

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

**ALTERAÇÕES TERMICAMENTE
INDUZIDAS:
Influência da Duração da Exposição ao
Calor na Colorimetria, Morfometria e
Quimiometria**

Bruna Daniela Cunha Gabriel

Dissertação no âmbito do Mestrado em Antropologia Forense orientada pela Professora Doutora Eugénia Maria Guedes Pinto Antunes da Cunha e apresentada ao Departamento de Ciência da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Junho de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado contou com apoios fundamentais e sem os quais não seria possível e por isso estarei eternamente grata.

À Professora Doutora Eugénia Cunha pela orientação, acompanhamento, colaboração, rigor e sábios conselhos ao longo deste projeto.

Aos colegas Calil Makhoul e João Coelho pelo incondicional apoio e dedicação empenhados, por estarem sempre disponíveis e prontos a ajudar mesmo quando estavam longe.

Ao Laboratório de Antropologia Forense por permitir o acesso à coleção e por fornecer ferramentas de trabalho imprescindíveis.

Ao Laboratório de Química que me permitiu a realização das análises químicas que de outra forma não seriam possíveis, em particular ao Professor Doutor Luís Batista de Carvalho pela sua partilha de conhecimentos.

Um profundo agradecimento à minha família e amigos que estiveram sempre lá para mim e me deram suporte, sem o qual nada seria possível.

À Elite - Cláudia Maio, Mariana Pedrosa, Flávia Teixeira e Eduarda Silva - pela estabilidade e união que me proporcionaram, pela amizade e apoio incondicional, pelas noites em que me acompanharam na espera pelo forno, pelos cafés e palavras trocadas no trono, sem os quais teria sido muito difícil.

À Xlipa, eterna amiga e companheira, que ao longo de todo o processo me transmitiu quietude e confiança e por me fazer acreditar que era possível.

Por fim, ao Meu Mi, por estar sempre do meu lado pronto a ouvir pacientemente. Um muito obrigado pelos dias que sacrificou para me ajudar, pelo amor e confiança transmitidos, por cada sorriso e cada gesto meigo.

Resumo

Os ossos constituem um dos tecidos mais resistentes do corpo humano. Em determinados contextos, são dos poucos a resistir aos fatores tafonómicos adversos a que estão sujeitos, como a ação do calor. Deste modo, desempenham um papel deveras importante nas ciências forenses e na antropologia forense em particular cujo objetivo é a identificação da vítima, bem como assistir na determinação da causa e circunstância da morte. Os restos humanos queimados ainda representam um enorme desafio, essencialmente pelas transformações ocorridas ao longo deste processo. O objetivo deste projeto é, avaliar de que forma a duração da queima, a uma temperatura fixa de 700°C, influencia a estrutura química, a cor e a deformação dos ossos. Esta análise é apoiada em análises químicas (FTIR-KBr) e modelos virtuais 3D, realizados antes e depois da queima, numa amostra de 24 úmeros da Coleção de Esqueletos Não Identificados do Cemitério dos Capuchos e mais quatro da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI da Universidade de Coimbra. Todos os dados recolhidos foram analisados estatisticamente em **R**, o que permitiu concluir que existem diferenças químicas antes e após a queima e ainda que a duração de exposição ao calor exerce um papel fulcral no estudo de restos queimados. Relativamente à cor os resultados apontam para a importância da temperatura, mas também para a duração. Morfologicamente, as mudanças registadas não são significativas, e para melhores resultados, novos estudos são necessários.

Apesar do presente estudo se tentar aproximar o mais possível à realidade, tal torna-se difícil visto que os ossos foram submetidos a um aquecimento controlado enquanto num contexto de incêndio, o ambiente é completamente imprevisível.

Pode-se então concluir que o papel da antropologia forense é determinante na resolução de casos que envolvam ossos queimados.

Palavras-chave: antropologia forense; ossos queimados; modelos tridimensionais; análise químicas

Abstract

Bones are one of the most resistant tissues in the human body. In certain contexts, they are among of the few tissues that resist to the adverse taphonomic factors to which they are subjected, such as the action of heat. As such, they play a very important role in forensic sciences, particularly in forensic anthropology, whose aim is the identification as well as to assist in determining the cause and circumstance of death. Burnt human remains still represent a huge challenge, essentially due to the transformations that can occur throughout this process.

In this study, we have evaluated how the burning duration, at a fixed temperature of 700°C, influences the bones' chemical structure, color and deformation. This analysis was performed on vibrational spectroscopy (FTIR-KBr) and 3D virtual models, executed before and after burning, in a sample of 24 humeri from the Non-Identified Skeletal Collection from Cemitério dos Capuchos and another four from the 21st Century Identified Skeletal Collection of the University of Coimbra.

All the collected data were statistically analyzed using R, which allowed to conclude that there are chemical differences before and after the burning process, and that the duration of exposure to the heat plays one of the main roles in the study of burnt skeletal remains. Regarding color, the results point out not only to the importance of temperature but also the duration. Morphologically, the changes recorded are not significant, and for best results, further studies are required.

Although the present study attempts to get as close to reality as possible, it is difficult since the bones have undergone controlled heating and in a fire context the environment is completely unpredictable. It can then be concluded that the role of forensic anthropology is decisive in the resolution of cases involving burnt bones

Keywords: *forensic anthropology; burned bones; three-dimensional models; chemical analysis.*

Tabela de Conteúdos

1. Introdução	1
1.1. Estrutura e composição ósseas	1
1.2. Primeiros estudos realizados em ossos queimados e a sua aplicação em contextos forenses	3
1.3. Alterações termicamente induzidas	5
1.3.1. Variações químicas	8
1.3.2. Variações cromáticas	10
1.3.3. Variações morfométricas	14
1.4. Objetivos	15
1.5. Temperatura específica de 700°C	16
2. Material e Métodos	17
2.1. Amostra	17
2.2. Métodos	19
2.2.1. Fase I: antes da queima	19
2.2.2. Fase II: Queima	21
2.2.3. Fase III: Depois da queima	23
2.2.4. Fase IV: Confronto dos dados	23
3. Resultados	27
3.1. Variações químicas	27
3.2. Variações cromáticas	32
3.3. Variações morfométricas	34

4. Discussão	39
4.1. Variações químicas	39
4.2. Variações cromáticas	43
4.3. Variações morfométricas	44
5. Considerações finais	47
6. Referências Bibliográficas	51
Apêndice 1	61
Apêndice 2	65

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Principais diferenças entre FTIR-ATR e FTIR-KBr	10
Tabela 1.2: Intervalos de temperatura e respetiva cor segundo uma adaptação do modelo de Shipman <i>et al.</i> (1984)	12
Tabela 1.3: Código de atribuição de cor consoante o grau de calcinação. Adaptação do modelo de Stiner <i>et al.</i> (1995)	12
Tabela 2.1: Distribuição da amostra da Coleção de Esqueletos Não Identificados por sexo	18
Tabela 2.2: Distribuição da amostra da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI por sexo	18
Tabela 2.3: Lista de Indivíduos pertencentes à amostra em estudo com o respetivo sexo e temperatura, consoante a duração a que esteve exposto	22
Tabela 2.4: Lista de <i>Landmarks</i> do úmero e respetivo tipo e descrição adaptado de Rosas <i>et al.</i> 2015 e Coelho, 2015	25
Tabela 3.1: Média e desvio padrão dos índices para cada grupo de amostras ...	29
Tabela 3.2: Intervalo de confiança de cada um dos índices para cada grupo de amostras	29
Tabela 3.3: Resultados do teste de <i>Wilcoxon</i> que compara estatisticamente dois grupos amostrais	30
Tabela 3.4: Resultados do teste de <i>Kruskal-Wallis</i> que pretende averiguar a variação dos índices consoante a duração	31
Tabela 3.5: P value obtido pelo teste <i>Dunn</i> para a avaliação das diferenças entre durações	31
Tabela 3.6: Intervalo de confiança de cada uma das durações para cada grupo de amostras	32

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 3.7: Valor de N (número de indivíduos) e respetiva percentagem relativamente à avaliação de cor resultante	32
Tabela 3.8: Análise descritiva da amostra em estudo	35
Tabela 3.9: Resultados da ANOVA de <i>Procrustes</i>	38

Lista de Figuras

Figura 1.1: Representação das trocas e substituições iónicas nos ossos. Retirado de Mamede <i>et al.</i> 2017, com autorização	2
Figura 1.2: Representação da cor dos ossos dependendo da temperatura a que foram submetidos. Adaptado de Mamede <i>et al.</i> , 2017	11
Figura 1.3: Representação das coordenadas cartesianas associadas ao modelo <i>CIELAB</i> . Adaptado de Fairchild, 2013	14
Figura 3.1: Espectro de uma amostra queimada e outra não queimada	27
Figura 3.2: Espectros resultantes das amostras submetidas às diferentes durações estudadas neste projeto	28
Figura 3.3: Representação do leque de tonalidades obtidas após a exposição dos ossos ao calor	33
Figura 3.4: Ambos os antímeros do Individuo CC_NI_37 da Coleção de Esqueletos Não Identificados, submetidos à mesma temperatura, mas com durações diferentes	34
Figura 3.5: Análise descritiva da amostra em estudo	36
Figura 3.6: Representação de todos os indivíduos submetidos a GPA	36
Figura 3.7: Distribuição da amostra por lateralidade (PC1) e por grau de deformação (PC2)	37
Figura 3.8: Úmero esquerdo do individuo CC_NI_2 depois de submetido à ação do calor por 420 minutos	38

1. Introdução

Um dos papéis da antropologia forense é a atribuição de um perfil biológico que compreende quatro parâmetros – ancestralidade, estimativa da idade à morte, diagnose sexual e estatura, através da aplicação de métodos métricos e morfológicos aos ossos. Contudo quando esta matriz biológica é exposta a fatores externos, a sua avaliação pode ser enviesada (Coelho, 2015). Um dos exemplos mais marcantes é o calor cuja ação sobre os ossos é abordada neste trabalho (alterações químicas, de cor e morfológicas).

1.1. Estrutura e composição ósseas

Os ossos são estruturalmente complexos e simultaneamente sensíveis física e quimicamente aos fatores do meio ambiente. Consequentemente, muitos são os fatores tafonômicos que podem transformar a sua estrutura e composição, sendo a exposição ao calor uma das ações que mais impacto causa (Howes *et al.*, 2012; Thompson *et al.*, 2013).

São constituídos por células especializadas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos), e uma matriz extracelular que se divide numa fração orgânica (25%) que confere elasticidade; outra inorgânica (50%) responsável pelo suporte e armazenamento de iões como cálcio, fósforo e magnésio, que concede resistência ao osso; e ainda por uma porção de água (25%). Contudo as suas proporções podem variar ao longo da maturação óssea ou mesmo por condições patológicas (Mkukuma *et al.*, 2004).

As células presentes no tecido ósseo são responsáveis pela formação e reabsorção óssea, fundamental para a regulação dos níveis de cálcio, magnésio e fosfato (Alvarez-Lloret *et al.*, 2006; Chakraborty *et al.*, 2006).

Na porção orgânica podem-se encontrar essencialmente proteínas das quais se destaca o colagénio do tipo I cujas cadeias de aminoácidos se encontram agrupadas em triplas hélices que por sua vez se vão agrupar em fibras de colagénio. É ainda de notar outras proteínas não colagénicas como a osteonectina, osteocalcina, entre outras (Alvarez-Lloret *et al.*, 2006; Chakraborty *et al.*, 2006).

A fração inorgânica dos ossos é constituída principalmente por nanocristais de apatite que se formam e ocupam os espaços vazios entre as fibras de colagénio, o que vai conferir rigidez aos ossos (Alvarez-Lloret *et al.*, 2006; Chakraborty *et al.*, 2006). É maioritariamente constituída por fosfato de cálcio que estruturalmente se aproxima do grupo da apatite que, nos ossos, como conta com a presença do grupo hidroxilo (OH^-), adquire uma forma semelhante à hidroxiapatite [$\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. É a apatite mineral de maior interesse, admite a presença do grupo OH^- mas também sofre incorporação de iões de fluoreto (F^-) e cloreto (Cl^-) (Rey *et al.*, 2009). A grande diferença entre as duas (apatite e hidroxiapatite) encontra-se ao nível das substituições que ocorrem através do carbonato e da água (Lebon *et al.*, 2008). Estas últimas são classificadas como substituições *tipo A* (OH^-). Para além destas, ainda existem as substituições do *tipo B* (PO_4^{3-}), que são mais comuns no ser humano (Figueiredo *et al.*, 2010) (Figura 1.1).

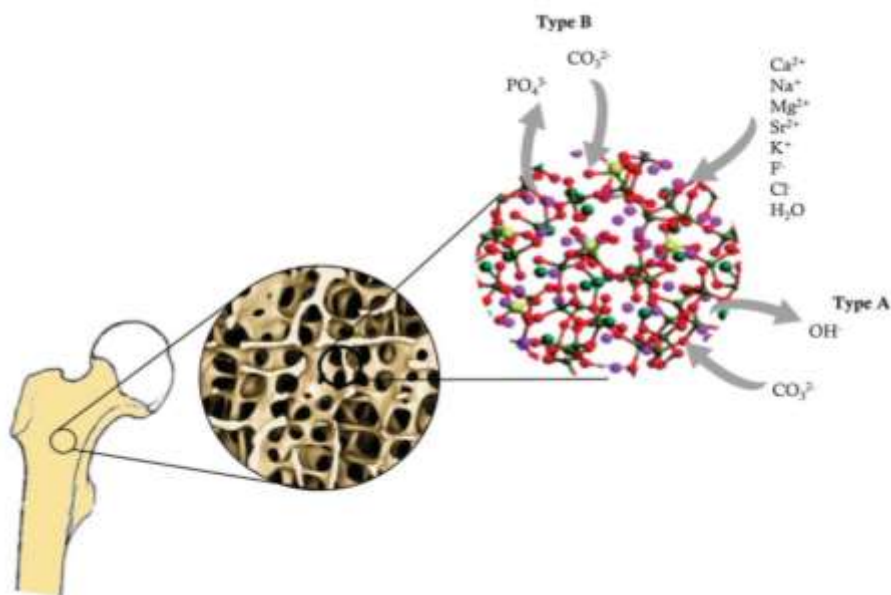


Figura 1.1: Representação das trocas e substituições iónicas nos ossos. Retirado de Mamede *et al.* 2017, com autorização.

Uma vez que a matriz em causa é flexível e se adapta facilmente ao meio, vai sofrer algumas alterações, o que tem implicações na estrutura e composição dos cristais, como acontece com o aquecimento, que deixa a apatite mais suscetível a mudanças iónicas (Wopenka & Pasteris, 2005).

Segundo Rey *et al.* (2009), é difícil de descrever os cristais e as mudanças sucedidas de forma precisa e detalhada devido à sua imensa complexidade e à inexistência de técnicas analíticas. No entanto, têm vindo a ser aplicados novos métodos como é o caso da espectroscopia vibracional.

1.2. Primeiros estudos realizados em ossos queimados e a sua aplicação em contextos forenses

Ao longo dos anos, a análise de restos queimados tem ganho grande importância em áreas como a arqueologia, a antropologia forense e a paleontologia (Shipman *et al.*, 1984; Bohnert *et al.*, 1998). No entanto, apesar do crescente número de estudos, esta ainda representa um desafio, devido aos fatores que contribuem para as alterações térmicas no tecido ósseo e ao seu estado de preservação aquando da exposição ao calor (Thompson, 2002; Ubelaker, 2009).

Embora tenha grande destaque na antropologia, o estudo dos restos queimados teve origem na arqueologia, quando arqueólogos investigavam o valor social da cremação. Estes ensaios vieram proporcionar ferramentas de trabalho aos antropólogos, através da implementação de guiões de análise (Silva, 2005; Schultz *et al.*, 2015).

Nas últimas duas décadas, a necessidade de melhorar a eficiência do trabalho em antropologia forense trouxe melhorias no que respeita à implementação de métodos quantitativos mais eficazes, à recuperação arqueológica, tafonomia forense e interpretação dos traumatismos ósseos, através das quais o antropólogo forense veio a convencionar o seu trabalho. Novos métodos estatísticos surgiram e trouxeram consigo novas ferramentas, nomeadamente funções discriminantes, que

conseguiram acompanhar as mudanças morfológicas ocorridas ao longo do tempo e que permitiram aceder de um modo mais assertivo ao perfil; os avanços na tafonomia forense vieram revolucionar a avaliação dos processos que ocorrem após a morte uma vez que o antropólogo forense, com a adaptação de certas técnicas da arqueologia forense (mas nem sempre aplicáveis, visto existir uma restrição temporal), começou a ganhar maior destaque no campo, permitindo ir mais além da identificação dos restos. Deste modo, cada vez mais o antropólogo começou a desempenhar um papel importante na avaliação dos danos ósseos, e em conjunto com o patologista forense, passou a ter um papel fundamental na decisão final na determinação da causa e circunstância da morte, estando sempre ciente que em campo deve registar todo o traumatismo ósseo e descrevê-lo (Dirkmaat *et al.*, 2008).

Na análise antropológica de restos queimados, é crucial conseguir avaliar a condição do corpo antes da exposição à fonte de calor através do estudo das mudanças ocorridas durante todo o processo (Fredericks *et al.*, 2012). Nem sempre é fácil interpretar o efeito do calor nos restos humanos e para que este possa ser estudado aprofundadamente é necessário, primeiro, saber distinguir ossos afetados pelo calor dos não afetados, uma vez que outros processos tafonómicos, ou mesmo condições patológicas podem estar na origem das mudanças. A título de exemplo, temos a cor que pode estar relacionada com o ambiente do enterramento pois fungos e pigmentos encontrados no solo e/ou na água que estiveram em contacto com o esqueleto podem provocar alterações (Thompson, 2002; White & Folkens, 2005).

Até há relativamente pouco tempo, a temática dos ossos queimados dedicava-se exclusivamente à sua caracterização. Atualmente o seu domínio é mais abrangente e inclui também a sua recuperação, a avaliação das fraturas, das alterações de cor e propriedade químicas e morfológicas. No entanto, o seu estudo encontra-se longe de estar completamente consolidado. A análise dos ossos termicamente alterados é de extrema importância visto que surgem nos mais diversos contextos desde acidentes de avião, explosões, homicídios e suicídios e mesmo em mortes acidentais (Thompson, 2002; Ubelaker, 2009).

Perante tantas mudanças que os ossos sofrem, os métodos osteológicos (métricos e morfológicos) tradicionalmente aplicados em antropologia biológica são inviáveis, essencialmente devido à deformação causada pela desidratação, perda de material orgânico e recristalização (Thompson, 2002; Thompson, 2004; Gonçalves, 2011; Gonçalves *et al.*, 2011; Gonçalves, 2012; Gonçalves *et al.*, 2017).

Surge assim a necessidade de um estudo mais aprofundado não só dos ossos em si, mas também do contexto em que se inserem, com o intuito de estabelecer novos métodos que permitam análises mais fiáveis (Schultz *et al.*, 2015; Vassalo *et al.*, 2016). Por exemplo, Etxeberria (1994) afirma que ossos frescos fragmentam mais facilmente do que ossos secos quando submetidos à ação do calor. Para Bennett (1999), a condição do osso pós queima vai ser imensamente influenciada pela duração e intensidade de exposição à fonte de calor, bem como a proximidade a esta. Outros fatores como o sexo, a idade à morte, o tempo decorrido entre a morte e o processo de queima também são fatores relevantes a considerar neste exame (Gonçalves *et al.*, 2015). Deste modo, com o intuito de compreender as circunstâncias que rodeiam a queima, que pode ou não ser *peri mortem*, analisam-se os padrões e a biomecânica das fraturas ósseas, as mudanças de cor e forma, a recristalização óssea, entre outros aspetos. No entanto, apesar do potencial, o diagnóstico das transformações ósseas sofridas nem sempre é possível (Gonçalves *et al.*, 2015; Vassalo *et al.*, 2017).

1.3. Alterações termicamente induzidas

Podem ser observadas diversas mudanças nos ossos quando expostos à ação do calor. Estas podem ser microscópicas (ao nível da composição e estrutura química, porosidade e resistência) que, por sua vez, vão afetar características macroscópicas como a cor, a forma e a fragmentação (Silva, 2005; Etok *et al.*, 2007).

Alterações Termicamente Induzidas

Mas os ossos podem sofrer alterações de etiologia distinta, diferente do calor, que se manifestam segundo a modificação ou mesmo destruição dos componentes orgânicos e inorgânicos presentes (Schurr *et al.*, 2015).

Depois da perda de água, vem a da perda de compostos orgânicos e, durante este processo, o osso fica instável e para atingir a estabilidade, a composição química e a estrutura têm que ser alteradas e reorganizadas. A composição de um mineral é dinâmica, como tal, pode sofrer diversas alterações e arranjos iônicos que por sua vez vão ao encontro de um equilíbrio geral sendo que os três constituintes do osso serão afetadas de forma independente ao longo do processo de aquecimento (Pasteris *et al.*, 2004; Snoeck & Schulting, 2014).

A reorganização óssea é considerada a maior dificuldade na identificação de restos queimados, que influencia inevitavelmente a estimativa de um perfil biológico (Piga *et al.*, 2008).

Devido ao vasto leque de influências ocorridas durante a exposição ao calor, por vezes é impossível determinar se o osso estava fresco ou não antes do aquecimento, principalmente quando estão fragmentados (Cain, 2005).

A temperatura a que as mudanças ocorrem ainda não está completamente definida, no entanto alguns investigadores como Thompson (2004), Etok *et al.* (2007), entre outros têm sido bem-sucedidos na determinação de certos intervalos de temperatura.

Segundo Shipman *et al.* (1984) as mudanças operadas nos ossos são uma consequência da alteração dos níveis e estrutura da apatite biológica e do colagénio, resultantes das diferentes temperaturas a que o material ósseo é submetido, da duração de exposição e, ainda, da proximidade à fonte de calor. No entanto, há que ter em atenção que as proporções de matéria orgânica e mineral não variam só com as alterações térmicas (Mkukuma *et al.*, 2004).

Para Thompson (2004), o osso passa por quatro fases durante o seu processo de queima: (1) desidratação entre os 100°C e os 600°C em que se dá a perda de água; (2) decomposição (300°C-800°C) em que se verifica a perda do material orgânico;

(3) inversão, entre 500°C e 1100°C onde se regista a perda de carbonato e a estrutura da apatite é alterada, originando o fosfato, e acabando por sofrer recristalização; (4) fusão (>700°C) – redução das dimensões do osso e aumento do tamanho dos cristais acompanhados por mudanças na porosidade do material ósseo. Todas estas fases levam à redução de peso e deformação óssea, embora nas duas primeiras seja mais intensa devido à perda de água e compostos orgânicos (Ellingham *et al.*, 2015b).

Já Etok *et al.* (2007) defendem a existência de três fases: (1) entre os 25°C e os 250°C em que acontece a perda de água; (2) compreendida entre os 300°C e os 500°C quando se dá a combustão do material orgânico com perda de 50-55% da massa e aumento do tamanho dos cristais; (3) acima dos 500°C em que qualquer resíduo de matéria orgânica é queimado e o tamanho dos cristais continua a aumentar progressivamente até aos 800°C.

Reidsma *et al.* (2016) dizem que é registada uma desidratação que consiste na perda de água por volta dos 100°C, seguida pela perda das ligações químicas da água, entre os 100°C e os 200°C; aos 200-300°C, as proteínas começam a sofrer alterações térmicas e é nesta fase que os marcadores de colagénio começam a diminuir; por volta dos 370°C, pouco resta da componente orgânica; um incremento de carbono (C) é registado (200-450°C) e ainda uma diminuição de azoto (N) (250-450°C); a temperaturas que rondam os 500°C, como a matéria orgânica já se está a decompor, o material adquire uma cor escura, sendo nesta fase que ocorrem as principais mudanças moleculares; após os 700°C, é notável a criação de novos compostos, nomeadamente a cianamida (iões que se formam na presença de azoto) em resultado de reações entre o cálcio, o carbono e o azoto (Dowker & Elliott, 1979; Reidsma *et al.*, 2016).

Em suma, a uma temperatura de 600 - 650°C, toda a matéria orgânica já foi decomposta, conseqüentemente o ADN já não se encontra presente; a parte inorgânica do osso começa a sofrer alterações a temperaturas superiores a 500°C e os cristais tendem a estabilizar a sua espessura e forma com o prolongamento da queima. Estas são as alterações na estrutura do osso que provocam mudanças ao

nível da cor, morfologia, resistência e cristalinidade (Figueiredo *et al.*, 2010; Ellingham *et al.*, 2015a).

Embora, neste estudo se tente aproximar o mais possível aos casos reais, nomeadamente incêndios, tal torna-se difícil uma vez que as queimas foram controladas - o material ósseo foi submetido a um aquecimento homogêneo num forno elétrico - enquanto em situações reais, o incêndio provoca um aquecimento irregular (Makhoul *et al.*, 2017).

1.3.1. Variações químicas

Após a morte, e sob o efeito da **diagénese**, os ossos são afetados de várias formas, nomeadamente nos cristais que vão alterar a sua dimensão e adquirir uma nova organização indo ao encontro da estabilidade (Stiner *et al.*, 1995; Paschalis *et al.*, 1997; Stiner *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2002; Hedges, 2002).

Com o aumento da temperatura, o mineral ósseo entra num tal estado de desordem, que vai procurar o equilíbrio, sofrendo para isso, uma reestruturação no seu tamanho (recristalização), sobretudo a partir dos 700°C (Piga *et al.*, 2009; Surovell & Stiner, 2001). Entre os 250°C e os 340°C, as alterações apontadas são muito suaves, apenas os compostos orgânicos mudam de forma significativa. Após esta temperatura e até aos 600°C, as ligações químicas do carbonato e do fosfato começam a ser alterados, dá-se uma reorganização da estrutura dos cristais bem como um ajuste do seu tamanho, até aos 900°C, sendo as mudanças mais notórias entre os 700°C e os 900°C (Reidsma *et al.*, 2016). Contudo, a partir dos 500°C, a dimensão morfológica destes já está a mudar, pois, a esta temperatura a matéria orgânica já está decomposta e é esta que confere proteção aos cristais (Munro *et al.*, 2007).

Assim sendo, as alterações na fração mineral podem ser influenciadas pela quantidade de matéria orgânica presente no osso (Mkukuma *et al.*, 2004). Mas a idade também pode ser um fator a considerar, na medida em que estes crescem

em função da idade e consequente maturação óssea (Paschalis *et al.*, 1997; Alvarez-Lloret *et al.* 2006).

Reidsma *et al.* (2016), dizem que, principalmente as ligações químicas de fosfato (PO_4) são afetadas, sofrendo uma reordenação; e é de notar ainda uma diminuição do carbonato (CO_3). Ou seja, com o aumento da temperatura, dá-se a destruição térmica das ligações de CO_3 que vão reagir com a água e o HPO_4 , resultando na libertação de CO_2 e na formação de OH^- (quando reage com a água) e $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ (quando reage com HPO_4). E o grupo OH^- recém formado vai ser introduzido na estrutura da apatite através de reações de rehidroxilação (Pasteris *et al.*, 2012). Segundo Pasteris *et al.* (2014) embora a quantidade de carbonato vá diminuindo, a concentração de hidróxido tende a aumentar gradualmente.

Assim, propriedades, como a cristalinidade, ou mesmo os níveis de carbonato, fosfato, hidróxido e cianamida podem ser medidos através dos Índices de Cristalinidade, Carbonato/Fosfato, Hidróxido/Fosfato e Cianamida/Fosfato e podem variar consoante o tipo de osso, grau de desenvolvimento ou mesmo de certas condições patológicas, e durante o processo de queima (Gonçalves *et al.*, 2018). De realçar que o material orgânico e o mineral se comportam de forma diferente, o que se deve às suas composições distintas (White & Folkens, 2005; Alvarez-Lloret *et al.*, 2006; Reidsma *et al.*, 2016). Para análises químicas deste tipo, recorre-se a métodos espectroscópicos como é o caso do FTIR-KBr (*KBr-Fourier transform infrared*).

A avaliação química tem mostrado grandes avanços nos últimos anos, todavia, não se mostrou inteiramente confiável e, por si só, não é um bom indicador dos ossos queimados, uma vez que outros fatores podem vir a influenciar a composição química dos ossos de forma semelhante ao efeito do calor (Stiner *et al.*, 1995; Lebon *et al.*, 2010). Outro problema associado prende-se com o facto de diferentes metodologias mostrarem diferentes resultados (Pasteris *et al.*, 2014). Thompson *et al.* (2009) mostram no seu estudo que o índice de cristalinidade não deve ser utilizado para determinar a temperatura a que o osso esteve sujeito uma vez que existem variações dependendo da região em que o osso foi amostrado. Este índice

pode antes ser utilizado como indicador da intensidade da queima mas tendo sempre atenção porque a baixas temperaturas pode ser facilmente confundido com o efeito da diagénese. E ainda, Thompson *et al.* (2011) indicaram que não só a temperatura mas também a duração da queima têm influência na variação dos valores.

No presente estudo, para uma análise química, recorreu-se a FTIR que consiste na análise das vibrações das ligações dentro das moléculas. Quando a amostra se encontra no estado sólido, esta análise pode ser feita através de dois métodos, FTIR ATR ou FTIR KBr (Thompson *et al.*, 2009). Uma comparação entre as duas é apresentada na Tabela 1.1. Apesar do primeiro método ser mais simples, para este trabalho recorreu-se ao segundo de forma a manter a uniformidade metodológica com o estudo de Calil Makhoul (SD), cujos resultados serão comparados com os obtidos neste trabalho.

Tabela 1.1: Principais diferenças entre FTIR-ATR e FTIR-KBr

FTIR - ATR	FTIR - KBr
Não necessita de meio de análise	Necessita de um meio de análise – Brometo de potássio (KBr)
Possibilidade de recuperação da amostra	Processo irreversível para a amostra
Pouca influência do meio ambiente	Maior suscetibilidade a influências do meio ambiente

1.3.2. Variações cromáticas

Habitualmente os ossos queimados são reconhecidos com base na sua cor e textura (Shipman *et al.*, 1984; Mkukuma *et al.*, 2004; Lebon *et al.*, 2010).

Shipman *et al.* (1984) afirmam que a principal razão para tal mudança é a decomposição dos compostos orgânicos, sendo a cor um bom indicador da

Alterações Termicamente Induzidas

quantidade de colagénio presente (Walker *et al.*, 2008). Ellingham *et al.* (2015a) corroboram esta asserção dizendo que a cor é um reflexo da quantidade de componentes orgânicos (como colagénio) e inorgânicos que o osso manifesta em determinada temperatura. As mudanças de cor são assim resultado das mudanças na composição e estrutura química dos ossos (Snoeck & Schulting, 2014).

Algumas investigações como as de Mkukuma *et al.* (2004) e de Lebon *et al.* (2010) mostram, *a priori*, e através de análises espectroscópicas, que existe uma relação entre as concentrações dos elementos químicos e a temperatura máxima de exposição tanto para a porção orgânica como para a porção inorgânica dos ossos. Assim as variações de cor vão acontecendo com o aumento da temperatura e a perda de colagénio, passando para tons de acastanhados ou preto (200-300°C), quando os componentes orgânicos começam a ser decompostos; depois, para um tom azul acinzentado, quando os compostos orgânicos já estão decompostos e atingindo um tom branco por volta dos 800°C, quando o osso passa a calcinado (Figura 1.2) (Bennett, 1999; Walker *et al.*, 2008; Schmidt & Uhlig, 2012).

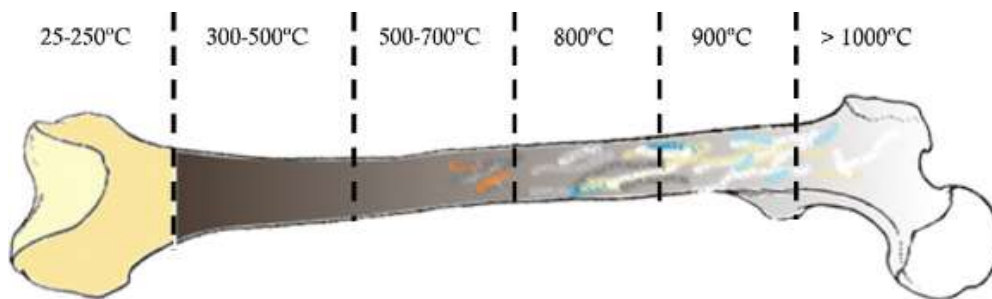


Figura 1.2: Representação da cor dos ossos dependendo da temperatura a que foram submetidos. Adaptado de Mamede *et al.*, 2017.

Também Shipman *et al.* (1984) realizaram estudos com o intuito de inferir intervalos de temperatura, aos quais atribuíram uma cor, tal como se pode ver na Tabela 1.2.

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 1.2: Intervalos de temperatura e respetiva cor segundo uma adaptação do modelo de Shipman *et al.* (1984).

Estádio	Temperatura	Atribuição de cor
I	20 – 285°C	Branco a amarelo claro
II	285 – 525°C	Castanho, cinzento escuro
III	525 – 645°C	Preto com nuances azuis
IV	645 – 940°C	Branco com nuances azuis ou cinzentas
V	>940°C	Branco com nuances azuis

Stiner *et al.* (1995) afirmaram que a cor do osso pode refletir o seu grau de exposição ao calor (como se pode ver na Tabela 1.3). Pode-se verificar que a cor depende do grau de calcinação que o osso apresenta. Temperaturas compreendidas entre os 300°C e os 500°C correspondem a ossos carbonizados enquanto temperaturas superiores a 600/700°C estão associadas a ossos calcinados (Snoeck & Schulting, 2014).

Tabela 1.3: Código de atribuição de cor consoante o grau de calcinação. Adaptação do modelo de Stiner *et al.* (1995).

Código de cor	Grau de calcinação
0	Não queimado (creme/castanho)
1	Levemente queimado (localizado e menos de metade carbonizado – creme/castanho)
2	Levemente queimado (meio carbonizado – castanho/preto)
3	Totalmente carbonizado (completamente preto)
4	Localizado e menos de metade calcinado (mais preto que branco)
5	Mais de metade calcinado (mais branco do que preto)
6	Completamente calcinado (completamente branco)

Alterações Termicamente Induzidas

O ambiente em que ocorre a queima também parece ter resultados significativos nas mudanças de cor associadas a uma temperatura específica, por exemplo, um ambiente com pouco oxigênio vai atrasar o processo (Walker *et al.*, 2008).

Segundo Cain (2005), a cor é o indicador mais usado para determinar a temperatura e a duração da queima. Similarmente, Shipman *et al.* (1984), apontam uma correlação entre a cor e a temperatura. No entanto a cor pode estar associada ainda à composição do solo, pH do meio, ou mesmo a presença de água e fungos (Pijoan *et al.*, 2007).

O primeiro sistema de avaliação de cor utilizado em arqueologia foi o de Munsell nos anos 50, que surgiu para avaliar a cor dos solos. Este método expressa apenas as coordenadas para cores como o vermelho, o verde e o azul (RGB – *Red/Green/Blue*) e apresenta algumas desvantagens, nomeadamente a variação intra e interobservador uma vez que se baseia numa estimativa visual e é bastante suscetível a mudanças de luz que podem afetar a avaliação da cor (Escadafal *et al.*, 1989; Devlin & Herrmann, 2015).

Mais tarde surgiu outro método, o sistema *CIELAB*, um modelo criado para avaliar as diferenças de cor, que considera todas as cores e combinações, sendo identificadas por três coordenadas cartesianas (Luminosidade/Escurecimento, Verde/Vermelho e Azul/Amarelo), como apresentado na Figura 1.3 (Fairchild, 2013; Devlin & Herrmann, 2015).

De acordo com Ellingham *et al.* (2015a) a cor pode refletir uma aproximação da temperatura a que o osso esteve exposto, mas há que ter em atenção que este critério por si só não é um indicador assertivo (Shahack-Gross *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 2013).

É comum a cor preta de um osso ser associada à sua carbonização, no entanto este é um parâmetro que avaliado isoladamente pode induzir em erro, sobretudo porque existem variações intrínsecas ao avaliador e ao próprio osso, bem como extrínsecas, tal como as condições a que o osso está exposto como por exemplo,

Alterações Termicamente Induzidas

certos compostos químicos como o óxido de manganês (Bennett, 1999; Piga *et al.*, 2009; Shahack-Gross *et al.*, 1997).

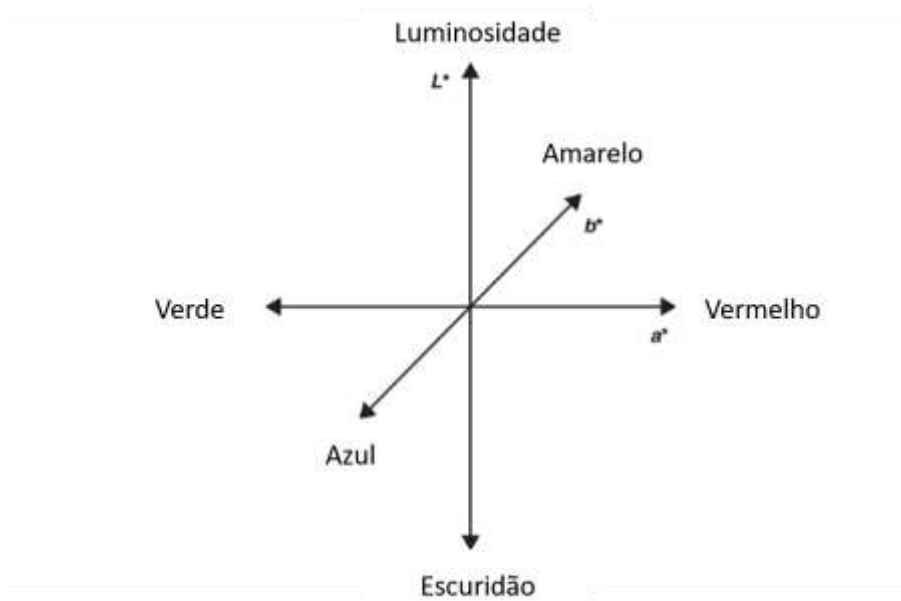


Figura 1.3: Representação das coordenadas cartesianas associadas ao modelo *CIELAB*. Adaptado de Fairchild, 2013.

Desta forma, é possível dizer que as mudanças de cor, tal como tantas outras, são influenciadas pela temperatura de exposição, pela duração da queima e ainda pela proximidade à fonte de calor e oxigênio.

1.3.3. Variações morfométricas

Paralelamente às alterações já referidas, também a forma e as fraturas ósseas têm sido analisadas para tentar entender a ação do fogo sobre os ossos.

Após a queima, os métodos osteológicos tradicionalmente utilizados em ossos não queimados deixam de ser aplicados pois as dimensões e forma dos ossos modificam-se (Shipman *et al.*, 1984; Gonçalves *et al.*, 2011; Coelho, 2015; Gonçalves *et al.*, 2015; Vassalo *et al.*, 2016).

Segundo Shipman *et al.* (1984), as alterações morfológicas advêm de um aumento progressivo da temperatura, da recristalização e da fusão da hidroxiapatite. No entanto, nem tudo é linear e ainda persistem dúvidas.

Têm sido colocadas várias hipóteses que tentam elucidar este ponto. Gonçalves *et al.* (2011) sugerem que pode estar relacionado com a presença de tecidos moles e de colagénio, bem como a sua concentração. Gonçalves *et al.* (2015) referem que a deformação óssea está dependente do conteúdo de colagénio presente na matéria orgânica do osso, o que lhe confere elasticidade suficiente para dobrar. Também ossos constituídos por osso compacto são mais afetados do que ossos maioritariamente compostos por osso trabecular, o que pode estar relacionado com a organização do colagénio (Gonçalves *et al.*, 2011).

No entanto, Vassalo *et al.* (2016), parecem não concordar totalmente com esta hipótese, dizendo que a temperatura e a duração da queima exercem maior influência na deformação óssea, bem como fatores intrínsecos ao indivíduo tais como o sexo e a idade à morte.

Assim, a avaliação morfológica foi considerado o mais eficiente no diagnóstico das condições dos restos humanos na pré queima (Gonçalves *et al.*, 2015).

Um aspeto importante a ter em consideração é que a avaliação morfológica não é ótimo em ossos cujo grau de fragmentação é elevado e poucos foram os estudos no passado em ossos queimados. O trabalho de Coelho (2015) constitui uma exceção porque se dedicou especificamente às alterações da forma através duma análise morfométrica.

1.4. Objetivos

Os objetivos deste trabalho prendem-se com a avaliação da influência da duração da queima a uma temperatura fixa de 700°C em ossos humanos, com base nas alterações químicas, de cor e morfologia numa amostra de úmeros da Coleção de

Esqueletos Não Identificados do Cemitério dos Capuchos e da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI.

Para tal, recorreu-se a análises físico-químicas assentes em espectroscopia vibracional - FTIR-KBr, para estudo estatístico. Procedeu-se ao registo fotográfico para a obtenção de dados relativamente a cor. Foram ainda criados modelos virtuais ósseos 3D, através de digitalizações tridimensionais para a obtenção de referências anatómicas dos ossos que permitam avaliar estatisticamente a deformação óssea.

1.5. Temperatura específica de 700°C

A temperatura de 700°C foi escolhida para a realização deste projeto, uma vez que é quando ocorrem as mudanças mais importantes a nível químico e estrutural, incluindo a estabilização do Índice de Cristalinidade (Thompson *et al.*, 2009).

Munro *et al.* (2007), concluíram que as mudanças mais significativas tendem a surgir a partir dos 700°C, tais como modificações isotópicas e estruturais nomeadamente a perda do carbono estrutural e a formação de óxido de cálcio (CaO), a partir da decomposição da hidroxiapatite, que habitualmente não ocorre abaixo dos 700°C (Harbeck *et al.*, 2011). Ainda se regista o aumento do tamanho dos cristais, perdendo a sua homogeneidade (Enzo *et al.*, 2007; Squires *et al.*, 2011; Ellingham *et al.*, 2015a). A mudança de cor de cinzento para branco dá-se efetivamente por volta dos 700°C. No entanto, tudo depende das condições a que o material ósseo esteve exposto, ou seja, o contexto de queima (Harbeck *et al.*, 2011). A 700°C ocorrem também mudanças nas propriedades mecânicas dos ossos (Rogers & Daniels, 2002). Investigadores como Van Vark (1970) *in* Ubelaker (2009) e Shipman *et al.* (1984), mostraram que o encolhimento ósseo se dá a partir desta temperatura.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostra

Selecionou-se a amostra de acordo com o estado de preservação de modo a que todos os úmeros em análise estivessem bem ou razoavelmente preservados, de forma que os resultados não sejam corrompidos e/ou enviesados pela degradação óssea.

A amostra total é constituída por 28 úmeros divididos em dois grupos de duas coleções osteológicas distintas.

O primeiro é constituído por 24 úmeros (ambos os antímeros) de 12 indivíduos (6 do sexo feminino e 6 do sexo masculino) (Tabela 2.1), pertencentes à Coleção de Esqueletos Não Identificados da Universidade de Coimbra, alojada no Laboratório de Antropologia Forense. Esta coleção é composta por 73 indivíduos (adultos e não adultos) e dois ossários (ambos com um número mínimo de indivíduos de 6), em que 36 indivíduos são do sexo feminino e com idades compreendidas entre os 30 e os 87 anos; 32 são indivíduos do sexo masculino cujas idades variam entre os 30 e os 86 anos; e 6 são indivíduos não adultos entre 1 e 14 anos (José, 2019; Tomé, 2019). Visto que o intervalo etário de cada um era demasiado amplo, este não foi considerado uma variável no presente estudo, bem como o tempo decorrido desde a morte (informação inexistente).

Optou-se por esta coleção, mesmo não sendo identificada, uma vez que se pretendem queimar os dois úmeros de um mesmo indivíduo, o que não é possível noutras coleções osteológicas desta instituição. No entanto, trabalhos como José (2019) e Tomé (2019) têm vindo a ser desenvolvidos no âmbito da valorização da série.

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 2.1: Distribuição da amostra da Coleção de Esqueletos Não Identificados por sexo

Sexo Feminino	Sexo masculino
CC_NI_1	CC_NI_2
CC_NI_5	CC_NI_6
CC_NI_9	CC_NI_8
CC_NI_37	CC_NI_14
CC_NI_55	CC_NI_44
CC_NI_68	CC_NI_50

O segundo grupo é constituído por 4 úmeros de 4 indivíduos (2 do sexo feminino e 2 do sexo masculino) com idades compreendidas entre os 83 e os 89 anos (Tabela 2.2) da Coleção de Esqueleto Identificados do Século XXI (CEI/XXI) (Ferreira *et al.*, 2014) cujo procedimento prático só se aplica após a queima uma vez que já se encontram queimados pelos doutorandos Calil Makhoul e João Coelho. A CEI/XXI também está alojada no Laboratório de Antropologia Forense da Universidade de Coimbra e conta com um número total de 302 Indivíduos, 162 do sexo feminino e 140 do sexo masculino, cujas datas à morte remetem à última década do século XX e primeiros anos do século XXI. Este conjunto de ossos insere-se numa subcoleção de esqueletos parcialmente queimados pelo *HOT Project* que atualmente conta com 51 indivíduos. Neste grupo nem a idade nem o tempo decorrido desde a morte foram considerados visto se tratarem apenas de quatro indivíduos.

Tabela 2.2: Distribuição da amostra da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI por sexo e idade

ID	Sexo	Idade (anos)
CEI/XXI_8	Feminino	83
CEI/XXI_15	Masculino	88
CEI/XXI_85	Feminino	89
CEI/XXI_179	Masculino	86

2.2. Métodos

2.2.1. Fase I: antes da queima

Após a seleção da amostra, esta passou por vários passos:

(1) avaliação métrica onde se tiraram as medidas (Tabelas 7.1 e 7.2 presentes no Apêndice 1) com recurso a uma craveira analógica, tábua osteométrica, fita métrica e uma balança KERN PCB versão 1.5 02/2013. Todas as medições foram realizadas duas vezes, por dois observadores distintos (colega Cláudia Maio) e depois de uma fase de preparação/treino monitorizada pela Professora Doutora Maria Teresa Ferreira. O objetivo desta análise foi verificar a existência ou não de erro e interobservador, calculado segundo a metodologia de Perini *et al.* (2005).

(2) registo fotográfico, sempre com recurso à máquina fotográfica *Canon EOS 1200D* e a um fundo preto, garantindo o controlo e uniformidade do procedimento. Foram tiradas fotografias em normas anterior e posterior da totalidade do osso bem como fotografias de pormenor das extremidades, para a avaliação macroscópica das alterações de cor;

(3) digitalizações tridimensionais de todos os ossos da amostra através do *NextEngine™ 3D Scanner HD* apoiado pelo *software ScanStudio™ HD*. Com esta técnica procedeu-se à realização de modelos virtuais dos 24 úmeros antes de serem submetidos à ação do calor, para comparação com os modelos posteriormente obtidos pela mesma técnica após a queima. Durante este procedimento, passou-se por uma fase de treino de um dia, sob a supervisão do colega João Coelho, mais experiente no tratamento digital, e com base no protocolo desenvolvido pelo mesmo. Fizeram-se entre 3 a 5 digitalizações de cada osso (uma 360° para toda a diáfise e as restantes nas extremidades proximal e distal), de modo a garantir uma maior qualidade e conseguir um alinhamento de todas as digitalizações mais facilmente. Desde o correto posicionamento do osso para digitalização até estar

completamente pronto para a análise, contou-se com um período de tempo de cerca de 40 minutos.

(4) raspagens ósseas em cada úmero (região proximal e distal da diáfise) para análises químicas através de métodos de espectroscopia vibracional, uma vez que segundo Thompson *et al.* (2009), o local do osso de onde é retirada a amostra tem influência nos resultados. Recorreu-se a FTIR (*Fourier transform infrared*), mais propriamente a sua subdivisão de KBr, que estuda a composição química e mineral do tecido ósseo, e avalia quantitativamente os seus componentes (Alvarez-Lloret *et al.*, 2006; Boskey, 2007; Reidsma *et al.*, 2016). Para tal, contou-se com uma fase de explicação e treino do método sob a supervisão do Professor Doutor Luís Batista de Carvalho, no Departamento de Química da Universidade de Coimbra.

Colocou-se 100 mg de brometo de potássio (KBr) no estado sólido num almofariz juntamente com 1 mg da amostra em estudo e triturou-se tudo; colocou-se a amostra já envolvida em KBr num recipiente e foi prensada de forma a fazer uma pastilha. A pastilha resultante foi colocada no espectrómetro de FTIR *Bruker Optics Vertex70*, associado a uma purga que cria um ambiente livre de CO₂ e humidade. Durante todo o processo, houve sempre especial cuidado com possíveis contaminações e ainda com o conteúdo de azoto líquido (essencial para o arrefecimento do equipamento). Cada vez que se colocava a amostra para análise, dava-se um período de espera de cerca de 2/3 minutos para que o ambiente pudesse estabilizar e ficar livre de interferências de CO₂ e humidade. No entanto, é muito difícil obter um ambiente totalmente livre de interferência do meio. Todo este procedimento prático foi apoiado pelo *software OPUS* que permitiu a obtenção de espectros compostos por 128 scans cada um, contando-se, deste modo com uma duração de cerca de 15 minutos para cada análise. Realizou-se o processo para cada uma das 48 amostras pré queima (24 proximais e 24 distais), bem como as 6 amostras da CEI/XXI (cujas raspagens já tinham sido efetuadas anteriormente). Entre cada análise, limpou-se todo o material com papel e no final de cada dia, este era descontaminado com recurso a isopropanol [(CH₃)₂CHOH]] e guardado na

estufa. Aqui, as maiores dificuldades encontradas foram a fixação da amostra bem como a estabilização da mesma, para evitar contaminações.

A utilização deste procedimento químico consiste numa imensa mais-valia visto permitir um exame detalhado de todos os componentes dos ossos (orgânicos e inorgânicos) e ainda uma identificação das mudanças ocorridas na estrutura elementar podendo ser aplicado a qualquer amostra independentemente do seu estado (Paschalis *et al.*, 1997; Munro *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2009). Permite igualmente retratar as alterações da diagénese (Lebon *et al.*, 2010). Além disso é um método bastante económico. Apresenta como desvantagem o facto de ser registada maior precisão a temperaturas mais baixas (Pucéat *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2013).

2.2.2. Fase II: Queima

Após a preparação da amostra, realizaram-se queimas experimentais com a monitorização do colega Calil Makhoul, com mais experiência na área.

Utilizou-se um forno elétrico trifásico Barracha K-3 em que as durações e temperaturas de queima foram reguladas antes de cada uma, e com um controlo presencial permanente.

Submeteu-se a amostra à ação do calor, numa queima controlada, a uma temperatura fixa de 700°C, com diferentes durações, de 90, 120, 150 180 e 360 minutos e ainda 360 minutos e mais 60 minutos a 700°C, que foi denominada de 420 minutos (Tabela 2.3). As durações realizadas não correspondem às estabelecidas originalmente devido a uma avaria no forno e à necessidade de reajustar o projeto prático. É de notar que os indivíduos pertencentes à CEI/XXI já se encontravam queimados de projetos anteriores.

Após cada queima, deu-se um período de cerca de 12 horas de espera antes de abrir o forno, de modo a que este pudesse baixar a sua temperatura. Em seguida retiraram-se e acondicionaram-se devidamente os ossos em caixas.

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 2.3: Lista de Indivíduos pertencentes à amostra em estudo com o respetivo sexo e temperatura, consoante a duração a que esteve exposto. R e L correspondem aos antímeros do lado direito e esquerdo, respetivamente.

ID	Sexo	Duração
CC_NI_1R	Feminino	90 Mins
CC_NI_2R	Masculino	90 Mins
CC_NI_9R	Feminino	90 Mins
CC_NI_14L	Masculino	90 Mins
CC_NI_37L	Feminino	90 Mins
CC_NI_50L	Masculino	90 Mins
CEI/XXI_179	Masculino	90 Mins
CC_NI_14R	Masculino	120 Mins
CC_NI_44R	Masculino	120 Mins
CC_NI_55L	Feminino	120 Mins
CC_NI_68L	Feminino	120 Mins
CEI/XXI_8	Feminino	120 Mins
CC_NI_37R	Feminino	150 Mins
CC_NI_44L	Masculino	150 Mins
CC_NI_50R	Masculino	150 Mins
CC_NI_55R	Feminino	150 Mins
CEI/XXI_15	Masculino	180 Mins
CEI/XXI_85	Feminino	180 Mins
CC_NI_1L	Feminino	360 Mins
CC_NI_5L	Feminino	360 Mins
CC_NI_6R	Masculino	360 Mins
CC_NI_8L	Masculino	360 Mins
CC_NI_2L	Masculino	360 + 60 Mins
CC_NI_5R	Feminino	360 + 60 Mins
CC_NI_6L	Masculino	360 + 60 Mins
CC_NI_8R	Masculino	360 + 60 Mins
CC_NI_9L	Feminino	360 + 60 Mins
CC_NI_68R	Feminino	360 + 60 Mins

2.2.3. Fase III: Depois da queima

Depois de submetida ao calor, a amostra passou por um processo semelhante ao descrito na fase I.

Nova análise métrica (Tabela 7.4 do Apêndice 1) e registo fotográfico, bem como novas raspagens ósseas, exceto dos indivíduos da CEI/XXI. Nesta fase, a ordem das etapas foi diferente visto que nesta altura todos os ossos foram sujeitos a um processo de consolidação (cerca de 10 minutos para cada osso) que conferiu maior resistência e proteção, pois ossos queimados são mais frágeis e apresentam maior risco de fratura. Apesar de todos os cuidados, o úmero direito do indivíduo CC_NI_5R fraturou-se e teve de ser reconstruído com recurso a cola fixadora.

Realizaram-se novas digitalizações dos mesmos ossos e raspagens ósseas. Devido à inexistência de digitalizações antes da queima dos úmeros dos indivíduos CEI/XXI_15 e CEI/XXI_85 estes não foram sujeitos a análise estatística da morfologia. O mesmo aconteceu com o indivíduo CEI/XXI_8 que não foi submetido a análise química, devido à falta de dados.

2.2.4. Fase IV: Confronto dos dados

Uma vez realizado todo o procedimento prático, compararam-se os resultados obtidos antes e depois da queima, de modo a averiguar as mudanças sofridas.

Tal como em Lebon *et al.* (2010), os dados obtidos a partir das análises químicas anteriormente referidas foram utilizadas para comparar a informação adquirida antes da queima com aquela que foi obtida depois, de modo a estudar as modificações termicamente induzidas a partir de diferentes indicadores como a variação do índice de cristalinidade, índice carbonato/fosfato, índice hidróxido/fosfato, índice cianamida/fosfato e composição química (Mamede *et al.*, 2017). Foram utilizados estes índices de modo a averiguar se existiam variações

intraósseas, confrontando-se os resultados proximais e distais de cada osso antes e depois da queima e ainda se avaliou as diferenças entre as mesmas regiões anatómicas, antes e depois de submetido à ação do calor. Para tal utilizou-se o teste estatístico *Wilcoxon*, um teste não paramétrico que compara dois grupos amostrais, analisando as diferenças entre eles. Adiante usou-se o teste de *Kruskal-Wallis*, outro teste não paramétrico utilizado para comparar três ou mais grupos amostrais. Posteriormente, e com o objetivo de avaliar as variações inter e intra grupos, realizou-se o teste *Dunn* e calcularam-se os coeficientes de variação, respetivamente.

Com os modelos virtuais dos ossos, avaliou-se a sua deformação. Após as digitalizações 3D, e através do *software Landmark Editor*, foram marcadas 35 *Landmarks* em cada osso (Tabela 2.4). No entanto, devido à degradação de certas zonas anatómicas, alguns *landmarks* tiveram de ser ocultados através da ferramenta “*missing landmark*”. Dentro dos tipos de *landmarks*, utilizaram-se o *tipo I* e o *tipo II* (Mitteroecker & Gunz, 2009).

Landmark: local anatómico que pode ser reconhecido no mesmo ponto em toda a amostra, ou seja, um ponto homólogo, por exemplo o bregma (Tallman, 2013).

Landmark tipo I: ponto de junção entre três ossos ou dois ossos e um músculo (Zelditch *et al.*, 2012).

Landmark tipo II: ponto máximo ou mínimo de curvatura. Não é um ponto homólogo, ou seja, pode variar de caso para caso e é suportada por evidências geométricas (Zelditch *et al.*, 2012).

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 2.4: Lista de *Landmarks* do úmero e respetivo tipo e descrição adaptado de Rosas et al. 2015 e Coelho, 2015

Landmark	Tipo	Descrição
S000	2	Ponto mais projetado do epicôndilo lateral
S001	1	Ponto proximal da junção entre o epicôndilo lateral e o <i>capitulum</i>
S002	1	Ponto distal da junção entre o epicôndilo lateral e o <i>capitulum</i>
S003	2	Ponto proximal da junção entre a tróclea medial e o côndilo medial
S004	2	Ponto mais projetado do epicôndilo medial
S005	1	Ponto anterior proximal da tróclea lateral
S006	1	Ponto anterior proximal da tróclea medial
S007	1	Ponto posterior proximal da tróclea lateral
S008	1	Ponto posterior proximal da tróclea medial
S009	2	Ponto proximal da fossa olecraniana
S010	2	Ponto distal da fossa olecraniana
S011	2	Ponto lateral da fossa olecraniana
S012	2	Ponto medial da fossa olecraniana
S013	2	Curvatura máxima entre o epicôndilo medial e o eixo
S014	2	Ponto mais proeminente da crista supracondilar lateral
S015	1	Ponto proximal da crista supracondilar lateral
S016	2	Ponto médio da inserção coracobraquial
S017	1	Ponto distal da crista do tubérculo maior
S018	1	Ponto distal da crista do tubérculo menor
S019	2	Ponto posterior da superfície do tubérculo maior
S020	2	Ponto lateral da superfície do tubérculo maior
S021	2	Ponto proximal da superfície do grande tubérculo
S022	2	Ponto medial da superfície do tubérculo maior
S023	2	Ponto mais projetado da superfície anterior do tubérculo maior
S024	2	Ponto anterior proximal onde ao sulco intertubercular está entre ambos os tubérculos
S025	2	Ponto mais projetado da superfície lateral do tubérculo menor
S026	2	Ponto proximal da superfície do tubérculo menor
S027	2	Ponto anterior da superfície do tubérculo menor
S028	2	Ponto distal da superfície do tubérculo menor
S029	2	Ponto posterior da superfície do tubérculo menor
S030	1	Ponto de junção entre o perímetro da cabeça do úmero e a cabeça longa do bicipite braquial
S031	2	Ponto proximal do perímetro da cabeça do úmero
S032	2	Ponto posterior do perímetro da cabeça do úmero
S033	2	Ponto distal do perímetro da cabeça do úmero
S034	2	Ponto anterior do perímetro da cabeça do úmero

Alterações Termicamente Induzidas

Nesta fase do processo, os modelos virtuais dos úmeros já estão prontos para a análise estatística. Recorreu-se a **R** permitindo assim a obtenção de referências anatómicas homólogas, e ainda informação quantitativa sobre a deformação. De entre as abordagens estatísticas, utilizou-se o *Procrustes* uma vez que é o melhor compreendido em termos matemáticos e estatísticos. A análise generalizada de *Procrustes* (GPA) é um método estatístico que pretende analisar a forma de objetos (Gower, 1975).

Na química, todos os espetros foram normalizados e trabalhados a partir do *software Origin*, permitindo desta forma a sua correta análise estatística também em R.

3. Resultados

Como já foi referido, foram analisadas três categorias de modificações provocadas pelo aquecimento. Neste capítulo pretende-se expor os resultados da análise de cada uma delas.

3.1. Variações químicas

Neste parâmetro como já mencionado, foi avaliada a influência da duração da exposição ao calor nos compostos químicos a uma temperatura fixa de 700°C

Na Figura 3.1 são apresentados dois espectros da mesma região, do mesmo osso, antes e após a queima, como forma de perceber as variações do mesmo.

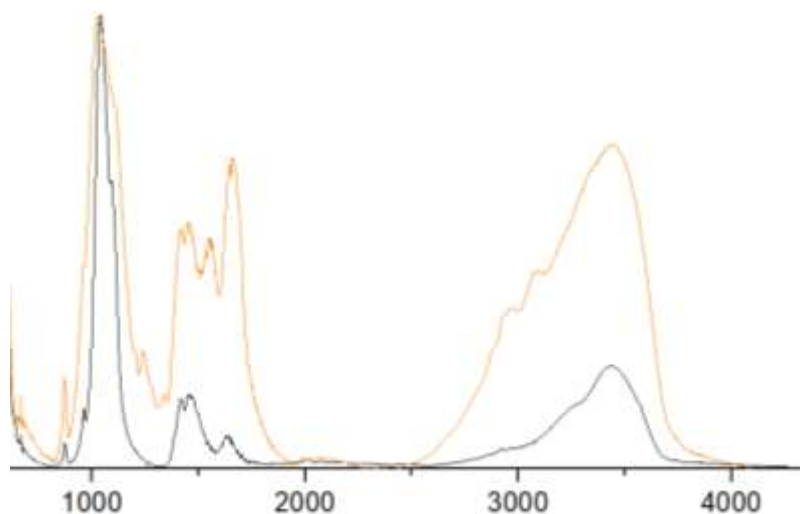


Figura 3.1: Espectro de uma amostra queimada e outra não queimada. A laranja temos a amostra não queimada e a preto esta representada a amostra queimada durante 90 minutos.

Pode-se ainda ver as diferenças existentes entre as diferentes durações experimentadas, representado na Figura 3.2.

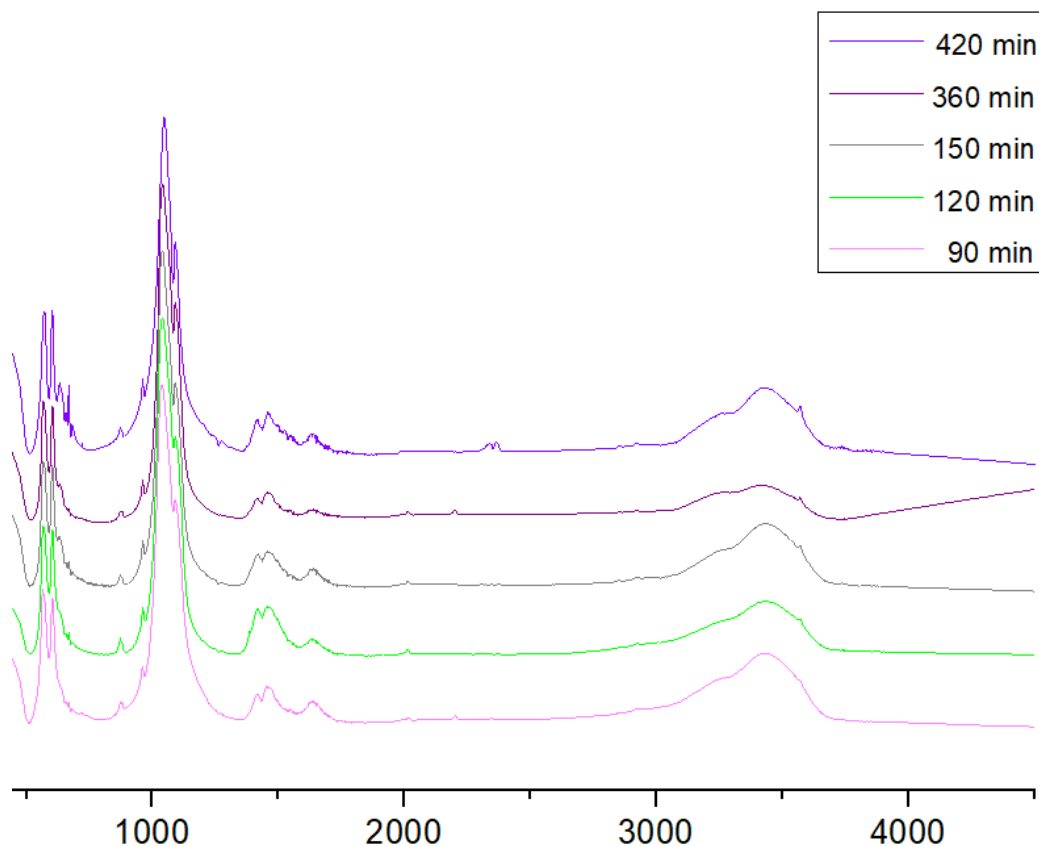


Figura 3.2: Espectros resultantes das amostras submetidas às diferentes durações estudadas neste projeto.

Como tal, os índices de cristalinidade (IC), carbonato/fosfato (C/P), hidróxido/fosfato (OH/P) e cianamida/fosfato (CN/P) foram medidos e comparados. Os dados preliminares destes são apresentados na Tabela 3.1, em que se apresentam a média e o desvio padrão de cada índice para cada um dos quatro grupos em estudo: amostras proximais pré queima (PreProx), amostras distais pré queima (PreDist), amostras proximais pós queima (PosProx) e amostras distais pós queima (PosDist). É ainda apresentado na Tabela 3.2 o intervalo de confiança de cada um dos índices aplicado a cada grupo amostral, a 95%.

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 3.1: Média e desvio padrão de cada índice para cada grupo de amostras.

Índice	PreProx		PreDist		PosProx		PosDist	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
IC	3,100	0,270	3,165	0,303	4,271	1,336	4,655	0,828
C/P	0,412	0,076	0,425	0,077	0,241	0,184	0,105	0,044
OH/P	0,376	0,066	0,359	0,055	0,411	0,108	0,433	0,087
CN/P	0,001	0,021	0,001	0,020	0,004	0,01	0,010	0,008

PreProx e PreDist representam os grupos de amostras proximais e distais não queimadas, respetivamente. E PosProx e PosDist equivalem aos grupos de amostras proximais e distais queimadas, respetivamente. E SD representa o desvio padrão.

Tabela 3.2: Intervalo de confiança de cada um dos índices para cada grupo de amostras.

Índice	PreProx	PreDist	PosProx	PosDist
IC	2.993 - 3,207	3.045 - 3.285	3,743 – 4,800	4,328 – 4,984
C/P	0,382 – 0,442	0,395 – 0,456	0,169 – 0,315	0,087 – 0,123
OH/P	0,350 – 0,402	0,338 – 0,381	0,367 – 0,453	0,399 – 0,468
CN/P	-0,010 – 0-007	-0,060 – 0,009	0,000 – 0,008	0,007 – 0,014

Face aos resultados obtidos pode-se dizer que: (1) para o IC, o grupo que apresenta maior dispersão é o PosProx, seguido do PosDist, do PreDist e por último o PreProx; (2) no que concerne ao índice C/P, vê-se uma maior dispersão no PosProx e depois no PosDist, sendo que antes da queima esta é semelhante entre os dois grupos; (3) no índice OH/P, verifica-se maior dispersão no PosProx, seguido do PostDist, PreProx e PreDist. (4) por último, tem-se o CN/P cuja dispersão é maior no PreDist, depois no PreProx, seguidos do PosProx e PosDist.

Posteriormente, novas avaliações estatísticas foram feitas. Desta vez foi o teste de *Wilcoxon*, utilizado para ver se as variações entre dois grupos são ou não significativas e cujos resultados são apresentados na Tabela 3.3, com o respetivo valor da hipótese nula estabelecida: “não existe variação entre grupos”.

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 3.3: Resultados do teste de *Wilcoxon* que compara estatisticamente dois grupos amostrais e respetivo *pvalue* e decisão relativamente à hipótese nula.

Índice	Grupos comparados	<i>pvalue</i>	<i>H₀</i>
IC	PreProx * PreDist	0,5593	Aceita
	PosProx * PosDist	0,0836	Aceita
	PreProx * PosProx	0,0017	Rejeita
	PreDist * PosDist	2,002e ⁻¹³	Rejeita
C/P	PreProx * PreDist	0,5257	Aceita
	PosProx * PosDist	0,0248	Rejeita
	PreProx * PosProx	0,0018	Rejeita
	PreDist * PosDist	1,027e ⁻¹⁵	Rejeita
OH/P	PreProx * PreDist	0,4292	Aceita
	PosProx * PosDist	0,2486	Aceita
	PreProx * PosProx	0,46	Aceita
	PreDist * PosDist	0,0023	Rejeita
CN/P	PreProx * PreDist	0,5593	Aceita
	PosProx * PosDist	0,0215	Rejeita
	PreProx * PosProx	0,7058	Aceita
	PreDist * PosDist	0,1243	Aceita

Até agora avaliou-se se existia, ou não, diferenças antes e após a queima e intraósseas (quer antes e após a exposição ao calor). Mas o objetivo do presente estudo é avaliar o papel da duração da queima numa amostra submetida à mesma temperatura. Por conseguinte, a partir desta etapa, todos os testes são unicamente realizados na amostra depois de submetida à ação do calor.

Face à problemática levantada neste projeto, foram realizados testes de *Kruskal-Wallis*, cujos resultados estão expostos na Tabela 3.4 e vêm relacionar cada um dos índices de uma determinada região anatómica com a duração da exposição à fonte de calor.

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 3.4: Resultados do teste de *Kruskal-Wallis* que pretende averiguar a variação dos índices consoante a duração, na porção proximal e distal de cada grupo e respetivo pvalue e valor da hipótese nula.

Índice	Grupo analisado	pvalue	Valor da H_0
IC	PosProx * Dur	0,0078	Rejeita
	PosDist * Dur	0,0367	Rejeita
C/P	PosProx * Dur	0,0091	Rejeita
	PosDist * Dur	0,2422	Aceita
OH/P	PosProx * Dur	0,0082	Rejeita
	PosDist * Dur	0,0113	Rejeita
CN/P	PosProx * Dur	0,1594	Aceita
	PosDist * Dur	0,1029	Aceita

Adjacente ao teste anterior vem o *post hoc* do mesmo, o teste *Dunn* visto que no teste *Kruskal-Wallis* foram encontradas diferenças significativas entre as variáveis estudadas. Perante tal resultado, cabe-nos agora confrontar as diferenças encontradas entre durações de modo a determinar quais delas apresentam maior divergência. Os resultados obtidos apresentam-se na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: P value obtido pelo teste *Dunn* para a avaliação das diferenças entre durações, quer na porção proximal, quer na distal para o índice de cristalinidade, carbonato/fosfato, hidróxido/fosfato e cianamida/fosfato.

Durações (minutos)	IC		C/P		OH/P		CN/P	
	Prox	Dist	Prox	Dist	Prox	Dist	Prox	Dist
90 * 120	1	1	0,5801	1	1	1	1	0,4524
90 * 150	1	1	1	1	1	1	1	1
120 * 150	1	1	1	1	1	1	1	1
90 * 180	1	1	1	1	1	1	1	1
120 * 180	0,478	1	1	1	1	1	0,4783	1
150 * 180	1	1	1	1	1	1	0,6252	1
90 * 360	0,7758	0,0454	1	0,3003	0,0226	0,0717	1	1
120 * 360	0,0147	0,7501	0,0235	1	0,2735	1	1	0,6753
150 * 360	0,0654	1	0,1668	1	0,1892	1	1	1
180 * 360	1	1	1	0,8789	1	1	1	1
90 * 420	1	0,1541	1	1	0,1019	0,07	1	1
120 * 420	0,231	1	0,0512	1	0,9911	1	1	0,1389
150 * 420	0,794	1	0,3719	1	0,7083	1	1	1
180 * 420	1	1	1	1	1	1	0,492	1
360 * 420	1	1	1	1	1	1	1	1

Alterações Termicamente Induzidas

Por último, com o objetivo de avaliar em que durações os resultados eram mais dispersos, foi novamente calculado o intervalo de confiança (desta vez para as durações de exposição ao calor). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Intervalo de confiança de cada uma das durações para cada grupo de amostras.

Duração (minutos)	PosProx	PosDist
90	0,0826 – 0,4359	0,0826 – 0,4359
120	0,005 – 0,2914	0,005 – 0,2914
150	0,005 – 0,2914	0,005 – 0,2914
180	-0,0315 – 0,1796	-0,0032 – 0,1796
360	0,005 – 0,2914	0,005 – 0,2914
420	0,0546 – 0,3898	0,0546 – 0,3898

3.2. Variações cromáticas

Neste parâmetro, foram avaliadas as diferentes colorações resultantes do processo de aquecimento do presente estudo. De um total de 28 indivíduos, cinco apresentam uma coloração preta acinzentada (17,86%), nove correspondem a uma coloração branca com nuances azuis (32,14%) e 14 mostram uma cor branca com nuances cinzentas (50%), como se expõe na Tabela 3.7 e Figura 3.3, em que se apresentam as três tonalidades obtidas.

Tabela 3.7: Valor de N (número de indivíduos) e respetiva percentagem relativamente à avaliação de cor resultante

Cor	N	%
Preto e cinzento (90 minutos)	5	17,86
Branco com nuances azuis (120 – 420 minutos)	9	32,14
Branco com nuances cinzentas (120 – 420 minutos)	14	50
Total	28	100



Figura 3.3: Representação do leque de tonalidades obtidas após a exposição dos ossos ao calor. À esquerda apresenta-se o úmero esquerdo do indivíduo CC_NI_37, com uma tonalidade preta e cinzenta; ao meio está o úmero direito do indivíduo CC_NI_6, com uma cor branca com nuances azuis; à esquerda está o úmero esquerdo do indivíduo CC_NI_1 com uma cor branca e com nuances cinzentas.

É de notar ainda que, embora expostos à mesma temperatura (700°C), mas com diferentes durações, se registaram tonalidades dissemelhantes. A título de exemplo, temos a Figura 3.4 que mostra ambos os antímeros do mesmo indivíduo (CC_NI_37) em que o esquerdo esteve sob ação do calor durante 90 minutos e o direito durante 150 minutos.



Figura 3.4: Ambos os antímeros do Indivíduo CC_NI_37 da Coleção de Esqueletos Não Identificados do Cemitério dos Capuchos, submetidos à mesma temperatura, mas com durações diferentes. À esquerda está o úmero direito submetido à ação do calor por 150 minutos e à direita está o úmero esquerdo, queimado por 90 minutos.

3.3. *Variações morfométricas*

O erro interobservador conseguiu-se a partir do cálculo do erro técnico métrico (ETM) (Tabela 7.3 do Apêndice 1), segundo a metodologia Perini *et al.* (2005) e obteve-se um valor de 1,02%. Não sendo um erro significativo, utilizaram-se os dados métricos obtidos.

Alterações Termicamente Induzidas

Inicialmente procedeu-se à análise de estatística descritiva da morfologia, cuja informação se encontra na Tabela 3.8 e na Figura 3.5.

Tabela 3.8: Análise descritiva da amostra em estudo.

	logSize	Temperatura	Duração	Massa
Nbr.val	52.00	52.00	52.00	52.00
Nbr.null	0.00	26.00	26.00	0.00
Nbr.na	0.00	0.00	0.00	0.00
Min	6.41	0.00	0.00	23.20
Max	6.72	700.00	420.00	134.30
Amplitude	0.31	700.00	420.00	111.10
Soma	343.18	18200.00	5690.00	4119.21
Mediana	6.61	350.00	45.00	77.45
Média	6.60	350.00	109.42	79.22
Desvio padrão	0.01	49.01	20.47	4.02
CI.0.95	0.02	98.39	41.09	8.07
Variância	0.01	124901.96	21782.01	839.40
Coef.var	0.01	1.01	1.35	0.37

Nbr.val corresponde ao número de variáveis, Nbr.null diz respeito ao número de nulo, Nbr.na representa o número de não aplicável, CI.0.95 exibe o intervalo de confiança a 95%.

Alterações Termicamente Induzidas

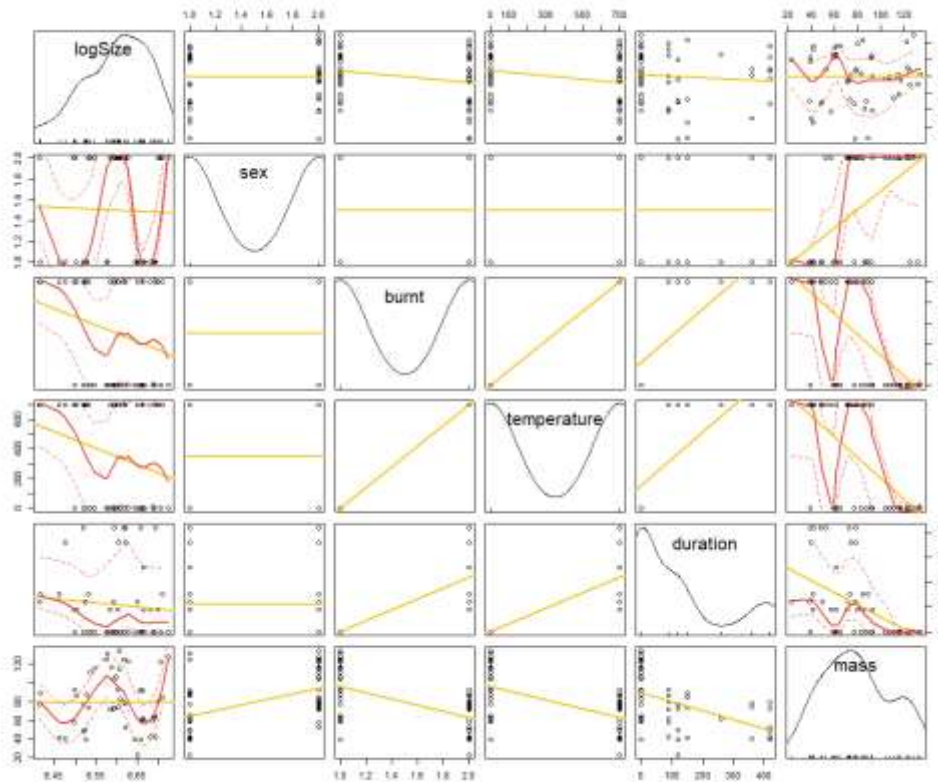


Figura 3.5: Análise descritiva da amostra em estudo em complemento à Tabela 4.8. A amarelo estão representados os modelos lineares e a vermelho estão representados os resultados da nossa amostra.

Na Figura 3.6 temos a representação dos valores médios de deformação dos indivíduos em estudo.

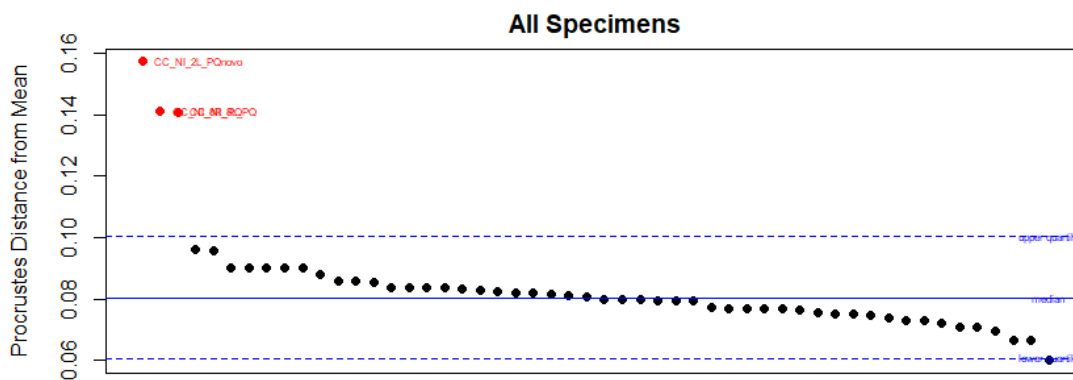


Figura 3.6: Representação de todos os indivíduos submetidos a GPA. Os três indivíduos exibidos a vermelho representam *outliers*.

Alterações Termicamente Induzidas

É ainda importante agrupar os ossos da nossa amostra consoante o seu grau de deformação. Na Figura 3.7 é apresentada uma divisão da amostra antes e depois de submetida à ação do calor em que se faz uma divisão entre úmeros esquerdos e direitos (eixo PC1) e ainda com os respetivos graus de deformação e fragmentação (eixo PC2). O Apêndice 2 contém as malhas de deformação de cada um dos ossos analisados.

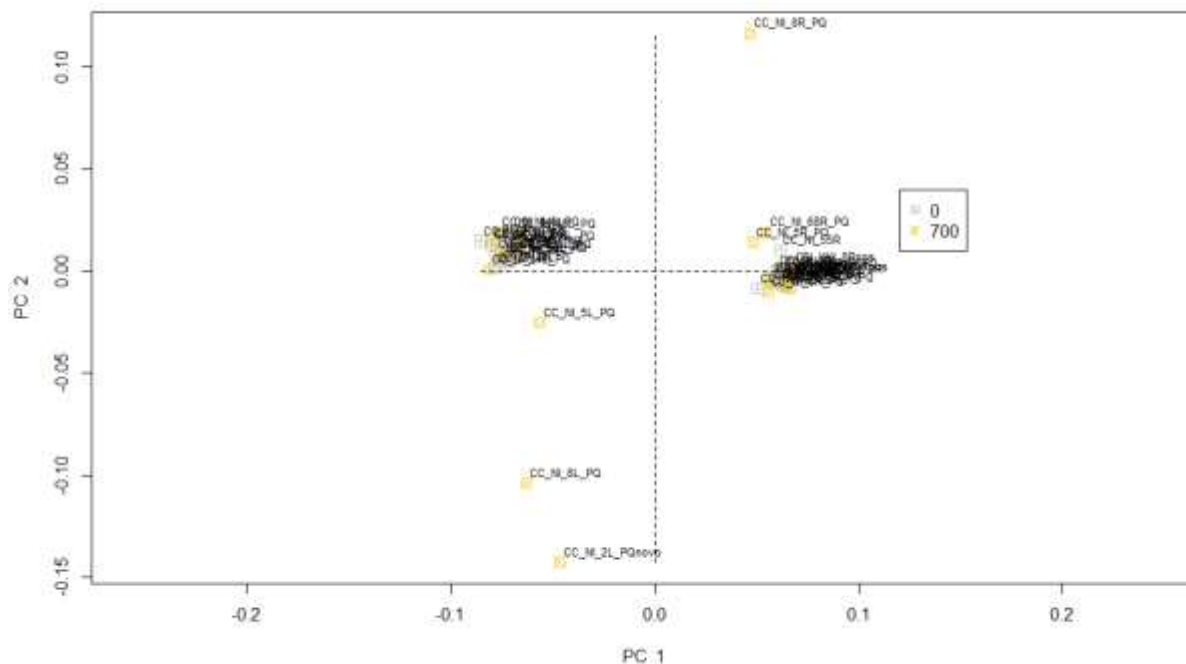


Figura 3.7: Distribuição da amostra por lateralidade (PC1) e por grau de deformação (PC2). A cinzento estão os indivíduos não queimados e a amarelo os indivíduos queimados.

Sabendo assim que existe alguma variação após a queima, foi realizado o teste ANOVA de *Procrustes* de modo a quantificar essa mesma variação e cuja hipótese nula considerada foi “não há deformação”. Este teste é semelhante a uma ANOVA simples, mas com a diferença de que trabalha com coordenadas de *Procrustes*. Os resultados são apresentados na Tabela 3.9.

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 3.9: Resultados da ANOVA de *Procrustes* para avaliação da morfometria.

	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média	F	Z	Pvalue
logSize	1	0,0025	0,0025	0,3317	0,2575	0,870
Duração	1	0,0034	0,0034	0,4467	0,3431	0,744
logSize:duração	1	0,0056	0,0 056	0,7365	0,5646	0.466
Residual	48	0,3678	0,0077			
Total	51	0,3794				

Toda esta análise, como referido anteriormente, foi baseada na colocação de *Landmarks* que foi profundamente influenciada pela destruição óssea. Um exemplo pode ver-se na Figura 3.8.



Figura 3.8: Úmero esquerdo do indivíduo CC_NI_2 em norma lateral (em cima) e norma posterior (em baixo) depois de submetido à ação do calor por 420 minutos.

4. Discussão

4.1. Variações químicas

Através da análise dos espectros da Figura 3.1, pode-se dizer que existem diferenças significativas principalmente nas amidas que se encontram compreendidas entre os comprimentos de onda dos 1200 aos 2000; e entre os 1500 e os 2000 é de notar que com o aquecimento, dois dos picos se tornaram num só, o que se deve à decomposição dos compostos orgânicos. Outra grande diferença é notada em comprimentos de onda superiores aos 2500 em que nota uma decomposição significativa das moléculas de água.

Na Figura 3.2, apesar de ténues, é possível notar certas diferenças nos espectros das diferentes durações realizadas. Os picos mais marcados representam o PO_4 , entre comprimentos de onda entre os 500 e os 1000, sendo ainda possível notar o aparecimento um terceiro pico (OH). Por volta dos 1500, não são notadas variações significativas no CO_3 . Já no espectro dos 420 minutos, por volta de comprimentos de onda que rondam os 2300 é possível notar a presença de dois picos que representam CO_2 que podem resultar da interferência do meio aquando a realização da análise. É possível detetar modificações entre comprimentos de onda compreendidos entre os 3000 e os 4000 que advêm das quebras de ligações químicas da água com a libertação de OH^- que vai ser introduzido na estrutura da apatite através de rehidroxilação, tal como Pasteris *et al.* (2012) referem.

Pelas médias registadas pode-se dizer que antes da queima, as diferenças intraósseas são reduzidas e que estas aumentam depois dos ossos serem submetidos à ação do calor.

Através do intervalo de confiança, avaliou-se a confiabilidade de todas as estimativas posteriormente realizadas. Como foi aplicado a todos os grupos da amostra de forma igual, sabe-se que um intervalo de confiança pequeno é mais confiável do que um maior, sendo que os extremos deste intervalo são os limites de

confiança. Aqui, à semelhança de estudos anteriores (Thompson *et al.* 2011 e 2013), também se conseguiu notar um aumento de todos os índices com a ação do calor com exceção do índice carbonato/fosfato uma vez que com o processo de aquecimento há uma quebra nas ligações de carbonato, e conseqüentemente a sua diminuição, tal como nos dizem Pasteris *et al.* (2012) e Reidsma *et al.* (2016). Em contrapartida à diminuição de carbonato, segundo Pateris *et al.* (2014) verifica-se um aumento de hidróxido que se regista também no presente estudo através do aumento do índice OH/P. Tais conclusões estão ainda em conformidade com Mamede *et al.* 2017, cujo estudo mostrou um aumento de todos os índices com exceção do C/P.

Thompson *et al.* (2009) havia retratado a existência de diferenças intraósseas. No entanto, os valores das médias obtidos mostram que as diferenças de índices registadas entre regiões do mesmo osso são reduzidas, estando de acordo com Gonçalves *et al.* (2018). Mas após o processo de aquecimento é de notar que as diferenças vêm a aumentar em todos os índices

Estes resultados preliminares mostram, assim, que existem diferenças intraósseas no pós queima e ainda entre o pré e o pós queima, mas que necessitam de ser comprovadas.

Para tal, fez-se teste de *Wilcoxon* com o objetivo de determinar se as diferenças entre grupos eram ou não significativas em cada índice. Assim, estabeleceu-se uma hipótese nula (H_0) “não existe variação” que consoante o *pvalue* vai ser aceite ou não.

De acordo com os resultados obtidos, o IC varia entre amostras queimadas e não queimadas, mas não se registam diferenças intraósseas antes da queima e diferenças intraósseas depois da queima, tal como Gonçalves *et al.* (2018) havia reportado.

O índice C/P, segundo os resultados obtidos, apresenta diferenças entre grupos queimados e não queimados e ainda é de notar uma diferença intraóssea (entre as regiões proximal e distal) mas somente após ter sido alterado pelo calor, uma vez

que segundo Reidsma *et al.* (2016), a partir dos 600°C a matéria orgânica já foi toda decomposta e a fração mineral fica mais exposta e suscetível a alterações.

Os testes realizados no índice OH/P mostram que apenas existe uma variação entre as regiões distais dos ossos antes e após a ação do calor, respetivamente, o que se pode dever à proximidade da fonte de calor tal como Shipman *et al.* (1984) e Bennett (1999) defendem ter importância.

Por último, tem-se o índice CN/P que apenas mostra uma variação intraóssea após a queima, o que mais uma vez pode estar relacionado com a fragilidade e suscetibilidade dos ossos queimados.

No geral, são retratadas diferenças entre amostras antes e após a queima que se devem à severa ação do calor.

Passando agora ao objetivo fulcral desta investigação, averiguar o papel da duração da exposição ao calor nos ossos e tomando a mesma hipótese nula, pode-se dizer que para o índice de cristalinidade e para o índice hidróxido/fosfato, a duração da exposição ao calor provoca variações no seu ratio. Já para o índice carbonato/fosfato são apresentados valores muito distintos em que se assume a influência na região proximal, mas não na distal. Tal facto pode estar relacionado com a proximidade à fonte de calor tal como defendido por Shipman *et al.* (1984) e Bennett (1999). Contudo, apesar de se assumir que a duração da exposição ao calor exerce influência nos ossos, esta parece não se manifestar no índice de CN/P.

Registada a variação dos componentes químicos nos ossos, importa agora saber entre que durações é que as diferenças são mais notórias

Na interpretação do *post hoc* de Kruskal-Wallis, sabe-se, *a priori*, que quanto menor o valor de *pvalue*, maior é a variação. Aqui pretende-se então confrontar grupos e avaliar onde as diferenças se fazem sentir mais.

Para o IC, as durações cujas variações são mais distintas são entre a duração 120 versus 360 para a região proximal. Para a distal, foram registadas maiores diferenças entre as durações 90 versus 360, o que apoia a hipótese anteriormente estabelecida de que as variações intraósseas são mais acentuadas após a queima.

Alterações Termicamente Induzidas

No índice C/P, na região proximal as durações que apresentam maior diferença no que toca às alterações ósseas ocorridas são 120 versus 360. Já na região distal parece existir maior diferença entre os 90 minutos e os 360 minutos.

No terceiro índice, registaram-se diferenças mais significativas entre as queimas de 90 minutos e de 360 minutos na porção proximal e entre os 90 minutos e os 360 minutos, mas também entre os 90 e os 420 minutos, para a porção distal.

Até então todos os índices apresentaram maior variação quando comparadas uma duração baixa e uma duração alta, exceto o índice CN/P em que as maiores dissemelhanças se registaram em queimas realizadas durante 120 minutos e queimas de 180 minutos (durações semelhantes) na porção proximal. No entanto a porção distal vai ao encontro da norma em que as maiores diferenças se registam entre queimas a 120 minutos e queimas a 420 minutos.

No geral os resultados deste teste mostraram que alterações manifestadas a baixas durações são em grande medida desiguais daquelas registadas a altas durações o que nos leva a crer que não só a temperatura como também a duração e ainda a proximidade à fonte de calor desempenham um papel fundamental no comportamento dos ossos quando exposto à ação do calor. Tal conclusão corrobora ensaios anteriormente publicados, dos quais são exemplo Shipman *et al.* (1984), Bennett (1999).

No entanto, têm de ser considerados o tipo de osso, o seu grau de desenvolvimento, o sexo, a idade e condições patológicas adjacentes a cada elemento da amostra, fatores importantes apontados por Paschalis *et al.* (1997) Alvarez Lloret *et al.* (2006) e mais recentemente por Gonçalves *et al.* (2015 e 2018). Mas, apesar de importantes estes fatores não consistiram uma variável na nossa amostra porque a maioria pertence à Coleção de Esqueletos Não Identificados do Cemitério dos Capuchos e as informações associadas a esta são apenas uma estimativa, contando com intervalos etários alargados (José, 2019; Tomé, 2019). E a amostra cuja informação está disponível (CEI/XXI), conta apenas com quatro indivíduos com idades entre os 83 e 89, onde a densidade óssea pode vir a ser relacionada. Daqui nasce a necessidade de futuros estudos que tenham em conta tais fatores.

À primeira vista pode-se dizer que a diferença na dispersão de valores nas regiões proximal e distal é extremamente reduzida ou até mesmo nula.

Através de novos cálculos de intervalo de confiança para cada duração é possível inferir a dispersão da amostra concluindo assim que esta assume valores menores para a duração de 180 minutos, a mesma para durações de 120, 150 e 360 minutos e que é maior nas duas durações dos extremos, ou seja, a 90 minutos e 420 minutos. Desta forma é legítimo assumir que existe uma maior variação intragrupo a durações de 90 e 420 minutos e a menor variação corresponde à duração de 180 minutos.

4.2. Variações cromáticas

Embora expostos à mesma temperatura, como já foi referido, os resultados deste parâmetro apontam para três tonalidades diferentes – preto acinzentado, branco com matizes azuis e branco com uma ligeira tonalidade de cinzento.

De facto, como Snoeck & Schulting (2014) defendem, este parâmetro é o reflexo das alterações ocorridas na composição e estrutura química.

De acordo com Shipman *et al.*, 1984, a amostra em estudo inserir-se-ia no estágio IV (645-940°C) que corresponde a uma cor branca com nuances azuis ou cinzentas. De facto, 82,14% da amostra estudada corrobora esta hipótese. No entanto, 17,86% dos úmeros em análise não se enquadram nesta classificação, apontando para um estágio III (525-645°C), segundo esta classificação (que não engloba a nossa temperatura). Tal pode dever-se à proximidade que a temperatura experimentada apresenta ao limite superior do estágio III.

Segundo Stiner *et al.* (1995), os resultados apontam para um grau 4 para 17,86% da amostra, que segundo a cor apresentada estaria menos de metade calcinado. Mas para o grupo mais significativo da amostra, tem-se um grau 5, ou seja, mais de metade calcinado, uma vez que está mais branco do que preto.

O que se pode inferir é que a duração da exposição tem impacto na cor dos ossos queimados e que a temperatura é um fator mais variável e portanto menos fidedigno, uma vez que ossos expostos ao calor por 90 minutos apresentam uma tonalidade escura e ossos cuja exposição se insere entre 120 – 420 minutos têm todas as tonalidades a tender para o branco.

Assim, os resultados da cor apresentados neste projeto estão em desacordo com as hipóteses defendidas por Shipman *et al.* (1984) e Stiner *et al.* (1995), bem como Ellingham *et al.* (2015a) que defendem que a cor reflete uma aproximação da temperatura, uma vez que temos dois úmeros, expostos à mesma temperatura e apresentam tonalidades completamente diferentes. Visto pertencerem ao mesmo indivíduo e o que difere é a duração da exposição ao calor, é legítimo afirmar que a duração possa exercer maior influência na manifestação da cor.

Mamede *et al.* (2017), embora não explorando intensivamente a cor, dizem que até aos 500°C, o osso apresenta uma tonalidade escura e a partir desta temperatura, começa a adquirir uma tonalidade mais clara. Mas, a 700°C ainda se têm ossos pretos, o que não está totalmente de acordo.

Há que ter em atenção que este parâmetro, tal como defendem Shahack-Gross *et al.* (1997) e Thompson *et al.* (2013), apresenta uma enorme subjetividade pois baseia-se numa estimativa visual que pode variar de observador para observador e ainda com as condições de luz. Por estas razões, está-se perante a necessidade de estudos futuros que venham apresentar resultados realmente assertivos, uma vez que neste projeto se deveria ter avaliado o erro inter e intra observador de forma a combater a subjetividade, o que não foi inicialmente previsto.

4.3. Variações morfométricas

Como o valor do erro inter observador, calculado através do erro técnico métrico, foi de 1,02% e segundo Perini *et al.* (2005) este não é significativo, as medidas foram utilizadas.

A avaliação da morfologia teve por base a marcação de *landmarks*, onde se notou que alguns ossos, depois de submetidos à ação do calor, apresentavam algum grau de deformação. Após a análise de GPA e como pode ser visto no gráfico presente da Figura 3.6, notou-se a presença de três *outliers* – CC_NI_2L, CC_NI_8R e CC_NI_8L, isto é, indivíduos com elevado grau de deformação e que se destacam drasticamente de todos os outros. Estes três indivíduos, devido à sua disparidade podem vir a causar interferência nos resultados da nossa análise.

Tal como em Coelho (2015), temos um gráfico (Figura 3.7) que nos mostra os indivíduos que apresentam uma variação maior e que se destacam do restante grupo. Aqui os indivíduos CC_NI_2L, CC_NI_8L e CC_NI_8R são os que apresentam maior deformação seguidos pelo CC_NI_5L. Os restantes apresentam uma forma semelhante, com pequenas variações entre eles. Pode-se notar que estes indivíduos que se encontram fora do grande grupo são do sexo masculino e foram submetidos ao calor durante períodos longos (360 e 420 minutos). A primeira asserção está descrita em Coelho (2015). Daqui pode-se dizer que a durações mais baixas a dispersão não é tão grande como quando os ossos são sujeitos a durações mais altas mas mais uma vez estamos perante a necessidade de novos estudos de forma a validar tal teoria, uma vez que apenas se tratam de três indivíduos com este comportamento. De modo a compreender visualmente as alterações na morfologia, no Apêndice 2, podem-se encontrar as malhas com as respetivas *landmarks* de cada osso.

Do resultado do teste ANOVA, o que se pode dizer é que, segundo o *pvalue*, se aceita a hipótese nula de que não há deformação ou pelo menos que esta não é significativa e de facto apenas é acentuada em três dos espécimes em estudo. Tal conclusão está em desacordo com os resultados obtidos por Coelho (2015). Mas a diferença pode estar relacionada com a subjetividade aquando da colocação das *landmarks* uma vez, que apesar de cada uma delas estar associada a uma determinada região anatómica, o ponto exato de colocação poder variar do modelo pré queima para o modelo pós queima, principalmente devido às alterações manifestadas. Ou mesmo o facto de existirem ossos em que não foi possível colocar

Alterações Termicamente Induzidas

as 35 *landmarks* pois as respetivas zonas anatómicas mostravam-se verdadeiramente destruídas, como representado na Figura 3.8.

Consequentemente, de forma a obter melhores resultados, testes futuros neste âmbito serão necessários.

5. Considerações finais

Neste capítulo propõe-se resumir as etapas realizadas ao longo de todo o projeto, através do qual se avaliaram as alterações termicamente induzidas na composição e estrutura química, na cor e morfologia numa amostra de úmeros. Isto porque os ossos queimados ainda representam um enorme desafio devido à sua disparidade de reações face aos agentes do meio. Neste caso em particular perante a ação do calor quando submetidos a diferentes durações (90 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos, 360 minutos e 420 minutos).

De forma a avaliar as modificações químicas, foram realizadas análises através de espectroscopia vibracional, FTIR-KBr, cuja validade dos resultados foi avaliada estatisticamente com recurso à linguagem de programação R.

A cor foi avaliada por meio comparações de fotografias tiradas antes e após a exposição térmica e confrontadas com os métodos de avaliação já existentes.

Para a morfologia, foram realizadas digitalizações tridimensionais de cada osso, com o intuito de criar modelos virtuais que permitissem a sua avaliação estatística, novamente em R.

As grandes dificuldades comuns a todas as metodologias implementadas prenderam-se com a análise estatística, devido à pouca experiência e falta de contacto com programação, exigindo desta forma uma maior atenção e dedicação às mesmas; e ainda ao desconhecimento das normas e *softwares* utilizados que tiveram de ser conhecidos e aprendidos de raiz. A interpretação dos resultados também se revelou um verdadeiro desafio pois, apesar dos estudos já publicados, não se sabia o que esperar.

Durante a realização de todo o procedimento prático, vários foram os imprevistos que foram surgindo e que impediram o total cumprimento do cronograma. O mais

marcante foi a avaria do forno que condicionou e atrasou em cerca de dois meses a realização da presente dissertação.

Face as adversidades, a passagem por cada processo teve de ser mais breve de modo a conseguir realizar-se o proposto.

Podemos concluir que **a ação térmica altera consideravelmente a estrutura e composição química dos ossos e apesar de não serem notadas diferenças intraósseas antes da queima, a mesma realidade não se mantém após a queima. Pode ainda concluir-se que a espectroscopia vibracional desempenha um papel fundamental na avaliação das alterações térmico induzidas nos ossos.**

No que respeita às alterações de cor, percebeu-se uma diferença entre os ossos queimados durante 90 minutos e os restantes, em que os primeiros apresentaram uma cor enegrecida e os outros uma tonalidade branca. A conclusão que se consegue apurar aqui é de que, neste estudo, **a duração tem influência na manifestação da cor, mas, de forma a corroborar tal afirmação, novos estudos necessitam de ser realizados.**

Morfologicamente, grande parte da amostra não mostrou alterações significativas, no entanto três dos úmeros mostraram-se verdadeiramente alterados e deformados. Atestou-se que os três pertenciam a indivíduos do sexo masculino e que foram sujeitos a ação do calor por 360 e 420 minutos. Tal confere uma variável que necessita de futuros estudos para ser aprofundada, com o intuito de conhecer bem as alterações termicamente induzidas para o estabelecimento de métodos métricos capazes de acompanhar o comportamento do osso quando sujeito a condições adversas, uma vez que em antropologia forense, os restos humanos queimados surgem nos mais diversos contextos, desde acidentes de aviação, viação ou ferroviários, explosões e incêndios com origem antrópica ou natural. Em todas as situações descritas, pode estar-se perante cenários criminosos ou acidentais. Assim é imperativo a intervenção de antropólogos forenses, conjuntamente com profissionais de outras áreas, no que concerne à identificação das vítimas mortais e atribuição da respetiva causa e circunstância da morte, não

Alterações Termicamente Induzidas

só com o intuito de desvendar a mão criminosa, mas também para devolver o corpo à sua família.

A partir deste estudo pode-se concluir que a duração da exposição ao calor tem influência na composição química, cor e morfologia (a última não tão marcada) dos ossos. No entanto, por muito que se pretenda uma aproximação à realidade, tal ainda é difícil visto que é impossível prever o comportamento de um incêndio.

Atendendo a que os corpos queimados são cada vez mais frequentes, não só na rotina da antropologia forense, como também nos cenários de exceção (sobretudo nos desastres de massa), os testes efetuados revelaram-se pertinentes para ajudar a resolver estes mesmos casos.

6. Referências bibliográficas

- Alvarez-Lloret, P., Rodriguez-Navarro, A. B., Romanek, C. S., Gaines, K. F., & Congdon, J. (2006). Quantitative Analysis of Bone Mineral Using Ftir. *Macla*, 6, 45–47. <https://doi.org/10.1109/CLUSTR.2008.4663796>
- Bennett, J. L. (1999). Thermal Alteration of Buried Bone. *Journal of Archaeological Science*, 26(1), 1–8. <https://doi.org/10.1006/jasc.1998.0283>
- Bohnert, M., Rost, T., & Pollak, S. (1998). The degree of destruction of human bodies in relation to the duration of the fire. *Forensic Science International*, 95(1), 11–21. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(98\)00076-0](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(98)00076-0)
- Boskey, A. L. (2007). Mineralization of Bones and Teeth. *Elements*, 3, 387–393.
- Cain, C. R. (2005). Using burned animal bone to look at Middle Stone Age occupation and behavior. *Journal of Archaeological Science*, 32(6), 873–884. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2005.01.005>
- Chakraborty, S., Bag, S., Pal, S., & Mukherjee, A. K. (2006). Structural and microstructural characterization of bioapatites and synthetic hydroxyapatite using X-ray powder diffraction and Fourier transform infrared techniques. *Journal of Applied Crystallography*, 39(3), 385–390. <https://doi.org/10.1107/S0021889806010351>
- Coelho, J. (2015). Unwarping Heated Bones: A Quantitative Analysis of Heat-induced Skeletal Deformations Using 3D Geometric Morphometrics. (Dissertação de Mestrado). Universidade de Coimbra, Portugal.
- Collins, M. J., Nielsen-Marsh, C. M., Hiller, J., Smith, C. I., Roberts, J. P., Prigodich, R. V., Wess, T. J., Csapò, J., Millard, A. R., & Turner-Walker, G. (2002). The Survival of Organic Matter in Bone: a Review. *Archaeometry*, 44(3), 383-394.
- Devlin, J. B. & Herrmann, N. P. (2015). Bone Colour. In C. W. Schmidt & S. A. Symes (2^a ed), *The Analysis of Burned Human Remains* (pp.119 - 138).

- Dirkmaat, D. C., Cabo, L. L., Ousley, S. D., & Symes, S. A. (2008). New perspectives in forensic anthropology. *American Journal of Physical Anthropology*, 137, 33–52. <https://doi.org/10.1002/ajpa.20948>
- Dowker, S. E. P., & Elliott, J. C. (1979). Infrared absorption bands from NCO⁻ and NCN²⁻ in heated carbonate-containing apatites prepared in the presence of NH₄⁺ ions. *Calcified Tissue International*, 29(1), 177–178. <https://doi.org/10.1007/BF02408075>
- Ellingham, S. T.D., Thompson, T. J. U., & Islam, M. (2015b). Thermogravimetric analysis of property changes and weight loss in incinerated bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 438, 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2015.08.009>
- Ellingham, S. T.D., Thompson, T. J. U., Islam, M., & Taylor, G. (2015a). Estimating temperature exposure of burnt bone - A methodological review. *Science and Justice*, 55(3), 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.12.002>
- Enzo, S., Bazzoni, M., Mazzarello, V., Piga, G., Bandiera, P., & Melis, P. (2007). A study by thermal treatment and X-ray powder diffraction on burnt fragmented bones from tombs II, IV and IX belonging to the hypogeic necropolis of “Sa Figù” near Ittiri, Sassari (Sardinia, Italy). *Journal of Archaeological Science*, 34(10), 1731–1737. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2006.12.011>
- Escadafal, R., Girard, M. C., & Courault, D. (1989). Munsell soil color and soil reflectance in the visible spectral bands of landsat MSS and TM data. *Remote Sensing of Environment*, 27(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(89\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0034-4257(89)90035-7)
- Etok, S. E., Valsami-Jones, E., Wess, T. J., Hiller, J. C., Maxwell, C. A., Rogers, K. D., ... Woodgate, S. L. (2007). Structural and chemical changes of thermally treated bone apatite. *Journal of Materials Science*, 42(23), 9807–9816. <https://doi.org/10.1007/s10853-007-1993-z>

- Etxeberria, F. (1994). Aspectos macroscópicos del hueso sometido al fuego . Revisión de las cremaciones descritas en el País Vasco desde la Arqueología Macroscopic aspects of the bone subjected to fire . Revision of cremations. *MUNIBE (Antropologia-Arkeologia)*, 46, 111–116.
- Fairchild, M.D. (2013) Color Appearance Models. 3ª edição. Wiley,USA.
- Ferreira, M. T., Vicente, R., Navega, D., Gonçalves, D., Curate, F., & Cunha, E. (2014). A new forensic collection housed at the University of Coimbra, Portugal: The 21st century identified skeletal collection. *Forensic Science International*, 245, 202.e1-202.e5. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.09.021>
- Figueiredo, M., Fernando, A., Martins, G., Freitas, J., Judas, F., & Figueiredo, H. (2010). Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramics International*, 36(8), 2383–2393. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.07.016>
- Fredericks, J. D., Bennett, P., Williams, A., & Rogers, K. D. (2012). FTIR spectroscopy: A new diagnostic tool to aid DNA analysis from heated bone. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.07.014>
- Gonçalves, D. (2011). The reliability of osteometric techniques for the sex determination of burned human skeletal remains, *Journal of Comparative Human Biology*, 62, 351-358.
- Gonçalves, D. (2012). Cremains The Value of Quantitative Analysis for the Bioanthropological research of Burned Human Skeletal Remains. (Tese de Doutoramento). Universidade de Coimbra, Portugal
- Gonçalves, D., Cunha, E., & Thompson, T. J. U. (2015). Estimation of the pre-burning condition of human remains in forensic contexts. *International Journal of Legal Medicine*, 129(5), 1137–1143. <https://doi.org/10.1007/s00414-014-1027-8>

- Gonçalves, D., d'Oliveira Coelho, J., Amarante, A., Makhoul, C., Santos, I, O., Navega, O. & Cunha, E. (2017). Dead Weight: Validation of Mass Regression Equations on Experimentally Burned Skeletal Remains to Assess Skeleton Completeness. *Science & Justice*, 58(1), 2-6.
- Gonçalves, D., Thompson, T. J. U., & Cunha, E. (2011). Implications of heat-induced changes in bone on the interpretation of funerary behaviour and practice. *Journal of Archaeological Science*, 38(6), 1308–1313. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.01.006>
- 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*, 00, 1-17.
- Gower, J. C. (1975). Generalized procrustes analysis. *Psychometrika*, 40(1), 33-51.
- Harbeck, M., Schleuder, R., Schneider, J., Wiechmann, I., Schmahl, W. W., & Grupe, G. (2011). Research potential and limitations of trace analyses of cremated remains. *Forensic Science International*, 204(1–3), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.06.004>
- Hedges, R. E. M. (2002). Bone Diagenesis: na Overview of Processes. *Archaeometry*, 44(3), 319-328.
- Howes, J. M., Stuart, B. H., Thomas, P. S., Raja, S., & O'Brien, C. (2012). An Investigation of Model Forensic Bone in Soil Environments Studied Using Infrared Spectroscopy. *Journal of Forensic Sciences*, 57(5), 1161-1167. <http://doi.org//10.1111/j.1556-4029.2012.02236.x>
- José, A. (2019). Reconstruir uma identidade: Caracterização da Coleção de Esqueletos Não Identificados do Cemitério dos Capuchos. (Dissertação de Mestrado). Universidade de Coimbra, Portugal.
- Lebon, M., Reiche, I., Bahain, J. J., Chadeaux, C., Moigne, A. M., Fröhlich, F., ...

- 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(9), 2265–2276. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.03.024>
- Lebon, M., Reiche, I., Fröhlich, F., & Bahain, J. (2008). Characterization of archaeological burnt bones : contribution of a new analytical protocol based on derivative FTIR spectroscopy and curve fitting of the ν_1 ν_3 PO₄ domain. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 392, 1479–1488. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2469-y>
- Mamede, A. P., Gonçalves, D., Marques, M. P. M., & de Carvalho, L. A. E. B. (2017). Burned bones tell their own stories: A review of methodological approaches to assess heat-induced diagenesis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(8), 603-635.
- Makhoul, C., Amarante, A., Coelho, J. d'Oliveira, Navega, D., Almeida, M., Parker, S. F., ... Cunha, E. (2017). Experimental burning and real fire scenarios: Are they comparable in terms of chemical anthropology? *La Revue de Médecine Légale*, 8(4), 187. <https://doi.org/10.1016/j.medleg.2017.10.019>
- Makhoul, C. (sem data). Individualization of Human Burned Remains in commingled or scattered context through Vibrational Spectroscopy. (Tese de Doutoramento em preparação). Universidade Coimbra, Portugal.
- Mitteroecker, P., & Gunz, P. (2009). Advances in Geometric morphometrics. *Evolutionary Biology*, 36(2), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s11692-009-9055-x>
- Mkukuma, L. D., Skakle, J. M. S., Gibson, I. R., Imrie, C. T., Aspden, R. M., & Hukins, D. W. L. (2004). Effect of the proportion of organic material in bone on thermal decomposition of bone mineral: An investigation of a variety of bones from different species using thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry, high-temperature X-ray diffraction,. *Calcified Tissue International*, 75(4), 321–328. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-0199-5>

- 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. *Palaeo*, 249, 90–102. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2007.01.011>
- Paschalis, E. P., Betts, F., DiCarlo, E., Mendelsohn, R., & Boskey, A. L. (1997). FTIR Microspectroscopic Analysis of Normal Human Cortical and Trabecular *Bone*. *Calcif Tissue Int* , 61, 480-486.
- Pasteris, J. D., Wopenka, B., Freeman, J. J., Rogers, K., Valsami-Jones, E., van der Houwen, A. M., & Silva, M. J. (2004). Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. *Biomaterials*, 25, 229-238.
- Pasteris, J. D., Yoder, C. H., & Sternlieb, M. P., & Liu, S. (2012). Effect of carbonate incorporation on the hydroxyl content of hydroxylapatite. *Mineralogical Magazine*, 76(7), 2741–2759. <https://doi.org/10.1180/minmag.2012.076.7.08>
- Pasteris, J. D., Yoder, C. H., & Wopenka, B. (2014). Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite : The key to a better understanding of bone mineral. *American Mineralogist*, 99, 16–27.
- Perini, T. A., de Oliveira, G. L., Oenellas, J. S., & de Oliveira, F. P. (2005). Cálculo do erro técnico de medição em antropometria. *Sociedade Brasileira de Medicina do Esporte*, 11(1), 81-85.
- Piga, G., Malgosa, A., Thompson, T. J. U., & Enzo, S. (2008). A new calibration of the XRD technique for the study of archaeological burned human remains. *Journal of Archaeological Science*, 35(8), 2171–2178. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.02.003>
- Piga, G., Santos-Cubedo, A., Moya Solà, S., Brunetti, A., Malgosa, A., & Enzo, S. (2009). An X-ray Diffraction (XRD) and X-ray Fluorescence (XRF) investigation in human and animal fossil bones from Holocene to Middle Triassic. *Journal of Archaeological Science*, 36(9), 1857–1868. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2009.04.013>

- Pijoan, C. M., Mansilla, J., Leboreiro, I., Lara, V. H., & Bosch, P. (2007). Thermal alterations in archaeological bones. *Archaeometry*, 49(4), 713–727. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4754.2007.00331.x>
- Pucéat, E., Reynard, B., & Lécuyer, C. (2004). Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites?. *Chemical Geology*, 205, 83-97.
- Reidsma, F. H., Hoesel, A. Van, Os, B. J. H. Van, Megens, L., & Braadbaart, F. (2016). Journal of Archaeological Science : Reports Charred bone : Physical and chemical changes during laboratory simulated heating under reducing conditions and its relevance for the study of fire use in archaeology. *JASREP*, 10, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.10.001>
- Rey, C., Combes, C., Drouet, C., & Glimcher, M. J. (2009). Bone mineral : update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int*, 20, 1013–1021. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0860-y>
- Rogers, K. D., & Daniels, P. (2002). An X-ray diffraction study of the effects of heat treatment on bone mineral microstructure. *Biomaterials*, 23(12), 2577–2585. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00395-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00395-7)
- Rosas, A., Pérez-Criado, L., Bastir, M., Estalrich, A. Huguet, R., García-Taberner, A., Pastor, J. F., & de la Rasilla, M. (2015). A geometric morphometrics comparative analysis of Neandertal Humeri (epiphyses-fused) from the El Sidrón cave site (Asturias, Spain). *Journal of Human Evolution*. 82, 51-66.
- Schmidt, C. W., & Uhlig, R. (2012). Light Microscopy of Microfractures in Burned Bone. *Forensic Microscopy for Skeletal Tissues*. 915, 227–234. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-977-8>
- Schultz, J. J., Warren, M. W., & Krigbaum, J. S. (2015). Analysis of Human Remains. In C. W. Schmidt & S. A. Symes (2^a ed), *The Analysis of Burned Human Remains* (pp.83-104).
- Schurr., M. R., Hayes, R. G., & Cook, D. C. (2015). Thermally Induced Changes. In

C. W. Schmidt & S. A. Symes (2^a ed), *The Analysis of Burned Human Remains* (pp.105-118).

Shahack-Gross, R., Bar-Yosef, O., & Weiner, S. (1997). Black-coloured bones in Hayonim Cave, Israel: Differentiating between burning and oxide staining. *Journal of Archaeological Science*, 24(5), 439–446. <https://doi.org/10.1006/jasc.1996.0128>

Shipman, P., Foster, G., & Schoeninger, M. (1984). Burnt Bones and Teeth: an Experimental Study of Color, Morphology, Crystal Structure and Shrinkage. *Journal of Archaeological Science*, 11, 307–325.

Silva, F. (2005). Sinais de fogo: análise antropológica de restos ósseos cremados do Neolítico final/Calcolítico do tholos OP2b (Olival da Pega, Reguengos de Monsaraz). (Dissertação de Mestrado). Universidade de Coimbra, Portugal.

Snoeck, C., & Schulting, R. J. (2014). From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 416, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2014.08.002>

Squires, K. E., Thompson, T. J. U., Islam, M., & Chamberlain, A. (2011). The application of histomorphometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of early Anglo-Saxon burned bone. *Journal of Archaeological Science*, 38(9), 2399–2409. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.04.025>

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(6), 643–659. <https://doi.org/10.1006/jasc.2000.0634>

Stiner, M. C., Kuhn, S. L., Weiner, S., & Bar-Yosef, O. (1995). Differential Burning, Recrystallization, and Fragmentation of Archaeological Bone. *Journal of Archaeological Science*, 22(2), 223–237. <https://doi.org/10.1006/jasc.1995.0024>

- 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. <https://doi.org/10.1006/jasc.2000.0633>
- Tallman, M. (2013). Forelimb to Hindlimb Shape Covariance in Extant Hominoids and Fossil Hominins. *The Anatomical Record*, 296, 290-304.
- Thompson, T. (2002). The assessment of sex in cremated individuals: Some cautionary notes. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 35(2), 49–56. <https://doi.org/10.1080/00085030.2002.10757535>
- Thompson, T. J. U. (2004). Recent advances in the study of burned bone and their implications for forensic anthropology. *Forensic Science International*, 146, 203–205. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.063>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.11.013>
- 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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.10.044>
- Tomé, L. (2019). O primeiro passo para a identificação: Caracterização Antropológica de uma amostra proveniente do Cemitério dos Capuchos de Santarém. (Dissertação de Mestrado). Universidade de Coimbra, Portugal.
- Ubelaker, D. H. (2009). The forensic evaluation of burned skeletal remains: A

synthesis. *Forensic Science International*, 183(1–3), 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.09.019>

Vassalo, A. R., Cunha, E., de Carvalho, L. A. E. B., & Gonçalves, D. (2016). Rather yield than break: assessing the influence of human bone collagen content on heat-induced warping through vibrational spectroscopy. *International Journal of Legal Medicine*, 130(6), 1647–1656. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1400-x>

Vassalo, A. R., Mamede, A. P., Ferreira, M. T., Cunha, E., & Gonçalves, D. (2017). The G-force awakens: the influence of gravity in bone heat-induced warping and its implications for the estimation of the pre-burning condition of human remains. *Australian Journal of Forensic Sciences*, 1–8.
<https://doi.org/10.1080/00450618.2017.1340521>

Walker, P. L., Miller, K. W. P., & Richman, R. (2008). Time, Temperature, and Oxygen Availability: an Experimental Study of the Effects of Environmental Conditions on the Color and Organic Content of Cremated Bone. In C. W. Schmidt & S. A. Symes (Eds.), *The Analysis of Burned Human Remains* (pp.129-136).

White, T., & Folkens, P. (2005). *The Human Bone Manual*. (1^a ed). Amsterdam: Academic Press.

Wopenka, B., & Pasteris, J. D. (2005). A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science & Engineering*, 25, 131–143.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008>

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. (2012). *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. 2^a edição. Elsevier, Amesterdão.

Apêndice 1

Tabela 7.1: Análise métrica (em gramas e milímetros) da amostra constituída por 24 úmeros (esquerdo e direito) de 12 indivíduos da Coleção de Esqueletos Não Identificados do Cemitério dos Capuchos, antes de serem submetidos à ação do calor. Esq - esquerdo; Dir - direito; Ind – indeterminado - Observador 1

ID	Massa (gr)		Perímetro minino (mm)		Largura epicondílina (mm)		Diâmetro vertical cabeça (mm)		Diâmetro trans. cabeça (mm)		Comprimento máximo (mm)		Diâmetro mínimo (mm)		Diâmetro máximo (mm)	
	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.
CC_NI_1	92,1	91,5	61	58	56	56	42	41	38	38	292	295	21	21	18	16
CC_NI_2	134,3	116,8	69	70	64	65	46	46	Ind.	Ind.	330	328	23	25	20	20
CC_NI_5	65,2	62,2	59	60	56	54	38	38	Ind.	Ind.	291	285	22	21	15	15
CC_NI_6	122,7	83,1	68	65	58	56	50	46	44	Ind.	340	329	26	23	20	20
CC_NI_8	125,1	115	65	63	56	54	45	44	43	40	314	312	21	22	20	18
CC_NI_9	59,9	59,4	46	44	Ind.	49	34	37	34	34	277	273	16	16	13	12
CC_NI_14	107	103,6	59	57	59	57	44	43	Ind.	39	321	320	21	21	16	15
CC_NI_37	131,7	124,9	62	62	59	Ind.	39	40	36	38	302	303	21	22	20	19
CC_NI_44	115,8	111,1	64	63	55	53	43	Ind.	41	41	300	299	22	22	20	18
CC_NI_50	127,8	121,9	73	69	59	55	49	47	44	43	324	320	25	25	18	18
CC_NI_55	61,9	59,2	60	58	58	58	42	42	Ind.	Ind.	302	298	22	22	17	17
CC_NI_68	87,4	77,4	55	55	52	50	42	42	37	39	282	279	20	20	17	17

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 7.2: Análise métrica (em gramas e milímetros) da amostra constituída por 24 úmeros (esquerdo e direito) de 12 indivíduos da Coleção de Esqueletos Não Identificados do Cemitério dos Capuchos, antes de serem submetidos à ação do calor. Esq - esquerdo; Dir - direito; Ind – indeterminado - Observador 2

ID	Massa (gr)		Perímetro minino (mm)		Largura epicondilians (mm)		Diâmetro vertical cabeça (mm)		Diâmetro trans. cabeça (mm)		Comprimento máximo (mm)		Diâmetro mínimo (mm)		Diâmetro máximo (mm)	
	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.
CC_NI_1	92,2	91,4	60	57	57	57	42	40	38	38	290	294	21	20	18	16
CC_NI_2	134,4	116,7	69	69	64	65	45	46	Ind.	Ind.	330	327	23	25	20	20
CC_NI_5	65,4	62,2	58	60	56	54	38	39	Ind.	Ind.	290	286	21	21	15	15
CC_NI_6	122,7	83,1	68	66	58	55	50	46	43	Ind.	336	330	25	23	20	19
CC_NI_8	125,2	115	64	62	56	54	45	44	42	40	315	311	21	20	19	18
CC_NI_9	59,9	59,2	47	44	Ind.	49	36	37	35	34	278	274	16	15	13	12
CC_NI_14	107	103,6	58	57	60	57	44	43	Ind.	38	320	319	21	20	16	15
CC_NI_37	131,7	124,8	63	62	59	Ind.	39	41	37	38	301	303	22	21	20	19
CC_NI_44	116,1	111,2	65	63	56	53	44	Ind.	41	41	300	299	21	22	19	18
CC_NI_50	127,9	121,9	72	69	60	56	48	46	43	43	324	319	25	23	18	18
CC_NI_55	62	58,7	59	58	58	59	42	42	Ind.	Ind.	301	297	22	21	17	17
CC_NI_68	87,4	77,5	56	55	52	50	42	43	38	39	281	279	19	19	16	17

Alterações Termicamente Induzidas

Tabela 7.3: Cálculo do erro técnico de medição interobservador, segundo Perini et al. (2005)

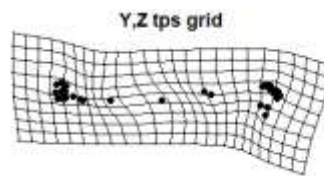
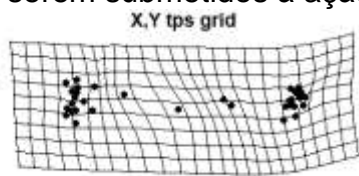
Média Ob1	102,206	94,572	60,620	58,907	57,352	54,17	42,546	42,307	39,375	38,984	302,833	300,463	20,935	20,204	17,287	16,778
Média Ob2	99,332	92,302	60,198	58,521	57,545	55,364	42,24	42,065	38,937	38,839	301,313	299,146	20,927	20,229	17,073	16,625
Desvio	-2,555	-2,090	-0,376	-0,344	0,169	1,193	-0,273	-0,212	-0,375	-0,127	-1,352	-1,171	-0,007	0,023	-0,19	-0,136
(Desv)²	6,527	4,37	0,141	0,118	0,029	1,424	0,074	0,045	0,141	0,016	1,827	1,371	0,000	0,000	0,036	0,018
Soma Desv²	16,137															
VMV	80,23															
ETM (%)	1,02															

Ob: Observador; VMV: valor médio da variável; ETM: erro técnico métrico

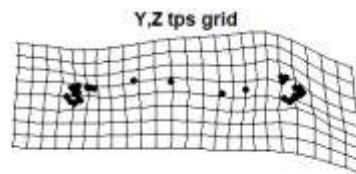
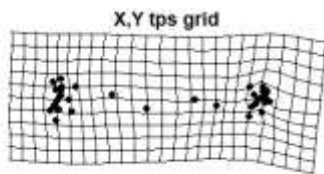
Tabela 7.4: Análise métrica (em gramas e milímetros) da amostra constituída por 24 úmeros (esquerdo e direito) de 12 indivíduos da Coleção de Esqueletos Não Identificados do Cemitério dos Capuchos, depois de serem submetidos à ação do calor. Esq - esquerdo; Dir - direito; Ind – indeterminado

ID	Massa (gr)		Perímetro mínimo (mm)		Largura epicondiliana (mm)		Diâmetro vertical cabeça (mm)		Diâmetro trans. cabeça (mm)		Comprimento máximo (mm)		Diâmetro mínimo (mm)		Diâmetro máximo (mm)	
	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.	Dir.	Esq.
CC_NI_1	61,9	61,9	55,5	55	55	53	41,5	40	36	36	298	292	17,5	16	19	19
CC_NI_2	92,6	73	64	55	63,5	53	45	Ind.	Ind.	Ind.	328	256	19,5	17	22,5	20
CC_NI_5	42,5	40,1	Ind.	51	46,5	50	Ind.	34	Ind.	Ind.	245	269	Ind.	13,5	Ind.	19,5
CC_NI_6	78,5	52,6	63	63	55,5	55,5	46	44	48	Ind.	333	327	14	20	24,5	23
CC_NI_8	78,7	74	49	55	46	48	39,5	44	40	42	259	274	14,5	16	78,5	18,5
CC_NI_9	41,8	39,4	45	44	41	47,5	36	36,5	35	35	273	270	12	13	16	16
CC_NI_14	72,2	71,5	55,5	54	58	55,5	43	42	39	37	319	315	15	15	20,5	19
CC_NI_37	88,7	86,3	60	61	57	56,5	38	38	34,5	36,5	303	300	18	18	21,5	21
CC_NI_44	77,5	73,5	60	59	53	52	42	40	39,5	39	297	298	18,5	17,5	21	21
CC_NI_50	84,2	79,8	68	66	58	56	47	46	42	Ind.	321	319	17,5	17,5	24	23,5
CC_NI_55	41,4	39	55	55	57	56	40	40	Ind.	Ind.	299	292	17	16	21,5	21,5
CC_NI_68	48,5	50	42	52	42,5	48	39	40,5	33,5	37	249	277	14	16	16	17,5

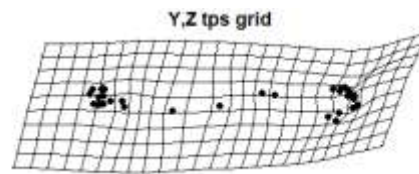
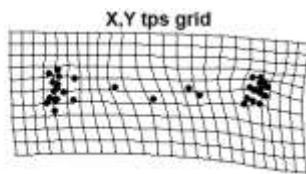
Apêndice 2: Malhas de cada osso com as respectivas *landmarks*, antes e após serem submetidos à ação do calor



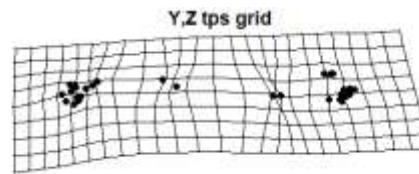
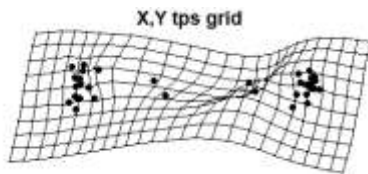
CC_NI_1L



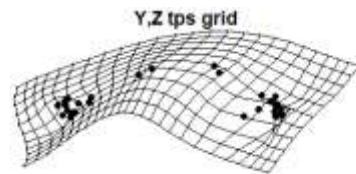
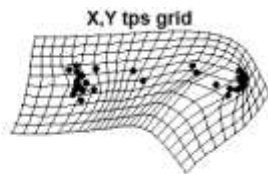
CC_NI_1R



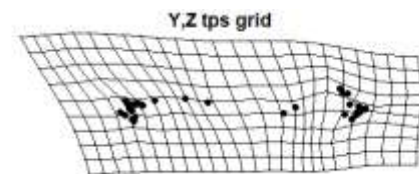
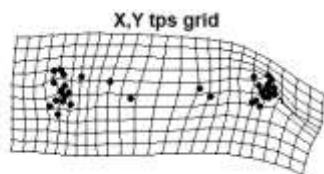
CC_NI_2L



CC_NI_2R

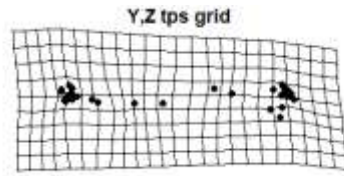
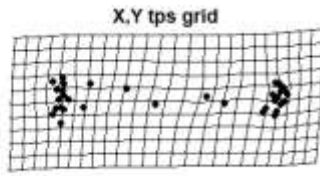


CC_NI_5L

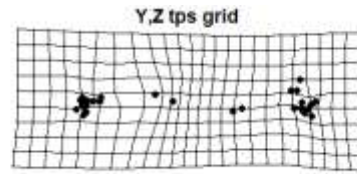
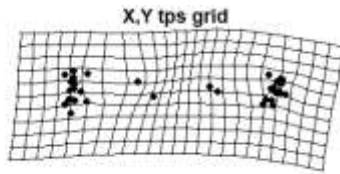


Alterações Termicamente Induzidas

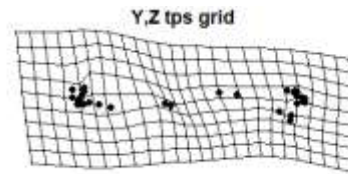
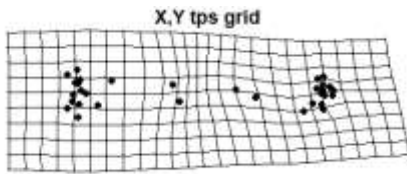
CC_NI_5R



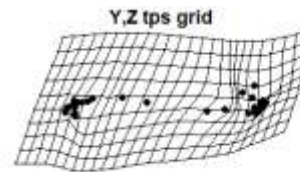
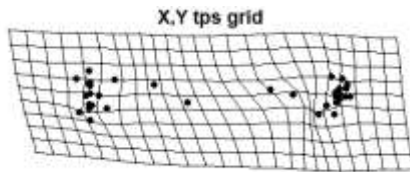
CC_NI_6L



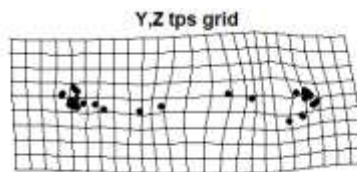
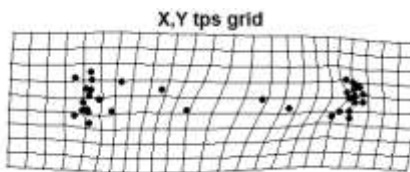
CC_NI_6R



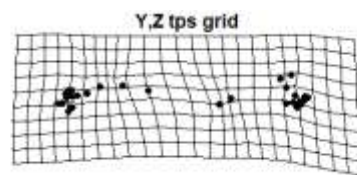
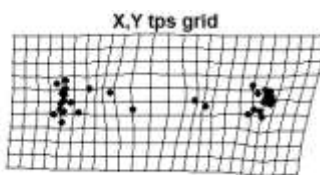
CC_NI_8L



CC_NI_8R

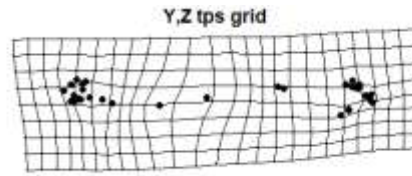
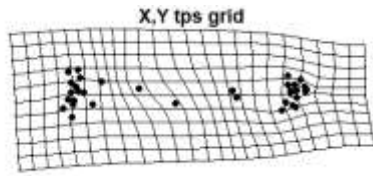


CC_NI_9L

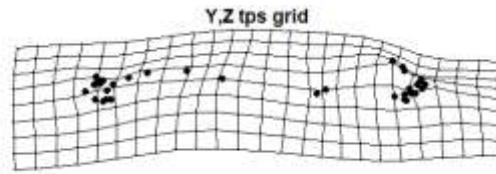
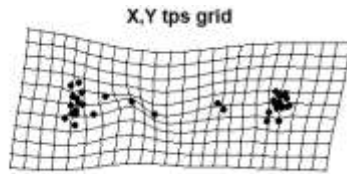


Alterações Termicamente Induzidas

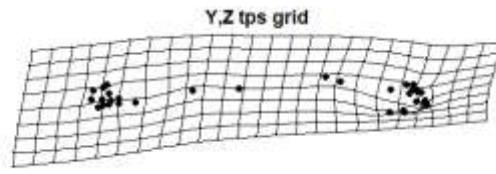
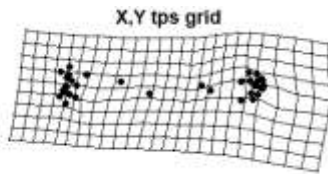
CC_NI_9R



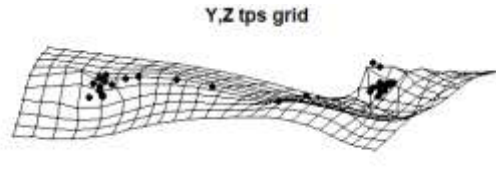
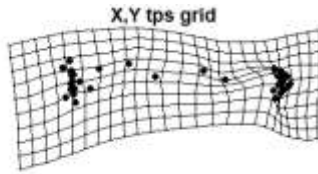
CC_NI_14L



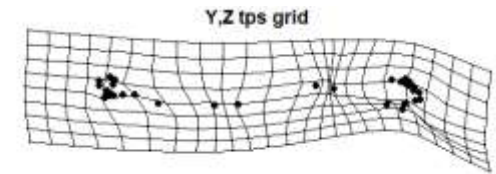
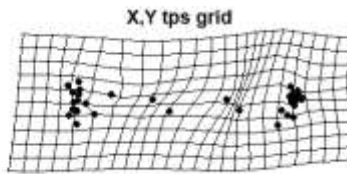
CC_NI_14R



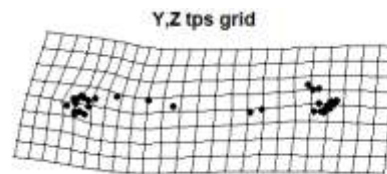
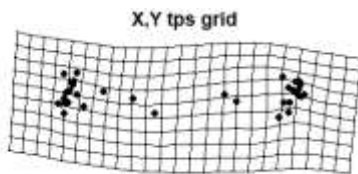
CC_NI_37L



CC_NI_37R

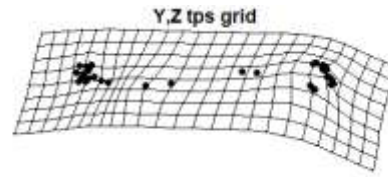
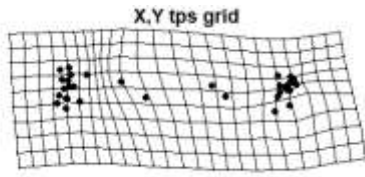


CC_NI_44L

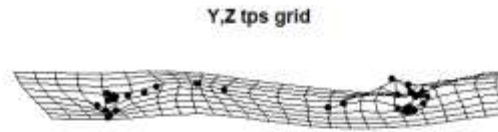
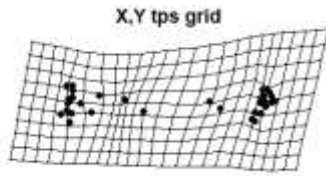


CC_NI_44R

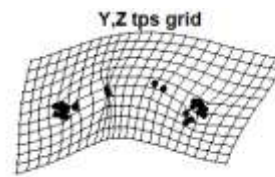
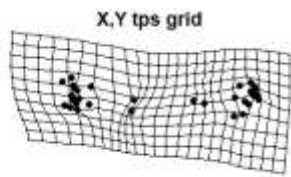
Alterações Termicamente Induzidas



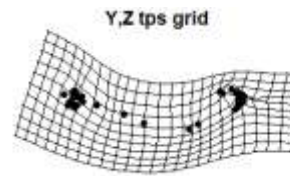
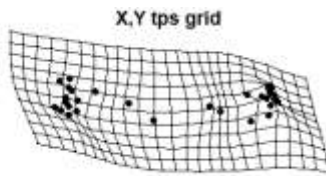
CC_NI_50L



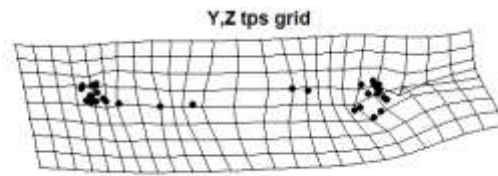
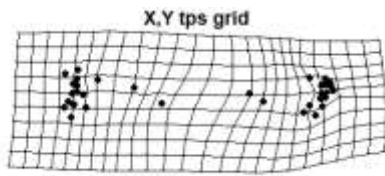
CC_NI_50R



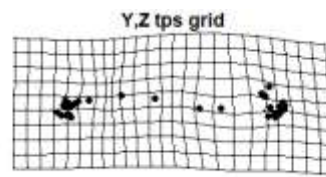
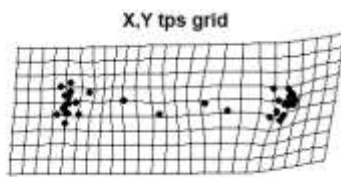
CC_NI_55L



CC_NI_55R

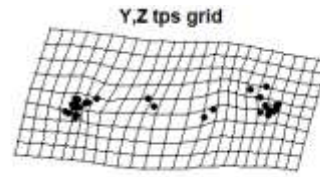
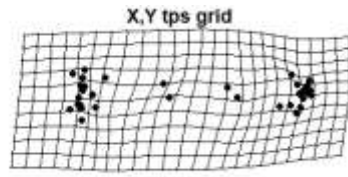


CC_NI_68L

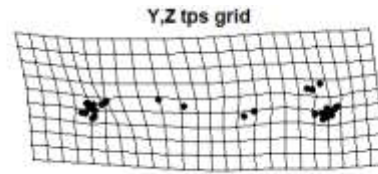
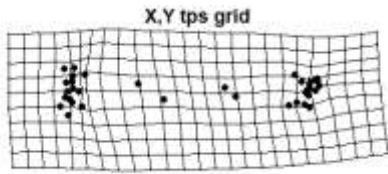


CC_NI_68R

Alterações Termicamente Induzidas



CEI/XXI_8



CEI/XXI_179