

MESTRADO EM MEDICINA LEGAL E CIÊNCIAS FORENSES

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA



# **Luminol - Contributo para a estimativa do intervalo *postmortem* de restos esqueletizados.**

Ana Catarina Marques Ermida

Dissertação elaborada no âmbito do Mestrado de Medicina Legal e Ciências Forenses da Universidade de Coimbra, para a obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Professora Doutora Eugénia Maria Guedes Pinto Antunes da Cunha

Co-orientação: Professora Doutora Helena Maria Sousa Ferreira Teixeira

Coimbra, 2015



# Agradecimentos

---

Este trabalho resultou não apenas do meu esforço, trabalho e dedicação, mas também do incentivo e força que aqueles que comigo se cruzaram durante este percurso me transmitiram. Agradeço a todos, no geral, e a alguns, em particular, por todo o apoio, mesmo que inconsciente. Por vezes, apenas uma palavra de alguém totalmente inesperado, pode mudar o nosso rumo e transmitir-nos aquilo que necessitamos para progredir, seja força, coragem ou apenas um mostrar do caminho.

À Professora Eugénia Cunha, agradeço não só ter aceitado orientar-me nesta dissertação, como lhe agradeço as dicas e conselhos, e também as palavras de incentivo nas alturas mais difíceis em que duvidei que fosse possível este desfecho.

À Professora Helena Teixeira, por ter permitido que o meu projecto fosse em frente, sendo minha co-orientadora tão em cima da hora.

À Doutora Cristina Mendonça e à Dr.<sup>a</sup> Beatriz Simões, por terem permitido o acesso a parte da minha amostra tão prontamente.

Ainda acerca da amostra, não poderia deixar de agradecer ao Sr. Lima, não só pela ajuda voluntária e valiosa no tratamento da amostra, como pelos preciosos ensinamentos de vida que me transmitiu. E à Dr.<sup>a</sup> Maria Casella, por tão prestavelmente ter recolhido parte das minhas clavículas.

À D. Cristina, pela enorme paciência comigo e com os meus pedidos. Sem ela, creio que ainda hoje estaria à espera que tudo pudesse avançar.

Não posso também deixar de agradecer aos serviços de genética e biologia forense das delegações do centro e sul do INMLCF, nomeadamente à Dr.<sup>a</sup> Maria João Porto e ao Dr. António Amorim, por terem facilitado todo este processo, permitindo que usufrísse dos seus laboratórios. Neste contexto, agradeço também à Joana Lopes por tão bem se encarregar da minha amostra em Lisboa, e ao Dr. Armando, pela ajuda imprescindível, pela paciência, explicações e conselhos.

Ao David, pelo precioso auxílio na estatística.

Aos meus colegas e amigos de mestrado, pela companhia, companheirismo e, quando preciso, pelo esclarecimentos de tantas e tantas dúvidas, durante todo este percurso.

Aos meus amigos em geral, em particular ao Ed pelo incentivo, por me tirar de casa nos momentos mais difíceis e pelos cafés e longas conversas, e à Carina, por ter posto as “mãos na massa” e me ter ajudado, apesar do odor e imagens menos apelativas.

Às minhas meninas de sempre, pelos momentos de riso e descontração, e principalmente pela amizade.

Ao Miguel, pelo companheirismo e carinho, e sobretudo pela paciência.

Mas, acima de tudo, agradeço aos meus pais e ao Bias, pelo colo, agora e sempre.



# Lista de abreviaturas

---

**95% CI** – Intervalo de Confiança a 95%

**a.C.** – antes de Cristo

**ADD** – Graus-dia acumulados (Accumulated Degree Day)

**CEI-XXI** - Coleção de Esqueletos Identificados do século XXI

**DDI** - Degree of Decomposition Index

**Hb** – Hemoglobina

**INMLCF** - Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

**INMLCF-DC** - Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

**INMLCF-DS** - Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

**MS** – Espectrometria de Massa

**NMR** - Ressonância Magnética Nuclear

**PMI** – Intervalo *postmortem* (Postmortem interval)

**TRP** - True positive rate

**UV** – Ultravioleta



# Resumo

---

Perante restos esqueletizados, identificados ou não, é de considerar a relevância da avaliação do tempo decorrido desde a morte do indivíduo, designado por intervalo *postmortem* (PMI<sup>1</sup>) Esta é uma das atribuições do antropólogo forense, saber há quanto tempo aconteceu a morte o que, obviamente, tem importantes consequências legais.

O PMI é um dos principais desafios da Antropologia Forense, e vários são os métodos referenciados que o pretendem determinar, analisando factores intrínsecos e extrínsecos aos restos esqueletizados.

É de salientar a necessidade de desenvolver uma técnica precisa, económica, fácil e reproduzível, que opere como teste presuntivo ou de orientação, com número de amostras considerável, que permita a significância estatística dos resultados obtidos.

A reacção química que ocorre na presença de luminol, quimioluminescência, é assinalada como uma ferramenta de trabalho no sentido de avaliar o PMI, devido à sua elevada afinidade para a hemoglobina, que fica protegida no tecido ósseo pelo seu elevado conteúdo mineral, após o suprimento de sangue ter cessado *postmortem*. Esta técnica é já aplicada em locais de crime, na detecção de sangue, devido à grande sensibilidade da hemoglobina, podendo assim ser usada também em amostras de osso, segundo o mesmo princípio.

O estudo da técnica do luminol surge como um método a investigar, com o objectivo de complementar os restantes métodos de avaliação do tempo decorrido desde a morte de restos esqueletizados já existentes, contribuindo para uma avaliação mais precisa do PMI e com a finalidade de permitir a distinção entre ossos de interesse médico-legal (em Portugal, amostras com menos de 15 anos) e ossos sem significado médico-legal (amostras com mais de 15 anos).

---

<sup>1</sup> Foi decidida a utilização da sigla em inglês por uma questão de uniformização

A amostra em estudo é constituída por 51 indivíduos de ambos os sexos, todos adultos, com idades entre os 20 e os 98 anos e com tempo decorrido desde a morte conhecido. O osso seleccionado foi a clavícula, com ausência de patologias ósseas.

Os resultados obtidos na presente dissertação, com falsos positivos a atingir os 100%, descartam a possibilidade de, pelo menos sem a investigação de uma amostra de maiores dimensões e variedade, ser possível a distinção entre ossadas de pertinência forense e sem interesse médico-legal, para a realidade portuguesa. Contudo, a hipótese da reacção de quimioluminescência ser aplicada como teste presuntivo, sobretudo para restos esqueléticos fragmentados, mantém-se, com uma percentagem de falsos negativos de 22 a 25%. Comparando os dois tipos de escala empregues, embora mais subjectiva, a escala de 5 níveis apresenta resultados mais detalhados e descritivos, existindo duas categorias (“muito fraco positivo” e “forte positivo”) com assertividade de 100%, sendo, portanto, a mais indicada para uso futuro. Os resultados da estatística de Kappa, com valores compreendidos entre 0,79 e 0,97, revelaram confiança inter e intraobservador no teste de aplicação de luminol, como teste de presunção.

A diagnose do PMI, baseada nos registos da reacção do luminol com a hemoglobina, não pode ser usada isoladamente. É necessária a interpretação das circunstâncias de recolha, das condições ambientais e também uma análise crítica dos dados resultantes do exame antropológico.

**Palavras-chave:** intervalo *postmortem* (PMI), luminol, quimioluminescência, restos esqueléticos.

# Abstract

---

When facing skeletonized remains, identified or not, it is important to consider the relevance of assessing the time since death of the individual, known as postmortem interval (PMI). This is one of the duties of forensic anthropologists - knowing how long ago the death happened - which obviously has important legal consequences.

The PMI is one of the main challenges of Forensic Anthropology, and several are the referenced methods that aim to determine it, considering intrinsic and extrinsic factors to the skeletonized remains.

Therefore, it should be emphasized the need to develop a precise, economic, easy and reproducible technique, which will operate as a presumptive test or guidance, using a considerable number of samples, in order to allow the statistical significance of the results obtained. The chemical reaction that occurs in the presence of luminol, chemiluminescence, is noted as a work tool to evaluate the PMI. This is given by luminol's high affinity for hemoglobin, which is secured in bone tissue by its high mineral content, after the blood supply ceases postmortem. This technique is already applied on blood detection at crime scenes, due to hemoglobin's high sensitivity. So, according to the same principle, it can also be used in bone samples.

The study of the luminol technic appears as a method to investigate, with the purpose of complementing the already used methods for the evaluation of the PMI of skeletonized remains. It contributes to a more accurate assessment of the PMI, in order to allow distinction between bones of forensic interest (in Portugal, samples with less than 15 years) and bones without medical-legal meaning (samples with more than 15 years).

The test sample consists of 51 individuals of both sexes, all in adult age, between 20 and 98 years, with a known time since death. The selected bone was the collarbone, with no bone diseases.

The results obtained in this thesis, with false positives achieving the 100%, rule out the possibility to distinguish between bones of forensic interest to the Portuguese reality,

at least not without the investigation of a sample of larger dimensions and variety. However, the hypothesis of the chemiluminescent reaction being applied as a presumptive test is still applicable, especially for skeletonized fragmented remains, since the method showed a percentage of false negatives from 22 to 25%. When comparing the two types of scales employed, it can be verified that the 5 levels range, although more subjective, grants more detailed and descriptive results. It presents two categories ("very weak positive" and "strong positive") with assertion of 100%, and, therefore, it is the most suitable scale for future use. The results of Kappa statistics, with values between 0.79 and 0.97, showed inter and intraobserver agreement when applying the luminol test as a presumption test.

The PMI diagnosis, based on the records of the hemoglobin reaction with luminol, cannot be used alone. The interpretation of the circumstances of collection and environmental conditions, as well as a critical analysis of the resulting data of the anthropological examination, is required.

**Keywords:** postmortem interval (PMI), luminol, chemiluminescence, skeletonized remains.



# Índice

---

Agradecimentos.....	iii
Lista de abreviaturas .....	vi
Resumo .....	viii
Abstract .....	x
1.Introdução .....	1
1.1 Intervalo postmortem.....	6
1.1.1 Factores circunstanciais .....	9
1.1.2 Entomologia forense.....	9
1.1.3 Botânica Forense .....	10
1.1.4 Grau de decomposição do cadáver .....	11
1.1.5 Alterações Químicas e Imunológicas .....	13
1.1.5.1 Aplicação de Luminol .....	16
1.2 Objectivos .....	22
1.3 Organização e conteúdo .....	23
2. Amostra .....	25
2.1 Subamostra proveniente de autópsias da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF-DC).....	27
2.2 Subamostra proveniente de autópsias da Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. ....	28
2.3 Subamostra proveniente da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI” .....	29
2.3.1 Origem da subamostra da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI” .....	29
2.3.2 Constituição da subamostra da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI” .....	31

2.4 Subamostra proveniente do laboratório de Antropologia Forense da Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. ....	32
2.4.1 Origem da subamostra do laboratório de Antropologia forense do INMLCF-DS .....	32
2.4.2 Constituição da subamostra de Antropologia Forense do INMLCF-DS .....	32
3. Metodologia .....	35
3.1 Subamostras provenientes de autópsia das Delegações do Centro e Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.....	38
3.2 Subamostras provenientes de restos já esqueletizados, da “Colecção de esqueletos identificados do século XXI” e do laboratório de Antropologia forense do INMLCF-DS.....	39
3.3 Aplicação de Luminol – prática comum a todos os grupos de subamostra .	40
3.4 Justificação de procedimentos .....	43
4. Resultados .....	46
5. Discussão .....	56
6. Conclusão.....	62
7. Bibliografia.....	67
8. Apêndices e Anexos.....	78
8.1 Listagens de registos dos indivíduos.....	80
8.1.1 Lista de registos dos indivíduos provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC.....	80
8.1.2 Lista de registos dos indivíduos provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS .....	81
8.1.3 Lista de registos dos indivíduos provenientes da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI” .....	82

8.1.4 Lista de registos dos indivíduos provenientes do laboratório de Antropologia forense do INMLCF-DS.....	83
8.2 Listagens de documentação do estado de conservação dos restos esqueletizados utilizados.....	84
8.2.1 Estado de conservação do material de Antropologia forense do INMLCF-DS .....	84
8.2.2 Estado de conservação do material da CEI-XXI .....	85
8.3 Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol.....	86
8.3.1 Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC.....	86
8.3.1.1 Observador 1.....	86
8.3.1.2 Observador 2.....	87
8.3.2 Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS.....	88
8.3.2.1 Observador 1.....	88
8.3.2.2 Observador 2.....	88
8.3.3 Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas amostras provenientes da CEI-XXI .....	89
8.3.3.1 Observador 1.....	89
8.3.3.2 Observador 2.....	91
8.3.4 Resultados da observação da intensidade de luminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras de Antropologia forense do INMLCF-DS.....	92
8.3.4.1 Observador 1.....	92

8.3.4.2 Observador 2.....	93
8.4 Análise do Erro Inter e Intraobservador .....	94
8.4.1 Erro Interobservador .....	94
8.4.1.1 Erro Interobservador referente à primeira abordagem – visível e não visível .....	94
8.4.1.2 Erro Interobservador referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis.....	94
8.4.2 Erro Intraobservador.....	95
8.4.2.1 Erro Intraobservador do observador 1, referente à primeira abordagem – visível e não visível.....	95
8.4.2.2 Erro Intraobservador do observador 1, referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis.....	95
8.4.2.3 Erro Intraobservador do observador 2, referente à primeira abordagem – visível e não visível.....	96
8.4.2.4 Erro Intraobservador do observador 2, referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis.....	96
8.5 Tabelas de Resultados .....	97
8.5.1 Erro Inter e intraobservador .....	97
8.5.1.1 Erro Interobservador.....	97
8.5.1.2 Erro Intraobservador.....	97
8.5.2 Reacção do Luminol .....	98

# Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.1</b> - Síntese de luminol (Koolman e Roehm, 2005).....	16
<b>Figura 1.2</b> - Mecanismo geral da reacção de quimioluminescência do luminol (Creamer e Buck, 2009: 312) .....	17
<b>Figura 1.3</b> - Espectro de emissão da reacção do luminol com peróxido de hidrogénio na presença de sangue (Barni <i>et al.</i> , 2007:900).....	18
<b>Figura 1.4</b> - Cronologia do luminol desde a sua descoberta (Barni <i>et al.</i> , 2007: 898)...	19
<b>Figura 2.1</b> - Distribuição etária da subamostra proveniente de autópsia do INMLCF-DC. ....	28
<b>Figura 2.2</b> - Distribuição etária da subamostra proveniente de autópsia do INMLCF-DS. ....	29
<b>Figura 2.3</b> - Distribuição etária da subamostra proveniente da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI”. ....	31
<b>Figura 3.1</b> - Clavícula proveniente de autópsia, devidamente acondicionada em caso de congelação.....	38
<b>Figura 3.2</b> - Maceração em água das clavículas provenientes de autópsia para remoção dos tecidos moles. a) Maceração realizada em Coimbra, no departamento de Ciências da Vida; b) Maceração realizada em Lisboa, de Antropologia Forense do INMLCF-DS.	39
<b>Figura 3.3</b> - Exemplo de registo fotográfico de documentação de uma clavícula esquerda, pertencente ao individuo 7 da CEI/XXI: a) comprimento da vista inferior; b) largura da vista superior; c) comprimento da vista inferior; d) largura da vista superior. ....	40
<b>Figura 3.4</b> - Material contendo a redução a pó. Atrás, nos tubos Falcon, encontra-se a totalidade de pó de cada clavícula. À frente, em primeiro plano na fotografia, os tubos Eppendorf contendo os 50mg de cada uma das 3 réplicas, devidamente etiquetados.	41

<b>Figura 3.5</b> - Aplicação do Luminol. a) As três réplicas são dispostas no papel branco; b) Luminol após ter sido aplicado em <i>spray</i> sobre as três réplicas; c) Vista geral da técnica depois de visualizada a quimiluminescência, acendida a luz e efectuados os devidos registos. ....	42
<b>Figura 4.1</b> - Reacção fortemente positiva, resultante da aplicação de luminol em <i>spray</i> na subamostra 2013/231/CR, proveniente de autópsia do INMLCF-DC. (Canon EOS 500D; ISSO-400; F/5.6; 5 segundos) .....	48
<b>Figura 4.2</b> - Reacção positiva, resultante da aplicação de luminol em <i>spray</i> na subamostra 2010-011, proveniente do laboratório de Antropologia forense do INMLCF-DS. (Canon EOS 500D; ISSO-400; F/5.6; 6 segundos) .....	48
<b>Figura 4.3</b> - Reacção fraca positiva, resultante da aplicação de luminol em <i>spray</i> na subamostra 4 da CEI-XXI. (Canon EOS 500D; ISSO-400; F/5.6; 6 segundos).....	49
<b>Figura 4.4</b> - Distribuição etária da amostra total em que dados respeitantes ao sexo e à idade são conhecidos. ....	51

# Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 3.1</b> - Significado das escalas escolhidas na avaliação da reacção de quimioluminescência.....	43
<b>Tabela 4.1</b> - Resumo dos resultados da observação da reacção de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol na amostra total. Nota: Estes resultados são respeitantes ao primeiro observador, surgindo da média das três réplicas usadas.....	49
<b>Tabela 8.1</b> - Lista de registos dos indivíduos provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC.....	80
<b>Tabela 8.2</b> - Lista de registos dos indivíduos provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS.....	81
<b>Tabela 8.3</b> - Lista de registos dos indivíduos provenientes da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI” .....	82
<b>Tabela 8.4</b> - Lista de registos dos indivíduos provenientes do laboratório de Antropologia Forense do INMLCF-DS.....	83
<b>Tabela 8.5</b> - Estado de conservação do material do laboratório de Antropologia forense do INMLCF-DS.....	84
<b>Tabela 8.6</b> - Estado de conservação do material da CEI-XXI.....	85
<b>Tabela 8.7</b> - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC - Observador 1.....	86
<b>Tabela 8.8</b> - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC - Observador 2.....	87

<b>Tabela 8.9</b> - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS - Observador 1 .....	88
<b>Tabela 8.10</b> - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS - Observador 2 .....	89
<b>Tabela 8.11</b> - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes da CEI-XXI - Observador 1 .....	90
<b>Tabela 8.12</b> - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes da CEI-XXI - Observador 2 .....	91
<b>Tabela 8.13</b> - Resultados da observação da intensidade de luminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras de Antropologia forense do INMLCF-DS - Observador 1 .....	92
<b>Tabela 8.14</b> - Resultados da observação da intensidade de luminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras de Antropologia forense do INMLCF-DS - Observador 2 .....	93
<b>Tabela 8.15</b> - Erro Interobservador referente à primeira abordagem – visível e não visível .....	94
<b>Tabela 8.16</b> - Erro Interobservador referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis .....	94
<b>Tabela 8.17</b> - Erro Intraobservador do observador 1, referente à primeira abordagem – visível e não visível .....	95
<b>Tabela 8.18</b> - Erro Intraobservador do observador 1, referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis .....	95

<b>Tabela 8.19</b> - Erro Intraobservador do observador 2, referente à primeira abordagem – visível e não .....	96
<b>Tabela 8.20</b> - Erro Intraobservador do observador 2, referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis .....	96
<b>Tabela 8.21</b> - Cohen’s Kappa Analysis, Observer 1 vs. Observer 2, Binary Scale.....	97
<b>Tabela 8.22</b> - Cohen’s Kappa Analysis, Observer 1 vs. Observer 2, 5-levels Scale.....	97
<b>Tabela 8.23</b> - Cohen’s Kappa Analysis, Observer 1 , Sample 1 vs Sample 2, Binary Scale .....	97
<b>Tabela 8.24</b> - Cohen’s Kappa Analysis, Observer 1 , Sample 1 vs Sample 2, 5-levels Scale .....	97
<b>Tabela 8.25</b> - Cohen’s Kappa Analysis, Observer 2 , Sample 1 vs Sample 2, Binary Scale .....	98
<b>Tabela 8.26</b> - Cohen’s Kappa Analysis, Observer 2 , Sample 1 vs Sample 2, 5-levels Scale .....	98
<b>Tabela 8.27</b> - Divisão da amostra por grupos de acordo com o tempo decorrido desde a morte. ....	98
<b>Tabela 8.28</b> - Resultados da reacção de luminol (escala binária) por classes de PMI. ( + - visível; - - não visível).....	98
<b>Tabela 8.29</b> - Resultados da reacção de luminol (escala de 5 níveis) por classes de PMI. ( +++++ - Forte positivo; +++ - Positivo; ++ - Fraco positivo; + - Muito fraco positivo; - - negativo).....	99
<b>Tabela 8.30</b> - Resultados da reacção do luminol (escala binária) por classes de PMI, de acordo com a reacção de quimioluminescência espectacular. ( + - visível; - - não visível)99	

**Tabela 8.31** - Resultados da reacção do luminol (escala 5 níveis) por classes de PMI, de acordo com a reacção de quimioluminescência espectável. ( ++++ - Forte positivo; +++ - Positivo; ++ - Fraco positivo; + - Muito fraco positivo; - - negativo) ..... 99

# 1.Introdução

---



## 1. Introdução

---

*“As Ciências Forenses apresentam-se como uma história de caminhos que se cruzam”*  
(Cesare, 1924).

É conhecida, e crescente, a curiosidade que todo o processo criminal para determinar o autor e os motivos de um crime, desperta no público em geral no decorrer dos últimos anos. Uma vez que a existência de crimes e delitos é tão antiga como a própria humanidade, a história destas ciências remonta a tempos antigos, sendo de acreditar que a investigação criminal terá nascido na China antiga. Porém, as ciências forenses modernas, como as conhecemos actualmente, e as suas aplicações práticas remontam a meados do séc. XIX (Eckert, 1997). Desde então, acompanha a evolução das técnicas e tecnologias, caminhando sempre no sentido do seu aperfeiçoamento, lado a lado com a justiça.

O conceito de ciência forense, segundo o dicionário, surge do latim *forense* (legal – “antes do fórum”) que se refere a “relativo a, ou próprio do foro judicial” (Dicionário da Língua Portuguesa sem Acordo Ortográfico, 2003). Este termo não é, porém, estático. Resulta da interacção entre os conhecimentos e campos de acção das mais variadas ciências, sendo de ressaltar a interdisciplinaridade como de máxima importância para o alcance dos seus objectivos, que se prendem com investigar e comprovar cientificamente um facto, compreendendo o ocorrido através da identificação dos instrumentos e acções de execução do acto e detectando evidências para a identificação das vítimas e suspeitos de forma a provar o grau de participação dos envolvidos.

Consoante as características e tipo do caso, são solicitados a intervir especialistas nas mais diversas áreas como medicina legal, psicologia, odontologia, entomologia, antropologia, entre outras. O foco desta investigação centra-se na Antropologia Forense que, segundo o *American Board of Forensic Anthropology* (<http://www.theabfa.org/>), consiste na aplicação dos conhecimentos da Antropologia Física ou Biológica ao contexto legal, sendo mesmo considerada pela UNESCO, como uma subdisciplina das acima citadas (Etxeberria, 2004).

Dentro das ciências forenses, a Antropologia tem sido um campo com crescimento exponencial (Iskan, 2005), tendo vindo a desempenhar, progressivamente, um papel cada vez mais importante, como comprovado pelo aumento significativo de publicações nesta área. Num contexto histórico, as raízes académicas desta disciplina remontam à Europa dos séculos XVIII e XIX, com Broca a reconhecer a necessidade de colocar o estudo e interpretação dos esqueletos numa base mais científica (Ubelaker, 2006). No entanto, só em 2003 nasce a primeira associação europeia para esta disciplina, “Forensic Anthropology Society of Europe” (FASE), sendo de ressaltar a sua existência noutros países, como nos Estados Unidos da América (AAFS, com uma seção de Antropologia Física), desde 1972 (Iskan, 1988). Aqui, a Antropologia Forense constitui uma profissão regulada, ao contrário do que se verifica na grande maioria dos países europeus (Cunha e Cattaneo, 2006). Em Portugal, esta ciência tardou a ser praticada de uma forma sistemática pelos antropólogos, ocupando o seu lugar somente no final dos anos noventa (Cunha, 2008; Cunha e Pinheiro, 2007). Actualmente, mudanças na importância dada às provas científicas apresentadas em tribunal, têm tido também repercussões a nível da Antropologia Forense, e da sua popularidade. Esta trajetória de evolução tem levado a uma, cada vez mais, viável e vibrante Antropologia Forense, permitindo que esta área de interesse não só continue, como também ganhe espaço e destaque no mundo das ciências e investigações forenses (Dirkmaat *et al.*, 2009). A sua pluridisciplinaridade não pode ser relevada como factor de grande importância para o seu crescimento. O seu envolvimento com outras disciplinas, como a arqueologia (Dupras e Schultz, 2006), a patologia (Domènech *et al.*, 2011) ou a genética, não a faz apenas depender de outras ciências, como também o contrário, revelando a necessidade que outras áreas demonstram nas respostas dadas pela Antropologia Forense (Cunha, 2010). No entanto, é de sublinhar que a informação presente nos restos esqueletizados, quantitativa ou qualitativa, só pode ser correctamente descodificada por antropólogos forenses qualificados e experientes (Cunha e Cattaneo, 2006), que conseguem até maximizar a recuperação de restos mortais fragilizados ou de pequenas dimensões.

Os estudos em Antropologia Forense incidem, essencialmente, no esqueleto humano, e são empregues em casos com vários estados de decomposição do cadáver e/ou em

restos humanos não identificados (mutilação, carbonização, ou esqueletização), e também, mais recentemente, em indivíduos vivos. Os principais objectivos de um antropólogo forense relacionam-se com a identificação, com o auxílio do patologista na determinação da causa e circunstância da morte e com a estimativa do tempo decorrido após a morte, numa tentativa de responder às questões quem, como e quando, respectivamente (Duday e Guillon, 2006; Cunha, 2014).

Para a identificação, o primeiro passo, depois de macerados e limpos os restos humanos, relaciona-se com a confirmação da origem humana dos ossos, que em casos de indivíduos carbonizados ou ossos muito fragmentados não se torna tão evidente. Posteriormente segue-se a construção do perfil biológico, que, por si só, se baseia num processo de exclusão, com a determinação do sexo, idade à morte, estatura e ancestralidade, e seguidamente a procura por factores de individualização. O cadáver é pesquisado no sentido de encontrar caracteres morfológicos e patológicos de interesse, tendo em consideração que quanto mais raros estes forem, maior a probabilidade de identificação, como é exemplo a perfuração esternal, entre outros. Para este efeito, mais importante do que identificar a origem das características individualizantes ou das lesões, o antropólogo forense tem de ser capaz de descrever os efeitos das alterações patológicas no quotidiano do indivíduo. Tendo em conta que a identificação individual é essencialmente um estudo comparativo, levanta-se a questão relacionada com o número de características individualizantes necessárias para uma identificação positiva. O último passo para uma tentativa de identificação positiva é a reconstrução facial e a sobreposição fotográfica craniofacial, que pretende, principalmente, activar as lembranças de quem procura um desaparecido.

No que diz respeito à sua colaboração na determinação da causa e circunstância de morte, o papel fundamental do antropólogo forense é a distinção entre a origem *ante, peri ou postmortem* das lesões. Pode ainda contribuir no reconhecimento do instrumento produtor das lesões, através da distinção entre fracturas contundentes, cortantes, perfurantes ou mistas, no caso de uma lesão *perimortem*.

A estimativa do tempo decorrido desde a morte, tema abordado nesta investigação e, por isso, revisado de seguida com detalhe, constitui uma das tarefas que mais

dificuldades impõem ao antropólogo forense até ao presente, pela variabilidade de factores envolvidos.

Outras situações recrutam também a sua intervenção, como desastres de massa, valas comuns e crimes de guerra (crimes contra a humanidade) e também a recuperação de restos humanos em cena de crime, sendo, para este caso, essencial o uso de metodologia arqueológica, de forma a evitar a perda de peças corporais, e de informação estratigráfica relevante para a determinação do PMI.

Como falado acima, mais recentemente, muitos antropólogos se têm envolvido na identificação de indivíduos vivos. São chamados, entre outros, em casos de crimes, como assaltos, em que os sistemas de camaras de vigilância são o único elemento de identificação do suspeito e em casos de determinação da idade (à falta de documentos), seja por questões de imputabilidade, relacionadas com pornografia infantil, através de material fotográfico, ou qualquer outra situação em que a ausência de documentação assim o exija (Cunha e Cattaneo, 2006; Cunha, 2014; Forbes, 2004).

Desta forma, o presente trabalho pretende contribuir para a expansão do conhecimento na avaliação do tempo decorrido desde a morte, através do experimento de técnicas para eventual uso futuro, de forma a facilitar, tanto a nível logístico como técnico, a estimativa deste parâmetro de tão grande valor, tanto para antropologia forense como para a investigação criminal.

### **1.1. Intervalo postmortem**

*“Of these newly developing areas, the determination of post-mortem interval has proven to be among the most challenging” (Forbes e Nugent, 2009)*

A morte é um acontecimento inevitável. Quando são encontrados restos humanos, estejam eles em fase de decomposição ou já esqueletizados, são colocadas à partida uma série de questões para a resolução do caso: como, quando e onde morreu, porque morreu, quem é, entre outras. A estimativa do tempo decorrido após a morte, também referida na literatura como cronotanatognose, que corresponde ao intervalo de tempo desde a ocorrência da morte até ao momento em que o corpo é encontrado (Greenberg e Kunich, 2002), ajuda a esclarecer uma dessas questões, o “quando?”.

Alguns autores referem até que a morte não se resume apenas a um momento, mas sim a um desenrolar de processos ao longo de um determinado período de tempo (Knight, 1996).

Depois de reconhecer as ossadas que lhe são apresentados como humanas, um dos primeiros objectivos do antropólogo forense é verificar se os restos esqueletizados têm relevância forense, ou seja, se o intervalo *postmortem* é inferior a 15 anos, prazo máximo legal para a prescrição de um crime (art.º 118º CPP - <http://www.pgdlisboa.pt>). Uma estimativa precisa do PMI, das tarefas mais complexas para o antropólogo forense, é fundamental e pode contribuir de forma eficaz para a investigação forense, colaborando na identificação da vítima e confirmação de alibis, clarificando ocorrências relacionados com direitos humanos e negligência e determinando a pertinência forense do caso (Donaldson e Lamont, 2014). Em casos de morte natural, ou violenta, pode ter também aplicações na área cível, em casos de questões sucessórias ou situações relacionadas com apólices de seguro e pensões (DiMaio e DiMaio, 2001).

A estimativa de um PMI preciso tem-se revelado um desafio por mais de 2000 anos, sendo o registo mais antigo atribuído aos egípcios e gregos, com a descrição e realização de autópsias e dissecações no vivo desde os séculos III e IV a.C. (Sachs, 2001). Na última década, tem-se verificado um aumento no número de estudos destinados à descoberta de metodologias apropriadas e precisas para a estimativa do tempo decorrido desde a morte. Porém, a tentativa de datar restos esqueléticos tem-se relevado um desafio para os cientistas que deste assunto se ocupam (Ubelaker, 2008). Na verdade, só uma combinação de diferentes métodos, não esquecendo a influência que os factores ambientais, entre outros, podem possuir, pode resultar numa estimativa acertada (Ferreira e Cunha, 2013), tendo também em conta que, quanto maior o intervalo de tempo ocorrido após a morte, mais difícil se torna a sua estimativa (Ferreira, 2012). De forma a prestar auxílio a essa determinação, informações obtidas através de actividades de interesse do indivíduo, evidências do cadáver, do meio envolvente ou mesmo a partir da sua história clínica são cruzadas pelos profissionais competentes (Jaffe, 1983). É portanto de ressaltar que, devido às grandes dificuldades encontradas na sua determinação, originadas pelos mais diversos

factores internos e externos, tais como o modo, o local da morte e as condições ambientais em que o corpo foi encontrado (Jaffe, 1983), a sua estimativa é transdisciplinar, sendo necessária a observação do contexto em que os restos esqueléticos foram recolhidos. Um exame holístico, onde todas as características e evidências são indicadores preciosos, é fundamental para o sucesso na determinação do tempo decorrido após a morte (Cunha, 2014).

Limitações metodológicas à parte, toda a estimativa de PMI em restos esqueléticos, num contexto forense, inicia-se com a análise macroscópica dos restos humanos (Ramsthaler *et al.*, 2011). Com o término das funções vitais, inicia-se o aparecimento dos fenómenos *postmortem* relacionados com essa cessação (Donaldson e Lamont, 2014). Os fenómenos imediatos podem ser, então, instantâneos, como a abolição do tónus muscular, intermédios com o relaxamento muscular inicial, ou ter um aparecimento ligeiramente mais lento (consecutivos), como é o caso dos livores ou rigidez cadavérica (Knight, 1996), contribuindo estes últimos para a determinação do PMI. Segundo DiMaio e DiMaio (2001), são vários os aspectos colaborantes na estimativa do tempo decorrido após a morte. No cadáver fresco destacam-se a presença de livores, rigidez cadavérica e variação da temperatura corporal (*livor, rigor e algor mortis*, respectivamente), conteúdo estomacal ou conteúdo de potássio no humor vítreo. Após o decorrer do período inicial outros podem tomar lugar, podendo ser também aplicados num contexto de esquelétização dos restos humanos, e, por isso descritos com mais destaque, como a presença de factores circunstanciais, grau de decomposição do cadáver, actividade entomológica ou alterações químicas e imunológicas. Estes revelam maior dificuldade na sua aplicação, já que se encontram sujeitos a variáveis intrínsecas, como causa de morte, sexo e idade do indivíduo, composição corporal, entre outras, e extrínsecas ao cadáver, de que são exemplo o tipo de solo, fauna e flora, temperatura e humidade, que proporcionam um obstáculo. Também a botânica forense se revê nesta classificação, através da análise dos estádios e, também, do crescimento de raízes, folhas e pólen que se encontram na envoltória do corpo (Ferreira, 2012). Apesar de pouco conhecido, o estudo das características físico-químicas e biológicas do solo pode também contribuir para a estimativa do PMI. A permanência do cadáver no solo poderá perturbar o ecossistema presente, através

da alteração nas concentrações de compostos químicos como amónia, nitratos e sulfatos, e de modificações na sucessão das comunidades aí existentes (Carter e Tibbett, 2008).

#### **1.1.1. Factores circunstanciais**

A presença de factores circunstanciais, como cartas, jornais, anotações ou recibos para confirmação de datas, testemunhos de familiares, amigos e vizinhos acerca da última vez que a vítima foi avistada, assim como alterações de hábitos do dia-a-dia, luzes acesas ou apagadas, restos de comida, lixo, e seu respectivo estado de decomposição, e loiça suja, constituem um método pouco científico, mas eficaz, na determinação da data da morte (DiMaio e DiMaio, 2001). A análise das roupas, através da identificação de marcas ou modelos, com uma identificação posterior da sua data de fabrico, ou mesmo o grau de degradação das mesmas, pode também estabelecer um padrão de datação relevante para a estimativa do PMI.

#### **1.1.2. Entomologia forense**

A Entomologia Forense, responsável pela análise da actividade entomológica, utiliza os dados que o estudo dos artrópodes proporciona, como o seu ciclo de vida, entre outros, como suporte para a estimativa do PMI.

Quando o cadáver se encontra em elevado estado de decomposição, esta estimativa baseia-se frequentemente no estudo da sucessão ecológica de insectos que aí depositam os seus ovos, atraídos pela matéria orgânica em decomposição, ou pelos diversos produtos derivados da putrefacção (García-Rojo *et al.*, 2009).

Diferentes insectos são atraídos em diferentes estados de decomposição do cadáver, seguindo um padrão de desenvolvimento. Com o conhecimento da sua taxa de desenvolvimento, e a identificação do tipo de insectos, assim como o estágio em que se encontram (ovo, larva ou pupa), é possível determinar com alguma exactidão o tempo decorrido após a morte (DiMaio e DiMaio, 2001). Porém, é preciso ter em conta que variações na temperatura podem condicionar o tipo de insectos presente, ou o seu estágio de desenvolvimento, assim como que o meio ambiente em que o cadáver

está inserido ou as circunstâncias que envolveram a morte, podem retardar ou acelerar o aparecimento dos mesmos.

Embora o principal foco da entomologia forense seja estabelecer o intervalo *postmortem*, esta é uma disciplina em grande expansão, tendo a capacidade de dar resposta a outras questões como se o corpo foi movido de lugar ou se aquele é efectivamente o local da morte, desde que a comunidade de artrópodes daquela região específica seja conhecida (Castro *et al.*, 2011).

### **1.1.3. Botânica Forense**

A botânica forense resulta do cruzamento de várias subdisciplinas da botânica, como anatomia das plantas, desenvolvimento das plantas, dinâmicas populacionais, reprodução das plantas, taxonomia, entre outras, aplicadas ao sistema judicial (Coyle, 2004). É colaborativa na estimativa do PMI, através da análise do pólen, com o estudo dos ciclos de vida, ou análise do conteúdo estomacal, empregando metodologias microscópicas simples (Coyle *et al.*, 2005). No primeiro caso, são cuidadosamente retirados do cadáver os resíduos de pólen e posteriormente identificados. É feita uma comparação e, de acordo com o seu ciclo de vida, é datada a altura da morte. No que diz respeito à análise do conteúdo estomacal, esta relaciona-se com o tempo que determinada planta ingerida demora a ser digerida pelo organismo, sendo assim possível estimar a data da morte (Coyle, 2004). Recentemente, em Portugal, um caso foi correctamente desvendado com recurso aos ciclos de vida de algas verdes, briófitas e raízes de arbustos em crescimento, reportando para a eficiência do estudo de briófitas para esta finalidade (Cardoso *et al.*, 2010).

Hoje em dia as plantas são usadas como evidência na resolução de vários tipos de casos criminais (verificação de um alibi, casos de batida e fugida, abuso de menores, deslocação de cadáver, etc.), sendo a determinação do tempo decorrido após a morte apenas uma ínfima parte da sua utilidade na investigação criminal (Ladd e Lee, 2004).

#### **1.1.4 Grau de decomposição do cadáver**

Após a morte, a composição e estrutura corporal sofrem alterações significativas, resultantes de uma complexa sucessão de processos bioquímicos (Pinheiro e Cunha, 2006).

A decomposição cadavérica é ditada, em termos de tempo e extensão, por dois processos tardios destrutivos: autólise e putrefacção (DiMaio e DiMaio, 2001; Wilson-Taylor, 2013). A combinação destes dois processos conduz à morte celular, e leva a que enzimas, bactérias e outros microorganismos se alimentem do corpo agora desprotegido (Wilson-Taylor, 2013). A autólise resulta do colapso dos tecidos através de um processo químico asséptico, causado por enzimas intracelulares, culminando na autodigestão das mesmas. Como processo químico que é, é acelerado pelo calor e atrasado pelo frio, sendo mesmo interrompido com a congelação e inactivado com a fervura ou calor em demasia (DiMaio e DiMaio, 2001). A putrefacção rapidamente se segue à autólise, encontrando-se intimamente relacionada com a temperatura e com o estado do indivíduo (Wilson-Taylor, 2013). Em grande parte dos cadáveres, putrefacção é sinónimo de decomposição, já que dos dois processos é aquele que se manifesta na maioria dos casos. Acontece depois da morte, e resulta da expansão das bactérias provenientes da flora gastrointestinal por todo o corpo (o que origina a desintegração das moléculas através de reacções de oxidação e redução – fermentação pútrida de origem bacteriana), sendo acelerada em indivíduos em septicémia antes da morte (DiMaio e DiMaio, 2001). Para facilitar a análise deste processo, foram criados períodos de putrefacção: período cromático (aparecimento da mancha verde na região abdominal); período enfisematoso ou gasoso (infiltração gasosa no tecido subcutâneo, inchando e desfigurando o cadáver); período coliquativo ou de liquefacção (a epiderme desprende-se facilmente do plano subjacente, escorre uma serosidade escura pelos orifícios nasais e dos órgãos, os gases vão-se escapando e o corpo vai diminuindo de volume); período de esqueletização (desaparecimento dos tecidos progressivamente) (Knight, 1996). Ocasionalmente o cadáver pode sofrer processos tardios conservadores, causados essencialmente por condições ambientais ou pelo próprio corpo, permitindo um atraso no processo de decomposição e resultando na sua mumificação, saponificação ou congelação. A avaliação dos tipos e

graus de modificações podem funcionar como método auxiliar na determinação do tempo decorrido desde a morte, já que tendem a suceder-se de forma ordenada (Ferreira, 2012). Os próprios ossos podem orientar no tempo passado após a morte, através da presença ou ausência de ligamentos e das taxas de lixiviação das gorduras e outras matérias orgânicas (Introna *et al.*, 1999). É, no entanto, de salientar a influência que as condições internas e externas têm nestes fenómenos, podendo dificultar este processo de cronotanatognose (Ramsthaler *et al.*, 2011). Desta forma, variáveis intrínsecas ao cadáver como causa de morte, idade, sexo, estilo de vida ou composição corporal, ou extrínsecas como o tipo de deposição já anteriormente falado, temperatura, fauna, flora, humidade, entre outros, aumentam a complexidade da tarefa (Cattaneo e Gibelli, 2009). Também o tipo de osso em si, com as suas variações na área de superfície, ratio de volume, grau de fragmentação e porosidade pode exigir diferentes abordagens na avaliação deste assunto (Introna *et al.*, 1999).

Neste sentido, têm sido sucessivos os estudos baseados na decomposição cadavérica, destacando-se casos como Rodriguez e Bass (1983, 1985) pela sua investigação com cadáveres humanos na Universidade do Tennessee (a “Quinta dos Cadáveres”), sendo dois dos trabalhos mais antigos e de maior prestígio, e Galloway (1997) com a classificação dos estados de decomposição, e que ainda hoje serve de comparação entre diferentes análises. De novo no Tennessee, Vass, que em 2011 publica “the elusive universal *postmortem* interval formula” que tem como requisito a pré-esqueletização dos restos mortais. Megyesi *et al.*, em 2005, publicam um artigo fundamental como base para a fórmula por eles mais tarde desenvolvida, o cálculo dos graus-dia acumulados (ADD). O conhecimento das temperaturas médias diárias do local onde o corpo foi encontrado é crucial para este método (a decomposição dos tecidos moles termina quando estes atingem  $1285 \pm 110 \text{ADD}$ ), uma vez que o dia da morte é encontrado pela soma dessas mesmas temperaturas, até atingir o valor de ADD. Este facto constitui uma desvantagem para esta metodologia, já que a temperatura ambiente fornecida pelas estações meteorológicas é diferente da temperatura à superfície do solo, a mais correcta para a aplicação da fórmula (Ferreira, 2012). Fitzgerald e Oxenham (2009) propuseram um novo método baseado na quantificação dos estados de decomposição, que toma em consideração as alterações

no processo de decomposição com o decorrer do tempo, assumindo que as variações no clima se encontram já incorporadas na equação, denominado “Degree of Decomposition Index” (DDI) (Marhoff *et al.*, 2015). Janjua e Rogers (2008) e Ross e Cunningham (2011) centraram os seus estudos na estimativa do PMI recorrendo a restos humanos esqueletizados, uma área com muito menos estudos e mais dificuldades, estabelecendo, respectivamente, quatro e cinco estádios de degradação óssea, com diferentes condições, para a classificação pretendida (Ferreira, 2012).

Num contexto forense, o rigor e precisão com que o tempo decorrido desde a morte é estimado é fundamental e, por vezes, embora o odor e o estado de preservação possam fornecer informações valiosas e de grande utilidade, pesquisas e estudos de caso sugerem que podem surgir dificuldades pelo seu cálculo recorrendo apenas à morfologia (Ubelaker *et al.*, 2006).

### **1.1.5 Alterações Químicas e Imunológicas**

Nas últimas décadas, uma nova abordagem tem sido seguida na tentativa de estimar o PMI com maior precisão no material esqueletizado, recorrendo a técnicas ao nível da química e imunologia (Forbes, 2004). Segundo Knight (1967, 1968 e 1969), vários métodos químicos têm sido explorados, como o conteúdo de azoto, quantificação de aminoácidos, reacção com ácido mineral, reacção com benzidina, fluorescência de UV e conteúdo de lípidos no osso, baseado na sua diminuição nos restos esqueletizados com o decorrer do tempo. Porém, a sua aplicação prática tem-se revelado inútil na discriminação entre ossos de carácter forense ou arqueológico (recentes ou antigos) (Forbes e Nugent, 2009). Posteriormente a Knight, Facchini e Pettener sugerem um novo procedimento, cujos fundamentos assentam na medição da condutividade supersónica e gravidade específica do osso (Facchini e Pettener, 1977). Já Castellano *et al.* (1984) avaliam as características bioquímicas do osso recente, tentando estabelecer um paralelismo com o tempo decorrido após a morte. No entanto, devido à sensibilidade de ambas as técnicas e aos factores ambientais, foram consideradas como pouco confiáveis e, por isso, mudado o rumo das investigações. Também a actividade serológica residual (Gel diffusion testing), e outros testes imunológicos, assim como testes histológicos, foram testados e abandonados, devido à sua

susceptibilidade com a contaminação dos solos e ao elevado número de falsos positivos (Forbes e Nugent, 2009). A investigação de métodos metabólicos e bioquímicos dos fluidos corporais, através do estudo de biomarcadores com recurso a Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e Espectrometria de Massa (MS), pode providenciar informação valiosa nas estimativas do PMI, caso os marcadores em questão estejam devidamente identificados, estudados e documentados. Porém, e embora ofereçam vantagens relativamente a métodos convencionais devido ao decréscimo de subjectividade pelo observador, e com o evoluir dos tempos se tenham tornado mais precisos e específicos, requerem mão-de-obra altamente especializada, laboratórios bem equipados e trabalho intensivo (Donaldson e Lamont, 2014).

Outra técnica estudada, bastante dispendiosa e elaborada, é o uso da datação por radiocarbono, considerada como a única metodologia capaz de providenciar um resultado ausente de ambiguidade na estimativa do PMI (Cappella *et al.*, 2015) e amplamente aceite como método para datar material esqueletizado com interesse arqueológico. No período compreendido entre 1950 e 1963, dispositivos termonucleares, como a bomba atómica, produziram elevados níveis artificiais de Carbono 14 nos humanos e restantes organismos terrestres (“bomb pulse”). Em 1963 foi atingido o pico, seguindo-se uma redução dos mesmos, embora mantendo-se acima dos anteriormente existentes. Desta forma, e através de comparação com os valores da “bomb-curve”, é possível distinguir indivíduos cuja morte se deu antes de 1950 dos que ainda se encontravam vivos depois deste aumento. A aplicação deste método é particularmente valiosa no estudo de restos humanos em elevado estado de decomposição dos tecidos moles, e pode revelar informação relevante para a estimativa da data do nascimento e da morte do indivíduo (Ubelaker, 2014) A aplicação desta técnica apresenta, contudo, obstáculos relacionados com a complexidade de formação do osso, assim como com as condições ambientais, dieta e idade do individuo na altura de formação dos tecidos (Ubelaker *et al.*, 2006). Segundo Ubelaker e Parra (2011), a idade à morte representa um factor a ter em grande consideração. Estudos recentes sugerem a possibilidade de datar ossadas de um período posterior a 1950 até aos dias de hoje, recorrendo ao método do Carbono 14.

No entanto, no caso português, pode apenas servir como método de exclusão para casos forenses, já que ultrapassa grandemente a pertinência forense.

Além do Carbono 14, os testes nucleares da década de 50 provocaram o aumento dos níveis de outros radionuclídeos na atmosfera, como o trítio, estrôncio e cézio, tendo sido realizadas investigações de forma a testar a sua utilidade na abordagem deste tema. No entanto, a contaminação após a inumação pelas águas subterrâneas revelou-se um problema na análise dos resultados (Forbes, 2004; Cattaneo e Gibelli, 2009). O seu elevado custo, a metodologia extremamente elaborada e a necessidade de laboratórios equipados tornam-se também desvantagens na sua utilização (Ramsthaler *et al.*, 2011). Hoje em dia, um grande foco de interesse parece concentrar-se no estudo de isótopos de elementos como chumbo. Estes estudos tiveram como amostra uma colecção de adultos, do sexo masculino, de um cemitério de Lisboa, não tendo sido posteriormente generalizado para as diferenças culturais entre os diferentes países (Forbes, 2004). Estes métodos, embora pareçam fornecer informação válida, são caros e a sua eficácia foi, para já, apenas testada em amostras de pequeno tamanho (Ramsthaler *et al.*, 2009).

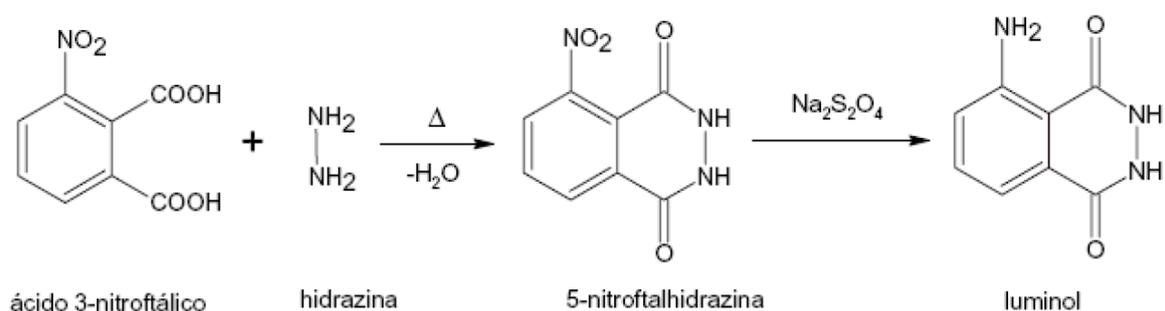
Por último, a produção de fluorescência e quimioluminescência tem também sido investigada como abordagem para datar a altura da morte, recorrendo à detecção de compostos sanguíneos nos ossos, através da utilização de técnicas como a reflexão-UV e a aplicação de Luminol, respectivamente. Segundo Ramsthaler *et al.* (2011), a reflexão-UV revela-se como um bom teste de exclusão de contexto forense, apresentando uma boa correlação entre a extensão da fluorescência e o PMI, em casos em que há uma forte redução da mesma. Desta forma, apesar de sozinha não possuir valor científico suficiente para uma conclusão segura, facilmente poderá ser usada como teste presuntivo. Relativamente à aplicação de luminol, e por esta técnica ser o ponto central desta dissertação, as suas revisões bibliográficas encontram-se expostas num ponto à parte.

### 1.1.5.1. Aplicação de Luminol

“Os ossos, o material mais resistente do corpo humano, têm uma capacidade ímpar para registrar muitos episódios ocorridos na vida, na altura da morte e até mesmo depois da morte.” (Cunha e Pinheiro, 2006)

Quimioluminescência refere-se à emissão de luz derivada de uma reacção química que pode ocorrer quer em sistemas sólidos, líquidos ou gasosos. Essa emissão tem diferentes graus de intensidade, duração e comprimento de onda, cobrindo um espectro que quase toca o ultravioleta e o infravermelho, passando pela luz visível (Barni *et al.*, 2007).

O luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinadiona ou, numa forma mais simplificada, 3-aminoftalhidrazida) é uma acil-hidrazida cíclica que mostra uma reactividade típica desta classe de compostos. A forma mais comum para a sua obtenção é através do ácido 3-nitroftálico, segundo a figura 1.1 (Koolman e Roehm, 2005).

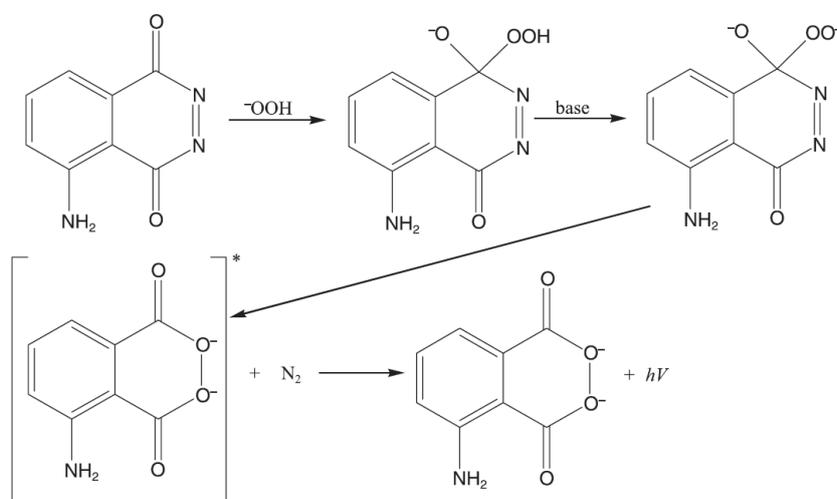


**Figura 1.1-** Síntese de luminol (Koolman e Roehm, 2005)

Para que a aplicação de luminol seja possível e se dê a reacção com peróxido de hidrogénio em água é necessária a presença de um catalisador redox, existindo uma grande variedade de metais de transição com capacidade para cumprir esta função (Webb *et al.*, 2006). A hemoglobina (Hb) é uma molécula transportadora de oxigénio encontrada nos eritrócitos, responsável pela coloração vermelha do sangue. No corpo humano, esta molécula encontra-se protegida da desnaturação pelo encapsulamento nos eritrócitos, e os iões ferro, presentes nos grupos “heme”, e que assumem a função de catalisador no teste empregue na verificação da presença de sangue, são mantidos no estado ferroso por vários tipos de mecanismos (Barni *et al.*, 2007). Thornton e

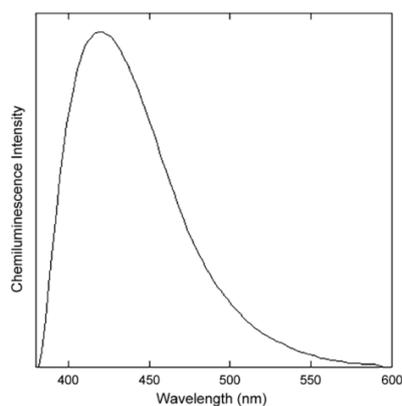
Maloney concluíram então que, os grupos “heme” da Hb, são responsáveis pela catálise da quimioluminescência do luminol no sangue. Quando o luminol é aplicado numa mancha de sangue, o ferro presente nos grupos “heme” é capaz de catalisar quer a reacção de decomposição do peróxido, quer a oxidação do luminol (Barni *et al.*, 2007).

Este teste envolve a aplicação de luminol em *spray*, dissolvido numa solução aquosa alcalina contendo peróxido de hidrogénio, nas manchas suspeitas de sangue encontradas nas cenas de crime (Quickenden e Cooper, 2001). Esta reacção ocorre com a oxidação pelo ferro do luminol em diazoquinona, que sofre posteriormente acção por parte do anião do peróxido de hidrogénio, originando-se o endoperóxido. Este composto sofre a perda de azoto, formando ácido 3-aminoftálico, um di-anião que se encontra no estado excitado, decaindo para o estado fundamental. Este processo é seguido pela emissão de radiação por fluorescência do 3-aminoftalato (Koolman e Roehm, 2005), segundo indica a figura 1.2 abaixo.



**Figura 1.2** – Mecanismo geral da reacção de quimioluminescência do luminol (Creamer e Buck, 2009: 312)

Em soluções aquosas, a luz observada caracteriza-se entre um azul com fundo violeta e azul-esverdeado, sendo o alcance do espectro bastante amplo, dependendo de diversos parâmetros da reacção (Barni *et al.*, 2007) – figura 1.3.



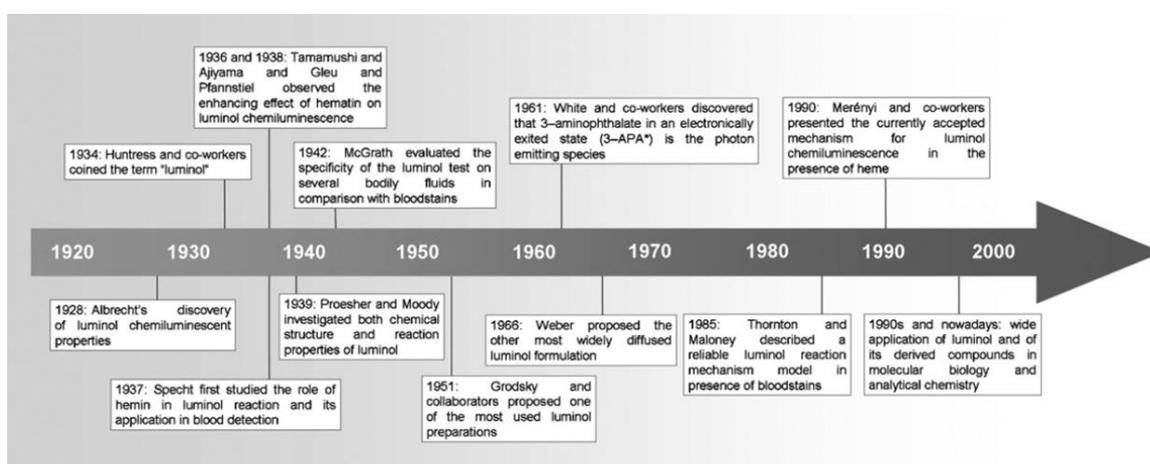
**Figura 1.3** - Espectro de emissão da reacção do luminol com peróxido de hidrogénio na presença de sangue (Barni *et al.*, 2007:900)

Barnett e Francis (2005) revisaram recentemente a sua reacção de quimiluminescência, verificando que a produção de luz resultante da oxidação do luminol é um processo múltiplo e complexo, e está dependente de inúmeros factores como a temperatura (devendo ser protegido de ambientes quentes), pH (depende do catalisador presente, e varia entre 8 e 11), força iónica e espécies reactivas que podem estar presentes e interagir com o luminol. A sua solução é sensível à luz e à presença de cationes metálicos, sendo normalmente estável por apenas 8-12 horas (Barnett e Francis, 2005).

Uma das limitações do uso de luminol, assim como de outros testes de detecção de sangue, é a sua falta de especificidade, sendo possível a catálise da reacção de quimiluminescência com outras substâncias que não o sangue, como é o caso da solução de hipoclorito de sódio, frequentemente utilizada em agentes de limpeza tanto em ambientes domésticos como industriais (Creamer *et al.*, 2005), ou da hemoglobina animal e peroxidase das plantas (Quickenden e Creamer, 2001). Este alcance por substâncias interferentes que podem accionar a emissão de luz pelo luminol, limita a utilização desta técnica como definitiva, sendo por isso caracterizado como um teste de presunção, embora os investigadores com maior prática nesta aplicação afirmem que a experiência permite a distinção entre substâncias interferentes e o sangue (Creamer *et al.*, 2003). No entanto, a aplicação deste método tem também inúmeras vantagens, que permitem com que seja um dos testes mais usados na detecção de sangue. Uma delas relaciona-se com o facto de ser uma técnica passível de ser aplicada e interpretada a olho nu, sem necessidade de detecção por

instrumentos (Creamer *et al.*, 2003). O facto de ser considerada uma técnica rápida, pouco dispendiosa e simples, assim como a sua enorme sensibilidade numa escala de diluição de 1:10000 a 1:5000000, têm contribuído fortemente a sua investigação e aplicação (Ramsthaler *et al.*, 2009).

Contam-se já mais de 40 anos, desde que a emissão de luz, que se verifica quando uma solução contendo luminol e peróxido de hidrogénio é aplicada em *spray* em manchas de sangue, tem sido utilizada para fins forenses, em investigações relacionadas com crimes violentos (Barni *et al.*, 2007).



**Figura 1.4** - Cronologia do luminol desde a sua descoberta (Barni *et al.*, 2007: 898)

Existe alguma controvérsia no que toca à informação relativa à síntese de luminol pela primeira vez, embora este feito seja normalmente atribuído ao alemão Schmitz, em 1902 (Gimeno, 1989; Gimeno e Rini, 1989). Porém, parece ser completamente aceite nos dias de hoje que Albrecht foi o primeiro a reportar o seu envolvimento em reacções de quimioluminescência, em 1928. No final dos anos 30, Specht, um cientista do Instituto Universitário de Medicina Legal e Criminalística Científica de Jena, na Alemanha, estudou pela primeira vez o papel da hemina, um componente derivado do grupo heme com ferro no seu conteúdo, na reacção química do luminol, e investigou o seu potencial na detecção de sangue. Mais tarde, Proesher e Moody salientaram a capacidade desta solução ser aplicada em *spray* repetidas vezes sobre as manchas de sangue, permitindo que a reacção de quimioluminescência se dê de forma reiterada. McGrath, por sua vez, avaliou a especificidade do luminol para o sangue, aparentando insensibilidade para outros fluidos. Já depois de 1950, Grodsky e seus colegas,

propuseram a fórmula que ainda hoje em dia é a mais comum de ser aplicada, pelos investigadores, para detectar vestígios de sangue em cenas de crime. Nas últimas décadas, este composto tem sido um dos mais requeridos reagentes quimioluminescentes para aplicação em biologia molecular e química analítica, sendo amplamente estudado como base para métodos como cromatografia líquida de alta performance (HPLC), imunoenaios, entre outros (Barni *et al.*, 2007) – figura 1.4.

Os seus estudos têm vindo a ser alargados a várias áreas de interesse, como estudos históricos e arqueológicos, e também testada a sua diligência para outros fins nas ciências forenses, neste caso a antropologia forense, com a sua aplicabilidade na estimativa do PMI através da análise da quantidade de sangue ainda presente dos ossos, investigação presente nesta dissertação.

Esta última vertente de aplicação resultou da necessidade urgente de desenvolvimento de um método rápido e pouco dispendioso, não só para a distinção entre osso de interesse médico-legal e de contexto histórico, mas também na tentativa de aumentar a precisão da estimativa do tempo decorrido desde a morte (Creamer e Buck, 2009).

Devido ao seu elevado conteúdo mineral, os ossos tornam-se um material muito resistente, o que lhes permite a sua permanência em boas condições durante um longo período de tempo após a decomposição dos tecidos moles, sendo assim possível a protecção da hemoglobina em condições estáveis, mesmo depois de cessado o suprimento sanguíneo. Contudo, assim como no caso dos tecidos moles, existem factores que influenciam a decomposição dos mesmos, embora mais lentamente, como o declive e o ambiente de inumação, alterações de pH do solo, factores tafonómicos (animais, etc.), exposição ao calor e a troca de iões entre o tecido ósseo e o ambiente envolvente, e que afectam igualmente a concentração de Hb (Creamer e Buck, 2009). O tipo de osso em si pode também influenciar este aspecto, variando consoante o rácio do volume, a área de superfície, a fragmentação e até a porosidade do mesmo (Introna *et al.*, 1999).

Outros métodos têm sido investigados com o mesmo objectivo. Knight e Lauder (1969) aplicaram um teste colorimétrico de benzidina com o mesmo propósito de detecção

de hemoglobina nos ossos, concluindo que, na maioria dos casos, esta se encontrava ausente da superfície do osso ao fim de 50 anos. Mais tarde, também Facchini e Pettener (1977) testaram a mesma técnica, mas desta vez com o osso em pó. Em 2011, Ramsthaler e colegas investigam a hipótese de aplicação de outros testes, Combur® e Hexagon-OBTI®. O primeiro é igualmente empregue na pesquisa por proteínas, glucose, nitritos, etc., e contém peróxido de hidrogénio que, em conjunto com a hemoglobina possivelmente presente, catalisa a oxidação do indicador. No caso do Hexagon-OBTI®, que foi desenvolvido com objectivos clínicos, dá-se uma reacção entre um anticorpo e a Hb humana. Porém, ambos têm capacidades de detecção baixas e foram descartados como futuro método, pelo menos segundo o protocolo *standard* usado (Ramsthaler *et al.*, 2011). Em 1999, Introna *et al.* propõem a utilização de luminol numa amostra de fémur humano, registando os resultados com camara de vídeo, e confirmando a viabilidade do luminol na estimativa do PMI, embora com necessidade de alargar os estudos neste sentido. Recentemente, Verhoff e Kreutz (2005), adaptaram esta prática às suas próprias recomendações, tornando-a mais simples.

A detecção de luminescência nos ossos assenta no mesmo princípio que a procura de manchas de sangue, a alta sensibilidade do luminol para vestígios de sangue que não se encontram visíveis a olho nu. As mais diversas abordagens destinadas a diferenciar restos esqueléticos forenses de arqueológicos têm sido experimentadas, apresentando-se cada vez mais forte a convicção de que a ausência de emissão de luz é um dado forte o suficiente para concluir que a ossada terá um PMI superior a 50 anos. Assim, será de esperar que a intensidade da quimioluminescência diminuirá com o aumento do intervalo *postmortem*, e será totalmente ausente numa fracção da amostra com elevado período de tempo decorrido após a morte (Ramsthaler *et al.*, 2009). Segundo Ramsthaler *et al.*, (2009), para uma amostra aleatória, a aplicação de luminol permite um valor preditivo positivo de 80%, e um valor preditivo negativo de 96%. Com estes dados em conta, observando que a validação da inexistência de hemoglobina nos restos esqueléticos parece ser mais confiável, este teste poderá assumir o papel de teste de presunção, excluindo os resultados negativos, e sendo o

uso de outras metodologias, como os radionuclídeos, restringido a resultados positivos (Ramsthaler *et al.*, 2011).

Como todos os métodos, tem as suas vantagens e desvantagens, sendo de acreditar que as primeiras acabarão por se sobreporem. A sua sensibilidade numa escala de diluição de 1:10000 a 1:500000, tal como a sua rapidez de execução, utilização de técnicas bem estabelecidas, baixo custo e simplicidade relativamente aos outros métodos morfológicos, físicos, químicos, etc. (requer pequenas quantidades de material sem pré-tratamento), têm contribuído fortemente a sua aplicação e desenvolvimento (Ramsthaler *et al.*, 2011). Menos positiva é a ocorrência de falsos positivos, como por exemplo na presença de vegetais. Apesar de falsos positivos e negativos deverem ser considerados da mesma forma, de um ponto de vista científico, em termos forenses os falsos negativos deverão ser tidos em maior consideração, uma vez que podem conduzir à exclusão de um caso com ainda pertinência criminal (Ramsthaler *et al.*, 2009).

## **1.2. Objectivos**

A avaliação do tempo decorrido desde a morte é de extrema importância, quando encontrados restos mortais esqueletizados, sendo determinante para a avaliação do seu significado médico-legal. A sua estimativa pode ajudar na descoberta da sucessão de acontecimentos que rodeiam a morte, e contribuir para o desfecho da investigação forense. Porém, a determinação do intervalo *postmortem* em restos esqueletizados, é um assunto ainda pouco estudado e pouco consensual. Assim sendo, é de extremo valor, a investigação de técnicas que permitam adicionar conhecimento e fiabilidade a este tema. Técnicas como a aplicação do luminol têm sido referidas como possíveis métodos para a estimativa do PMI. Desta forma, e porque as contribuições passadas, presentes e futuras da antropologia forense devem ser adaptadas às necessidades da sociedade actual (Cunha, 2010), o objectivo desta investigação relaciona-se com a tentativa de estabelecimento de um protocolo preciso, económico, fácil e reprodutível para a estimativa do PMI, com recurso à técnica supracitada, e com a análise das diferentes intensidades de luminescência entre os vários ossos da amostra estudada e a exploração do potencial do luminol para a distinção entre ossos com interesse médico-legal e arqueológico, ou seja, com um tempo decorrido desde a morte inferior

ou superior a 15 anos, respectivamente. Por fim, testar a subjectividade inerente ao método experimentado. Em suma, pretende-se averiguar a aplicabilidade e a validade do luminol como técnica para a avaliação do tempo decorrido desde a morte em antropologia forense.

### **1.3. Organização e conteúdo**

A presente tese está inserida no campo de pesquisa actual em ciências forenses, especificamente em antropologia forense, com especial foco e interesse no tema intervalo post-mortem. Destina-se a profissionais, assim como estudantes, de Antropologia Forense, Medicina Legal, Criminalística e também a curiosos sobre esta área tão popular nos nossos dias. Foi escrita de acordo com o método científico tradicional, dividida em capítulos: introdução, com uma pequena revisão do estado da arte para inteirar o leitor dos assuntos abordados, assim como com uma explicitação dos objectivos do trabalho; amostra, metodologia, resultados, discussão e conclusão.



# 2. Amostra

---



## 2. Amostra

---

Para a realização desta investigação foi solicitada, e concedida, a permissão de utilização de 4 grupos de subamostra oriundos de diferentes locais, perfazendo um total de 51 indivíduos com características variáveis e com datas à morte diferentes e conhecidas. A escolha recaiu, então, sobre restos esqueléticos provenientes de autópsias efectuadas no Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF), quer da sua Delegação do Sul, como da Delegação do Centro; da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI” – CEI-XXI, exumados do Cemitério dos Capuchos em Santarém (Ferreira *et al*, 2014), e, por último, do Laboratório de Antropologia Forense da Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF-DS).

De modo a uniformizar a amostra foi seleccionado um único tipo de osso. O osso seleccionado para a amostragem foi a clavícula, sem qualquer tipo de patologia óssea sempre que possível, por apresentar maior facilidade logística em termos de recolha e utilização.

### **2.1 Subamostra proveniente de autópsias da Delegação do Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF-DC)**

Esta subamostra resulta da solicitação efectuada, através de pedido formal, ao serviço de Patologia forense do INMLCF-DC, à Senhora Professora Dr.<sup>a</sup> Beatriz Simões, à data do pedido, directora do mesmo serviço.

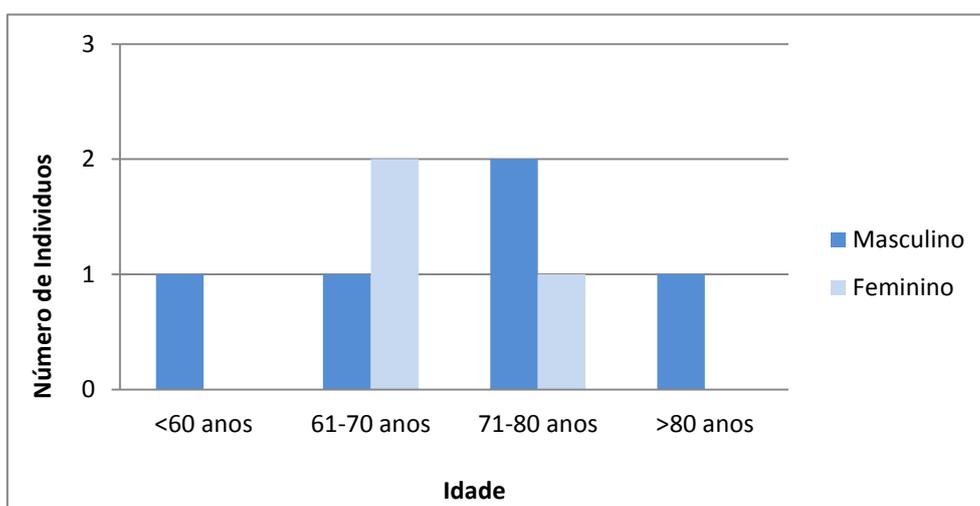
A recolha foi procedida segundo o protocolo *standard*, em autópsias realizadas num período compreendido entre o dia 06 de Dezembro de 2013 e dia 30 do mesmo mês<sup>2</sup>.

A subamostra é composta pelos dados de 8 indivíduos identificados e com data da morte conhecida, podendo a listagem ser conferida em apêndice (8.1.1). Estes dados são constituídos pelos registos individuais dos mesmos, assinalados durante o período da perícia médico-legal, a autópsia. Foram recolhidas clavículas, direitas, de indivíduos

---

<sup>2</sup> As recolhas foram autorizadas apenas para este período de tempo.

adultos, com idades à morte entre os 52 e 83 anos ( $\bar{x}=70,5$ ,  $\sigma=9,885054$ ,  $\sigma^2=97,71429$ ), 3 deles do sexo feminino (37,5%) e os restantes (5, correspondentes a 62,5%) do sexo masculino. Como se pode observar pela figura 2.1, a distribuição dos sexos pelas classes etárias não é homogénea, existindo mesmo intervalos sem nenhum indivíduo feminino. Por se tratar de uma subamostra proveniente de autópsias realizadas em dias praticamente consecutivos, seria expectável, de acordo com a realidade portuguesa, que os PMI fossem próximos, o que veio de facto a verificar-se, encontrando-se compreendidos num intervalo entre 205 e 230 dias, à data da aplicação do luminol.



**Figura 2.1-** Distribuição etária da subamostra proveniente de autópsia do INMLCF-DC.

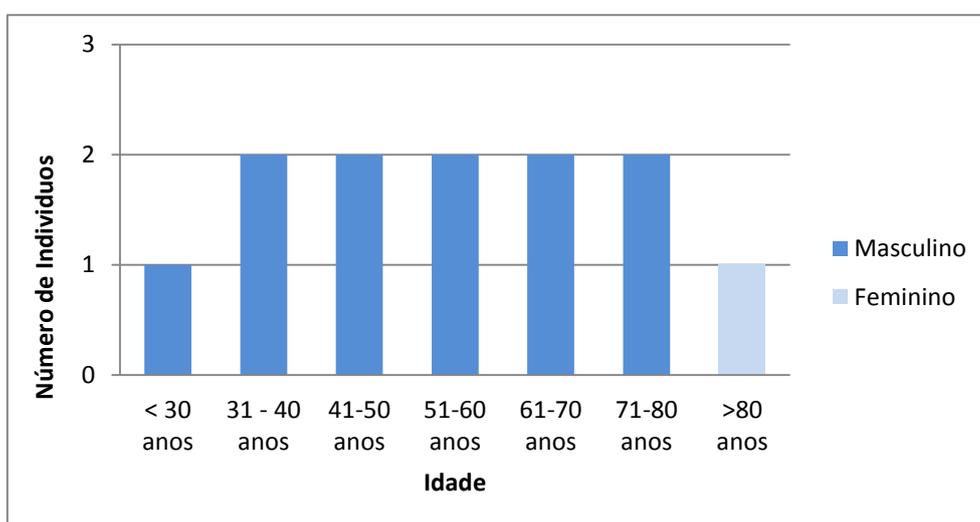
## **2.2 Subamostra proveniente de autópsias da Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.**

Tal como a anterior, esta subamostra é o resultado do pedido prévio realizado, através de pedido formal, ao serviço de Patologia forense do INMLCF-DS, à Senhora Professora Doutora Cristina Mendonça, directora deste serviço à época.

A recolha foi procedida segundo o protocolo *standard*, em autópsias realizadas num período compreendido entre o dia 14 de Novembro de 2013 e dia 29 de Janeiro de 2014.

A subamostra é constituída pelos registos de 12 indivíduos identificados e com data da morte conhecida, podendo a listagem ser conferida em apêndice (8.1.2), registos esses

assinalados durante o decorrer da autópsia. No que a esta subamostra diz respeito, a lateralidade do osso em questão é maioritariamente esquerda, estando presente apenas um exemplar do lado direito. Foi, mais uma vez, dada preferência a indivíduos sem qualquer tipo de patologia óssea. Todos são adultos, existindo neste caso uma maior discrepância de idades, encontrando-se estas compreendidas entre os 20 e os 86 anos ( $\bar{x}=53,8$ ,  $\sigma=18,81$ ,  $\sigma^2=353,97$ ). Relativamente à diagnose sexual, novamente se observa uma predominância do sexo masculino (91,67%) relativamente ao sexo feminino (8,33%) – figura 2.2. Os PMI encontram-se de novo num intervalo pouco amplo, embora maior que o anterior, compreendido entre 176 e 253 dias, à data da aplicação do luminol.



**Figura 2.2** - Distribuição etária da subamostra proveniente de autópsia do INMLCF-DS.

## 2.3 Subamostra proveniente da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI”

### 2.3.1 Origem da subamostra da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI”

As colecções de referência representam a base para o desenvolvimento de técnicas básicas em antropologia forense, sendo por isso reconhecido o seu valor excepcional em investigações e pesquisas (Cunha e Wasterlain, 2007).

A “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI”, proveniente do cemitério dos Capuchos, em Santarém, é a mais recente colecção osteológica de referência

portuguesa. Resulta da reunião de indivíduos de nacionalidade portuguesa e ancestrais do sul da Europa e era formada, à data da recolha da amostra, por 159 indivíduos: 70 esqueletos disponíveis para estudo e 89 em processo de limpeza e etiquetagem (Ferreira *et al.*, 2014). Surgiu de um protocolo de cooperação, assinado em 2009, entre a Câmara Municipal de Santarém e o Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia, na altura Departamento de Antropologia, e aí se encontra depositada. O primeiro protocolo de cedência de indivíduos esqueletizados, que contou com 77 esqueletos identificados e que se encontravam abandonados no cemitério acima citado, foi ultimado a 26 de Janeiro de 2011 (Curate, 2011).

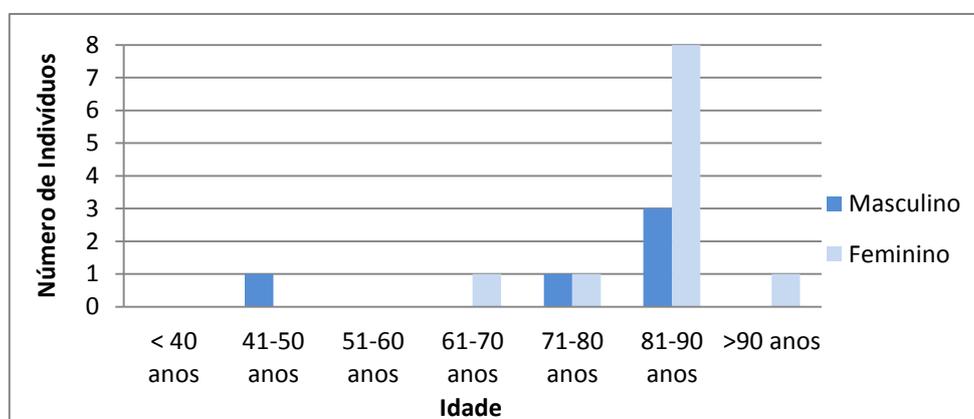
A colecção é constituída por indivíduos com data de nascimento compreendida entre 1905 e 1968, e data de óbito entre 1995 e 2008, exumados entre 1999 e 2013. O sexo feminino está representado por 53,5% da colecção, contra 46,5% de indivíduos masculinos. A idade à morte oscila entre os 25 e 99 anos. A grande maioria possuía já uma idade avançada na altura da morte (faleceu depois dos 80 anos), verificando-se por isso perdas dentárias *antemortem* em grande parte dos casos. Esta situação limita o desenvolvimento de métodos dentários, assim como a ausência total de jovens limita os experimentos a estimativas da idade em adultos (Ferreira *et al.*, 2014). A falta total de adultos em muitas classes etárias sugere que a presente colecção não reflecte o perfil de mortalidade do séc. XX (Curate, 2011). Uma outra falha ainda por resolver assenta na determinação da causa de morte, apenas conhecida, até à data, em 12 dos indivíduos. A representação óssea dos esqueletos apresenta-se bastante razoável, com as ossadas bem preservadas e escassos ossos em falta, o que era expectável já que os corpos foram enterrados em caixões e completamente vestidos, sendo as pequenas ausências justificadas pela recuperação incompleta durante a exumação (Ferreira *et al.*, 2014).

No repositório biográfico da colecção estão incluídos o certificado de óbito e o nome, idade à morte, estado civil, filiação, naturalidade, estatura, residência na altura da morte do indivíduo e data do enterramento, assim como o número da cova onde foram inumados (Curate, 2011).

### 2.3.2 Constituição da subamostra da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI”

Neste grupo 16 clavículas constituem a subamostra, que, como anteriormente, pode ser vista em listagem em apêndice (8.1.3). Contrariamente aos casos anteriores, em que os ossos eram fornecidos aleatoriamente, os restos esqueletizados que pertencem a esta subamostra foram seleccionados, e devidamente documentados através de registos fotográficos, de acordo com o seu estado de degradação. Isto é, foram escolhidos aqueles que não se encontravam inteiros, já que para o sucesso da investigação a sua preservação era pouco relevante, não existindo, por isso, a necessidade de efectuar cortes em ossos em perfeito estado de preservação. Os seus registos foram retirados de uma base de dados, previamente elaborada por outrem, e que contempla todos os indivíduos inseridos nesta colecção.

Aqui, a lateralidade é mais díspar, estando presentes 9 clavículas do lado direito e 7 do lado esquerdo. Foi dada preferência a indivíduos sem qualquer tipo de patologia óssea, como habitual. Todos os indivíduos são adultos, maioritariamente idosos, encontrando-se as idades compreendidas entre os 43 e os 97 anos ( $\bar{x}=81,62$ ,  $\sigma=12,24$ ,  $\sigma^2=149,72$ ). Quanto à diagnose sexual, verifica-se uma situação diferente das anteriores, com predominância do sexo feminino (11 indivíduos) relativamente ao sexo masculino (5 indivíduos), com uma percentagem de distribuição de 68,75% e 31,25%, respectivamente. Como se pode observar pela figura 2.3, a distribuição pelas classes etárias não é homogénea, existindo mesmo intervalos sem nenhum indivíduo.



**Figura 2.3**– Distribuição etária da subamostra proveniente da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI”.

O tempo decorrido desde a morte é bastante superior ao dos outros grupos, como seria de esperar, sendo maior o próprio intervalo entre eles, variando entre 4881 e 7131 dias, à data da aplicação do luminol.

## **2.4 Subamostra proveniente do laboratório de Antropologia Forense da Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.**

### **2.4.1 Origem da subamostra do laboratório de Antropologia forense do INMLCF-DS**

O laboratório de Antropologia Forense do INMLCF-DS é composto por 105 casos objectos de análise antropológica e descritos em relatórios de antropologia forense, realizados entre 2004 e 2011 (Ferreira, 2012). Os restos esqueletizados que o constituem têm proveniências variadas, por vezes desconhecidas, encontrando-se alguns deles resolvidos e encerrados, embora nem todos. Os seus PMI nem sempre são conhecidos, mas os seus perfis biológicos estão maioritariamente definidos. Alguns casos possuem esqueletos praticamente completos, em detrimento de outros, constituídos por apenas algumas peças ósseas, ou mesmo um único osso, como é o caso das clavículas provenientes do cemitério da Amadora.

### **2.4.2 Constituição da subamostra de Antropologia Forense do INMLCF-DS**

Para a elaboração desta subamostra, resultante da reunião de 15 clavículas (com registos passíveis de visualização em listagem em apêndice – 8.1.4), foi imperativa a consulta dos relatórios correspondentes aos casos deste serviço, com o intuito de fazer uma escolha nos restos esqueletizados com interesse para esta investigação. A selecção baseou-se na escolha de indivíduos cujo PMI era conhecido, exceptuando um caso, e que tivessem pelo menos uma clavícula presente. Não foi possível aumentar o número de indivíduos desta subamostra, uma vez que a grande maioria dos casos possuía PMI desconhecido. Mais uma vez, o material foi documentado através de registos fotográficos, como posteriormente explicado na metodologia.

Nesta subamostragem os registos disponíveis apresentavam maior limitação, não sendo possível apurar todos os dados pretendidos para todos os casos, razão pela qual

não é apresentado o gráfico de distribuição de sexos por classes etárias. Assim sendo, do que foi possível apurar, a lateralidade é maioritariamente esquerda (11), com um número de clavículas direitas muito inferior (4), os homens encontram-se também em maioria e a idade é avançada, 50 a 98 anos, tendo em conta que estes últimos dois parâmetros foram avaliados em apenas 7 dos 15 casos. Também os PMI são menos precisos, inserindo-se num período entre os 3 e os 20 anos.



# 3. Metodologia

---



### 3. Metodologia

---

*“Our greatest weakness lies in giving up. The most certain way to succeed is always to try just one more time.” (Thomas A. Edison)*

A elaboração da presente metodologia teve como base os estudos prévios realizados por Introna *et al.* (1999), Creamer e Buck (2009) e Ramsthaler *et al.* (2009 e 2011), que serviram como guias orientadores, sendo adaptados à medida e aos objectivos desta investigação.

É imprescindível ressaltar as dificuldades logísticas encontradas durante a preparação deste trabalho, desde as demoradas autorizações a pedidos de material e outras questões burocráticas, que em muito atrasaram o início da componente prática, até à escassez de meios e espaço, por vezes exigidos para o mesmo propósito. Todos estes obstáculos exigiram um empenho redobrado, assim como persistência e força de vontade de maneira a que, no final, fosse viável a conclusão desta dissertação. A estas razões reúnem-se também as pessoas que se foram cruzando durante o caminho, com a sua ajuda e boa vontade.

Para o presente estudo foram usados diferentes grupos de amostra, com diferentes origens, características e registos, o que leva a que a metodologia, embora maioritariamente aplicada de forma igual, tenha pequenos desvios e alterações, sendo, por isso, dividida segundo o tipo de subamostra.

Seria de esperar uma amostragem de 80 clavículas inteiras, 30 ossos frescos de autópsia e 50 pertencentes a casos forenses e não forense, com PMI conhecido e com a respectiva identificação de lateralidade, sexo, idade e exclusão de patologia óssea. No entanto, por restrições logísticas de material foi apenas possível atingir um número de 50 indivíduos, cumprindo, no entanto, os requisitos esperados.

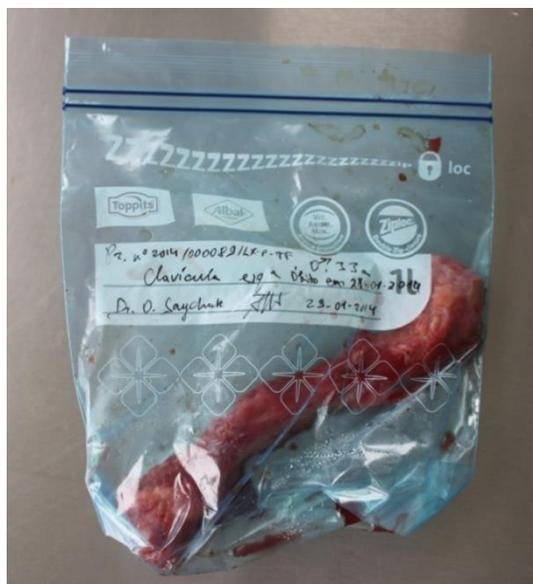
Os dados recolhidos durante a aplicação desta técnica foram devidamente assinalados em fichas de registo criadas com esse mesmo propósito, e os registos fotográficos foram efectuados com recurso a uma máquina fotográfica reflex Canon EOS 500D de 15,1 megapixels, com objectiva EFS. Os dados obtidos foram inseridos em bases de

dados e, posteriormente, aplicado o tratamento estatístico, com recurso ao programa SPSS.

### 3.1 Subamostras provenientes de autópsia das Delegações do Centro e Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

Nestes casos, em que o material foi proveniente de autópsia, o tratamento aplicado foi o mesmo, quer em Coimbra quer em Lisboa, fazendo por isso sentido que seja descrito junto.

A amostra foi obtida de cadáveres frescos, extraída durante o decorrer da autópsia (depois de consultado o RENNDA), e conservada por congelação a 4°C (desde a data da sua extracção até à data da maceração – cerca de 2 a 3 meses), em sacos de congelação *zip-lock* devidamente identificados com a lateralidade do osso, idade à morte, data da morte e da recolha, sexo, número da autópsia e perito responsável pela colheita (Figura 3.1). Foram excluídos ossos sujeitos a qualquer tipo de tratamento químico.



**Figura 3.1** – Clavícula proveniente de autópsia, devidamente acondicionada em caso de congelação.

Para dar início à componente prática, o material foi descongelado e macerado em água (Figura 3.2), uma vez que era o único meio disponível para a remoção total dos

tecidos moles, e posteriormente seco e limpo manualmente com recurso a lixas, escovas e bisturis.



**Figura 3.2** - Maceração em água das clavículas provenientes de autópsia para remoção dos tecidos moles. a) Maceração realizada em Coimbra, no departamento de Ciências da Vida; b) Maceração realizada em Lisboa, de Antropologia Forense do INMLCF-DS.

Depois de totalmente limpos, os restos esqueletizados estavam preparadas para a aplicação da técnica estudada. Sendo esta segunda parte comum a todas as amostras, será descrita no final como um todo.

### **3.2 Subamostras provenientes de restos já esqueletizados, da “Colecção de esqueletos identificados do século XXI” e do laboratório de Antropologia forense do INMLCF-DS.**

Quando o material se encontrava já esqueletizado, como foi o caso destes dois grupos de amostra, a preparação do mesmo envolveu outro tipo de passos, com a necessidade de documentar de forma fotográfica e escrita as condições prévias dos ossos escolhidos para este trabalho. Este passo foi imprescindível, uma vez que as ossadas seriam parcialmente destruídas, e, pertencendo a colecções teria de ficar registada essa alteração.

Foram seleccionados restos esqueletizados com pertinência forense ou sem interesse médico-legal, com tempos decorridos desde a morte conhecidos e diferentes entre si.

Feita a escolha do material a utilizar, o mesmo foi documentado como descrito acima, e como ilustra a figura 3.3 abaixo e o apêndice 8.2.



**Figura 3.3** - Exemplo de registo fotográfico de documentação de uma clavícula esquerda, pertencente ao indivíduo 7 da CEI/XXI: a) comprimento da vista inferior; b) largura da vista superior; c) comprimento da vista inferior; d) largura da vista superior.

Como estes grupos de subamostra já se encontravam esqueletizados, não houve necessidade de proceder a congelação ou maceração. Sendo apenas fotografados e, posteriormente, devidamente acondicionados em sacos *zip-lock* e etiquetados, como nas subamostras anteriores.

### **3.3 Aplicação de Luminol – prática comum a todos os grupos de subamostra**

Depois de todas as amostras estarem livres de tecidos moles e apresentarem apenas o tecido ósseo, estavam terminadas as diferenças de metodologia entre os vários tipos de material. Assim, a preparação e aplicação do luminol em si, foi comum.

Foi preparada a solução de luminol previamente adquirido, conforme as instruções do manual que o acompanhava.

A aplicação do luminol foi feita em *spray*, sobre o osso reduzido a pó. Essa redução implicou o corte do osso em pequenos pedaços de tamanho regulado, para posteriormente sofrer a moagem. O processo de corte em pequenos cubos, com cerca de 1 cm de lado, embora sem necessidade de um rigor extremo, foi realizado com recurso a uma serra eléctrica de serra redonda sobre uma superfície plana. Os

pequenos pedaços foram novamente armazenados em sacos *zip-lock* e devidamente etiquetados.

Seguiu-se a redução a pó do material ósseo, processo efectuado nos moinhos de azoto líquido dos serviços de Genética e Biologia Forense do INMLCF- DS e DC. Neste sistema, os restos esqueletizados foram introduzidos em viais metálicos selados que, por sua vez, foram inseridos no interior do moinho de azoto. As baixas temperaturas que aí se fazem sentir, juntamente com a agitação dos viais permite a redução do osso a pó. É importante referir que cada osso, com os seus respectivos cortes, foi introduzido no seu próprio saco e vial, não existindo risco de contaminações.

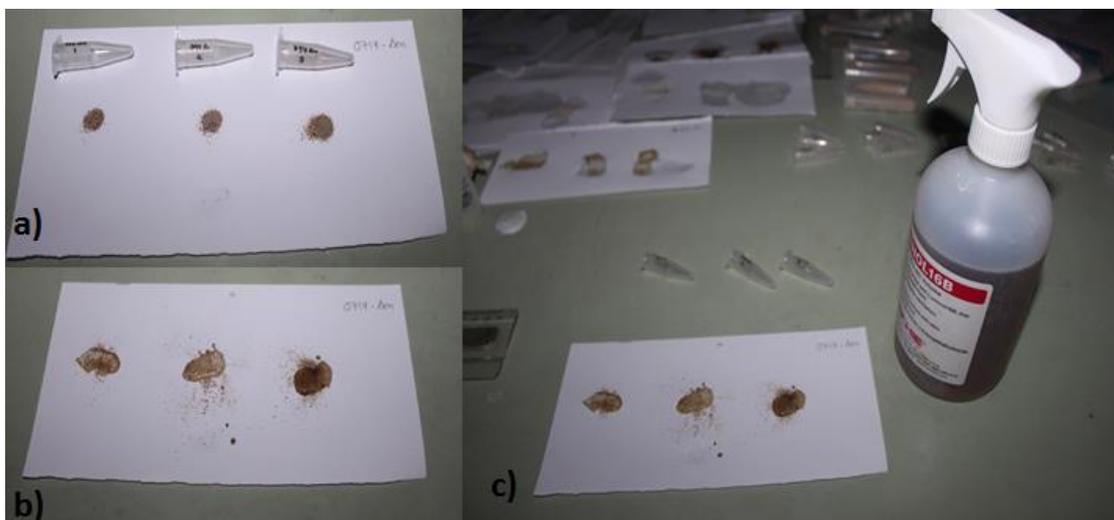
O pó resultante de cada corte das amostras com PMI conhecido foi retirado do vial – com o auxílio de luvas e pinças para não ocorrerem queimaduras pelo frio - recolhido num pedaço de papel branco limpo e transferido para tubos Falcon. Posteriormente, a amostra proveniente de cada clavícula foi pesada numa balança com grau de sensibilidade ao miligrama e dividida por tubos Eppendorf – 3 ensaios foram corridos para cada amostra, utilizando 50 mg de pó por tubo – figura 3.4.



**Figura 3.4** - Material contendo a redução a pó. Atrás, nos tubos Falcon, encontra-se a totalidade de pó de cada clavícula. À frente, em primeiro plano na fotografia, os tubos Eppendorf contendo os 50mg de cada uma das 3 réplicas, devidamente etiquetados.

Cada réplica foi disposta numa folha de papel branco limpo, segundo a figura 3.5, e foi adicionado o Luminol em spray, a uma de cada vez, numa sala totalmente escura. A

solução de luminol foi aplicada à temperatura ambiente, e utilizada no máximo até 3 horas depois da sua preparação. Uma gota de sangue foi usada como controlo positivo, e como controlo negativo foram reduzidos a pó dois ossos provenientes do Hospital de Santo António no Porto, ambas datadas do séc. XIX.



**Figura 3.5** - Aplicação do Luminol. a) As três réplicas são dispostas no papel branco; b) Luminol após ter sido aplicado em *spray* sobre as três réplicas; c) Vista geral da técnica depois de visualizada a quimiluminescência, acendida a luz e efectuados os devidos registos.

Os resultados foram examinados a olho nu, e fotografados, com ausência total de luz, não sendo empregues câmaras ou detectores de luz propositadamente, e a observação terminou assim que a reacção deixar de ser visível. A intensidade da quimioluminescência foi efectuada por duas abordagens distintas. Inicialmente graduada em 2 categorias: visível ou não visível, e de seguida em categorias com maior poder discriminante: negativo, muito fraco positivo, fraco positivo, positivo e forte positivo, de acordo com o seu grau crescente de quimioluminescência, respectivamente, como explicado na tabela 3.1.

Por uma questão de maior fiabilidade dos resultados, e redução do erro, a observação foi sempre executada por dois observadores, sendo a segunda observadora a orientadora desta dissertação.

Os dados foram tratados em SPSS e posteriormente analisados.

**Tabela 3.1** - Significado das escalas escolhidas na avaliação da reacção de quimioluminescência

	Resultado	Interpretação
Escala binária	Negativo	Não há qualquer tipo de emissão de quimioluminescência. A reacção não é visível a olho nu.
	Positivo	Há emissão de quimioluminescência. A reacção é visível a olho nu.
Escala de 5 níveis	Negativo	Não há qualquer tipo de emissão de quimioluminescência. A reacção não é visível a olho nu.
	Muito Fraco Positivo	Há emissão de quimioluminescência. A reacção praticamente não é visível a olho nu.
	Fraco Positivo	Há emissão de quimioluminescência. A reacção é visível a olho nu, mas com fraca intensidade.
	Positivo	Há emissão de quimioluminescência. A reacção é facilmente visível a olho nu.
	Forte Positivo	Há emissão de quimioluminescência. A reacção é fortemente visível a olho nu.

Para a avaliação das relações entre as variáveis do erro, recorreu-se ao uso do teste Kappa de Cohen, já que os dados referentes ao seu cálculo requereram métodos estatísticos específicos para a determinação do grau de confiança, e a estatística de kappa (K) é frequentemente usada para este objectivo. Este teste é uma medida de concordância verdadeira, que indica a proporção de concordância para além da esperada pelo acaso, e o valor de Kappa advém da fórmula (Sim e Wright, 2005):

$$K = \frac{\textit{observed agreement} - \textit{chance agreement}}{1 - \textit{chance agreement}}$$

Uma abordagem de grande valor e pertinência, que auxilia na interpretação dos resultados, é a construção de um intervalo de confiança que circunda o valor de K estimado, recorrendo ao valor de erro *standard* de kappa e ao “z score” correspondente ao nível de confiança desejado (Sim, 2005).

### 3.4 – Justificação de procedimentos

A metodologia aplicada nesta dissertação, e descrita acima, foi sujeita a alguns constrangimentos que justificam, e explicam, algumas decisões tomadas na elaboração deste protocolo. É importante esclarecer que os PMI respeitantes às subamostras provenientes de autópsia são de meses, e não de dias, não porque a autópsia tenha sido executada muito tempo após a morte, mas porque as clavículas analisadas foram

aconicionados em sacos e congeladas durante cerca de 2 a 3 meses, período variável entre Coimbra e Lisboa, de forma a evitar a putrefacção enquanto todas as subamostras eram recolhidas, e enquanto aguardávamos as autorizações necessárias. Este procedimento era fundamental, já que a maceração e, posterior aplicação de luminol, teve de ser feita em bloco, quer por falta de meios, quer pela curta duração da solução de luminol (cerca de 3 a 5 horas), após insertada, que obrigou a que todas as observações fossem efectuadas em apenas dois dias. Após a maceração dessas subamostras, o período de espera foi mais uma vez prolongado pela falta de azoto líquido para a redução dos ossos a pó, pelo qual, mais uma vez, tivemos de pedir autorização e aguardar.

Idealmente, a aplicação do luminol teria sido realizada logo após a colheita e selecção das subamostras, mas neste caso em particular, questões logísticas impediram essa situação.



# 4. Resultados

---

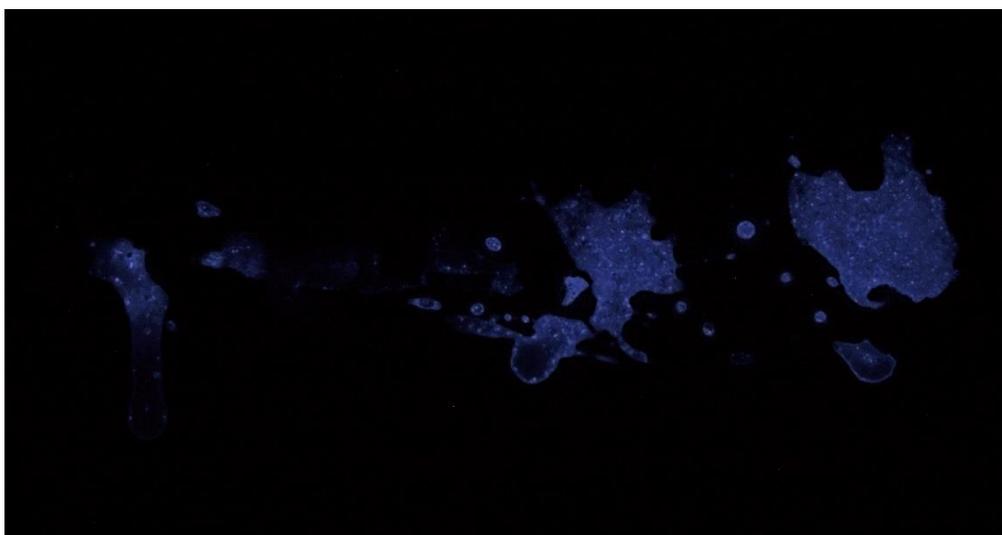


## 4. Resultados

---

Apresentam-se, seguidamente, os resultados correspondentes à reacção resultante da aplicação do luminol, assim como ao cálculo do erro intra e interobservador. O cálculo do erro revela-se de grande importância neste estudo, uma vez que orienta a investigação relativamente ao grau de subjectividade inerente a esta técnica.

Antes de mais, exibem-se abaixo as capturas fotográficas conseguidas durante a execução da parte prática, com a aplicação do luminol.



**Figura 4.1** - Reacção fortemente positiva, resultante da aplicação de luminol em *spray* na subamostra 2013/231/CR, proveniente de autópsia do INMLCF-DC. (Canon EOS 500D; ISSO-400; F/5.6; 5 segundos)



**Figura 4.2** – Reacção positiva, resultante da aplicação de luminol em *spray* na subamostra 2010-011, proveniente do laboratório de Antropologia forense do INMLCF-DS. (Canon EOS 500D; ISSO-400; F/5.6; 6 segundos)



**Figura 4.3** – Reacção fraca positiva, resultante da aplicação de luminol em *spray* na subamostra 4 da CEI-XXI. (Canon EOS 500D; ISSO-400; F/5.6; 6 segundos)

É de referir que apenas se encontram representadas as primeiras 3 categorias, devido ao facto de, embora tenham sido feitas variadas tentativas, não ter sido captada pela máquina fotográfica a fraca quimioluminescência na categoria de “muito fraca positividade”.

**Tabela 4.1** – Resumo dos resultados da observação da reacção de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol na amostra total. Nota: Estes resultados são respeitantes ao primeiro observador, surgindo da média das três réplicas usadas.

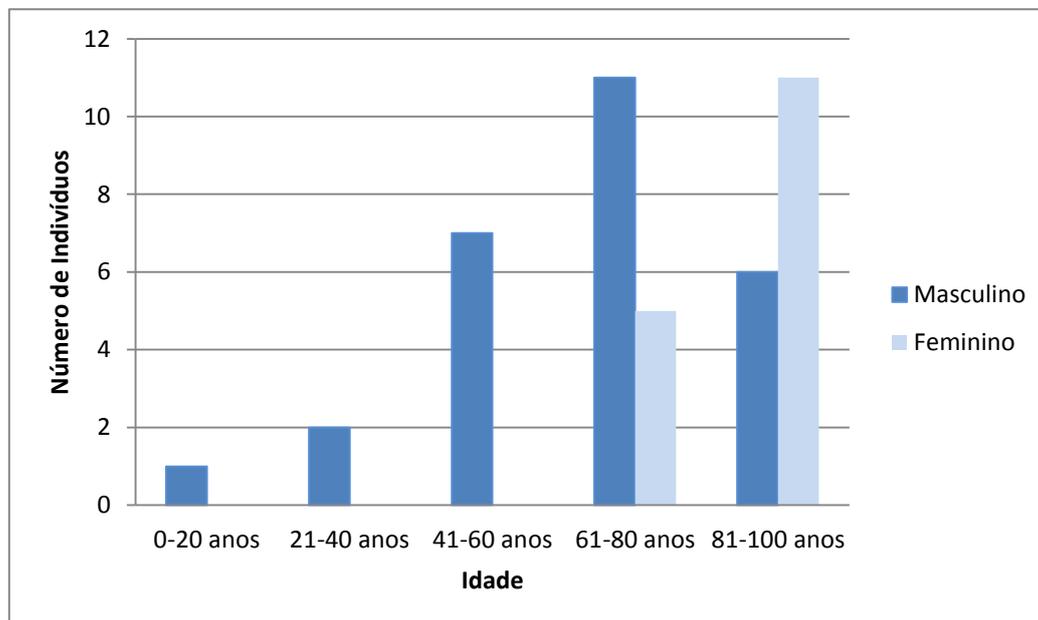
Nº da amostra	PMI real	Aplicação do Luminol	
		Escala Binária	Escala de 5 níveis
2013/229/CR	230 dias	Visível	Positivo
2013/230/CR	230 dias	Visível	Positivo
2013/231/CR	225 dias	Visível	Forte Positivo
2013/234/CR-P-TF	226 dias	Visível	Muito Fraco Positivo
2013/235/CR-P-TF	226 dias	Visível	Forte Positivo
2013/236/CR	225 dias	Visível	Positivo
2013/248/CR	208 dias	Visível	Positivo
2013/250/CR-P-TF	205 dias	Visível	Forte Positivo
2013/1068 LX-P-TF	253 dias	Não Visível	Negativo
2013/1069 LX-P-TF	253 dias	Visível	Positivo
2013/001081 LX-P-TF	249 dias	Não Visível	Negativo
2013/001082 LX-P-TF	248 dias	Não Visível	Negativo
2013/1103 LX-P-TF	230 dias	Visível	Fraco Positivo
2013/001150 LX-P-TF	224 dias	Visível	Fraco Positivo
2013/001170 LX-P-TF	220 dias	Não Visível	Negativo

<b>2013/1174 LX-P-TF</b>	220 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>2013/1179 LX-P-TF</b>	219 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>2014/000083 LX-P-TF</b>	178 dias	Não Visível	Negativo
<b>2014/000089 LX-P-TF</b>	176 dias	Não Visível	Negativo
<b>2014/000090 LX-P-TF</b>	180 dias	Não Visível	Negativo
<b>4 CEI-XXI</b>	4949 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>7 CEI-XXI</b>	4919 dias	Visível	Positivo
<b>9 CEI-XXI</b>	4913 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>10 CEI-XXI</b>	4911 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>12 CEI-XXI</b>	4881 dias	Visível	Positivo
<b>21 CEI-XXI</b>	4888 dias	Visível	Positivo
<b>45 CEI-XXI</b>	5222 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>52 CEI-XXI</b>	5295 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>54 CEI-XXI</b>	4944 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>55 CEI-XXI</b>	4906 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>56 CEI-XXI</b>	5009 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>68 CEI-XXI</b>	5126 dias	Visível	Fraco Positivo
<b>72 CEI-XXI</b>	4999 dias	Visível	Positivo
<b>74 CEI-XXI</b>	7131 dias	Visível	Positivo
<b>75 CEI-XXI</b>	5104 dias	Visível	Positivo
<b>85 CEI-XXI</b>	5220 dias	Não Visível	Negativo
<b>1530/2000</b>	PMI < 20	Visível	Fraco Positivo
<b>Amadora 0704</b>	PMI aproximado: 12.5 anos	Visível	Muito Fraco Positivo
<b>Amadora 0707</b>	PMI aproximado: 12.5 anos	Visível	Positivo
<b>Amadora 0709</b>	PMI aproximado: 12.5 anos	Visível	Positivo
<b>Amadora 0713</b>	PMI aproximado: 12.5 anos	Visível	Positivo
<b>Amadora 0714</b>	PMI aproximado: 12.5 anos	Visível	Positivo
<b>Amadora 0716</b>	PMI aproximado: 12.5 anos	Visível	Positivo
<b>Amadora 722</b>	PMI aproximado: 12.5 anos	Visível	Fraco Positivo
<b>2010-006</b>	PMI provável: 7 anos	Visível	Fraco Positivo
<b>2010-011</b>	PMI provável: 5,5 anos	Visível	Positivo
<b>2011-277</b>	PMI > 5 anos	Não Visível	Negativo
<b>2011-400</b>	PMI > 5 anos	Visível	Positivo
<b>2011-870</b>	PMI > 6 meses	Visível	Fraco Positivo
<b>2012-564</b>	PMI provável > 3 e < 12	Não Visível	Negativo
<b>2013-666</b>	PMI indefinido	Não Visível	Negativo

A análise estatística necessária para a conclusão deste estudo foi relativamente pequena, tendo em conta que os resultados, por si só, permitem a obtenção de conclusões no que à aplicação do luminol diz respeito, como se pode verificar na

tabela acima (4.1). Não foi tida em conta a divisão nos 4 grupos de amostra iniciais, funcionando a amostra como um todo, tendo esta separação surgido apenas devido às suas diferentes proveniências, e tendo sido mantida em alguns pontos desta dissertação por facilitar a sua caracterização (secção 8.3 dos apêndices e anexos). Também não foi tida em conta, para a análise estatística, a diferença entre sexos ou idades, o que vai de encontro com literatura existente, já que não é de esperar que a hemoglobina se comporte de forma diferente de acordo com esses parâmetros.

A amostra total é constituída por 51 indivíduos, todos adultos e com idades à morte entre os 20 e os 97 anos, como é passível de observar na figura 4.4. Encontram-se presentes indivíduos de ambos os sexos, com clavículas com lateralidade variada, e sem qualquer tipo de patologia óssea identificada. No entanto, para fins estatísticos, e de comparação, da reacção de luminol foram usados apenas 50 ossos, já que um deles possuía um PMI indefinido (2013-666 – do grupo de indivíduos provenientes do laboratório de Antropologia Forense do INMLCF-DS), tendo sido seleccionado, de qualquer das formas, para uma possível estimativa.



**Figura 4.4** - Distribuição etária da amostra total em que dados respeitantes ao sexo e à idade são conhecidos.

Para uma mais fácil compreensão dos resultados da presença ou ausência de quimioluminescência, a amostra foi dividida em 4 grupos (subamostras), de acordo

com o seu tempo decorrido desde a morte, sendo estes: 0-5 anos, 5-10 anos, 10-15 anos, 15-20 anos (tabela 8.27 da secção de apêndices e anexos). Esta separação não foi homogénea, sendo o número de indivíduos superior nas divisões 0-5 e 10-15 e menor nas restantes.

Os resultados da aplicação desta técnica estão presentes nas tabelas 8.28 e 8.29, com complementaridade nas tabelas 8.30 e 8.31. De acordo com a observação e análise das mesmas, é possível verificar que, no que diz respeito à primeira abordagem, constituída por apenas duas categorias – visível e não visível, a percentagem de falsos positivos corresponde a 100% e a de falsos negativos a 25%. Nos grupos com PMI entre 0-15 anos, ou seja, com pertinência forense, mais de metade dos resultados foram positivos, sendo que o intervalo dos 10-15 anos apresenta uma assertividade de 95%. É, no entanto, de ressaltar que no grupo em que mais facilmente seriam expectáveis resultados visíveis – 0-5 anos – 43% foram negativos. Quanto à 2ª abordagem, dividida em 5 categorias, a percentagem de falsos positivos mantém-se nos 100%, enquanto a dos falsos negativos desce para 22%. Embora a percentagem de falsos negativos seja 100%, há que ter em conta que as reacções observadas foram de uma fraca positividade. O único grupo que apresenta quimioluminescência fortemente positiva é, como seria de esperar, o grupo com PMI compreendido entre 0 e 5 anos. Porém, também neste caso, este mesmo intervalo possui uma percentagem de resultados não visíveis que não eram previsíveis – 38%. Os registos correspondentes à categoria “muito fraco positivo” são, na sua totalidade, provenientes da categoria 10-15, o que vai de encontro com o pretendido.

Em suma, a técnica estudada apresenta uma TPR (true positive rate) de 72% relativamente à primeira abordagem, de escala binária. Quanto à escala de 5 níveis, esta aumenta para 74%. No entanto, se tivermos em consideração a categoria de quimioluminescência a que devia pertencer, isto é, por exemplo, ter um PMI de 0-5 anos e, portanto, dever ser observada uma reacção forte positiva ou positiva, mas obter apenas um resultado de fraco positivo, o TPR desce para 48%.

Relativamente ao caso acima falado, de PMI indefinido, os seus resultados (negativos) sugeririam que o seu tempo decorrido após a morte fosse superior a 15 anos.

Contudo, devido ao elevado valor de falsos positivos, seria apenas uma suposição, sendo necessária a intervenção de outros métodos para a confirmação futura.

Para a avaliação das relações entre as variáveis do erro, recorreu-se ao uso do teste Kappa de Cohen. As tabelas correspondentes a esta análise – 8.15 a 8.26 - encontram-se em apêndice.

A subjectividade inerente a esta técnica, aqui medida pelo cálculo do erro, foi prevista para duas circunstâncias, entre os dois observadores responsáveis pela avaliação da reacção de quimioluminescência, e entre repetições de um mesmo caso, pelo mesmo observador.

No primeiro caso, todas as observações foram efectuadas por dois investigadores, sendo as diferenças daí resultantes utilizadas para este parâmetro. É importante informar que, para este cálculo uma das amostras não foi analisada (a 2013/001170 LX-P-TF, pertencente à CEI-XXI), devido à inexistência de observação da sua reacção por um dos observadores, sendo portanto o número de casos reduzido a 50 indivíduos (com 3 repetições cada). Mais uma vez, esta análise é dividida nas duas abordagens já acima citadas (escala binária e escala de 5 níveis). Começando pela primeira, os resultados obtidos apontam para um  $K=0,83$ , com um intervalo de confiança a 95% com um mínimo de 0,73 e um máximo de 0,93. A escala de 5 níveis, por sua vez, possui um  $K=0,93$  (95% CI= 0,90 – 0,96). O valor de K escolhido nesta situação foi o valor ponderado (weighted), uma vez que, tratando-se de uma escala ordinal, é importante que o grau de desacordo seja reflectido, conferindo maior ênfase a grandes diferenças entre categorias e menor a pequenas diferenças (Sim, 2005). Em suma, é espectável que os resultados coincidam, para os dois observadores, 83% das vezes para uma escala binária e 93% para a escala de 5 níveis, revelando assim um alto grau de concordância.

Na última situação citada, as repetições para um mesmo caso, foram realizados quatro testes K, como é possível verificar nas tabelas 8.23 a 8.26. Apesar de serem efectuadas três repetições para cada indivíduo, foi apurada a inexistência de diferenças estatisticamente relevantes entre as 3, tendo sido decidido, por esse motivo, que seriam apresentados resultados para discrepâncias entre as 2 primeiras réplicas

apenas, de forma a não se tornar tão pesada e exaustiva a análise dos resultados. Desta forma, para o observador 1, kappa correspondeu um valor de 0,88, estando o seu intervalo de confiança a 95% compreendido entre 0,73 e 1, para a escala constituída apenas pelos parâmetros visível e não visível. No que diz respeito à escala constituída por 5 categorias,  $K=0,97$ , com 95% CI= 0,95 – 0,99. Relativamente ao segundo investigador a observar as reacções, para a escala binária obteve um valor de K de 0,79, e um intervalo de confiança de 0,59-0,99, e para a escala de 5 níveis um valor de  $K=0,93$  (95% CI= 0,86 – 0,998). Mais uma vez, a escolha dos valores ponderados se prende com o mesmo motivo. Assim sendo, pode afirmar-se que o erro intraobservador, englobando os dois observadores, tem uma assertividade média mínima de 79% e máxima de 97%, sendo, nos dois casos, superior na escala de 5 níveis relativamente à escala binária.



# 5. Discussão

---



## 5. Discussão

---

Como referido na introdução, a estimativa do intervalo *postmortem* de restos humanos esqueletizados tem constituído um dos maiores desafios da antropologia forense (Ramsthaler *et al.*, 2011). Como se encontra descrito no capítulo 1 em maior detalhe, muitos são os métodos usados para esta determinação, desde estudos de decomposição cadavérica e alterações morfológicas, à entomologia e botânica forense, passando por técnicas mais recentes, ligadas à imunologia e à química. Apesar dos constantes esforços nesse sentido, é imperativo, nos dias de hoje, o desenvolvimento de uma metodologia rápida e pouco dispendiosa que possa distinguir ossadas com pertinência forense de outras com interesse arqueológico (Creamer e Buck, 2009).

Com o objectivo de obter métodos adicionais para a estimativa do PMI de restos esqueletizados, uma amostra constituída por 51 indivíduos de ambos os sexos e diferentes idades, sem patologia óssea conhecida, foi testada para reconhecer, ou excluir, a capacidade da aplicação de luminol na datação do tempo decorrido após a morte, assim como para examinar o nível de subjectividade desta técnica. Esta hipótese baseia-se no conhecimento pré-existente da afinidade deste reagente pelo ferro, presente na hemina das moléculas de hemoglobina. Com este fundamento como base, esta experiência propôs-se a relacionar a intensidade de quimioluminescência com a degradação de hemoglobina nos ossos, ao longo do tempo.

Como já foi focado anteriormente, a elaboração desta dissertação sofreu diversos constrangimentos respeitantes à realização da parte prática, tanto no que toca à construção da amostra, como à escassez de simplificação logística. A presente investigação é inédita para a realidade portuguesa, não sendo conhecidos, até ao momento, outros estudos sistemáticos sobre o assunto.

Estudos prévios, que investigaram a viabilidade da aplicação de luminol em osso seco, reduzido a pó, na determinação do tempo decorrido após a morte, concluíram que, por si só, este método seria capaz de excluir material ósseo com PMI superior a 80

anos, afirmando que após este período não existiriam vestígios de quimioluminescência (Ramsthaler *et al.*, 2009). Este facto não pode ser apoiado nesta dissertação, uma vez que amostra é constituída por indivíduos com uma estimativa de tempo decorrido após a morte bastante inferior, adaptada à realidade da legislação portuguesa.

Desta forma, o primeiro ponto a ser discutido prende-se com a falta de indivíduos com PMI superior, que teria sido vantajoso, não só para uma maior dispersão da mesma, como para uma melhor análise no que respeita à distinção entre restos esqueletizados com interesse médico-legal e ossadas com interesse meramente arqueológico, um dos objectivos deste trabalho.

Neste conjunto de indivíduos, constavam apenas 2 com PMI superior a 15 anos, prazo legal para a prescrição criminal em Portugal. Para todas as diferentes abordagens aplicadas, os dois ossos utilizados deram resultados positivos, embora fracos, para a quimioluminescência, o que vai contra os resultados esperados, originando uma percentagem de falsos positivos de 100%. Esta situação poderá resultar do facto dos dois indivíduos em questão, um deles proveniente da CEI-XXI e o outro do serviço de Antropologia do INMLCF-DS, terem sido contaminados, antes da sua recolha ou durante o seu período de inumação e armazenamento, com algum composto que cumpra a função de catalisador, nesta técnica ocupada pelo ferro da hemoglobina, reagindo com o luminol. Uma outra explicação poderá estar relacionada, como refere a literatura, à circunstância dos resultados negativos aumentarem, exponencialmente, apenas 25 anos após a morte (Introna *et al.*, 1999). De acordo com estes resultados, exclui-se a possibilidade de distinção entre restos esqueletizados com pertinência forense e não forense, usando apenas este método, pelo menos no caso português. No entanto, a sua utilidade não é excluída como teste de presunção, já que a percentagem de falsos negativos é bem menor, cerca de 22 a 25%, indo de encontro com a literatura já existente. De facto, o cálculo do LR=18 (likelihood ratio) permite concluir que, um resultado de quimioluminescência positiva é aproximadamente dezoito vezes mais provável de ocorrer para ossos recentes do que para ossos com PMI superior a 15 anos. Neste caso, a grande maioria dos falsos negativos resultaram da aplicação de luminol nas amostras de autópsia provenientes do INMLCF-DS, onde se

esperavam resultados fortemente positivos, devido à origem recente dos ossos. Estes resultados poderão ser explicados por alguma falha, possivelmente relacionada com as alterações de temperatura durante o seu processo de congelação, maceração ou na moagem dos mesmos, que levou à degradação da hemoglobina.

Em Portugal, o ideal seria repetir o experimento com uma amostra com intervalos de PMI mais espaçados, assim como com maior número de indivíduos com tempo decorrido após a morte superior a 15 anos. Noutras realidades, com tempos de prescrição superiores, poderá ser de grande proveito a investigação desta metodologia.

No geral, as diferenças entre os resultados esperados e os obtidos poderão dever-se a inúmeros factores, como a diferença de tratamento entre os ossos provenientes de autópsia e os que já se encontravam esqueletizados, e, no caso destes últimos, às suas condições desconhecidas de inumação e armazenamento.

Por fim, este estudo não contou com a ajuda de meios técnicos, como captura de imagem digital e a sua análise, como os estudos de Introna *et al.* (1999) e Creamer e Buck (2009), que traria resultados mais precisos e menos subjectivos em termos de medições de quimioluminescência.

Essa subjectividade foi controlada através do cálculo do erro inter e intraobservador, com recurso ao teste Kappa, esclarecido no capítulo 4. Os resultados da estatística de K, com valores sempre superiores a 0,79, revelaram confiança inter e intraobservador no teste de aplicação de luminol, como teste presuntivo.



# 6. Conclusão

---



## 6. Conclusão

---

A aplicação do princípio da afinidade do luminol para a hemoglobina em decomposição nos restos esqueletizados, guiou esta investigação, que tinha como objectivos estabelecer um paralelo entre este pressuposto e a estimativa do intervalo *postmortem*, testar a sua utilidade na distinção entre ossos com interesse forense e sem interesse médico-legal e, por fim, apurar a sua subjectividade inerente.

Confirmou-se o carácter económico, fácil e reproduzível deste protocolo, descartando-se, no entanto, como um procedimento preciso pelas razões apresentadas abaixo.

O presente estudo demonstrou que a aplicação de luminol origina resultados com interesse, quando dirigida ao material ósseo. A sua percentagem de falsos negativos que ronda os 22 a 25%, que se revê nas anteriores publicações da literatura, os seus “fortes positivos”, assim como os “muito fracos positivos” que coincidem com os resultados esperados, e a sua subjectividade mínima, sustentam a prática deste método como teste de presunção, sendo necessária a confirmação posterior com outro tipo de metodologias. Embora este teste ainda se encontre numa fase de construção, e necessite de ajustes, a sua utilização apresenta-se bastante apelativa já que oferece uma metodologia rápida, repetível, simples, com recurso a pequenas quantidades de material, e pouco dispendiosa, com resultados disponíveis pouco tempo depois da recolha dos restos humanos. O facto de ter como base, técnicas e critérios bem estabelecidos funciona também como uma vantagem. Poderá ser útil, sobretudo, em casos onde são recolhidos restos ósseos fragmentados.

A percentagem total de falsos positivos impede, porém, que seja empregue como diferenciador entre restos esqueletizados com pertinência forense (mais de 15 anos) e interesse arqueológico, na realidade portuguesa. Esta situação corresponde, provavelmente, ao facto da maior percentagem de perda de hemoglobina, que reage com o luminol, acontecer apenas 25 após a morte (Introna *et al.*, 1999), sendo que os indivíduos com maior PMI da amostra rondavam os 19-20 anos.

Quanto ao grau de subjectividade, esta seria facilmente eliminada recorrendo a procedimentos de análise de imagem, como Introna *et al.* (1999). Este processo

permitiria quantificar a intensidade e distribuição do fenómeno de quimioluminescência. Contudo, o cálculo do erro intra e interobservador revela uma subjectividade mínima, tanto entre observadores, como entre réplicas, apresentando intervalos de confiança a 95% sempre compreendidos entre valores mínimos de 72% e máximos de 100%. É, portanto, confiável dispensar análises mais dispendiosas, confirmando, no entanto, que seria interessante a sua utilização numa perspectiva futura.

Mencionadas perspectivas futuras, o estudo de uma amostra de maiores dimensões, com intervalos de PMI mais espaçados, e com indivíduos com tempos decorridos desde a morte superiores seria de imenso valor para confirmar, ou excluir, os resultados de falsos positivos obtidos.

Para concluir, o diagnóstico de um intervalo *postmortem* confiável não irá apenas precisar sempre de um exame antropológico completo dos restos esqueletizados, como também de uma avaliação crítica das características morfológicas, condições ambientais envolventes e achados histológicos (Ramsthaler *et al.*, 2009).



# 7. Bibliografia

---



## 7. Bibliografia

---

### A.

American Board of Forensic Anthropology <http://www.theabfa.org/>. Last accessed 2015/03/09.

### B.

Barnett N, Francis P. (2005) Chemiluminescence: liquid-phase. Encyclopedia of analytical science. London, Elsevier Academic Press.

Barni F, *et al.* (2007) Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, 72: 896-913.

### C.

Cappella A, Gibelli D, *et al.* (2015) The comparative performance of PMI estimation in skeletal remains by three methods (C-14, luminol test and OHI): analysis of 20 cases. *International Journal of Legal Medicine*, 1-10.

Cardoso H, Santos A, *et al.* (2010) Establishing a minimum postmortem interval of human remains in an advanced state of skeletonization using the growth rate of bryophytes and plant roots. *International Journal of Legal Medicine*, 124 (5): 451-456.

Carter DO, Tibbett M. (2008) Cadaver decomposition and soil: processes. In Tibbett M, Carter DO. (eds) *Soil analysis in forensic taphonomy. Chemical and biological effects of buried human remains*. Boca Raton, CRC Press: 29-52.

Castellano M, *et al.* (1984) Estimating the date of bone remains: a multivariate study. *Journal of forensic sciences*, 34: 1196-1205.

Castro CP, Arnaldos M, *et al.* (2011) Preliminary study on a community of sarcosaprophagous Diptera in Central Portugal. *Entomol Gener*, 33 (3): 183-198.

Cattaneo C, Gibelli D. (2009). *Postmortem Interval: Anthropology*. Wiley Encyclopedia of Forensic Science.

Coyle HM, Lee CL, *et al.* (2005) Forensic Botany: Using Plant Evidence to Aid in Forensic Death Investigation. *Croat Med*, 46 (4): 606-612.

Coyle HM. (2004) Introduction to Forensic Botany. In Coyle HM (eds) *Forensic Botany: principles and applications to criminal casework*. Boca Raton, CRC Press: 1-9.

Creamer J, Buck A. (2009) The assaying of haemoglobin using luminol chemiluminescence and its application to the dating of human skeletal remains. *Luminescence: The journal of Biological and Chemical Luminescence*, 24: 311-316.

Creamer J, *et al.* (2003) A comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol teste for blood. *Luminescence*, 18: 193-198.

Creamer J, *et al.* (2005) Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic luminol test. *Luminescence*, 20: 411-413.

Cunha E, Cattaneo C. (2006) Forensic anthropology and forensic pathology: the state of art. In Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J (eds) *Forensic anthropology and medicine. Complementary sciences from recovery to cause of death*. Totowa, Humana Press Inc: 39-56.

Cunha E, Pinheiro J. (2006) A linguagem das fracturas: a perspectiva da antropologia forense. *Antropologia Portuguesa*, 22/23: 223-243.

Cunha E, Pinheiro J. (2007) Forensic Anthropology in Portugal: from current practice to future challenges. In Brickley MB, Ferllini R. (eds) *Forensic Anthropology. Case studies from Europe*. Springfield, C.C. Thomas: 38-57.

Cunha E, Wasterlain S. (2007) The Coimbra identified osteological collections. In Grupe G, Peters J. (eds) *Skeletal series and their socio-economic context*. Rahden, Verlag Marie Leidorf: 23-24.

Cunha E. (2008) Contribución para el conocimiento del desarrollo actual de la Antropología Forense en Portugal. *Cuad Med Forense*, 14 (53-54): 201-211.

Cunha E. (2010) Some reflections on the popularity of forensic anthropology today. *Bull. Mém. Soc. Anthropol.*, 22: 190-193.

Cunha E. (2014) A antropologia forense passo a passo. In Gomes A. (eds) *Enfermagem Forense*. Lisboa, Lidel: 280-288.

Curate F. (2011) O Perímetro do Declínio: osteoporose e fracturas de fragilidade em três amostras osteológicas identificadas portuguesas – século XIX & XX. Tese de Doutoramento em Antropologia Biológica apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

## **D.**

Dicionário da Língua Portuguesa sem Acordo Ortográfico. Porto: Porto Editora, 2003-2015. Last accessed 2015/02/10.

DiMaio VJ, DiMaio D. (2001) Time of dead. *Forensic Pathology*. Boca Raton, CRC Press: 21-42.

Dirkmaat DC, Cabo L, *et al.* (2009) New perspectives in forensic anthropology. *Yrbk Phys Anthropol*, 52: 33-52.

Domènech M, García J, *et al.* (2011) Antropología forense como técnica complementaria en patologia forense. A propósito de un caso. *Cuad Med Forense*, 17(4): 203-205.

Donaldson A, Lamont I. (2014) Estimation of post-mortem interval using biochemical markers. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 1: 8-26.

Duday H, Guillon M. (2006) Understanding the circumstances of decomposition when the body is skeletonized. In Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J. (eds) *Forensic anthropology and medicine. Complementary sciences from recovery to cause of death*. Totowa, Humana Press Inc: 117-157.

Dupras T, Schultz J, *et al.* (2006) An Introduction to Forensic Anthropology and Forensic Archaeology. In Dupras T, Schultz J, *et al.* (eds) *Forensic Recovery of Human Remains*. Boca Raton, CRC Press: 1-11.

## **E.**

Eckert W. (1997) Introduction to forensic sciences. Boca Raton, CRC Press: 1-10.

Etxeberría F.G. (2004) Panorama organizativo sobre Antropología y Patología Forense en España. Algunas propuestas para el estudio de fosas con restos humanos de la Guerra Civil española de 1936. [http://www.sc.ehu.es/scrwwsr/MedicinaLegal/\\_private/AnPat.htm](http://www.sc.ehu.es/scrwwsr/MedicinaLegal/_private/AnPat.htm).

## **F.**

Facchini F, Pettener D. (1977) Chemical and physical methods in dating human skeletal remains. *American journal of physical anthropology*, 47: 65-70.

Ferreira MT, Cunha E. (2013) Can we infer post mortem interval on the basis of decomposition rate? A case from a Portuguese cemetery. *Forensic Science International*, 226: 298.e1-298.e6.

Ferreira MT, *et al.* (2014) A new forensic collection housed at the University of Coimbra, Portugal: the 21st century identified skeletal collection. *Forensic Science International*, 245: 202.e1-202.e5.

Ferreira MT. (2012) Para lá da morte: estudo tafonómico da decomposição cadavérica e da degradação óssea e implicações na estimativa do intervalo pós-morte. Tese de Doutoramento em Antropologia Forense apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Forbes S. (2004) Time since death: a novel approach to dating skeletal remains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 36: 67-72.

Forbes SL, Nugent K. (2009) Dating of anthropological skeletal remains of forensic interest. In Blau S, Ubelaker D. (eds) *Handbook of forensic anthropology and archaeology*. Walnut Creek, Left Coast Press: 164-173.

## **G.**

García-Rojo A, Honorato L, *et al.* (2009) Determinación del intervalo post-mortem mediante el estudio de la sucesión de insectos en dos cadáveres hallados en el interior de una finca rústica en Madrid. *Cuad Med Forense*, 15 (56): 137-145.

Gimeno F, Rini G. (1989) Fill flash photo luminescence to photograph luminol blood stain patterns. *Journal of Forensic Identification*, 39 (3): 149-156.

Gimeno F. (1989) Fill flash color photography to photograph luminol bloodstain patterns. *Journal of Forensic Identification*, 39 (5): 305-306.

Greenberg B, Kunich JC. (2002) *Entomology and the law: flies as forensic indicators.* Cambridge, University Press.

#### **I.**

Introna F, Di Vella G, Campobasso C. (1999) Determination of postmortem interval from old skeletal remains by image analysis of luminol test results. *J. Forensic Sciences*, 44 (3): 535-538.

Iscan M. (1988) Rise of forensic anthropology. *American Journal of Physical Anthropology*, 31: 203-229.

Iscan M. (2005) Forensic anthropology of sex and body size. *Forensic Science International*, 147 (2-3): 107-112.

#### **J.**

Jaffe A. (1983) *Guide to Pathological Evidence: For Lawyers and Police Officers.* Toronto, Carswell Criminal Law Series, Carswell Ltd.

#### **K.**

Knight B. (1996) *Forensic Pathology.* New York, Oxford University Press.

Koolman J, Roehm K. (2005) *Color atlas of biochemistry.* New York, Thieme.

#### **L.**

Ladd C, Lee H. (2004) The use of biological and botanical evidence in criminal investigations. In Coyle HM (eds) *Forensic Botany: principles and applications to criminal casework*. Boca Raton, CRC Press: 1-9.

## **M.**

Marhoff S, *et al.* (2015) Estimating post-mortem interval using accumulated degree-days and a degree of decomposition index in Australia: a validation study. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 10-12.

## **P.**

Pinheiro J, Cunha E. (2006) Forensic investigation of corpses in various states of decomposition. A multidisciplinary approach. In Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J (eds) *Forensic anthropology and medicine. Complementary sciences from recovery to cause of death*. Totowa, Humana Press Inc: 159-195.

Procuradoria-Geral Distrital de Lisboa, Ministério Público  
[http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei\\_mostra\\_articulado.php?artigo\\_id=109A0118&nid=109&tabela=leis&pagina=1&ficha=1&nversao=#artigo](http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?artigo_id=109A0118&nid=109&tabela=leis&pagina=1&ficha=1&nversao=#artigo). Last accessed 2015/04/17.

## **Q.**

Quickenden T, Cooper P. (2001) Increasing the specificity of the forensic luminol test for blood. *Luminescence*, 16: 251-253.

Quickenden T, Creamer J. (2001) A study of common interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*, 16: 295-298.

## **R.**

Ramsthaler F, Ebach S, *et al.* (2011) Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI®, and Combur® tests. *Forensic Science International*, 209: 59-63.

Ramsthaler F, Kreutz K, *et al.* (2009) Dating skeletal remains with luminol-chemiluminescence. Validity, intra- and interobserver error. *Forensic Science International*, 187: 47-50.

## **S.**

Sachs J. (2001) *Corpse: nature, forensic, and the struggle to pinpoint time of death.* New York, Basic Books.

Sim J, Wright C. (2005) The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation and sample size requirements. *Journal of the American Physical Therapy Association*, 85: 257-268.

## **U.**

Ubelaker D, Buchholz B, Stewart J. (2006) Analysis of the artificial radiocarbon in different skeletal and dental tissue types to evaluate date of death. *J Forensic Science*, 51 (3): 484-488.

Ubelaker D, Parra R. (2011) Radiocarbon analysis of dental enamel and bone to evaluate date of birth and death: perspective from the southern hemisphere. *J Forensic Science*, 208(1-3):103-7.

Ubelaker D. (2006) Introduction of forensic anthropology. In Schmitt A, Cunha E, Pinheiro J (eds) *Forensic anthropology and medicine. Complementary sciences from recovery to cause of death.* Totowa, Humana Press Inc: 3-12.

Ubelaker D. (2008) *Forensic Anthropology: Methodology and Diversity of Applications.* In Katzenber M, Saunders S. (eds) *Biological Anthropology of the human skeleton.* New Jersey, John Wiley & sons, Inc: 41-70.

Ubelaker D. (2014) Radiocarbon analysis of human remains: a review of forensic applications. *J Forensic Science*, 59(6):1466-1472.

## **V.**

Verhoff M, Kreutz K. (2005) Macroscopic findings on soil-embedded remains allowing the exclusion of a forensically relevant lay time. In Tsokos M. (eds) Forensic pathology reviews. Totowa, Humana Press: 239-252.

## **W.**

Webb J, Creamer J, Quickenden T. (2006) A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescence forensic techniques. *Luminescence*, 21: 214-220.

Wilson-Taylor R. (2013) Time since death estimation and bone weathering. In Tersigni-Tarrant MT, Shirley N (eds) *Forensic Anthropology: an introduction*. Boca Raton, CRC Press: 339-376.



# 8. Apêndices e Anexos

---



## 8. Apêndices e anexos

### 8.1. Listagens de registros dos indivíduos

#### 8.1.1 Lista de registros dos indivíduos provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC

**Tabela 8.1**– Lista de registros dos indivíduos provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC

Nº Processo	Data da Morte	PMI (23.07.2014)	Lateralidade	Sexo	Idade
2013/229/CR	05/12/2013	7 meses; 2 semanas; 4 dias (230 dias)	Direita	Feminino	78
2013/230/CR	06/12/2013	7 meses; 2 semanas; 4 dias (230 dias)	Direita	Masculino	83
2013/231/CR	10/12/2013	7 meses; 1 semana; 6 dias (225 dias)	Direita	Feminino	64
2013/234/CR-P-TF	09/12/2013	7 meses; 2 semanas (226 dias)	Direita	Masculino	78
2013/235/CR-P-TF	09/12/2013	7 meses; 2 semanas (226 dias)	Direita	Masculino	74
2013/236/CR	10/12/2013	7 meses; 1 semana; 6 dias (225 dias)	Direita	Feminino	68
2013/248/CR	27/12/2013	6 meses; 3 semanas; 5 dias (208 dias)	Direita	Masculino	52
2013/250/CR-P-TF	30/12/2013	6 meses; 3 semanas; 2 dias (205 dias)	Direita	Masculino	67

### 8.1.2 Lista de registos dos indivíduos provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS

**Tabela 8.2-** Lista de registos dos indivíduos provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS

<b>Nº Processo</b>	<b>Data da Morte</b>	<b>PMI (23.07.2014)</b>	<b>Lateralidade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>
<b>2013/1068 LX-P-TF</b>	12-11-2013	8 meses; 1 semana; 4 dias (253 dias)	Direita	Feminino	86
<b>2013/1069 LX-P-TF</b>	12-11-2013	8 meses; 1 semana; 4 dias (253 dias)	Esquerda	Masculino	42
<b>2013/001081 LX-P-TF</b>	16-11-2013	8 meses; 1 semana (249 dias)	Esquerda	Masculino	61
<b>2013/001082 LX-P-TF</b>	17-11-2013	8 meses; 6 dias (248 dias)	Esquerda	Masculino	37
<b>2013/1103 LX-P-TF</b>	26-11-2013	7 meses; 3 semanas; 6 dias (230 dias)	Esquerda	Masculino	56
<b>2013/001150 LX-P-TF</b>	11-12-2013	7 meses; 1 semana; 5 dias (224 dias)	Esquerda	Masculino	20
<b>2013/001170 LX-P-TF</b>	15-12-2013	7 meses; 1 semana; 1 dia (220 dias)	Esquerda	Masculino	73
<b>2013/1174 LX-P-TF</b>	15-12-2013	7 meses; 1 semana; 1 dia (220 dias)	Esquerda	Masculino	64
<b>2013/1179 LX-P-TF</b>	16-12-2013	7 meses; 1 semana; (219 dias)	Esquerda	Masculino	48
<b>2014/000083 LX-P-TF</b>	26-01-2014	5 meses; 3 semanas; 6 dias (178 dias)	Esquerda	Masculino	55
<b>2014/000089 LX-P-TF</b>	28-01-2014	5 meses; 3 semanas; 4 dias (176 dias)	Esquerda	Masculino	33
<b>2014/000090 LX-P-TF</b>	24-01-2014	5 meses; 4 semanas; 1 dia (180 dias)	Esquerda	Masculino	71

### 8.1.3 Lista de registos dos indivíduos provenientes da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI”

Tabela 8.3 - Lista de registos dos indivíduos provenientes da “Colecção de Esqueletos Identificados do séc. XXI”

Nº Processo	Data da Morte	PMI	Lateralidade	Sexo	Idade
4	03-01-2001	13 anos; 6 meses; 2 semanas; 6 dias (4949 dias)	Direita	Feminino	76
7	02/02/2001	13 anos; 5 meses; 3 semanas (4919 dias)	Esquerda	Feminino	86
9	08/02/2001	13 anos; 5 meses; 2 semanas; 1 dia (4913 dias)	Direita	Masculino	88
10	10/02/2001	13 anos; 5 meses; 1 semana; 6 dias (4911 dias)	Direita	Feminino	68
12	12/03/2001	13 anos; 4 meses; 1 semana; 4 dias (4881 dias)	Direita	Masculino	76
21	05/03/2001	13 anos; 4 meses; 2 semanas; 4 dias (4888 dias)	Direita	Masculino	84
45	05/04/2000	14 anos; 3 meses; 2 semanas; 4 dias (5222 dias)	Esquerda	Feminino	84
52	23/01/2000	14 anos; 6 meses (5295 dias)	Direita	Feminino	85
54	08/01/2001	13 anos; 6 meses; 2 semanas; 1 dia (4944 dias)	Esquerda	Feminino	97
55	15/02/2001	13 anos; 5 meses; 1 semana; 1 dia (4906 dias)	Esquerda	Feminino	87
56	04/11/2000	13 anos; 8 meses; 2 semanas; 5 dias (5009 dias)	Esquerda	Feminino	87
68	10/07/2000	14 anos; 1 semana; 6 dias (5126 dias)	Direita	Feminino	89
72	14/11/2000	13 anos; 8 meses; 1 semana; 2 dias (4999 dias)	Direita	Masculino	81
74	13/01/1995	19 anos; 6 meses; 1 semana; 3 dias (7131 dias)	Direita	Masculino	43
75	01/08/2000	13 anos; 11 meses; 3 semanas; 1 dia (5104 dias)	Esquerda	Feminino	86
85	07/04/2000	14 anos; 3 meses; 2 semanas; 2 dias (5220 dias)	Esquerda	Feminino	89

### 8.1.4 Lista de registos dos indivíduos provenientes do laboratório de Antropologia Forense do INMLCF-DS

**Tabela 8.4** - Lista de registos dos indivíduos provenientes do Laboratório de Antropologia Forense do INMLCF-DS

Nº Processo	Data da Morte	PMI	Lateralidade	Sexo	Idade
<b>1530/2000</b>	-	PMI < 20	Esquerda	-	-
<b>Amadora 0704 (31.03.2006)</b>	Entre Dezembro de 2001 e Janeiro de 2002	PMI aproximado: 12.5 anos	Direita	Masculino	77
<b>Amadora 0707 (27.03.2006)</b>	Entre Dezembro de 2001 e Janeiro de 2002	PMI aproximado: 12.5 anos	Esquerda	Masculino	98
<b>Amadora 0709 (27.03.2006)</b>	Entre Dezembro de 2001 e Janeiro de 2002	PMI aproximado: 12.5 anos	Esquerda	Masculino	50
<b>Amadora 0713 (28.03.2006)</b>	Entre Dezembro de 2001 e Janeiro de 2002	PMI aproximado: 12.5 anos	Direita	Masculino	72
<b>Amadora 0714 (28.03.2006)</b>	01.01.2002	PMI aproximado: 12.5 anos	Esquerda	Masculino	82
<b>Amadora 0716 (27.03.2006)</b>	Entre Dezembro de 2001 e Janeiro de 2002	PMI aproximado: 12.5 anos	Direita	Feminino	84
<b>Amadora 722/2006 (28.03.2006)</b>	Entre Dezembro de 2001 e Janeiro de 2002	PMI aproximado: 12.5 anos	Esquerda	Masculino	74
<b>2010-006</b>	-	PMI provável: 7 anos	Esquerda	-	-
<b>2010-011</b>	-	PMI provável: 5,5 anos	Esquerda	-	-
<b>2011-277</b>	-	PMI > 5 anos	Esquerda	-	-
<b>2011-400</b>	-	PMI > 5 anos	Esquerda	-	-
<b>2011-870</b>	-	PMI > 6 meses	Esquerda	-	-
<b>2012-564</b>	-	PMI provável > 3 e < 12	Direita	-	-
<b>2013-666</b>	-	PMI indefinido	Esquerda	-	-

## 8.2. Listagens de documentação do estado de conservação dos restos esqueléticos utilizados

### 8.2.1 Estado de conservação do material de Antropologia Forense do INMLCF-DS

**Tabela 8.5** - Estado de conservação do material do laboratório de Antropologia Forense do INMLCF-DS

Nº Identificativo	Lateralidade	Comprimento	Largura	Descrição
1530/2000	Esquerda	14,7	2,7	Extremidades destruídas <i>post-mortem</i> , sobretudo a acromial. Não apresenta patologia óssea.
Amadora 0704 (31.03.2006)	Direita	15,3	4	Não apresenta patologia óssea. Extremidade esternal ligeiramente destruída <i>post-mortem</i> .
Amadora 0707 (27.03.2006)	Esquerda	16	3,4	Extremidades ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
Amadora 0709 (27.03.2006)	Esquerda	16,2	3,9	Extremidades ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
Amadora 0713 (28.03.2006)	Direita	15,4	3,8	Extremidades ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
Amadora 0714 (28.03.2006)	Esquerda	13,6	3,4	Extremidades muito ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
Amadora 0716 (27.03.2006)	Direita	15,1	3,9	Extremidade esternal ligeiramente destruída <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
Amadora 722/2006 (28.03.2006)	Esquerda	14,5	3,2	Extremidades ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
2010-006	Esquerda	15	3,3	Extremidades ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
2010-011	Esquerda	15,2	3,4	Extremidades muito ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
2011-277	Esquerda	14,1	3	Extremidades muito ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
2011-400	Esquerda	13,9	2,5	Extremidades pouco destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
2011-870	Esquerda	14,5	2,9	Extremidades muito ligeiramente destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
2012-564	Direita	9,4	2,1	Corpo com fractura completa <i>post-mortem</i> no terço intermédio, com ausência da extremidade esternal. Não apresenta patologia óssea.
2013-666	Esquerda	14,2	2,9	Extremidades destruídas <i>post-mortem</i> , sobretudo a acromial. Não apresenta patologia óssea.

## 8.2.2 Estado de conservação do material da CEI-XXI

**Tabela 8.6** - Estado de conservação do material da CEI-XXI

Nº Identificativo	Lateralidade	Comprimento	Largura	Descrição
4	Direita	9,6 cm	2,4 cm	Corpo com fractura completa <i>post-mortem</i> no terço intermédio, estando a extremidade esternal ausente. Extremidade acromial com destruição <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
7	Esquerda	11,7 cm	2,6 cm	Corpo com fractura completa <i>post-mortem</i> no terço lateral, com ausência da extremidade acromial. Não apresenta patologia óssea.
9	Direita	10,9 cm	3,7 cm	Corpo com fractura completa <i>post-mortem</i> no terço intermédio, estando a extremidade esternal ausente. Extremidade acromial com destruição <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
10	Direita	Ext. Esternal: 5,2 cm Ext. Acromial: 6,0 cm	Ext. Esternal: 2,4 cm Ext. Acromial: 2,9 cm	Extremidades esternal e acromial destruídas e fracturadas <i>post-mortem</i> no terço medial e lateral do corpo respectivamente. Não apresenta patologia óssea.
12	Direita	11,3 cm	2,5 cm	Extremidades destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
21	Direita	15,6 cm	2,8 cm	Extremidades destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
45	Esquerda	13,1 cm	2,9 cm	Extremidade acromial destruída <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
52	Direita	12,3 cm	2,8 cm	Extremidades destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
	Esquerda	5,3 cm	2,7 cm	Corpo com fractura completa <i>post-mortem</i> no terço lateral, com ausência do terço intermédio e da extremidade esternal. Não apresenta patologia óssea.
54	Esquerda	7 cm	1,8 cm	Terço intermédio fracturado <i>post-mortem</i> lateral e medialmente, estando ausente o restante corpo da clavícula assim como as extremidades. Não apresenta patologia óssea.
55	Esquerda	10,8 cm	3,2 cm	Terço intermédio fracturado <i>post-mortem</i> , não estando presente o terço medial, assim como a extremidade esternal. Não apresenta patologia óssea.
56	Esquerda	11,5 cm	2,3 cm	Corpo com fractura completa <i>post-mortem</i> no terço intermédio, com ausência da extremidade esternal. Não apresenta patologia óssea.
68	Direita	11,4 cm	3,2 cm	Terço intermédio fracturado <i>post-mortem</i> , estando ausente a extremidade esternal. Não apresenta patologia óssea.
72	Direita	9,3 cm	2,6 cm	Terço lateral do corpo fracturado <i>post-mortem</i> , com ausência da extremidade acromial. Não apresenta patologia óssea.
74	Direita	6,5 cm	3,1 cm	Extremidade acromial fracturada <i>post-mortem</i> , estando o corpo e a extremidade esternal ausentes. Não apresenta patologia óssea.
75	Esquerda	14,4 cm	3 cm	Extremidades destruídas <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.
85	Esquerda	14,4 cm	3,2 cm	Extremidade esternal destruída <i>post-mortem</i> . Não apresenta patologia óssea.

## 8. 3 – Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol

### 8.3.1 - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC

#### 8.3.1.1 – Observador 1

**Tabela 8.7** - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC - Observador 1

Nº Processo	PMI	Data da Morte	1ª Abordagem		2ª Abordagem					
			Visível	Não Visível	Negativo	Muito Fraco positivo	Fraco positivo	Positivo	Forte Positivo	
2013/229/C R	1	7 meses; 2 semanas; 4 dias (230 dias)	05/12/2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/230/C R	1	7 meses; 2 semanas; 4 dias (230 dias)	05/12/2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/231/C R	1	7 meses; 1 semana; 6 dias (225 dias)	10/12/2013	x						x
	2			x						x
	3			x						x
2013/234/C R-P-TF	1	7 meses; 2 semanas (226 dias)	09/12/2013		x	x				
	2			x			x			
	3			x			x			
2013/235/C R-P-TF	1	7 meses; 2 semanas (226 dias)	09/12/2013	x						x
	2			x						x
	3			x						x
2013/248/C R	1	6 meses; 3 semanas; 5 dias (208 dias)	27/12/2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/250/C R-P-TF	1	6 meses; 3 semanas; 2 dias (205 dias)	30/12/2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/236/C R	1	7 meses; 1 semana; 6 dias (225 dias)	10/12/2013	x						x
	2			x						x
	3			x						x

### 8.3.1.2 – Observador 2

**Tabela 8.8** - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DC - Observador 2

Nº Processo	PMI	Data da Morte	1ª Abordagem		2ª Abordagem					
			Visível	Não Visível	Negativo	Muito Fraco positivo	Fraco positivo	Positivo	Forte Positivo	
2013/229/C R	1	7 meses; 2 semanas; 4 dias (230 dias)	05/12/2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/230/C R	1	7 meses; 2 semanas; 4 dias (230 dias)	05/12/2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/231/C R	1	7 meses; 1 semana; 6 dias (225 dias)	10/12/2013	x						x
	2			x						x
	3			x						x
2013/234/C R-P-TF	1	7 meses; 2 semanas (226 dias)	09/12/2013		x	x				
	2			x			x			
	3			x			x			
2013/235/C R-P-TF	1	7 meses; 2 semanas (226 dias)	09/12/2013	x						x
	2			x						x
	3			x						x
2013/248/C R	1	6 meses; 3 semanas; 5 dias (208 dias)	27/12/2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/250/C R-P-TF	1	6 meses; 3 semanas; 2 dias (205 dias)	30/12/2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/236/C R	1	7 meses; 1 semana; 6 dias (225 dias)	10/12/2013	x						x
	2			x						x
	3			x						x

### 8.3.2 - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS

#### 8.3.2.1 – Observador 1

**Tabela 8.9** - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS - Observador 1

Nº Processo	IPM	Data da Morte	1ª Abordagem		2ª Abordagem					
			Visível	Não Visível	Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo	
2013/1068 LX-P-TF	1	8 meses; 1 semana; 4 dias (253 dias)	12-11-2013		x	x				
	2				x	x				
	3				x	x				
2013/1069 LX-P-TF	1	8 meses; 1 semana; 4 dias (253 dias)	12-11-2013	x					x	
	2			x					x	
	3			x					x	
2013/001081 LX-P-TF	1	8 meses; 1 semana (249 dias)	16-11-2013		x	x				
	2				x	x				
	3				x	x				
2013/001082 LX-P-TF	1	8 meses; 6 dias (248 dias)	17-11-2013		x	x				
	2				x	x				
	3				x	x				
2013/1103 LX-P-TF	1	7 meses; 3 semanas; 6 dias (230 dias)	26-11-2013	x				x		
	2			x			x			
	3			x			x			
2013/001150 LX-P-TF	1	7 meses; 1 semana; 5 dias (224 dias)	11-12-2013	x				x		
	2			x			x			
	3			x			x			
2013/001170 LX-P-TF	1	7 meses; 1 semana; 1 dia (220 dias)	15-12-2013		x	x				
	2				x	x				
	3				x	x				
2013/1174 LX-P-TF	1	7 meses; 1 semana; 1 dia (220 dias)	15-12-2013	x				x		
	2			x				x		
	3			x				x		
2013/1179 LX-P-TF	1	7 meses; 1 semana; (219 dias)	16-12-2013	x				x		
	2			x			x			
	3			x			x			
2014/000083 LX-P-TF	1	5 meses; 3 semanas; 6 dias (178 dias)	26-01-2014		x	x				
	2				x	x				
	3				x	x				
2014/000089 LX-P-TF	1	5 meses; 3 semanas; 4 dias (176 dias)	28-01-2014		x	x				
	2				x	x				
	3				x	x				
2014/000090 LX-P-TF	1	5 meses; 4 semanas; 1 dia (180 dias)	24-01-2014		x	x				
	2				x	x				
	3				x	x				

#### 8.3.2.2 – Observador 2

**Tabela 8.10** - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes de autópsia realizada no INMLCF-DS - Observador 2

Nº Processo	IPM	Data da Morte	1ª Abordagem		2ª Abordagem					
			Visível	Não Visível	Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo	
2013/1068 LX-P-TF	1	8 meses; 1 semana; 4 dias (253 dias)	12-11-2013		X	X				
	2				X	X				
	3				X	X				
2013/1069 LX-P-TF	1	8 meses; 1 semana; 4 dias (253 dias)	12-11-2013	X						X
	2			X						X
	3			X						X
2013/001081 LX-P-TF	1	8 meses; 1 semana (249 dias)	16-11-2013		X	X				
	2				X	X				
	3				X	X				
2013/001082 LX-P-TF	1	8 meses; 6 dias (248 dias)	17-11-2013		X	X				
	2				X	X				
	3				X	X				
2013/1103 LX-P-TF	1	7 meses; 3 semanas; 6 dias (230 dias)	26-11-2013	X					X	
	2			X				X		
	3			X				X		
2013/001150 LX-P-TF	1	7 meses; 1 semana; 5 dias (224 dias)	11-12-2013	X			X			
	2			X			X			
	3			X			X			
2013/001170 LX-P-TF	1	7 meses; 1 semana; 1 dia (220 dias)	15-12-2013							
	2									
	3									
2013/1174 LX-P-TF	1	7 meses; 1 semana; 1 dia (220 dias)	15-12-2013	X			X			
	2			X				X		
	3			X			X			
2013/1179 LX-P-TF	1	7 meses; 1 semana; (219 dias)	16-12-2013	X			X			
	2			X			X			
	3			X			X			
2014/000083 LX-P-TF	1	5 meses; 3 semanas; 6 dias (178 dias)	26-01-2014		X	X				
	2				X	X				
	3				X	X				
2014/000089 LX-P-TF	1	5 meses; 3 semanas; 4 dias (176 dias)	28-01-2014		X	X				
	2				X	X				
	3				X	X				
2014/000090 LX-P-TF	1	5 meses; 4 semanas; 1 dia (180 dias)	24-01-2014		X	X				
	2				X	X				
	3				X	X				

### 8.3.3 - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas amostras provenientes da CEI-XXI

#### 8.3.3.1 – Observador 1

**Tabela 8.11** - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes da CEI-XXI - Observador 1

Nº Processo	IPM	Data da Morte	1ª Abordagem		2ª Abordagem					
			Visível	Não Visível	Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo	
4	1	13 anos; 6 meses; 2 semanas; 6 dias (4949 dias)	03/01/2001	x				x		
	2			x				x		
	3			x				x		
7	1	13 anos; 5 meses; 3 semanas (4919 dias)	02/02/2001	x					x	
	2			x				x		
	3			x					x	
9	1	13 anos; 5 meses; 2 semanas; 1 dia (4913 dias)	08/02/2001	x				x		
	2			x				x		
	3			x				x		
10	1	13 anos; 5 meses; 1 semana; 6 dias (4911 dias)	10/02/2001	x				x		
	2			x				x		
	3			x				x		
12	1	13 anos; 4 meses; 1 semana; 4 dias (4881 dias)	12/03/2001	x					x	
	2			x				x		
	3			x					x	
21	1	13 anos; 4 meses; 2 semanas; 4 dias (4888 dias)	05/03/2001	x					x	
	2			x				x		
	3			x				x		
45	1	14 anos; 3 meses; 2 semanas; 4 dias (5222 dias)	05/04/2000	x			x			
	2			x			x			
	3			x			x			
52	1	14 anos; 6 meses (5295 dias)	23/01/2000	x			x			
	2			x			x			
	3			x				x		
54	1	13 anos; 6 meses; 2 semanas; 1 dia (4944 dias)	08/01/2001	x			x			
	2			x			x			
	3			x				x		
55	1	13 anos; 5 meses; 1 semana; 1 dia (4906 dias)	15/02/2001	x			x			
	2			x			x			
	3			x				x		
56	1	13 anos; 8 meses; 2 semanas; 5 dias (5009 dias)	04/11/2000	x			x			
	2			x			x			
	3			x				x		
68	1	14 anos; 1 semana; 6 dias (5126 dias)	10/07/2000	x			x			
	2			x			x			
	3			x				x		
72	1	13 anos; 8 meses; 1 semana; 2 dias (4999 dias)	14/11/2000	x				x		
	2			x				x		
	3			x				x		
74	1	19 anos; 6 meses; 1 semana; 3 dias (7131 dias)	13/01/1995	x				x		
	2			x				x		
	3			x				x		
75	1	13 anos; 11 meses; 3 semanas; 1 dia (5104 dias)	01/08/2000	x				x		
	2			x			x			
	3			x				x		
85	1	14 anos; 3 meses; 2 semanas; 2 dias (5220 dias)	07/04/2000		x	x				
	2				x	x				
	3			x			x			

### 8.3.3.2 – Observador 2

**Tabela 8.12** - Resultados da observação da intensidade de quimioluminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras provenientes da CEI-XXI - Observador 2

Nº Processo	IPM	Data da Morte	1ª Abordagem		2ª Abordagem					
			Visível	Não Visível	Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo	
4	1	13 anos; 6 meses; 2 semanas; 6 dias (4949 dias)	03/01/2001	x				x		
	2			x				x		
	3			x				x		
7	1	13 anos; 5 meses; 3 semanas (4919 dias)	02/02/2001	x					x	
	2			x				x		
	3			x				x		
9	1	13 anos; 5 meses; 2 semanas; 1 dia (4913 dias)	08/02/2001	x				x		
	2			x			x			
	3			x			x			
10	1	13 anos; 5 meses; 1 semana; 6 dias (4911 dias)	10/02/2001	x				x		
	2			x			x			
	3			x			x			
12	1	13 anos; 4 meses; 1 semana; 4 dias (4881 dias)	12/03/2001	x					x	
	2			x			x			
	3			x				x		
21	1	13 anos; 4 meses; 2 semanas; 4 dias (4888 dias)	05/03/2001	x					x	
	2			x				x		
	3			x			x			
45	1	14 anos; 3 meses; 2 semanas; 4 dias (5222 dias)	05/04/2000	x			x			
	2			x			x			
	3			x			x			
52	1	14 anos; 6 meses (5295 dias)	23/01/2000	x				x		
	2			x			x			
	3			x				x		
54	1	13 anos; 6 meses; 2 semanas; 1 dia (4944 dias)	08/01/2001	x				x		
	2				x	x				
	3				x	x				
55	1	13 anos; 5 meses; 1 semana; 1 dia (4906 dias)	15/02/2001	x			x			
	2			x			x			
	3			x			x			
56	1	13 anos; 8 meses; 2 semanas; 5 dias (5009 dias)	04/11/2000		x	x				
	2				x	x				
	3				x	x				
68	1	14 anos; 1 semana; 6 dias (5126 dias)	10/07/2000	x			x			
	2			x			x			
	3			x			x			
72	1	13 anos; 8 meses; 1 semana; 2 dias (4999 dias)	14/11/2000	x					x	
	2			x				x		
	3			x				x		
74	1	19 anos; 6 meses; 1 semana; 3 dias (7131 dias)	13/01/1995	x					x	
	2			x				x		
	3			x				x		
75	1	13 anos; 11 meses; 3 semanas; 1 dia (5104 dias)	01/08/2000	x					x	
	2			x			x			
	3			x				x		
85	1	14 anos; 3 meses; 2 semanas; 2 dias (5220 dias)	07/04/2000		x	x				
	2				x	x				
	3			x				x		

### 8.3.4 - Resultados da observação da intensidade de luminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras de Antropologia Forense do INMLCF-DS

#### 8.3.4.1 – Observador 1

**Tabela 8.13** - Resultados da observação da intensidade de luminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras de Antropologia Forense do INMLCF-DS - Observador 1

Nº Processo		PMI provável	1ª Abordagem		2ª Abordagem				
			Visível	Não Visível	Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo
1530/2000	1	PMI <20	x				x		
	2		x				x		
	3		x				x		
Amadora 0709 (27.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x			x			
	2		x			x			
	3		x			x			
Amadora 0714 (28.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 722/2006 (28.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 0716 (27.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 0707 (27.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 0713 (28.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 0704 (31.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x				x		
	2		x				x		
	3		x				x		
2010-006	1	IPM provável: 7 anos	x				x		
	2		x				x		
	3		x				x		
2010-011	1	PMI provável: 5,5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
2011-277	1	PMI eventualmente superior a 5 anos		x	x				
	2			x	x				
	3			x	x				
2011-400	1	PMI eventualmente superior a 5 anos.	x					x	
	2		x				x		
	3		x					x	
2011-870	1	PMI > 3,5 anos	x				x		
	2		x				x		
	3		x				x		
2012-564	1	PMI provável > 3 e < 12 anos		x	x				
	2			x	x				
	3			x	x				
2013-666	1	PMI indefinido.		x	x				
	2			x	x				
	3			x	x				

### 8.3.4.2 – Observador 2

**Tabela 8.14** - Resultados da observação da intensidade de luminescência resultante da aplicação de luminol nas subamostras de Antropologia Forense do INMLCF-DS - Observador 2

Nº Processo		PMI provável	1ª Abordagem		2ª Abordagem				
			Visível	Não Visível	Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo
1530/2000	1	PMI <20	x				x		
	2		x				x		
	3		x				x		
Amadora 0709 (27.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x			x			
	2		x			x			
	3		x			x			
Amadora 0714 (28.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 722/2006 (28.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 0716 (27.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 0707 (27.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 0713 (28.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
Amadora 0704 (31.03.2006)	1	PMI aproximado: 12.5 anos	x				x		
	2		x				x		
	3		x				x		
2010-006	1	IPM provável: 7 anos	x				x		
	2		x				x		
	3		x				x		
2010-011	1	PMI provável: 5,5 anos	x					x	
	2		x					x	
	3		x					x	
2011-277	1	PMI eventualmente superior a 5 anos		x	x				
	2			x	x				
	3			x	x				
2011-400	1	PMI eventualmente superior a 5 anos.	x					x	
	2		x				x		
	3		x					x	
2011-870	1	PMI > 3,5 anos	x				x		
	2			x	x				
	3			x	x				
2012-564	1	PMI provável > 3 e < 12 anos		x	x				
	2			x	x				
	3			x	x				
2013-666	1	PMI indefinido.		x	x				
	2			x	x				
	3			x	x				

## 8.4 - Análise do Erro Inter e Intraobservador

### 8.4.1 - Erro Interobservador

#### 8.4.1.1 - Erro Interobservador referente à primeira abordagem – visível e não visível

**Tabela 8.15** - Erro Interobservador referente à primeira abordagem – visível e não visível

		Observador 1		Totais
		Visível	Não Visível	
Observador 2	Visível	113	0	113
	Não Visível	7	30	37
Totais		120	30	150

#### 8.4.1.2 - Erro Interobservador referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis

**Tabela 8.16** - Erro Interobservador referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis

		Observador 1					Totais
		Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo	
Observador 2	Negativo	30	5	2	0	0	37
	Muito Fraco Positivo	0	14	8	0	0	22
	Fraco Positivo	0	6	25	0	0	31
	Positivo	0	0	9	42	0	51
	Forte Positivo	0	0	0	0	9	9
Totais		30	25	44	42	9	150

## 8.4.2- Erro Intraobservador

### 8.4.2.1 - Erro Intraobservador do observador 1, referente à primeira abordagem – visível e não visível

**Tabela 8.17** - Erro Intraobservador do observador 1, referente à primeira abordagem – visível e não visível

		Réplica 1		Totais
		Visível	Não Visível	
Réplica 2	Visível	10	0	10
	Não Visível	2	39	41
Totais		12	39	51

### 8.4.2.2 - Erro Intraobservador do observador 1, referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis

**Tabela 8.18** - Erro Intraobservador do observador 1, referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis

		Réplica 1					Totais
		Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo	
Réplica 2	Negativo	10	0	0	0	0	10
	Muito Fraco Positivo	2	6	1	0	0	9
	Fraco Positivo	0	1	12	3	0	16
	Positivo	0	0	1	12	0	13
	Forte Positivo	0	0	0	0	3	3
Totais		12	7	14	15	3	51

**8.4.2.3 - Erro Intraobservador do observador 2, referente à primeira abordagem – visível e não visível**

**Tabela 8.19** - Erro Intraobservador do observador 2, referente à primeira abordagem – visível e não visível

		Réplica 1		Totais
		Visível	Não Visível	
Réplica 2	Visível	10	2	12
	Não Visível	2	36	38
Totais		12	38	50

**8.4.2.4 - Erro Intraobservador do observador 2, referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis**

**Tabela 8.20** - Erro Intraobservador do observador 2, referente à segunda abordagem – escala de 5 níveis

		Réplica 1					Totais
		Negativo	Muito Fraco Positivo	Fraco Positivo	Positivo	Forte Positivo	
Réplica 2	Negativo	10	0	2	0	0	12
	Muito Fraco Positivo	1	6	0	0	0	7
	Fraco Positivo	1	1	8	3	0	13
	Positivo	0	0	1	14	0	15
	Forte Positivo	0	0	0	0	3	3
Totais		12	7	11	17	3	50

## 8.5 – Tabelas de Resultados

### 8.5.1 – Erro Inter e intraobservador

#### 8.5.1.1 – Erro Interobservador

**Tabela 8.21-** Cohen’s Kappa Analysis, Observer 1 vs. Observer 2, Binary Scale

	Lower	Estimate	Upper
Unweighted kappa	0.7252678	0.8311233	0.9369789
Weighted kappa	0.7252678	0.8311233	0.9369789

**Tabela 8.22-** Cohen’s Kappa Analysis, Observer 1 vs. Observer 2, 5-levels Scale

	Lower	Estimate	Upper
Unweighted kappa	0.6962548	0.7743447	0.8524347
Weighted kappa	0.9004572	0.9322742	0.9640912

#### 8.5.1.2 – Erro Intraobservador

**Tabela 8.23 -** Cohen’s Kappa Analysis, Observer 1 , Sample 1 vs Sample 2, Binary Scale

	Lower	Estimate	Upper
Unweighted kappa	0.7268963	0.8837209	1
Weighted kappa	0.7268963	0.8837209	1

**Tabela 8.24 -** Cohen’s Kappa Analysis, Observer 1 , Sample 1 vs Sample 2, 5-levels Scale

	Lower	Estimate	Upper
Unweighted kappa	0.7966278	0.8948475	0.9930672
Weighted kappa	0.9456396	0.9726177	0.9995959

**Tabela 8.25** - Cohen's Kappa Analysis, Observer 2 , Sample 1 vs Sample 2, Binary Scale

	Lower	Estimate	Upper
Unweighted kappa	0.5977413	0.7920998	0.9864583
Weighted kappa	0.5977413	0.7920998	0.9864583

**Tabela 8.26**- Cohen's Kappa Analysis, Observer 2 , Sample 1 vs Sample 2, 5-levels Scale

	Lower	Estimate	Upper
Unweighted kappa	0.7231839	0.8411858	0.9591877
Weighted kappa	0.8598269	0.9288931	0.9979593

### 8.5.2- Reacção do Luminol

**Tabela 8.27**– Divisão da amostra por grupos de acordo com o tempo decorrido desde a morte.

Classe de PMI	Nº de Indivíduos
0-5	21
5-10	5
10-15	22
15-20	2

**Tabela 8.28** – Resultados da reacção de luminol (escala binária) por classes de PMI. ( + - visível; - - não visível).

	A. [0-5[	B. [5-10[	C. [10-15[	D. [15-20[
-	9	2	1	0
+	12	3	21	2

**Tabela 8.29-** Resultados da reacção de luminol (escala de 5 níveis) por classes de PMI. ( +++++ - Forte positivo; +++ - Positivo; ++ - Fraco positivo; + - Muito fraco positivo; - - negativo)

	A. [0-5[	B. [5-10[	C. [10-15[	D. [15-20[
-	8	2	1	0
+	0	0	7	0
++	5	1	6	2
+++	5	2	8	0
++++	3	0	0	0

**Tabela 8.30 –** Resultados da reacção do luminol (escala binária) por classes de PMI, de acordo com a reacção de quimioluminescência espectável. ( + - visível; - - não visível)

Classe de PMI	Quimioluminescência Esperada	Quimiolum./Total	Percentagem
0-5	+	12/21	57%
5-10	+	3/5	60%
10-15	+	21/22	95%
15-20	-	0/2	0%

**Tabela 8.31 –** Resultados da reacção do luminol (escala 5 níveis) por classes de PMI, de acordo com a reacção de quimioluminescência espectável. ( +++++ - Forte positivo; +++ - Positivo; ++ - Fraco positivo; + - Muito fraco positivo; - - negativo)

Classe de PMI	Quimioluminescência Esperada	Quimiolum./Total	Percentagem
0-5	++++/+++	8/21	38%
5-10	+++/>++	3/5	60%
10-15	++/>+	13/22	59%
15-20	-	0/2	0%