

FUNDAMENTOS DA DIAGENESSE ÓSSEA E SUAS FORMAS DE AVALIAÇÃO USANDO AS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS DE FTIR-ATR E DRX

Daniela Cisneiros Silva Mutzenberg¹

Henry S. Lavalley Sullasi¹

Allysson Allan de Farias²

André Luiz Campelo dos Santos²

Matheus Belo Guimarães Barbosa²

RESUMO

Arqueometria é uma abordagem multidisciplinar dirigida a uma grande gama de assuntos das diferentes áreas da Arqueologia, auxiliando com respostas às suas indagações. Uma área também pouco estudada ainda é a Arqueoquímica que, dentro de seus tópicos, tem o estudo dos parâmetros diagenéticos a partir de técnicas espectroscópicas. Neste trabalho, é feita uma revisão dos conjuntos de processos que envolvem as alterações físicas, químicas, histológicas e mecânicas chamadas de *diagênese*. Além disso, neste mesmo trabalho, foram comparadas duas técnicas de análise: a espectroscopia Fourier *transform infrared by attenuated total reflectance spectroscopy* (FTIR-ATR), que analisa a interação da radiação com a matéria, com o objetivo de determinar as energias das vibrações das moléculas; e a Difração de Raios X (DRX), técnica que caracteriza a estrutura cristalina dos materiais. Ambas as técnicas foram aplicadas em um fragmento de tíbia humana evidenciado no sítio Pedra do Alexandre no Rio Grande do Norte, um fêmur bovino evidenciado no sítio Pilar em Pernambuco e um fêmur humano moderno. Os parâmetros diagenéticos foram determinados com o intuito de avaliar sua aplicação comparando ambas as técnicas no estudo da diagênese óssea.

Palavras-chave: Diagênese óssea, espectroscopia, arqueologia.

¹ Departamento de Arqueologia, UFPE.

² Discente, Programa de Pós-graduação em Arqueologia, UFPE.

ABSTRACT

Archaeometry is multidisciplinary approach addressed to a wide range of topics from different archaeological areas, supporting it with answers for its quests. One area poor studied yet is archaeochemistry that within its topics has the study of diagenetic parameters by spectroscopic techniques. This work is a review of the processes that involve the physical, chemical, histological and mechanic called diagenesis. Moreover, it was also compared two techniques of spectroscopic analysis, ATR-FTIR (Fourier transform infrared by attenuated total reflectance spectroscopy) that analyzes the interaction between radiation of the matter with the aim to determine the molecule vibrations energy; and the X-ray diffraction (XRD), technique that characterize the materials crystalline structure. Both techniques were applied in a human tibia fragment evidenced in Pedra do Alexandre archaeological site, Rio Grande do Norte state; one bovine femur from Pilar archaeological site, Pernambuco state; and one modern human femur. The diagenetic parameters were determined in order to evaluate its application comparing both techniques in the bone diagenesis study.

155

Keywords: bones diagenesis, spectroscopy, archeology.

Este relatório faz parte do Projeto *O uso de técnicas de espectroscópicas no estudo da diagênese óssea*, que tinha como objetivo principal estudar os fundamentos da diagênese ósseas e suas formas de avaliação, utilizando as técnicas espectroscópicas, em estudos de casos específicos. Partiu-se de uma ampla revisão bibliográfica para aplicação técnica em amostras modernas e arqueológicas, tendo como meta a aplicação e comparação de ambas às técnicas FTIR-ATR e DRX no estudo da diagênese óssea.

PRINCÍPIOS DOS PROCESSOS DIAGENÉTICOS PARA A ARQUEOLOGIA

Quando materiais são enterrados, eles passam a sofrer alterações físicas, químicas e biológicas provocadas pela sua interação com, por exemplo, águas subterrâneas, sais minerais e/ou, até mesmo, atividade bioquímica presentes naquele solo. O resultado desses processos de alterações pós-deposicionais é conhecido coletivamente como *diagênese*, (GOFFER, 2007).

Nos processos diagenéticos, quaisquer que sejam as alterações no material arqueológico enterrado resultam na total conversão desses materiais em outros que, por sua vez, são gradualmente integrados aos sedimentos estratificados. Algo que, obviamente, só ocorre depois de longos períodos de tempo (COLLINS *et al.*, 2002; HEDGES, 2002). No entanto, em condições incomuns de sepultamento, os processos diagenéticos podem resultar na preservação da forma exata do animal ou vegetal, em alguns casos, até a aparência dos mesmos ainda é mantida. O resultado desses processos diagenéticos, em que a matéria orgânica é substituída por minerais, culmina na formação dos fósseis (SILLEN, MORRIS, 1996; COLLINS *et al.*, 2002; HEDGES, 2002; AMBROSE e KRIGBAUM, 2003; GOFFER, 2007).

Os diferentes processos diagenéticos que podem afetar ossos, conchas, carvão e demais estruturas que apresentem matéria orgânica e cristais são definidos e podem ser observados na tabela 1 (GOFFER, 2007).

Processos diagenéticos	Mudanças físicas e/ou químicas
Autigênese	Cristalização que ocorre entre partículas de um determinado material, ou em espaços vazios entre sedimentos, ou em novos minerais introduzidos por água subterrânea.
Bioturbação	Revolvimento de camadas estratigráficas pela atividade de organismos vivos.
Cimentação	Ligação de partículas de um determinado material ocorrida pela chegada de novos cristais, esta última possibilitada a partir da precipitação de água subterrânea.
Compactação	Redução do volume de poros e espaços vazios nos materiais em decorrência do rearranjo de partículas.
Dissolução	Dissolução de um determinado material por água subterrânea.
Recristalização	Reorientação de cristais, que compõem um determinado material, como resultado da dissolução e subsequente reprecipitação dos mesmos, ambas ocasionadas pela ação de água subterrânea.
Substituição	Substituição de minerais previamente existentes por novos minerais formados <i>in situ</i> .

Tabela 1 – Lista dos diferentes processos diagenéticos que podem afetar uma estrutura material. Fonte: adaptado de GOFFER, 2007.

É possível se perceber que mudanças físicas e/ou químicas geralmente resultam em uma alteração gradual da composição, porosidade, permeabilidade, densidade, bem como de outras propriedades físicas dos materiais enterrados. Uma vez que os processos diagenéticos ocorrem, apesar de geralmente iniciarem-se na superfície do material, podem continuar por longos períodos de tempo e afetam também seu interior. Isso ocorre sempre que um (ou mais) dos componentes do material tornam-se instáveis às condições ambientais do local onde está enterrado. Para compreender, então, como se

dão os processos diagenéticos na matéria orgânica de um vestígio ósseo ou dentário é necessário antes entender suas composições e estruturas (COLLINS *et al.*, 2002; GOFFER, 2007).

A DIAGÊNESE ÓSSEA

O osso é um tecido composto que consiste em fosfatos de cálcio (material inorgânico) precipitados em uma matriz de colágeno (material orgânico). As concentrações desses materiais na composição óssea variam consideravelmente com a idade e o tipo de osso, no entanto, o componente inorgânico corresponde a, aproximadamente 69% do material ósseo, enquanto o componente orgânico corresponderia a 22% do total, geralmente os restantes 9% são preenchidos por água. O mineral chamado hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), altamente insolúvel, apresenta predominantemente o fosfato de cálcio em sua composição no componente inorgânico ósseo (PATE e HUTON, 1988; GOFFER, 2007). Já o componente orgânico é composto por proteínas, sendo a mais abundante o colágeno Tipo I (COLLINS *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2005; GOFFER, 2007; WEINER, 2010). A alta concentração de colágeno no osso (22%, em peso, e 36% em volume) e sua facilidade de isolamento em uma amostra torna esse material ideal tanto para datação por radiocarbono quanto para as análises de isótopos estáveis. Isso faz com que a presença desse material seja muito importante nas análises arqueológicas (COLLINS *et al.*, 2002; WALKER, 2005).

Considerando que os ossos são materiais compostos, em sua maioria, por um componente inorgânico e um orgânico, a diagênese óssea se dá por três processos (COLLINS *et al.*, 2002; HEDGES, 2002; CECCANTI *et al.*, 2007; GOFFER, 2007):

- a) deterioração química (mais lenta) do componente orgânico³ (as fibras de colágeno), e outras moléculas, como osteocalcina, DNA e proteínas morfogenéticas ósseas – BMPs;
- b) deterioração química do componente inorgânico⁴ (os cristais de hidroxiapatita, e fluorapatita nos dentes); e
- c) uma ação microbiológica que afeta, de uma maneira mais rápida, a ambos os componentes do vestígio ósseo.

No primeiro processo, a perda lenta de colágeno se dá pela ocorrência da hidrólise química, que provoca um evidenciamento da porosidade do vestígio ósseo (simultaneamente à ocorrência da hidrólise, acontece também o repreenchimento desses poros por materiais do seu entorno, que é presumidamente um dos principais mecanismos que conduzem à fossilização de ossos). A taxa em que o colágeno é perdido dependerá do tempo o qual o vestígio ósseo permaneceu enterrado, da temperatura (caso sejam elevadas, tal taxa será aumentada) e do pH do ambiente no qual o mesmo está inserido. É importante ressaltar que ambos os extremos de pH podem causar a aceleração da hidrólise, uma vez que o colágeno também é sensível a

159

³ Apesar de, geralmente, a matéria orgânica de um vestígio ósseo sofrer alterações e, consequentemente, ser biodegradada muito rapidamente (uma vez que são tanto consumidas pelos micro-organismos quanto submetidas a outros processos de deterioração), traços ou pequenas quantidades de colágeno e de DNA podem, no entanto, permanecer e serem preservados no osso por longos períodos de tempo. Caso sejam descobertos, esses traços de DNA, remanescentes no vestígio ósseo, constituem uma importante fonte de informações sobre o organismo do qual ele originalmente fazia parte (COLLINS *et al.*, 2002; GOFFER, 2007).

⁴ Os constituintes minerais do vestígio ósseo enterrado podem ser dissolvidos em águas subterrâneas e substâncias externas, pertencentes ao ambiente no qual tal osso está inserido, podem ser depositadas no mesmo. A ação combinada e simultânea da dissolução e da deposição também pode ocorrer na matéria inorgânica, alterando drasticamente a composição do osso (HEDGES, 2002; AMBROSE, KRIGBAUM, 2003; GOFFER, 2007).

ambientes alcalinos⁵. Estima-se que, para ambientes temperados (<20°C), o colágeno tenha uma persistência esperada de 15 mil anos (COLLINS *et al.*, 2002).

Já de acordo com o segundo processo, é possível perceber que os processos diagenéticos em vestígios ósseos podem alterar também o componente inorgânico. Nos casos da deterioração do componente inorgânico, geralmente, os processos diagenéticos de dissolução e recristalização são dominantes, uma vez que os cristais ósseos são particularmente sensíveis à água da chuva. Além do que, para os casos de ossos que foram encontrados acima ou no entorno de lençóis freáticos, a hidrologia da região será um fator fundamental para a persistência do componente inorgânico (COLLINS *et al.*, 2002; BROWN e BROWN, 2011).

160

O terceiro processo consiste na deterioração microbiana (inclui também a ação de fungos), que é provavelmente o mecanismo mais comum de deterioração do osso e pode ocorrer de forma rápida após o enterro desse tipo de material (PRUVOST *et al.*, 2007; BRADY *et al.*, 2008). Enquanto a deterioração química é acelerada em solos que apresentam extremos de pH ou pela elevada temperatura do ambiente, a atividade microbiana é otimizada em condições onde o pH do solo é, inicialmente, neutro. A remoção do componente inorgânico, como decorrência do baixo pH do solo, permite que micro-organismos acessem o colágeno e o utilizem como alimento, liberando assim enzimas microbianas extracelulares para a realização de tal tarefa. Desse modo, o ataque

⁵ Segundo afirmam Collins e seus colegas (2002, p. 385) uma prática funerária em particular, que prevê a adição de cal (CaO, óxido de cálcio) ou cal apagada (também chamada de cal hidratada ou cal extinta, Ca(OH)₂, hidróxido de cálcio) em cadáveres teria como efeito, não necessariamente consciente de quem o fazia, a elevação do pH e, conseqüentemente, a aceleração da perda de colágeno (GOFFER, 2007; WEINER, 2010).

microbiano é, em muitos aspectos funcionais, semelhante ao mecanismo de dissolução (a deterioração química) descrito nos parágrafos anteriores (COLLINS *et al.*, 2002; HEDGES, 2002; AMBROSE e KRIGBAUM, 2003; SHAHACK-GROSS *et al.*, 2004; GOFFER, 2007).

Os dois primeiros processos mostram-se independentes um do outro, embora ainda não esteja claro, na atualidade, até que ponto eles podem proceder de forma isolada (GOFFER, 2007). Estabelecer qual desses três processos que predomina em um determinado vestígio ósseo vai depender dos estudos das condições ambientais do local onde o mesmo estava enterrado (HEDGES, 2002).

É importante ressaltar que as informações aqui apresentadas estão com certo caráter generalista, uma vez que os fatores que possibilitam a ação dos processos diagenéticos são muito variáveis e extremamente complexos, sendo assim pouco provável de prever seus resultados (GOFFER, 2007). Sob certas condições ambientais, a diagênese de ossos enterrados por longos períodos de tempo pode resultar, surpreendentemente, na preservação desses vestígios, enquanto sob condições ambientais ligeiramente diferentes, estes podem ser totalmente alterados quimicamente ou completamente dissolvidos (COLLINS *et al.*, 2002; HEDGES, 2002).

Além disso, os processos tafonômicos⁶ podem resultar na fossilização de ossos e, até mesmo, de organismos inteiros enterrados (GOFFER, 2007). Durante o processo de fossilização, ossos e outros tecidos são convertidos em matéria lítica, alterando

⁶ Tafonomia é o ramo da ciência que estuda os processos de decaimento e fossilização que ocorrem nos restos de organismos mortos (GOFFER, 2007).

totalmente a composição original desses tecidos, mas preservando as suas formas e texturas, por vezes, em uma escala até mesmo microscópica (COLLINS *et al.*, 2002; BRADY *et al.*, 2008). Conclui-se que o processo de fossilização, assim como os processos diagenéticos que ocorrem nos ossos ou em outros tecidos mortos devido às condições ambientais do local de enterramento, somente pode ser definido em termos gerais (GOFFER, 2007).

A DIAGÊNESE DOS TECIDOS DENTÁRIOS

Os dentes são formados por um núcleo interior resistente — a dentina — e uma carapaça exterior quebradiça — o esmalte. A composição do esmalte é, aproximadamente, de 96% de fosfato de cálcio, 3% de água e 1% de matéria orgânica. Já a da dentina, semelhante a de ossos, é de entre 70% e 75% de hidroxiapatita, 20% de matéria orgânica e entre 5% e 10% de água (HOPPE, KOCH e FURUTANI, 2003).

162

Estruturalmente, o esmalte é extremamente compacto, com pouco espaço poroso e grandes cristais de fosfato (>1000 nm de comprimento). Enquanto a dentina é porosa, apresentando túbulos de 1 mm de diâmetro e cristalitos muito pequenos (<100 nm de comprimento) e geralmente é utilizada para a extração de DNA antigo (KOCH; TUROSS; FOGEL, 1997; KOHN; SCHOENINGER; BARKER, 1999).

Devido o esmalte dentário ter 96% de sua composição formada pela hidroxiapatita, o mesmo apresenta uma maior resistência aos processos diagenéticos que alteram o componente orgânico quando comparado com tecidos ósseos (GREENE *et al.*, 2004; SZOSTEK *et al.*, 2011). Isso se explica pelo fato de a hidroxiapatita presente no esmalte

dentário ser mais densa e cristalina em relação às demais (KOCH, TUROSS e FOGEL, 1997; PRICE e BURTON, 2011).

Na maioria dos casos, os dentes estão posicionados próximos a vestígios ósseos e apresentam os mesmos indicadores diagenéticos. Espera-se, no entanto, que os mesmos não tenham sido tão extensivamente alterados quanto os ossos, uma vez que o tecido dentário mais externalizado é o esmalte.

O estudo da composição de sedimentos e a compreensão da diagênese nos vestígios arqueológicos enterrados têm contribuído grandemente na atualidade para reconstituir, pelo menos parcialmente, os processos que ocasionam as perdas e adições de materiais que ocorrem no registro arqueológico ao longo do tempo (PATE, 2000; COLLINS *et al.*, 2002; HEDGES, 2002; AMBROSE e KRIGBAUM, 2003; SHAHACK-GROSS *et al.*, 2003; SHAHACK-GROSS *et al.*, 2004; GOFFER, 2007; LOFTUS e SEALY, 2012).

163

MEIOS DE AVALIAR A EXTENSÃO DA DIAGÊNESE DE OSSOS E DENTES

O processo de diagênese pode ser detectado por técnicas que já são amplamente utilizadas em Arqueologia, que envolvem espectroscopias vibracionais, como a espectroscopia por infravermelho e o raman, a difração de raio X, além de outras técnicas como a microscopia eletrônica de transmissão e a varredura (PATE, HUTTON e NORRISH, 1989; BERNA, MATTHEWS e WEINER, 2004; ZAZZO *et al.*, 2012; SUI *et al.*, 2013). A aplicabilidade dessas técnicas tem sido cada vez mais ampliada na Arqueologia e suporta a criação de uma nova disciplina chamada de *Microarqueologia* (WEINER, 2010).

A ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A técnica mais comumente utilizada, em Arqueologia, para o estudo da diagênese de ossos e dentes é a espectroscopia no *Fourier Transform Infrared* (FTIR) (SUROVELL e STINER, 2001; THOMPSON, GAUTHIER e ISLAM, 2009).

De forma geral, a *espectroscopia* é um termo geralmente utilizado para nomear as técnicas que analisam a interação de diversos tipos de radiação com a matéria. De uma forma mais precisa, os métodos de espectroscopia mais utilizados são baseados no estudo da emissão, da absorção e do espalhamento/da dispersão de radiação eletromagnética por moléculas ou átomos, nos quais tal radiação incidiu, enquanto estes transitam entre diferentes níveis energéticos (STUART, 2007).

164

A radiação eletromagnética, por sua vez, é um tipo de energia que assume diversas formas, desde a luz visível, radiação ultravioleta, raios gama, raios X, radiação infravermelha, micro-ondas e as ondas de radio.

Particularmente, a espectroscopia por FTIR analisa a interação da radiação infravermelha com a matéria; a grandezas utilizada para representar a radiação é o “número de onda” apresentado na unidade de cm^{-1} . A região média (*mid-infrared*) entre 4000 e 560 cm^{-1} é a de maior interesse para os estudos da diagênese de ossos e dentes, uma vez que é onde se dão as interações associadas às moléculas orgânicas e inorgânicas (THOMPSON, GAUTHIER e ISLAM, 2009; BENETTI, 2014).

A espectroscopia por FTIR é considerada uma técnica semiquantitativa. Utiliza-se a radiação infravermelha para determinar em qual comprimento de onda em particular uma fração incidente da mesma é absorvida pela matéria. Tal fenômeno possibilita a caracterização dos modos vibracionais das ligações atômicas dentro de uma molécula. Para tal identificação, é empregado um algoritmo matemático chamado de *Transformada de Fourier*, que possibilita a geração de espectros que caracterizam as vibrações das ligações moleculares enquanto estas últimas absorvem radiação infravermelha (Imagem 1). Os espectros obtidos possibilitam a análise das estruturas moleculares de materiais como o colágeno e a hidroxiapatita (BEASLEY, 2014; THOMPSON, GAUTHIER e ISLAM, 2009).

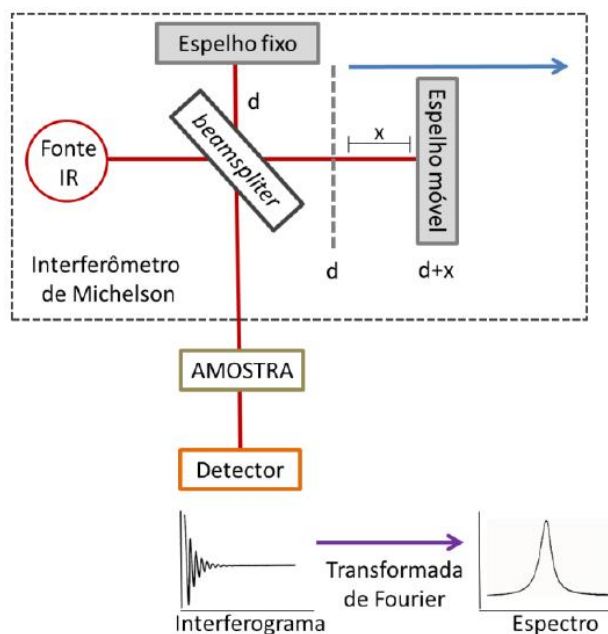


Imagem 1: Esquema de um espectroscópio de FTIR.

Fonte: adaptado de BENETTI, 2014.

A quantidade relativa de luz absorvida, dentro de uma variada gama de comprimentos de onda de infravermelhos, consequentemente, faz com que seja possível detectar alterações diagenéticas na estrutura de ossos e dentes em um nível molecular, as quais podem ser medidas semiquantitativamente por meio das concentrações relativas dos grupos ativos de infravermelho, utilizando como base a altura dos picos ou as proporções das áreas dos picos presentes nos espectros gerados. As principais bandas (picos) de absorção desses materiais podem ser atribuídas aos radicais PO_4 , CO_3 , OH e aos grupos de H_2O (SUROVELL e STINER, 2001).

Nos equipamentos de espectroscopia usando infravermelho, os espectros podem ser gerados por diferentes métodos (Imagem 2): a transmissão (onde são preparadas pastilhas (*pellet*) de amostras do material a ser analisado misturado com brometo de potássio, KBr); a reflexão; a reflexão total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflection*); a reflexão difusa (DRIFT, *Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform*); e/ou a radiação sincrotrônica (SR, *Synchrotron Radiation-based*); além dos métodos associados à microscopia (GARVIE-LOK, VARNEY e KATZENBERG, 2004; GREENE *et al.*, 2004; LEBON *et al.*, 2011; FERNANDES, NADOU e GROOTES, 2012; HOLLUND *et al.*, 2013; BENETTI, 2014).

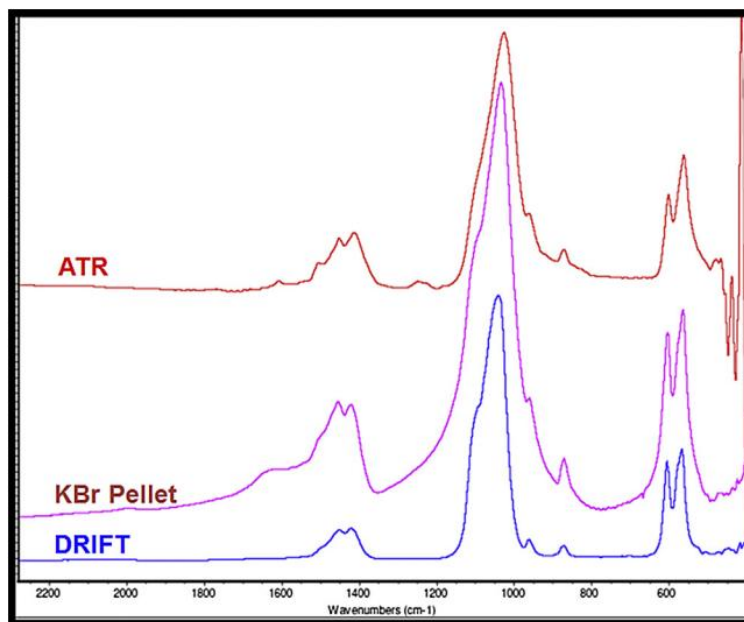


Imagem 2: Comparação de exemplos de espectros gerados utilizando três dos métodos disponíveis de espectroscopias no FTIR em osso moderno.
Fonte: adaptado de BEASLEY, *et al.*, 2014.

Como é possível observar acima, nos espectros, entre existe uma primeira região entre 560 até 1455 cm^{-1} referentes à detecção do componente inorgânico do osso, já a segunda região acima de 1600 cm^{-1} é referente à presença de colágeno na mesma amostra (FARIAS, 2013; BEASLEY, 2014).

Dos métodos citados na Imagem 2, a espectroscopia de FTIR usando ATR tem sido, ultimamente, o mais empregado por requerer pouco preparo da amostra, principalmente quando comparado ao método das pastilhas de KBr que, por sua vez, era tradicionalmente o método mais utilizado até o advento da ATR (BENETTI, 2014).

A partir dos valores das alturas dos picos apontados anteriormente, é possível utilizá-los para mensurar outros valores como o do Índice de Cristalinidade (C.I., *crystallinity index*, ou IR-SF, *infrared splitting factor*) e das relações C/C (entre Carbonila e Carbonato) e C/P (entre Carbonato e Fosfato) (ROBERTS *et al.*, 2002; SZOSTEK, 2009; FARIAS, 2013).

O C.I. e a relação C/P são especialmente importantes para o estudo da diagênese óssea, uma vez que o primeiro diz respeito à quantidade de colágeno presente na amostra analisada, enquanto a segunda é relativa à presença de carbonatos (CO_3) e fosfatos (PO_4 , lembrando que a hidroxiapatita apresenta predominantemente fosfato de cálcio e no osso ela se apresenta carbonatada) (BEASLEY, 2014).

168

O C.I., ou IR-SF, pode ser calculado somando os valores das alturas dos dois picos 560 e 600 cm^{-1} , aproximadamente, e dividindo tal soma pelo valor da banda (nesse caso um “vale”) de absorção em torno de 590 cm^{-1} , como pode ser observado abaixo na fórmula e na Imagem 3 (HOLLUND *et al.*, 2013):

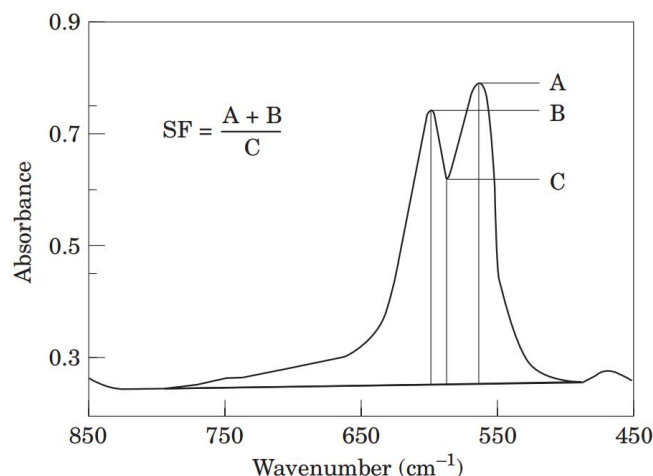


Imagem 3: Picos utilizados para o cálculo do C.I. Fonte: adaptado de SUROVELL e STINER, 2001.

Segundo afirmam Beasley, *et al.* (2014, p. 19) “em amostras de ossos arqueológicos que contêm uma quantidade mensurável de colágeno o valor do C.I. tende a ser menor ou igual a 3,3”. Caso tal valor seja maior ou igual a 3,4, muito provavelmente houve perda do colágeno ósseo na amostra. Ossos modernos possuem um C.I. entre 2,5 e 3,25 (BEASLEY *et al.*, 2014).

Já o valor da relação C/P pode ser obtido mediante a divisão dos valores de um pico de carbonato e um de fosfato. Dentre os picos anteriormente citados, há três relativos ao carbonato (em torno de 870, 1415 e 1455 cm^{-1}) e três ao fosfato (560, 600 e 1030 cm^{-1}) (BEASLEY *et al.*, 2014). Como somente é necessário somar um dos picos relativos a cada radical, geralmente, para o somatório, têm sido usados os valores das alturas dos picos abaixo (GARVIE-LOK, VARNEY e KATZENBERG, 2004; HOLLUND *et al.*, 2013):

$$\text{C/P} = A_{1415} / A_{1030}$$

O valor da relação C/P em ossos modernos tende a ser entre 0,23 e 0,34, enquanto em ossos arqueológicos que sofreram alterações diagenéticas, tal valor tende a ser menor ou maior do que o intervalo de valores definido para ossos modernos (BEASLEY *et al.*, 2014).

DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Como já exposto anteriormente, no estudo da diagênese óssea, algumas análises também podem ser realizadas por meio do emprego da difração de raio X. Mais precisamente, o C.I. de um osso ou dente (arqueológicos ou modernos) pode ser calculado ao submeter uma amostra desse tipo de material à referida técnica (REICHE,

VIGNAUD e MENU, 2002; STATHOPOULOU *et al.*, 2008; PIGA *et al.*, 2009; ABDEL-MAKSoud, 2010).

A difração de raio X é uma técnica utilizada para determinar o arranjo dos átomos em sólidos (STUART, 2007). A mesma tem sido empregada com frequência na Arqueologia por ser a técnica mais barata e mais confiável para a identificação de fases cristalinas (minerais) presentes tanto em materiais da natureza quanto criados pelo homem, como metais, cerâmica, solos, pedras de construção, pigmentos, gesso e os trabalhados especificamente para esse projeto: ossos e dentes. (SCHOENINGER *et al.*, 1989; BALME e PATERSON, 2006; PIJOAN *et al.*, 2007; WESS *et al.*, 2001; PIGA *et al.*, 2009; ARTIOLI, 2010; ROGERS *et al.*, 2010).

170

Os fundamentos da técnica baseiam-se na constatação de que os comprimentos de onda de raios X são aproximadamente iguais à distância entre os átomos em sólidos cristalinos. Na difração de raios X, tal constatação é explorada e picos de difração de radiação com intensidades variáveis são produzidos quando um feixe de raio X atinge um sólido cristalino. Tal mecanismo permite então que padrões de difração, que são característicos de cada material, sejam definidos e, ao compará-los com um banco de dados de padrões de difração de raio X⁷, o material possa ser identificado. (STUART, 2007).

A metodologia mais utilizada de difração de raios X é a que envolve a trituração da amostra. Neste método, um feixe de raio X monocromático é incidido sobre uma

⁷ Disponibilizada pela *Joint Committee of Powder Diffraction Standards* (JCPDS), Comitê Misto de Padrões de Difração em Pó, em tradução livre).

amostra em pó espalhada sobre um suporte que pode ser rotacionado. As intensidades dos feixes difratados são registradas por um detector montado sobre um mecanismo móvel, que também pode ser rotacionado (Imagem 4). É, então, obtido o padrão de difração do material em estudo para a posterior identificação dos componentes de tal amostra cristalina (STUART, 2007).

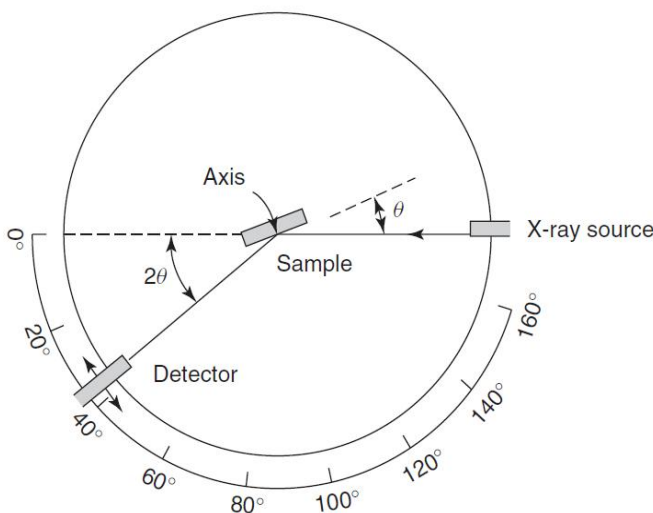
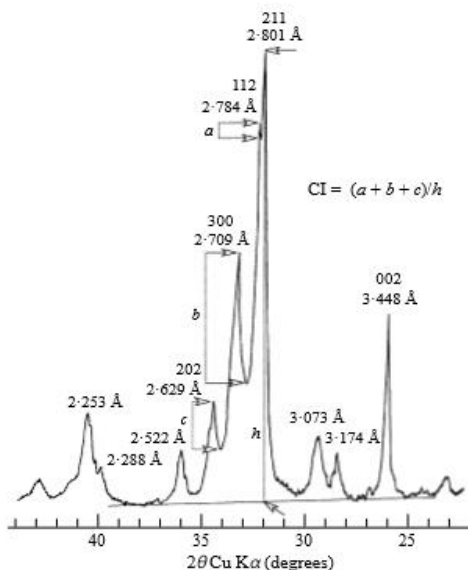


Imagem 4: Esquema de difratômetro de raio X.
Fonte: adaptado de STUART, 2007.

Alterações diagenéticas ocorridas no componente mineral (majoritariamente, hidroxiapatita carbonatada) presente em ossos e dentes arqueológicos podem, então, ser avaliadas de três formas: a primeira é analisar o pico de difração (002) de uma determinada amostra e calcular a largura à meia altura *full width at half maximum* – FWHM) de tal pico; o C.I. é, por sua vez, determinado (REICHE, VIGNAUD e MENU, 2002; ABDEL-MAKSoud, 2010). A segunda forma consiste no somatório dos valores da altura dos outros três picos de difração de apatita (112), (300) e (202), e dividir tal

resultado pelo valor da altura do pico (211) (Imagem 5) (REICHE, VIGNAUD e MENU, 2002):



172

Imagem 5: Picos de difração usados no cálculo do índice de cristalinidade sugerida
 Fonte: adaptado de PERSON *et al.* 1995.

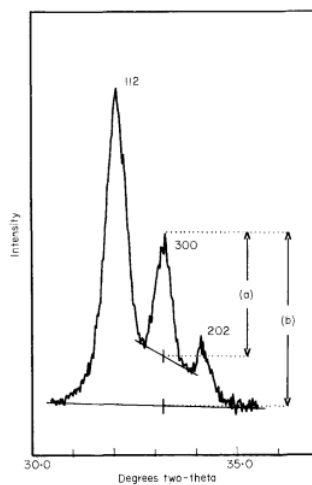


Imagem 6: Picos de difração de raios X, utilizados para o cálculo do índice de cristalinidade.
 Fonte: adaptado de BARTSIOKAS e MIDDLETON, 1992.

A terceira forma de calcular o C.I. foi proposta por Bartsiokas e Middleton (ver Imagem 6) e obedece a seguinte fórmula:

$$I = 10(a/b)$$

AS AMOSTRAS

AMOSTRAS ANALISADAS E SUA PREPARAÇÃO

Foram preparadas três amostras em duplicatas para análise, duas para cada um dos materiais ósseos obtidos a partir da reserva técnica do Laboratório de Antropologia e Bioarqueologia Forense (Labifor) do Departamento de Arqueologia da Universidade Federal de Pernambuco. A primeira amostra é de um fêmur bovino encontrado em um sítio histórico do Pilar, Recife – PE; a segunda amostra é um osso longo (fêmur) humano moderno proveniente do Departamento de Anatomia da Universidade Federal de Pernambuco; e o terceiro é uma tíbia humana proveniente do sítio arqueológico Pedra do Alexandre, Carnaúba dos Dantas – RN, escolhido por se tratar de um sítio com sérios problemas de conservação. As amostras foram divididas e submetidas a dois laboratórios; três amostras foram enviadas ao Departamento de Química da UFPE, para serem submetidas à análise por FTIR-ATR, e as outras três amostras foram para o Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE), para serem analisadas pela difração de raio X. Para ambas as análises, as amostras foram trituradas e peneiradas na granulometria <75µm, homogeneizadas e obtidos os espectros obtidos no FTIR-ATR e das amostras.

O CÁLCULO DO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE (IC)

Na análise dos espectros do FTIR-ATR, o C.I., ou IR-SF, foi calculado a partir das alturas dos dois picos 560 e 600 cm^{-1} , aproximadamente, e dividindo tal soma pelo valor da banda de absorção em torno de 590 cm^{-1} , como pode ser observado na Imagem 3.

Na análise de difração de raios X, o índice de cristalinidade foi calculado a partir de um espectro de difração de raios X adquirido entre 25 e 40° para 2 θ , usando o *software Origin Pro8*, e a partir das fórmulas (ver imagens 5 e 6):

$$I = 10 (a/b) \quad e \quad C.I. = \frac{a+b+c}{h}$$

RESULTADOS

174

Os resultados estão divididos em dois itens, primeiramente são mostrados os espectros obtidos pela técnica de DRX, assim com sua análise e respectivo cálculo de C.I. Posteriormente, são apresentados os espectros obtidos pela espectroscopia FTIR-ATR, com seu respectivo análise e cálculo de C.I.

No Imagem 7, são apresentados difratogramas dos três ossos analisados nele. Ao compararmos, podemos observar o seguinte: o osso bovino não apresenta de forma clara os picos, na difração de raios X, da hidroxiapatita; já os ossos humanos, moderno e arqueológico, sim. Devido a esse fato é que a determinação do C.I. só foi realizada nos ossos humanos; uma provável explicação é que a estrutura cristalina da hidroxiapatita tenha amorfizado pelo fato de que esse osso foi encontrado numa área com grande quantidade de água.

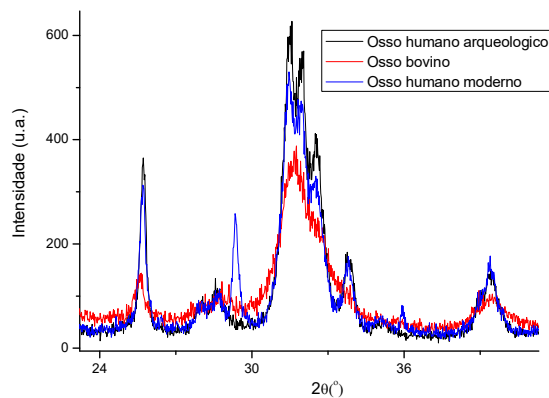


Imagem 7. Comparação dos espectros de difração de raios X dos três ossos analisados.

No Imagem 8, podemos observar a determinação do parâmetro C.I. usando os valores de “a” e “b”. Essa metodologia foi utilizada em ambos os ossos humanos, e o resultado é mostrado na tabela 1.

175

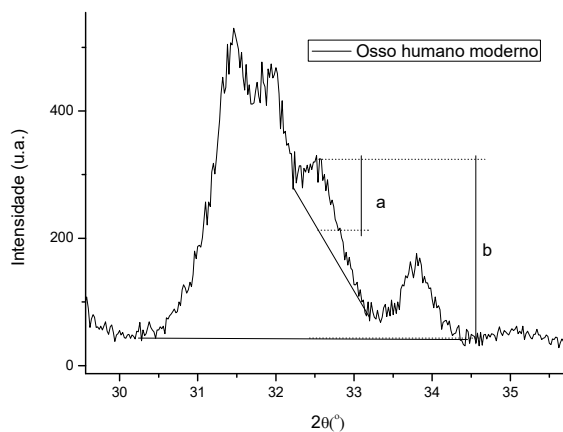
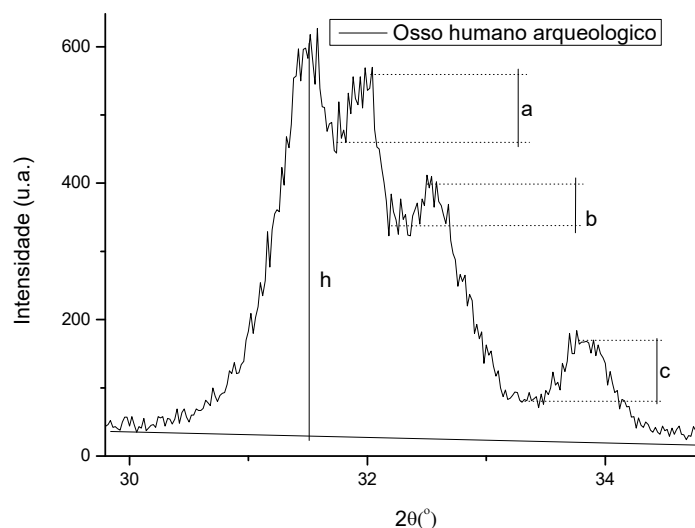


Imagem 8. Espectro de difração do osso humano moderno com detalhes do cálculo de C.I. usando a metodologia sugerida por PERSON *et al.* 1995.

Na Imagem 9, é mostrado o espectro de FTIR-ATR da amostra de osso humano arqueológico; também são destacadas a forma como foram adquiridos os valores de “a”, “b”, “c” e “h”, valores que foram utilizados para determinar o parâmetro C.I., conforme se observa na tabela 2.



176

Imagem 9. Espectro de difração do osso humano moderno com detalhes do cálculo de C.I. usando a metodologia sugerida por BARTSIOKAS e MIDDLETON, 1992.

Os espectros obtidos pela técnica de FTIR-ATR são mostrados na Imagem 10. Ao inspecionar esse gráfico, podemos observar que na amostra de osso bovino e osso humano moderno existe a presença de picos acima de 1600cm^{-1} que apontam colágeno nessas amostras e consequentemente sua viabilidade para datação e análises de DNA.

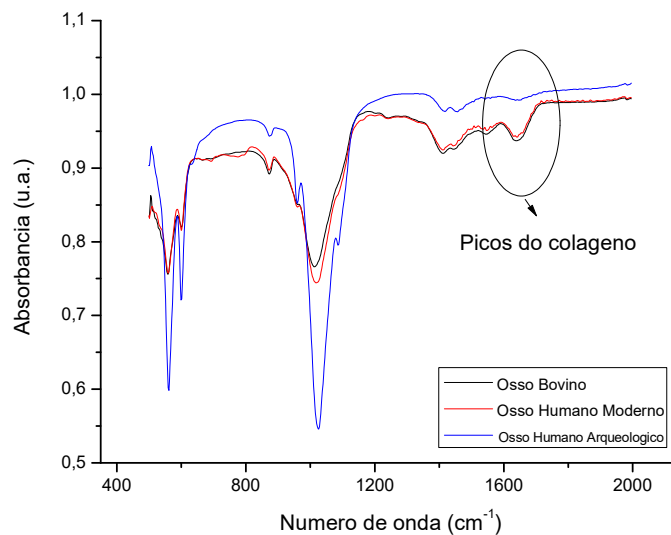
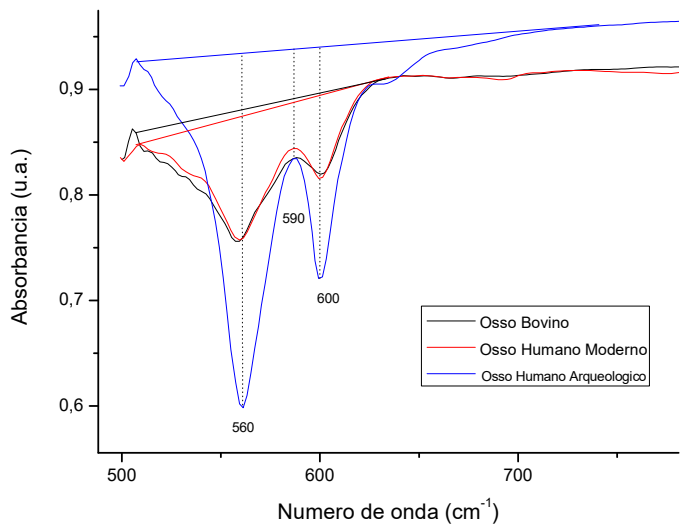


Imagem 10. Comparação dos espectros de FTIR-ATR dos três fragmentos de ossos analisados.

Na Imagem 11, podemos observar os espectros de FTIR-ATR dando destaque à região aonde se apresentam os picos e vales 560, 600 e 590 respectivamente. A partir dessas alturas, foi determinado o C.I. para todos os ossos analisados, conforme é mostrado na tabela 3.



178

Imagem 11. Espectros de FTIR-ATR dos três fragmentos de ossos analisados mostrando a metodologia usada no cálculo de C.I. conforme indica HOLLUND *et al.*, 2012.

Fórmulas do índice de cristalinidade	Osso humano moderno	Osso humano arqueológico
$I = 10(a/b)$	54	84
$C.I. = (a+b+c)/h$	0,34	0,38

Tabela 2. Valores do parâmetro diagenético C.I. para os ossos analisados usando a técnica de DRX.

Fórmulas do índice de cristalinidade	Osso humano arqueológico	Osso humano moderno	Osso bovino
$C.I. \text{ ou } SF = (a+b)/c$ (ver Imagem 3)	5,10	3,58	3,51

Tabela 3. Valores do parâmetro diagenético C.I. para os ossos analisados usando a técnica de FTIR-ATR.

As tabelas 2 e 3 mostram as respectivas fórmulas utilizadas e os valores dos índices de cristalinidade C.I., que, calculados a partir desses valores, podemos afirmar que o osso bovino encontrado no sítio histórico do Pilar é um osso moderno. Também é necessário destacar que os valores de C.I. sempre aumentam para ambas as técnicas e os diferentes métodos de cálculo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambas as técnicas utilizadas, a de FTIR-ATR e DRX, apresentam resultados satisfatórios e semelhantes de forma relativa. Sempre que os valores para C.I. aumentam, os ossos analisados são mais antigos.

A técnica de DRX se mostrou limitada, na determinação do C.I. Quando analisados, os ossos perdem parte de sua estrutura cristalina, como foi o caso do osso bovino. Por outro lado, este fato nos alerta a interação da amostra com possíveis ambientes de deposição diferenciados.

A técnica de FTIR-ATR, usando amostras em pó de ossos, evidencia nitidamente os picos usados no cálculo de C.I. A partir dos valores obtidos, foi verificado que o osso moderno apresenta um valor de C.I. de aproximadamente de 3,58, e osso bovino trata-se também de um osso animal moderno (C.I. = 3,51); já o osso arqueológico proveniente do Sítio Pedra do Alexandre (C.I. = 5,10) tem um alto valor de C.I., o qual indica que esse material não é idôneo para a datação radiocarbônica e de DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MAKSoud, Gomaa. Comparison between the properties of "accelerated-aged" bones and archaeological bones. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, Grécia, vol. 10, n. 1, 2010.

AMBROSE, Stanley H.; KRIGBAUM, John. Bone chemistry and bioarchaeology. *Journal of Anthropological Archaeology*, [S.l.], vol. 22, 2003.

ARTIOLI, Gilberto. *Scientific Methods And Cultural Heritage – An introduction to the application of materials science to archaeometry and conservation science*. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 2010.

180

BALME, Jane; PATERSON, Alistair. *Archaeology in Practice – A Student Guide to Archaeological Analyses*. 1. ed. Malden: Blackwell Publishing, 2006.

BARTSIOKAS, A. MIDDLETON A, P. Characterization and Dating of Recent and Fossil Bone by X-Ray Diffraction. *Journal of Archaeological Science*. Vol 19, Issue 1, 1992.

BEASLEY, Melanie M.; BARTELINK, Eric J.; TAYLOR, Lacy; MILLER, Randy M. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.], vol. 15, 2014.

BENETTI, Carolina. Estudo da reparação óssea por espectroscopia ATR-FTIR após remoção de fragmento da região mandibular com laser de Er,Cr:YSGG ou broca multilaminada. 91f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia Nuclear, Universidade de São Paulo, 2014.

BERNA, Francesco; MATTHEWS, Alan; WEINER, Stephen. Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallization window. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.], vol. 31, n. 7, 2004.

BRADY, Allyson L.; WHITE, Christine D.; LONGSTAFFE, Fred J.; SOUTHAM, Gordon. Investigating intra-bone isotopic variations in bioapatite using IR-laser ablation and micromilling: Implications for identifying diagenesis? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, [S.l.], vol. 266, 2008.

181

BROWN, Terry; BROWN, Keri. *Biomolecular Archaeology - An Introduction*. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2011.

CECCANTI, B.; LANDI, A.; BARTOLI, F.; MALLEGGNI, F.; MASCIANDARO, G.; CARMIGNANI, A.; MACCI, C. Study and control of the geochemical processes responsible of diagenetic alteration of archaeological bones. *Atti Soc. tosc. Sci. nat., Mem., Serie A, Toscana*, vol. 112, 2007.

COLLINS, M. J.; NIELSEN-MARSH, C. M.; HILLER, J.; SMITH, C. I.; ROBERTS, J. P.; PRIGODICH, R. V.; WESS, T. J.; CSAPÒ, J.; MILLARD, A. R.; TURNER-

WALKER, G. The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, Oxford, vol. 44, n. 3, 2002.

FARIAS, A. A. Diagênese óssea em ambiente semiárido brasileiro: modelagem e experimentações com sedimentos do sítio Pedra do Alexandre. 84f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Arqueologia e Conservação Patrimonial, Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

FERNANDES, R.; NADEAU, M-J.; GROOTES, P. M. EDTA based protocols for the cleaning of ancient bone bioapatite. *Proceedings of the 39th International Symposium for Archaeometry*, Leuven, 2012.

182

GARVIE-LOK, Sandra J.; VARNEY, Tamara L.; KATZENBERG, M. Anne. Preparation of bone carbonate for stable isotope analysis: the effects of treatment time and acid concentration. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.], vol. 31, 2004.

GOFFER, Zvi. *Archaeological Chemistry*. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

GREENE, Ethan F., TAUCH, Socheata, WEBB, Ellen, AMARASIRIWARDENA, Dulasiri. Application of diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) for the identification of potential diagenesis and crystallinity changes in teeth. *Microchemical Journal*, [S.l.], vol. 76, 2004.

HEDGES, R. E. M. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, Oxford, vol. 44, n. 3, 2002.

HOLLUND, H. I.; ARIESE, F.; FERNANDES, R.; JANS, M. M. E.; KARS, H. Testing an alternative high-throughput tool for investigating bone diagenesis: FTIR in attenuated total reflection (ATR) mode. *Archaeometry*, Oxford, vol. 55, n. 3, 2013.

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*, [S.l.] , vol. 13, 2003.

KOCH, Paul L.; TUROSS, Noreen; FOGEL, Marilyn L. The Effects of Sample Treatment and Diagenesis on the Isotopic Integrity of Carbonate in Biogenic Hydroxylapatite. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.], vol. 24, 1997.

183

LEBON, Matthieu; MÜLLER, Katharina; BAHAIN; Jean-Jacques; FRÖHLICH, François; FALGUÈRES, Christophe; BERTRAND, Loïc; SANDT, Christophe; REICHE, Ina. Imaging fossil bone alterations at the microscale by SR-FTIR microspectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.*, [S.l.], vol. 26, 2011.

LOFTUS, Emma; SEALY, Judith. Technical note: interpreting stable carbon isotopes in human tooth enamel: an examination of tissue spacings from South Africa. *American Journal Of Physical Anthropology*, [S.l.], vol. 147, 2012.

PATE, F. Donald. Bone chemistry and palaeodiet: Bioarchaeological research at Roonka Flat, lower Murray River, South Australia 1983 - 1999. *Australian Archaeology*, [S.l.], vol. 50, 2000.

PATE, F. Donald; HUTON, John T. The use of soil chemistry data to address post-mortem diagenesis in bone mineral. *Journal of Archeological Science*, [S.l.], vol. 15, 1988.

PATE, F. Donald; HUTTON, John T.; NORRISH, Keith. Ionic exchange between soil solution and bone: toward a predictive model. *Applied Geochemistry*, Grã-Bretanha, vol. 4, 1989.

PERSON, A. BOCHERENS, H. SALIÈGE, J. PARIS, F. ZEITOUN V. Early Diagenetic Evolution of Bone Phosphate: An X-ray Diffractometry Analysis. *Journal of Archaeological Science*, vol 22, 1995.

184

PIGA, Giampaolo; THOMPSON, Tim J. U.; MALGOSA, Assumpci; ENZO, Stefano. The Potential of X-Ray Diffraction in the Analysis of Burned Remains from Forensic Contexts. *Journal of Forensic Science*, [S.l.], vol. 54, n. 3, 2009.

PIJOAN, C. MA.; MANSILLA, J.; LEBOREIRO, I.; LARA, V. H.; BOSCH, P. Thermal alterations in archaeological bones. *Archaeometry*, Oxford, vol. 49, n. 4, 2007.

PRICE, T. Douglas; BURTON, James H. An introduction to archaeological chemistry. 1. ed. Nova Iorque: Springer Science+Business Media, 2011.

PRUVOST, Mélanie; SCHWARZ, Reinhard; CORREIA, Virginia Bessa; CHAMPLLOT, Sophie; BRAGUIER, Séverine; MOREL, Nicolas; FERNANDEZ-

JALVO, Yolanda; GRANGE, Thierry; GEIGL, Eva-Maria. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Washington, vol. 104, n. 3, 2007.

REICHE, I.; VIGNAUD, C.; MENU, M. The crystallinity of ancient bone and dentine: new insights by transmission electron microscopy. *Archaeometry*, Oxford, vol. 44, n. 3, 2002.

ROBERTS, Sam J.; SMITH, Colin I.; MILLARD, Andrew; COLLINS, Matthew J. The taphonomy of cooked bone: characterising boiling and its physico-chemical effects. *Archaeometry*, Oxford, vol. 44, n. 3, 2002.

185

ROGERS, Keith; BECKETT, Sophie; KUHN, Samira; CHAMBERLAIN, Andrew; CLEMENT, John. Contrasting the crystallinity indicators of heated and diagenetically altered bone mineral. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, [S.l.], vol. 296, 2010.

SCHOENINGER, Margaret J.; MOORE, Katherine M.; MURRAY, Matthew L.; KINGSTON, John D. Detection of bone preservation in archaeological and fossil samples. *Applied Geochemistry*, Grã-Bretanha, vol. 4, 1989.

SHAHACK-GROSS, Ruth; MARSHALL, Fiona; WEINER, Steve. Geo-Ethnoarchaeology of Pastoral Sites: The Identification of Livestock Enclosures in Abandoned Maasai Settlements. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.], vol. 30, 2003.

SHAHACK-GROSS, Ruth; BERNA, Francesco; KARKANAS, Panaiotis; WEINER, Steve. Bat guano and preservation of archaeological remains in cave sites. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.], vol. 31, 2004.

SMITH, Colin. *Modelling Diagenesis in Archaeological Bone*. 185f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Combustíveis Fósseis e Geoquímica Ambiental, Universidade de Newcastle-upon-Tyne, 2002.

SMITH, C. I.; CRAIG, O. E.; PRIGODICH, R. V.; NIELSEN-MARSH, C. M.; JANS, M. M. E.; VERMEER, C.; COLLINS, M. J. Diagenesis and survival of osteocalcin in archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.], vol. 32, 2005.

186

STATHOPOULOU, Elizabeth T.; PSYCHARIS, Vassilis; CHRYSSIKOS; Georgios D.; GIONIS, Vassilis; THEODOROU, George. Bone diagenesis: New data from infrared spectroscopy and X-ray diffraction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, [S.l.], vol. 266, 2008.

STUART, Bárbara H. *Analytical Techniques in Material Conservation*. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

SUI, Tan; SANDHOLZER, Michael A.; BAIMPAS, Nikolaos; LANDINI, Gabriel; WALMSLEY A. Damien; LUMLEY, Philip J.; KORSUNSKY Alexander M. Ultrastructural Changes in Burnt Dental Tissue Revealed by Synchrotron X-ray Scattering. *Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientists 2013*, Hong Kong, vol. 2, 2013.

SUROVELL, Todd A.; STINER, Mary C. Standardizing Infra-red Measures of Bone Mineral Crystallinity: an Experimental Approach. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.], vol. 28, 2001.

SZOSTEK, Krzysztof. Chemical signals and reconstruction of life strategies from ancient human bones and teeth – problems and perspectives. *Anthropological Review*, [S.l.], vol. 72, 2009.

SZOSTEK, Krzysztof; STEPĄNCZAK, Beata; SZCZEPANEK, Anita; KĘPA, Małgorzata; GŁĄB, Henryk; JAROSZ, Paweł; WŁODARCZAK, Piotr; TUNIA, Krzysztof; PAWLYTA, Jacek; PALUSZKIEWICZ, Czesława; TYLKO, Grzegorz. Diagenetic signals from ancient human remains – bioarchaeological applications. *MINERALOGIA*, Polônia, vol. 42, n. 2-3, 2011.

THOMPSON, T. J. U.; GAUTHIER, Marie; ISLAM, Meez. The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone. *Journal of Archaeological Science*, [S.l.]. vol. 36, 2009.

WALKER, Mike. *Quaternary Dating Methods*. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2005.

WEINER, Stephen. *Microarchaeology: beyond the visible archaeological record*. 1. ed. Cambridge: Cambridge Press, 2010.

WESS, T. J.; DRAKOPOULOS, M.; SNIGIREV, A.; WOUTERS, J.; PARIS, O.; FRATZL, P.; COLLINS, M.; HILLER, J.; NIELSEN, K. The use of small-angle x-ray diffraction studies for the analysis of structural features in archaeological samples. *Archaeometry*, Oxford, vol. 43, n. 1, 2001.

ZAZZO, Antoine; SALIÈGE, Jean-François; LEBON, Matthieu; LEPETZ, Sébastien; MOREAU, Christophe. Radiocarbon dating of calcined bones: insights from combustion experiments under natural conditions. *Radiocarbon*, Tucson, vol. 54, n. 3–4, 2012.