-se pontualmente nas idades dos 40, 55, 70 anos. O gráfico das médias das concentrações oscila discretamente para ambos os sexos. A hipótese nula em que não há diferença entre a concentração média de zinco em ambos os gêneros não foi rejeitada a um p-valor de 0.7698. Isso implica em dizer que a concentração de zinco no gênero masculino foi de 0.04864583 g/cm², enquanto no feminino foi de 0.04645833 g/cm². Não há variação da concentração de

zinco entre os sexos, p-valor: 0.04645833, o que na verdade é um resultado indeciso para nível de significância de 5%. No Gráfico 34, da média entre sexos, o grupo masculino sugere apresentar uma discreta oscilação comparada com o grupo feminino.

4.6.4 Análise dos grupos dentários em relação ao elemento zinco para feminino e masculino

O Gráfico 35, demonstra os boxplots para masculino e feminino. A concentração de zinco no esmalte é superior na dentina para feminino, enquanto que no masculino observou-se o oposto. Verificou-se que as maiores dispersões dos dados estão no M- feminino e M –masculino.

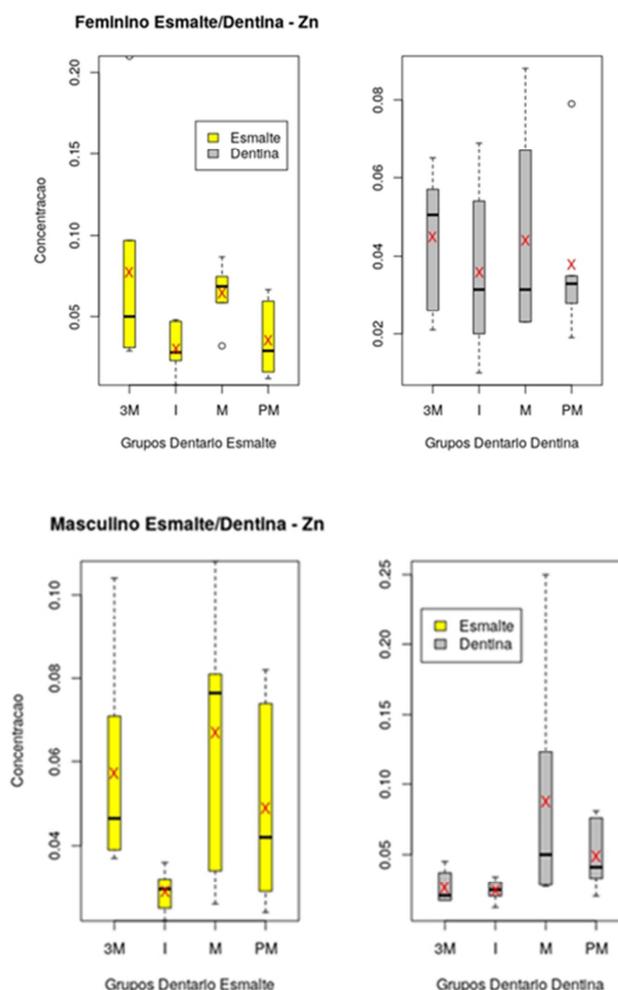


Gráfico 35: Boxplot com as concentrações de zinco distribuídas nos grupos dentários e suas respectivas médias em x vermelho.

Fonte: Autoria própria

A Tabela 29 expressa numericamente os boxplots mencionados anteriormente, no grupo feminino notou-se diferença significativa na variabilidade no terceiros molares ($p=0.009383$). No grupo masculino houve uma diferença significativa na variabilidade nos pré-molares ($p=0.04197$), e não conclusivo para molares ($p=0.1098$) e terceiros molares ($p=0.003753$). Nas médias as concentrações de zinco em relação aos grupos dentários para feminino e masculino não houve diferença significativa.

Tabela 29: Análise das médias e variâncias

Feminino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	0.03033333	0.03600000	0.6215	N.S.	0.4327	N.S.
Pré-molares	0.03550000	0.03783333	0.8575	N.S.	0.8557	N.S.
Molares	0.06516667	0.04400000	0.1498	N.S.	0.4369	N.S.
3º molares	0.07783333	0.04500000	0.3117	N.S.	0.009383	S.
Masculino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	0.02900000	0.02416667	0.2328	N.S.	0.353	N.S.
Pré-molares	0.04883333	0.04866667	0.9907	N.S.	0.9539	N.S.
Molares	0.067	0.088	0.5971	N.S.	0.04197	S.(Indeciso*)
3º molares	0.05733333	0.02616667	0.03249	S. (Indeciso*)	0.1098	S.

Fonte: Autoria própria. (*) Não conclusivo para 5%.

4.6.5 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os gêneros

A Tabela 30 exhibe a diferença significativa na variância do zinco em esmalte nos incisivos ($p=0.027$), em dentina nos incisivos ($p=0.03651$), em dentina nos molares ($p=0.02277$), e em esmalte nos terceiros molares ($p=0.04897$).

Tabela 30: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de zinco

	μ Masculino	μ Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Esmalte I	0.02900000	0.03033333	0.8467	N.S.	0.027	S.
Dentina I	0.02416667	0.03600000	0.2651	N.S.	0.03651	S.
Esmalte PM	0.04883333	0.03550000	0.3458	N.S.	0.9298	N.S.
Dentina PM	0.04866667	0.03783333	0.4301	N.S.	0.7435	N.S.
Esmalte M	0.06700000	0.06516667	0.9047	N.S.	0.2856	N.S.
Dentina M	0.088	0.044	0.2818	N.S.	0.02277	S.
Esmalte 3M	0.05733333	0.007	0.253	N.S.	0.04897	S.
Dentina 3M	0.02616667	0.010	0.140	N.S.	0.3917	N.S.

Fonte: Autoria própria

O gráfico 36, apresenta a média das concentrações de zinco quando comparamos as estruturas esmalte e dentina com os sexos, foi encontrado maior concentração na dentina molares masculino e em seguida em esmalte em molares feminino. Notou-se menor concentração em esmalte de terceiros molares feminino.

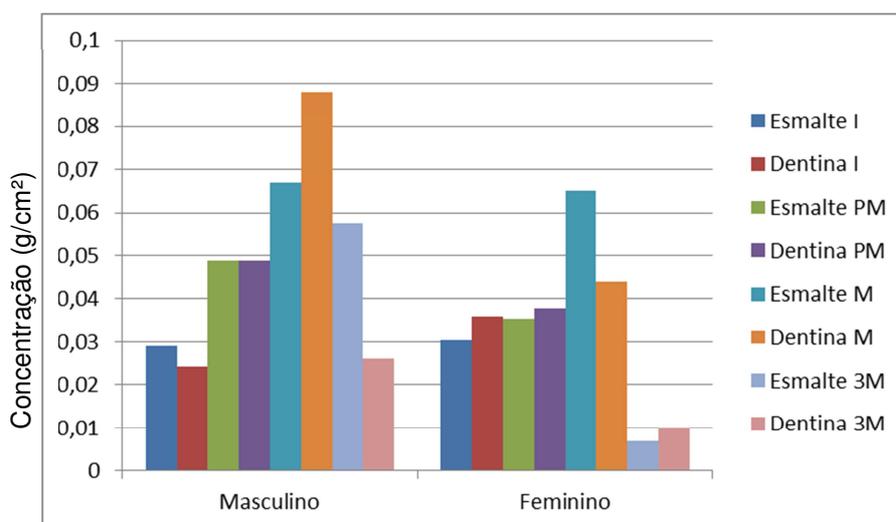


Gráfico 36: Relação das médias da concentrações do zinco com os grupos dentários

Fonte: Autoria própria

4.6.6 Matriz de correlação

A correção do elemento zinco de acordo com os grupos dentários, ilustrada na Figura 37, determina que quanto maior os círculos, maior a correlação, e quando tendem à cor vermelha mais negativa é, enquanto a tendência para a cor azul será positiva. Pode-se observar que no grupo masculino existe uma correlação maior entre os grupos dentários e o elemento zinco comparado com o grupo feminino.

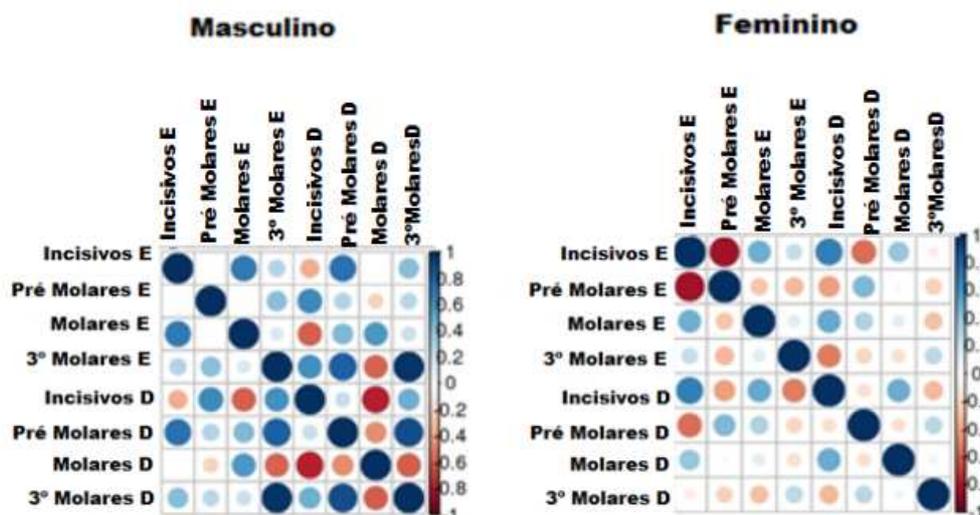


Figura 37: Matriz de correlação para o elemento zinco
Fonte: Autoria própria

4.6.7 Dendograma para o elemento zinco

Relação de distribuição em peso do zinco em relação às estruturas esmalte e dentina nos incisivos, pré-molares, molares e terceiros molares nos sexos masculino e feminino, ilustrada na Figura 38. No masculino o peso da média da concentração do molar (dentina) é maior que a soma do peso das médias das concentrações dos demais dentes. No feminino ocorre a mesma situação, porém esta situação foi observada no terceiro molar (esmalte).

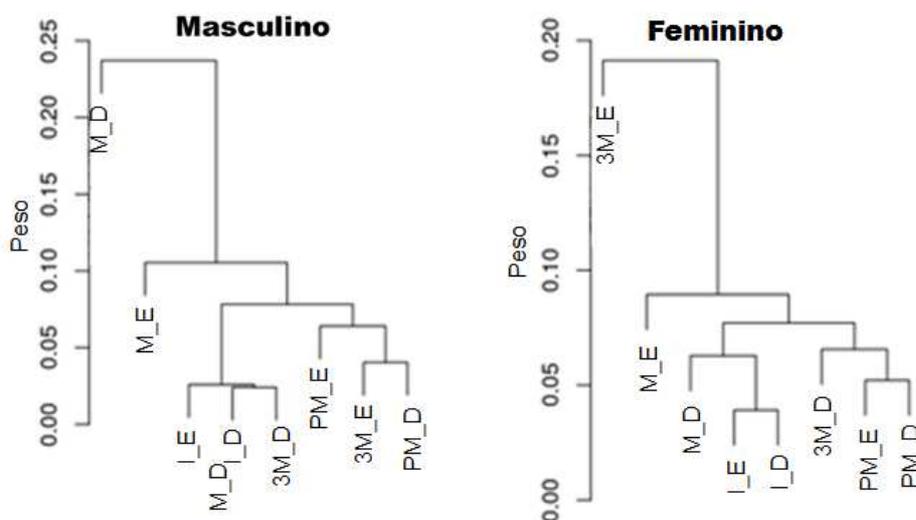


Figura 38: Dendograma do elemento zinco
Fonte: Autoria própria

4.7 RESULTADOS PARA O ELEMENTO CHUMBO

4.7.1 Análise geral

Na análise geral, considerando-se todos os dentes do grupo amostral dessa pesquisa tanto para masculino e feminino, não houve diferença significativa em relação ao elemento chumbo resultando no $p=0.682$ e no teste variacional não houve diferença significativa com $p=0.7666$. O Gráfico 37 demonstra a densidade relacionado à concentração do elemento chumbo.

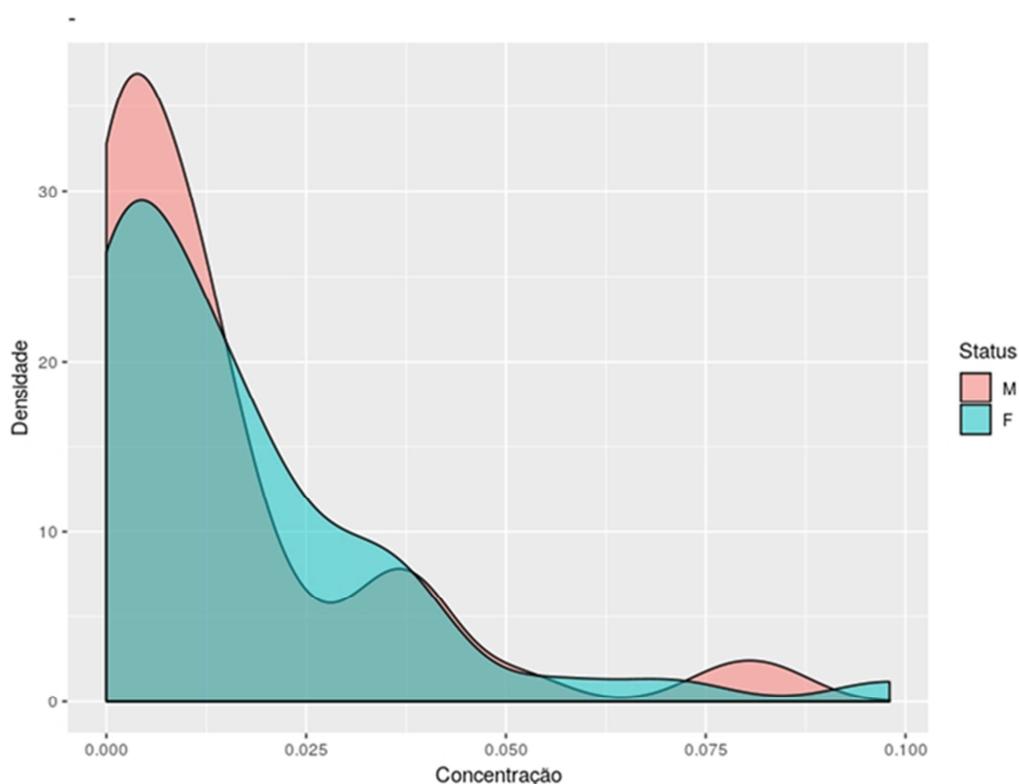


Gráfico 37: Relação da densidade x concentração (g/cm²) do chumbo para masculino e feminino

Fonte: Autoria própria

A concentração máxima de 0.098 g/cm² foi encontrada no grupo masculino, de acordo com a Tabela 31.

Tabela 31: Relação das concentrações de chumbo (g/cm²), para os sexos

Chumbo	mínimo	máximo	média	desvio padrão
Masculino	0.00000	0.08400	0.01438	0.01918624
Feminino	0.00000	0.09800	0.01602	0.02003984

Fonte: Autoria própria

A média na concentração de chumbo comparada para todos os dentes masculino na dentina foi de 0.01758333 g/cm² para o esmalte foi de 0.01116667 g/cm². A concentração de dentina e esmalte não difere entre si com p-valor= 0.2516 pelo teste t-Student.

Nas amostras femininas, a concentração na dentina foi de 0.02083333 g/cm² e para o esmalte foi de 0.01120833 g/cm². Isso implica em um ganho maior de 46,20 % no caso feminino, no Gráfico 38 exibe a dispersão do elemento chumbo para masculino e feminino. A concentração de dentina e esmalte, considerando ambos os sexos, não diferem-se entre si com p-valor= 0.09754 pelo teste t-Student. De fato, parece não haver maior concentração de chumbo das amostras na dentina que no esmalte, em média uma diferença de $\mu_{M_dentina} - \mu_{M_esmalte} = 0.00641666$ g/cm² para o masculino e uma diferença $\mu_{F_dentina} - \mu_{F_esmalte} = 0.009625$ g/cm² para o feminino, ambos com 95% de confiança. Este resultado corrobora com o estudo de (CARVALHO, 2015) que identificou o elemento chumbo em menor concentração no esmalte. O chumbo presente na parte interna do dente corresponde à acumulação *ante-mortem*, e o chumbo nas regiões mais externas está associado à captação *post-mortem* (CARVALHO ET AL., 2007).

Com relação aos sexos, a diferença da concentração de chumbo independente da estrutura não é significativa (p-valor > 5% para ambos os sexos). Parece não haver diferença entre sexos, mas entre estruturas.

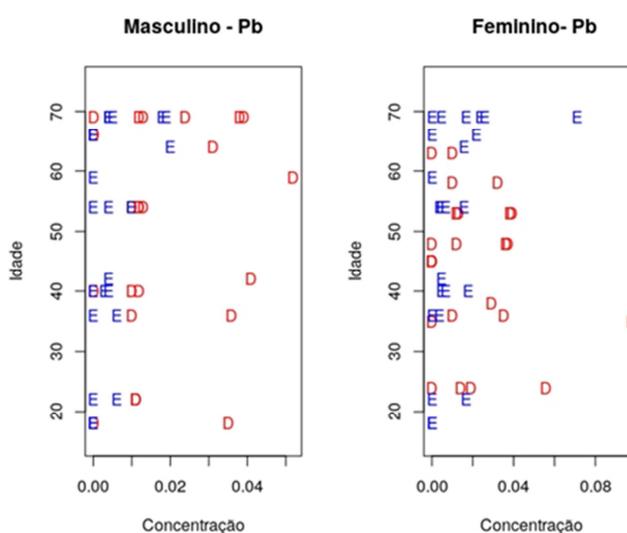


Gráfico 38: Dispersão da média da concentração de chumbo para masculino e feminino
 Fonte: Autoria própria

Para a análise da variância no masculino para dentina e esmalte, o p-valor foi de 0.08423, enquanto no feminino o p-valor foi de 0.05306. Esse resultado foi esperado, pois houve diferença nas médias entre a dentina e o esmalte, para o caso masculino. Também não houve diferença na variabilidade no sexo masculino com p-valor >5%, no limite de decisão.

No caso feminino, essa diferença nas médias não implicou em uma diferença significativa p-valor >5%. Essas características gerais para a dentina do Pb (dentina)= $0.01920833 \pm 0.01953062$ recaem a um coeficiente C.V. de 101%, enquanto para o Pb (esmalte)= 0.0111875 ± 0.01888899 apresentando C.V. de 168% para o esmalte. Tais medidas exploratórias indicam que, de fato existe maior concentração de chumbo na dentina que no esmalte, independente do sexo. Tal incerteza se deve ao tamanho da amostra. Para futuras análises deve-se aumentar o tamanho amostral para respeitar a Lei dos Grandes Números (SHELDON, 2010). Isso implica em dizer que pode-se encontrar resultados com incertezas cada vez menores e maior confiabilidade no resultado. O Gráfico 39 mostra a dispersão do elemento chumbo para esmalte e dentina.

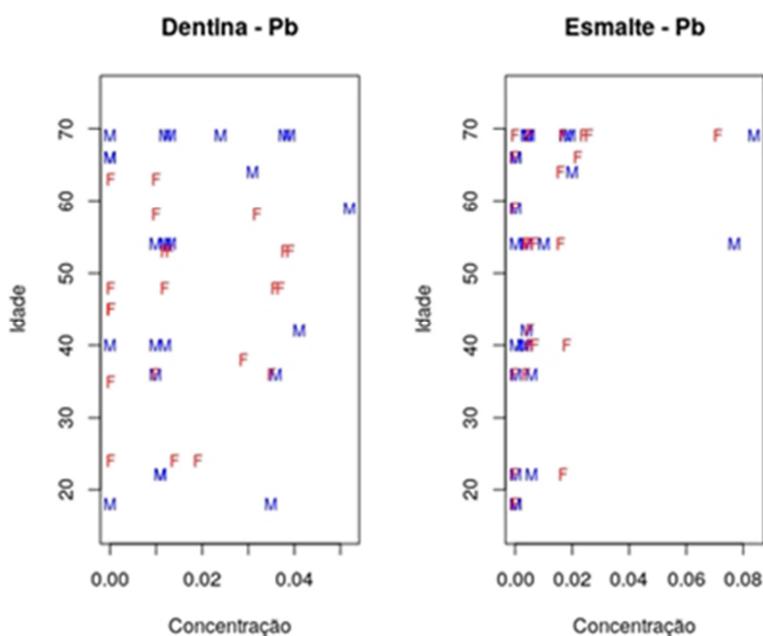


Gráfico 39: Dispersão de chumbo para dentina e esmalte
Fonte: Autoria própria

4.7.2 Análise Geral, considerando o dente como um todo (esmalte + dentina) comparação entre Feminino e Masculino.

De acordo com a Tabela 32, para a análise (esmalte + dentina) entre os gêneros feminino e masculino, a média das concentrações do elemento chumbo não houve diferença significativa. Porém, observa-se que não houve significativa diferença na variabilidade do chumbo nos incisivos ($p=0.09207$) e nos terceiros molares($p=0.009035$).

Tabela 32: Análise do chumbo em relação ao grupos dentários(esmalte + dentina)

	Masculino	Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.01150000	0.01533333	0.595	N.S.	0.09207	N.S.
Pré-Molares	0.02283333	0.02041667	0.7901	N.S.	0.8563	N.S.
Molares	0.01358333	0.01100000	0.6881	N.S.	0.1806	N.S.
3Molares	0.00958333	0.01733333	0.4259	N.S.	0.009035	S.

Fonte: Autoria própria

O Gráfico 40, mostra a média das concentrações do elemento chumbo apresenta-se maior nos pré-molares para ambos os sexos, seguido pelo grupo de terceiros molares feminino.

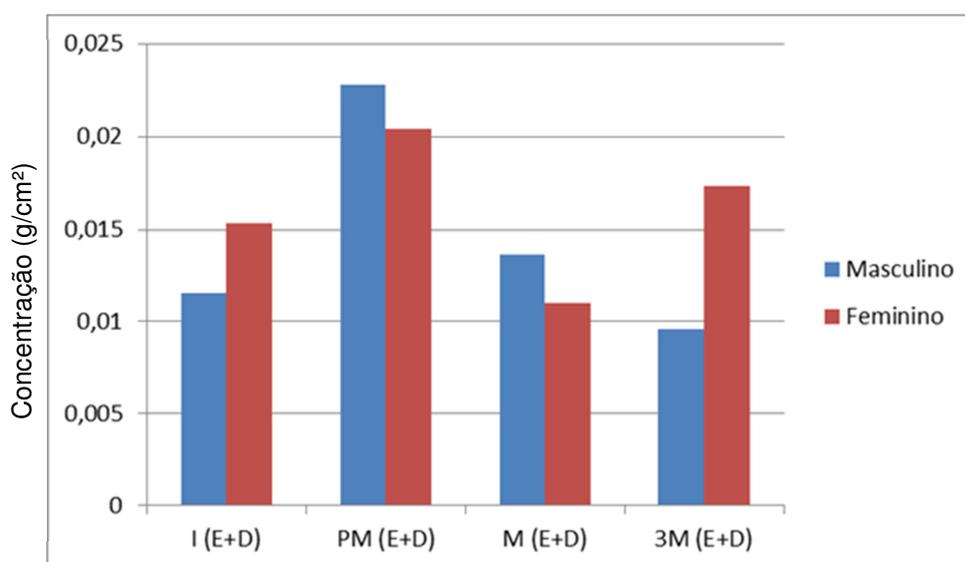


Gráfico 40: Média das concentrações de chumbo em relação ao grupos dentários(esmalte + dentina).

Fonte: Autoria própria

4.7.3 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas

Nesta etapa foram analisadas as médias das concentrações e variâncias de forma independente, separando-se as estruturas de esmalte e dentina.

4.7.3.1 Esmalte: comparação entre sexos

A diferença significativa na variabilidade do elemento chumbo no esmalte em incisivos ($p=0.02839$), pré-molares ($p=0.02839$), quando comparado entre feminino e masculino, demonstrada na Tabela 33.

Tabela 33: Análise comparativa entre gêneros com grupos dentários em esmalte

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor $\bar{\sigma}$	conclusão
Incisivos	0.01550000	0.01233333	0.815	N.S.	0.02839	Indeciso*
Pré-molares	0.01550000	0.01233333	0.815	N.S.	0.02839	Indeciso*
Molares	0.00450000	0.01016667	0.2913	N.S.	0.6449	N.S.
3º Molares	0.0020	0.0035	0.6382	N.S.	0.1092	N.S.

Fonte: Autoria própria. (*) Não decisivo para 5%.

Foi observada que a média das concentrações de chumbo em esmalte resultaram em maiores concentrações nos incisivos e pré-molares no masculino e feminino, exibido no Gráfico 41.

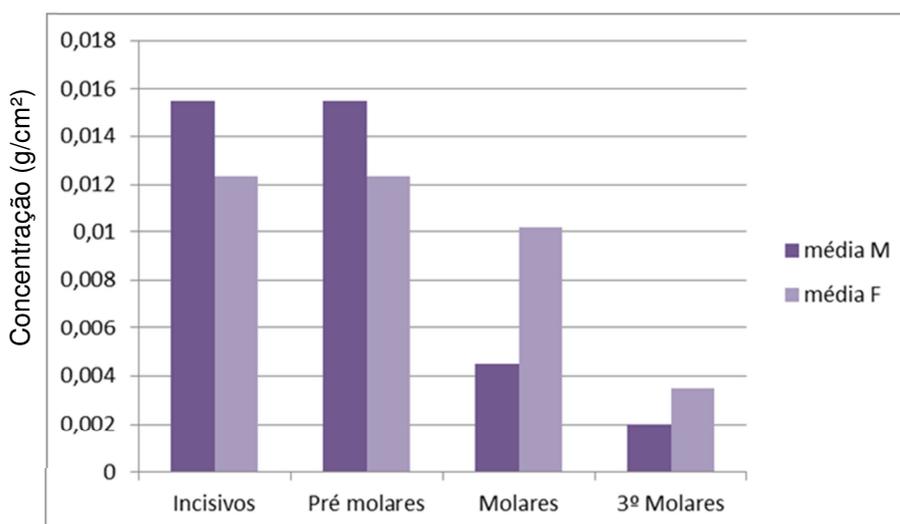


Gráfico 41: Média da concentração do Chumbo na dentina em relação aos grupos dentários
Fonte: Autoria própria

4.7.3.2 Dentina: comparação entre sexos

A Tabela 34 exibe discreta diferença na variância do chumbo na dentina nos incisivos($p=0.06472$), terceiros molares($p=0.05502$). Mas essa diferença não é significativa em relação às médias das concentrações de chumbo.

Tabela 34: Análise comparativa entre gêneros com grupos dentários em dentina

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	0.00750000	0.01833333	0.1442	N.S.	0.06472	Indeciso*
Pré-molares	0.023	0.022	0.9117	N.S.	0.5332	N.S.
Molares	0.02266667	0.01183333	0.3446	N.S.	0.4234	N.S.
3º Molares	0.01716667	0.03116667	0.437	N.S.	0.05502	Indeciso*

Fonte: Autoria própria. (*) Não decisivo para 5%.

A média das concentrações do elemento chumbo apresenta-se maior nos terceiros molares feminino. E com menor média da concentração de chumbo em incisivos masculino, observada no Gráfico 42.

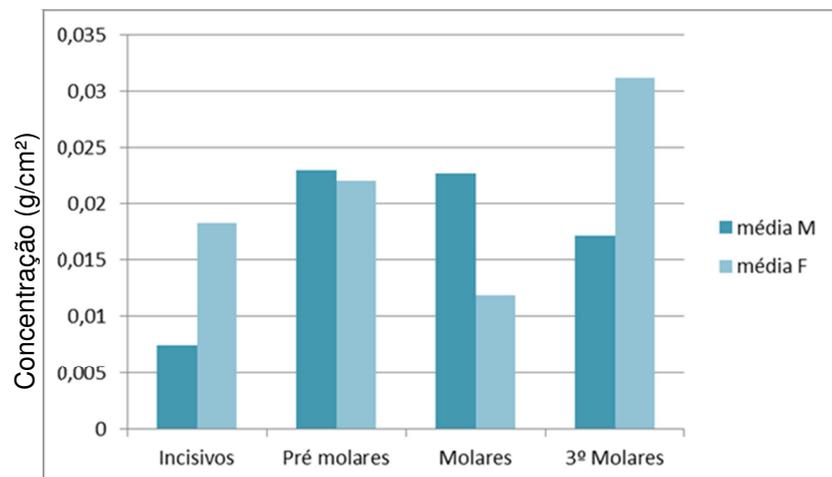


Gráfico 42: Média da concentração do chumbo na dentina em relação aos grupos dentários
Fonte: Autoria própria

Na análise geral, considerando o dente como um todo (esmalte+dentina), observa-se que não houve diferença na médias das concentrações, porém não houve diferença na variabilidade entre os incisivos e terceiros molares quando comparou-se os sexos. Na análise em estruturas esmalte e dentina separadas, tanto no esmalte quanto na dentina não foram observadas diferenças nas médias das

concentrações de chumbo, havendo maior variabilidade na estrutura da dentina quando comparados masculino e feminino.

O Gráfico 43 determina os pontos terceiros molares (preto), incisivos (vermelho), molares (azul) e pré-molares (verde), subdividido em grupos e por sexo. A análise k-mens selecionou para $R^2 > 95\%$ quatro grupos masculinos e quatro grupos femininos.

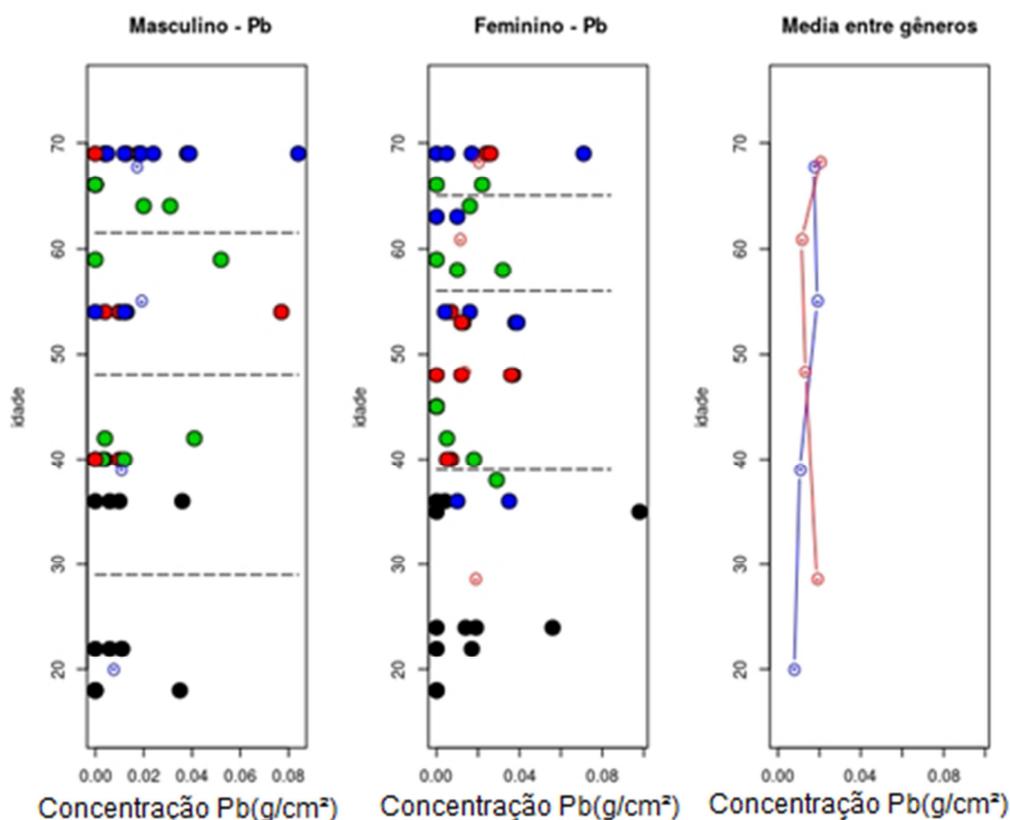


Gráfico 43: Dispersão do elemento chumbo para os sexos com K-means
Fonte: Autoria própria

No Gráfico de dispersão 43, observou-se que a média das concentrações do chumbo encontra-se mais dispersa entre os grupos dentários feminino, quando comparado ao masculino. Os incisivos e pré-molares apresentam dispersão na faixa dos 40 anos a 70 anos em ambos os gêneros. Os molares apresentam maior dispersão compreendendo a faixa dos 35 anos à 70 anos no feminino, enquanto que no masculino é compreendida na faixa à partir dos 55 anos a 70 anos.

A hipótese nula em que não há diferença entre a concentração média de chumbo em ambos os sexos não foi rejeitada a um p-valor de 0.682. Isso implica em dizer que a concentração de chumbo no masculino foi de 0.01437500 g/cm²,

enquanto no feminino foi de 0.0160208 g/cm². Não há variação da concentração de chumbo entre os sexos com p-valor: 0.7666. No Gráfico 44, da média entre sexos, ambos os sexos apresentam discreta oscilação com o aumento da idade.

4.7.4 Análise dos grupos dentários em relação ao elemento chumbo para feminino e masculino

O Gráfico 44, exibe os boxplots para masculino e feminino. A concentração de chumbo na dentina é superior no esmalte para ambos os sexos. Verificou-se que as maiores dispersões dos dados estão no 3M- feminino e M -masculino.

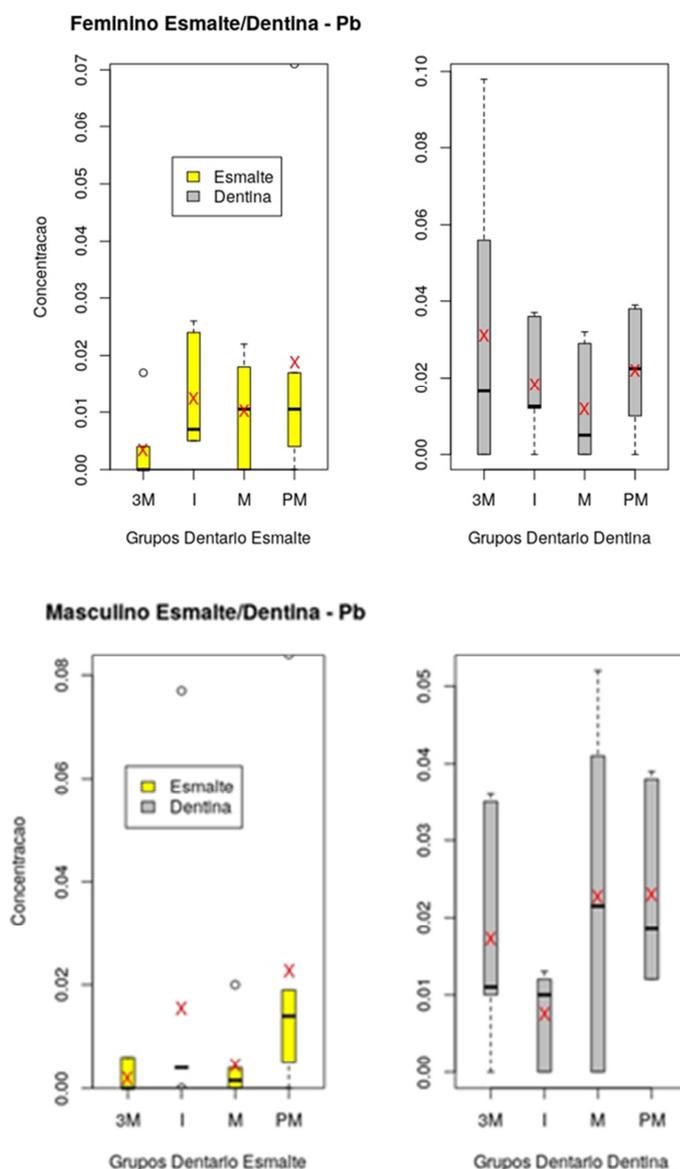


Gráfico 44: Boxplots com as concentrações de chumbo distribuídas nos grupos dentários e suas respectivas médias em x vermelho

Fonte: Autoria própria

A Tabela 35 expressa numericamente os boxplots apresentados anteriormente. O grupo feminino apresentou uma diferença significativa na variabilidade no terceiros molares ($p=0.001648$). Enquanto que o grupo masculino apresentou diferença significativa na variabilidade em incisivos ($p=0.002772$), molares ($p=0.04022$) e terceiros molares ($p=0.003753$). E nas médias as concentrações de chumbo em relação aos grupos dentários para feminino e masculino não houve diferença significativa.

Tabela 35: análise das médias e variâncias

Feminino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	Conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	0.01233333	0.01833333	0.4323	N.S.	0.3897	N.S.
Pré-molares	0.01883333	0.02200000	0.8117	N.S.	0.3697	N.S.
Molares	0.01016667	0.01183333	0.8245	N.S.	0.3589	N.S.
3º molares	0.00350000	0.03116667	0.1413	N.S.	0.001648	S.
<hr/>						
Masculino	média esmalte	média dentina	p-valor μ	Conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivo	0.0155	0.0075	0.55	N.S.	0.002772	S.
Pré-molares	0.02266667	0.02300000	0.9813	N.S.	0.07619	N.S.
Molares	0.00450000	0.02266667	0.1027	N.S.	0.04022	S.
3º molares	0.00200000	0.01716667	0.05347	N.S.	0.003753	S.

Fonte: Autoria própria

4.7.5 Análise das estruturas dentárias dos grupos dentários comparado com os sexos

A Tabela 36 demonstra a diferença significativa na variância do chumbo em esmalte nos incisivos ($p=0.02839$), em dentina nos incisivos ($p=0.06472$), em dentina nos molares ($p=0.02277$), e em dentina nos terceiros molares ($p=0.05502$), quando compara-se feminino e masculino.

Tabela 36: Análise comparativa entre os grupos dentários em relação à concentração de chumbo

	μ Masculino	μ Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Esmalte I	0.01550000	0.01233333	0.815	N.S.	0.02839	S.
Dentina I	0.00750000	0.01833333	0.1442	N.S.	0.06472	N.S.
Esmalte PM	0.02266667	0.01883333	0.9117	N.S.	0.5332	N.S.
Dentina PM	0.023	0.022	0.160	N.S.	0.605	N.S.
Esmalte M	0.00450000	0.01016667	0.2913	N.S.	0.6449	N.S.
Dentina M	0.02266667	0.01183333	0.3446	N.S.	0.4234	N.S.
Esmalte 3M	0.0020	0.0035	0.6382	N.S.	0.1092	N.S.
Dentina 3M	0.01716667	0.03116667	0.437	N.S.	0.05502	Indeciso*

Fonte: Autoria própria. (*) Não decisivo para 5%.

A maior média das concentrações de chumbo na dentina dos terceiros molares feminino enquanto a menor média foi em esmalte de terceiros molares masculino, de acordo com o Gráfico 45.

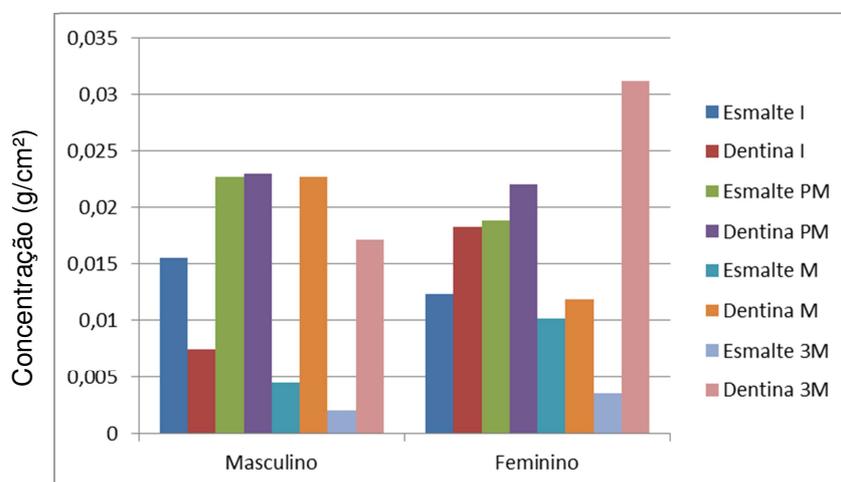


Gráfico 45: Relação das médias da concentrações do chumbo com os grupos dentários
Fonte: Autoria própria

4.7.6 Matriz de correlação

A correlação entre os grupos dentários conforme o elemento chumbo, pode ser verificada na ilustração Figura 39, que expressa: quanto maior os círculos, maior a correlação. Quando tendem à cor vermelha mais negativa é, enquanto a tendência para a cor azul será positiva. Em relação ao elemento chumbo podemos observar que houve pouca correlação entre os grupos dentários analisados tanto no masculino quanto no feminino.

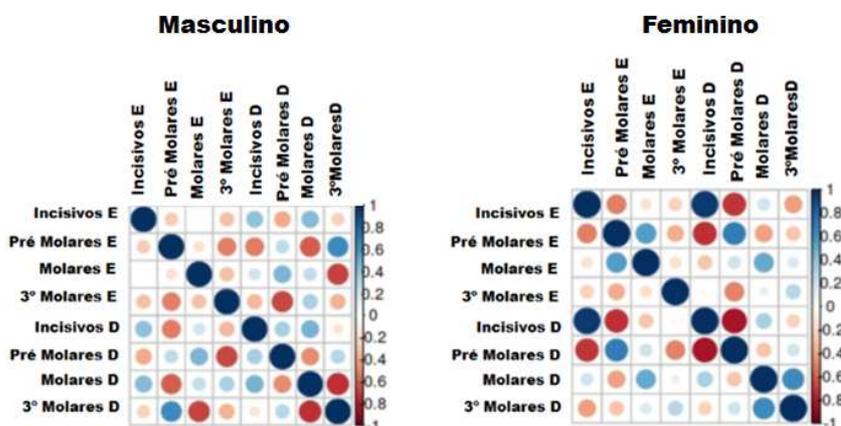


Figura 39: Matriz de correlação do elemento chumbo
Fonte: Autoria própria

4.7.7 Dendograma para o elemento chumbo

A relação da distribuição em peso do chumbo em relação às estruturas esmalte e dentina nos incisivos, pré-molares, molares e terceiros molares nos sexos masculino e feminino, apresentada na Figura 40. No masculino o peso da média da concentração dos pré-molares (esmalte) é maior que a soma do peso das médias das concentrações dos demais dentes. No feminino ocorre a mesma situação porém é observado no terceiro molar (dentina).

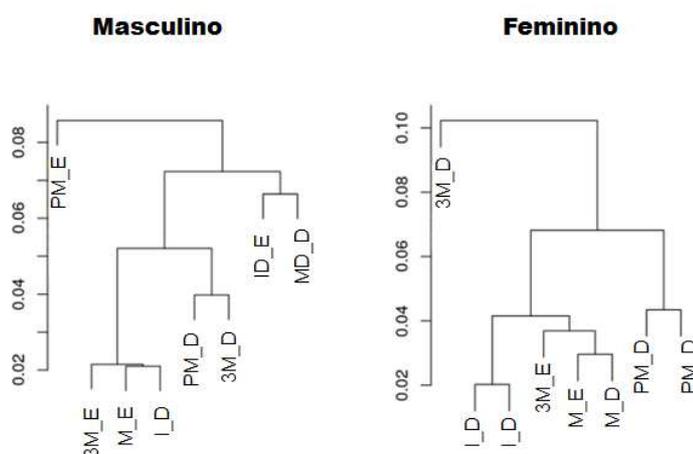


Figura 40: Dendograma do elemento chumbo
Fonte: Autoria própria

4.8 RESULTADOS PARA ANÁLISES PELO MEV

A superfície do esmalte varia com idade, como demonstra a microscopia eletrônica, em que acontece uma diminuição dos poros, à medida que os cristais incorporam íons (CATE, 1998). Apesar de que macroscopicamente a superfície do esmalte de um dente apresente-se lisa e brilhante, microscopicamente essa superfície apresenta-se irregular (KATCHUBIRAN & ARANA, 2012).

A Figura 41 apresenta o relatório de algumas amostras em que foram caracterizados os seguintes elementos: C, O, Na, Mg, P, Ca, Cl, nas amostras CAO 26, JBA 35 e MSM 31. Os pontos 1, 2 e 3 referem-se à estrutura do esmalte, enquanto que os pontos 3, 4 e 5 referem-se à estrutura da dentina, as demais amostras caracterizadas encontram-se no Apêndice C.

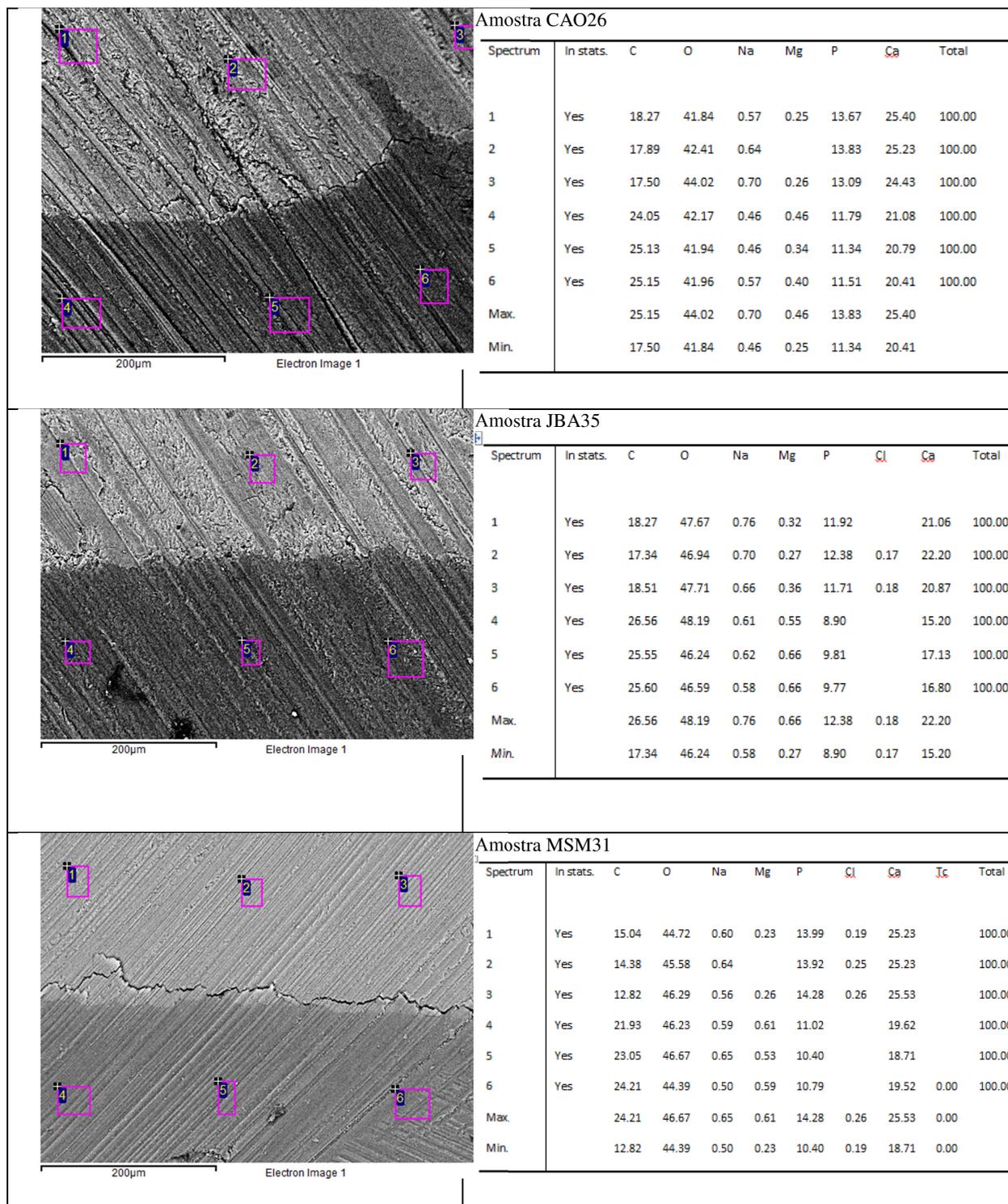


Figura 41: Relatório da composição química presente nas amostras CAO26, JBA35 e MSM31 em relação aos diferentes pontos analisados.

Fonte: Autoria própria

Foram selecionados quatro amostras aleatórias dos grupos dentários (I, PM, M e 3M) para cada sexo masculino e feminino, para análise pela técnica Energia Dispersa de Raios- X (EDS). Selecionou-se seis pontos, sendo três em esmalte e três em dentina, nas amostras, resultando na caracterização elementar.

O conteúdo e a organização estrutural da camada externa hígida do esmalte são de significativa importância para a percepção do processo de perda mineral que ocorre nas lesões provenientes da ação da dieta (VIEIRA ET AL., 2006).

A dentina evidencia-se pela presença de múltiplos túbulos dentinários ordenados muito próximos que atravessam toda a sua espessura. Os túbulos dentinários estendem-se por toda a espessura da dentina da junção amelo-dentinária até a polpa (BHASKAR, 1989).

A média da concentração de cálcio, nos dentes masculino na estrutura de dentina foi de 17.838 (wt%) e para o esmalte foi de 24.933 (wt%). A concentração de dentina e esmalte, diferem entre si com p-valor $\ll 0.05$, pelo teste t-Student.

Nas amostras femininas, a concentração na dentina foi de 15.569 (wt%) e para o esmalte foi de 23.630 (wt%), diferem-se entre si com p-valor $\ll 0,05$.

Na análise da variância no masculino para dentina e esmalte o p-valor foi de 0.08732, enquanto que no feminino o p-valor foi de 0.2347, ambos não significativo.

4.8.1 Comparação entre Feminino e Masculino.

De acordo com a Tabela 37, para a análise (esmalte +dentina) entre os gêneros feminino e masculino, a média das concentrações do elemento cálcio houve diferença nos terceiros molares ($p=0.05597$). Também observa-se que não houve diferença na variabilidade do cálcio.

Tabela 37: Análise comparativa entre os sexos em relação à concentração de cálcio pela técnica EDS

	Masculino	Feminino	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	21.851	18.571	0.2677	N.S.	0.8674	N.S.
Pré-molares	21.971	20.318	0.6043	N.S.	0.4589	N.S.
Molares	18.905	21.331	0.3371	N.S.	0.7227	N.S.
3º Molares	22.815	18.176	0.05597	N.C.	0.9908	N.S.

Fonte: Autoria própria

Observa-se no Gráfico 46, a média das concentrações de cálcio em terceiros molares masculino apresenta maior concentração em relação aos demais grupos dentários.

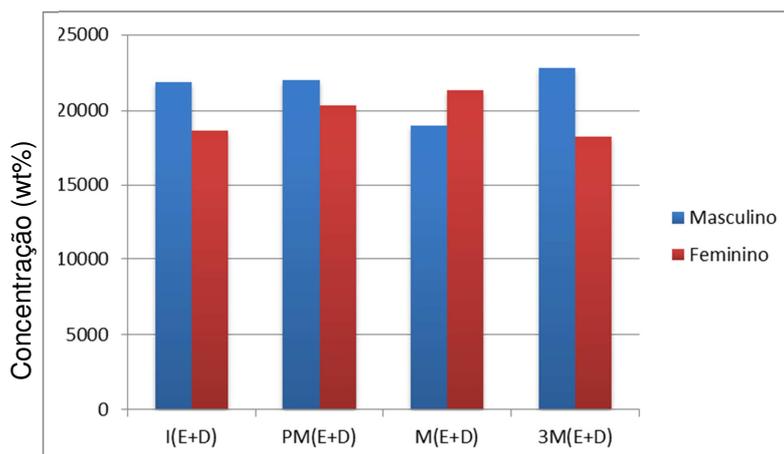


Gráfico 46: Relação das médias das concentrações do elemento cálcio nas estruturas (esmalte+ dentina), comparada entre feminino e masculino

Fonte: Autoria própria

4.8.2 Análise das estruturas esmalte e dentina separadas

Nesta etapa foram analisadas as médias das concentrações e variâncias de forma independente, separando-se as estruturas de esmalte e dentina.

4.8.2.1 Esmalte: comparação entre sexos

Considerando-se o grupo amostral analisado, observa-se na Tabela 38, uma diferença significativa na média das concentrações do elemento cálcio no esmalte em incisivos($p=0.03425$), pré-molares($p=0.03425$), e molares($p=0.03887$) quando comparado feminino ao masculino. Não há diferenças na variabilidade.

Tabela 38: Análise do elemento cálcio em esmalte, pela técnica EDS

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	25.860	23.063	0.03425	S.	0.8807	N.S.
Pré-molares	25.860	23.063	0.03425	S.	0.8807	N.S.
Molares	22.840	24.776	0.03887	S.	0.6991	N.S.
3º Molares	25.130	21.013	0.1369	N.S.	0.6013	N.S.

Fonte: Autoria própria

Na análise do elemento cálcio em esmalte, observa-se as médias das concentrações são maiores em incisivos, pré-molares e terceiros molares no masculino, de acordo com o Gráfico 47.

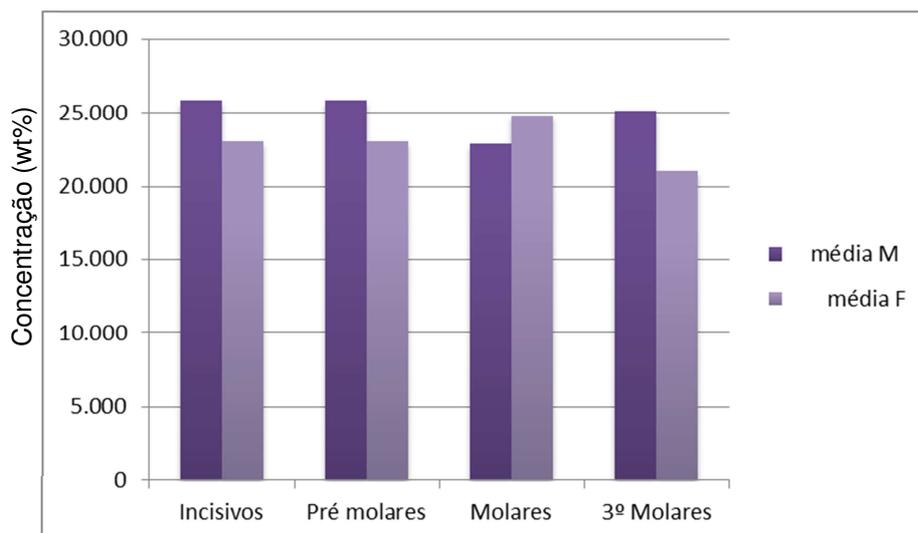


Gráfico 47: Média da concentração do cálcio no esmalte em relação aos grupos dentários pela técnica EDS

Fonte: Autoria própria

4.8.2.2 Dentina: comparação entre sexos

A Tabela 32 apresenta a diferença na média das concentrações do cálcio na dentina dos incisivos ($p=0.07614$), pré-molares ($p=0.07568$). Também verificou-se a diferença em relação à variabilidade nos pré-molares ($p=0.08578$).

Tabela 39: Análise do cálcio em dentina, pela técnica EDS

	média M	média F	p-valor μ	conclusão	p-valor δ	conclusão
Incisivos	17.843	14.080	0.07614	N.S.	0.431	N.S.
Pré-molares	18.040	14.970	0.07568	N.S.	0.2318	N.S.
Molares	14.970	17.886	0.103	N.S.	0.08578	N.S.
3º Molares	20.500	15.340	0.1327	N.S.	0.1379	N.S.

Fonte: Autoria própria

Observa-se no Gráfico 48, que os terceiros molares masculino apresentaram a média das concentrações maiores de cálcio na dentina, em relação aos demais grupos.

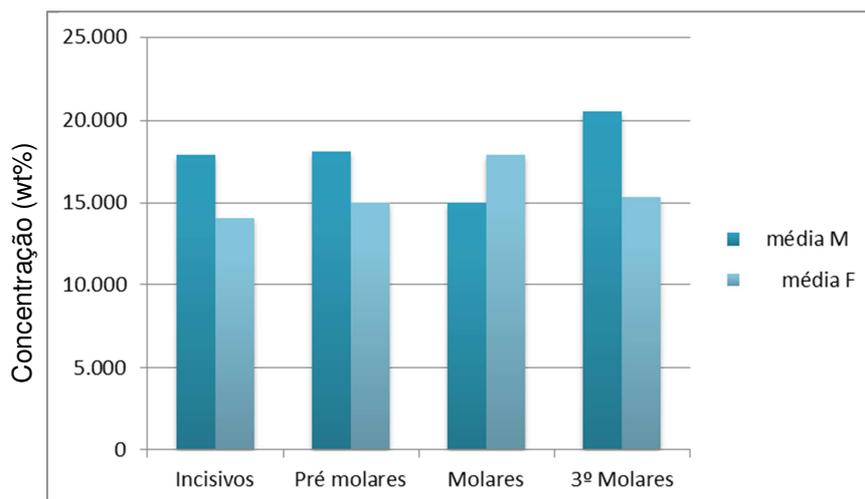


Gráfico 48: Média da concentração do cálcio na dentina, em relação aos grupos dentários.
Fonte: Autoria própria

A partir dos resultados na análise no MEV, quando analisado o dente como um todo (esmalte + dentina), não há diferenças em relação às médias das concentrações de cálcio, nem diferenças na variabilidade, tanto para feminino como para masculino. Contudo, na análise separada das estruturas em esmalte e dentina, no esmalte foi observado que houve uma diferença na média das concentrações nos incisivos, pré-molares e molares, enquanto que na dentina houve diferença na média das concentrações em incisivos e pré-molares.

Na análise de superfície com o auxílio do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), observa-se na Figura 42 (fotomicrografias 1 e 2) as superfícies de esmalte (coloração mais clara) e a dentina (coloração escura). E nas fotomicrografias 2 e 4 observa-se a região da dentina e presença de túbulos dentinários.

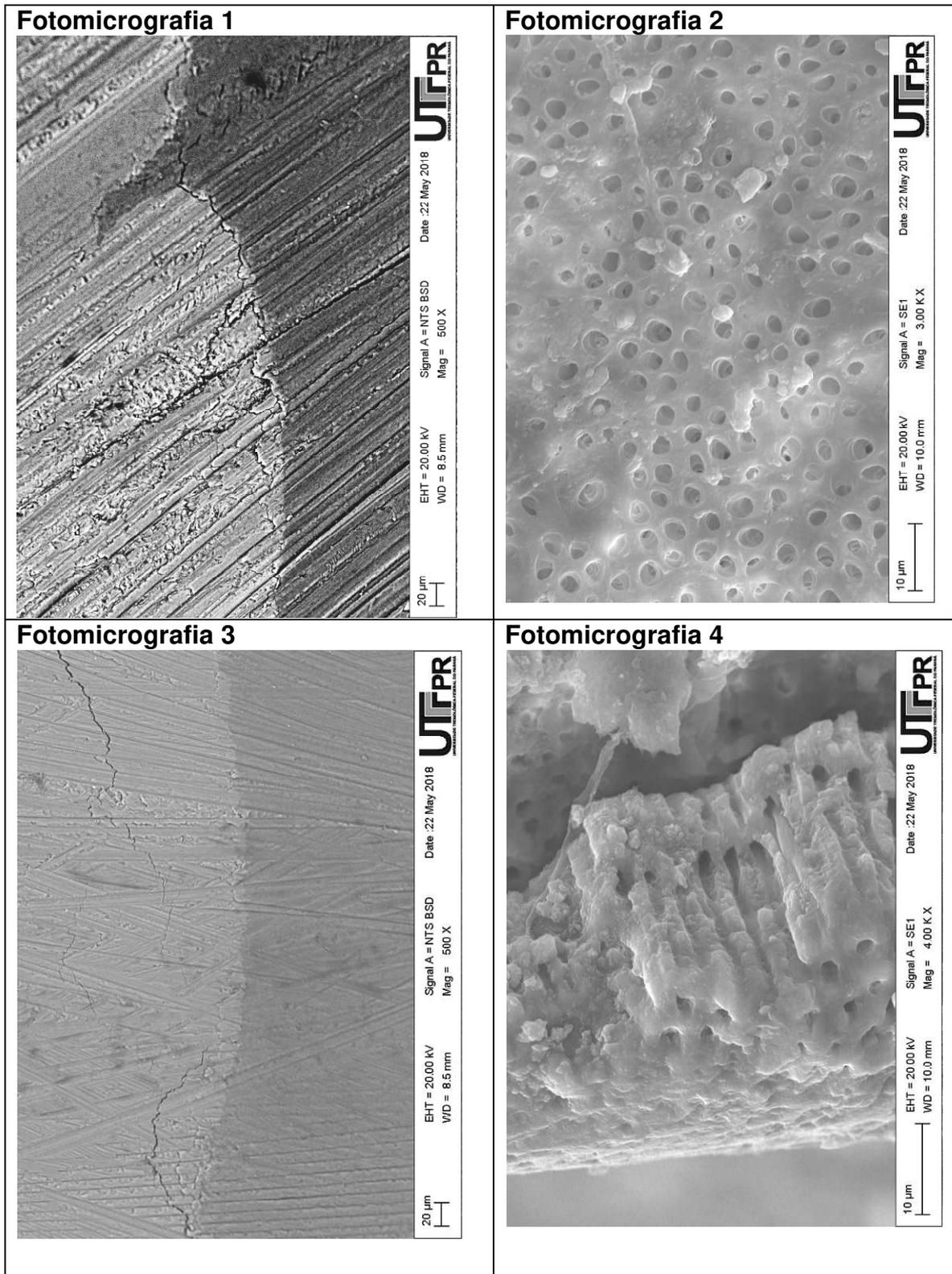


Figura 42: Fotomicrografias das estruturas de esmalte e dentina
Fonte: Autoria própria

5. CONCLUSÕES

A análise qualitativa para o alvo de Au e colimador de 1mm, proporcionou melhor caracterização para as amostras de dentes, através da comprovação dos testes realizados.

Mediante a técnica de EDXRF, este estudo identificou a presença de vários elementos químicos como parte da composição da estrutura bioquímica dos tecidos dentários. Quanto à caracterização elementar dos dentes analisados, foram identificados os seguintes elementos: Mg, Al, P, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br, Sr, Ba, Hg, Pb.

A análise semi-quantitativa pela técnica de EDXRF, permitiu identificar as concentrações dos elementos químicos estudados nessa pesquisa, através do *software* FTPX-APMTEK, baseado na medida das intensidades (número de raios X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos que são emitidos pelos elementos constituintes da amostra (BOUMANS, 1989).

Por intermédio dos testes de variância ANOVA e Teste Tukey, verificou-se que, na análise considerando o dente como um todo (esmalte + dentina), não há diferença significativa entre os sexos, porém observou-se que há diferença significativa entre os elementos químicos presentes nas estruturas de esmalte e dentina. Comprovou-se também que o elemento Cálcio é majoritário nas estruturas de esmalte e dentina.

O elemento cálcio, quando analisado como um todo, não apresentou diferença significativa das médias das concentrações para masculino e feminino. No entanto apresentou maior concentração em dentina, ocorrendo maiores dispersões em molares, tanto para feminino, quanto para masculino. Em relação à idade, no grupo masculino foi observado o aumento com a idade e no feminino nota-se uma oscilação na faixa dos 45-50 anos.

No elemento estrôncio, observa-se maior concentração na dentina para ambos os sexos, ocorrendo maior dispersão em incisivos no grupo feminino, e em pré-molares no masculino. Observou-se que a média da concentração de estrôncio aumenta com a idade.

O elemento ferro apresentou maiores concentrações em dentina para ambos os sexos, com maiores dispersões em terceiros molares para ambos os sexos. No grupo masculino a média das concentrações de ferro aumenta com a idade e no grupo feminino há uma oscilação com o aumento da idade.

O zinco apresentou maiores concentrações em esmalte para feminino, e em dentina para masculino. Verificaram-se maiores dispersões em molares para ambos os sexos. Constatou-se que houve discreta variação o elemento zinco com o aumento da idade.

Observou-se a concentração de chumbo em dentina é superior para ambos os sexos, com dispersões maiores em terceiros molares feminino e em molares masculino. Notou-se um aumento da concentração do chumbo com a idade.

Os resultados do MEV vão de encontro aos resultados encontrados pela técnica do EDXRF para o elemento cálcio considerando-o como elemento majoritário, entretanto divergem-se em relação às médias das concentrações nas estruturas. Foi observada maior concentração em dentina no EDXRF, enquanto que no MEV foi encontrado em esmalte.

Conclui-se que a análise dos elementos traço nos dentes e a sua interação entre os sexos, estruturas de esmalte/ dentina e idade, é de considerável importância para os aspectos da bioquímica do dente, e também do ponto de vista antropológico e forense, podendo obter-se inferências à respeito de hábitos alimentares, poluições ambientais e patologias associadas. Demonstrou-se que a técnica de EDXRF permite a análise quantitativa de amostras biológicas, com a vantagem de não ser destrutiva.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As possíveis sugestões e/ou propostas futuras para a devida continuidade do trabalho seriam as seguintes:

1. Ampliar o grupo amostral para realização de novas análises comparativas em relação ao gênero, idade, estruturas dentárias (esmalte/ dentina).
2. Avaliar um grupo dentário específico, para melhor análise dos resultados.
3. Investigar outros elementos traços encontrados nos dentes
4. Estender o estudo de caracterização elementar para outras estruturas como cimento e região da polpa (túbulos dentinários).
5. Realizar uma análise de correlação dos elementos traço encontrados.

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Summary report hair analysis panel discussion exploring the state of the science**, 2001.

Disponível em: http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair_analysis/index.html. Acessado 28 agosto, 2018.

ALEXANDRE T. L.; BUENO, M. I. M. S. **Classification of some species, genera and families of plants by x-ray spectrometry**. *X-ray spectrometry*, v. 35, n.4, p. 257- 260, 2006.

ALMEIDA, T. **Estudo da Distribuição de Elementos Vestigiais em Tecidos Humanos Saudáveis e com Carcinoma por Espectrometria De Raios –X**. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa, 2007.

ALMEIDA GRC, DE SOUZA GUERRA C, TANUS-SANTOS JE, BARBOSA JR. F, GERLACH RF. **A plateau detected in lead accumulation in subsurface deciduous enamel from individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead**. *Environ Res.*v.107(2), p. 264-70, 2008.

ALMEIDA GRC, PEREIRA SARAIVA MC, BARBOSA JR. F, KRUG FJ, CURY JA, ROSÁRIO DE SOUSA MDL, ET AL. **Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas**. *Environ Res.*;v. 104(3), p. 337-45, 2007.

ALS-NIELSEN, J. ; MCMORROW, D. **Elements of Modern X-ray Physics**. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd, 2 ed., 2011.

ANDERSON, J.; GARNER, S. **Calcium and Phosphorus in a health and disease**. CRC Press, Inc., 1996.

ANJOS, M. J., BARROSO, R. C., PÉREZ, C. A., BRAZ, D., MOREIRA, S., DIAS, K. R. H. C., & LOPES, R. T. **Elemental mapping of teeth using μ SRXRF**. *Nuclear Instruments and Methods*. Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms, v. 213, p. 569–573, 2004.

AMR, M. A., & HELAL, A. F. I. **Analysis of trace elements in teeth by ICP-MS: implications for caries**. *Journal of Physical Science*, v. 21(2), p. 1–12, 2010.

ALOMARY, A., AL-MOMANI, I. F., OBEIDAT, S. M., & MASSADEH, A. M. **Levels of lead, cadmium, copper, iron, and zinc in deciduous teeth of children living in Irbid, Jordan by ICP-OES: some factors affecting their concentrations**. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185(4), p. 3283–3295, 2012.

ARORA M, HARE D, AUSTIN C, SMITH DR, DOBLE P. **Spatial distribution of manganese in enamel and coronal dentine of human primary teeth**. *Sci Total Environ*. v.409(7), p.1315-9, 2011.

ARORA M, AUSTIN C. **Teeth as a biomarker of past chemical exposure.** *Curr Opin Pediatr.* v. 25(2) p.261-7, 2013.

ARORA, M., KENNEDY, B. J., ELHLOU, S., PEARSON, N. J., WALKER, D. M., BAYL, P., & CHAN, S. W. Y. **Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure.** *Science of the Total Environment*, v. 371(1-3), p. 55–62, 2006.

ASH, M. M., & NELSON, S. J. **Wheeler's dental anatomy, physiology and occlusion.** Philadelphia, PA: W.B. Saunders, p. 32-53, 2002.

BAILEY, D.A.; MCKAY, H.A.; MIRWALD, R.L.; CROCKER, P.R.; FAULKNE, R. A. **A six-year longitudinal study of the relationship of physical activity to bone mineral accrual in growing children: the university of Saskatchewan bone mineral accrual study.** *J Bone Miner Res*, v. 14(10), p.1672-9, 1999.

BALASSE, M. **Reconstructing dietary and environmental history from enamel isotopic analysis: time resolution of intra-tooth sequential sampling.** *International Journal of Osteoarchaeology*, v. 12(3), p.155-165, 2002.

BALLANTINE, B.; LANSDOWN, A.B.G. **General & Applied Toxicology**, Abridged Edition, p. 679-686, 1995.

BHASKAR, S.N. **Histologia e embriologia oral de Orban.** 10° ed. São Paulo: Artes Médicas, 1989.

BARANOWSKA, L. BARCHAŃSKI, M. BAŁ, B. SMOLEC, Z. MZYK. **X-Ray Fluorescence Spectrometry in Multielemental Analysis of Hair and Teeth.** *Polish Journal of Environmental Studies* V.13, N. 6, p. 639-646, 2004.

BERKOVITZ, B.; MOXHAM, B.; LINDEN, R.; SLOAN, A. **Master Dentistry - Oral Biology.** 3^a. Londres: Churchill Livingstone, Elsevier Ltd., p. 79–80; 142–143, 2011.

BARCELOUX, D. G. **Cobalt. Clinical Toxicology**, v.37(2), p.201-216,1999.

BERKOVITZ, B. K. B.; HOLLAND, G. R.; MOXHAM, B. J. **Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal.** 3^a. Porto Alegre RS: ARTMED, p. 101–118, 2004.

BEHRENSMEYER, A.; HILL, A.P. **Fossils in the Making: Vertebrate Taphonomy and Paleoecology.** University of Chicago Press, 1988.

BOAZ, N. T. ; HAMPEL J., **Strontium Content of fossil tooth enamel and Diet of Early Hominids**, *Journal of Paleontology*, p. 928-933, 1978.

BOUMANS, P., & KLOCKENKÄMPER, R. **Total reflection X-ray fluorescence spectrometry.** Proc; of the Second Workshop on TXRF, Dortmund, 1989.

BORJESSON, J.; ISAKSSON, M.; MATTSSON, S. **X-ray fluorescence analysis in medical sciences: a review.** *Acta Diabetologica*, v. 40, n. 1, p. S39-S44, 2003.

BOYDE, A. **The development of enamel structure.** Proceedings of the Royal Society of Medicine 60(9): 923-928, 1967.

BROWN, C. J., CHENERY, S. R. N., SMITH, B., MASON, C., TOMKINS, A., ROBERTS, G. J., SERUNJOGI, L., & TIBERINDWA, J. V. **Environmental influences on the trace element content of teeth--implications for disease and nutritional status.** *Archives of Oral Biology*, v. 49(9), p. 705–17, 2004.

BROWN, A. B.; BLAKELY, R. L. **Biocultural Adaptation as Reflected in Trace Element Distribution.** *Journal of Human Evolution* 14(5): 461-468, 1985.

BUDD, P.MONTGOMERY, J.COX, A.KRAUSE, P.BARREIRO, B.THOMAS, R. G. **The distribution of lead within ancient and modern human teeth: Implications for long-term and historical exposure monitoring.** *The Science of the Total Environment* v. 220, p. 121-136, 1998.

BUDD P, MONTGOMERY J, EVANS J, TRICKETT M. **Human lead exposure in England from approximately 5500 BP to the 16th century AD.** *Sci Total Environ.* v. 318(1-3), p. 45-58, 2004.

BUDD P, MONTGOMERY J, EVANS J, BARREIRO B. **Human tooth enamel as a record of the comparative lead exposure of prehistoric and modern people.** *Sci Total Environ.*v.263 (1-3), p. 1-10, 2000.

BUMSTED, M. P. **Past Human Behavior from Chemical Analysis - Respects and Prospects.** *Journal of Human Evolution* 14(5): 539-551, 1985.

BRUDEVOLD, F.; AASENDEN, R.; SRINIVASAN, B.N.; BAKHOS, Y. **Lead in Enamel and Saliva, Dental Caries and the Use of Enamel Lead Biopsies for Measuring Past Exposure to Lead,** *J Dent Res* v. 56, p. 1165-1171, 1977.

BRUDEVOLD F, STEADMAN L. **The distribution of lead in human enamel.** *J Dent Res.*, v. 35(3), p. 430-7, 1956.

BRUKER N.G.M.B.H., **Physical Principles of Micro-X-ray Fluorescence**, M4 Tornado Phys. Princ. (Bruker, ed.), (Berlin), p. 1-59, 2011.

CATE A. R. T. **Oral Histology.** 4^a. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., p. 239–245, 1994.

CARVALHO, M. L.; BRITO, J.; BARREIROS, M. A. **Study of Trace Element Concentrations in Human Tissues by EDXRF Spectrometry.** *X-Ray Spectrometry* 27.3, p. 198–204, 1998.

CARVALHO, M. L., CASACA, C., MARQUES, J. P., PINHEIRO, T., & CUNHA, A. S. **Human teeth elemental profiles measured by synchrotron x-ray fluorescence: dietary habits and environmental influence.** *X-Ray Spectrometry*, 30(3), 190–193, 2001.

CARVALHO, M. L.; CASACA, C.; PINHEIRO, T.; MARQUES, J.P.; CHEVALLIER, P.; CUNHA, A.S. **Analysis of human teeth and bones from the chalcolithic period by X-ray spectrometry**, *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. With Mater. Atoms*, v. 168, p. 559- 565, 2000.

CARVALHO, M. L.; MARQUES, A.F.; LIMA, M.T.; REUS, U, **Trace elements distribution and postmortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence**, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* v. 59, p. 1251-1257, 2004.

CARVALHO, M. L. ; MARQUES, A.F; MARQUES, J.P. ; CASACA, C. **Evaluation of the diffusion of Mn, Fe, Ba and Pb in Middle Ages human teeth by synchrotron microprobe X-ray fluorescence**, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* v. 62, p. 702-706, 2007.

CARVALHO, M. L.; MANSO, M.; PESSANHA, S.; GUILHERME, A.; FERREIRA, F.R **Quantification of Mercury in XVIII century books by Energy Dispersive X-Ray Fluorescence (EDXRF)**. *J. Cult. Herit.* v. 10, p. 435 -438, 2009.

CASTRO, W., HOOGEWERFF, J., LATKOCZY, C., & ALMIRALL, J. R. **Application of laser ablation (LA-ICP-SF-MS) for the elemental analysis of bone and teeth samples for discrimination purposes**. *Forensic Science International*, 195(1-3), 17–27, 2010.

CHASAPIS, C. T., LOUTSIDOU, A. C., SPILIOPOULOU, C. A., & STEFANIDOU, M. E. **Zinc and human health: an update**. *Archives of Toxicology*, v. 86(4), p. 521–534, 2011.

CAPLUN, E.; PETIT, D.; PICCIOYTO, E. **Le Plomb dans l'Essence**, *La Recherche* v, 15, p. 270-280, 1984.

CATE, A. R. T. **Oral Histology**. 4^a. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book, Inc., 1994.

CEVC G, CEVC P, SCHARA M, SKALERIC U. **The caries resistance of human teeth is determined by the spatial arrangement of hydroxyapatite microcrystals in the enamel**. *Nature*; 286, p. 425-6, 1980.

CHAO, J. H., LIU, M. T., YEH, S. A., HUANG, S. S., WU, J. M., CHANG, Y. L., HSU, F. Y., CHUANG, C. Y., LIU, H. Y., & SUN, Y. C. **Using medical accelerators and photon activation to determine Sr/Ca concentration ratios in teeth**. *Applied Radiation and Isotopes*, 67, 1121- 1126, 2009.

CHASAPIS, C. T., LOUTSIDOU, A. C., SPILIOPOULOU, C. A., & STEFANIDOU, M. E. **Zinc and human health: an update**. *Archives of Toxicology*, v.86 (4), p. 521–534, 2011.

CHAVEZ, J. AUGER ELECTRON SPECTROSCOPY (AES) Confluence, 2011.

CHEVALLIER, P.; RICORDEL, I; MEYER. G., **Trace element determination in hair by synchrotron xray Fluorescence analysis: Application to the hair of Napoleon**, X-Ray Spectrom., v. 35, p. 125-130, 2006.

CIFUENTES, M.; MORANO, A.B.; CHOWDHURY, H.A.; SHAPSES, S.A. **Energy restriction reduces fractional calcium absorption in mature obese and lean Rats**. J Nutr; v. 132, p. 2660-6, 2002.

COOK, S. F.; HEIZER, R. F. **The Quantitative Investigation of Aboriginal Sites: Analyses of Human Bone**. American Journal of Physical Anthropology 5(2): 201-220, 1947.

CURREY, J. D. **Bones Structure and Mechanics**. Princeton: Princeton University Press, 1 ed., 2002.

CURZON, M.E.J. and CUTRESS, T.W. **Trace Elements and Dental Disease**, Boston: J. Wright, p. 357-385, 1983.

DALLEMAGNE, M.J. **Apatites Phosphates Calciques de Synthèse, Sels Osseux et Dentaires**. In: **Handbuch der Experimentellen Pharmakologie**, V. 2, Eichler and A. Farah, Eds., Berlin: Springer, p. 273-345, 1964.

DAWSON-HUGHES B. **Calcium Throughout the Life Cycle – The Later Years**. In: Weaver CM, Heaney RP, editors. **Calcium in Human Health**, Totowa, Human Press Inc, p.371-86, 2006.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura, Aplicações e Preparação de Amostras**. Porto Alegre: ediPUCRS, 2007.

DREAL, W. F. **Spectrum analysis of dental tissues for trace elements**. Journal of Dental Research, 15, 403-406, 1936.

DEUTSCH, D.; PE'ER, E. **Development of enamel in human fetal teeth**. Journal of Dental Research December: 1543-1555, 1982.

ENOMOTO, A., TANAKA, T., KAWAGISHI, S., NAKASHIMA, H., WATANABE, K., & MAKI, K. **Amounts of Sr and Ca eluted from deciduous enamel to artificial saliva related to dental caries**. Biological Trace Element Research, 148(2), 170–177, 2012.

EISENMANN DR. **Estrutura do Esmalte**. In: Ten Cate, A. R. **Histologia Bucal-Desenvolvimento, Estrutura e Função**. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan; p. 205-221, 2001.

ERICSON, J.; SMITH, D.R.; FLEGAL, A.R. **Skeletal concentrations of lead, cadmium, zinc, and silver in ancient North American Pecos Indians**, *Environ. Health Perspect.* v. 93, p. 217- 223, 1991.

EVERITT, B. S. **Dictionary of Statistics**. Cambridge University Press. Cambridge, 1998.

FALLA-SOTELO, F. O., RIZZUTTO, M. A., TABACNIKS, M. H., ADDED, N., & BARBOSA, M. D. L. **Analysis and discussion of trace elements in teeth of different animal species**. *Brazilian Journal of Physics*, 35, 761-762, 2005.

FEATHERSTONE, J. D. B.; LUSSI, A. **Understanding the Chemistry of Dental Erosion**. *Monogr Oral Sci. Basel*, v.20, p. 66–76, 2006.

FERRETTI, M. **Princípios e aplicações de espectroscopia de fluorescência de Raios X (FRX) com instrumentação portátil para estudo de bens culturais**. *CPC* 7, p. 74–98, 2009.

FLEET, J.C. **Molecular Regulation of Calcium Metabolism**. In: Weaver CM, Heaney RP, editors. *Calcium in Human Health*, Totowa, Human Press Inc, p.163-90, 2006.

FINCHAM, A. G.; MORADIAN-OLDAK, J.; SIMMER, J. P. **The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix**. *Journal of Structural Biology* 126(3): 270-299, 1999.

FISCHER, A., WIECHUŁA, D., POSTEK-STEFANIŃSKA, L., & KWAPULIŃSKI, J. **Concentrations of metals in maxilla and mandible deciduous and permanent human teeth**. *Biological Trace Element Research*, 132(1-3), 19–26, 2009.

FRAGA, C. G. **Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health**, *Mol. Aspects Med.*, v. 26, p. 235-244, 2005.

FRANK, R.M.; SARGENTINI-MAIER, M.L.; LEROY, M.J.F.; and TURLLOT, J.C. **Age-Related Lead Increase in Human Permanent Teeth Demonstrated by Energy Dispersive X-ray Fluorescence**, *J Trace Elem Electr Health Dis* v. 2, p. 175-179, 1988

FOGH-ANDERSEN N, BJERRUM PJ, SIGGAARD-ANDERSEN O. **Ionic binding, net charge, and Donnan effect of human serum albumin as a function of pH**. *Clin Chem*, v. 39, p. 48-52, 1993.

GAUGLITZ, G.; VO-DINH, T. **Handbook of Spectroscopy**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.

GHADIMI, E., EIMAR, H., MARELLI, B., NAZHAT, S. N., ASGHARIAN, M., VALI, H., & TAMIMI, F. **Trace elements can influence the physical properties of tooth enamel**. *SpringerPlus*, 2(1), 499, 2013.

GREGER, J. L. **Aluminum metabolism.** Annual Review of Nutrition 13(1): 43-63, 1993.

GOMES VE, DE SOUSA MDLR, BARBOSA JR. F, KRUG FJ, SARAIVA MDCP, CURY JA, ET AL. **In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children.** Sci Total Environ.v. 320(1), p. 25-3, 2004.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, J; FOWLER, G. **A study on the discrimination of human skeletons using X-ray fuorescence and chemometric tools in chemical anthropology,** Forensic Sci. Int., v. 231, p. 407.e1-6, 2013.

GONZALEZ-REIMERS, E.; ARNAY-DE-LA-ROSA, M.; VELASCO-VAZQUEZ, J.; GALINDO-MARTIN, L.; DELGADO-URETA, E.; SANTOLARIA-FERNANDEZ, F. **Bone lead in the prehistoric population of Gran Canaria.,** Am. J. Hum. Biol., v. 11, p. 405- 410, 1999.

GOODHEW, P. J.; HUMPHREYS, J.; BEAULAND, R. **Electron Microscopy and Analysis.** 3rd. Ed. London:Taylor & Francis, 2001.

GWINNETT AJ. **Structure and composition of enamel.** Oper Dent; 5:10-7, 1992.

HAMMARSTROM, L. **Enamel matrix, cementum development and regeneration.** Journal of Clinical Periodontology 24(9): 658-668, 1997.

HANĆ, A., OLSZEWSKA, A., & BARAŁKIEWICZ, D. **Quantitative analysis of elements migration in human teeth with and without filling using LA-ICP-MS.** Microchemical Journal, 110, 2013.

HAIR, J. F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados** - 6ed Artmed editora S.A. SP. 2009

HIDELBRAND, M.; GOSLOW, G. E. **Análise da estrutura dos vertebrados.** São Paulo: Atheneu, p. 637, 2006.

HILLSON, S. **Dental Anthropology.** Cambridge: Cambridge University Press, 1996.

HOLOBINKO, A. **Forensic human identification in the United States and Canada: A review of the law, admissible techniques, and the legal implications of their application in forensic cases.** J. Forensic Science International. 222, p.394e1-394e3, 2012

HOPPE, K. A.; KOCH, P. L.; FURUTANI, T. T. **Assessing the Preservation of Biogenic Strontium in Fossil Bones and Tooth Enamel.** International Journal of. Osteoarchaeology. V.13 (1-2), p. 20-28, 2003.

JAMES, B. **Advances in wet elétron microscopy techniques and their application to the study of food structure.** Trends in Food Science & Technology, Cambridge, v.20, p. 114-124, 2009.

JANDT, K. D. **Probing the future in functional soft drinks on the nanometre scale towards tooth friendly soft drinks.** Trends in Food Science and Technology 17.5, pp. 263–271, 2006.

JENKINS, R. **X-RAY Fluorescence spectrometry.** John Wiley & Sons, Inc, 2a ed ed., 1999.

JONES, M. E. **Trace element analysis of human tooth enamel by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry for estimation of region of origin.** Thesis of Master of Science, Boston University, 2014.

KAMENOV, G. D., & GULSON, B. L. The Pb isotopic record of historical to modern human lead exposure. Science of the Total Environment, 490, 861–870, 2014.

KARIM, B. F. A., & GILLAM, D. G. **The efficacy of strontium and potassium toothpastes in treating dentine hypersensitivity: a systematic review.** International Journal of Dentistry, v. (4), p.1-13, 2013.

KHAN K.; MCKAY H.; KANNUS P.; BAILEY D.; WARK J.; BENNEL K., **Physical activity and bone health.** Human Kinetics, 2001.

KRAGH-HANSEN U, VORUM H. **Quantitative analyses of interaction between calcium ions and human serum albumin.** Clin Chem, v. 39, p.202-8, 1993.

KATCHBURIAN, E., ARANA, V., **Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas.** 3. ed. Guanabara Koogan, 2012.

KESTENBACH, H.J.; BOTA FILHO, W.J. **Microscopia Eletrônica de transmissão e varredura.** São Paulo: ABM, 1994.

KESTENBACH, H.; BOTTA, W. J.; BOTTA, W. J. **Microscopia Eletrônica: Transmissão e Varredura.** São Paulo: Associação Brasileira de Metais, p. 104. 1989.

KIM, Y.-K., LEE, J., UM, I.-W., KIM, K.-W., MURATA, M., AKAZAWA, T., & MITSUGI, M. **Tooth-derived bone graft material.** Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, 39(3), 103–111, 2013.

KREBS, N.; LANGKAMMER, C.; GOESSLER, W.; ROPELE, S.; FAZEKAS, F. ; YEN, K.; SCHEURER, E., **Assessment of trace elements in human brain using inductively coupled plasma mass spectrometry,** J. Trace Elem. Med. Biol., v. 28, n. 1, p. 1-7, 2014.

KUHNLEIN, H. V.; CALLOWAY, D. H. **Minerals in human teeth: differences between preindustrial and contemporary Hopi Indians.** American Journal of Clinical Nutrition 30(6): 880-886, 1977.

KUMAGAI, A., FUJITA, Y., ENDO, S., ITAI, K. **Concentrations of trace element in human dentin by sex and age.** Forensic Science International, v.219 (1-3), p. 29–32, 2012.

LANE, D. W.; PEACH, D. F. **Some Observations on the Trace Element Concentrations in Human Dental Enamel.** Biological Trace Element Research v. 60, p. 1-11, 1997.

LI, Z., HE, M., PENG, B., & JIN, Z. **Strontium concentrations and isotope ratios in enamel of healthy and carious teeth in southern Shaanxi, China.** Rapid Communications in Mass Spectrometry, 27(17), 1919–1924, 2013.

LIPPERT, F., & HARA, A. T. **Strontium and caries: a long and complicated relationship.** Caries Research, v. 47(1), p. 34–49, 2013.

LOWATER, F., & MURRAY, M. M. **Chemical composition of teeth. V. Spectrographic analysis.** Biochemical Journal, 31, 837-841, 1937.

LÖNNERDAL B. **Dietary factors influencing zinc absorption.** J Nutr., v. 130(5 SUPPL.), p. 1378S-83, 2000.

MALARA, P., KWAPULINSKI, J., & MALARA, B. **Do the levels of selected metals differ significantly between the roots of carious and non-carious teeth?** Science of the Total Environment, 369, 59-68, 2006.

MANNHEIMER W.A; SCHMIDT P.F.; VANDER VOORT G.F.; WILLIAMS D.B. **Microscopia dos Materiais: Uma Introdução.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, p. 221. Relatório técnico, 2002.

MANICA J., **Estrutura eletrônica dos rutenatos 2D e 3D: Sr₂RuO₄ e SrRuO₃.** M.Sc., Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil, 2006.

MANUAL ARL 9900 **Intellipower Series**, Nº AA83654-02, Thermo Fisher Scientific 2007.

MARTINS, R A **A descoberta dos raios X: O primeiro comunicado de Roentgen.** Revista Brasileira de Ensino de Física, v.20, p 373-391, 1998.

MATSUNAGA T, ISHIZAKI H, TANABE S, HAYASHI Y. **Synchrotron radiation microbeam X-ray fluorescence analysis of zinc concentration in remineralized enamel in situ.** Arch Oral Biol.; v.54 (5), p. 420-3, 2009.

MICROSCOPIO ELETRONICO DE VARREDURA, COMPONENTES: <http://lab-siviero.icb.usp.br/biocel/modulos>. Acesso em: 15 abr. 2018.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments.** 6 ed, John Wiley & Sons, 2005.

MONTGOMERY, J. **Passports from the Past: Investigating Human Dispersals using Strontium Isotope Analysis of Tooth Enamel.** *Annals of Human Biology*. v. 37 p. 325-346. 2010.

MULLER, R. O, **Spectrochemical Analysis by X-Ray Fluorescence**, Plenum Press, NY, 1972) A Rachetti e W. Wegscheider, *Anal. Chim. Acta* 188, 37-50, 1986.

MUSHAK P. **Lead and public health: Science, risk, and regulation.** Boston: Elsevier; 2011.

NAGATANI, T.; SAITO, S.; SATO, M.; YAMADA, M. **Development of the ultra-high resolution scanning electron microscope by means of a field emission source and in-lens system.** *Scanning Microscopy*, v.11, 901-909, 1987.

NASCIMENTO FILHO, V. F. **Técnicas analíticas nucleares de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (ED-XRF) e por Reflexão Total (TXRF).** Laboratório de Instrumentação Nuclear/CENA, 1999.

NANCI, A. **Ten Cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NETTER: Frank H. **Netter Atlas De Anatomia Humana.** 5.ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2011.

NORDIN, B.E.C.; NEED, A.G.; MORRIS, H.A.; O'LOUGHLIN, P.D.; HOROWITZ, M. **Effect of age on calcium absorption in postmenopausal women.** *Am J Clin Nut*; v. 80, p. 998-1002, 2004.

NRIAGU J, BURT B, LINDER A, ISMAIL A, **Sohn W. Lead levels in blood and saliva in a low-income population of detroit, michigan.** *Int J Hyg Environ Health*. V. 209(2), p. 109-21, 2006.

OPREA, C., SZALANSKI, P. J., GUSTOVA, M. V., OPREA, I. A., & BUZGUTA, V. **Multivariate comparison of elemental concentrations in human teeth.** *Applied Radiation and Isotopes*, 67(12), 2142–2145, 2009.

PEEDIKAYIL, F. C., KUMAR, S. V., & THANGAVELU, M. **Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary teeth by atomic emission spectrometry.** *Health Sciences*, 2(1), 1–12, 2013.

PEJOVIC-MILIC A, ASLAM, CHETTLE DR, OUDYK J, PYSKLYWEC MW, HAINES T. **Bone manganese as a biomarker of manganese exposure: A feasibility study.** *Am J Ind Med*. V.52 (10), p.742-50, 2009.

PEMMER,B. ; ROSCHGER,A.; WASTL, A.; HOFSTAETTER,J.G.; WOBRAUSCHEK,P.; SIMON,R. ; THALER, H.W.; ROSCHGER; KLAUSHOFER,K.; STRELI,C. **Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue.**,*Bone*, v. 57, p. 184-93, 2013.

PINCHIN MJ, NEWHAM J, THOMPSON RPJ. **Lead, copper, and cadmium in teeth of normal and mentally retarded children.** Clinica Chimica Acta.v, 85(1), p. 89-94, 1978.

PRICE, T. D.; SCHOENINGER, M. J.; ARMELAGOS, G. J. Bone Chemistry and past behavior: an overview. J. Of Human Evolution, v. 14, p. 233-234, 1985.

Behavior: An Overview. Journal of Human Evolution 14(5): 419-447. POOLE DFG, TAILBY PW, BERRY DC. **The movement of water and other molecules through human enamel.** Arch Oral Biol; 8, p. 771-72, 1963.

POTTS, P. J. ET AL. **Atomic spectrometry update. X-ray fluorescence spectrometry.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 18, n. 10, p. 1289-1326, 2003.

RABINOWITZ MB, WETHERILL GW, KOPPLE JD. **Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans.** J Clin Invest.; v. 58(2), p. 260-7, 1976.

RABINOWITZ MB, BELLINGER D, LEVITON A, WANG J. **Lead levels among various deciduous tooth types.** Bull Environ Contam Toxicol.v. 47(4), p. 602-8, 1991.

REITZNEROVÁ, E., AMARASIRIWARDENA, D., KOPČÁKOVÁ, M., & BARNES, R. M. **Determination of some trace elements in human tooth enamel.** Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 367, 748-754, 2000.

REYNARD, B., & BALTER, V. **Trace elements and their isotopes in bones and teeth: diet, environments, diagenesis, and dating of archeological and paleontological samples.** Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 416, p. 4–16, 2014.

RISHER, J.; DEWOSKIN, R. **Toxicological Profile for Mercury,** U.S Public Heal. Serv. Agency Toxic Subst. Dis. Regist., p. 676, 1999.

RIYAT, M., & SHARMA, D. C. **Significance of trace element profile of blood of persons with multiple caries versus sound teeth.** Biological Trace Element Research, 134(2), 174–179, 2010.

RIYAT, M., & SHARMA, D. C. **An experimental study of the effect of strontium pre-treatment on calcium release from carious and non-carious teeth.** Biological Trace Element Research, 133(3), 251–254, 2009.

RIZZOLI R, BONJOUR JP. **Physiology of calcium and phosphate homeostasis. In: Seibel MJ, Robbins SP, Bilezikian JP (Eds.). Dynamics of bone and cartilage metabolism.** 2. ed. San Diego, CA: Academic Press; p.345-60, 2006.

ROZA, G. **Bromine.** New York: The Rosen Publishing Group, Inc, 1 ed., 2009.

RUBIO, C.; GONZALEZ-IGLESIAS, T.; REVERT, C.; REGUERA, J.I.; GUTIERREZ, A.J.; HARDISSON, A. **Lead dietary intake in a Spanish population (Canary Islands)**, J. Agric. Food Chem., v. 53, p. 6543- 6549, 2005.

RUTTER, M.; JONES, R.R. **Lead Versus Health: Sources and Effects of Low Level Lead Exposure**, Chichester: J. Wiley, 1983.

SALGUEIRO, L.; FERREIRA, G. **Fisica Atomica e Nuclear**, v. 1. 1^oed., 1970.

SANDSTROM B, DAVIDSSON L, CEDERBLAD A, LONNERDAL B. **Oral iron, dietary ligands and zinc absorption**. J Nutr., v.115 (3), p. 411-4, 1985.

SANDFORD, M. K.; WEAVER, D. S. **Trace Element Research in Anthropology: New Perspectives and Challenges**. In: **Saunders, S. R. and Katzenberg, M. A. Skeletal Biology of Past Peoples: Research Methods**. New York: Wiley-Liss. p. 79-103, 2000.

SILVA N. M. **Amostragem Probabilística: Um Curso Introdutório** – Edusp, 2^a ed. São Paulo. 2004.

SILVERSTONE LM. **The histopathology of early approximal caries in the enamel of primary teeth**. ASDC J Dent Child. V. 37, p.17-26, 1970.

SIZER, F. S., & WHITNEY, E. N. **Water and Minerals**. In **F. S. Sizer, & E. N. Whitney, Nutrition: concepts and controversies** . Wadsworth: Cengage Learning, pp. 302-321, 2013.

SHASHIKIRAN, N. D., REDDY, V. V. S., & HIREMATH, M. C. **Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary and permanent teeth by atomic absorption spectrophotometry: an in vitro study**. Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research, 18(4), 157–162, 2007.

SHELDON, R. **Probabilidade - Um Curso Moderno com Aplicações**. Porto Alegre, Bookman. 2010.

SHELLIS RP. **Variations in growth of the enamel crowns in human teeth and a possible relationship between growth and enamel structure**. Arch Oral Biol v. 29, p. 697-705, 1984.

SMITH CE. **Cellular and chemical events during enamel maturation**. Crit Rev Oral Biol Med;v. 9, p.128–61, 1998.

SMITH D, GWIAZDA R, BOWLER R, ROELS H, PARK R, TAICHER C, ET AL. **Biomarkers of Mn exposure in humans**. Am J Ind Med. V. 50(11), p.801-1, 2007.

SVANBERG, S. **Atomic and Molecular Spectroscopy**. 3^a. Berlim: Springer, p. 71–79, 2001.

STITCH, S. R. **Trace Elements in Human Tissue 1. A Semi-Quantitative Spectrographic Survey.** Biochemical Journal 67(1): 97-103, 1957.

STREHLOV, C.D. and KNEIP, T.J. **The Distribution of Lead and Zinc in the Human Skeleton,** Am Ind Hyg Assoc J, v. 30, p. 372-378, 1969.

SUZUKI T, ISHIHARA K, MIGAKI H, ISHIHARA K, NAGAO M, YAMAGUCHI-IWAI Y, ET AL. **Two different zinc transport complexes of cation diffusion facilitator proteins localized in the secretory pathway operate to activate alkaline phosphatases in vertebrate cells.** J Biol Chem., v. 280(35), p. 30956-62, 2005.

TANAKA, T., MAKI, K., HAYASHIDA, Y., & KIMURA, M. **Aluminum concentrations in human deciduous enamel and dentin related to dental caries.** Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS), 18(2), 149–54, 2004.

TIPLER, M.; GENE, P. A.; **Physics for Scientists and Engineers.** 6^a. Nova Iorque: W. H. Freeman e Company, p. 1250–1255, 2008.

THYLTRUP, A., LEACH, A. **Dentin and dentin reactions in the oral cavity.** Oxford: IRL Press, p. 27-31, 1987.

TUKEY, j. **Comparing Individual Means in the Analysis of Variance.** Biometrics. V. 5 (2), p. 99–114. JSTOR 3001913. 1949

TVINNEREIM HM, EIDE R, RIISE T, WESENBERG GR, FOSSE G, STEINNES E. **Lead in primary teeth from norway: Changes in lead levels from the 1970s to the 1990s.** Sci Total Environ. v. 207(2-3), p. 165-77, 1997.

TVINNEREIM HM, EIDE R, RIISE T. **Heavy metals in human primary teeth: Some factors influencing the metal concentrations.** Sci Total Environ. V. 255(1-3), p. 21-7, 2000.

UBELAKER, D. H.; BUIKSTRA, J. E. **Standards for data collection from human skeletal remains.** Fayetteville: Arkansas Archaeological Survey Research Series 44, 1994.

UNDERWOOD, E. J. **Trace Elements in Human and Animal Nutrition.** New York: Academic Press. Sponheimer, M.; Lee-Thorp, J. A. 2006. **Enamel diagenesis at South African Australopith sites: Implications for paleoecological reconstruction with trace elements.** Geochimica et Cosmochimica Acta 70(7), p. 1644-1654, 1977.

UMETRICS. **Design of Experiments – Principles and Applications.** Umetrics DOE guide. Learnwais AB. 2000.

URYU T, HOJO S, KIDA A, NISHIKAWA M, YOSHINAGA J. **Relationship between fetal lead exposure and birth weight--evaluation using deciduous incisor**

enamel. Nippon eiseigaku zasshi. Japanese journal of hygiene. V. 59(4), p. 387-94, 2004.

VALSAMI-JONES, E. **Phosphorus in Environmental Technologies: Principles and Applications.** London: IWA Publishing, 1 ed., 2004.

VAN GRIEKEN R.; MARKOWICZ, A.A. **Handbook of X-ray spectrometry,** v 64. 2002.

VIEIRA, C.L.; VALENÇA, A. M. G.; MEDEIROS, M. I. D.; MEDEIROS, L. A. D. M.; LIMA, S. J. G. **Análise em microscopia eletrônica de varredura da superfície do esmalte dentário submetido à ação de sucos de frutas cítricas.** Revista Odonto Ciência, Fac. Odonto/PUCRS, v. 21, n. 52, 2006.

WATANABE, K., TANAKA, T., SHIGEMI, T., SAEKI, K., FUJITA, Y., MORIKAWA, K., NAKASHIMA, H., TAKAHASHI, S., WATANABE, S., & MAKI, K. **Al and Fe levels in mixed saliva of children related to elution behavior from teeth and restorations.** Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 25(3), 143–148, 2012.

WEBB E, AMARASIRIWARDENA D, TAUCH S, GREEN EF, JONES J, GOODMAN AH. **Inductively coupled plasma-mass (ICP-MS) and atomic emission spectrometry (ICP-AES): Versatile analytical techniques to identify the archived elemental information in human teeth.** Microchemical Journal. v. 81(2), p. 201-8, 2005.

WEST, N., NEWCOMBE, R. G., HUGHES, N., MASON, S., MAGGIO, B., SUFI, F., & CLAYDON, N.). **A 3-day randomised clinical study investigating the efficacy of two toothpastes, designed to occlude dentine tubules, for the treatment of dentine hypersensitivity.** Journal of Dentistry, v.41 (2), p. 187–194, 2013.

WHITTAKER, D. K.; RICHARDS, D. **Scanning electron microscopy of the neonatal line in human enamel.** Archives of Oral Biology 23(1): 45-50, 1978.

WHITE, T. & FOLKENS, P. **The Human Bone Manual.** London: Elsevier Academic Press, 2005.

WHITE, T.D., BLACK, M.T. AND P.A. FOLKENS. **Human Osteology.** Elsevier Academic Press, 2011.

WU JUNJIE. **Advances in K-means Clustering: A Data Mining Thinking.** Springer Science & Business Media. 2012.

ZAICHICK, V. **Neutron activation analysis of Ca, Cl, K, Mg, Mn, Na, P, and Sr contents in the crowns of human permanent teeth.** Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 281(1), p. 41-45, 2009.

APÊNDICE A

RESULTADO COMPARATIVO DA ANÁLISE DAS INTENSIDADES DAS LINHAS DE EMISSÃO KALPHA, PARA O ELEMENTO CÁLCIO, PELA TÉCNICA EDXRF COM TUBO DE RAIOS X COM ALVO DE AU E AG E COLIMADOR DE 1 MM

Dentina			Esmalte		
Nome	Au	Ag	Nome	Au	Ag
AMR28D	1351.53	358.66	AMR28E	339.96	740.41
AMR38D	1374.22	539.41	AMR38E	998.84	307.61
DAC45D	1300.27	447.12	DAC45E	1499.18	500.43
DMM16D	1292.84	306.93	DMM16E	767.15	503.34
GLP14D	886.46	578.44	GLP14E	1372.52	314.92
GREP18D	1197.3	273.01	GREP18E	472.35	509.34
GREP28D	1448.57	594.47	GREP28E	1695.15	738.69
JAS24D	1726.87	602.39	JAS24E	1280.03	404.60
JAS27D	1393.56	528.37	JAS27E	2105.04	784.79
JBA33D	1423.49	635.07	JBA33E	1368.38	516.42
JBA34D	932.64	493.53	JBA34E	1246.52	559.96
JBA35D	1259.91	581.73	JEC27E	1707.68	755.61
JEC27D	1320.18	716.0	JEL23E	1241.95	449.26
JEL23D	1282.81	628.73	LEF21E	1776.34	420.31
LEF21D	1366.66	421.15	OSV12E	1189.49	538.35
OSV12D	1272.36	616.95	OSV46E	1923.70	869.78
OSV46D	1510.33	582.35	VLS18E	1170.32	436.18
VLS18D	1169.27	342.86	VLS48E	1184.05	759.93

APÊNDICE B

DESCRIÇÃO DOS OUTROS ELEMENTOS TRAÇO

- **MAGNÉSIO (Mg)**

É um elemento necessário para inúmeros processos metabólicos como a biossíntese dos lípidos, proteínas, ácidos nucleicos e também para a glicólise. As suas principais fontes alimentares são as leguminosas, frutos secos, carne e peixe (SIZER & WHITNEY, 2013).

- **VANÁDIO (V)**

É encontrado em concentrações relativamente baixas em todo o corpo humano, sem concentração particular em quaisquer órgãos ou tecidos. Pode estar presente no esmalte dental humano em concentrações abaixo de 0,1 ppm. Os tubérculos parecem ter mais vanádio, seguidos por carnes, grãos e vegetais. A absorção é mais eficiente em dietas ricas em gorduras insaturadas, e menos eficientes em dietas ricas em gorduras saturadas (JONES, 2014).

- **CROMO (Cr)**

É encontrado em maior concentrações em lactentes e diminui com a idade (UNDERWOOD, 1977). Variação dos níveis de cromo no fígado e no rim foram estabelecidos em associação com diferentes regiões geográficas (UNDERWOOD, 1977, KUMPULAINEN, 1992). É encontrado em altas concentrações em ostras, ovos e vegetais verdes. (KUMPULAINEN, 1992, ANDERSON, 1997).

- **MANGANÊS (Mn)**

É mais prontamente absorvido da água do que da comida (GREGER, 1998). Na dieta humana, nozes e todo cereais contêm mais Mn, vegetais contêm quantidades variáveis e carne, peixe e laticínios têm baixas concentrações de Mn (UNDERWOOD, 1977, GREGER, 1988).

- **COBALTO (Co)**

Encontra-se na forma fisiologicamente ativa da vitamina B12 (UNDERWOOD, 1977, BARCELOUX, 1999). Diferenças geológicas no nível de cobalto nos solos são transferidas através da variação das plantas. Carnes e laticínios fornecem mais B12

na dieta humana, embora nozes e legumes também possam contribuir (UNDERWOOD, 1977). O cobalto pode ser ingerido através da água de oceanos, ou inalados através de poluentes atmosféricos, resultantes da queima de combustíveis fertilizantes (BARCELOUX, 1999).

- NÍQUEL (Ni)

Somente cerca de 1-10% do níquel ingerido é absorvido; muito disso é excretado pelo suor (SOLOMONS ET AL. 1982). Os alimentos que contêm maiores quantidades de Ni são vegetais de folhas verdes e frutos do mar, com menores concentrações encontrado em frutas, tubérculos e grãos. Produtos de origem animal e alimentos refinados contêm quantidades de níquel (UNDERWOOD, 1977, SOLOMONS ET AL. 1982).

- BROMO (Br)

É um elemento altamente reativo, que se encontra no estado líquido à temperatura ambiente, sendo instável, denso e volátil (Almeida, 2007). No corpo humano é encontrado em pequenas quantidades, não sendo ainda conhecida nenhuma contribuição nas funções vitais do organismo (Roza, 2009). Os níveis de bromo no organismo provêm principalmente da alimentação de uma dieta rica em peixe (CARVALHO ET AL., 2000).

- MERCÚRIO (Hg)

É um elemento altamente tóxico e pode ser encontrado na forma elementar (forma metálica) e em formas orgânicas e inorgânicas (RISHER & DEWOSKIN, 1999). Pode entrar no meio ambiente a partir de fontes naturais (vulcões, fogos florestais), como das atividades humanas (queima de combustíveis fósseis, exploração mineira) (ALMEIDA, 2000). A exposição ao mercúrio pode ocorrer através da inalação de vapores, pela ingestão de alimentos, ou por contato direto com a pele (CARVALHO ET AL., 2009).

APÊNDICE C

RELATÓRIO DOS PONTOS ANALIZADOS NAS AMOSTRAS MASCULINAS PELA TÉCNICA DE ENERGIA DISPERSA DE RAIOS -X (EDS).

Masculino										
Amostra	Pontos analisados	Elementos em fração de massa %								
		C	O	Na	Mg	Cl	P	Ca	Fe	Ni
CJC 37	Ponto 1 D	16.04	45.21	0.80	0.25	-	13.66	24.05	-	-
CJC 37	Ponto 2 D	16.00	46.02	0.77	0.28	-	13.55	23.58	-	-
CJC 37	Ponto 3 D	12.87	45.99	0.82	-	-	14.47	25.85	-	-
CJC 37	Ponto 4 E	22.06	46.32	0.64	0.53	-	10.69	19.76	-	-
CJC 37	Ponto 5 E	22.70	44.47	0.57	0.46	-	11.31	20.48	-	-
CJC 37	Ponto 6 E	23.76	45.91	0.49	0.56	-	10.50	18.78	-	-
JBA35	Ponto 1 D	18.27	47.67	0.76	0.32	-	11.92	21.06	-	-
JBA35	Ponto 2 D	17.34	46.94	0.70	0.27	0.17	12.38	22.20	-	-
JBA35	Ponto 3 D	18.51	47.71	0.66	0.36	0.18	11.71	20.87	-	-
JBA35	Ponto 4 E	26.56	48.19	0.61	0.55	-	8.90	15.20	-	-
JBA35	Ponto 5 E	25.55	46.24	0.62	0.66	-	9.81	17.13	-	-
JBA35	Ponto 6 E	25.60	46.59	0.58	0.66	-	9.77	16.80	-	-
OAS43	Ponto 1 D	18.65	43.45	0.66	0.30	0.18	12.97	23.80	-	-
OAS43	Ponto 2 D	15.38	43.93	0.71	0.34	0.19	14.08	25.38	-	-
OAS43	Ponto 3 D	19.50	42.04	0.70	0.25	0.19	13.40	23.93	-	-
OAS43	Ponto 4 E	25.55	43.36	0.57	0.57	-	10.95	19.00	-	-
OAS43	Ponto 5 E	25.04	43.46	0.58	0.60	-	10.83	19.48	-	-
OAS43	Ponto 6 E	26.99	41.93	0.60	0.45	-	10.65	19.38	-	-
PTS18	Ponto 1 D	24.10	41.38	1.02	0.25	-	10.11	16.36	4.44	2.15
PTS18	Ponto 2 D	20.81	45.89	0.93	0.25	-	11.83	20.29	-	-
PTS18	Ponto 3 D	16.59	47.06	1.04	0.24	-	12.75	22.33	-	-
PTS18	Ponto 4 E	27.26	44.80	1.04	0.45	-	8.98	14.29	-	3.01
PTS18	Ponto 5 E	23.23	41.60	1.30	0.41	-	8.87	13.33	5.97	4.48
PTS18	Ponto 6 E	24.90	41.73	1.04	0.44	-	8.67	14.10	5.71	2.70

RELATÓRIO DOS PONTOS ANALIZADOS NAS AMOSTRAS FEMININAS PELA TÉCNICA DE ENERGIA DISPERSA DE RAIOS –X (EDS).

Feminino										
Amostra	Pontos analisados	elementos em fração de massa%								
		C	O	Na	Mg	Cl	P	Ca	Fe	Ni
CAO 26	Ponto 1 D	18.27	41.84	0.57	0.25	-	13.67	25.40	-	-
CAO 26	Ponto 2 D	17.89	42.41	0.64	-	-	13.83	25.23	-	-
CAO 26	Ponto 3 D	17.50	44.02	0.70	0.26	-	13.09	24.43	-	-
CAO 26	Ponto 4 E	24.05	42.17	0.46	0.26	-	11.79	21.08	-	-
CAO 26	Ponto 5 E	25.13	41.94	0.46	0.34	-	11.34	20.79	-	-
CAO 26	Ponto 6 E	25.15	41.96	0.57	0.40	-	11.51	20.41	-	-
MS15	Ponto 1 D	13.93	49.98	0.82	0.28	-	12.99	22.01	-	-
MS15	Ponto 2 D	16.94	48.40	0.84	0.24	-	12.22	21.36	-	-
MS15	Ponto 3 D	14.04	49.30	0.78	0.30	-	13.00	22.58	-	-
MS15	Ponto 4 E	24.38	47.88	0.64	0.55	-	9.72	16.82	-	-
MS15	Ponto 5 E	28.57	44.56	0.58	0.62	-	9.20	16.48	-	-
MS15	Ponto 6 E	24.05	47.71	0.61	0.56	-	10.04	17.04	-	-
MSM31	Ponto 1 D	15.04	44.72	0.60	0.23	0.19	13.99	25.23	-	-
MSM31	Ponto 2 D	14.38	45.58	0.64	-	0.25	13.92	25.23	-	-
MSM31	Ponto 3 D	12.82	46.29	0.56	0.26	0.26	14.28	25.53	-	-
MSM31	Ponto 4 E	21.93	46.23	0.59	0.61	-	11.02	19.62	-	-
MSM31	Ponto 5 E	23.05	46.67	0.65	0.53	-	10.40	18.71	-	-
MSM31	Ponto 6 E	24.21	44.39	0.50	0.59	-	10.79	19.52	-	-
GS48	Ponto 1 D	14.96	45.34	1.11	0.21	-	12.16	20.35	5.87	-
GS48	Ponto 2 D	14.56	48.03	1.06	-	-	13.14	23.02	-	-
GS48	Ponto 3 D	16.50	47.46	1.08	0.30	-	12.50	22.16	-	-
GS48	Ponto 4 E	24.56	47.26	1.39	0.55	-	8.89	15.35	-	2.00
GS48	Ponto 5 E	19.56	45.48	1.45	0.51	-	9.37	15.04	6.18	1.83
GS48	Ponto 6 E	18.92	45.96	1.60	0.35	-	9.52	14.96	-	2.22

ANEXO A

PROTOCOLO DO SOFTWARE R

R is a language and environment for statistical computing and graphics. It is a GNU project which is similar to the S language and environment which was developed at Bell Laboratories (formerly AT&T, now Lucent Technologies) by John Chambers and colleagues. R can be considered as a different implementation of S. There are some important differences, but much code written for S runs unaltered under R.

R provides a wide variety of statistical (linear and nonlinear modelling, classical statistical tests, time-series analysis, classification, clustering, ...) and graphical techniques, and is highly extensible. The S language is often the vehicle of choice for research in statistical methodology, and R provides an Open Source route to participation in that activity.

One of R's strengths is the ease with which well-designed publication-quality plots can be produced, including mathematical symbols and formulae where needed. Great care has been taken over the defaults for the minor design choices in graphics, but the user retains full control.

R is available as Free Software under the terms of the Free Software Foundation's GNU General Public License in source code form. It compiles and runs on a wide variety of UNIX platforms and similar systems (including FreeBSD and Linux), Windows and MacOS.

The R environment

R is an integrated suite of software facilities for data manipulation, calculation and graphical display. It includes

- an effective data handling and storage facility,
- a suite of operators for calculations on arrays, in particular matrices,
- a large, coherent, integrated collection of intermediate tools for data analysis,
- graphical facilities for data analysis and display either on-screen or on hardcopy, and
- a well-developed, simple and effective programming language which includes conditionals, loops, user-defined recursive functions and input and output facilities.

The term "environment" is intended to characterize it as a fully planned and coherent system, rather than an incremental accretion of very specific and inflexible tools, as is frequently the case with other data analysis software.

R, like S, is designed around a true computer language, and it allows users to add additional functionality by defining new functions. Much of the system is itself written in the R dialect of S, which makes it easy for users to follow the algorithmic choices made. For computationally-intensive tasks, C, C++ and FORTRAN code can be linked and called at run time. Advanced users can write C code to manipulate R objects directly.

Many users think of R as a statistics system. We prefer to think of it of an environment within which statistical techniques are implemented. R can be extended (easily) via *packages*. There are about eight packages supplied with the R distribution and many more are available through the CRAN family of Internet sites covering a very wide range of modern statistics.

R has its own LaTeX-like documentation format, which is used to supply comprehensive documentation, both on-line in a number of formats and in hardcopy.

Fonte: <https://www.r-project.org/about.html>