



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Andreia Margarida da Cruz Baptista

**ESTIMATIVA DO INTERVALO *POSTMORTEM* A  
PARTIR DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA ÓSSEA  
ANALISADA POR FTIR-ATR**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Antropologia Forense orientada pela Professora Doutora Maria Teresa dos Santos Ferreira e pela Professora Doutora Maria Paula Matos Marques Catarro do Departamento Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020

Faculdade de Ciências e Tecnologias  
da Universidade de Coimbra

# Estimativa do Intervalo *Postmortem* a Partir da Composição Química Óssea Analisada por FTIR-ATR

Andreia Margarida da Cruz Baptista

Dissertação de Mestrado na área científica de Antropologia Forense orientada pela Professora Doutora Maria Teresa dos Santos Ferreira e pela Professora Doutora Maria Paula Matos Marques Catarro e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA





# Agradecimentos

A realização desta dissertação contou com grandes apoios e incentivos sem os quais este projeto não se teria tornado realidade.

Quero agradecer às minhas orientadoras – a Professora Doutora Maria Teresa dos Santos Ferreira e a Professora Doutora Maria Paula Matos Marques Catarro – pela disponibilidade para tirar dúvidas e resolver problemas, pelo apoio e acompanhamento mesmo durante o confinamento e adaptação à situação atual em que vivemos, pela confiança que depositaram em mim para desenvolver este trabalho, pelas suas opiniões críticas e partilha dos seus conhecimentos.

Ao Doutor Francisco Curate pela disponibilidade e auxílio para o tratamento estatístico. À Unidade de I&D Química-Física Molecular da Universidade de Coimbra, quero agradecer a disponibilidade de equipamento de FTIR e pela forma que me acolheram e à Doutora Ana Lúcia pela ajuda a realizar a análise espectroscópica.

Agradeço ao Laboratório de Antropologia Forense por permitir o acesso a esqueletos da Coleção de Esqueletos Identificados Século XXI e a Coleção de Escravos Africanos do Valle da Gafaria de Lagos.

À Mariana Pedrosa, pela sua disponibilidade incansável para o esclarecimento de dúvidas e por me ter permitido basear o presente estudo em parte do seu trabalho sem o qual seria impossível realizar este projeto.

Por último, um obrigada à minha família e amigos por nunca me terem deixado desistir e por “me darem na cabeça” quando era necessário.



# Resumo

Em Antropologia Forense há uma dificuldade inerente à estimativa do Intervalo *Postmortem* (PMI) com base em restos esqueléticos devido à falta de metodologias fidedignas. Portanto, é imperativo o desenvolvimento de novos métodos para a estimativa do PMI com base na componente mineral do tecido ósseo, a bioapatite.

Este estudo teve como objetivo avaliar se existe uma correlação entre as alterações da componente mineral óssea e o PMI. Para tal, avaliaram-se algumas componentes da bioapatite, mediante índices obtidos a partir de bandas de infravermelho (FTIR-ATR): o conteúdo em carbonato tipo B (BPI), carbonato tipo A (API), a razão carbonato-fosfato (C/P), a relação entre carbonato tipo (A+B) e carbonato tipo B (C/C) e o índice de cristalinidade (IC). Assim, recorreu-se a uma amostra de fémures e úmeros de 80 indivíduos da Coleção de Esqueletos Identificados do Séc. XXI e a uma clavícula de um indivíduo da Coleção de Escravos Africanos do Valle da Gafaria de Lagos, ambas pertencentes à Universidade de Coimbra. Além disso, apurou-se se o sexo e a idade dos indivíduos presentes na amostra tinham algum efeito nas correlações entre os índices e o PMI.

Concluiu-se que, a quantidade de carbonato tipo B aumenta com o aumento do PMI e, conseqüentemente, o BPI e o C/P também aumentam. Em contraste, o IC, o C/C e o API diminuem com o aumento do intervalo. As correlações estatisticamente significativas foram maioritariamente, pertencentes a indivíduos do sexo feminino com uma idade avançada. O IC e C/C mostraram ter um grande potencial para a estimativa do PMI, sobretudo no sexo feminino controlando os efeitos do sexo e idade. Serão necessários mais estudos para confirmar os presentes resultados e conclusões.

**Palavras-chave:** Antropologia Forense; Bioapatite; Espectroscopia de Infravermelho; Intervalo *Postmortem*



# Abstract

In Forensic Anthropology, there is an inherent difficulty in estimating the *Postmortem* Interval (PMI) due to the lack of reliable methodologies based on skeletal remains. Therefore, it is imperative to develop new methods for the estimation of the PMI based on the mineral component of bone tissue, bioapatite.

This study aimed to assess whether there is a correlation between changes in the bone mineral component and the PMI estimate. For this, some components of the bioapatite were evaluated, through indexes obtained from infrared bands (FTIR-ATR): the content of carbonate type B (BPI), carbonate type A (API), the carbonate-phosphate ratio (C/P), the relationship between carbonate type (A + B) and carbonate type B (C/C) and the crystallinity index (CI). Thus, we used a sample of femurs and humerus from 80 individuals from the Collection of Identified Skeletons of the 21st century and a clavicle of one individual from the Collection African Enslaved Individuals from Valle da Gafaria, Lagos, both collections belong to the University of Coimbra. Moreover, it was determined whether sex and age of the individuals present in the sample had any effect on the correlations between the indexes and the PMI estimation.

It was concluded that the amount of type B carbonate increases with the increase in PMI and, consequently, BPI and C/P also increase. In contrast, CI, C/C and API decrease with the increasing interval. The statistically significant correlations were belonged, mostly, to female individuals with an advanced age. The CI and C/C showed great potential for estimating the PMI, especially in females, controlling the effects of sex and age. Further studies are needed to confirm the present results and conclusions.

**Keywords:** Bioapatite; *Postmortem* Interval; Forensic Anthropology; Infrared Spectroscopy.

# Índice

<b>Agradecimentos</b>	<b>i</b>
<b>Resumo</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>Índice</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>x</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Tecido Ósseo	3
1.2. Tafonomia Forense – PMI	5
1.3. Diagénese	8
1.3.1. Índice de Cristalinidade e Relação Carbonato-Fosfato	9
1.4. Espectroscopia de Infravermelho	11
1.4.1. 1.4.1.Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – em modo de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	12
1.5. Objetivos	14
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>15</b>
2.1. Seleção e recolha da amostra	15
2.2. Método FTIR-ATR	16
2.3. Tratamento Estatístico	18
<b>3. Resultados</b>	<b>19</b>
3.1. Índices calculados através dos espectros FTIR-ATR	19
3.1.1. Diferenças entre tipo de osso	19
3.1.2. Amostra arqueológica	21
3.1.3. Correlações	21
<b>4. Discussão</b>	<b>25</b>
<b>5. Conclusão</b>	<b>28</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	<b>30</b>
<b>Apêndices</b>	<b>42</b>



# Lista de Figuras

<b>Figura 2.2.</b> Espectro de FTIR-ATR mostrando os sinais de interesse para o cálculo dos índices espectrais de amostras de osso humano usados ao longo deste trabalho para avaliar a respetiva composição química. (Espectro do indivíduo 70 da CEI/XXI do sexo feminino, 90 anos de idade à morte).....	17
<b>Figura 3.1.</b> Espectros de FTIR-ATR mostrando as bandas de interesse da componente mineral pertencentes às amostras de fémur e úmero do indivíduo 80 da CEI/XXI (indivíduo do sexo feminino de 88 anos de idade à morte).....	19
<b>Figura 3.2.</b> Correlação do IC com o PMI para a amostra total do úmero.....	21
<b>Figura 3.3.</b> Correlação do C/C com o PMI para a amostra total do úmero.....	22
<b>Figura 3.4.</b> Correlação do BPI e C/P com o PMI para o fémur do sexo feminino, controlando os efeitos do sexo.....	23
<b>Figura 3.5.</b> Correlação do IC com o PMI para o fémur do sexo masculino, controlando os efeitos do sexo.....	23
<b>Figura 3.6.</b> Correlação do API com o PMI para o fémur do sexo feminino, controlando os efeitos do sexo e idade.....	24
<b>Figura 3.7.</b> Correlação do IC e C/C com o PMI para o úmero do sexo feminino, controlando os efeitos do sexo e idade.....	24

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1.</b> Equações utilizadas para avaliar a composição química óssea das amostras. (adaptado de Mamede <i>et al.</i> , 2018).....	17
<b>Tabela 3.2.</b> Estatística descritiva dos valores calculados a partir dos índices em estudo.....	20
<b>Tabela A.1.</b> Lista de indivíduos, de ambas as coleções (CEI/XXI e Coleção de Escravos Africanos do Valle da Gafaria de Lagos) utilizados neste estudo.....	42
<b>Tabela A.2.</b> Resultado dos coeficientes de correlação de Pearson entre os índices calculados (IC, API, BPI, C/C e C/P) do fémur e do úmero e o PMI, para a amostra total. ....	43
<b>Tabela A.3.</b> Resultado dos coeficientes de correlação de Pearson entre os índices calculados (IC, API, BPI, C/C e C/P) do fémur e do úmero e o PMI controlando os efeitos do sexo, para a amostra total e organizado de acordo com o sexo.....	44
<b>Tabela A.4.</b> Resultado dos coeficientes da correlação parcial entre os índices calculados (IC, API, BPI, C/C e C/P) do fémur e do úmero e o PMI controlando os efeitos do sexo e da idade, para a amostra total organizados de acordo com o sexo.....	45

# Lista de Abreviaturas

**API:** Conteúdo de Carbonato Tipo A

**ATR:** Reflexão Total Atenuada

**BMP:** Proteínas Morfogénicas

**BPI:** Conteúdo de Carbonato Tipo B

**C/C:** Carbonato (A+B) para Carbonato Tipo B

**C/P:** Carbonato-Fosfato

**CEI/XXI:** Coleção de Esqueletos Identificados Século XXI

**ic95%:** Intervalo de Confiança a 95%

**IC:** Índice de Cristalinidade

**FTIR:** Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier

**FTIR-ATR:** Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – Reflexão Total Atenuada

**IR-SF:** Fator de desdobramento

**IV:** Espectroscopia de Infravermelho

**PMI:** Intervalo *Postmortem*

# 1. Introdução

Um dos primeiros passos após a recuperação de restos humanos é a estimativa do Intervalo *Postmortem* (PMI), ou seja, o tempo decorrido entre a morte de um indivíduo e a análise dos restos cadavéricos. A não ser que o momento da morte seja testemunhado, a hora exata do seu acontecimento não pode ser determinado com precisão (Dix e Graham, 1999). Estão disponíveis muitos métodos para a estimativa do PMI para cadáveres em decomposição precoce ou no período logo após a morte. No entanto, quanto maior o intervalo, mais difícil é estimar com precisão o PMI (Ferreira e Cunha, 2012).

A estimativa do Intervalo *Postmortem* não é só de grande importância para a identificação dos indivíduos como também tem consequências legais (Skinner e Jones, 1996). Uma potencial punição por ofensas criminais prescreve por lei após diferentes intervalos de tempo, dependendo do enquadramento legal de cada país. Por isso, é imperativo distinguir ossos recentes e com interesse médico-legal de ossos de outros contextos e cronologias, ou seja, perceber se representam a um verdadeiro caso forense. Os períodos iniciais da decomposição geralmente enquadram-se no âmbito da patologia forense porque ainda estão presentes os tecidos moles mas à medida que o corpo se deteriora entra no ramo da Antropologia Forense, onde o antropólogo aplica conceitos de Tafonomia Forense para analisar os restos cadavéricos (Wilson-Taylor, 2012). Contudo, os diversos fatores tafonômicos para além de influenciarem o processo de decomposição, também influenciam a datação através da análise do estado de decomposição (Buekenhout, 2017).

A datação por radiocarbono para além de ser uma técnica dispendiosa, destrutiva e morosa, a sua precisão é mais alta nas décadas de 1960 e 1970 e tem vindo a diminuir progressivamente nos últimos 50 anos (Hodgins, 2009). À medida que os níveis de radiocarbono se aproximam dos níveis ambientais pré bombas e ensaios nucleares, a precisão das determinações da idade do tecido com base no conteúdo de radiocarbono diminui. Salvo se ocorrer uma catástrofe nuclear futura, seria razoável esperar que o

método pudesse ser usado nas determinações do ano de nascimento para as pessoas nascidas nas próximas uma ou duas décadas (Hodgins, 2009). Assim, o desenvolvimento de novas metodologias para a estimativa do PMI de restos esqueléticos humanos é um dos aspetos mais necessários para contextos forenses.

Nos últimos tempos tem-se visto o uso de novas metodologias empregues à Antropologia Forense, não só ao nível da estimativa do PMI mas, também, do perfil biológico como é o caso do estudo de Pedrosa, 2019. Nesse estudo, é utilizada a espectroscopia vibracional para a análise da composição óssea com o objetivo de estimar alguns parâmetros do perfil biológico (Pedrosa, 2019). O presente estudo terá por base as metodologias utilizadas em Pedrosa (2019) para uma nova abordagem, a estimativa do PMI.

### 1.1. Tecido Ósseo

O esqueleto é mais do que uma estrutura que suporta o resto do corpo. Os ossos permitem movimento e locomoção através da transmissão da força das contrações musculares, protegem os órgãos e estruturas vitais, participam no equilíbrio do pH dos tecidos, servem como reservatório mineral de fatores de crescimento e citocinas e nos seus espaços medulares ocorre a hematopoiese (Taichman, 2005).

O esqueleto humano adulto é composto por 80% de osso cortical e 20% de osso trabecular em geral (Eriksen *et al.*, 1994). O osso cortical é denso e sólido, a sua relação superfície/volume no osso é muito menor do que no osso trabecular. Enquanto o osso trabecular é composto por uma rede de placas e hastes trabeculares intercaladas no compartimento da medula óssea. O osso trabecular transfere cargas mecânicas da superfície articular para o osso cortical. As propriedades hidráulicas absorvem o choque. As propriedades do material dos compartimentos ósseos diferem: o osso trabecular tem menor teor de cálcio e mais água em comparação com o osso cortical (Ott, 2018).

Por outro lado, do ponto de vista molecular, o osso é um material heterogêneo, contendo componentes minerais e orgânicos sendo que 50 a 70% são atribuídos à componente mineral (70% no osso seco), 20 a 40% aos componentes orgânicos, 5 a 10% em água e <3% a lípidos (Clarke, 2008; Thompson, 2015; Wang *et al.*, 2010). A fase inorgânica fornece rigidez mecânica e resistência, enquanto a fase orgânica fornece elasticidade e flexibilidade (Datta *et al.*, 2008). A componente orgânica compreende lipídios e proteínas (principalmente colagénio tipo I) e proteínas não colagénicas, incluindo osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina e sialoproteína óssea II, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento (Aszódi *et al.*, 2000). A componente inorgânica, bioapatite, é uma hidroxiapatite substituída por carbonato representada pela fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Os carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) podem substituir os grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (substituição do tipo B) ou os grupos hidróxilo (OH) (substituição do tipo A) na matriz de hidroxiapatite (Rey *et al.*, 1989; Astala e Stott, 2005). Os grupos de carbonato e os grupos de fosfato têm carga e geometria diferente entre si e são de maiores dimensões em comparação com os grupos hidróxilo, por isso a sua presença

distorce a rede cristalina e há uma conseqüente diminuição da cristalinidade (Astala e Stott, 2005).

A idade do indivíduo, o tipo de tecido, a dieta, o metabolismo, as patologias, o Intervalo *Postmortem* e o tipo de solo em contacto com os restos mortais são exemplos de fatores que podem alterar as quantidades relativas dos constituintes do tecido ósseo, bem como o seu arranjo geométrico e espacial (Bacon, 1990).

## 1.2. *Tafonomia Forense – PMI*

A Tafonomia é o estudo dos fenómenos que afetam os restos dos organismos na altura e após a morte (Nawrocki, 2009). O termo foi proposto por Efremov em 1940 como o estudo dos processos pelos quais restos orgânicos passam da biosfera para a litosfera como resultado de processos geológicos e biológicos. A avaliação das mudanças tafonómicas dos restos cadavéricos é um componente importante da análise antropológica forense (Ubelaker, 1997). Existem várias disciplinas necessárias à estimativa do PMI não só a antropologia forense mas também, por exemplo, a patologia forense, a botânica forense e a entomologia forense (Forbes, 2009; Iqbal *et al.*, 2018). Regra geral, a decomposição de um corpo passa por cinco períodos: fresco, inchado, decomposição ativa, decomposição avançada e esqueletização (Swann *et al.*, 2010; Statheropoulos *et al.*, 2011).

A autólise é descrita como a primeira alteração identificável num cadáver, e é a destruição celular provocada pela atividade enzimática das próprias células, ou seja, é uma auto-digestão celular (Swann *et al.*, 2010; Paczkowski e Schütz, 2011). Este processo ocorre em células metabolicamente mais ativas e pode ser desencadeado pela diminuição do pH intracelular como resultado da anoxia (Gill-King, 1997; Iqbal *et al.*, 2018). No período fresco ocorre uma acumulação de sangue não circulante nos vasos nas regiões de declive devido à hemólise do sangue (DiMaio e DiMaio, 2001). O período fresco pode ter uma duração entre uma hora a três dias após a morte e depende do ambiente envolvente, termina com o início do período de inchado (Statheropoulos *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2018). O inchaço do cadáver ocorre por acumulação dos gases produzidos durante a autólise. Com o início do período de inchado começa a putrefação, ou seja, destruição celular pela ação de microorganismos (bactérias, fungos e protozoários) (Swann *et al.*, 2010). A fase de putrefação é identificada pela descoloração verde presente, primeiramente, na fossa ílica direita, devido ao crescimento excessivo de bactérias do cólon (Swann *et al.*, 2010; Vass *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2018). Os hidratos de carbono, proteínas e lípidos que começaram a ser decompostas durante a autólise continuam a ser catabolizadas, durante a putrefação, para formar moléculas mais simples. Este processo de catabolização forma gases que criam pressão no interior do corpo resultando na

distensão dos orifícios, que pode ser confundido com lesões perimortem (Swann *et al.*, 2010; Vass *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2018). Com o final do período de inchado, ocorre a libertação dos gases e começa o período de decomposição ativa caracterizada pelo escurecimento da pele (Swann *et al.*, 2010; Statheropoulos *et al.*, 2011). Este período caracteriza-se pela atividade dos dípteros principalmente de larvas Calliphoridae (Vass *et al.*, 1992) e pelo forte odor de putrefação devido à liquefação dos tecidos em que são produzidas, por exemplo, a cadaverina e a putrescina, a partir da decomposição das proteínas musculares (Swann *et al.*, 2010; Statheropoulos *et al.*, 2011; Vass *et al.*, 2002; Vass *et al.*, 1992; Iqbal *et al.*, 2018). A presença de dípteros e coleópteros neste período acelera o processo de perda dos tecidos moles expondo o esqueleto (Statheropoulos *et al.*, 2011). Segue-se o período de decomposição avançada caracterizada pela fermentação butírica dos tecidos em meios sem oxigénio, ou seja, em anaerobiose (Statheropoulos *et al.*, 2011). Com o início do final deste período há uma redução da atividade dos dípteros e um aumento da atividade dos coleópteros devido ao tipo de tecidos remanescentes, pois há menos tecidos moles e apenas são visíveis, maioritariamente pele, cartilagem, cabelos e ossos (Swann *et al.*, 2010; Statheropoulos *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2018). Por fim, no período de esqueletização os tecidos moles remanescentes são decompostos ou convertidos num tecido “semelhante a couro”, sendo que a maioria dos ossos já se encontra exposto (Swann *et al.*, 2010; Vass *et al.*, 2002; Iqbal *et al.*, 2018). A degradação química dos elementos mais resistentes como os dentes, ligamentos, cartilagens e os ossos ocorre durante um período mais longo em relação aos outros tecidos, pode durar vários anos (Swann *et al.*, 2010; Dent *et al.*, 2004; Statheropoulos *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2018). Eventualmente, os processos diagenéticos manifestam-se, degradam o colagénio e alteram a matriz inorgânica do tecido ósseo e o ambiente envolvente (Hedges, 2002).

A sucessão dos períodos de decomposição não é uniforme e podem ocorrer, em simultâneo, num mesmo cadáver (Pinheiro, 2006). Há fatores intrínsecos e extrínsecos ao cadáver que afetam a decomposição como a temperatura ambiente, precipitação, roupa, local de deposição (água, à superfície, enterrado...), tipo de enterro, profundidade do enterro, fauna, flora, peso corporal, idade, características do solo, humidade (Ubelaker, 1997). Estes fatores podem acelerar os estágios de decomposição, suprimi-los ou até conservar o corpo. A mumificação e a saponificação permitem um atraso da putrefação e uma “conservação” do corpo (Rogers, 2010). A mumificação natural consiste na

desidratação e exsicação dos tecidos e ocorre em locais quentes e tendencialmente arejados, que ajudam a dissecar ou secar os tecidos, ajudando a retardar a putrefação (Knight, 2004; Powers, 2005). Já a saponificação é um processo de formação de adipocera, um composto formado pela hidrólise e hidrogenação dos tecidos adiposos e que ocorre melhor em condições húmidas e anaeróbias (Forbes *et al.*, 2002). A decomposição é inibida devido à libertação de ácidos gordos que retardam o crescimento de bactérias putrefativas (Rogers, 2010).

Com tantos fatores a ter em consideração é difícil o estabelecimento de um método para a estimativa do PMI que resulte em todos os contextos, regiões geográficas e cronologias (Cockle e Bell, 2015). Apesar disso, existem muitos métodos para a estimativa do PMI tendo por base o processo de decomposição (Galloway, 1997; Mann *et al.*, 1990; Voss *et al.*, 2008; Galloway *et al.*, 1989), a entomologia forense (Goff e Flynn, 1991; Megyesi *et al.*, 2005; Frątczak-Łagiewska e Matuszewski, 2019) e a botânica forense (Quatrehomme *et al.*, 1997; Courtin e Fairgrieve, 2004). Mas, a estimativa do PMI a partir de restos esqueletizados é difícil (Vass *et al.*, 1992) e os métodos existentes são pouco confiáveis (Buekenhout *et al.*, 2018; Schwarcz *et al.*, 2010; Introna *et al.*, 1999; Hoke *et al.*, 2013). Apesar disso, a espectroscopia de infravermelho tem mostrado resultados promissores para a estimativa do PMI a partir de restos esqueletizados (Yao *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Longato *et al.*, 2015; Patonai *et al.*, 2013).

### 1.3. *Diagénes*

A digénes é um processo de extrema complexidade que envolve alterações físico-químicas *postmortem* nos ossos e dentes (Beasley *et al.*, 2014). Os processos diagenéticos podem alterar a microestrutura e os sinais químicos biogénicos do osso envolvendo três processos distintos: atividade microbiana no tecido ósseo, alteração química da fase mineral (dissolução/ recristalização) e decomposição química da fase orgânica (hidrólise) (Collins *et al.* 2002; Kendall *et al.* 2018; Kontopoulos *et al.*, 2019).

Uma das primeiras fases da diagénes é o ataque microbiano ao tecido ósseo que pode ocorrer nos três meses seguintes à morte (Swann *et al.*, 2010; Bell *et al.*, 1996 Müller *et al.*, 2011). Em geral, a atividade microbiana modifica a microestrutura óssea aumentando a porosidade no tecido degradando enzimaticamente o colagénio com recurso a colagenases (Hedges, 2002). A temperatura, o pH do meio envolvente, a hidrologia e a quantidade de oxigénio disponível também podem afetar a degradação do colagénio (Nielsen-Marsh *et al.* 2000; Grupe *et al.* 2002; Collins *et al.* 2002; Koon *et al.* 2003, 2010; Kendall *et al.* 2018; Kontopoulos *et al.*, 2019). Quanto mais alta for a temperatura e mais alcalino ou ácido for o meio envolvente maior e mais rápida será a perda do colagénio pela hidrólise das proteínas (Collins e Galley, 1998; Collins *et al.* 2002; Kendall *et al.* 2018 Ajie *et al.* 1991; Kontopoulos *et al.*, 2019).

A perda de colagénio provoca um aumento da porosidade (cerca de 1/3 do volume da matriz óssea *in vivo*) dando uma maior acessibilidade às águas subterrâneas de explorarem o tecido ósseo. As águas subterrâneas adquirem os iões presentes no solo, sendo que, quando são solos com pH neutro ou levemente alcalino estas têm altas concentrações de cálcio, fosfato e magnésio, ao contrário dos solos com um pH extremamente alcalino ou ácido (Hedges, 2002; Berna *et al.* 2004). Estes iões são incorporados nos cristais de bioapatite reorganizando a rede cristalina numa forma mais estável e ordenada (recristalização) (Trueman *et al.* 2004; Lee-Thorp e van der Merwe 1991; Berna *et al.* 2004; Stathopoulou *et al.* 2008; Figueiredo *et al.* 2012; Trueman, 2013; Rey and Combes 2014; Kontopoulos *et al.*, 2019). Em solos ácidos ocorre uma dissolução do tecido ósseo, ou seja, perda de iões para o meio provocando uma desestruturação da rede cristalina (High *et al.*, 2015).

Os espectros obtidos por FTIR fornecem informações sobre a composição química e da cristalinidade do tecido (Trueman *et al.*, 2008). A análise deve ser realizada a partir de uma amostra de osso cortical pois apresenta menos área de superfície para troca de elementos com o ambiente envolvente em contraste com o osso trabecular que sofre uma diagênese mais significativa (Mays, 2002 ver). O Índice de Cristalinidade e o Índice C/P são indicadores dos efeitos de processos diagenéticos (Weiner e Bar-Yosef, 1990; Wright e Schwarcz 1996).

### *1.3.1. Índice de Cristalinidade e Relação Carbonato-Fosfato*

A cristalinidade é um indicador de ordem dos cristais, que no tecido ósseo está diretamente relacionado com o seu tamanho (Surovell e Stiner, 2001; Beasley *et al.*, 2014). A cristalinidade de uma amostra é avaliada pelo fator de desdobramento (IR-SF) ou Índice de Cristalinidade (IC) (Surovell e Stiner, 2001; Wright e Schwarcz, 1996). O IR-SF ou IC é uma medida da ordem estrutural da rede cristalina que é aplicada para estudar as alterações na estrutura óssea, que está diretamente relacionada com o tamanho médio do cristal, ou seja, para determinar a cristalinidade (Sponheimer e Lee-Thorp, 1999; Shemesh, 1990; Thompson *et al.*, 2013; Weiner e Bar-Yosef, 1990; Beasley *et al.*, 2014; Wright e Schwarcz, 1996; Stiner *et al.*, 2001; Trueman *et al.*, 2004).

Os valores do IC em tecido ósseo variam geralmente entre 2,50-3,25 mas podem aumentar ou diminuir consoante a estrutura cristalina se tornar mais ou menos ordenada, respetivamente (Munro *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2008; Nielsen-Marsh e Hedges, 1999; Stiner *et al.*, 2001). Um dos processos *postmortem* pela qual a estrutura cristalina passa é a recristalização da bioapatite, alterando-a para uma estrutura mais estável e ordenada (Hedges, 2002; Nielsen- Marsh e Hedges, 2000; Berna *et al.*, 2004). Alterações na porosidade do tecido ósseo, resultantes de processos diagenéticos, estão associados a alterações no IC (Nielsen-Marsh e Hedges, 1999). O IC é afetado pela quantidade de carbonato presente na bioapatite que substitui o íão fosfato. Os valores do Índice de Cristalinidade não são uniformes em todo o esqueleto pois a cristalinidade varia com os diferentes tecidos das várias peças ósseas (Nakano *et al.*, 2002). Alterações na cristalinidade do tecido ósseo têm sido utilizadas como indicadores para caracterizar o

grau de alteração diagenética (Trueman *et al.*, 2004; Weiner e Bar-Yosef, 1990; Dal Sasso *et al.*, 2016; Salesse *et al.*, 2014; Kendall *et al.*, 2017).

As alterações de cristalinidade também afetam o índice C/P, que avalia a razão carbonato/fosfato (Lee-Thorp e Sponheimer, 2003). O aumento de cristalinidade (e consequente aumento do IC) está correlacionado com a diminuição do C/P. Caso seja uma diminuição de cristalinidade há um aumento do C/P, ou seja, a cristalinidade está inversamente relacionada com a razão carbonato/fosfato (Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2013). Esta relação está associada à quantidade de carbonato presente na bioapatite mais precisamente ao carbonato tipo B (quantificado pelo índice BPI) (Yerramshetty *et al.*, 2006). Um aumento de carbonato na rede cristalina produz cristais de menores dimensões e com maior tensão, distorcendo a estrutura cristalina e, conseqüentemente, o valor do IC diminui (Wright e Schwarcz, 1996).

Para avaliar as alterações de cristalinidade provocados pelos processos diagenéticos, o Índice de Cristalinidade e o C/P, medidos por espectroscopia de infravermelho (FTIR), têm sido usados para caracterizar o grau de alteração diagenética (Weiner e Bar Yosef, 1990; Wright e Schwarcz, 1996; Nielsen-Marsh e Hedges, 2000; Sillen e Morris, 1996). Mas estudos mais recentes revelam que devido à contínua mudança na cristalinidade (Trueman *et al.*, 2008) os índices C/P e IC não são métodos viáveis para avaliar as alterações na rede cristalina (Lee-Thorp e Sponheimer, 2003; Trueman *et al.*, 2008; Lebon *et al.*, 2010; Stathopoulou *et al.*, 2008; Trueman *et al.*, 2004). Assim, a caracterização da composição e estrutura química da componente mineral do tecido ósseo é essencial para avaliar as suas alterações diagenéticas (Nielsen-Marsh e Hedges, 2000; Dal Sasso *et al.*, 2016; Trueman *et al.*, 2004).

#### 1.4. *Espetroscopia de Infravermelho*

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica utilizada para investigar qualquer substância com uma estrutura cristalina ou não-cristalina em qualquer estado físico (Butu *et al.*, 2014), tendo por base as vibrações dos átomos que compõem as moléculas da substância em análise (Stuart, 2005), que alteram os comprimentos e os ângulos de ligação (Tu, 1982; Stuart, 2005). As vibrações moleculares são sondadas por radiação eletromagnética, a frequências características, para os diversos modos vibracionais fundamentais da molécula, *i*. Ou seja, há uma transição entre estados de energia vibracional, que se traduz no aparecimento de bandas num espectro vibracional (Mamede *et al.*, 2018; Griffiths, 2006; Stuart, 2005).

Para haver uma transição vibracional a frequência de radiação, que interage com a amostra, tem que corresponder à frequência do modo vibracional da molécula para que esta seja absorvida e ocorra uma transição vibracional originando uma banda espectral (Coates, 2006; Griffiths, 2006; Stuart, 1997 e 2005). Assim, a transição só ocorre com absorção de radiação na região do infravermelho, que interfere com o momento dipolar da molécula analisada (Stuart, 2005; Monnier, 2018).

A região espectral de infravermelho (IV) pode ser dividida em: infravermelho longínquo (*far infrared*,  $<200\text{ cm}^{-1}$ ), médio (*medium infrared*,  $200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ) e próximo (*near infrared*,  $4000\text{--}13000\text{ cm}^{-1}$ ) (Mamede *et al.*, 2018). A região do IV médio é a mais comumente usada, visto que a maioria das vibrações moleculares ocorrem entre os 400 e os  $4000\text{ cm}^{-1}$ , incluindo os sinais atribuíveis aos principais componentes ósseos (Carden e Morris, 2000).

Cada molécula tem modos vibracionais ligeiramente diferentes de todas as outras moléculas, portanto, o espectro infravermelho de uma dada molécula é único e pode ser usado para identificar essa mesma molécula (Griffiths, 2007). Esta assinatura espectral (*fingerprint*) fornece informações muito rigorosas sobre a composição química da substância em estudo (Petra *et al.*, 2005) e permite identificar os grupos funcionais presentes (Pestle *et al.*, 2014).

#### 1.4.1. *Espetroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – em modo de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)*

A espectroscopia de infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica convencional que usa um algoritmo matemático, a transformada de Fourier (TF), transforma uma função do tempo (um sinal) nas suas frequências constituintes (Ellis e Goodacre, 2006; Beasley *et al.*, 2014; Dutta, 2017). A espectroscopia de FTIR é uma das técnicas mais utilizadas para analisar a estrutura e composição do material ósseo, pois é muito eficaz na análise das componentes orgânica e mineral do tecido ósseo (Ruppel *et al.*, 2006; Lebon *et al.*, 2008; Chadeaux *et al.*, 2009; Lebon *et al.*, 2010; Patonai *et al.*, 2013; Longato *et al.*, 2015; Marques *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2016; Mamede *et al.*, 2018; Mamede *et al.*, 2018; Festa *et al.*, 2019;).

Na espectroscopia FTIR, todas as frequências são medidas simultaneamente (vantagem multiplex ou de Fellgett). Deste modo, mais radiação pode ser passada entre a fonte e o detetor para cada elemento de resolução. Como resultado, os espectros de transmissão, reflexão e até emissão podem ser medidos de maneira significativamente mais rápida e com maior sensibilidade (Griffiths e Haseh, 2007). Além disso, os instrumentos utilizados para a técnica de FTIR são caracterizados por frequências reproduzíveis de alta resolução e precisão (vantagem de Connes) (Wilson e Poole, 2009).

Na configuração FTIR com Reflexão Total Atenuada (Attenuated Total Reflection - ATR), o feixe de radiação entra num cristal com um alto índice de reflexão e é internamente refletido se o ângulo de incidência na interface amostra-cristal for maior do que o ângulo crítico (Stuart, 2005). A interação entre a radiação e a amostra ocorre na superfície desta e é dependente das características da amostra e do ambiente (Mamede *et al.*, 2018). É uma técnica pouco dispendiosa, de análise rápida e não-destrutiva, não tem problemas de saturação e dispersão óptica, não usa qualquer tipo de solvente ou meio de suporte para a amostra e, assim, a probabilidade de variação do espectro é mínima e a quantidade de amostra necessária é muito pequena (<1 mg) (Mamede *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2009; Hollund *et al.*, 2013; Beasley *et al.*, 2014). A técnica também pode fornecer informações sobre a concentração de uma componente na amostra (Sponheimer e Lee-Thorp, 1999).

Num espectro de FTIR de tecido ósseo podem ser observadas as bandas correspondentes de algumas componentes minerais como, a do fosfato e a do carbonato e bandas da componente orgânica devidas ao colagénio tipo I, amida I, II e III (Kimura-Sura e Ito, 2017) e aos lípidos.

### 1.5. *Objetivos*

O presente estudo teve como objetivo avaliar se existe uma correlação entre a bioapatite óssea e o Intervalo *Postmortem*. Assim, mediante a técnica de FTIR-ATR, foram obtidos os seguintes índices, a partir da análise do osso cortical de amostras de fêmur e úmero, o conteúdo de carbonato tipo B (BPI), carbonato tipo A (API), a razão carbonato-fosfato (C/P), a relação de carbonato (A+B) e o carbonato tipo B (C/C) e o índice de cristalinidade (IC).

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Seleção e recolha da amostra

Para a seleção da amostra de indivíduos de cronologia recente usou-se a mesma amostra recolhida por Pedrosa (2019), de forma a otimizar as amostras e diminuir o impacto da sua recolha. Assim a presente amostra é composta por 81 indivíduos sendo que, 80 são pertencentes aos 302 indivíduos que constituem a Coleção dos Esqueletos Identificados Século XXI (CEI/XXI) (Ferreira *et al.*, 2020) (a mesma usada por Pedrosa, 2019) e um 158 indivíduos da Coleção de Escravos Africanos do Valle da Gafaria de Lagos (Ferreira *et al.*, 2019) provenientes do Laboratório de Antropologia Forense da Universidade de Coimbra. Os esqueletos pertencentes a CEI/XXI possuíam um Intervalo *Postmortem* compreendido entre os 19 e 25 anos ( $\bar{X}=20,24$ ; DP= 1,39) e, de acordo com Pedrosa, 2019, com idades à morte compreendidas entre os 33 e 97 anos ( $\bar{X}=76,3$ ; DP=15,4), sendo que 36 são do sexo masculino (45%) com idades entre os 33 e os 92 anos ( $\bar{X}=69,3$ ; DP=17,2) e 44 indivíduos do sexo feminino (55%) entre os 50 e 97 anos ( $\bar{X}=82,0$ ; DP=10,9). Todos os indivíduos da CEI/XXI provêm do mesmo cemitério, em Santarem, e tiveram inumados cerca de seis anos (com variações entre 5 e 10 anos) (Ferreira, 2012).

O indivíduo arqueológico pertencente à Coleção dos Escravos Africanos do Valle da Gafaria de Lagos possuía um Intervalo *Postmortem* de cerca de 560 anos (datado a radio carbono) era adolescente/adulto jovem e de sexo desconhecido (Tabela A.1). A sua utilização prende-se com a necessidade de se ter um indivíduo com uma cronologia e contexto distintos dos restante que contituem a amostra, de forma a servir como controlo.

Com a exceção do indivíduo da Coleção dos Escravos Africanos do Valle da Gafaria de Lagos (PAVd'09\_I.25), em que foi utilizada a clavícula direita (por ser o osso disponível para recolha da amostra), neste estudo foram utilizadas as duas peças ósseas de cada indivíduo – fémur e úmero – escolhidas por Pedrosa (2019) por serem das mais resistentes aos efeitos diagenéticos (Boaks *et al.*, 2014).

Para a análise química, foi avaliado o tecido ósseo compacto, visto que este é menos suscetível aos processos diagenéticos (Grupe, 1988). Para a preparação das amostras

para a análise química, Pedrosa, 2019 removeu a camada mais externa do osso compacto, com recurso a um bisturi, da porção medial da diáfise produzindo, assim, um pó fino adequado à técnica FTIR-ATR, e, posteriormente armazenado em tubos *ependorf* devidamente identificados. O mesmo procedimento foi agora aplicado para a recolha da amostra do indivíduo PAVd'09 I.25.

## 2.2. Método FTIR-ATR

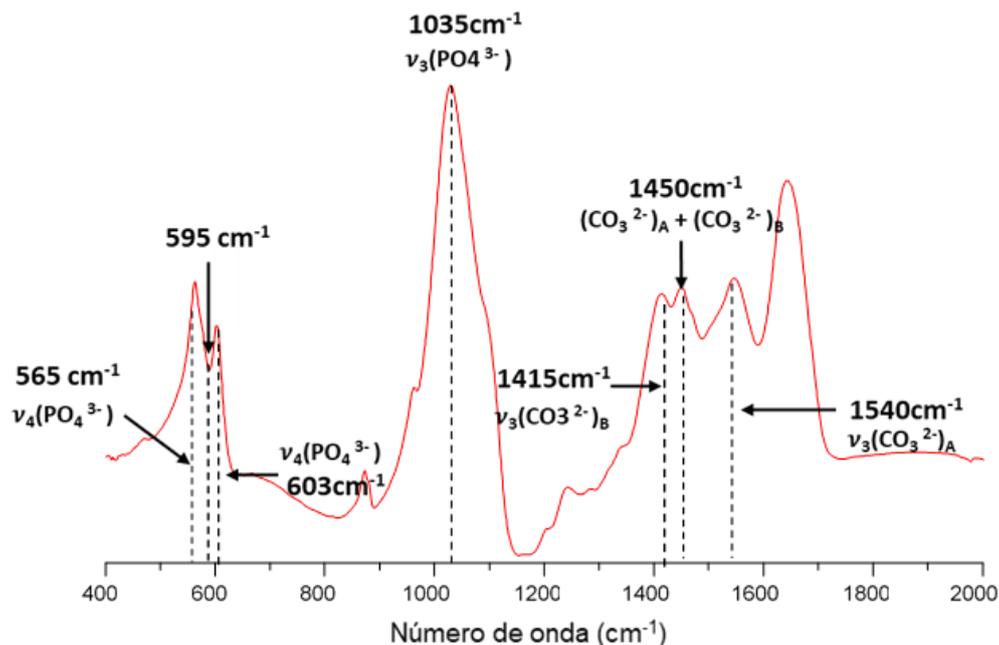
Na Unidade de I&D “Química-Física Molecular” da Universidade de Coimbra, os espectros de FTIR-ATR foram registados na gama do infravermelho médio (400-4000  $\text{cm}^{-1}$ ), num espectrómetro Bruker Optics Vertex 70 purgado com ar isento de vapor de água e  $\text{CO}_2$ , usando um desdobrador de feixe de Ge em substrato de KBr e um detetor de mercúrio de cádmio telureto (MTC) de banda larga, refrigerado com nitrogénio líquido, e um acessório ATR de reflexão única de cristal de diamante. As medições foram feitas em amostras de um pequeno fragmento retirado do osso com um bisturi. Para cada espectro foram somados 128 scans, com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  e uma apodização de Blackman-Harris de três termos, e foi obtido um *background* com 256 scans.

Os espectros foram pré-processados com recurso aos programas *Opus Spectroscopy Software, Version 7.2* – correcção relativa à dependência da frequência da radiação incidente e OriginPro 9.1 ajuste da linha de base e normalização em relação à banda de fosfato (1035  $\text{cm}^{-1}$ ),  $\nu_3$  ( $\text{PO}_4^{3-}$ ).

Para avaliar as disparidades espectrais das amostras, em relação à variável em estudo foram calculadas várias relações entre intensidades de bandas específicas, descritas na Tabela 2.1. Na Figura 2.2 encontra-se um espectro de FTIR-ATR de uma amostra de osso, com as atribuições dos sinais de interesse para o cálculo destes índices espectrais.

**Tabela 2.1.** Índices espectrais calculados com base nos resultados de FTIR-ATR para amostras de osso humano. (adaptado de Mamede *et al.*, 2018)

Parâmetro	Equação	Referência
Índice de Cristalinidade (IC)	$\frac{\text{Abs}(602 \text{ cm}^{-1}) + \text{Abs}(562 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(590 \text{ cm}^{-1})}$	Weiner e Bar-Yosef, 1990
Carbonato-Fosfato (C/P)	$\frac{\text{Abs}(1415 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(1035 \text{ cm}^{-1})}$	Wright e Schwarcz 1996; Trueman <i>et al.</i> , 2008; Thompson <i>et al.</i> , 2009
Conteúdo de Carbonato Tipo A (API)	$\frac{\text{Abs}(1540 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(603 \text{ cm}^{-1})}$	Sponheimer e Lee-Thorp, 1999
Conteúdo de Carbonato Tipo B (BPI)	$\frac{\text{Abs}(1415 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(603 \text{ cm}^{-1})}$	Sponheimer e Lee-Thorp, 1999; Snoeck <i>et al.</i> 2014
Carbonato (A+B) para Carbonato Tipo B (C/C)	$\frac{\text{Abs}(1450 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(1415 \text{ cm}^{-1})}$	Thompson <i>et al.</i> , 2009; Snoeck <i>et al.</i> , 2014



**Figura 2.2.** Espectro de FTIR-ATR mostrando os sinais de interesse para o cálculo dos índices espectrais de amostras de osso humano usados ao longo deste trabalho para avaliar a respectiva composição química. (Espectro do indivíduo 70 da CEI/XXI do sexo feminino, 90 anos de idade à morte).

### 2.3. *Tratamento Estatístico*

Para poder realizar a análise estatística foi utilizado o programa IBM SPSS Statistics que possui uma integração código R e Python para a realização de computação estatística e gráficos.

Primeiro foi realizada uma estatística descritiva (média e desvio padrão) dos valores obtidos a partir da análise da composição mineral óssea do fémur e do úmero. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson para avaliar a relação entre cada um dos índices e o PMI. De seguida, foram realizadas correlações parciais e para isso foi introduzida uma nova variável, o sexo, apenas para controlar os seus efeitos na relação em questão e, por fim, utilizando as três variáveis anteriores e introduzindo mais uma variável, a idade.

A correlação de Pearson,  $r$ , mede a força e direção da relação estatística linear entre duas variáveis. A correlação parcial mede a força e direção de uma relação linear entre duas variáveis contínuas enquanto se controla o efeito de uma ou mais variáveis também elas contínuas. As correlações em questão podem tomar qualquer valor entre -1 e +1, sendo que se tomarem o valor de zero não existe relação entre as variáveis em estudo. Quanto mais próximos de -1 e +1 são os coeficientes das correlações mais forte é a relação. Se, pelo contrário, os valores são mais próximos de zero mais fraca é a relação.

O nível de significância adotado foi de 95%, assim, o  $p$ -value menor ou igual a 0,05 foi considerado significativo.

Os valores calculados para os índices do indivíduo pertencente à Coleção de Escravos Africanos do Valle da Gafaria de Lagos não puderam ser utilizados para o cálculo das correlações pois este indivíduo é um *outlier* significativo, ou seja, os seus valores não seguem o padrão normal. As correlações são muito sensíveis a *outliers* e podem afetar os valores dos seus coeficientes e, por isso alterar, significativamente, os resultados.

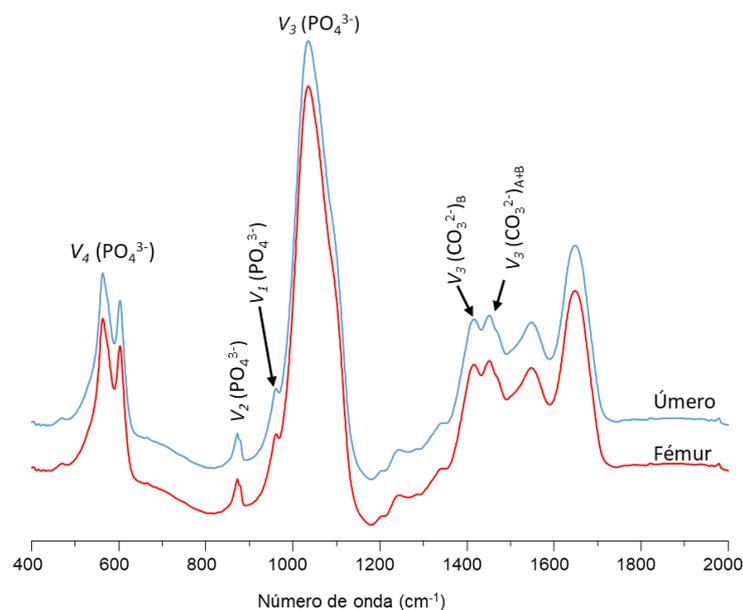
## 3. Resultados

### 3.1. Índices calculados através dos espectros FTIR-ATR

#### 3.1.1. Diferenças entre tipo de osso

A Figura 3.1 apresenta dois espectros retirados do fêmur e do úmero do mesmo indivíduo onde se observam as principais bandas de interesse correspondentes a grupos funcionais como o fosfato e carbonato, não se observando diferenças espectrais significativas entre as duas peças ósseas.

Os resultados obtidos a partir dos índices da Tabela 2.1 calculados para a amostra utilizada encontram-se sintetizados na Tabela 3.2. Pode-se observar que os valores médios dos índices calculados para o fêmur e o úmero são muito próximos. Os valores médios são ainda mais semelhantes entre sexos em relação à mesma peça óssea, em particular os valores médios de IC para o fêmur que são iguais.



**Figura 3.1.** Espectros de FTIR-ATR de amostras de fêmur e úmero, mostrando as bandas de interesse da componente mineral (Indivíduo 80 da CEI/XXI sexo feminino, 88 anos de idade à morte).

**Tabela 3.2.** Estatística descritiva dos valores calculados a partir dos índices em estudo.

		PMI		IC		API		BPI		C/C		C/P		
		$n$	$\bar{X}$	$\sigma$										
<b>Fémur</b>	Sexo Masculino	37	20,46	1,520	3,186	0,181	0,932	0,085	1,162	0,166	1,011	0,046	0,362	0,059
	Sexo Feminino	43	20,05	1,272	3,186	0,128	1,005	0,115	1,209	0,153	1,009	0,029	0,388	0,049
	Total	80	20,24	1,398	3,181	0,159	0,963	0,131	1,188	0,159	1,010	0,038	0,376	0,056
<b>Úmero</b>	Sexo Masculino	37	20,46	1,520	3,300	0,215	0,968	0,092	1,089	0,149	1,035	0,048	0,341	0,059
	Sexo feminino	43	20,05	1,272	3,309	0,177	1,016	0,133	1,128	0,189	1,037	0,049	0,351	0,059
	Total	80	20,24	1,398	3,305	0,194	0,994	0,117	1,110	0,172	1,036	0,048	0,346	0,059

### 3.1.2. Amostra arqueológica

Comparando os valores obtidos a partir dos índices espectrais para amostra de osso arqueológico (PAVd'09 I.25) com os valores médios totais dos mesmos parâmetros pode-se concluir que as relações API (0,296) e BPI (0,596) são significativamente menores relativamente aos seus valores médios, que IC (2,800) e C/P (0,273) têm também valores ligeiramente menores que os restantes. C/C (0,994) apresenta um valor muito aproximado aos valores médios.

### 3.1.3. Correlações

Começou-se por calcular o coeficiente de correlação de Pearson entre o PMI e cada um dos índices de cada peça óssea (Tabela A.2). Todas as correlações calculadas para cada um dos índices relativamente ao fémur são estatisticamente não significativas. No entanto, no úmero existe uma relação moderadamente fraca e negativa (Pearson  $p < 0,05$ ;  $r = -0,354$ ) para o IC (Figura 3.2) e uma relação negativa e fraca para o C/C (Pearson  $p < 0,05$ ;  $r = -0,244$ ) (Figura 3.3). Ou seja, nestas duas relações, quando o PMI aumenta, os valores dos dois índices tendem a diminuir, sendo que esta diminuição é mais significativa no IC do que no C/C. Os restantes índices tinham valores estatisticamente não significativos.

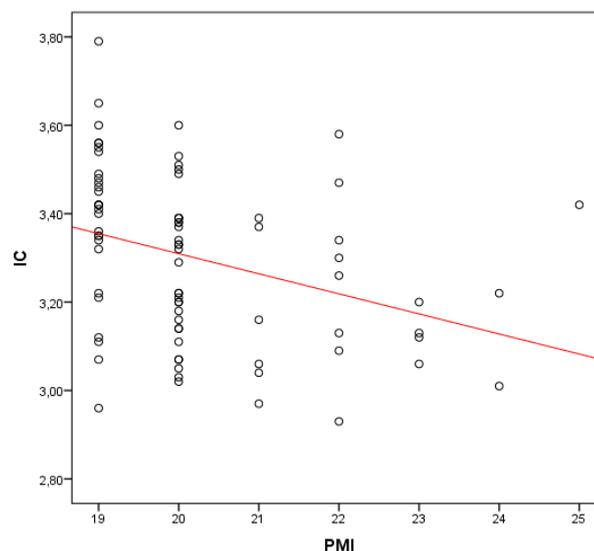
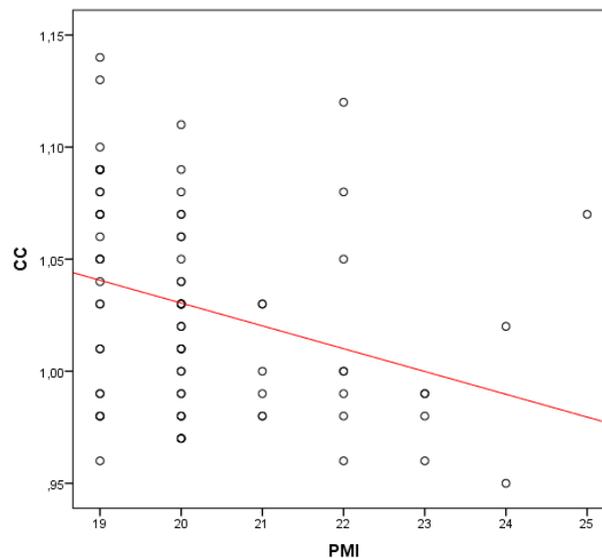
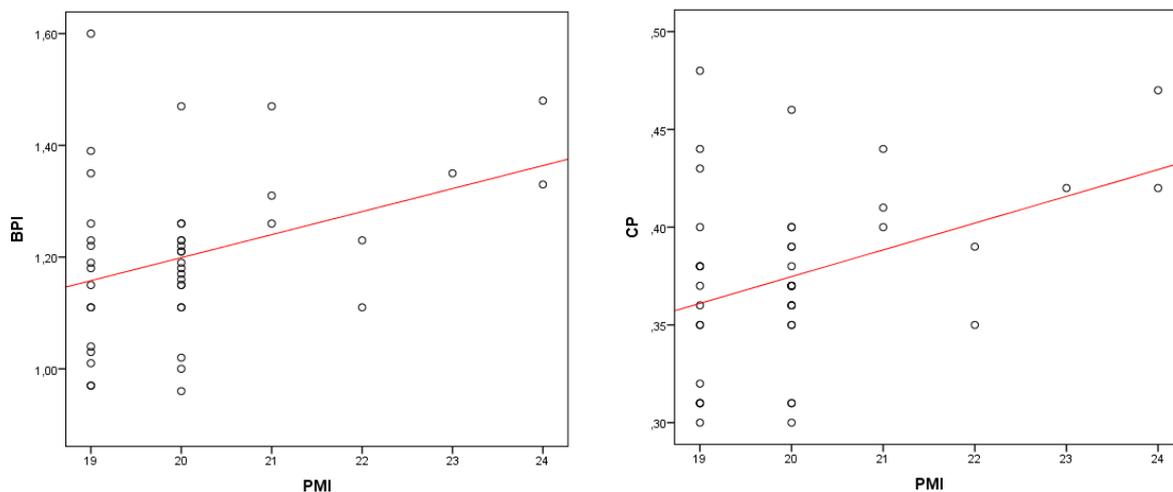


Figura 3.2. Correlação do IC com o PMI para a amostra total do úmero.

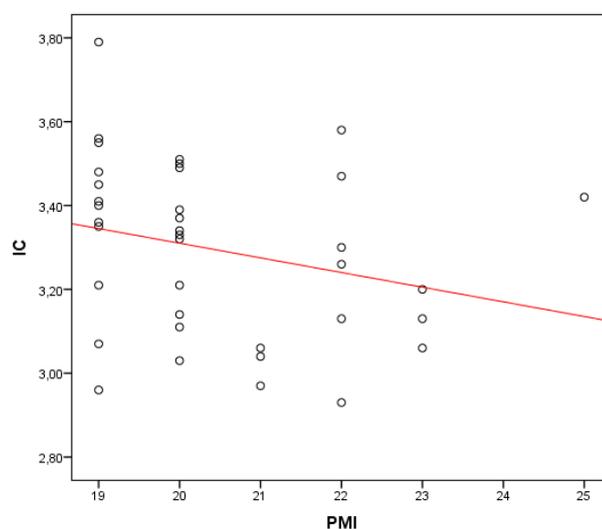


**Figura 3.3.** Correlação do C/C com o PMI para a amostra total do úmero.

Nos resultados das correlações controladas pelo sexo (Tabela A.3), o fêmur tem três índices – API, BPI e C/P – estatisticamente significativos, apenas para o sexo feminino. Todos com relações moderadamente fracas e positivas (API (Pearson  $p < 0,05$ ;  $r = 0,339$ ); (BPI (Pearson  $p < 0,05$ ;  $r = 0,342$ ); C/P (Pearson  $p < 0,05$ ;  $r = 0,310$ )(Figura 3.4), assim, quando o PMI aumenta o API, o BPI e o C/P também têm tendência para aumentar ligeiramente. No úmero, apenas o IC e o C/C tinham valores estatisticamente significativos, o IC para os dois sexos e o C/C apenas para o sexo feminino. O IC, para o sexo feminino, tende a diminuir significativamente com o aumento do PMI pois têm uma relação moderada e negativa (Pearson  $p < 0,05$ ;  $r = - 0,446$ ). No sexo masculino, o IC tende a diminuir muito ligeiramente com o aumento do PMI, sendo que, se correlacionam de forma fraca e negativa (Pearson  $p < 0,05$ ;  $r = - 0,281$ ) (Figura 3.5). A relação do C/C do sexo feminino com o PMI é moderadamente fraca e negativa (Pearson  $p < 0,05$ ;  $r = - 0,373$ ).

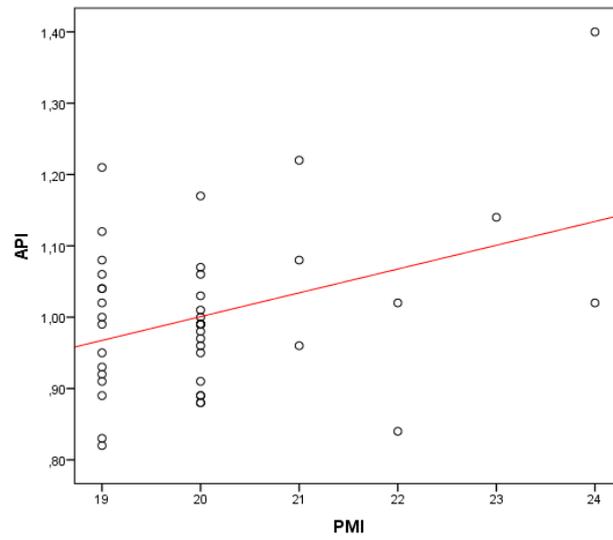


**Figura 3.4.** Correlação do BPI e C/P com o PMI para o fêmur do sexo feminino, controlando os efeitos do sexo.

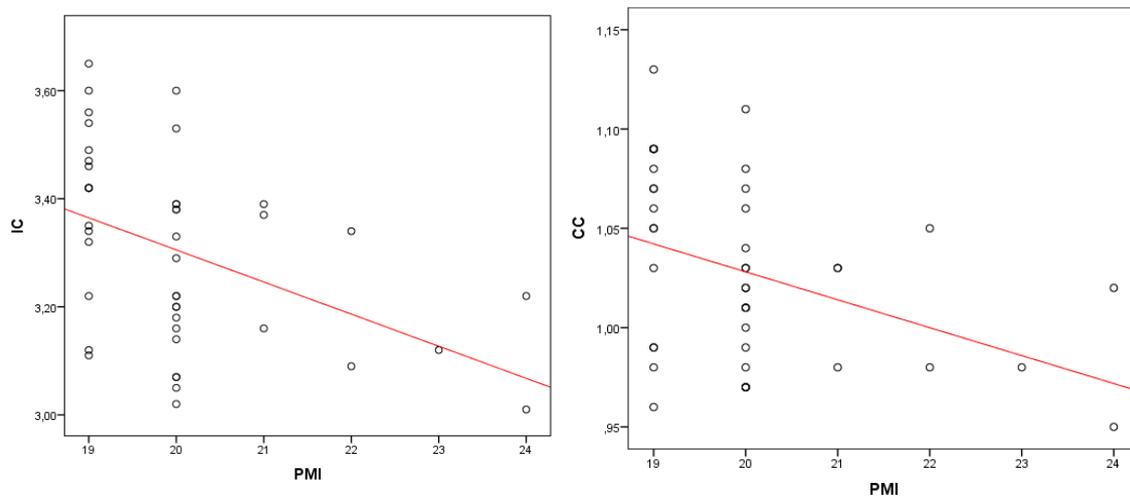


**Figura 3.5.** Correlação do IC com o PMI para o fêmur do sexo masculino, controlando os efeitos do sexo.

Por fim, nos resultados das correlações parciais controladas pelo sexo e idade (Tabela A.4), no fêmur apenas o API do sexo feminino teve um valor estatisticamente significativo, este correlaciona-se de forma moderadamente fraca e positiva com o PMI ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,347$ ) (Figura 3.6). No úmero, continuam a ser apenas o IC e o C/C com valores estatisticamente significativos, para o sexo feminino. Os dois correlacionam-se de forma negativa com o PMI, sendo que, quando o PMI aumenta o IC tem uma tendência mais significativa para diminuir do que o C/C (IC ( $p < 0,05$ ;  $r = -0,437$ ); C/C ( $p < 0,05$ ;  $r = -0,330$ )(Figura 3.7)).



**Figura 3.6.** Correlação do API com o PMI para o fêmur do sexo feminino, controlando os efeitos do sexo e idade.



**Figura 3.7.** Correlação do IC e C/C com o PMI para o úmero do sexo feminino, controlando os efeitos do sexo e idade.

## 4. Discussão

Este estudo teve como principal objetivo a estimativa do PMI a partir da avaliação da relação dos índices espectrais - BPI, API, C/C, C/P e IC que foram obtidos a partir dos resultados de FTIR-ATR para amostras de fêmur e úmero. No presente capítulo ir-se-ão discutir os resultados obtidos, comparando-os e confrontando-os com estudos anteriormente realizados. A análise por FTIR-ATR de amostras ósseas fornece informações sobre a sua composição química (Petra *et al.*, 2005) e permite identificar os grupos funcionais (Pestle *et al.*, 2014) e a quantidade mineral relativa presente (Miller *et al.*, 2001).

Na análise estatística descritiva dos índices espectrais constataram-se disparidades entre os valores do fêmur e do úmero, o que indica que existe uma variabilidade intraindividual dos parâmetros ósseos. Tal pode ser explicado pelas alterações diagenéticas e diferentes ambientes químicos de enterramento (Francalacci e Tarli, 1988). A própria estrutura, forma, tamanho do osso e remodelação óssea podem interferir nos parâmetros ósseos refletidos nos espectros de FTIR-ATR (Reznikov *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2013). A heterogeneidade do tecido ósseo pode justificar o facto de as relações entre os índices e o PMI serem moderadamente fracas ou fracas, embora, e de acordo com Pedrosa (2019), a amostragem tenha sido realizada no ponto medial das diáfises das peças ósseas analisadas, o que reduz o efeito das variáveis influenciadoras (Thompson *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2018).

O índice de cristalinidade (IC) é usado para estudar as alterações da estrutura e ordenação da rede cristalina na matriz óssea, que se encontram diretamente relacionadas com o comprimento médio do cristal (Shemesh, 1990; Stiner *et al.*, 1995). De acordo com estudos anteriores, os resultados obtidos mediante o rácio presente na Tabela 2.1, encontram-se dentro dos valores expectáveis, 2,50-3,25 (Weiner e Bar-Yosef, 1990; Wright e Schwarcz, 1996; Stiner *et al.*, 1995, 2001; Munro *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2008; Trueman *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009). Em conformidade com a escassa literatura existente sobre este tema (Patonai *et al.*, 2012; Longato *et al.*, 2015), o IC diminuiu progressivamente com o aumento do PMI, ou seja, a rede cristalina vai ficando progressivamente mais desorganizada ou/e com cristais mais pequenos à medida que

o Intervalo *Postmortem* aumenta. A desorganização da rede cristalina pode ser explicada pelo aumento de carbonatos de tipo B na bioapatite, pois o processo de substituição de fosfato por carbonato produz cristais de menores dimensões e com uma maior deformação e tensão estruturais – assim, amostras com alto teor de carbonatos têm um baixo valor de IC (Wright e Schwarcz, 1996; Snoeck *et al.*, 2014; Rey *et al.*, 2007; Grunenwald *et al.*, 2014; Thompson, 2015).

O índice C/C estabelece a relação entre os carbonatos (A+B) e os carbonatos do tipo B. O seu aumento pode ser provocado pela alteração da proporção de carbonato tipo A e do tipo B, pelo aumento do carbonato tipo A ou pela diminuição do carbonato tipo B (Snoeck *et al.*, 2014). No entanto, ao longo do presente estudo, há uma diminuição da razão C/C com o aumento do PMI (tal como para o índice IC). Em Snoeck *et al.* (2014) e Madupalli *et al.* (2017) é referido que a quantidade de carbonato tipo A é muito reduzida. Por outro lado, Madupalli *et al.* (2017) referem que a substituição por carbonatos tipo B é cineticamente favorecida porque a substituição de fosfato por carbonato causa uma menor perturbação na molécula da bioapatite. Deste modo, durante o período de enterramento, a substituição por carbonatos do tipo B é mais rápida e completa do que a substituição por carbonatos do tipo A, que é mais lenta (Wright e Schwarcz, 1996). Um aumento em carbonatos do tipo B provoca uma diminuição do índice C/C, pois os carbonatos de tipo A não conseguem permutar à mesma velocidade que os de tipo B. Sabe-se que o aumento de carbonatos de tipo B no osso cortical provoca um baixo valor de IC, uma vez que induzem uma desorganização da rede cristalina. (Legros *et al.*, 1987; Shemesh, 1990; Wright e Schwarcz, 1996).

Durante o período de enterramento, em conformidade com Nielsen-Marsh e Hedges (2000b), é possível haver um ganho de carbonatos na matriz óssea ao longo do tempo, depende das condições do local do enterramento; ou seja, ocorre um aumento do índice BPI (iões carbonato substituem iões fosfato na bioapatite) com o aumento do PMI. Por sua vez, a relação C/P indica o nível de substituição por carbonatos na amostra óssea. Se há um aumento do BPI ocorrerá um aumento do C/P, em proporção direta com o valor de PMI, o que foi confirmado pelos resultados obtidos no presente estudo, que estão de

acordo com dados da literatura (Patonai *et al.*, 2013; Longato *et al.*, 2015). Deste modo, as razões carbonato de tipo B regulam a cristalinidade da bioapatite.

De acordo com a literatura, durante diagênese relativa à idade a estrutura cristalina deverá ficar mais organizada ao longo do tempo, o que pode ser medido pelo fator IC, que aumenta à medida que a bioapatite vai ficando mais organizada (LeGeros, 1981; Shemesh, 1990). Também ocorre uma mudança ao nível do C/P, que vai diminuindo ao longo do tempo, refletindo uma perda diagenética de carbono. No presente estudo, os resultados obtidos indicam que não só ocorre um aumento do nível de carbonato como, também, uma diminuição do IC com o PMI e com a idade. Relativamente ao índice C/P não se puderam avaliar os efeitos da idade, visto que não foram obtidos valores estatisticamente significativos para esta relação espectral.

No estudo realizado por Sponheimer e Lee-Thorp (1999), os valores do API obtidos diminuíram ao longo do tempo, pois durante a dissolução, os carbonatos de tipo A são deslocados para os locais de carbonato de tipo B. Mas, no presente estudo, os valores do API aumentaram ao longo do tempo. Este facto pode ser explicado pelo aumento de carbonatos de tipo B que afeta substancialmente as frequências vibracionais dos carbonatos de tipo A ( $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_A$ ), dando assim origem a resultados erróneos (Madupalli *et al.*, 2017).

De acordo com Patonai *et al.* (2013), os valores de IC e de C/P para amostras de osso arqueológico devem situar-se nos intervalos 2,84-3,78, e 0,10-0,33, respetivamente. Para a amostra arqueológica analisada no presente estudo obteve-se um valor ligeiramente mais baixo para IC (2,800) e C/P igual a 0,273. Em relação às razões C/C e API não se podem tirar conclusões, pois não existem dados na literatura para comparação. O valor medido para BPI é oposto ao que seria esperado, pois teve um valor inferior aos valores médios da restante amostra ( $0,596 < 1,110$  e  $1,188$ ). Em concordância com as conclusões retiradas acima, a amostra de osso arqueológico deveria apresentar um valor de BPI mais alto. Por outro lado, enquanto as amostras de osso forense agora estudadas foram retiradas de fémur e úmero, a amostra arqueológica foi obtida a partir de uma clavícula e, em conformidade com outros estudos (Child, 1995; Jans *et al.*, 2004), o fémur e o úmero são mais resilientes aos efeitos diagenéticos devido ao seu tamanho e robustez.

## 5. Conclusão

O desenvolvimento de novos métodos para a estimativa do PMI a partir de restos esqueléticos é absolutamente essencial em contextos forenses. Os constituintes orgânicos e inorgânicos do tecido ósseo fornecem um espectro de infravermelho característico, sendo assim o método de FTIR-ATR extremamente adequado para fornecer informações detalhadas sobre amostras de osso. Além disso, trata-se de uma técnica não destrutiva, pouco dispendiosa, que necessita de pequenas quantidades de amostra para análise e não requer qualquer tipo de preparação da amostra.

A aplicação dos índices espectrais BPI, API, IC, C/C e C/P em amostras de úmero e fêmur teve como objetivo implementar um novo método para a estimativa do Intervalo *Postmortem* (PMI). Neste sentido, foi necessário comparar os valores obtidos para as amostras ósseas, constatando-se que existe uma variação intraindividual dos índices em estudo, sendo por isso, imprescindível que as futuras equipas de investigação adotem o mesmo tipo de amostragem para, posteriormente, haver uma possível comparação de dados.

Alterações na bioapatite afetam diferentes componentes ósseos de diferentes formas, todas elas com implicações *in vivo*, nas alterações *postmortem* e na diagénese (LeGeros, 1991; Lee-Thorp, 2002). O aumento de carbonato na matriz óssea não só implica um aumento do BPI como também do C/P, mas representa um decréscimo ao nível da cristalinidade no osso, uma diminuição do índice C/C e resultados deturpados em relação ao API. Há estudos que avaliaram a precisão com a qual os índices C/P e IC representam os processos diagenéticos, concluindo que estes índices não são métodos viáveis para avaliar as alterações na rede cristalina (Stathopoulou *et al.*, 2008; Trueman *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2008). Em relação, à amostra de osso arqueológico seria necessário uma maior amostragem para poder discutir e tirar conclusões sobre os resultados obtidos e, também, recolher uma amostra do mesmo tipo de peça óssea que as restantes.

Em relação aos efeitos do sexo e idade, a maioria das correlações estatisticamente significativas correspondem ao sexo feminino, para o qual as amostras têm idades

compreendidas entre os 50 e os 97 anos. A idade tem implicações na matriz óssea e com o progresso da idade à morte a estrutura cristalina torna-se mais desordenada com cristais de menores dimensões, devido ao incremento de carbonato do tipo B, sobretudo em indivíduos do sexo feminino (Pedrosa, 2019). Portanto, os resultados obtidos podem ser atribuídos à idade avançada dos indivíduos que constituem a amostra. Seria útil realizar um estudo com uma amostra de indivíduos de várias idades (não-adultos e adultos), para um melhor entendimento das variações do carbonato, após o sepultamento, tanto nos restos esqueléticos como no solo.

É necessário ainda efetuar mais estudos com os parâmetros em causa em relação ao PMI. Os estudos já existentes são escassos e apenas retratam o IC e o C/P sem terem em conta outros fatores com possíveis efeitos nesta relação como o sexo e idade. É imprescindível realizarem-se estudos, não só com outros índices mas também para poder perceber quais os efeitos dos parâmetros do perfil biológico na relação dos índices com o PMI e até mesmo de patologias associadas ao tecido ósseo.

Em suma, a análise por FTIR-ATR permite recolher informações importantes sobre as propriedades químicas do tecido ósseo e compreender melhor como elas se alteram, nomeadamente a partir das variações ao nível do conteúdo em carbonatos sendo assim muito úteis à Antropologia Forense. Os índices IC e C/C mostraram ter um grande potencial para a estimativa do PMI, sobretudo no sexo feminino (controlando os efeitos do sexo e idade). Os conhecimentos adquiridos a partir deste estudo são inovadores, mas esta investigação deverá ser continuada de modo a poder confirmar os presentes resultados e conclusões, atingindo-se assim um melhor entendimento da temática desta dissertação.

## 6. Referências Bibliográficas

- Ajie, H.O.; Hauschka, P.V.; Kaplan, I.R. 1991. Comparison of bone collagen and osteocalcin for determination of radiocarbon ages and paleodietary reconstruction Earth and Planetary Science Letters 107:380–388
- Astala, R.; Stott, M. J. 2005. First principles investigation of mineral component of bone: CO<sub>3</sub> substitutions in hydroxyapatite. Chemistry of Materials. 17(16): 4125–4133. DOI: 10.1021/cm050523b
- Aszódi, A.; Bateman, J.F.; Gustafsson, E.; Boot-Handford, R.; Fässler, R. 2000. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice?. Cell Structure and Function. 25(2):73–84. DOI: 10.1247/csf.25.73
- Bacon, G. E. 1990. The dependence of human bone texture on life style. Royal Society of London. Series B, Biological Sciences London 240: 363–370. DOI: 10.1098/rspb.1990.0042
- Beasley, M. M.; Bartelink, E. J.; Taylor, L.; Miller, R. M. 2014. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. Journal of Archaeological Science, 46: 16-22. DOI: 10.1016/j.jas.2014.03.008.
- Berna, F.; Matthews, A.; Weiner, S.; 2004. Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallization window. Journal of Archaeological Science 31:867–882. DOI:10.1016/j.jas.2003.12.003
- Boaks, A.; Siwek, D.; Mortazavi, F. 2014. The temporal degradation of bone collagen: A histochemical approach. Forensic Science International, 240: 104-110. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.04.008
- Buekenhout, I. 2017. O Intervalo Pos-Mortem nas Ciências Forenses. In: Investigação Criminal, Ciências Criminais e Forenses. ASFIC/PJ Nº:1 : 104-1
- Buekenhout, I.; Cravo, I.; Vieira, D.N.; Cunha, E.; Ferreira, M.T. 2018. Applying standardized decomposition stages when estimating the PMI of buried remains: reality or fiction?, Australian Journal of Forensic Sciences, 50:1, 68-81, DOI: 10.1080/00450618.2016.1212268
- Butu, M.; Rodino, S.; Pentea, M.; Negrea, A.; Petrache, P.; Butnariu, M. 2014. IR spectroscopy of the flour from bones of European hare. Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures, 9(4): 1317-1322
- Carden, A.; Morris, M. D. 2000. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). Journal of Biomedical Optics, 5(3): 259-269. DOI: 10.1117/1.429994.

- Chadefaux, C.; Le Hô, A-S.; Bellot-Gurlet, L.; Reiche, I. 2009. Curve-fitting micro-ATRFTIR studies of the amide I and II bands of type I collagen in archaeological bone materials. *ePreservation Science*, 6: 129-137.
- Child, A. M. 1995. Towards and Understanding of the Microbial Decomposition of Archaeological Bone in the Burial Environment. *Journal of Archaeological Science*, 22(2): 165-174. DOI: 10.1006/jasc.1995.0018.
- Clarke B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3 Suppl 3(Suppl 3), S131–S139. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>
- Coates, J. 2000. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Meyers, R.A. (ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, Reino Unido, John Wiley & Sons, Ltd.: 10815–10837. ISBN: 9780470027318.
- Cockle, D.L.; Bell, L. S.2015. Human decomposition and the reliability of a ‘Universal’ model for post mortem interval estimations. *Forensic Science International*.253:136.e1-136.e9. DOI:10.1016/j.forsciint.2015.05.018.
- Collins, M.J.; Galley, P. 1998. Towards an optimal method of archaeological collagen extraction: the influence of pH and grinding. *Anc Biomol* 2:209–223 Collins, M.J.; Hiller, C.M. 2002. The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*. 44:383–394. DOI: 10.1111/1475-4754.t01-1-00071
- Courtin, G.; Fairgrieve, S. 2004. Estimation of *Postmortem* Interval (PMI) as Revealed Through the Analysis of Annual Growth in Woody Tissue. *Journal of Forensic Sciences* 49, 4: 1-3. DOI: 10.1520/JFS2003419
- Datta, H.K.; Ng,W.F.; Walker, J.A.; Tuck, S.P.; Varanasi, S.S. 2008. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*. 61(5): 577–587. DOI: 10.1136/jcp.2007.048868
- Dal Sasso, G.; Lebon, M.; Angelini, I.; Maritan, L.; Usai, D.; Artioli, G. 2016. Bone diagenesis variability among multiple burial phases at Al Khiday (Sudan) investigated by ATR-FTIR spectroscopy. *Journal Palaeogeography, Paleoclimatology, Palaecology*. 463, 168–179. DO: 10.1016/j.palaeo.2016.10.005
- Dent, B.B.; Forbes, S.; Stuart, B. 2004. Review of human decomposition processes in soil. *Environ Geol*.45(4):576–585. DOI: 10.1007/s00254-003-0913-z DiMaio, D.; DiMaio, V.J. 2001. *Forensic pathology (Second edition)*. Boca Raton (FL): CRC Press. ISBN: 9780849300721
- Dix, J.; Graham, M. 1999. *Time of Death, Decomposition and Identification: An Atlas*. CRC Press. ISBN: 1420048287 Donaldson, A.E.; Lamont, I.L. 2014. Estimation of

Estimativa do Intervalo *Postmortem*

*postmortem* interval using biochemical markers. Australian Journal of Forensic Sciences.46: 8–26.DOI:10.1080/00450618. 2013.784356

Dutta, A. 2017. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: Thomas, S.; Thomas, R.; Zachariah, A.; Mishra, R. (eds.). Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization, Elsevier: 73-93. ISBN: 9780323461467

Ellis, D. I.; Goodacre, R. 2006. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. Analyst, 131(8): 875-885. DOI: 10.1039/b602376m

Eriksen, E.F.; Axelrod, D.W.; Melsen, F. 1994. Bone Histomorphometry, New York, Raven Press 1 –12. DOI: 10.1016/B978-0-12-809965-0.00053-7

Ferreira, M. T. 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, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra. Coimbra.

Ferreira, M. T.; Cunha, E. 2012 Será credível estimar o PMI em restos cadavéricos em avançado estado de decomposição?. Cadernos do GEEvH, 2: 7-20.

Ferreira, M. T.; Coelho, C.; Makhoul, C.; Navega, D.; Gonçalves, D.; Cunha, E.; Curate, F. 2020. A New data about the 21st Century Identified Skeletal Collection (University of Coimbra, Portugal), International Journal of Legal Medicine. DOI: 10.1007/s00414-020-02399-6

Ferreira, M.T.; Coelho, C.; Wasterlain, S.N. 2019. Discarded in the trash: Burials of African enslaved individuals in Valle da Gafaria, Lagos, Portugal (15th–17th centuries). International Journal of Osteoarchaeology. 29: 670– 680. DOI: .org/10.1002/oa.2747

Festa, G.; Andreani, C.; Baldoni, M.; Cipollari, V.; Martínez-Labarga, C.; Martini, F.; Rickards, O.; Rolfo, M.F.; Sarti, L.; Volante, N.; Senesi, R.; Stasolla, F.R.; Parker, S.F.; Vassalo, A.R.; Mamede, A.P.; Batista de Carvalho, L.A.E.; Marques, M.P.M. 2019. First analysis of ancient burned human skeletal remains probed by neutron and optical vibrational spectroscopy. American Association for the Advancement of Science. 5(6). DOI: 10.1126/sciadv.aaw1292

Figueiredo, M. M.; Gamelas, J. A. F.; Martins, A. G. 2012. Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy. In: Theophanides, T. (ed.). Infrared spectroscopy – Life and Biomedical Sciences. InTech: 315-338. ISBN: 978-953-51-0538-1.

Forbes, S.L. 2009. Potential determinants of *postmortem* and postburial interval of buried remains. In: Tibbett, M.; Carter, D.O. (eds) Potential determinants of *postmortem* and postburial interval of buried remains. Soil analysis in forensic taphonomy: chemical and biological effects of buried human remains. Boca Raton (FL): CRC Press: 225–246. ISBN: 9781420069914

- Forbes, S.L.; Stuart, B.H.; Dent, B.B. 2002. The identification of adipocere in grave soils. *Forensic Science International*. 127, pp. 225 – 230. DOI: 10.1016/s0379-0738(02)00127-5
- Francalacci P.; Tarli S. B. 1988 Multielementary Analysis of Trace Elements and Preliminary Results on Stable Isotopes in Two Italian Prehistoric Sites. Methodological Aspects. In: Grupe G.; Herrmann B. (eds.). *Trace Elements in Environmental History. Proceedings in Life Sciences*. Berlim, Heidelberg, Springer: 41-52. ISBN: 978-3-642-73297-3.
- Frątczak-Łagiewska, K.; Matuszewski, S. 2019. The quality of developmental reference data in forensic entomology: Detrimental effects of multiple, in vivo measurements in *Creophilus maxillosus* L. (Coleoptera: Staphylinidae). *Forensic Science International*. 298:316-322. DOI: 10.1016/j.forsciint.2019.02.059.
- Galloway, A. 1997. The Process of Decomposition: A Model From teh Arizona-Sonoran Desert. In: Haglund, W.D.; Sorg, M.H.(Eds) *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remais*. CRC Press: 139-150
- Galloway, A., W.H. Birkby, A.M. Jones, T.H. Henry, and B.O. Parks 1989. Decay Rates of Human Remains in an Arid Environment. *Journal of Forensic Sciences* 34:607–616. DOI: 10.1520/JFS12680J
- Gill-King, H. 1997. Chemical and ultrastructural aspects of decomposition. In: Sorg, M. H.; Haglund, W. D. *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains (First Edition)*; CRC Press: 93-108. ISBN: 9780849394348
- Goff, M.L.; Flynn, M.M. 1991. Determination of *Postmortem* Interval by Arthropod Succession: A Case Study from the Hawaiian Islands. *Journal of Forensic Sciences* 36:607–614. DOI: 10.1520/JFS13067J
- Gonçalves, D.; Vassalo, A. R.; Mamede, A. P.; Makhoul, C.; Piga, G.; Cunha, E.; Marques, M. P. M.; Batista de Carvalho, L. A. E. 2018. Crystal clear: Vibrational spectroscopy reveals intrabone, intraskeleton, and interskeleton variation in human bones. *American journal of physical anthropology*, 166(2): 296-312. DOI: 10.1002/ajpa.23430
- Griffiths, P. R. 2006 Introduction to Vibrational Spectroscopy. In: Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R. (eds.). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chichester, Reino Unido, John Wiley & Sons, Ltd.: 33-43. ISBN: 978-0-471-98847-2 Griffiths, P.R; Haseth, J.A. 2007. *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. John Wiley & Sons. ISBN: 0470106298
- Gourion-Arsiquaud, S.; Lukashova, L.; Power, J.; Loveridge, N.; Reeve, J.; Boskey, A. L. 2013. Fourier Transform Infrared Imaging of Femoral Neck Bone: Reduced Heterogeneity of Mineral-to-Matrix and Carbonate-to-Phosphate and More Variable Crystallinity in Treatment-Naive Fracture Cases Compared With Fracture-

Estimativa do Intervalo *Postmortem*

- Free Controls. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(1): 150-161. DOI: 10.1002/jbmr.1724.
- Grunenwald, A.; Keyser, C.; Sautereau, A. M.; Crubézy, E.; Ludes, B.; Drouet, C. 2014. Revisiting carbonate quantification in apatite (bio) minerals: a validated FTIR methodology. *Journal of Archaeological Science*, 49: 134-141. DOI: 10.1016/j.jas.2014.05.004.
- Grupe, G. 1988. Impact of the choice of bone samples on trace element data in excavated human skeletons. *Journal of Archaeological Science*, 15(2): 123-129. DOI: 10.1016/0305-4403(88)90002
- Hedges, R.E.M. 2002. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry* 44:319–328. DOI:10.1111/1475-4754.00064
- High, K.; Milner, N.; Panter, I.; Penkman, K.E.H. 2015. Apatite for destruction: investigating bone degradation due to high acidity at Star Carr *Journal of Archaeological Science* 59:159–168. DOI:10.1016/j.jas.2015.04.001
- Hodgins, G. W.L. 2009 Measuring atomic bomb-derived <sup>14</sup>C levels in human remains to determine Year of Birth and/or Year of Death. NCJRS
- Hoke, N.; Grigat, A.; Grupe, G.; Harbeck, M. 2013. Reconsideration of bone *postmortem* interval estimation by UV-induced autofluorescence. *Forensic Science International*.228: 176.e1-176.e6. DOI: 10.1016/j.forsciint.2013.03.013
- Hollund, H. I.; Ariese, F.; Fernandes, R.; Jans, M. M. E.; Kars, H. 2013. Testing an alternative high- throughput tool for investigating bone diagenesis: FTIR in attenuated total reflection (ATR) mode. *Archaeometry*, 55(3): 507-532. DOI: 10.1111/j.1475-4754.2012.00695.x.
- Introna, F.; Di Vella, G.; Campobasso, C. 1999. Determination of *Postmortem* Interval from Old Skeletal Remains by Image Analysis of Luminol Test Results. *Journal of Forensic Sciences* 44, 3: 535-538. DOI: 10.1520/JFS14505J
- Iqbal, M. A.; Maiken, U.; Forbes, S. L.. 2018. Recent advances in the estimation of post-mortem interval in forensic taphonomy. *Australian Journal of Forensic Sciences*. DOI: 10.1080/00450618.2018.1459840.
- Jans, M. M. E.; Nielsen-Marsh, C. M.; Smith, C. I.; Collins, M. J.; Kars, H. 2004. Characterisation of microbial attack on archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 31(1): 87-95. DOI: 10.1016/j.jas.2003.07.007.
- Kendall, C.; Eriksen, A.M.H.; Kontopoulos, I.; Collins, M.J.; Turner-Walker, G. 2018. Diagenesis of archaeological bone and tooth. *Journal Palaeogeography, Paleoclimatology, Palaecology* 491:21– 37.DOI: 10.1016/j.palaeo.2017.11.041.

- Kimura-Suda, H.; Ito, T. 2017. Bone quality characteristics obtained by Fourier transform infrared and Raman spectroscopic imaging. *Journal of Oral Biosciences*, 59(3): 142-145. DOI: 10.1016/j.job.2017.04.002.
- Knight, B.; Saukko, P. 2004. *Knights Forensic Pathology (Third Edition)*. Hodder Arnold. ISBN: 978-0340760444
- Kontopoulos, I.; Penkman, K.; Liritzis, I. 2019. Bone diagenesis in a Mycenaean secondary burial (Kastrouli, Greece). *Archaeological and Anthropological Sciences* 11, 5213–5230. DOI: 10.1007/s12520-019-00853-0
- Koon H. E. C.; Nicholson R. A.; Collins M.J. 2003. A practical approach to the identification of low temperature heated bone using TEM. *Journal of Archaeological Science* 30:1393–1399. DOI: 10.1016/S0305-4403(03)00034-7
- Lebon, M.; Reiche, I.; Bahain, J.-J.; Chadeaux, C.; Moigne, A.-M.; Fröhlich, F.; Sémah, F.; Schwarcz, H.P.; Falguères, C. 2010. New parameters for the characterization of diagenetic alterations and heat-induced changes of fossil bone mineral using Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of Archaeological Science*, 37: 2265-2276. DOI: 10.1016/j.jas.2010.03.024
- Lebon, M.; Reiche, I.; Fröhlich, F.; Bahain, J.-J.; Falguères, C. 2008. Characterization of archaeological burnt bones: contribution of a new analytical protocol based on derivative FTIR spectroscopy and curve fitting of the  $\nu_1\nu_3$  PO<sub>4</sub> domain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392: 1479-1488. DOI:10.1007/s00216-008-2469-y
- LeGeros, R. Z. 1981. Apatites in biological systems. *Progress in Crystal Growth and Characterization*, 4(1-2): 1-45. DOI: 10.1016/0146-3535(81)90046-0.
- LeGeros, R. Z. 1991. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Paris, Karger: 172-201. DOI: 10.1159/000419241.
- Lee-Thorp, J. 2002. Two decades of progress towards understanding fossilization processes and isotopic signals in calcified tissue minerals. *Archaeometry*, 44(3): 435-446. DOI: 10.1111/1475-4754.t01-1-00076.
- Lee-Thorp, J.; Sponheimer, M. 2003. Three case studies used to reassess the reliability of fossil bone and enamel isotope signals for paleodietary studies. *Journal of Anthropological Archaeology*, 22(3): 208-216. DOI: 10.1016/S0278-4165(03)00035-7
- Lee-Thorp, J. A.; van der Merwe, N. J. 1991. Aspects of the chemistry of modern and fossil biological apatites. *Journal of Archaeological Science*, 18(3): 343-354. DOI: 10.1016/0305-4403(91)90070-6.
- Longato, S.; Wöss, C.; Hatzer-Grubwieser, P.; Bauer, C.; Parson, W.; Unterberger, S. H.; Kuhn, V.; Pemberger, N.; Pallua, A. K.; Recheis, W.; Lackner, R.; Stalder, R.; Pallua, J. D. 2015. Post-mortem interval estimation of human skeletal remains by microcomputed tomography, mid-infrared microscopic imaging and energy

Estimativa do Intervalo *Postmortem*

- dispersive X-ray mapping. *Analytical Methods*, 7(7): 2917-2927. DOI: 10.1039/c4ay02943g.
- Madupalli, H.; Pavan, B.; Tecklenburg, M. M. 2017. Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite. *Journal of Solid State Chemistry*, 255: 27-35. DOI: 10.1016/j.jssc.2017.07.025.
- Mamede, A. P.; Gonçalves, D.; Marques, M. P. M.; Batista de Carvalho, L. A. 2018. Burned bones tell their own stories: A review of methodological approaches to assess heat-induced diagenesis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(8): 603-635. DOI: 10.1080/05704928.2017.1400442
- Mamede, A.; Vassalo, A.R.; Cunha, E.; Gonçalves, D.; Parker, S.F.; Batista de Carvalho, L. A.; Marques, M. P. M. 2018. Biomaterials from Human Bone – Probing Organic Fraction Removal by Chemical and Enzimatic Methods. *RSC Adv* 8, 27260–27267. DOI: 10.1039/C8RA05660A
- Mamede, A.; Vassalo, A.R.; Piga, G.; Cunha, C.; Parker, S.F.; Marques, M.P.M.; Batista de Carvalho, L.A.E.; Gonçalves, D. 2018. Potential of Bioapatite Hydroxyls for Research on Archeological Burned Bone. *Analytical Chemistry*. 90(19): 11556-11563. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b02868
- Mann, R.W.; Bass, W.M.; Meadows, L. 1990. Time Since Death and Decomposition of the Human Body: Variables and Observations in Case and Experimental Field Studies. *Journal of Forensics Sciences*, 35:103-111. DOI: 10.1520/JFS12806J
- Marques, M.P.M.; Gonçalves, D.; Amarante, A.I.C.; Makhoul, C.I.; Parker S.F.; Batista de Carvalho, L.A.E. 2016. Osteometrics in burned human skeletal remains by neutron and optical vibrational spectroscopy *RSC Adv*.6. DOI: 10.1039/C6RA13564A
- Marques, M.P.M.; Mamede, A.P.; Vassalo, A.R.; Makhoul, C.; Cunha, E.; Gonçalves, D.; Parker, S.F.; Batista de Carvalho, L.A.E. 2018. Heat-induced Bone Diagenesis Probed by Vibrational Spectroscopy. *Sci Rep* 8, 15935. DOI:10.1038/s41598-018-34376-w
- Mays, S. 2002. *The Archaeology of Human Bones*. Routledge. ISBN: 1134687931
- Megyesi, M.; Nawrocki, S.; Haskell, N. 2005. Using Accumulated Degree-Days to Estimate the *Postmortem* Interval from Decomposed Human Remains. *Journal of forensic sciences*. 50. 618-26. 10.1520/JFS2004017
- Miller, L. M.; Vairavamurthy, V.; Chance, M. R.; Mendelsohn, R.; Paschalis, E. P.; Betts, F.; Boskey, A. L. 2001. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the  $\nu_4$  PO<sub>4</sub> 3– vibration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1527(1-2): 11-19. DOI: 10.1016/S0304-4165(01)00093-9.

- Monnier, G. F. 2018. A review of infrared spectroscopy in microarchaeology: Methods, applications, and recent trends. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 18: 806-823. DOI: 10.1016/j.jasrep.2017.12.029
- Müller, K.; Chadeaux, C.; Thomas, N.; Reiche, I. 2011. Microbial attack of archaeological bones versus high concentrations of heavy metals in the burial environment. A case study of animal bones from a mediaeval copper workshop in Paris. *Journal of Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. 310: 39-51. DOI: 10.1016/j.palaeo.2011.03.023.
- Munro, L.E.; Longstaffe, F.J.; White, C.D. 2007. Burning and boiling of modern deer bone: effects on crystallinity and oxygen isotope composition of bioapatite phosphate. *Journal of Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 249, 90-102. DOI: 10.1016/j.palaeo.2007.01.011
- Nagy, G.; Lorand, T.; Patonai, Z.; Montsoko, G.; Bajnoczky, I.; Marcsik, A.; Mark, L. 2007. Analysis of pathological and non-pathological human skeletal remains by FT-IR spectroscopy. *Forensic Science International* 175, 55-60. DOI: 10.1016/j.forsciint.2007.05.008
- Nakano, T.; Umakoshi, Y.; Tokumura, A. 2002. Variation in crystallinity of hydroxyapatite and the related calcium phosphates by mechanical grinding and subsequent heat treatment. *Metallurgical and Materials Transactions A* 33, 521–528. DOI:10.1007/s11661-002-0114-5
- Nawrocki, S.P. 2009. Forensic taphonomy. In: S. Blau & D.H. Ubelaker (ed.) *Handbook of forensic anthropology and archaeology*. Left Coast Press: 284-294. ISBN: 9781629583853
- Nielsen-Marsh, C.M.; Hedges, R.E.M. 1999. Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies. *Archaeometry* 41(1), 165-174. DOI:10.1111/j.1475-4754.1999.tb00858.x
- Nielsen-Marsh, C.; Hedges, R.E.M. 2000. Patterns of Diagenesis in Bone II: Effects of Acetic Acid Treatment and the Removal of Diagenetic CO<sub>2</sub>-. *Journal of Archaeological Science* 27: 1151-1159. DOI: 10.1006/jasc.1999.0538.
- Nielsen-Marsh, C.; Gernaey, A.; Turner-Walker, G.; et al 2000. The chemical degradation of bone. In: Cox M, Mays S (eds) *Human osteology: in archaeology and forensic science*. Cambridge University Press, pp 439–454
- Ott S. M. 2018. Cortical or Trabecular Bone: What's the Difference? *American Journal of Nephrology*. 47:373-375. doi: 10.1159/000489672
- Paczkowski, S.; Schütz, S. 2011. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue *Applied Microbiology and Biotechnology*. 91(4):917–935. DOI: 10.1007/s00253-011-3417-x

- Patonai, Z.; Maasz, G.; Avar, P.; Schmidt, J.; Lorand, T.; Bajnoczky, I.; Mark, L. 2013. Novel dating method to distinguish between forensic and archeological human skeletal remains by bone mineralization indexes. *International Journal of Legal Medicine*, 127(2): 529-533. DOI: 10.1007/s00414-012-0785-4.
- Pedrosa, M. 2019. Para além da métrica e da morfologia: Influência da idade à morte, sexo, densidade mineral óssea, massa óssea, preservação e patologias na análise química por FTIR-ATR. Dissertação em Antropologia Forense apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Pestle, W. J.; Ahmad, F.; Vesper, B. J.; Cordell, G. A.; Colvard, M. D. 2014. Ancient bone collagen assessment by hand-held vibrational spectroscopy. *Journal of Archaeological Science*, 42: 381-389. DOI: 10.1016/j.jas.2013.11.014
- Pinheiro, J. 2006. Decay Process of a Cadaver. In: Schimtt, A.; Cunha, E.; Pinheiro, J. *Forensic Anthropology and Medicine: Complementary Sciences From Recovery to Cause of Death*. Humana Press: 85-116
- Powers, R.H. 2005. The decomposition of human remains, a biochemical perspective. In: Rich, J.; Dean, D.E.; Powers, R.H. (eds) *Forensic Medicine of the Lower Extremity: Human Identification and Trauma Analysis of the Thigh, Leg and Foot*. New Jersey: Humana press INC:3 – 15. ISBN: 978-1-58829-269-8
- Quatrehomme, G.; Lacoste, A.; Bailet, P.; Grévin, G.; Ollier, A. 1997. Contribution of Microscopic Plant Anatomy to *Postmortem* Bone Dating. *Journal of Forensic Sciences* 42, 1: 140-143. DOI: 10.1520/JFS14084J
- Rey, C.; Collins, B.; Goehl, T.; Dickson, I. R.; and Glimcher, M. J. 1989. The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcif. Tissue Int.* 45(3): 157–164. DOI: 10.1007/bf02556059
- Rey, C.; Combes, C.; 2014. What bridges mineral platelets of bone? *Bonekey Rep* 3:586. DOI:10.1038/bonekey.2014.81) (Trueman, C.N. 2013. Chemical taphonomy of biomineralized tissues. *Palaeontology* 56:475–486. DOI:10.1111/pala.12041
- Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Sfihi, H.; Barroug, A. 2007. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2): 198-205. DOI: 10.1016/j.msec.2006. 05.015.
- Reznikov, N.; Chase, H.; Brumfeld, V.; Shahar, R.; Weiner, S. 2015. The 3D structure of the collagen fibril network in human trabecular bone: Relation to trabecular organization. *Bone*, 71: 189-195. DOI: 10.1016/j.bone.2014.10.017.
- Rogers, C. J. 2010. *Dating Death: Forensic Taphonomy and the Postmortem Interval*. Tese de Doutorado apresentada à Universidade de Wolverhampton.

- Ruppel, M.E.; Burr, D.B.; Miller, L.M. 2006. Chemical makeup of microdamaged bone differs from undamaged bone. *Bone*, 39: 318-324. DOI: 10.1016/j.bone.2006.02.052
- Salesse, K.; Dufour, E.; Lebon, M.; Wurster, C.; Castex, D.; Bruzek, J.; Zazzo, A., 2014. Variability of bone preservation in a confined environment: the case of the catacomb of Sts Peter and Marcellinus (Rome, Italy). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. DOI: 10.1016/j.palaeo.2014.07.021
- Schwarcz, H.P., Agur, K. and Jantz, L.M. 2010. A New Method for Determination of *Postmortem* Interval: Citrate Content of Bone. *Journal of Forensic Sciences* 55: 1516-1522. doi:10.1111/j.1556-4029.2010.01511.x
- Shemesh, A. 1990. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54(9): 2433-2438. DOI: 10.1016/0016-7037(90)90230-I.
- Sillen, A.; Morris, A. 1996. Diagenesis of bone from Border Cave: implications for the age of the Border Cave hominids. *Journal of Human Evolution*, 31(6): 499-506. DOI: 10.1006/jhev.1996.0075.
- Skinner, M.F.; Jones, S.J. 1996. The speed of *postmortem* change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Science International*.82:129–140. DOI:10.1016/0379-0738(96)01984-6
- Snoeck, C.; Lee-Thorp, J. A.; Schulting, R. J. 2014. From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 416: 55-68. DOI: 10.1016/j.palaeo.2014.08.002.
- Sponheimer, M.; Lee-Thorp, J. A. 1999. Alteration of Enamel Carbonate Environments during Fossilization. *Journal of Archaeological Science*, 26(2): 143-150. DOI: 10.1006/jasc.1998.0293
- Statheropoulos, M.; Agapiou, A.; Zorba, E.; Mikedi, K.; Karma, S.; Pallis, G.; Eliopoulos, C.; Spiliopoulou, C. 2011. Combined chemical and optical methods for monitoring the early decay stages of surrogate human models. *Forensic Science International* 210(1-3):154–163. DOI: 10.1016/j.forsciint.2011.02.023
- Stiner, M.C.; Kuhn, S.L.; Surovell, T.A.; Goldberg, P.; Meignen, L.; Weiner, S.; Bar-Yosef, O. 2001. Bone preservation in Hayonim Cave (Israel): a macroscopic and mineralogical study. *Journal of Archaeological Science* 28, 643-659. DOI: 10.1006/jasc.2000.0634
- Stuart, B. H.; Ando, D. J. 1997. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. Chichester, Reino Unido, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-471-97414-7
- Stuart, B. 2005. Infrared spectroscopy. In: Seidel, A. (ed.). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Hoboken, NJ, EUA, John Wiley & Sons, Inc.: 1–20. ISBN: 978-0-471-48494-3

- Surovell, T.A.; Stiner, M.C. 2001. Standardizing Infra-red Measures of Bone Mineral Crystallinity: an Experimental Approach. *Journal of Archaeological Science*.28(6): 633- 642. DOI: 10.1006/jasc.2000.0633
- Swann L. M.; Forbes, S.; Lewis, S. 2010, Analytical separations of mammalian decomposition products for forensic science: a review. *Analytica Chimica Acta*.682(1-2):9–22. DOI: 10.1016/j.aca.2010.09.052
- Taichman, R.S. 2005. Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 105 :2631 –2639. DOI: 10.1182/blood-2004-06- 2480
- Thompson, T. J. U. 2015. The analysis of heat-induced crystallinity change in bone. In: *The analysis of burned human remains*, Schmidt, C.W., Symes, S.A., Eds., Elsevier: 323–337. ISBN: 9780128004517
- Thompson, T. J. U.; Islam, M.; Bonniere, M. 2013. A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra. *Journal of Archaeological Science*, 40(1): 416-422. DOI: 10.1016/j.jas.2012.07. 008
- Thompson, T. J. U.; Islam, M.; Piduru, K.; Marcel, A. 2011. An investigation into the internal and external variables acting on crystallinity index using Fourier Transform Infrared Spectroscopy on unaltered and burned bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 299(1-2): 168-174. DOI: 10.1016/j.palaeo.2010.10.044.
- Thompson, T. J. U.; Gauthier, M.; Islam, M. 2009. The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone. *Journal of Archaeological Science*, 36(3): 910-914. DOI: 10.1016/j.jas.2008.11.013.
- Trueman, C.N. 2013. Chemical taphonomy of biomineralized tissues. *Palaeontology*, 56: 475-486. DOI:10.1111/pala.12041
- Trueman, C.N.G.; Behrensmeyer, A.K.; Tuross, N.; Weiner, S. 2004. Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *Journal of Archaeological Science*.Volume 31(6): 721-739. DOI:10.1016/j.jas.2003.11.003.
- Trueman, C. N.; Privat, K.; Field, J. 2008. Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*.266 (3–4), 160–7. DOI:10.1016/j.palaeo.2008.03.038
- Tu, A. 1982. *Raman spectroscopy in biology principles and applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA. ISBN: 978-0471079842
- Turner-Walker, G.; Jans, M. 2008. Reconstructing taphonomic histories using histological analysis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266:227–235. DOI: 10.1016/j.palaeo.2008.03.024

- Ubelaker, D. H. 1997. Taphonomic Applications in Forensic Anthropology. In: Sorg, M. H.; Haglund, W. D. *Forensic Taphonomy: The Postmortem Fate of Human Remains* (First Edition). CRC Press: 77-91. ISBN: 9780849394348.
- Vass, A.A.; Wolt, J.D.; Foss, J.E.; Ammons, J.T.; Bass, W.M. 1992. Time since death determinations of human cadavers using soil solution. *Journal of Forensic Sciences* 37(5):1236–1253.
- Vass, A. A.; Segal, G.; Caton, J.; Synsteliën, J.; Love, J.C.; Skeen, J.; Barshick, S. 2002. Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the *postmortem* interval. *Journal of Forensic Sciences* 47(3):542–553
- Voss, S.C.; Forbes, S.L.; Dadour, I.R. 2008. Decomposition and Insect Succession on Cadavers Inside a Vehicle Environment. *Forensic Science, Medicine and Pathology*. 4:22-32. DOI: 10.1007/s12024-007-0028-z
- Wang, Q.; Zhang, Y.; Lin, H.; Zha, S.; Fang, R.; Wei, X.; Fan, S.; Wang, Z. 2017. Estimation of the late *postmortem* interval using FTIR spectroscopy and chemometrics in human skeletal remains. *Forensic Science International*, 281: 113-120. DOI: 10.1016/j.forsciint.2017.10.033.
- Wang, X. Y.; Zuo, Y.; Huang, D.; Hou, X. D.; Li, Y. B. 2010. Comparative Study on Inorganic Composition and Crystallographic Properties of Cortical and Cancellous Bone. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23(6): 473-480. DOI: 10.1016/S08953988(11)60010-X.)
- Weiner, S.; Bar-Yosef, O. 1990. States of Preservation of Bones from Prehistoric Sites in the Near East: A Survey. *Journal of Archaeological Science*, 17(2): 187-196. DOI: 10.1016/0305-4403(90)90058-D.
- Wilson, I.D.; Poole, C. 2009. *Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science*. Academic Press. ISBN: 0123757274)
- Wilson-Taylor, R. J. 2012. Time Since Death Estimation and Bone Weathering The *Postmortem* Interval In: Tersigni-Tarrant, M.T.; Shirley, N. R.. *Forensic Anthropology: An Introduction*. CRC Press. ISBN: 1439816468
- Wright, L.E.; Schwarcz, H.P. 1996. Infrared and Isotopic Evidence for Diagenesis of Bone Apatite at Dos Pilas, Guatemala: Palaeodietary Implications. *Journal of Archaeological Science*. 23(6): 933-944. DOI: 10.1006/jasc.1996.0087
- Yao, Y.; Wang, Q.; Jing, X.; Li, B.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Li, C.; Lin, H.; Zhang, J.; Wang, Z. 2016. Relationship between PMI and ATR-FTIR Spectral Changes in Swine Costal Cartilages and Ribs. *Fa yi xue za zhi*. 32(1):21-25
- Yerramshetty, J. S.; Lind, C.; Akkus, O. 2006. The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. *Bone*, 39(6): 1236-1243. DOI: 10.1016/j.bone.2006.06.002.

# Apêndices

**Tabela A.1.** Lista de indivíduos, de ambas as coleções (CEI/XXI e Coleção de Escravos Africanos do Valle da Gafaria de Lagos) utilizados neste estudo.

ID	PMI	Sexo	Idade à morte	ID	PMI	Sexo	Idade à morte
1	20	F	64	45	20	F	84
2	20	F	60	46	23	M	84
3	19	F	80	47	20	M	57
4	19	F	76	48	19	M	89
5	19	F	73	50	20	F	89
6	19	M	85	51	20	M	70
7	19	F	86	52	20	F	85
8	19	F	83	53	20	F	77
9	19	M	88	54	19	F	97
10	19	F	68	55	19	F	87
11	19	M	61	56	20	F	87
12	19	M	76	57	21	M	85
13	19	F	68	58	21	M	60
14	19	M	34	59	21	F	85
15	19	M	88	60	21	M	95
16	19	F	88	61	21	F	82
18	19	M	74	62	20	M	60
19	19	F	72	63	20	M	64
20	20	F	92	65	20	F	81
21	19	M	84	67	20	F	91
22	19	F	61	68	20	F	89
23	19	M	74	69	24	F	83
25	22	F	83	70	24	F	90
27	22	M	79	71	20	M	67
28	22	M	78	72	20	M	81
29	22	M	74	73	20	F	92
30	22	M	44	74	25	M	43
31	22	F	90	75	20	F	86
33	22	M	78	76	20	F	60
34	22	M	33	78	19	M	38
35	20	M	75	79	20	M	74
36	23	M	65	80	19	F	88
37	23	F	86	81	19	F	96
38	20	F	50	82	21	F	96
39	20	M	90	83	19	M	61
40	20	F	95	84	19	F	76
41	20	M	92	85	20	F	89
42	20	M	34	87	20	F	83
43	20	M	72	88	19	F	80
44	23	M	82	89	20	F	83
M - Masculino F - Feminino				<b>PAVd'09 ID.25</b>	560	Indeterminado	Adolescente



**Tabela A.2.** Resultado dos coeficientes de correlação de Pearson entre os índices calculados (IC, API, BPI, C/C e C/P) do fêmur e do úmero e o PMI, para a amostra total.

		IC		API		BPI		C/C		C/P		
		<i>n</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>
<b>PMI</b>	Fêmur	80	0,488	-0,079	0,095	0,188	0,169	0,155	0,657	0,050	0,350	0,106
	Úmero	80	<b>0,001</b>	<b>-0,354</b>	0,930	-0,010	0,095	0,189	<b>0,030</b>	<b>-0,244</b>	0,277	0,124

**Tabela A.3.** Resultado dos coeficientes de correlação de Pearson entre os índices calculados (IC, API, BPI, C/C e C/P) do fêmur e do úmero e o PMI controlando os efeitos do sexo, para a amostra total e organizado de acordo com o sexo.

		IC		API		BPI		C/C		C/P		
Sexo		<i>p-value</i>	<i>r</i>									
PMI	Fémur	Feminino	0,273	-0,171	<b>0,026</b>	<b>0,339</b>	<b>0,025</b>	<b>0,342</b>	0,373	-0,139	<b>0,043</b>	<b>0,310</b>
		Masculino	0,920	-0,017	0,342	0,161	0,824	0,038	0,326	0,166	0,938	0,013
	Úmero	Feminino	<b>0,003</b>	<b>-0,446</b>	0,548	0,094	0,058	0,291	<b>0,014</b>	<b>-0,373</b>	0,155	0,220
		Masculino	<b>0,092</b>	<b>-0,281</b>	0,682	-0,070	0,476	0,121	0,508	-0,112	0,705	0,064

**Tabela A.4.** Resultado dos coeficientes da correlação parcial entre os índices calculados (IC, API, BPI, C/C e C/P) do fêmur e do úmero e o PMI controlando os efeitos do sexo e da idade, para a amostra total organizados de acordo com o sexo.

		IC		API		BPI		C/C		C/P		
Sexo		<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>r</i>	
PMI	Fémur	Feminino	0,558	-0,093	<b>0,024</b>	<b>0,347</b>	0,052	0,303	0,666	-0,069	0,090	0,265
		Masculino	0,933	-0,015	0,341	0,164	0,718	0,062	0,360	0,157	0,889	0,024
	Úmero	Feminino	<b>0,004</b>	<b>-0,437</b>	0,346	0,149	0,056	0,297	<b>0,033</b>	<b>-0,330</b>	0,147	0,228
		Masculino	0,105	-0,274	0,741	-0,057	0,437	0,134	0,503	-0,115	0,655	0,077