

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Luísa Correia Brandão

**DISCRIMINAÇÃO ENTRE OSSOS HUMANOS
QUEIMADOS RECENTES E ARQUEOLÓGICOS POR
ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO APÓS
TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense
orientada pelo Professor Doutor Luís Alberto Batista de Carvalho, pela
Professora Doutora Maria Paula Marques e pelo Doutor David
Gonçalves e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2021

Faculdade de Ciências e Tecnologia
Da Universidade de Coimbra

Discriminação entre Ossos Humanos
Queimados Recentes e Arqueológicos por
Espectroscopia de Infravermelho após
Tratamento com Ácido Acético

Ana Luísa Correia Brandão

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense orientada pelo Professor
Doutor Luís Alberto Batista de Carvalho, pela Professora Doutora Maria Paula
Marques e pelo Doutor David Gonçalves e apresentada ao Departamento de Química
da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

Carl Sagan

Agradecimentos

Após terminar este projeto quero agradecer a todas as pessoas que tornaram a sua realização possível.

Aos meus orientadores - Professor Doutor Luís Batista de Carvalho, Professora Doutor Maria Paula Marques e Doutor David Gonçalves - pela disponibilidade para tirar dúvidas e resolver problemas que surgiram durante a elaboração deste projeto, pela confiança depositada em mim para desenvolver este trabalho de forma autónoma.

A todos os colaboradores da Unidade de Química-Física Molecular da Universidade de Coimbra pela forma como me acolheram e me apoiaram durante a realização desta tese.

Ao meu amigo, Tiago Simões, colaborador da empresa Talho Vasco Cidral por ter fornecido os ossos de porco e à Joana Rosa, aluna de doutoramento em Antropologia, pela ajuda nas queimas destes ossos.

Agradeço ao Laboratório de Antropologia Forense por permitir o acesso a esqueletos da coleção de Esqueletos identificados do Século XXI, ao Doutor Giampaolo Piga por disponibilizar amostras de um crematório moderno e da Necrópole “El Inchidero”, e ao Departamento de Ciências da Vida da FCTUC por disponibilizar as amostras do cemitério civil do Hospital de Santo António.

À minha família e amigos. Em particular, aos meus pais por todo o apoio e ajuda nas conquistas pessoais e académicas, sem eles nada disto era possível; minha avó por todas as refeições preparadas sempre ao meu gosto; à minha irmã, cunhado e padrinhos por todo o carinho e apoio demonstrado ao longo desta caminhada.

Resumo

Em algumas situações com relevância forense surgem restos humanos de tal forma alterados, que tornam o processo de identificação muito difícil, principalmente quando estão queimados.

Estes também podem surgir num contexto arqueológico. No entanto, as Ciências Forenses apenas trabalham materiais com potencial interesse forense, ou seja, os ossos arqueológicos não são seu objeto de estudo. Assim, é importante distinguir ossos arqueológicos de ossos não arqueológicos, com potencial interesse forense.

Neste sentido, Snoeck *et al.*¹ sugeriram que o tratamento com ácido acético poderia ter potencial para discriminar ossos arqueológicos de ossos não arqueológicos. Para averiguar se esta premissa apresentava realmente algum potencial discriminatório, analisaram-se, por FTIR-ATR, amostras humanas modernas (CEI/XXI), arqueológicas (ArqR e Arq) e amostras de crematório recente (Cr) antes e após o tratamento, com o intuito de encontrar características únicas de cada grupo capazes de os discriminar. Nas amostras CEI/XXI e ArqR a queima foi realizada em ossos secos e nas amostras Arq e Cr foram realizadas na presença de tecidos moles, roupas, entre outros.

As diferenças detetadas após o tratamento não foram suficientes para distinguir amostras arqueológicas de amostras modernas. Apenas as amostras do crematório apresentaram diferenças significativas em relação a todas as outras coleções. No entanto, com este trabalho, constatou-se que este tratamento é um excelente método para remover contaminantes exógenos (carbonatos) de todos os conjuntos de amostras, mesmo naquelas em que a concentração destes contaminantes era muito elevada.

Palavras-chave: FTIR-ATR; ossos queimados recentes; ossos queimados arqueológicos; crematório; ácido acético

Abstract

In some situations, with forensic relevance, human remains appear in such a way that renders the identification process is very difficult, especially when they are burned. Overmore, burned remains can also occur in archaeological contexts. Nevertheless, Forensic Science only works with materials with potential forensic interest, *i.e.*, archaeological bones are not its object of study. Thus, it is important to distinguish archaeological from non-archaeological bones of potential forensic interest.

Snoeck *et al.* suggested that treatment with acetic acid could be able to discriminate archaeological from non-archaeological bones. In order to determine whether this methodology really had discriminatory potential, modern (CEI/XXI), archaeological (ArqR and Arq), and recent crematorium (Cr) human samples were analysed by FTIR-ATR before and after acid treatment, aiming to find unique characteristics for each group capable of distinguishing between the different sample sets. For the CEI/XXI and ArqR samples burning was performed on dry bones, while for the Arq and Cr specimens it was carried out in the presence of soft tissues and clothes. The differences detected after treatment were not enough to discriminate archaeological from modern samples. Only the bones from the crematorium showed significant differences when compared to the other collections. However, this study, allowed to assess that the treatment of burned human bones with acetic acid is an excellent method to remove exogenous contaminants (mainly carbonates) from all types of samples, even those where the concentration of these contaminants was very high.

Keywords: FTIR-ATR; recent burnt bones; archaeological burnt bones; crematorium; acetic acid

Índice

Agradecimentos	I
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice	VII
Índice de Tabelas	IX
Índice de Figuras.....	XIII
Abreviaturas	XV
1. Introdução.....	1
1.1.O Tecido Ósseo	2
1.1.1. Cristalinidade e Processo de Queima	4
1.1.2. Determinação do Intervalo <i>post-mortem</i>	6
1.1.3. Datação por Radiocarbono	7
1.2.Tratamento com Ácido Acético.....	8
1.3.Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier	12
1.3.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier em Modo de Transmissão	18
1.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier em modo reflexão Total Atenuada	19
2. Procedimento Experimental	21
2.1.Tipo de Amostras	21

2.2. Recolha e Preparação das Amostras	23
2.3. Tratamento com Ácido Acético.....	23
2.4. Obtenção dos Espectros de FTIR-ATR.....	24
3. Resultados.....	26
3.1. Análise Antes do Tratamento	26
3.1.1. Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI (CEI/XXI)	26
3.1.2. Cemitério do Hospital de Santo António do Porto (ArqR)	29
3.1.3. Necrópole da Idade do Ferro “El Inchidero” (Soria, Espanha)	29
3.1.4. Crematório de Trieste (Itália).....	30
3.2. Otimização das Condições do Tratamento com Ácido Acético.....	32
3.3. Análise Após Tratamento com Ácido Acético	39
3.3.2. Amostras do Cemitério Civil do Hospital de Santo António do Porto ..	41
3.3.3. Necrópole da Idade do Ferro “El Inchidero”	42
3.3.4. Crematório de Trieste	42
3.4. Estudo Estatístico	43
4. Discussão	47
5. Conclusão	56
6. Referências.....	57
7. Anexos.....	65

Índice de Tabelas

TABELA 1 NÚMEROS DE ONDA DE FTIR E RAMAN RELATIVOS ÀS AMOSTRAS DE OSSOS HUMANOS ANALISADAS NESTE ESTUDO, ADAPTADO DE MAMEDE ET AL. ³	15
TABELA 2. ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS DE INFRAVERMELHO E DE RAMAN UTILIZADOS NA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE OSO E INFORMAÇÃO POR ELES FORNECIDA . ^{2,12,15}	17
TABELA 3. AMOSTRAS DE RESTOS HUMANOS ESQUELETIZADOS ANALISADAS NO PRESENTE TRABALHO	22
TABELA 4. RESUMO DA ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS CI, C/P, API, BPI, C/C E OH/P PARA A COLEÇÃO DE ESQUELETOS IDENTIFICADOS DO SÉCULO XXI (CEI/XXI), PARA AS AMOSTRAS DO CEMITÉRIO CIVIL DO HOSPITAL DE SANTO ANTÓNIO DO PORTO (ARQR), PARA A NECRÓPOLE DA IDADE DO FERRO “EL INCHIDERO” (CR) ANTES DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.	27
TABELA 5. ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE OSO DE PORCO, NÃO QUEIMADO E QUEIMADO A 300, 500, 700, 900 E 1000 °C ANTES DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.	33
TABELA 6. PERCENTAGEM DE PERDA DE MASSA E VALORES DOS ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS IC, C/P, API, BPI, C/C E OH/P PARA AS AMOSTRAS DE PORCO QUEIMADAS A 300, 500, 700, 900 E 1000 °C, APÓS TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO 1,0M, 0,5 E 0,1 M DURANTE 2 E 15 H.....	36
TABELA 7. VALORES MÉDIOS DE PERDA DE MASSA E DE DIFERENÇAS RELATIVAS DOS ÍNDICES IC, C/P, API, BPI, C/C E OH/P, PARA AS AMOSTRAS DE OSO DE PORCO QUEIMADOS, APÓS TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO 1 M, 0,5 E 0,1 M DURANTE 2 E 15 H.....	37
TABELA 8. ESTATÍSTICA DESCRITIVA DOS ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS CI, C/P, API, BPI, C/C E OH/P PARA AS AMOSTRAS CEI/XXI, ARQR, ARQ E CR, APÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.....	40
TABELA 9. RESULTADOS DO TESTE NÃO PARAMÉTRICO DE WILCOXON PARA OS ÍNDICES IC, C/P, API, BPI, C/C E OH/P EM CADA UMA DAS COLEÇÕES (450, 700, 800, 900, ARQR, ARQ E CR).	44
TABELA 10. RESULTADOS ESTATÍSTICOS DO TESTE DE MANN WHITNEY CALCULADO PARA CADA PAR DE COLEÇÕES COMPARADAS.	45
TABELA 11. VALORES DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS DA MASSA (DIF. MÉDIA), DESVIO PADRÃO, DIFERENÇA RELATIVA DA MASSA MÁXIMA E MÍNIMA (RESPECTIVAMENTE) E O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA TODAS AS COLEÇÕES DE AMOSTRAS.	46

TABELA I. TABELA COM ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESQUELETO 188 DA CEI/XXI QUEIMADO EXPERIMENTALMENTE A 450 °C, PRÉ E PÓS-TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.....	65
TABELA II. TABELA COM ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESQUELETO 116 DA CEI/XXI QUEIMADO EXPERIMENTALMENTE A 700 °C, ANTES E PÓS-TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.....	67
TABELA III. TABELA COM ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESQUELETO 100 QUEIMADO A 800 °C PRÉ E PÓS-TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.	69
TABELA IV. TABELA COM ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DAS AMOSTRAS DO ESQUELETO 91 QUEIMADO EXPERIMENTALMENTE A 900 °C, PRÉ E PÓS TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.....	71
TABELA V. TABELA COM ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO HOSPITAL DE SANTO ANTÓNIO NO PORTO QUEIMADAS EXPERIMENTALMENTE A 900 °C, PRÉ E PÓS TRATAMENTO.....	73
TABELA VI. TABELA COM ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO CALCULADOS PARA AS AMOSTRAS DA NECRÓPOLE “EL INCHIDERO” PRÉ E PÓS O TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.	75
TABELA VII. ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS AMOSTRAS PROVENIENTES DO CREMATÓRIO DE TRIESTE EM ITÁLIA, PRÉ-TRATAMENTO E PÓS-TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.	77
TABELA VIII. VALORES DAS DIFERENÇAS RELATIVAS DA MASSA MÉDIAS (DIF. MÉDIA), DESVIO PADRÃO, DIFERENÇA RELATIVA DA MASSA MÁXIMA E MÍNIMA (DIF. MÁXIMA E DIF. MÍNIMA, RESPETIVAMENTE) E O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO PARA TODAS AS COLEÇÕES DE AMOSTRAS.	80
TABELA IX. VALORES DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS (DIF. MÉDIA), DESVIO PADRÃO, DIFERENÇA RELATIVA MÁXIMA E MÍNIMA (DIF. MÁXIMA E DIF. MÍNIMA, RESPETIVAMENTE) E O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO IC, PARA TODAS AS COLEÇÕES DE AMOSTRAS.	80
TABELA X. VALORES DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS (DIF. MÉDIA), DESVIO PADRÃO, DIFERENÇA RELATIVA MÁXIMA E MÍNIMA (DIF. MÁXIMA E DIF. MÍNIMA, RESPETIVAMENTE) E O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO C/P, PARA TODAS AS COLEÇÕES DE AMOSTRAS.	81
TABELA XI. VALORES DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS (DIF. MÉDIA), DESVIO PADRÃO, DIFERENÇA RELATIVA MÁXIMA E MÍNIMA (DIF. MÁXIMA E DIF. MÍNIMA, RESPETIVAMENTE) E O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO API, PARA TODAS AS COLEÇÕES DE AMOSTRAS.	81

TABELA XII. VALORES DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS (DIF. MÉDIA), DESVIO PADRÃO, DIFERENÇA RELATIVA MÁXIMA E MÍNIMA (DIF. MÁXIMA E DIF. MÍNIMA, RESPETIVAMENTE) E O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO BPI, PARA TODAS AS COLEÇÕES DE AMOSTRAS82

TABELA XIII. VALORES DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS (DIF. MÉDIA), DESVIO PADRÃO, DIFERENÇA RELATIVA MÁXIMA E MÍNIMA (DIF. MÁXIMA E DIF. MÍNIMA, RESPETIVAMENTE) E O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO C/C, PARA TODAS AS COLEÇÕES DE AMOSTRAS82

TABELA XIV. VALORES DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS (DIF. MÉDIA), DESVIO PADRÃO, DIFERENÇA RELATIVA MÁXIMA E MÍNIMA (DIF. MÁXIMA E DIF. MÍNIMA, RESPETIVAMENTE) E O COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DO OH/P, PARA TODAS AS COLEÇÕES DE AMOSTRAS83

Índice de Figuras

FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ORGANIZAÇÃO MOLECULAR DO OSSO E DAS SUBSTITUIÇÕES POR CARBONATOS NA MATRIZ INORGÂNICA. (ADAPTADO DA REFERÊNCIA MAMEDE ET AL.(2018) ³).....	3
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ALTERAÇÕES DE COR INDUZIDAS PELO CALOR NO OSSO HUMANO PARA A GAMA DE TEMPERATURA DE 25 A 1000 °C. (ADAPTADO DE MAMEDE ET AL. ³).....	5
FIGURA 3. MODOS VIBRACIONAIS DE ELONGAÇÃO (SIMÉTRICA E ANTISSIMÉTRICA), DEFORMAÇÃO (NO PLANO E FORA DO PLANO) E TORSÃO.	13
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SINAIS FTIR DE UMA AMOSTRAS DE OSSO HUMANO, NA GAMA DE 500-700 cm^{-1} , E CÁLCULO DO RESPECTIVO ÍNDICE DE CRISTALINIDADE (IC).....	16
FIGURA 5 . REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA EXPERIÊNCIA DE ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADAS DE FOURIER EM REFLEXÃO TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR).....	19
FIGURA 6. EVOLUÇÃO DOS ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS IC, C/P, API, BPI, C/C E OH/P COM O INCREMENTO DA TEMPERATURA DE QUEIMA, ANTES DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO. (OS ÍNDICES OH/P E API NÃO FORAM CALCULADOS PARA AS AMOSTRAS A 450 °C UMA VEZ QUE ESTAS AMOSTRAS CONTINHAM AINDA MUITA QUANTIDADE DE MATÉRIA ORGÂNICA QUE IMPOSSIBILITAVA A OBSERVAÇÃO DOS SINAIS DE INFRAVERMELHO CORRESPONDENTES A ESTES ÍNDICES).	28
FIGURA 7. ESPETROS DE QUATRO AMOSTRAS PROVENIENTES DO CREMATÓRIO DE TRIESTE (ITÁLIA) ANTES DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.	30
FIGURA 8. ESPETROS DE FTIR-ATR DAS AMOSTRAS DE OSSOS DE PORCO NÃO QUEIMADO E QUEIMADOS A 300, 500, 700, 900 E 1000 °C ANTES DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.	32
FIGURA 9. ESPETROS DAS AMOSTRAS DE OSSO DE PORCO QUEIMADAS A 300, 500, 700, 900 E 1000 °C TRATADAS COM UMA SOLUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO 1,0 M DURANTE 2H (VERMELHO) E 15H (PRETO).	35
FIGURA 10. EVOLUÇÃO DAS PERDAS DE MASSA E DOS ÍNDICES ESPETROSCÓPICOS IC, API E BPI EM FUNÇÃO DO TEMPO DE TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO 0,1 M-(2, 3, 4, 6, 8 E 15 H) DE AMOSTRAS DE OSSO DE PORCO QUEIMADO.....	38
FIGURA 11. ESPETROS DAS AMOSTRAS QUEIMADAS A 700 °C E TRATADAS COM ÁCIDO ACÉTICO 0,1 DURANTE 4H.....	39
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS DE MASSA E INTERVALOS DE PERDAS EM FUNÇÃO DAS COLEÇÕES.....	46

FIGURA 13. EVOLUÇÃO DOS ÍNDICES IC, C/P, API, BPI, C/C E OH/P PARA AS 7 COLEÇÕES (450 °C, 700 °C, 800 °C, 900 °C, ARQR, ARQ E Cr) ANTES (SEGMENTO A PRETO) E APÓS (SEGMENTO A VERMELHO) O TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO 0,1M DURANTE 4 H.....	48
FIGURA 14. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS DO IC E INTERVALOS DE PERDAS EM FUNÇÃO DAS COLEÇÕES.....	48
FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS DE C/P E INTERVALOS DE PERDAS EM FUNÇÃO DAS COLEÇÕES.....	49
FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS DO API E BPI E C/C E INTERVALOS DE PERDAS PARA OS VÁRIOS GRUPOS DE AMOSTRAS ANALISADAS.....	51
FIGURA 17. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DIFERENÇAS RELATIVAS MÉDIAS DE OH/P E INTERVALOS DE PERDAS EM FUNÇÃO DAS COLEÇÕES. (ESTE ÍNDICE NÃO FOI CALCULADO PARA AS AMOSTRAS A 450 °C, PORQUE, A ESTA TEMPERATURA, AINDA EXISTE MATÉRIA ORGÂNICA A DESEMPENHAR FUNÇÕES DE BLINDAGEM TÉRMICA, IMPEDINDO QUE A COMPONENTE INORGÂNICA SOFRA EFEITOS DO CALOR).....	54
FIGURA I. ESPETROS DAS AMOSTRAS DA CEI/XXI A 450°C PRÉ-TRATAMENTO (A) E PÓS-TRATAMENTO (B) COM ÁCIDO ACÉTICO 0,1M DURANTE 4H.....	66
FIGURA II. ESPETROS DAS AMOSTRAS DA CEI/XXI A 700 °C PRÉ-TRATAMENTO (A) E PÓS-TRATAMENTO (B) COM ÁCIDO ACÉTICO 0,1M.....	68
FIGURA III. ESPETROS DAS AMOSTRAS DA CEI/XXI À TEMPERATURA DE 800 °C PRÉ-TRATAMENTO (A) E PÓS-TRATAMENTO (B) COM ÁCIDO ACÉTICO	70
FIGURA IV. ESPETROS DAS AMOSTRAS DA CEI/XXI À TEMPERATURA DE 900 °C PRÉ DO TRATAMENTO (A) E PÓS-TRATAMENTO (B) COM ÁCIDO ACÉTICO 0,1M	72
FIGURA V. ESPETROS DO CEMITÉRIO DE SANTO ANTÓNIO (ARQR) PRÉ-TRATAMENTO (A) E PÓS-TRATAMENTO (B) COM ÁCIDO ACÉTICO.....	74
FIGURA VI. ESPETROS DAS AMOSTRAS DA NECRÓPOLE "EL INCHIDERO" PRÉ-TRATAMENTO (A) E PÓS-TRATAMENTO (B) COM ÁCIDO ACÉTICO 0,1M.....	76
FIGURA VII. ESPETROS DAS AMOSTRAS DO CREMATÓRIO DE TRIESTE (Cr) PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO.	78
FIGURA VIII. ESPETROS DAS 24 AMOSTRAS DO CREMATÓRIO DE TRIESTE (Cr) PÓS-TRATAMENTO COM ÁCIDO ACÉTICO 0,1M DURANTE 4H.....	79

Abreviaturas

CEI-XXI: Coleção de esqueletos identificados do Século XXI

ArqR: Cemitério Civil do Hospital de Santo António (Porto, Portugal)

Arq: Necrópole “El Inchidero” da Idade do Ferro (Soria, Espanha)

Cr: Crematório Moderno (Trieste, Itália)

INS: Dispersão Inelástica de Neutrões

FTIR: Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier

FTIR-ATR: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier em modo Reflexão Total Atenuada

PMI: Intervalo *post-mortem*

IV: Espectroscopia de infravermelho

Am/P: Teor de colagénio

API: Teor de carbonatos de tipo A

BPI: Teor de carbonatos de tipo B

C/C: Total de carbonatos por carbonatos de tipo B

C/P: Teor de carbonatos relativamente aos fosfatos

OH/P: Teor de hidroxilos em relação aos fosfatos

CI: Índice de cristalinidade

C: Carbonatos

P: Fosfatos

KRS-5: Bromiodeto de tálio

CV: Coeficiente de Variação

1. Introdução

As Ciências Forenses englobam várias áreas científicas distintas que utilizam os seus conhecimentos, métodos e técnicas para resolver problemas legais. São utilizados, em conjunto ou separadamente, os conhecimentos da Química, da Toxicologia, da Genética, da Balística, da Antropologia e da Psicologia,² entre outros, de forma a averiguar as circunstâncias de determinado caso forense. Estas situações podem ser crimes, identificação de vítimas de acidentes de viação, desastres em massa, questões legais associadas a heranças e seguros de vida, entre outras.³ Em algumas destas situações estão envolvidos restos humanos de tal forma alterados que tornam o processo de identificação muito difícil. No caso em que um exame do esqueleto é necessário, os patologistas forenses são assistidos por antropólogos forenses, que reúnem competências para extrair informação de ossos e dentes. Por exemplo, esta pode ser comparada com registos antemortem de pessoas desaparecidas que poderão corresponder à vítima (raio-x, fotografias, etc.) e, assim, contribuir para a sua identificação positiva. Desta forma, os antropólogos forenses têm um papel insubstituível neste processo.⁴

A Antropologia Forense é definida como uma área que aplica metodologias da Antropologia Física e que, para fins forenses, examina restos mortais, para estabelecer perfis biológicos e, assim, contribuir para a identificação positiva a partir de restos de esqueletos,⁵ que se sabe ou suspeita serem humanos. Frequentemente, as causas de morte destas vítimas estão relacionadas com incêndios (florestais ou outros), acidentes de viação, explosões ou bombardeamentos.^{3,5-7}

Quando se encontram restos esqueléticos em cenários envolvendo fogo em que o único vestígio que permanece é o esqueleto, torna-se complicado aplicar os exames forenses convencionais para a identificação positiva, tais como, reconhecimento facial, análise de impressões digitais ou análise de ADN.^{3,8,9} A avaliação da ancestralidade, da estatura, do sexo, da idade à morte, assim como de eventuais patologias ou traumatismos que o esqueleto possa ter sofrido, ocorre por métodos bioantropológicos aplicados a ossos e dentes.³ Estes métodos bioantropológicos são de difícil, ou mesmo impossível, aplicação em restos esqueléticos queimados, uma vez que são baseados na morfologia e métrica ósseas e estas são afetadas pelo calor que causa mudanças

variadas: alterações mecânicas, deformações e fraturas “thumbnail”, diferenças de cor, variação das dimensões, e ainda perturbações microscópicas da superfície óssea.^{3,10}

O estudo de ossos queimados vai para além dos contextos forenses. Na verdade, podem também surgir em contextos arqueológicos que permitem, por exemplo, compreender melhor as práticas culinárias ou comportamentos funerários praticados pelas culturas e civilizações ao longo da história.^{1,3,4,11-13} Contudo, para as Ciências Forenses, apenas têm interesse os restos humanos que possam ser associados a alguma questão do seu domínio, excluindo-se assim os ossos arqueológicos. Portanto, é importante possuir metodologias/conhecimentos que permitam distinguir ossos arqueológicos de ossos não arqueológicos com potencial interesse forense. Atualmente, o único método que permite fazê-lo é a datação por radiocarbono. Como vamos perceber mais à frente, este método apresenta alguns problemas quando aplicado a ossos queimados. Assim, o presente estudo pretende avaliar um método com uma contribuição potencial para a resolução desta questão. Nomeadamente, são investigados os efeitos do tratamento com ácido acético em ossos recentes e arqueológicos humanos como uma possível metodologia para a distinção entre ossos arqueológicos e não arqueológicos. É utilizada espectroscopia de infravermelho para a análise das amostras antes e depois do tratamento com ácido.

1.1. O Tecido Ósseo

O osso é um material bifásico heterogêneo,¹⁴ constituído por um componente orgânico (25%), uma matriz inorgânica (65%, podendo aumentar para 70% em ossos secos) e água (9,7%).³ O constituinte orgânico é composto por lípidos e proteínas (principalmente fibras de colagénio de tipo I), sendo que 2% são constituintes celulares variados. A fase inorgânica, denominada por biapatite (Figura 1), é uma forma carbonada e não estequiométrica da hidroxiapatite (HAp).^{3,9,15-19} Após a morte, o componente orgânico presente no osso desaparece progressivamente e, como consequência, a matriz inorgânica fica exposta ao ar, sofrendo alterações químicas que podem fornecer informações sobre os eventos *post-mortem* (processo de diagénese).¹⁸

A disposição espacial e quantidade de cada componente no osso depende da dieta, metabolismo, patologias e tratamentos farmacológicos, idade à morte, intervalo *post-mortem* e tipo de solo em redor dos restos esqueléticos.^{3,9} Além disso, características como a estrutura, a forma e o tamanho dos ossos humanos podem

também influenciar alguns parâmetros ósseos, principalmente a cristalinidade. Assim, torna-se importante, em alguns estudos, utilizar vários tipos de osso, com propriedades diferentes, mas pertencendo ao mesmo esqueleto.^{9,17,20}

In vivo, iões carbonato podem substituir os fosfato (substituição de tipo B) ou os hidroxilos (substituição de tipo A, muito menos comum) – Figura 1.^{1,3,21} A presença destes grupos carbonato na rede cristalina da biopatite provoca distorções em relação à hidroxiapatite e conseqüente diminuição da cristalinidade. Isto acontece porque os carbonatos têm dimensões e geometria diferentes dos grupos hidroxilo, são maiores, e possuem carga diferente dos fosfatos.^{3,17}

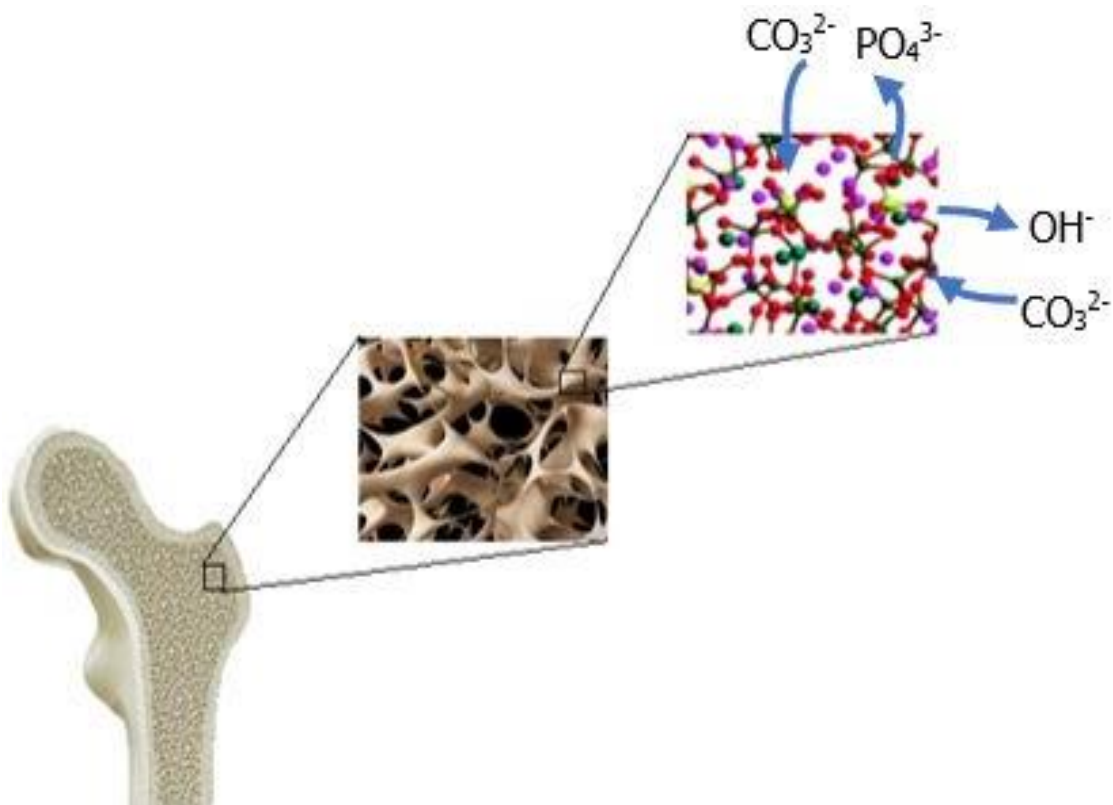


Figura 1. Esquema representativo da organização molecular do osso e das substituições por carbonatos na matriz inorgânica. (Adaptado da referência Mamede et al.(2018)³).

Assim, devido às substituições de tipo A e B, a biopatite possui uma menor cristalinidade do que a hidroxiapatite, o que provoca a formação de cristais menores, com alta deformação estrutural, elevada área superficial e uma maior solubilidade em água.³ Estas propriedades são responsáveis pela resistência e flexibilidade da matriz

óssea que contribui para a homeostase mineral do organismo humano.³ Esta menor cristalinidade da biopatite faz com que os ossos sejam mais suscetíveis às alterações *post-mortem* causadas por calor ou por fatores ambientais.^{3,17,19} Um incremento de temperatura leva a um aumento do tamanho dos cristais e a uma diminuição da tensão de rede e da porosidade, resultando numa maior organização e num maior índice de cristalinidade.³

1.1.1. Cristalinidade e Processo de Queima

A cristalinidade é um parâmetro indicativo do tamanho e da organização atômica de um cristal.^{1,3} A biopatite óssea, após a diagénese, torna-se menos reativa e a sua cristalinidade aumenta.^{1,3} A diagénese é definida como um conjunto complexo de processos que envolvem alterações químicas e físicas *post-mortem* nos ossos, e que é influenciado pela temperatura, pH, humidade, ataques microbianos e ambiente de sepultamento, incluindo o local geográfico, o tipo de solo e as condições das águas subterrâneas (que podem provocar variações mineralógicas, perda de carbonatos e captura de iões fluoreto).^{3,14,22,23} Um exemplo é a recristalização espontânea associada à decomposição do colagénio, após os cristais de biopatite estarem em contacto com o ambiente.³ Como o colagénio e a biopatite apresentam sinais de diagénese, a sua análise por espectroscopia vibracional (técnicas de infravermelho, Raman e dispersão inelástica de neutrões (inelastic neutron scattering, INS)) ferramenta de excelência para caracterizar amostras biológicas,^{5,14,24-27} permite detetar as alterações na estrutura molecular óssea.

Durante o processo de queima, ocorre perda de água e de carbonatos da rede cristalina, e o aumento da temperatura faz com que a biopatite se torne mais semelhante à hidroxiapatite, ou seja, apresente menor porosidade, cristais maiores e conseqüentemente maior índice de cristalinidade.³ Os carbonatos de tipo A e B apresentam estruturas químicas diferentes, tendo assim mecanismos de decomposição térmica distintos. Isto acontece porque ocupam locais, dentro da rede inorgânica, que não são afetados, da mesma forma, pela temperatura.⁵

As alterações provocadas no osso pelo calor, em condições aeróbicas, obedecem a 4 etapas sequenciais: (i) desidratação, entre os 100 e os 500 °C; (ii) decomposição, entre os 300 e os 800 °C (ocorrendo pirólise dos compostos orgânicos - lipídicos e proteicos); (iii) inversão, entre os 500 e os 1100 °C (envolvendo alterações

da fase inorgânica) e (IV) fusão, acima dos 700 °C (incluindo aglutinação de cristais).^{3,17} A estrutura cristalina da biopatite apenas é afetada pelo calor acima dos 500 °C , devido à blindagem térmica da matriz orgânica que protege o componente inorgânico do osso, e que só é totalmente destruída a temperaturas superiores a 500 °C.

Os ossos intactos, normalmente, apresentam uma coloração amarelo clara. Contudo, à medida que o osso é exposto a calor (em condições aeróbicas), a sua cor característica vai-se alterando, escurecendo primeiro e tornando-se depois cada vez mais esbranquiçada (Figura 2). Neste último caso, são observadas manchas de cores cinza, branca, amarela e/ou azul indicativas de processos de calcinação³, que pode reduzir as dimensões ósseas até cerca de 30%.⁸ Este facto faz com que a fiabilidade dos métodos métricos utilizados para estimar o sexo, estatura e idade à morte seja forçosamente afetada.^{8,10,18,28} Estudos realizados em restos humanos queimados em condições laboratoriais controladas^{2,4,6,11-13,15-18,26-28} têm sido fundamentais para documentar o melhor possível os efeitos do calor sobre o osso, assim como para melhor compreender como o processo de queima afeta a estimativa do perfil biológico, a avaliação de lesões, a identificação de doenças esqueléticas, a determinação de circunstâncias em torno da morte e a estimativa das condições de pré-queima dos restos esqueléticos humanos.

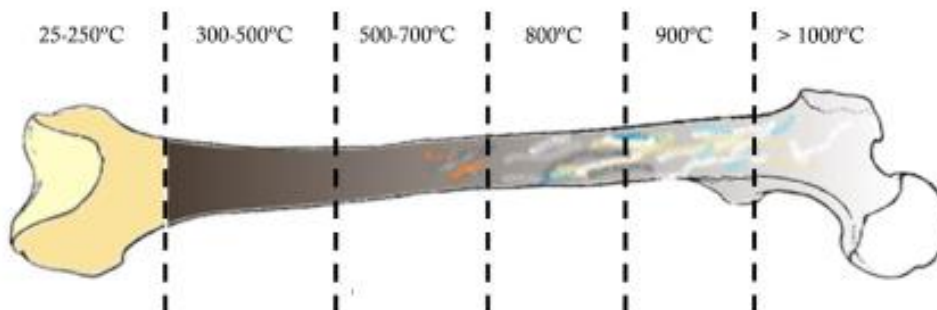


Figura 2. Representação esquemática das alterações de cor induzidas pelo calor no osso humano para a gama de temperatura de 25 a 1000 °C. (adaptado de Mamede *et al.*³)

1.1.2. Determinação do Intervalo *post-mortem*

Ao longo do tempo, muitos foram os estudos realizados em ossos queimados. Contudo, muitas são as perguntas ainda por responder. Uma dessas questões consiste no potencial para a estimativa do intervalo *post-mortem* (*post-mortem* interval, PMI). Este é definido como “o tempo que decorre desde a morte de um indivíduo, até que este é encontrado”.²⁹ (Naia,2014, p. VII).

O PMI é um parâmetro fundamental para reconstruir os acontecimentos imediatamente antes e durante o momento da morte de um indivíduo através da análise dos restos esqueléticos (queimados ou não queimados),³⁰ que permite contribuir para a identificação da vítima, avaliar a necessidade de despoletar uma investigação forense, e, no caso desta, permite a verificação de álbis e o esclarecimento de casos de negligência.³¹ Embora o PMI seja uma questão pertinente judicialmente, a sua estimativa encontra algumas dificuldades, não só por causa da ausência de métodos fiáveis para a sua determinação³⁰ como devido à grande variabilidade do processo de decomposição óssea (principalmente quando esta já está muito avançada).^{30,31}

Muitos estudos têm evidenciado a grande variabilidade associada ao processo de decomposição, onde são as características intrínsecas do osso e o contexto envolvente aos restos esqueléticos que desempenham um papel importante na determinação do que ocorreu no momento da morte e para estimar de alguma forma o PMI.³⁰ Algumas fontes decisivas na estimativa deste parâmetro em ossos frescos são frequentemente indiretas, ou seja, não se baseiam diretamente no corpo em questão. A flora envolvente, os insetos que colonizam o cadáver, os fatores circunstanciais (roupa, acessórios, testemunhos de vizinhos e familiares, etc.) e o solo onde está depositado são alguns exemplos.³¹

Desta forma, é notório que em restos esquelizados queimados a estimativa do intervalo *post-mortem* é ainda mais complicada, uma vez que, frequentemente, os contextos envolventes não contêm nenhum dos fatores decisivos, apresentados anteriormente, que ajude nesta estimativa. Assim, torna-se deveras importante o desenvolvimento de um método fiável para uma determinação rigorosa do PMI, pois as técnicas existentes apresentam vários aspetos negativos e, deste modo, não contribuem para ajudar na investigação criminal.^{29,30}

1.1.3. Datação por Radiocarbono

A datação por radiocarbono é uma das poucas formas de obter um PMI diretamente a partir do osso. Durante o decorrer de alguns estudos, verificou-se que o colagénio seria um componente ótimo para uma datação pelo método do radiocarbono,³² uma vez que contém cerca de 95 % do carbono do osso, reduzindo muito a quantidade de amostra necessária para a análise. Além disso, a biopatite é propensa a alterações diagenéticas, pois os cristais ósseos são muito pequenos o que os torna termodinamicamente instáveis e propícios a incorporação de carbonatos do meio ambiente durante a recristalização.³² Assim, os ossos queimados não podem ser datados convencionalmente uma vez que o colagénio nestes casos não é preservado e a biopatite é o único material que resta para a datação.³²

Deste modo, foi necessário desenvolver um método de datação da biopatite para ossos queimados. Lanting e Brindley³³, após assistirem a uma conferência de uma equipa de cientistas franceses, no âmbito do 3^a International Symposium ¹⁴C and Archaeology, onde apresentavam resultados da datação de amostras de esqueletos pré-históricos não queimados, perceberam que talvez fosse possível datar ossos cremados através dos carbonatos estruturais. Durante a queima alguns carbonatos estruturais desaparecem, mas Lanting postulou que era impossível que desaparecessem todos os carbonatos estruturais presentes em restos humanos queimados numa pira pré-histórica. Desta forma, em colaboração com o laboratório de Radiocarbono da Universidade de Groningen (Holanda) tentaram datar a biopatite de uma coleção de ossos cremados da pré-história através da datação dos carbonatos estruturais. Estas amostras já tinham sido datadas a partir de partículas de carvão encontradas entre os ossos cremados amostrados.^{4,33,34} A técnica desenvolvida por este laboratório é a única que atualmente permite datar ossos queimados, utilizando os iões carbonato incorporados por substituição dos fosfatos na rede iónica da biopatite.^{23,34} Este iões carbonato têm a sua origem em componentes orgânicos presentes no sangue^{34,35} e refletem a verdadeira idade de ¹⁴C do indivíduo.^{23,34}

O processo de datação por radiocarbono apresenta diversos problemas, para os quais ainda não foram encontradas soluções. Um desses problemas diz respeito a contaminações. Os ossos carbonizados e não calcinados são mais lábeis, ou seja, mais suscetíveis às trocas de carbonatos com o meio ambiente, alterando a quantidade de isótopos de carbono no osso, comprometendo o processo de datação.

Sabendo que a maioria dos ossos humanos queimados que precisam de ser datados são: i) ossos carbonizados e ossos não calcinados; e ii) ossos que não apresentam as condições necessárias para serem datados por qualquer dos tipos de análise por radiocarbono,⁴ é necessário desenvolver um procedimento que permita datar este tipo de amostras eficazmente.

No âmbito de uma investigação com um outro objetivo não relacionado com a questão da datação. Snoeck e colaboradores¹ aperceberam-se que um tratamento preliminar das amostras ósseas com ácido acético poderia ser um procedimento promissor para datação de ossos humanos queimados. Tal tratamento permitiria remover os carbonatos exógenos presentes no osso e conseqüentemente apresentar efeitos distintos em ossos queimados recentes e ossos queimados antigos. Estes últimos, devem conter mais carbonatos exógenos do que as amostras recentes, uma vez que estiveram inumados durante mais tempo, esperando-se assim que apresentem um efeito mais pronunciado face ao tratamento com ácido acético. Apesar de não permitir uma datação precisa, a confirmar-se esse padrão tal procedimento poderia ajudar a distinguir preliminarmente ossos arqueológicos dos ossos mais recentes. Isso seria relevante no âmbito de investigações forenses, visto que essa distinção poderia eventualmente, permitir a exclusão de ossos arqueológicos já sem relevância forense. Assim sendo, o presente estudo pretende avaliar o potencial do tratamento de ossos humanos com ácido acético para distinguir ossos queimados recentes de ossos arqueológicos por espectroscopia vibracional (de infravermelho).

1.2. Tratamento com Ácido Acético

A apatite óssea, por si só, não é um bom material para datação por radiocarbono porque pode ser facilmente contaminada e sofre alterações diagenéticas.^{22,23,31}

Os contaminantes (elementos exógenos), assimilados pelo osso durante a diagénese inicial, possuem três destinos possíveis: i) podem ser absorvidos pela superfície exterior dos cristais de biapatite ou pelo material orgânico restante; ii) podem precipitar em espaços porosos como componentes de espécies minerais diagenéticas e exógenas; ou iii) podem ser incorporados nos cristais de biapatite destabilizados durante a recristalização diagenética precoce.^{36,37}

Um dos elementos exógenos mais comuns, em amostras de ossos humanos, são os carbonatos. Estes podem ser gerados em diversas condições, nomeadamente:

i) em atmosferas muito ricas em CO₂: ii) em sistemas de combustão selados (anaeróbicos), por contaminação após secagem da apatite ativa (ex. numa mufla) ou em ambientes de inumação.³⁸ A presença destes carbonatos em amostras de ossos queimados fez com que, durante bastante tempo, estes fossem excluídos das datações por radiocarbono.³⁹ Os primeiros esforços para ultrapassar este problema, surgiram por Krueger e Sullivan,^{21,40} que efetuaram um tratamento do osso com ácido acético, embebendo a amostra nesse ácido diluído para tentar reconstruir as palaeodietas a partir do ¹³C da apatite. Embora não tenham resolvido completamente o problema, verificaram que a percentagem de contaminantes diagenéticos se reduzia bastante após este tratamento com ácido acético.²¹ Douglas Price e seus colaboradores,⁴¹ também estudaram amostras ósseas imersas em ácido acético durante várias horas, tendo verificado que havia menos contaminações diagenéticas após este tratamento, confirmando assim os resultados obtidos por Krueger e Sullivan.²¹

Deste modo, o tratamento com ácido acético começou a ser aplicado com o objetivo de remover contaminantes diagenéticos que podem ser incorporados pelos ossos calcinados, como por exemplo carbonatos exógenos ou apatites diagenéticas (apatites que já sofreram alterações *post-mortem*).^{1,14,17,21,23,37} O protocolo deste tratamento, aplicado também na datação por radiocarbono, tem vindo a ser alterado por vários investigadores, pois verificaram que soluções ácidas mais concentradas e tempos de tratamento mais longos podem provocar uma recristalização excessiva, perda de massa ou até alterações isotópicas.^{22,42} Estes fatores devem ser tidos em conta dependendo da quantidade e estado da amostra disponível (em fragmento ou em pó), do tamanho das partículas, da sua integridade e do tipo de amostra.⁴²

Com o desenvolvimento dos estudos em ossos queimados e o fato de que o ácido acético remove carbonatos exógenos de ossos humanos queimados, fez com que Snoeck levantasse algumas questões: (i) será que os carbonatos exógenos estão igualmente presentes nas amostras queimadas recentes e nas arqueológicas? (ii) será o efeito do tratamento com ácido acético igual para estes dois tipos de amostras?

Espera-se que os ossos arqueológicos apresentem maior quantidade de carbonatos exógenos, uma vez que permanecem durante muito tempo em ambientes propícios para gerar e trocar carbonatos entre a apatite e o meio ambiente, o que não acontece para as amostras recentes. Desta forma, presume-se que o tratamento com ácido acético tenha um efeito mais evidente nas amostras arqueológicas e um efeito muito mais limitando nas amostras modernas.^{1,17,43}

No entanto, segundo Snoeck e seus colaboradores, tal não acontece, já que as amostras recentes estudadas por estes investigadores apresentaram uma diminuição significativa no teor de carbonatos, acompanhada por um aumento de cristalinidade.¹ Trueman *et al.*,⁴³ já tinham obtido o mesmo resultado, propondo que uma possível explicação para este resultado é o fato de os ossos queimados modernos terem cristais mais pequenos e mais reativos do que os ossos queimados antigos, o que faz com que o ácido acético os remova mais facilmente.^{1,43}

Tal explicaria o aumento do respetivo índice de cristalinidade e o menor teor de carbonatos observado nas amostras modernas. Snoeck e colaboradores¹ realizaram um estudo onde verificaram que amostras modernas de osso calcinado e amostras antigas eram afetadas de forma diferente pelo ácido acético. Estas observações podem ser um indício de que o tratamento com ácido acético é bastante promissor como indicador preliminar da antiguidade dos ossos.

Os cristais ósseos têm a forma de placas com comprimentos muito variados, com uma média entre 40 e 50 nm. O incremento do seu comprimento médio (recristalização), deve-se à remoção de cristais mais pequenos ou ao crescimento espontâneo do cristal após remoção da matriz orgânica (ou a ambos os fatores).⁴³ O aumento de tamanho dos cristais ósseos faz com que estes se tornem menos reativos, por isso, não são afetados tão facilmente pelo ácido acético.⁴³ Esta situação foi observada por Trueman *et al.*⁴³ em ossos não queimados.

Se o crescimento espontâneo dos cristais ocorresse também em ossos calcinados após a queima, poder-se-iam explicar as perdas de carbonatos e o aumento de cristalinidade obtidos por Snoeck e seus colaboradores¹. Por outras palavras, o osso queimado recente apresenta cristais menores e mais reativos que, devido à ausência do componente orgânico, começam a crescer espontaneamente. Com o passar do tempo, começam a formar-se cristais maiores e menos reativos (mais estáveis) que não são afetados pelo ácido acético.^{1,43} Assim é natural que os ossos queimados recentes sofram um efeito mais significativo por tratamento com ácido acético do que as amostras de ossos queimados antigos. Isto acontece, porque os cristais dos ossos queimados arqueológicos já estão a crescer espontaneamente (recristalizar) há longos períodos de tempo, apresentando assim cristais maiores e menos reativos que não são afetados pelo ácido acético.^{1,43} Já nas amostras dos ossos queimados recentes, os cristais ainda estão a iniciar este processo de crescimento espontâneo, sendo, portanto, pequenos e reativos e assim mais facilmente afetados pelo ácido acético.^{1,43} Desta forma estariam

explicadas as diferenças encontradas por Snoeck *et al.*¹ relativamente ao que seria esperado.

Os cristais de carbonatos exógenos, além de serem os mais fáceis de remover são também os mais suscetíveis de serem contaminados durante os processos de diagénese. Contudo, a solubilidade dos contaminantes diagenéticos dos ossos varia e, durante a diagénese, pode ocorrer recristalização do mineral ósseo levando à introdução de carbonato exógeno na estrutura cristalina das amostras⁴⁴. Esta incorporação, vai originar uma apatite altamente solúvel, que pode ser dissolvida em ácido acético, e com um alto índice de carbonatos no caso de amostras arqueológicas.^{38,44,45} Desta forma, as amostras arqueológicas ao serem contaminadas com apatite recristalizada vão possuir elevada cristalinidade, baixo teor de carbonato e inserção de iões fluoreto na sua composição. Esta fluorapatite é um material menos solúvel do que a biopatite intacta, por isso não é removido pelo tratamento com ácido acético.³⁸

Neste tratamento, a temperatura e a concentração da solução utilizada vão influenciar o tipo de cristais produzidos durante a recristalização. Se esta ocorrer durante a preparação da amostra, pode verificar-se a incorporação de minerais exógenos nos ossos, deixando de ter sentido o tratamento com ácido acético.³⁸ Nielsen-Marsh e Hedges⁴⁶ sugeriram que tempos de tratamento mais curtos e soluções mais diluídas de ácido acético poderiam reduzir o risco de recristalização da amostra óssea.⁴⁶ Apesar de este ser um tema relevante e frequentemente investigado, não foi ainda possível chegar a conclusões definitivas uma vez que os resultados obtidos são bastante contraditórios.^{22,38,44,47-50}

Este trabalho pretende estudar o efeito do tratamento de ossos humanos queimados, recentes e arqueológicos, com ácido acético, utilizando como método de análise a espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier em modo de reflexão total atenuada (ATR).^{14,16} Numa primeira etapa, será otimizado o processo de tratamento com ácido acético (concentrações e duração do tratamento), sendo posteriormente levada a cabo uma análise completa das amostras por FTIR-ATR

1.3. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier

A espectroscopia é um conjunto de técnicas de análise que retira informações físicas e químicas de uma amostra com base na interação de uma radiação (eletromagnética ou de partículas) com a matéria (amostra analisada).⁵¹

Em espectroscopia vibracional a análise dos modos vibracionais – intensidade e energia fornece informações fundamentais sobre a composição química e estrutura/conformação da amostra.⁵² A espectroscopia de infravermelho (IV) consiste, assim, na interação entre a radiação de excitação (luz na região do infravermelho) e a amostra, ocorrendo absorção de energia.^{3,53} A energia absorvida vai desencadear uma transição entre níveis vibracionais separados por uma diferença energética equivalente. A análise das bandas observadas no espectro de IV – frequência e intensidade - vai fornecer informação preciosa (e única para cada amostra), que permite a sua identificação química e estrutural.^{3,53,54} Sendo a intensidade do sinal proporcional à concentração da espécie absorvente.²¹

Numa molécula os átomos não se encontram imóveis⁵¹, mas oscilam em torno das suas posições de equilíbrio, provocando a alteração dos comprimentos de ligação (modos vibracionais de alongação, simétricas ou antissimétrica), dos ângulos de ligação (modos vibracionais de deformação, no plano ou fora do plano), e dos ângulos diedros (modos vibracionais de torção) (Figura 3).⁵³ Estas vibrações moleculares são assim detetadas por interação com a radiação de infravermelho que incide na amostra. Para que um modo vibracional seja ativo em infravermelho ele deve corresponder a uma variação de momento dipolar não nula.^{53,55,56}

Elongações



Simétrica

Antissimétrica

Deformações

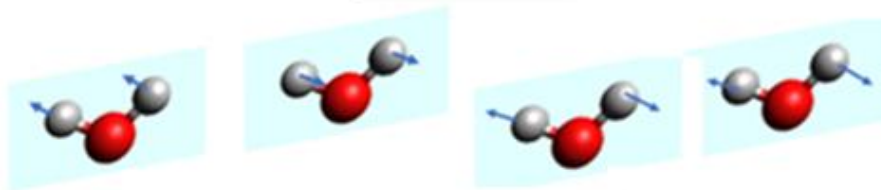
No Plano



Rocking

Scissoring

Fora do Plano



Wagging

Twisting

Torsões

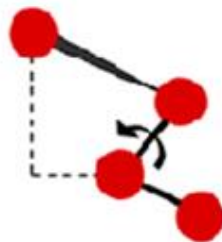


Figura 3. Modos vibracionais de alongação (simétrica e antissimétrica), deformação (no plano e fora do plano) e torsão.

Um espectro vibracional é então constituído por bandas espectrais específicas da amostra analisada, que correspondem a transições vibracionais entre estados de energia vibracional quantificados, envolvendo deslocamentos quase harmónicos.^{56,57} A região infravermelho divide-se em infravermelho longínquo ($<200\text{ cm}^{-1}$), IV médio ($200\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) e IV próximo ($4000\text{-}13000\text{ cm}^{-1}$), sendo o infravermelho médio o mais utilizado em análise molecular porque contém a maioria dos modos vibracionais fundamentais de uma molécula.^{3,53,57}

Ao efetuar uma análise por espectroscopia de infravermelho é importante ter em atenção fatores que podem afetar as transições entre estados vibracionais, tais como: estado físico da amostra, temperatura (principalmente para amostras líquidas ou soluções aquosas), tipo de solventes (para soluções), presença de humidade, espessura, propriedades óticas da amostra, e existência de espécies polimórficas (espécies que podem existir em mais do que uma organização cristalina).⁵⁴

Esta técnica é assim altamente específica e suficientemente sensível para analisar amostras ósseas, com vista à determinação do respetivo teor em carbonatos e/ou grupos hidroxilo e de alterações nos parâmetros de rede devidas a substituições diagenéticas.^{1,3,5,24} As alterações na estrutura molecular da biopatite óssea são facilmente detetadas por FTIR porque as variações de composição química resultam em alterações nos respetivos modos vibracionais, que se refletem nos respetivos espectros de FTIR.¹⁴

Tabela 1 Números de onda de FTIR e Raman relativos às amostras de ossos humanos analisadas neste estudo, adaptado de Mamede et al.³.

FTIR	Atribuição	Raman	Referências
3642	Portlandite		2,3,5,58-60
3573	v(OH ⁻) (HAp)	3572	2,3,5,58-60
3300	v(OH ⁻) (água)		2,3,5,58,60
2960-2850	v(CH) (lípidos)	2978,2940,2882	2,3,5,58,60
2010	v _{as} (C≡N) (Cianamida)		2,3,61
1660-1665	Amida I (colagénio)	1616-1720	2,3,5,7,58,60,62
1650	δ (HOH) (água deformação)		2,3,5,58,60
1540-1580	Amida II (colagénio)		2,3,7,58,60
1540	v ₃ (CO ₃ ²⁻) _A		2,3,58,61,63,64
1494	v(Phe)	1003	2,62
1440-1450	δ(CH ₂) (lípidos +colagénio); v ₃ (CO ₃ ²⁻) _B	1440-1460	2,3,58,60,65
1450	v ₃ (CO ₃ ²⁻) _{A+B}		2,3,5,58,61
1415-1425	v ₃ (CO ₃ ²⁻) _B		2,3,5,58
1242 w	Amida III (colagénio)	1215-1320	2,3,58,60
1090	v ₃ (PO ₄ ³⁻) (presença de fluorapatite)	1028-1054	2,3,5,58
	v ₁ (CO ₃ ²⁻) _B	1070	2,5
1035	v ₃ (PO ₄ ³⁻)	1046	2,3,18,58
	v ₁ (CO ₃ ²⁻) _A	1100	2
1005	v ₁ (HPO ₄ ²⁻)	1005	2,3
982	v ₁ (HPO ₄ ²⁻)		18
960	v ₁ (PO ₄ ³⁻)	960	2,3,5,7,58,65
911	v(C-N) (colagénio)	921,855	2
878	v ₂ (CO ₃ ²⁻) _A		2,3,58,66
872	v ₂ (CO ₃ ²⁻) _B		2,3,58,66
710	CO(CaCO ₃)		2,3,58
700 w	v ₄ (CO ₃ ²⁻)		2,3,5,58
700	δ(NCN ²⁻) (Cianamida)		2,3,61
630	OH _{Libração} (HAp)		2,3,5,58,60
565,603	v ₄ (PO ₄ ³⁻)	578-617	2,3,5,7,58,65
547 sh	β-TCP		2,3,18
470	v ₂ (PO ₄ ³⁻) / v ₂ (HPO ₄ ²⁻)	429-446	2,3,5,7,58,65
343,355 sh	v ₃ (Ca-OH)	329	2,3
337	OH _{translação} (HAp)	335	2,3,5
196, 228	v ₂ (Ca-OH) _{rede}	329	2,3,5
170, 210, 265	v(Ca-PO ₄) _{rede}	150,200,280	5
0-300	(Ca-PO ₄) _{rede}	0-320	2,3
85	v(Ca-PO ₄) _{rede}	138	5

δ –deformação (no plano); v – Elongação HAp – hidroxiapatite; (CO₃²⁻)_A – Carbonatos de tip A; (CO₃²⁻)_B – Carbonatos de tipo-B; β-TCP – β-fosfato tricálcico; sh- ombro; w- banda de baixa intensidade

Como foi dito anteriormente, os componentes ósseos são facilmente detetados pelas técnicas espectroscópicas vibracionais, uma vez que apresentam bandas específicas em FTIR e Raman (Tabela 2). Assim, as alterações provocadas no osso pelo processo de queima refletem-se no respetivo perfil vibracional e podem ser quantificadas através de razões entre intensidades de bandas específicas. Um dos índices espectroscópicos mais importantes é o índice de cristalinidade (IC), que reflete o tamanho relativo dos cristais na matriz óssea e o grau de ordenação da rede cristalina.³

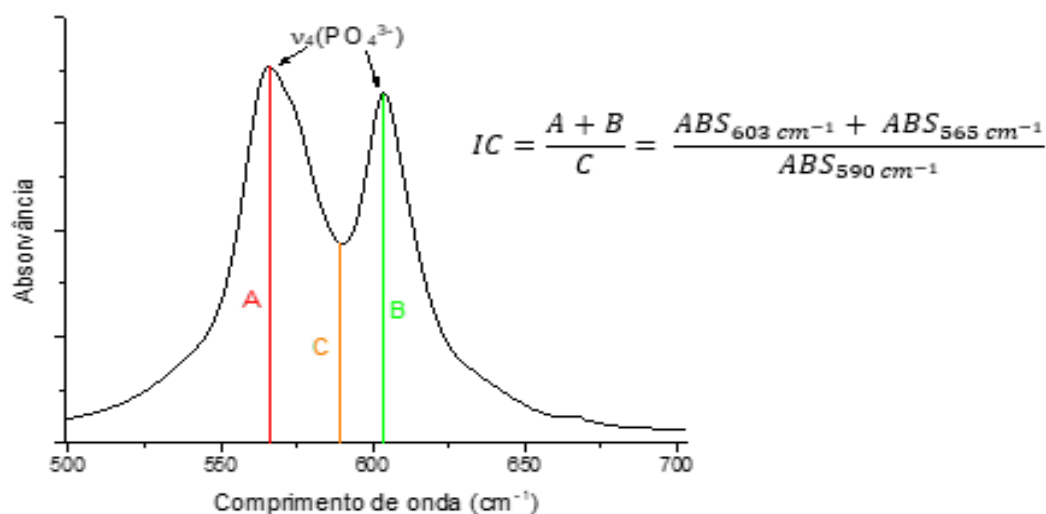


Figura 4. Representação esquemática dos sinais FTIR de uma amostra de osso humano, na gama de 500-700 cm^{-1} , e cálculo do respetivo índice de cristalinidade (IC).

O IC é calculado através das bandas atribuídas à elongação do grupo fosfato ($\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$), que é um modo vibracional triplamente degenerado com máximos a 603 e 565 cm^{-1} , ocorrendo um mínimo a 590 cm^{-1} , como mostra a Figura 4. O IC pode ter valores muito elevados quando os cristais são grandes e/ou possuem uma rede cristalina muito organizada. Além do índice de cristalinidade, existem outras razões entre sinais de FTIR que podem ser calculadas de modo a caracterizar quantitativamente as amostras ósseas, que fornecem informação acerca do conteúdo em: colagénio (Am/P), carbonatos de tipo A (API) ou B (BPI), quantidade total de carbonatos em função dos carbonatos de tipo B (C/C), e teor de carbonatos relativamente aos fosfatos (C/P) (Tabela 2).^{3,9}

Tabela 2. Índices espectroscópicos de infravermelho e de Raman utilizados na análise de amostras de osso e informação por eles fornecida ^{2,12,15}

Método	Índice	Cálculo	Referência	
FTIR	IC	$\frac{Abs(603\text{ cm}^{-1}) + Abs(565\text{ cm}^{-1})}{Abs(590\text{ cm}^{-1})}$	2,17,67-69	
	BPI	$\frac{Abs(1415\text{ cm}^{-1})}{Abs(603\text{ cm}^{-1})}$	1,2,17,48,61,68	
	API	$\frac{Abs(1540\text{ cm}^{-1})}{Abs(603\text{ cm}^{-1})}$	2,48,61,68	
	C/C	$\frac{Abs(1450\text{ cm}^{-1})}{Abs(1415\text{ cm}^{-1})}$	1,2,17,61,68,70	
	C/P	$\frac{Abs(1415\text{ cm}^{-1})}{Abs(1035\text{ cm}^{-1})}$	21,64,67,68,70-72	
	OH/P	Teor de OH/ fosfatos	$\frac{Abs(630\text{ cm}^{-1})}{Abs(603\text{ cm}^{-1})}$	1,2,17,61,73
			$\frac{Abs(3572\text{ cm}^{-1})}{Abs(603\text{ cm}^{-1})}$	2
			$\frac{Abs(340\text{ cm}^{-1})}{Abs(603\text{ cm}^{-1})}$	2
	CN/P	Teor de Cianamida	$\frac{Abs(2010\text{ cm}^{-1})}{Abs(1035\text{ cm}^{-1})}$	3,74
	Am/P	Proteína/fosfato	$\frac{Abs(1650\text{ cm}^{-1})}{Abs(1035\text{ cm}^{-1})}$	3,64
	CO/CO ₃	Proteína/carbonato	$\frac{Abs(1650\text{ cm}^{-1})}{Abs(1415\text{ cm}^{-1})}$	3
	CO ₃ /P	Carbonato/fosfato	$\frac{Abs(900\text{ cm}^{-1})}{Abs(1035\text{ cm}^{-1})}$	3
	Raman	Teor de Fosfatos	$A(\nu_2(PO_4^{3-})/A(\text{Amida III}))$	2,75
$A(\nu_1(PO_4^{3-})/A(\text{Amida I}))$			3,76	
Maturação mineral /cristalinidade		$1/LMA(\nu_1(PO_4^{3-}))$	2,75	
C/P		$A(\nu_1(CO_3^{2-})/A(\nu_1(PO_4^{3-})))$	2,77	
		$A(\nu_1(CO_3^{2-})/A(\nu_2(PO_4^{3-})))$	2,78	
OH/P		$A(\nu(OH^-))/A(\nu_2(PO_2^{3-}))$	2	
Preservação do colagénio		$I(\nu_1(PO_4^{3-}))/I(\nu(CO)_{\text{Amida I}})$	1,3	

ABS – Absorvância, A -área integrada, I -intensidade, LMA – Largura

1.3.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier em Modo de Transmissão

A espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier em modo de transmissão é uma técnica simples e largamente utilizada para a caracterização de materiais que permitam a passagem de luz (sólidos, líquidos ou gasosos).^{79,80}

Este método é baseado na absorção de radiação infravermelha, a valores de energia específicos, após a sua passagem pela amostra.^{53,79} Trata-se de uma técnica analítica muito sensível, sendo necessários muitos cuidados em relação à homogeneidade, concentração e tamanho das partículas durante a preparação da amostra.⁷⁹

Para amostras sólidas, o processo de homogeneização é feito com um solvente sólido transparente na região de interesse – geralmente o brometo de potássio (KBr) porque é completamente transparente na região do 400 a 4000 cm^{-1} .¹⁴ Este processo consiste na mistura e moagem de aproximadamente 75 mg de material, numa proporção de 0,5 mg amostra/75 mg de KBr (recomendado 0,2 a 1% de amostra), e aplicação de pressão para formar uma pastilha homogênea com cerca de 0,5 mm de espessura e 7,0 mm de diâmetro.^{80,81} Assim, a amostra não pode ser recuperada, embora a quantidade utilizada seja muito pequena.³ Porém uma grande desvantagem deste processo é que o KBr é altamente higroscópico. As moléculas de água, com o tempo, vão acumular-se na superfície do KBr, o que afeta os espectros obtidos uma vez que os sinais de infravermelho da água podem mascarar as bandas características da amostra.^{82,83} A presença de água na superfície do KBr pode ainda provocar a degradação de amostras sensíveis à humidade. Em casos mais raros, o KBr pode ainda interacionar com a amostra em análise, alterando as características físico-químicas da mesma.⁸³

De fato, Surovell e Stiner⁸⁴ verificaram que os métodos de moagem utilizados para a preparação de pastilhas de KBr com amostras de osso influenciam significativamente o grau de cristalinidade do osso e logo o perfil espectral obtido. As diferenças encontradas poder-se-ão dever à pressão exercida durante a moagem, suscetível de alterar a estrutura cristalina do osso. Desta forma, a técnica de infravermelho em modo transmissão com pastilhas de KBr não aparenta ser a mais adequada para a análise de amostras ósseas. Assim, embora todas as técnicas de infravermelho forneçam as mesmas informações sobre a amostra, podem ocorrer diferenças na resolução dos espectros conforme relatado por Beasley e colaboradores¹⁴,

que concluíram que os índices espectroscópicos calculados por FTIR-transmissão (KBr) e FTIR-ATR não são comparáveis (IC = 3,20 e 3,07, respetivamente).

1.3.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier em modo reflexão Total Atenuada

A interação entre a radiação de infravermelho e a amostra pode ocorrer em modo de transmissão ou de reflexão total atenuada (ATR). Na espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR), o feixe de radiação entra no cristal e sofre uma reflexão interna total.^{3,79,80} Esta reflexão interna dá origem a uma onda “evanescente” que ultrapassa a superfície refletora, ou seja, alcança a amostra que está em contacto com a superfície externa do cristal, Figura 5.⁵⁵ A profundidade de penetração da onda evanescente na amostra depende do ângulo de incidência e do índice de refração do cristal de ATR, e aumenta com a diminuição do número de onda (cm^{-1}).

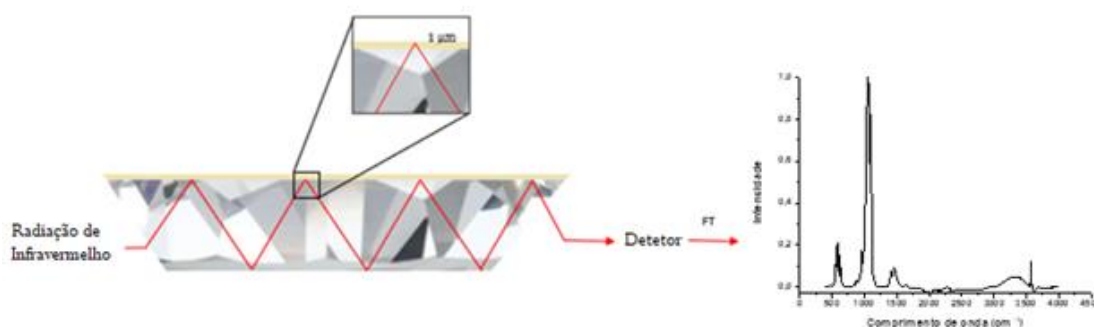


Figura 5 . Representação esquemática de uma experiência de espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier em reflexão total atenuada (FTIR-ATR).

Atendendo à dependência da profundidade de penetração da onda evanescente face ao número de onda, os espectros obtidos por FTIR-ATR apresentam intensidades relativas diferentes dos espectros adquiridos noutras configurações pelo que é necessária uma correção dos dados de modo a ajustar as intensidades relativas do

espectro e tornar possível a sua comparação com os espectros de FTIR obtidos, por exemplo, em modo de transmissão.⁸³

Os cristais usados como suporte de ATR possuem ondas evanescentes, gamas espectrais distintas e composições variadas - germânio (Ge), seleneto de zinco (ZnSe), diamante, bromiodeto de tálio (KRS-5) - e possuem uma baixa solubilidade em água e índices de refração muito altos.^{79,80} Contudo, é o tamanho do cristal que vai determinar o número de interações entre o feixe de luz e a amostra. Esta técnica permite analisar, de forma muito simples, amostras líquidas e sólidas, uma vez que existem diferentes configurações de células de ATR, incluindo células de fluxo que possibilitam uma passagem contínua de solução e a sua monitorização espectral ao longo do tempo.^{53,85}

O FTIR-ATR é assim extremamente adequado para análises rápidas e não destrutivas de amostras em forma de pó,⁵³ uma vez que não necessita de nenhum solvente ou meio de suporte nem de qualquer outro tipo de preparação da amostra, e requer quantidades muito pequenas de analito (<1 mg). Desta forma, é uma técnica rigorosa e extremamente apropriada para estudos de amostras ósseas, pois permite fazer medidas semi-quantitativas¹⁴ e fornece informação sobre as características químicas e estruturais do osso - componentes orgânicos (proteínas e lípidos), matriz inorgânica e possíveis contaminantes minerais (ex. fluorapatite, cloroapatite, gesso), tal como acerca de alterações induzidas por patologias ou pelo calor.^{7,16,86}

Qualquer alteração na constituição química ou estrutural do osso reflete-se no respetivo espectro de infravermelho, devido à elevada sensibilidade da técnica tanto para os constituintes inorgânicos como para os componentes orgânicos o que justifica a escolha da espectroscopia vibracional de infravermelho como técnica ideal para a análise de amostras ósseas.¹⁶

2. Procedimento Experimental

2.1. Tipo de Amostras

Neste estudo foram analisados 4 conjuntos de amostras de esqueletos humanos, dois compostos por ossos modernos e dois contendo restos de esqueletos arqueológicos (Tabela 3): (i) CEI/XXI (40 amostras) – ossos modernos (fémur, rádio, tibia, ulna e úmero), recolhidos de 4 esqueletos humanos do cemitério dos Capuchos (Santarém, Portugal), pertencentes à Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI (CEI/XXI), alojada no Laboratório de Antropologia Forense na Universidade de Coimbra (Portugal).⁸⁷ A autorização para utilização desta coleção para investigação foi concedida pelo Comité de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (número de referência: CE_026.2016). Os indivíduos desta coleção, de sexo e idade à morte conhecidos (F-53,64 %, M-46,36 %, idade à morte entre 1982 e 2012),⁸⁸ foram sujeitos a inumação em média durante dez anos (sendo 3 anos o período mínimo de tempo de inumação, antes da exumação, de acordo com a legislação Portuguesa/Decreto-Lei 411/98). (ii) Cr (24 amostras) – ossos modernos cremados a temperatura entre 850 e 1150 °C (amostras ósseas em pó resultantes da cremação de cadáveres, obtidos de um crematório em Trieste (Itália). (iii) ArqR (15 amostras) – ossos arqueológicos recentes do cemitério do Hospital de Santo António (Porto, Portugal), pertencentes a esqueletos do século XVII ao início do século XXI, sujeitos apenas a inumação (durante um período superior a 80 anos) e não a cremação. (iv) Arq (18 amostras) – ossos arqueológicos da Necrópole da Idade do Ferro “El Inchidero” (Aguilar de Montuenga, Espanha), do 1º milénio a.C., referentes a queimas sobre cadáveres com tecidos moles provavelmente realizadas em piras de madeira.

Tabela 3. Amostras de restos humanos esqueletizados analisadas no presente trabalho.

CEI/XXI	Código	CEI/XXI	Código
CEI/XXI - Esqueleto 188 – Fémur Distal	CEI/XXI – Fd1	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Fémur Proximal	CEI/XXI-Fp3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Fémur Proximal	CEI/XXI-Fp1	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Fíbula Distal	CEI/XXI-FIBd3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Rádio Distal	CEI/XXI-Rd1	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Fíbula Proximal	CEI/XXI-FIBp3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Rádio Proximal	CEI/XXI-Rp1	CEI/XXI I – Esqueleto 100 – Rádio Distal	CEI/XXI-Rd3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Tíbia Distal	CEI/XXI-TIBd1	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Rádio Proximal	CEI/XXI-Rp3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Tíbia Proximal	CEI/XXI-TIBp1	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Tíbia Distal	CEI/XXI-TIBd3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Ulna Distal	CEI/XXI-ULd1	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Tíbia Proximal	CEI/XXI-TIBp3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Ulna Proximal	CEI/XXI-ULp1	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Ulna Distal	CEI/XXI-ULd3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Úmero Distal	CEI/XXI-Ud1	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Ulna Proximal	CEI/XXI-ULp3
CEI/XXI – Esqueleto 188 – Úmero Proximal	CEI/XXI-Up1	CEI/XXI - Esqueleto 100 – Úmero Distal	CEI/XXI-Ud3
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Fémur Distal	CEI/XXI-Fd2	CEI/XXI – Esqueleto 100 – Úmero Proximal	CEI/XXI-Up3
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Fémur Proximal	CEI/XXI-Fp2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Fémur Distal	CEI/XXI-Fd4
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Rádio Distal	CEI/XXI-Rd2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Fémur Proximal	CEI/XXI-Fp4
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Rádio Proximal	CEI/XXI-Rp2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Rádio Distal	CEI/XXI-Rd4
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Tíbia Distal	CEI/XXI-TIBd2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Rádio Proximal	CEI/XXI-Rp4
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Tíbia Proximal	CEI/XXI-TIBp2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Tíbia Distal	CEI/XXI-TIBd4
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Ulna Distal	CEI/XXI-ULd2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Tíbia Proximal	CEI/XXI-TIBp4
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Ulna Proximal	CEI/XXI-ULp2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Ulna Distal	CEI/XXI-ULd4
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Úmero Distal	CEI/XXI-Ud2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Ulna Proximal	CEI/XXI-ULp4
CEI/XXI – Esqueleto 116 – Úmero Proximal	CEI/XXI-Up2	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Úmero Distal	CEI/XXI-Ud4
CEI/XXI – Esqueleto 100 – Fémur Distal	CEI/XXI-Fd3	CEI/XXI – Esqueleto 91 – Úmero Proximal	CEI/XXI-Up4
Arq	Código	Arq	Código
Diáfise de osso não identificado	Arq1-d	Diáfise de osso não identificado	Arq10-d
Crânio	Arq2-c	Diáfise de osso não identificado	Arq11-d
Diáfise de osso não identificado	Arq3-d	Diáfise de osso não identificado	Arq12-d
Diáfise a de osso não identificado	Arq4-d	Diáfise de osso não identificado	Arq13-d
Fémur	Arq5-f	Fémur	Arq14-f
Crânio	Arq6-c	Diáfise de osso não identificado	Arq15-d
Diáfise de osso não identificado	Arq7-d	Diáfise de osso não identificado	Arq16-d
Crânio	Arq8-c	Diáfise de osso não identificado	Arq17-d
Crânio	Arq9-c	Diáfise de osso não identificado	Arq18-d
Cr	Código		
Ossos Modernos do crematório de Trieste (Itália)		Cr – n ^{os} 1 a 24 ^a	
ArqR	Código		
Ossos Arqueológicos Recentes não identificados		ArqR- n ^{os} 1 a 15 ^b	

CEI/XXI - amostras da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI; Arq – amostras da Necrópole da Idade do Ferro; ArqR - amostras do cemitério civil do Hospital de Santo António do Porto; Cr – amostras de um crematório de Trieste (Itália)

^a Amostras de ossos em pó, resultado da cremação de cadáveres (cremados ainda com tecidos moles)

^b Amostras de ossos longos não identificados, do século XVII a XX, sepultados no cemitério civil do hospital de Santo António do Porto (Portugal)

2.2. Recolha e Preparação das Amostras

As amostras do conjunto CEI/XXI foram submetidas a um processo de limpeza preliminar no cemitério dos Capuchos (Santarém) de onde foram transportadas para as instalações da Universidade de Coimbra em saco de plástico preto. Após serem recebidos, os esqueletos foram armazenados em caixas de plástico negro com o correspondente número de série que está diretamente relacionado com a sua identificação.^{87,88}

As amostras dos conjuntos CEI/XXI e ArqR encontram-se secas (totalmente desprovidas de tecidos moles e medula) e não estavam completamente desidratadas e desengorduradas (apesar de isso ter sido parcialmente possível, dado o tempo de inumação a que foram sujeitos). Estes ossos foram submetidos a queima experimental controlada, a temperaturas específicas, num forno elétrico (Barracha modelo K-3, Trifásico 14 A, com 40x40x40 cm de dimensão interna, fabricado pela Barracha Lda., Leiria, Portugal, 1994) acoplado a um programador automático com um indicador digital da temperatura, permitindo arranques programados e variação automática da velocidade de aquecimento. Um termopar tipo K (negativo/ níquel-alumínio, positivo/ níquel-cromo) foi usado para medir a temperatura dentro do forno (de acordo com a IEC 60583-2). Foram aplicadas as seguintes temperaturas máximas e durações de queima (para uma velocidade de aquecimento de 6-10 °C/min): 450 °C (120 min), 700 (120 min), 800 °C (180 min) e 900 °C (220 min). Estes períodos temporais refletem o tempo necessário para atingir cada temperatura máxima, após o qual o forno foi desligado. As amostras foram deixadas arrefecer à temperatura ambiente antes de retiradas do forno (Esquema 1).

2.3. Tratamento com Ácido Acético

Antes das experiências em amostras humanas, o procedimento experimental para o tratamento com ácido acético foi otimizado com ossos de porco: em experiências independentes, pequenas porções de osso em pó (ca. 250 – 500 mg) foram colocadas em solução aquosa de ácido acético – 0,1, 0,5 ou 1,0 M^{1,14,37,89} – numa proporção de 0,04 mg/ml (de acordo com estudos anteriores).^{38,44} A mistura foi agitada (à temperatura ambiente) por diferentes períodos de tempo – 2,3,4,6,8 ou 15 horas (Esquema 1).^{14,42,89} As amostras foram então lavadas com água destilada (3 a 4 vezes), filtradas sob

vácuo^{21,33,42,45} ou centrifugadas (para as amostras de pó mais fino) e secas a 70°C (Esquema 1).^{21,42} As amostras resultantes deste tratamento foram analisadas por espectroscopia de infravermelho.

Este processo de otimização permitiu determinar as melhores condições experimentais para o tratamento dos ossos com ácido acético, que foram posteriormente aplicadas às amostras ósseas humanas em estudo - 4 horas de tratamento com ácido acético 0,1M não tamponizado (pH= 2,95).

Apos a queima às temperaturas definidas (450, 700, 800 e 900 °C), cada amostra óssea dos conjuntos CEI/XXI, ArqR, Arq e Cr foi raspada com um bisturi de modo a obter pequenas lascas, tendo sido submetidas a tratamento com ácido acético (nas condições otimizadas).

2.4. Obtenção dos Espetros de FTIR-ATR

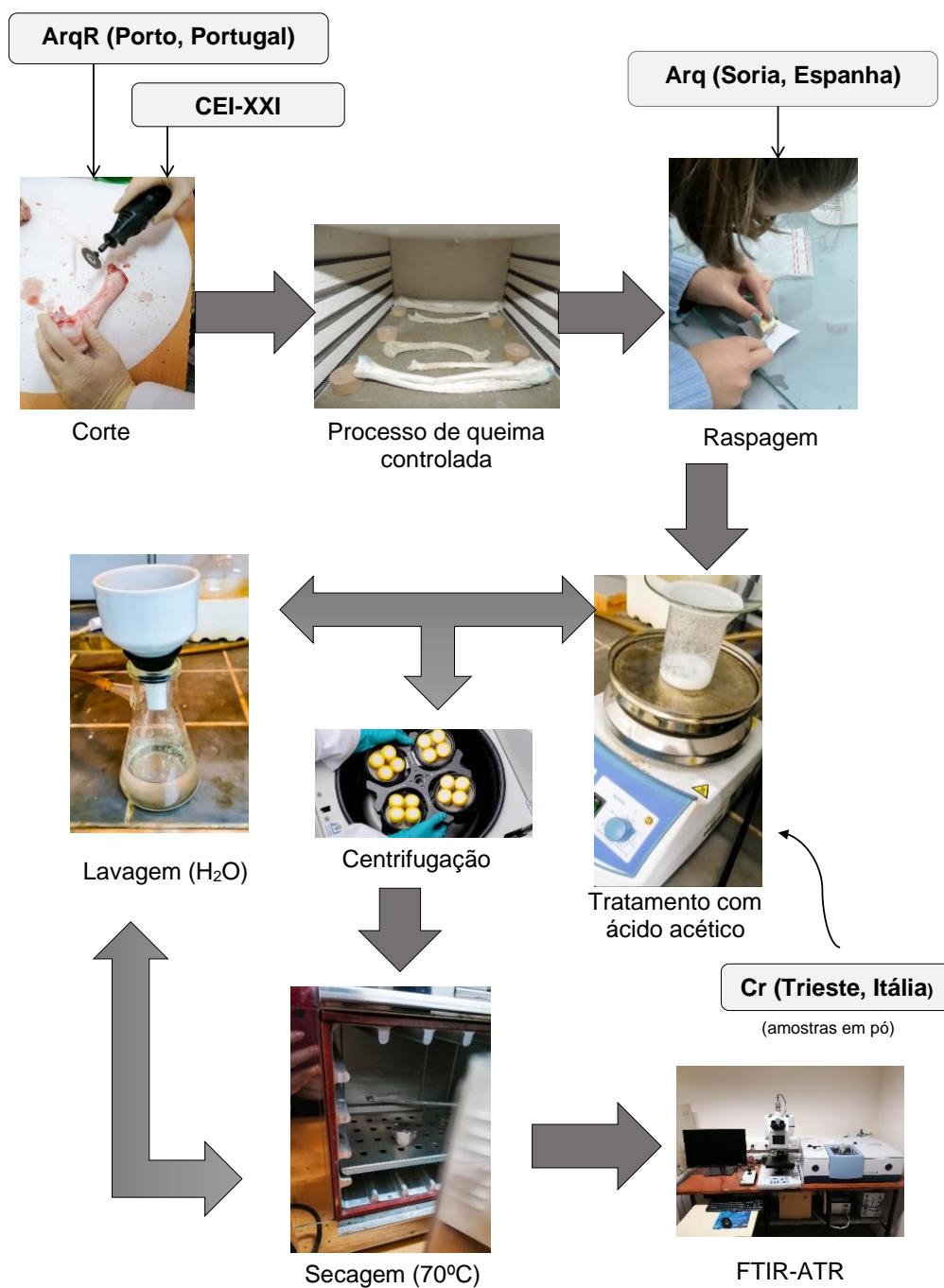
O registo dos espetros de infravermelho, em modo de reflexão total atenuada (ATR), no IV médio (400-4000 cm⁻¹), foi realizado num espectrómetro FTIR da Bruker Optics, modelo Vertex 70 purgado por ar seco, livre de CO₂ e equipado com um acessório Bruker Platinum ATR com cristal de diamante (ângulo de incidência de 45°, reflexão única). Foi utilizado um detetor de telureto de mercúrio e cádmio (MCT) de banda larga refrigerado com nitrogénio líquido e um divisor de radiação (“beamsplitter”), para o IV médio, de Ge em substrato de KBr.

Cada espectro foi obtido após 128 scans, com uma resolução de 2 cm⁻¹, aplicando uma função de apodização Balckman-Harris de 3 termos. Nestas condições, a exatidão do número de onda está acima de 1 cm⁻¹. Foi utilizado o software OPUS- Bruker Spectroscopy Software (versão 8.1) para corrigir os espetros em relação à dependência do comprimento de onda da profundidade de penetração do campo elétrico na amostra, usando um índice de refração médio de 1,25. Os espetros foram normalizados para a banda $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ a 1030 cm⁻¹.

As intensidades dos sinais foram consideradas para o cálculo das razões espectroscópicas C/P ($\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_B / \nu_3(\text{PO}_4^{3-})$), BPI ($(\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_B / \nu_4(\text{PO}_4^{3-}))$) e API ($(\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_A / \nu_4(\text{PO}_4^{3-}))$).

Posteriormente, como o número de amostras em cada coleção é reduzido e alguns conjuntos não cumpriam os requisitos necessários à aplicação de testes paramétricos, optou-se por efetuar testes estatísticos não paramétricos. Para investigar as diferenças entre o pré e o pós tratamento com ácido acético aplicou-se o teste de

Wilcoxon e para investigar as diferenças entre coleções aplicou-se o teste de Kruskal Wallis e Man Whitney.



Esquema 1. Representação esquemática do procedimento experimental aplicado às amostras ósseas estudadas neste trabalho.

3. Resultados

3.1. Análise Antes do Tratamento

3.1.1. Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI (CEI/XXI)

Foram analisadas amostras provenientes de quatro esqueletos diferentes da coleção CEI/XXI- 188, 116, 100 e 91 - que foram queimados às temperaturas máximas de 450, 700, 800 e 900 °C, respetivamente.

Nos estudos dos ossos queimados torna-se muito importante a análise de amostras de diferentes partes do esqueleto, uma vez que os ossos apresentam dimensões, formas e estruturas diferentes.^{9,17,20} Na Tabela 4, encontra-se estatística descritiva dos índices espectroscópicos calculados para todas as coleções

Nas amostras de fémur, rádio, úmero, tibia e ulna queimadas a 450 °C, verificou-se que o índice de cristalinidade (IC) variou entre 3,17 e 3,50 (CV= 3,53 %, este parâmetro permite avaliar o nível de variação interna da amostra).

Os carbonatos de tipo B (BPI) estavam em maior quantidade do que os carbonatos A (API). O API variou entre 0,15 e 0,23 (CV=9,83 %) enquanto que BPI variou entre 1,31 e 1,57 (CV=5,74 %). O índice C/P apresentou valores entre 0,27 e 0,31 (CV=4,52 %).

De seguida analisaram-se amostras de fémur, úmero, rádio, tibia e ulna queimadas a 700 °C (Tabela 4). Neste conjunto de amostras calculou-se o índice OH/P referente ao teor de grupos hidroxilo relativamente aos fosfatos, uma vez que, à temperatura de 700 °C a matéria orgânica já está completamente degradada,^{3,16,18} e deixa assim de exercer as suas funções de blindagem térmica. Desta forma, a componente inorgânica começa a sofrer alterações devido ao calor. Para o índice OH/P foram obtidos valores entre 0,38 e 0,46.

De um modo geral os carbonatos de tipo B continuaram a existir em maior quantidade do que os carbonatos de tipo A, sendo que BPI variou entre 0,63 e 0,95 (CV=10,91%) enquanto API variou entre 0,20 e 0,43 (CV=26,63%). Ainda relativamente ao teor de carbonatos, verificou-se que os índices C/P e C/C apresentaram um coeficiente de variação de 13,50% e 3,21%, respetivamente. Por fim, os índices de cristalinidade das amostras queimada a 700 °C variaram entre 4,39 e 5,05 (CV=4,12%).

Tabela 4. Resumo da estatística descritiva dos índices espectroscópicos CI, C/P, API, BPI, C/C e OH/P para a Coleção de esqueletos identificados do século XXI (CEI/XXI), para as amostras do cemitério civil do Hospital de Santo António do Porto (ArqR), para a necrópole da Idade do Ferro “El Inchidero” (Cr) antes do tratamento com ácido acético.

Coleção	Estatística	IC	C/P	API	BPI	C/C	OH/P	
CEI/XXI	450 °C	N	9	10	10	9	10	
		Média	3,35	0,30	0,20	1,42	1,00	-
		Desvio padrão	0,12	0,01	0,02	0,08	0,01	-
		Mínimo	3,17	0,27	0,15	1,31	0,99	-
		Máximo	3,50	0,31	0,23	1,57	1,03	-
	700 °C	N	9	9	9	9	9	9
		Média	4,85	0,18	0,26	0,83	1,08	0,42
		Desvio padrão	0,20	0,02	0,07	0,09	0,03	0,03
		Mínimo	4,39	0,13	0,20	0,63	1,03	0,38
		Máximo	5,05	0,22	0,43	0,95	1,14	0,46
	800 °C	N	9	10	10	10	9	9
		Média	3,75	0,21	0,29	1,02	1,11	0,33
		Desvio padrão	0,16	0,02	0,05	0,14	0,05	0,03
		Mínimo	3,57	0,17	0,19	0,79	1,05	0,30
		Máximo	3,94	0,24	0,35	1,22	1,18	0,38
	900 °C	N	9	9	10	9	10	10
		Média	4,19	0,19	0,28	0,86	1,00	0,43
		Desvio padrão	0,39	0,02	0,07	0,14	0,02	0,04
		Mínimo	3,73	0,14	0,13	0,61	0,97	0,35
		Máximo	4,83	0,22	0,37	0,67	1,04	0,49
ArqR	N	14	13	14	13	14	14	
	Média	5,12	0,05	0,18	0,22	1,71	0,55	
	Desvio padrão	0,67	0,06	0,21	0,27	0,38	0,08	
	Mínimo	3,82	0,01	0,01	0,03	1,19	0,37	
	Máximo	6,38	0,16	0,52	0,67	2,39	0,67	
Arq	N	15	17	17	16	17	17	
	Média	4,90	0,14	0,13	0,59	1,37	0,47	
	Desvio padrão	0,39	0,06	0,16	0,27	0,22	0,03	
	Mínimo	4,37	0,08	0,02	0,34	1,00	0,43	
	Máximo	5,62	0,31	0,65	1,45	1,64	0,53	
Cr	N	21	22	23	21	22	21	
	Média	4,95	0,18	0,47	0,75	1,42	0,58	
	Desvio padrão	0,58	0,05	0,14	0,16	0,14	0,07	
	Mínimo	3,93	0,12	0,24	0,52	1,13	0,44	
	Máximo	5,96	0,30	0,87	1,16	1,64	0,68	

De seguida, analisaram-se amostras de osso fémur, úmero, rádio, tíbia e ulna expostas à temperatura de 800 °C, tendo-se obtido as médias e desvios padrões para os índices espectroscópicos apresentados na Tabela 4.

À semelhança das amostras anteriores, o índice OH/P para estas amostras variou entre 0,30 a 0,36.

Nestas amostras, os carbonatos de tipo B continuaram em maior quantidade do que os carbonatos A ($BPI > API$). Contudo, verificou-se que a percentagem destes últimos aumentou em relação aos de tipo B, - os valores de C/C aumentaram para valores superiores a 1. Por último, o índice de cristalinidade das amostras queimadas a 800 °C variou de 3,57 para 3,94 (CV=4,27%).

Por fim, analisaram-se amostras recentes queimadas a 900 °C e obtiveram-se os valores médios e respetivos desvios padrões da Tabela 4.

O IC obtido para as amostras variou entre 3,73 e 4,83 (CV=9,31%), enquanto OH/P se situou entre 0,35 e 0,49 (CV=9,79%). Nesta temperatura, a quantidade de carbonatos de tipo B continuou a ser superior à quantidade de carbonatos de tipo A.

Após calcular os índices espectroscópicos de todos os conjuntos de amostras, analisou-se a evolução desses índices à medida que a temperatura aumentou (Figura 6). Constatou-se que os índices API, C/P e C/C não sofreram alterações importantes com o incremento da temperatura, os índices BPI e OH/P apresentaram variações mais proeminentes a 800 °C e o IC foi o que apresentou alterações mais evidentes com o aumento de temperatura.

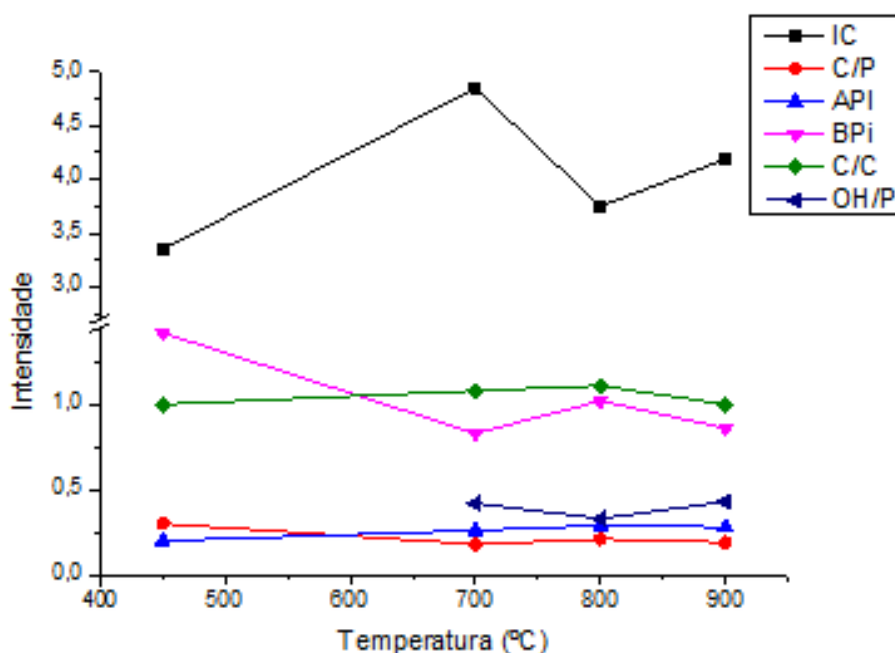


Figura 6. Evolução dos índices espectroscópicos IC, C/P, API, BPI, C/C e OH/P com o incremento da temperatura de queima, antes do tratamento com ácido acético. (os índices OH/P e API não foram calculados para as amostras a 450 °C uma vez que estas amostras continham ainda muita quantidade de matéria orgânica que impossibilitava a observação dos sinais de infravermelho correspondentes a estes índices).

3.1.2. Cemitério do Hospital de Santo António do Porto (ArqR)

Como o objetivo do presente trabalho consiste no estudo do potencial do tratamento com ácido acético para discriminar amostras ósseas antigas de amostras recentes, é necessário que este estudo incorpore amostras arqueológicas. Nesta última categoria estão inseridas as amostras do cemitério civil do hospital de Santo António do Porto (ArqR).

Embora as amostras ArqR e algumas amostras CEI/XXI tenham sido queimadas experimentalmente à mesma temperatura máxima (900 °C), o local e o tempo de sepultamento diferem, sendo este último maior para as amostras ArqR em relação às CEI/XXI, entre ~200 e 80 anos (Vassalo *et al.*)¹⁰ em contraste com 10 anos, respetivamente. Assim, é espetável que os resultados obtidos para as amostras ArqR difiram dos obtidos anteriormente. A estatística descritiva das amostras ArqR, antes de aplicado o tratamento com ácido acético, encontra-se na Tabela 4.

Ao contrário das amostras anteriores (CEI/XXI), o teor de carbonatos de tipo B (BPI) foi bastante semelhante ao de tipo A (API). Contudo, o índice C/C apresentou, para a maior parte das amostras, valores superiores a 1, sendo que em alguns casos chegou a 2. Este aumento de C/C pode ser explicado pelo aumento da quantidade de carbonatos de tipo A ou, alternativamente, pela diminuição dos carbonatos de tipo B. Através dos índices C/P e OH/P verificou-se que a quantidade de carbonatos e de grupos OH é muito pequena relativamente aos fosfatos presentes nas amostras. Quanto ao índice de cristalinidade, as amostras apresentaram valores entre 3,92 e 6,38 (CV=13,14 %).

3.1.3. Necrópole da Idade do Ferro “El Inchidero” (Soria, Espanha)

A análise das amostras de diáfise e crânios de 18 sepultamentos da Idade do Ferro resultou na estatística descritiva presente na Tabela 4.

As amostras apresentaram um teor de carbonatos de tipo B mais elevado do que o teor de carbonatos A. Contudo, C/C apresentou valores superiores a 1, para a maioria das amostras analisadas.

Os valores residuais dos índices C/P e OH/P refletiram quantidade carbonatos e hidroxilos reduzidos comparativamente à de fosfato. Por último, o índice de cristalinidade variou entre 4,37 e 5,62 (CV=7,86 %). Os altos elevados IC's em amostras arqueológicas podem ser explicados pelo crescimento dos cristais durante a inumação ou ainda devido à dissolução seletiva de cristais mais solúveis e menos ordenados.

3.1.4. Crematório de Trieste (Itália)

Por fim, avaliaram-se os efeitos dos tratamentos com ácido acético em amostras de esqueletos modernos submetidas a cremação. Desta forma, recorreu-se a amostras de diáfises de ossos longos provenientes de um crematório moderno em Trieste (Itália), não constituindo por isso material proveniente de trabalho experimental e controlado. Obtiveram-se os espectros de FTIR-ATR apresentados na Figura 7.

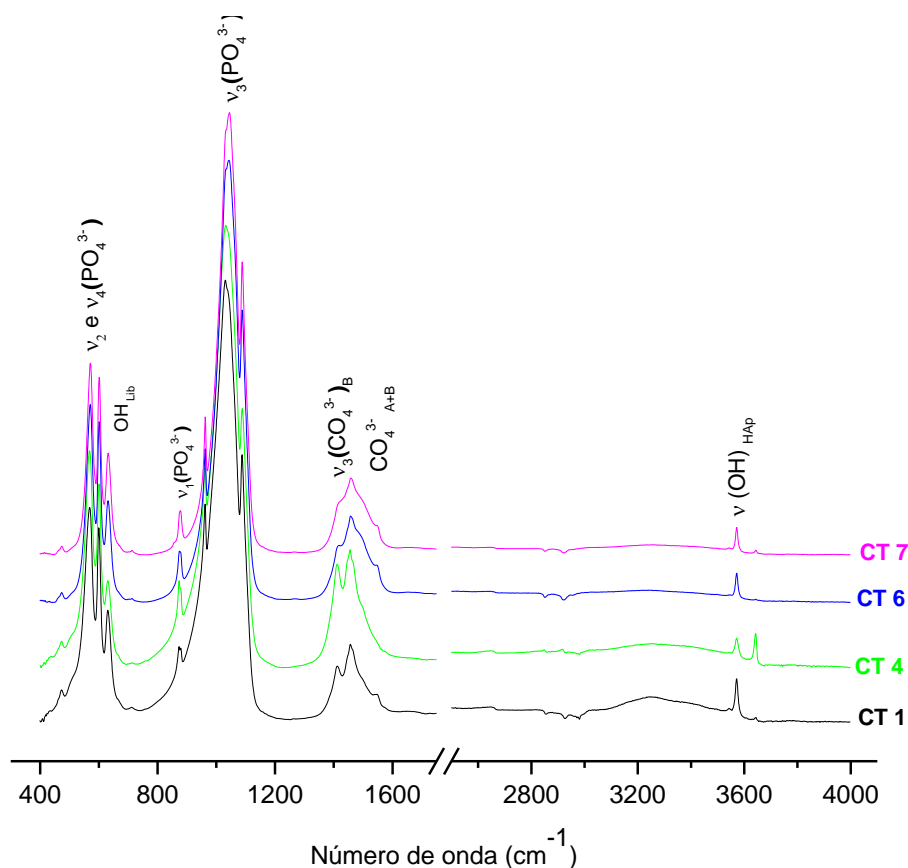


Figura 7. Espectros de quatro amostras provenientes do Crematório de Trieste (Itália) antes do tratamento com ácido acético.

Estes espectros de FTIR ajudam a estimar a temperatura provável a que as amostras foram sujeitas, por comparação com estudos prévios efetuados na Unidade QFM-UC.^{2,3,16,18} É claro que já não existem componentes orgânicas (proteínas e lípidos) nestas amostras, uma vez que elas foram sujeitas a temperaturas superiores a 500 °C. Adicionalmente, o fato de existirem bandas bem definidas, referentes à componente inorgânica (630 e 3572 cm⁻¹, atribuídas a OH_{Libração} e v(OH-) (HAp), respetivamente), significa que estas amostras foram sujeitas a temperaturas provavelmente superiores a 700 °C. Apesar da temperatura máxima não ser a única variável em jogo neste tipo de estimativa, sendo a duração da queima igualmente importante para definir a intensidade da mesma, os espectros indicaram claramente que as amostras tinham sido sujeitas a queima intensa. Estas evidências foram confirmadas pelos índices espectroscópicos calculados para todas as amostras (Tabela 4).

Sabendo que as temperaturas atingidas durante a cremação foram elevadas, era esperado que as amostras não apresentassem colagénio nem lípidos na sua composição, como se veio a verificar através da análise dos respetivos espectros de FTIR-ATR. Assim, não foi calculado o índice Am/P para este grupo de amostras. Uma vez que a matéria orgânica está completamente degradada, esta não executa as suas funções de blindagem térmica e a componente inorgânica fica exposta ao ar e às alterações provocadas pelo calor. Por isso, foi detetada a banda a 630 cm⁻¹ atribuída a OH_{Libração} (HAp) que permite calcular o índice OH/P, que variou entre 0,44 e 0,68 (CV=11,60%).

No que diz respeito aos carbonatos, verificou-se que, na maior parte das amostras os teores de carbonatos de tipo A e tipo B são semelhantes, uma vez que os índices API e BPI variaram entre 0,24 e 0,87 (CV= 30,09%) e 0,52 e 1,16 (CV=21,33%), respetivamente. Contudo, para as amostras Cr3, Cr17 e Cr21 a diferença entre os dois tipos de carbonatos foi considerável.

Relativamente ao índice C/C este apresentou valores elevados, entre 1,13 e 1,64 (CV=9,99%), que podem uma vez mais ser explicados pela diminuição do teor de carbonatos de tipo B nas amostras analisadas ou devido ao aumento dos carbonatos de tipo A. Apesar da proporção de um tipo aumentar em relação ao outro, a quantidade de carbonatos total ainda se revelou bastante pequena em comparação com os fosfatos. Por isso, os valores C/P para cada amostra foram diminutos, entre 0,12 e 0,30. Os índices de cristalinidade de cada uma das amostras analisadas variaram entre 3,93 e 5,96 (CV=11,72%).

3.2. Otimização das Condições do Tratamento com Ácido Acético

Perante o objetivo deste estudo, foi necessário otimizar as condições de tratamento das amostras com ácido acético pois a concentração e o tempo de tratamento utilizados influenciam previsivelmente os resultados obtidos. Como referido anteriormente, concentrações de ácido acético muito elevadas e tempos de tratamentos longos podem provocar perdas de massa da amostra e recristalização excessivas. Deste modo, o tratamento com ácido acético deixaria de ter qualquer sentido uma vez que os carbonatos exógenos seriam novamente repostos na estrutura óssea.^{37,38,42}

De modo a otimizar as condições experimentais para este processo utilizaram-se 6 fragmentos de ossos de porco, um não queimado (controlo) e os restantes queimados a 300, 500, 700, 900 e 1000 °C. Os respetivos espetros de FTIR-ATR foram registados antes do tratamento (Figura 8).

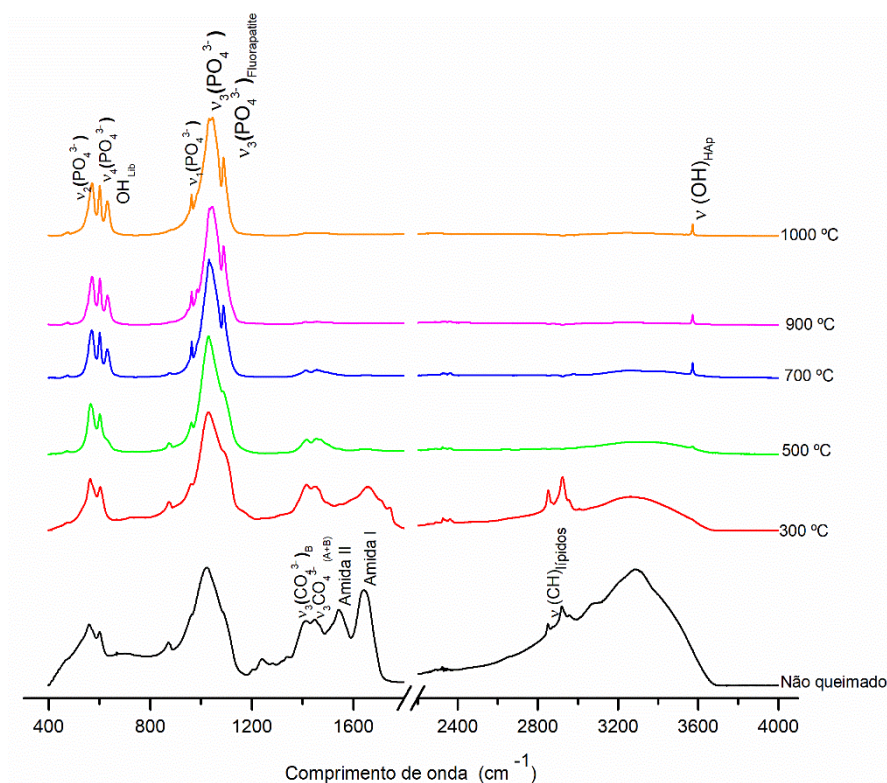


Figura 8. *Espectros de FTIR-ATR das amostras de ossos de porco não queimado e queimados a 300, 500, 700, 900 e 1000 °C antes do tratamento com ácido acético.*

Tal como esperado, o aumento de temperatura provocou alterações significativas na estrutura e composição ósseas. O osso não queimado apresentou uma elevada percentagem de proteínas e lípidos. No entanto, com o aumento da temperatura de 300 para 700 °C, estes constituintes orgânicos degradaram-se progressivamente até se tornarem residuais. Simultaneamente, a componente inorgânica (biopatite) tornou-se mais visível porque a matéria orgânica deixa de exercer as suas funções de blindagem térmica, surgindo assim as bandas atribuídas aos modos característicos dos grupos OH da biopatite (630 e 3572 cm⁻¹, devido à libração e alongação, respetivamente).

De acordo com Gonçalves *et al.*¹⁷ e Mamede *et al.*,³ a decomposição da matéria orgânica ocorre entre os 300 e os 800 °C e a componente inorgânica começa a sofrer os efeitos do calor a partir dos 500 °C, o que concorda com os resultados agora obtidos. Estas alterações estruturais foram também visíveis nos índices espectroscópicos (Tabela 5).

Tabela 5. Índices espectroscópicos obtidos para as amostras de osso de porco, não queimado e queimado a 300, 500, 700, 900 e 1000 °C antes do tratamento com ácido acético.

Amostra	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P	AM/P
300 °C	2,77	0,39	-	1,05	0,96	-	0,37
500 °C	3,03	0,20	0,19	0,53	0,99	0,38	-
700 °C	4,76	0,05	0,07	0,14	1,07	0,57	-
900 °C	4,73	0,03	0,05	0,08	1,14	0,61	-
1000 °C	4,83	0,03	0,04	0,07	0,97	0,69	-
Não queimado	2,47	0,70	-	1,57	1,08	-	0,81

O índice de cristalinidade revela variações entre 2,77 e 4,83 com um aumento da temperatura de 300 para 1000 °C. Os índices Am/P e OH/P confirmaram que componente orgânica desapareceu progressivamente até aos 500 °C, tendo sido a partir desta temperatura que as alterações térmico-induzidas na estrutura inorgânica se tornaram reconhecíveis no espetro.

O índice API apresentou valores inferiores ao BPI e diminui com o aumento da temperatura. Isto acontece porque as substituições de carbonatos de tipo A são menos comuns do que as substituições de tipo B.^{1,3,21} Para as amostras não queimada e queimadas a 300 °C não se calculou o índice API, porque a banda a 1540 cm⁻¹ tem uma elevada contribuição do modo vibracional da amida o que introduz um erro elevado na atribuição dos carbonatos A. Contudo, em condições normais, para temperaturas

superiores a 500 °C, em que a componente orgânica está totalmente destruída, a banda a 1540 cm⁻¹ já só diz respeito aos carbonatos de tipo A, permitindo o cálculo deste índice. Os índices C/P e BPI decresceram à medida que a temperatura aumentou.

Relativamente ao índice C/C obtiveram-se valores superiores ou próximos de 1, ou seja, houve um aumento dos carbonatos de tipo A ou, alternativamente, uma diminuição dos carbonatos B. De acordo com a literatura e com os resultados obtidos, o calor provocou a diminuição dos carbonatos B, de tal forma que poucos ou nenhuns vestígios destes carbonatos foram detetados a temperaturas superiores a 700 °C. Assim, pode-se dizer que o aumento de C/C foi provocado pela diminuição dos carbonatos B. A perda destes carbonatos vai provocar a diminuição da tensão da rede cristalina, permitindo o rearranjo das ligações de hidrogénio na apatite óssea, aumentando assim sua organização e levando a um incremento do índice de cristalinidade.^{3,17}

De acordo com alguns autores,¹ as razões C/P e BPI são inversamente proporcionais ao IC, pelo que um aumento deste vai fazer com que aqueles índices decresçam. Contudo, outros investigadores afirmam que o IC aumenta até aos 700/800 °C e decresce ligeiramente a temperaturas mais elevadas.³ Neste trabalho ambas as situações foram observadas.

A otimização do tratamento das amostras ósseas com ácido acético incidiu sobre a concentração da solução de ácido acético utilizada e o tempo de exposição das amostras a esta solução ácida. Apenas se otimizaram estas condições, uma vez que são as que mais influenciam o processo. Uma vez que este tratamento afeta os índices espectroscópicos característicos do osso, foi posteriormente avaliado o seu efeito sobre as amostras de ossos recentes e arqueológicos.

As amostras de osso de porco queimadas a 300, 500, 700, 900 e 1000 °C foram expostas a soluções de ácido acético de 1,0, 0,5 e 0,1 M durante 2 e 15 h. Na Figura 9 encontram-se os espectros das amostras tratadas com ácido acético 1,0 M.

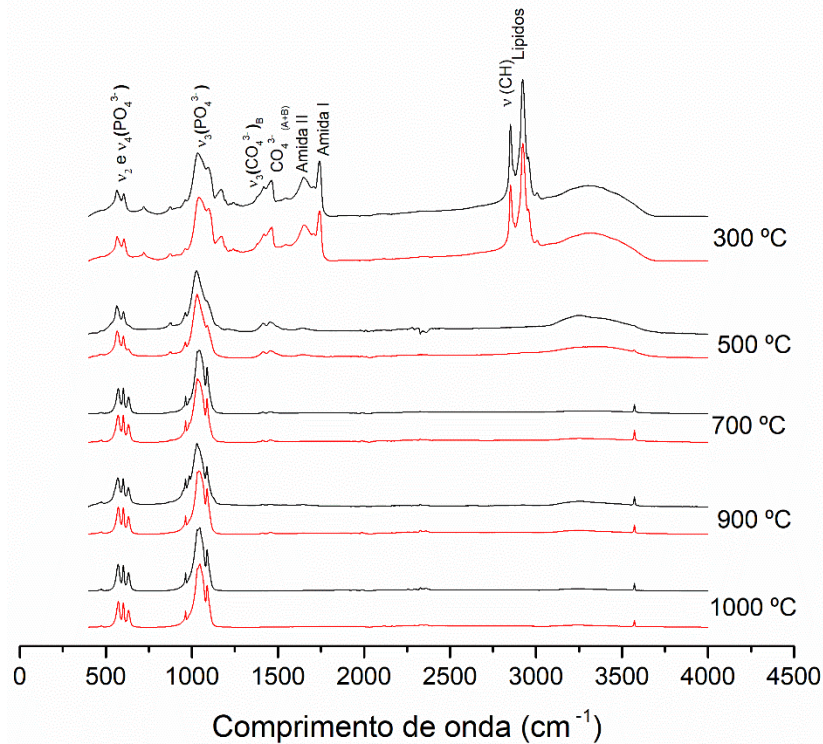


Figura 9. Espectros das amostras de osso de porco queimadas a 300, 500, 700, 900 e 1000 °C tratadas com uma solução de ácido acético 1,0 M durante 2h (vermelho) e 15h (preto).

O tratamento com ácido acético provocou uma redução na intensidade das bandas referentes aos carbonatos. Esta redução do teor em carbonatos reflete-se também na perda de massa determinada para as amostras após o tratamento com ácido. No entanto a perda de massa pode também ser devida à dissolução dos cristais de menores dimensões da hidroxiapatite, sendo este efeito mais acentuado nos ossos modernos. Assim, pesou-se a massa das amostras antes e após o tratamento com ácido acético, e obtiveram-se as percentagens de perdas de massa para cada amostra através da Equação 1 (Tabela 6).

$$\% \text{ Perda} = 100 - \left(\frac{m_{\text{Após}}}{m_{\text{Pré}}} * 100 \right) \quad (1)$$

Tabela 6. Percentagem de perda de massa e valores dos índices espectroscópicos IC, C/P, API, BPI, C/C e OH/P para as amostras de porco queimadas a 300, 500, 700, 900 e 1000 °C, após tratamento com ácido acético 1,0M, 0,5 e 0,1 M durante 2 e 15 h.

Conc.	Tempos	Amostras	Perdas	IC	C/P	API	BPI	C/C	OH/P
1,0 M	2 h	1000	48,1	6,36	0,00	0,01	0,01	1,40	0,69
		900	32,6	5,45	0,02	0,08	0,05	1,54	0,68
		700	59,6	5,04	0,03	0,09	0,07	1,27	0,66
		500	68,6	3,97	0,09	0,32	0,27	1,18	-
		300	89,4	3,20	0,42	1,48	1,22	1,21	-
	15 h	1000	60,5	6,31	0,00	0,02	0,01	1,34	0,71
		900	69,4	3,91	0,04	0,09	0,08	1,10	0,69
		700	82,4	5,57	0,03	0,08	0,06	1,24	0,65
		500	85,0	3,40	0,17	0,54	0,48	1,12	-
		300	84,8	3,10	0,47	1,55	1,30	1,19	-
0,5 M	2 h	300	82,6	2,90	0,43	-	1,19	1,05	-
		1000	50,9	6,72	0,01	0,02	0,02	1,02	0,69
	15h	300	71,0	3,45	0,28	-	0,91	1,14	-
		1000	84,2	5,55	0,01	0,02	0,02	0,94	0,74
0,1 M	2 h	1000	56,2	5,49	0,00	0,04	0,01	1,35	0,69
		900	60,7	5,80	0,01	0,05	0,03	1,32	0,61
		700	53,3	5,80	0,03	0,07	0,07	1,26	0,64
		500	40,3	3,91	0,09	0,19	0,25	1,17	-
		300	54,1	2,85	0,38	-	1,01	0,97	-
	15 h	1000	54,2	6,67	0,00	0,04	0,01	1,32	0,67
		900	50,0	6,36	0,01	0,05	0,03	1,55	0,63
		700	43,8	5,70	0,03	0,07	0,07	1,28	0,63
		500	39,2	3,70	0,11	0,19	0,34	1,18	-
		300	49,4	2,97	0,35	-	0,96	1,02	-

As perdas de massa das amostras tratadas com ácido acético 1 M foram superiores a 50%, à exceção das amostras a 900 °C tratadas durante 2 h que apresentam uma perda de apenas 32,6%. Em geral, com o aumento da temperatura de 300 para 1000 °C, as perdas de massa diminuíram de 89,4 % para 48,1 %, e de 84,8 % para 60,5 %, após 2 e 15 h de tratamento, respetivamente. Com a solução de ácido 0,5 M, as amostras com 15 h de tratamento apresentaram perdas de massa mais elevadas do que as tratadas durante 2 h, enquanto que as amostras expostas a ácido acético 0,1 M perderam cerca de 50,1% da massa inicial. Contudo, neste último caso as amostras após 15 h de tratamento foram as que tiveram menores perdas de massas (47,3 %), o que não era esperado, pois seria espetável que um tempo de tratamento mais longo correspondesse a maiores perdas de massa.

Nas amostras exposta a ácido 1,0 M durante 2 h e 15 h observaram-se diferenças muito acentuadas nos respectivos índices espectroscópicos: - 41,7 %, 20,9 % e -40,6 % após 2 h -22,4 %, 53,2 % e -23,3 % após 15 h. Nas amostras tratadas com ácido 0,1 M, os índices C/P, API e BPI apresentaram diferenças médias de -51,8 %, 9,2 % e -51 % para as amostras tratadas durante 2 h, e de -51,2 %, 23,5 % e -48,6% para as amostras sujeitas a 15 h de tratamento. Para a solução de ácido 0,5 M os índices C/P e BPI diminuíram 33,4 % e 29,5 % após 2 h e 49 % e 41,9 % após 15 h de tratamento. Assim, verificou-se que os índices C/P e BPI diminuíram com o tratamento com ácido, enquanto o índice API aumentou para todas as amostras tratadas e para todas as concentrações de ácido acético utilizadas.

Relativamente ao índice de cristalinidade, observou-se um aumento de 19,9 % e 10,9 % para as amostras tratadas com ácido 1,0 M, de 21,9 % e 19,7 % para as amostras tratadas com ácido 0,5 M, e de 18 % e 24,3 % para as amostras tratadas com ácido acético 0,1 M, respetivamente, após 2 e 15 h.

Tabela 7. Valores médios de perda de massa e de diferenças relativas dos índices IC, C/P, API, BPI, C/C e OH/P, para as amostras de osso de porco queimados, após tratamento com ácido acético 1 M, 0,5 e 0,1 M durante 2 e 15 h

[]	Tempo	Perdas	IC (%)	C/P (%)	API (%)	BPI (%)	C/C (%)	OH/P (%)
1,0 M	2h	59,7	19,9	-41,7	20,9	-40,6	28,8	11,4
	15h	76,4	10,9	-22,4	53,2	-23,3	17,7	8,1
0,5 M	2h	66,8	21,9	-33,4	-	-39,5	7,4	-
	15h	77,6	19,7	-49,0	-	-41,9	7,5	-
0,1 M	2h	52,9	18,0	-51,8	9,2	-51,0	18,8	2,3
	15h	47,3	24,3	-51,2	23,5	-48,6	23,7	4,1

Através da Tabela 7 constatou-se que a solução de ácido acético 0,1 M foi a que provocou perdas de massa próximas dos 50 %, em contraste com as perdas superiores a 60 % obtidas com concentrações de ácido superiores. Além disso, a maior diminuição dos índices BPI e C/P e o menor incremento do índice API, foram obtidos para tratamento com ácido acético a 0,5 M e 0,1 M.

Após estabelecida a concentração ótima de ácido acético a utilizar no tratamento das amostras de ossos humanos (0,1 M), procedeu-se à determinação do tempo de tratamento mais adequado. Assim, aplicou-se o tratamento com ácido acético 0,1 M a amostras de porco queimadas a 300 e 1000 °C (extremos de temperatura analisados anteriormente) durante 2, 3, 4, 6, 8 e 15 h. O tempo de tratamento escolhido não deveria

provocar perdas de massa excessivas, pois é importante que este processo seja não destrutivo, nem levar a variações significativas do índice de cristalinidade (IC).

É importante realçar que valores elevados de IC estão associados a um alto grau de cristalinidade. Se ocorrer dissolução de cristais pequenos e reativos por tratamento com ácido, haverá uma perda de massa acrescida (devido a esta dissolução e à perda de carbonatos) e os valores de IC aumentarão. Por outro lado, se houver um processo de recristalização excessiva os carbonatos serão reintegrados na matriz óssea, o que se reflete em perdas de massa menores e valores de IC elevados.

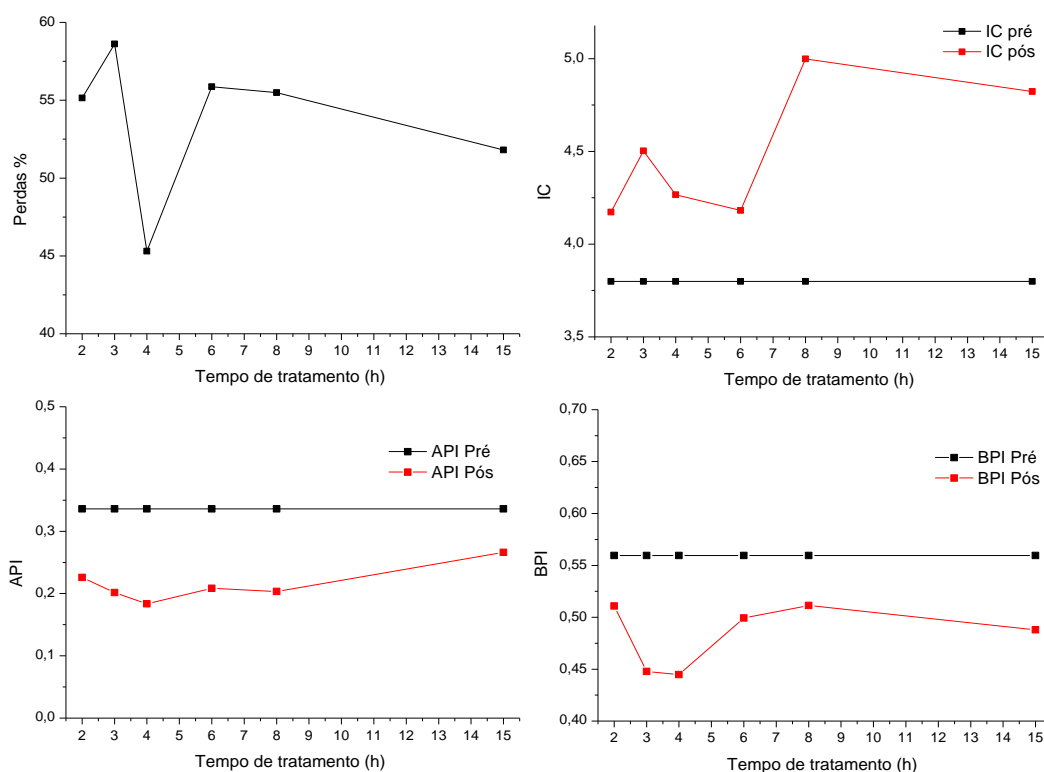


Figura 10. Evolução das perdas de massa e dos índices espectroscópicos IC, API e BPI em função do tempo de tratamento com ácido acético 0,1 M-(2, 3, 4, 6, 8 e 15 h) de amostras de osso de porco queimado.

Por análise da Figura 10, verificou-se que o tempo de tratamento mais adequado para as amostras de ossos são as 4 h, pois corresponde a uma perda de massa inferior a 50%, o IC aumentou apenas 12,8% e a perda de carbonatos exógenos foi mais pronunciadas do que para os outros tempos testados.

Assim, concluiu-se que as condições ideais para o tratamento com ácido acético a aplicar neste estudo incluem a exposição das amostras de osso a ácido acético 0,1 M durante 4h.

3.3. Análise Após Tratamento com Ácido Acético

3.3.1. Amostras da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI

Após a otimização das condições de tratamento com ácido acético, procedeu-se à aplicação deste processo nas amostras recentes da CEI/XXI, tendo-se obtido os espectros de FTIR-ATR para cada amostra (queimada entre 450 e 900 °C). Os valores médios, máximos, mínimos e desvio padrão dos índices espectroscópicos para estas amostras estão contidos na Tabela 8.

O tratamento com ácido acético das amostras queimadas a 450 °C conduziu ao aumento do índice de cristalinidade em cerca de 10,06%, passando este a variar entre 3,17 e 3,50 (CV=3,27%). Os carbonatos de tipo A e B apresentaram um decréscimo de 31,35 % e 12,27 %, variando entre 0,22 e 0,33 (CV=15,24 %) e entre 1,06 e 1,32 (CV=8,94%), respetivamente.

O índice C/C, após o tratamento com ácido acético, aumentou para valores superiores a 1, devido à diminuição do teor de carbonatos de tipo B.

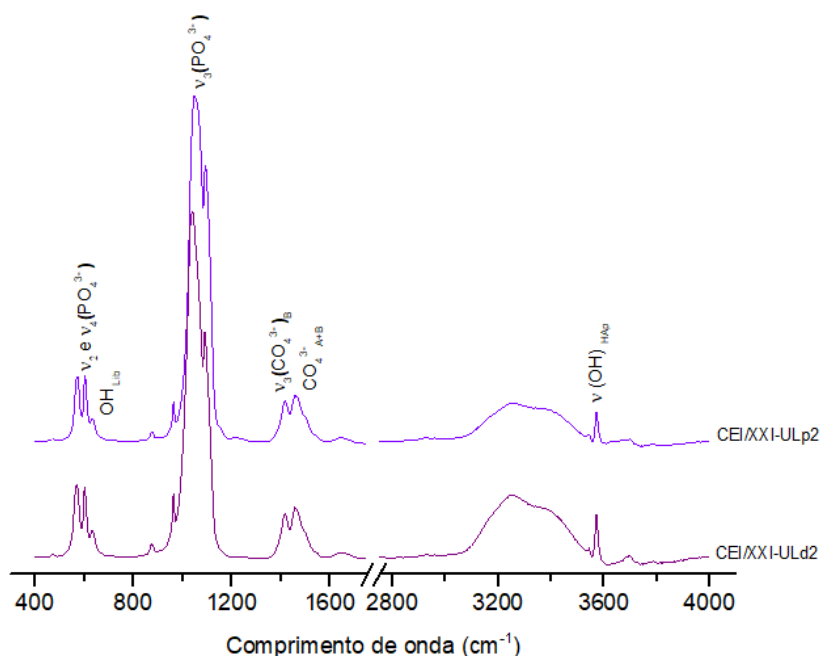


Figura 11. Espectros das amostras queimadas a 700 °C e tratadas com ácido acético 0,1 durante 4h.

Tabela 8. Estatística descritiva dos índices espectroscópicos CI, C/P, API, BPI, C/C e OH/P para as amostras CEI/XXI, ArqR, Arq e Cr, após o tratamento com ácido acético.

Coleção		Estatística	IC	C/P	API	BPI	C/C	OH/P
CEI/XXI	450 °C	N	9	10	10	9	10	
		Média	3,64	0,24	0,27	1,21	1,05	
		Desvio padrão	0,13	0,02	0,04	0,09	0,02	
		Mínimo	3,48	0,21	0,22	1,06	1,02	
		Máximo	3,83	0,27	0,33	1,32	1,07	
CEI/XXI	700 °C	N	9	9	9	9	9	9
		Média	5,13	0,11	0,11	0,52	1,23	0,40
		Desvio padrão	0,17	0,02	0,03	0,09	0,04	0,03
		Mínimo	4,92	0,08	0,07	0,38	1,16	0,35
		Máximo	5,37	0,12	0,15	0,61	1,27	0,44
CEI/XXI	800 °C	N	9	10	10	10	9	9
		Média	4,25	0,15	0,24	0,83	1,18	0,35
		Desvio padrão	0,32	0,03	0,09	0,26	0,03	0,04
		Mínimo	3,92	0,08	0,03	0,23	1,15	0,31
		Máximo	4,99	0,18	0,38	1,34	1,24	0,44
CEI/XXI	900 °C	N	9	9	10	9	10	10
		Média	5,48	0,07	0,08	0,36	1,17	0,45
		Desvio padrão	0,30	0,01	0,02	0,04	0,04	0,02
		Mínimo	5,00	0,06	0,04	0,29	1,11	0,44
		Máximo	5,86	0,09	0,10	0,44	1,22	0,49
ArqR		N	14	13	14	13	14	14
		Média	5,43	0,01	0,02	0,05	2,20	0,54
		Desvio padrão	0,58	0,01	0,01	0,04	0,48	0,09
		Mínimo	4,76	0,003	0,004	0,01	1,30	0,37
		Máximo	6,28	0,03	0,05	0,15	3,00	0,66
Arq		N	15	17	17	16	17	17
		Média	5,29	0,10	0,04	0,44	1,63	0,49
		Desvio padrão	0,49	0,04	0,02	0,15	0,19	0,04
		Mínimo	4,19	0,06	0,0003	0,28	1,36	0,40
		Máximo	6,10	0,19	0,07	0,73	2,03	0,58
Cr		N	21	22	23	21	22	21
		Média	5,99	0,02	0,10	0,09	2,86	0,60
		Desvio padrão	0,71	0,02	0,06	0,06	0,66	0,07
		Mínimo	4,75	0,01	0,02	0,03	1,74	0,47
		Máximo	7,08	0,09	0,23	0,26	4,14	0,75

Os resultados do tratamento com ácido acético 0,1M das amostras de fêmur, rádio, tíbia, ulna e úmero humanos expostas à temperatura de 700 °C apresentam-se na Figura 11 e Tabela 8.

Nas amostras queimadas a 700 °C o tratamento com ácido acético provocou as seguintes variações dos índices espectroscópicos: IC e C/C aumentaram de 5,97 % (CV=3,32 %) e 13,43 % (CV=3,32 %), respetivamente; API, BPI e C/P sofreram uma diminuição de -49,52 % (CV=23,76 %), -27,40 % (CV=16,49 %) e -34,99 % (CV=3,32 %), respetivamente; OH/P variou entre 0,46 a 0,65 (CV=9,16 %) (Tabela 8).

No caso das amostras sujeitas à temperatura de 800 °C, o tratamento com ácido acético provocou um aumento do índice de cristalinidade de 11,28 % (CV=10,45 %) e o índice C/C sofreu um incremento, passando a ter valores entre 1,15 e 1,24 (CV=7,59 %) (Tabela 8).

Os carbonatos de tipo A reduziram-se em cerca de 10,82 % variando entre 0,03 e 0,38 (CV=36,38 %), enquanto que os carbonatos de tipo B diminuíram 15,82 %. A quantidade de carbonatos relativamente aos fosfatos apresentou valores entre 0,08 e 0,18 (CV=17,55 %) e o índice OH/P variou 10,74 %.

Nas amostras de fémur, rádio, tibia, ulna e úmero queimadas a 900 °C, o IC pós-tratamento apresentou valores entre 5,00 e 5,86 (CV=5,52 %) e o índice C/C aumentou 16,78 %, apresentando valores entre 1,11 e 1,22 (CV=3,24 %) (Tabela 8).

Por sua vez, os índices API, BPI e C/P para as amostras queimadas a 900 °C sofreram grandes decréscimos médios de 69,11% (CV=26,26%), 56,88% (CV=12,87%) e 60,19% (CV=14,40), respetivamente (Tabela 8).

3.3.2. Amostras do Cemitério Civil do Hospital de Santo António do Porto

Os resultados obtidos para as amostras provenientes do hospital de Santo António do Porto (ArqR), após tratamento com ácido acético, estão apresentados na Tabela 8.

O índice de cristalinidade destas amostras aumentou em média 7,09 % alcançando valores entre 4,76 e 6,28 (CV=10,72 %). O índice OH/P já apresentou um decréscimo médio de 2,72 % (CV=16,89 %) e C/C teve um incremento médio de 40,23 %, atingindo valores entre 1,30 e 3,00.

Os carbonatos de tipos A e tipo B, após tratamento, apresentaram valores muito semelhantes, e apresentaram um decréscimo de -43,83 % e -37,10 %, respetivamente no índice API e BPI, com coeficientes de variações na ordem dos 64,89 % e 73,86 %

respetivamente. Por fim, a razão C/P diminuiu 35,11 %, alcançando valores entre 0,003 e 0,03 (CV=72,90 %).

3.3.3. Necrópole da Idade do Ferro “El Inchidero”

Os resultados obtidos para as amostras arqueológicas provenientes da Necrópole “El Inchidero” (Arq) são apresentados na Tabela 8. Os índices IC, C/C e OH/P apresentaram uma tendência crescente – respetivamente 8,66 %, 22,90 % e 3,92 % - enquanto os API, BPI e C/P sofreram uma diminuição 52,27 %, 16,76 % e 17,81 %, respetivamente). Variações entre 4,19 a 6,10 para o IC (CV=9,26 %), de 0,06 a 0,19 para o C/P (CV=39,20 %), o API entre 0,0003 a 0,07 (CV=61,24 %) para o API, entre 0,28 a 0,73 (CV=33,13 %) para o BPI, de 1,36 a 2,03 (CV=11,68 %) para o C/C e de 0,44 a 0,87 (CV=17,65 %) para o OH/P foram observadas.

3.3.4. Crematório de Trieste

Os resultados obtidos para as amostras de ossos queimados em crematório moderno (Cr) são apresentados na Tabela 8. Estas foram submetidas a temperaturas muito elevadas (entre 850 e 1050 °C) na presença de madeira (caixão), roupa e tecido moles, o que pode ter influenciado de alguma forma os índices espectroscópicos agora calculados. Sendo um forno que trabalha a gás, é provável que este fato tenha também tido a sua influência.

Verificou-se um incremento dos índices IC, OH/P e C/C (22,69 %, 4,20 % e 101,64 %, respetivamente), enquanto que os índices C/P, API e BPI apresentaram um decréscimo (87,93 %, 78,31 % e 87,91 %, respetivamente). O aumento do índice C/C para estas amostras é particularmente elevado (superior a 100 %) comparativamente com os detetados para os restantes grupos de amostras.

O índice de cristalinidade aumentou para valores entre 4,75 e 7,08 (CV=11,85 %), o índice C/P diminuiu para valores entre 0,01 e 0,09 (CV=86,21 %), o API entre 0,02 e 0,23 (CV=58,94 %), o BPI entre 0,03 e 0,26 (CV=66,03 %), o C/C entre 1,74 e 4,14 (CV=22,95 %) e o OH/P entre 0,47 e 0,75 (CV=11,46 %).

3.4. Estudo Estatístico

A análise estatística dos índices espectroscópicos foi efetuada através de teste não paramétricos.

Analisaram-se as 7 coleções separadamente (Cr, Arq e ArqR, 450, 700, 800 e 900 °C) no que diz respeito às diferenças nos vários índices antes e após o tratamento com ácido acético. Isto foi realizado com o objetivo de determinar se existe um padrão distinto entre arqueológicos e modernos.

De fato, após a análise estatística constatou-se que, ao contrário de todas as coleções modernas, as coleções ArqR e Arq não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos índices IC ($Z=-1,57$; $p>0,11$ e $Z=-1,704$; $p>0,08$, respetivamente) e C/P ($Z=-2,201$; $p>0,2$ e $Z=-2,741$; $p>0,05$, respetivamente). Por sua vez, o índice OH/P apenas apresentou diferenças estatisticamente significativas entre as coleções a 700 °C e as coleções a 900 °C e Cr ($p>0,0024$).

Na tabela 9, encontram-se os resultados dos testes estatísticos para as coleções analisadas. As diferenças relativas entre os valores pré- e pós-tratamento dos índices espectroscópicos dos vários conjuntos foram também testadas para verificar eventuais diferenças entre eles. Relembrando o objetivo desta investigação, para que o tratamento com ácido acético possa ser considerado útil na diferenciação entre ossos queimados arqueológicos e ossos queimados modernos, diferenças no seu efeito ao nível dos índices deveriam ocorrer. A partir de um teste Kruskal-Wallis, constatou-se que os diferentes conjuntos de amostras apresentavam diferenças estatisticamente significativas para todos os índices - $\chi^2(6, N = 80) = 21,92, p = 0,001$ no IC, $\chi^2(6, N = 80) = 56,37, p < 0,001$ no C/P, $\chi^2(6, N = 80) = 39,74, p < 0,001$ no API, $\chi^2(6, N = 80) = 51,08, p < 0,001$ no BPI, $\chi^2(6, N = 80) = 59,55, p < 0,001$ no C/C e $\chi^2(5, N = 80) = 7,69, p = 0,174$ no OH/P.

Testes *post-hoc*, mais especificamente testes de Mann-Whitney, foram então implementados para identificar entre que coleções se observaram diferenças estatisticamente significativas. Na Tabela 10 encontram-se os valores dos testes estatísticos. Através destes testes verificou-se que, apesar do resultado obtido com o teste Kruskal-Wallis, nenhum par de coleções apresentou diferenças estatisticamente significativas entre si. Assim, não foram detetadas diferenças suficientes para gerar um parâmetro fiável que permita distinguir amostras arqueológicas de amostras recentes.

Tabela 9. Resultados do teste não paramétrico de Wilcoxon para os índices IC, C/P, API, BPI, C/C e OH/P em cada uma das coleções (450, 700, 800, 900, ArqR, Arq e Cr).

Índices	Col.	n	Med.	Amp.	Z	ρ	Conclusão	Índices	Col.	n	Med.	Amp.	Z	ρ	Conclusão
IC	450	Pré	3,37	0,33	-2,67	0,01	IC pós > IC pré	BPI	450	9	1,41	0,26	-2,67	0,01	BPI Pré > BPI Pós
		Pós	3,66	0,35							1,20	0,26			
	700	Pré	4,90	0,66	-2,14	0,03	IC pós > IC pré		700	9	0,83	0,32	-2,67	0,01	BPI Pré > BPI Pós
		Pós	5,22	0,45							0,56	0,23			
	800	Pré	3,74	0,44	-2,43	0,02	IC pós > IC pré		800	9	1,01	0,43	-1,89	0,06	BPI Pré > BPI Pós
		Pós	4,16	1,68							0,85	1,11			
	900	Pré	4,29	1,10	-2,67	0,01	IC pós > IC pré		900	9	0,84	0,51	-2,67	0,01	BPI Pré > BPI Pós
		Pós	5,61	0,86							0,37	0,15			
	ArqR	Pré	5,02	2,46	-1,57	0,12	IC pré ñ ≠ IC pós		ArqR	9	0,05	0,64	-2,49	0,01	BPI Pré > BPI Pós
		Pós	5,23	1,52							0,04	0,14			
Arq	Pré	4,98	1,25	-1,70	0,09	IC pré ñ ≠ IC pós	Arq	9	0,50	1,11	-2,53	0,01	BPI Pré > BPI Pós		
	Pós	5,35	1,91						0,40	0,45					
Cr	Pré	5,11	2,03	-3,42	<0,001	IC pós > IC pré	Cr	21	0,72	0,64	-4,02	<0,001	BPI Pré > BPI Pós		
	Pós	6,06	2,33				0,08	0,23							
C/P	450	Pré	0,30	0,04	-2,67	0,01	C/P Pré > C/P Pós	C/C	450	9	1,00	0,04	-2,84	<0,001	C/C Pós > C/C pré
		Pós	0,24	0,06							1,05	0,05			
	700	Pré	0,18	0,09	-2,67	0,01	C/P Pré > C/P Pós		700	9	1,07	0,11	-2,67	0,01	C/C Pós > C/C pré
		Pós	0,11	0,04							1,24	0,11			
	800	Pré	0,21	0,07	-2,81	0,01	C/P Pré > C/P Pós		800	9	1,10	0,13	-2,37	0,02	C/C Pós > C/C pré
		Pós	0,16	0,10							1,17	0,09			
	900	Pré	0,19	0,08	-2,68	0,01	C/P Pré > C/P Pós		900	9	1,00	0,07	-2,81	0,01	C/C Pós > C/C pré
		Pós	0,07	0,03							1,17	0,11			
	ArqR	Pré	0,01	0,15	-2,20	0,28	IC pré ñ ≠ IC pós		ArqR	9	1,72	1,20	-2,79	0,01	C/C Pós > C/C pré
		Pós	0,01	0,03							2,24	1,70			
Arq	Pré	0,12	0,23	-2,74	0,06	IC pré ñ ≠ IC pós	Arq	9	1,40	0,64	-3,17	0,00	C/C Pós > C/C pré		
	Pós	0,10	0,13						1,60	0,67					
Cr	Pré	0,17	0,18	4,12	<0,001	C/P Pré > C/P Pós	Cr	21	1,46	0,51	-4,11	<0,001	C/C Pós > C/C pré		
	Pós	0,02	0,08				2,79	2,40							
API	450	Pré	0,22	0,08	-2,83	0,01	API Pré > API Pós	OH/P	450	9	0,43	0,08	-2,20	0,03	OH/P Pré = OH/P Pós
		Pós	0,27	0,11							0,39	0,09			
	700	Pré	0,25	0,23	-2,67	0,01	API Pré > API Pós		700	9	0,32	0,08	-0,99	0,33	OH/P Pré = OH/P Pós
		Pós	0,12	0,08							0,34	0,13			
	800	Pré	0,29	0,16	-1,40	0,16	IC pré ñ ≠ IC pós		800	9	0,43	0,14	-1,93	0,05	OH/P Pré = OH/P Pós
		Pós	0,25	0,35							0,45	0,05			
	900	Pré	0,29	0,24	-2,81	0,01	API Pré > API Pós		900	9	0,58	0,30	<0,001	1	OH/P Pré = OH/P Pós
		Pós	0,08	0,06							0,54	0,29			
	ArqR	Pré	0,04	0,51	-2,08	0,04	API Pré > API Pós		ArqR	9	0,47	0,10	-1,34	0,18	OH/P Pré = OH/P Pós
		Pós	0,02	0,05							0,50	0,18			
Arq	Pré	0,08	0,63	-3,19	<0,001	API Pré > API Pós	Arq	9	0,59	0,24	-1,90	0,06	OH/P Pré = OH/P Pós		
	Pós	0,04	0,07						0,60	0,28					
Cr	Pré	0,48	0,63	-4,20	<0,001	API Pré > API Pós	Cr	21	0,59	0,24	-1,90	0,06	OH/P Pré = OH/P Pós		
	Pós	0,07	0,021				0,60	0,28							

Med – Mediana; Amp, - Amplitude; Col – Coleções

Tabela 10. Resultados estatísticos do Teste de Mann Whitney calculado para cada par de coleções comparadas.

Coleções	IC		C/P		API		BPI		C/C		OH/P	
	U	ρ	U	ρ	U	ρ	U	ρ	U	ρ	U	ρ
450 vs, 700	29	0,541	2	<0,001	0	<0,001	0	0,000	0	<0,001	-	-
450 vs, 800	26	0,37	40	0,481	10	0,002	39	0,661	38	0,604	-	-
450 vs, 900	0	<0,001	0	<0,001	0	<0,001	0	<0,001	0	<0,001	-	-
450 vs, ArqR	52	0,815	53	0,483	16	0,001	43	0,324	20	0,002	-	-
450 vs, Arq	58	0,95	78	0,749	0	<0,001	70	0,934	62	0,264	-	-
450 vs, Cr	42	0,041	0	<0,001	0	<0,001	0	<0,001	0	<0,001	-	-
700 vs, 800	27	0,258	15	0,013	9	0,002	16	0,017	7	0,002	25	0,19
700 vs 900	3	<0,001	10	0,006	18	0,028	11	0,008	24	0,095	8	0,297
700 vs, ArqR	58	0,781	53	0,744	61	0,96	54	0,794	33	0,062	49	1
700 vs, Arq	65	0,907	30	0,011	68	0,846	27,5	0,01	65	0,56	44	0,085
700 vs, Cr	44	0,022	0	<0,001	0	<0,001	0	<0,001	0	<0,001	90	0,859
800 vs, 900	5	0,001	6	0,001	12	0,003	11	0,004	5	<0,001	32	0,489
800 vs, ArqR	53	0,557	59	0,738	47	0,192	53	0,483	21	0,007	16	0,01
800 vs, Arq	61	0,726	61	0,243	38	0,027	71	0,66	57	0,312	73	0,874
800 vs, Cr	59	0,114	0	<0,001	18	<0,001	3	<0,001	3	<0,001	67	0,226
900 vs, ArqR	15	0,002	46	0,431	69	0,977	48	0,512	42	0,108	31	0,175
900 vs, Arq	17	0,002	13	<0,001	48	0,097	15	0,001	65	0,334	59	0,367
900 vs, Cr	75	0,97	0	<0,001	86	0,269	0	<0,001	86	0,722	85	0,416
ArqR vs, Arq	97	0,747	88,5	0,363	110	0,951	75	0,215	87	0,215	53	0,059
ArqR vs, Cr	71	0,01	47	0,001	137	0,467	42	<0,001	28	<0,001	90	0,327
Arq vs, Cr	89,5	0,08	1	<0,001	86	0,004	0	<0,001	28	<0,001	135	0,209

Coleção	IC		C/P		API		BPI		C/C		OH/P	
	Med,	Amp	Med,	Amp	Med,	Amp	Med,	Amp	Med,	Amp	Med,	Amp
450	7,28	19,41	-18,19	13,38	24,25	44,58	- 14,59	19,37	4,37	5,10	-6,27	17,73
700	5,13	22,34	-36,99	35,32	-52,54	40,38	- 32,46	33,32	13,79	7,85	0,08	46,55
800	12,325	32,07	-22,73	25,7	27,54	72,97	- 16,79	74,22	6,85	12,44	6,60	31,38
900	29,77	34,24	-64,41	35,36	-75,65	65,29	-60,61	39,23	17,48	12,27	-1,09	43,66
ArqR	10,69	36,38	-69,7	90,68	-87,26	91,66	-38,27	94,63	31,56	122,21	5,66	49,62
Arq	6,53	48,27	-16,17	132,73	-59,37	90,60	-20,62	68,16	13,32	101,88	3,00	40,86
Cr	25,42	79,86	-88,48	17,06	-82,37	42,40	-87,61	20,07	91,52	149,99	-6,27	17,73

Med, – Mediana; Amp, - Amplitude

Por último, procurou-se avaliar se as perdas de massa poderiam ser um critério de distinção entre coleções, nomeadamente entre arqueológicas e modernas. Através dos testes estatísticos constatou-se que as perdas de massa não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as coleções 450, 700, 800 e 900 °C. A coleção ArqR também apresentou perdas de massa semelhantes às da coleção de ossos recentes queimados a 900 °C, não apresentando por isso características diferenciadoras em relação a amostras recentes.

Por seu lado, as amostras arqueológicas Arq apresentaram diferenças estatisticamente significativas ao nível da perda de massa em relação a todas as outras coleções, à exceção das amostras ArqR e Cr. Assim, sendo, uma diferenciação entre arqueológicas e modernos baseada na perda de massa afigurou-se impossível. A Figura 12 representa as perdas de massa médias e os intervalos de perdas de massa para

cada grupo de amostras analisado, enquanto a Tabela 11 contém a estatística descritiva das respectivas perdas de massa.

Tabela 11. Valores das diferenças relativas médias da massa (Dif. Média), desvio padrão, diferença relativa da massa máxima e mínima (respectivamente) e o coeficiente de variação para todas as coleções de amostras.

Amostras	U	ρ	Amostras	Dif, Média (%)	Mediana	Amplitude
450 vs, 700	27	0,156	450	68,62	68,19	27,11
450 vs, 800	46	0,796				
450 vs, 900	40	0,481				
450 vs, ArqR	34	0,036	700	75,28	76,67	34,05
450 vs, Arq	18	<0,001				
450 vs, Cr	13	<0,001				
700 vs, 800	32	0,315	800	69,48	66,41	41,59
700 vs 900	28	0,182				
700 vs, ArqR	20	0,005				
700 vs, Arq	11	<0,001	900	65,48	64,09	48,46
700 vs, Cr	9	<0,001				
800 vs, 900	44	0,684				
800 vs, ArqR	33	0,031	ArqR	50,99	50,66	66,51
800 vs, Arq	19	<0,001				
800 vs, Cr	16	<0,001				
900 vs, ArqR	41	0,096	Arq	48,68	47,72	54,39
900 vs, Arq	36	0,013				
900 vs, Cr	31	0,001				
ArqR vs, Arq	109	0,71	Cr	45,96	44,89	38,41
ArqR vs, Cr	134	0,411				
Arq vs, Cr	173	0,551				

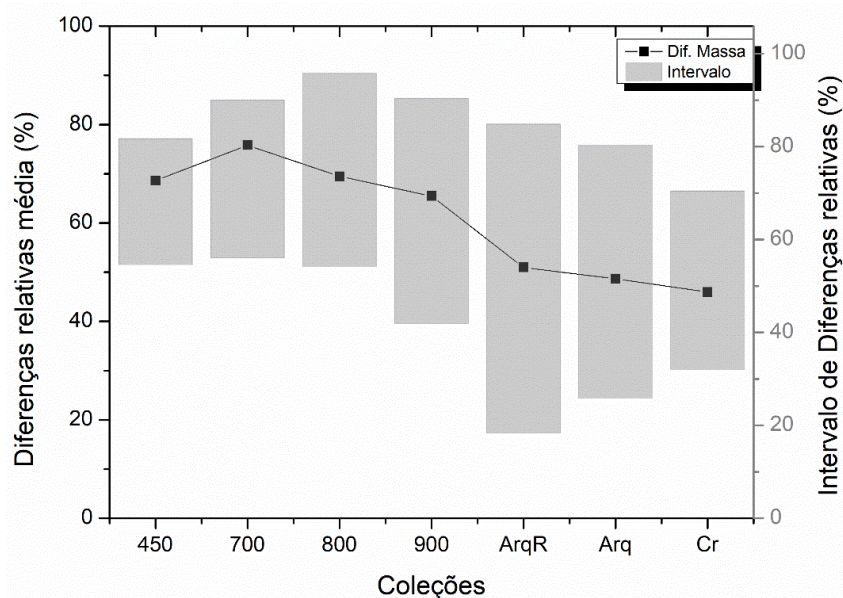


Figura 12. Representação gráfica das diferenças relativas médias de massa e intervalos de perdas em função das coleções

4. Discussão

Este estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento com ácido acético tem potencial para discriminar ossos humanos queimados recentes e arqueológicos através de índices espectroscópicos calculados a partir dos espectros de FTIR-ATR. Neste capítulo são discutidos os resultados, comparando-os com os estudos científicos já publicados.

No processo de otimização do tratamento com ácido acético descrito anteriormente (secção 3.2) notou-se que o tratamento é mais eficiente nas amostras sujeitas a ácido acético 0,1 M durante 4 h. Estes resultados concordam com o descrito por Yoder *et al.*⁴² e por Garvie-lok *et al.*,³⁸ pois ambos afirmam que um tratamento de 4 h é suficiente para remover os contaminantes exógenos. Além disso, soluções de ácido acético muito concentradas e tempos de tratamento muito longos podem provocar elevadas perdas de amostras e recristalização excessiva. Estes fatores adquirem elevada importância, neste estudo, porque a quantidade de amostra de ossos queimados humanos disponível era bastante reduzida.

Através da Figura 13 constatou-se que os ossos modernos CEI/XXI apresentaram valores médios muito semelhantes para os índices C/P, C/C e OH/P. Relativamente ao IC, as amostras a 800 °C revelaram valores diferentes quando comparadas quer com as restantes temperaturas de CEI/XXI, quer com os restantes grupos de amostras (ArqR, Arq e Cr). Observou-se que as amostras pós-tratamento do crematório (Cr) e as arqueológicas (Arq) apresentaram valores de C/C muito elevados e bastantes discrepantes relativamente aos das outras coleções (ArqR e CEI/XXI). Quanto ao índice BPI observou-se que os ossos modernos CEI/XXI têm valores semelhantes, diferindo um pouco das amostras arqueológicas e do crematório. No entanto esta diferença pode não ser suficiente para discriminar as coleções.

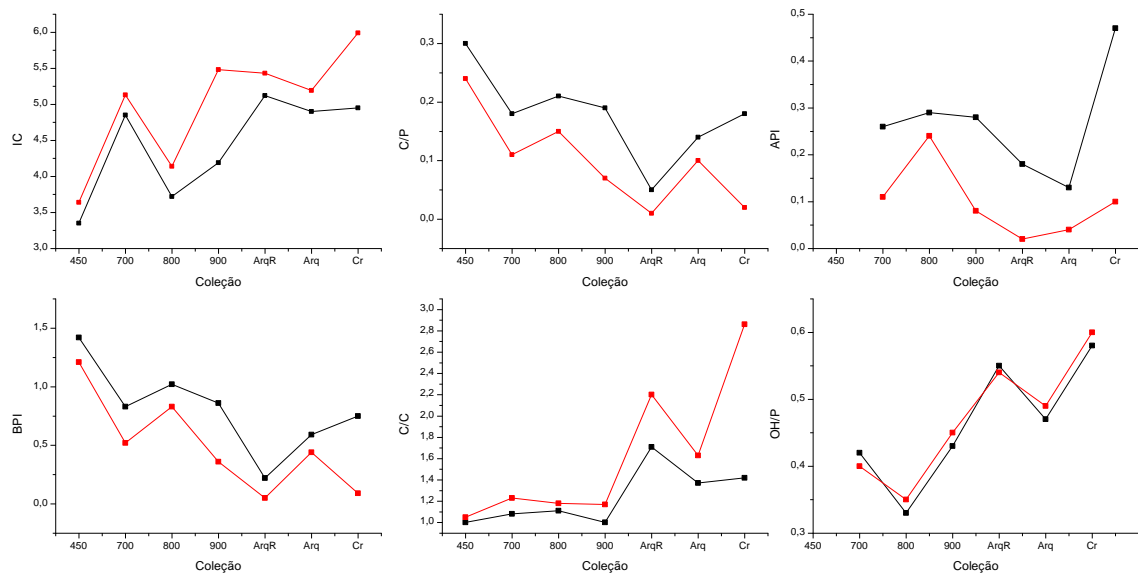


Figura 13. Evolução dos índices IC, C/P, API, BPI, C/C e OH/P para as 7 coleções (450 °C, 700 °C, 800 °C, 900 °C, ArqR, Arq e Cr) antes (segmento a preto) e após (segmento a vermelho) o tratamento com ácido acético 0,1M durante 4 h.

As amostras de osso humano queimado a 900 °C sofreram o maior incremento do IC (31,52%) após tratamento com ácido acético. Contudo o coeficiente de variação para este índice foi o mais baixo (44,47%), ou seja, a variação do IC foi mais uniforme para estas amostras (Figura14). Isto deve-se ao fato de os carbonatos terem sido praticamente todos removidos da estrutura óssea a esta temperatura elevada, pelo que o tratamento com ácido acético tem menos impacto.

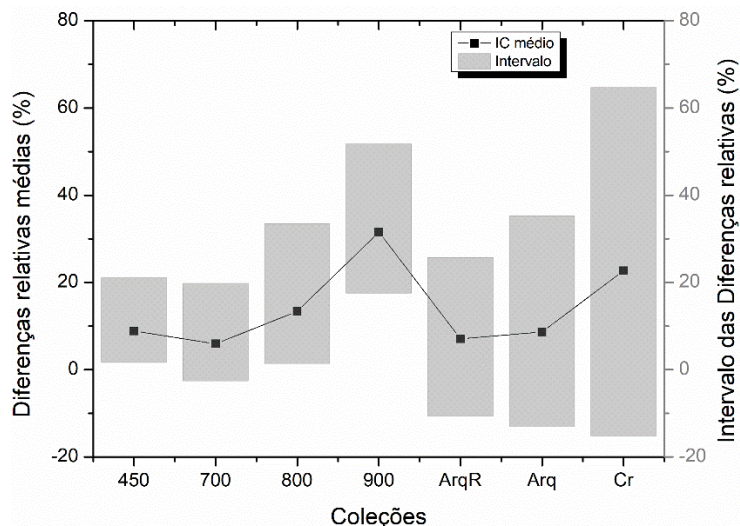


Figura 14. Representação gráfica das diferenças relativas médias do IC e intervalos de perdas em função das coleções.

As amostras queimadas a 700 °C apresentaram um coeficiente de variação muito elevado (CV=114,28%), o que significa que o tratamento com ácido acético não originou os mesmos efeitos em todas as amostras, provocando variações do IC muito discrepantes dentro deste conjunto (Figura 15). Num estudo anterior, Gonçalves *et al.*¹⁷ já tinham observado que os valores de IC em ossos longos eram mais variáveis nesta temperatura (CV=12%) do que em outras temperaturas (CV entre 4 e 9%) como é possível apurar a partir das tabelas publicadas. Estas discrepâncias podem ocorrer porque esta é uma temperatura de transição, onde as alterações na estrutura óssea podem já ter ocorrido ou estarem prestes a ocorrer.

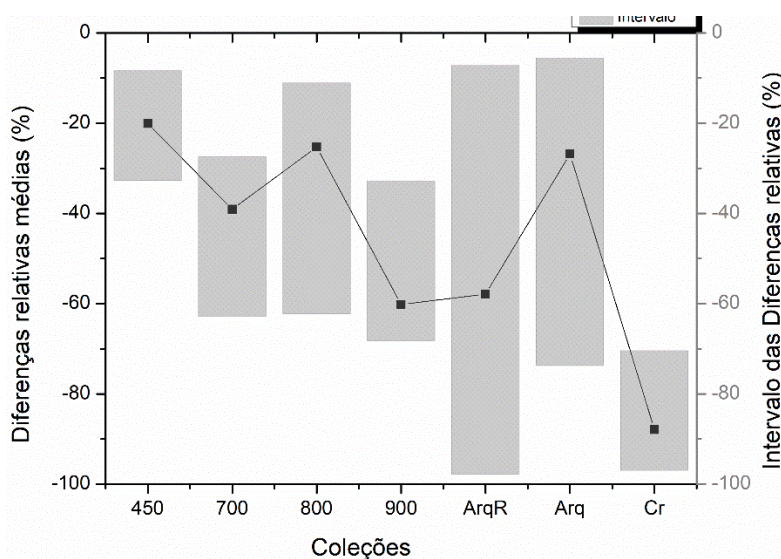
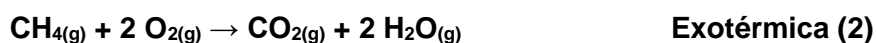


Figura 15. Representação gráfica das diferenças relativas médias de C/P e intervalos de perdas em função das coleções.

As condições de queima das amostras Arq e Cr são muito diferentes, apesar de em ambos os casos a queima ter tido lugar na presença de tecidos moles (queima de cadáveres). As amostras Arq são amostras arqueológicas queimadas, possivelmente, em piras de madeira ao ar livre e inumadas durante milhares de anos, enquanto que as amostras Cr são modernas e queimadas num sistema fechado (forno) em contacto com madeira e com o combustível utilizado para a cremação (metano). Além destas diferenças, também as diminuições do C/P e o incremento do IC foram muito diferentes nos dois conjuntos de amostras, sugerindo que as amostras Cr possuem um maior conteúdo de carbonatos do que as Arq.

O enriquecimento das amostras do crematório relativamente aos carbonatos pode ocorrer devido à combustão do metano (Equação 2), combustível utilizado para iniciar o processo de cremação. O metano em contacto com o oxigénio do ambiente do forno, entra em combustão, libertando CO₂, que pode ser adsorvido pela superfície do osso. Como a cremação foi realizada dentro de um sistema fechado e todo o sistema arrefeceu nesta atmosfera, as amostras Cr podem adquirir grande quantidade de carbonatos. Estes resultados estão de acordo com Snoeck *et al.*,⁹⁰ que também observaram que o combustível e madeira contribuem em muito para o teor de carbonatos destas amostras. No entanto, contradizem os resultados obtidos por McMillan *et al.*,³⁷ que afirmam que os ossos cremados são resilientes às contaminações e que o tratamento com ácido acético não remove os carbonatos dos ossos cremados.



No índice C/C apenas se obteve um potencial discriminatório entre as amostras arqueológicas e as amostras do crematório (Figura 16). Não foi possível distinguir as amostras recentes CEI/XXI das amostras arqueológicas, uma vez que estas últimas apresentaram um coeficiente de variação muito elevado, abarcando o intervalo de variações das amostras recentes.

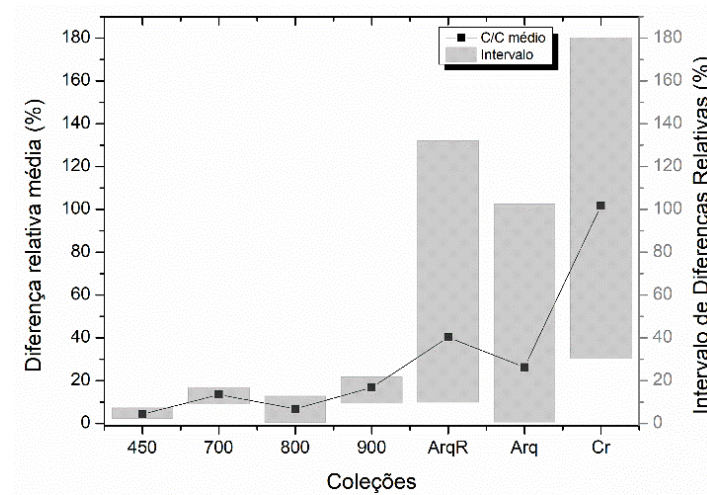
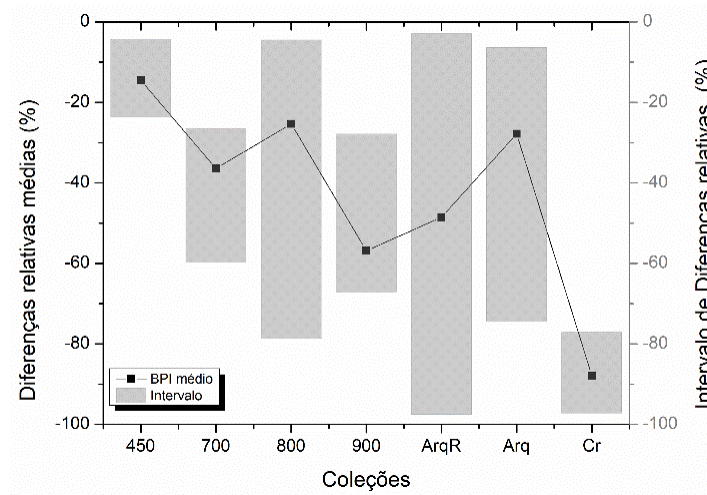
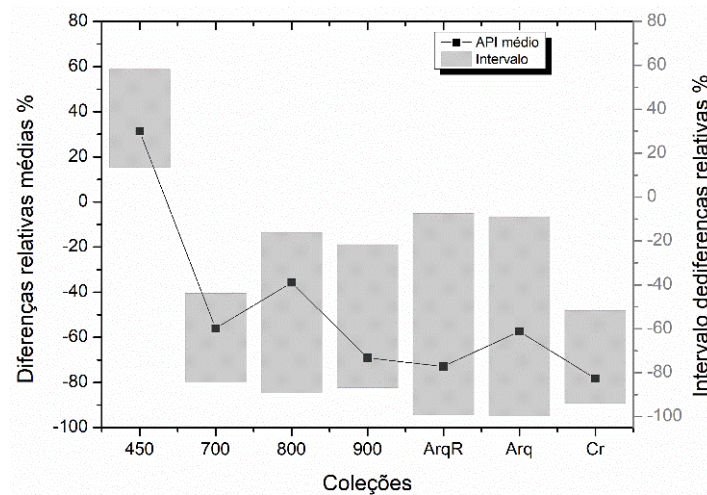


Figura 16. Representação gráfica das diferenças relativas médias do API e BPI e C/C e intervalos de perdas para os vários grupos de amostras analisadas.

Restos humanos queimados em crematório não estão frequentemente envolvidos em investigações forenses (uma rara exceção pode ser encontrada em Kennedy),⁹¹ por isso, teria sido importante adicionar a este estudo um grupo de amostras recentes queimadas em condições distintas, tanto das do crematório como das nossas queimas experimentais em forno elétrico. Tal teria servido eventualmente, para averiguar se o tratamento com ácido acético nestas amostras provocaria efeitos iguais àqueles observados nas amostras Arq e Cr. No caso de serem distintos, isso sugeriria algum potencial do C/C para uma discriminação entre ossos arqueológicos e ossos recentes, visto que casos envolvendo restos de crematório são raros.

Entre os conjuntos de amostras arqueológicas também foram encontradas grandes diferenças no C/P. Estas diferenças podem ocorrer porque as amostras arqueológicas mais antigas (Arq) sofreram mais diagénese do que as amostras arqueológicas recentes (ArqR). Na verdade, as amostras Arq foram queimadas e depois inumadas durante cerca de 3 mil anos, enquanto que as amostras ArqR foram queimadas depois de mais de 80 anos de inumação e analisadas logo a seguir. No entanto, as diferenças encontradas no C/P podem, teoricamente, também ocorrer porque as amostras ArqR correspondem a ossos queimados secos enquanto que as amostras Arq correspondem a ossos queimados com tecidos moles.

Por outro lado, verifica-se que o índice C/C aumenta para todos os conjuntos de amostras. Este índice representa a proporção de carbonatos A em relação aos carbonatos B e o seu aumento pode ser causado pela transferência de carbonatos de um local B para um local A ou pela diminuição da quantidade de carbonatos de tipo B. Perante os resultados obtidos, verifica-se que o incremento do índice C/C em todas as amostras, à exceção das queimadas a 450 °C, ocorre através da diminuição dos carbonatos B. Na verdade, observa-se uma diminuição dos índices API e BPI, sendo esta mais pronunciada nos carbonatos de tipo B, permitindo o aumento do índice C/C. No entanto, o incremento deste índice nas amostras queimadas a 450 °C ocorreu através da transferência dos carbonatos do local B para o local A, pois observa-se, simultaneamente, uma diminuição dos carbonatos de tipo B (BPI=-14,53 %) e um aumento da quantidade de carbonatos de tipo A (API=31, 35 %).

Verificou-se, ainda, que as amostras do crematório apresentaram um aumento médio do índice C/C superior a 100 %, muito pronunciado e bastante discrepante dos

outros conjuntos de amostras. Este incremento médio é provocado pelas elevadas perdas médias dos carbonatos de tipo A (API=-78,31 %) e de tipo B (BPI= -87,91 %).

Tal como mencionado anteriormente, este índice tem, possivelmente, potencial para discriminar amostras arqueológicas de amostras recentes não processadas em crematório, uma vez que estas últimas apresentaram aumentos do índice C/C inferiores a 30 %, enquanto as amostras arqueológicas apresentaram um incremento do C/C superior a 30 %. Esta hipótese deve ser testada no futuro.

Neste índice, é evidente a influência da queima controlada. Embora as amostras ArqR também tenham sido queimadas controladamente, os valores de C/C obtidos são muito diferentes das amostras recentes. Estas diferenças podem ser devidas à digénese que estas amostras sofreram durante mais de 80 anos de inumação em contraste com os 10 anos, em média, das amostras recentes.

As amostras do crematório (Cr) apresentaram aumentos de C/C superiores a 30 %, o que era espectável devido à contaminação do osso por carbonatos provenientes do gás utilizado na queima (como explicado anteriormente). No entanto, como estas fazem raramente parte de investigações forenses, é possível que o C/C tenha de fato algum potencial para discriminar restos recentes de restos antigos visto que, em condições normais, pode ser possível determinar se os ossos foram queimados em crematório. Mais uma vez, para confirmar esse potencial, teria sido importante incluir neste estudo um conjunto de amostras recentes queimadas em condições distintas das nossas queimas experimentais e das condições do crematório.

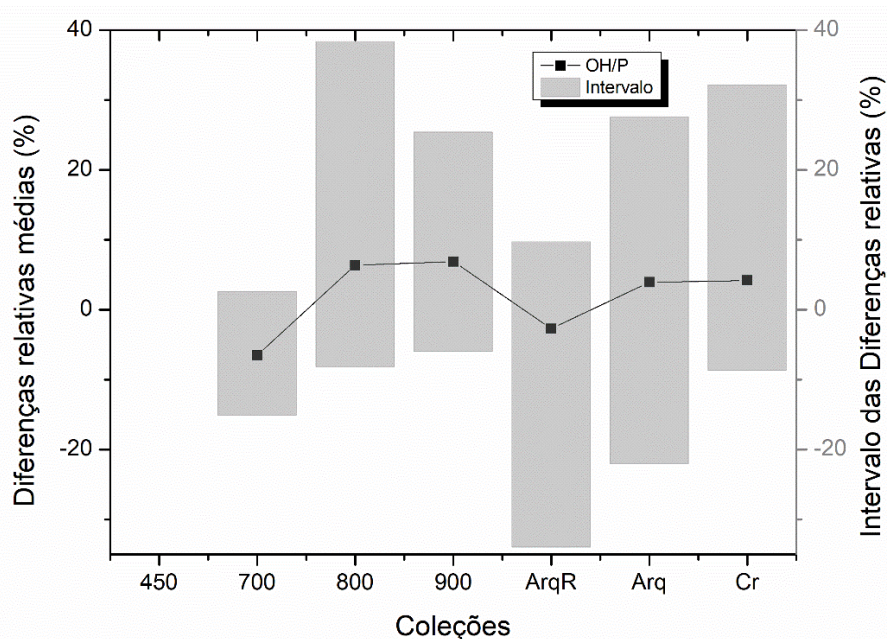


Figura 17. Representação gráfica das diferenças relativas médias de OH/P e intervalos de perdas em função das coleções. (Este índice não foi calculado para as amostras a 450 °C, porque, a esta temperatura, ainda existe matéria orgânica a desempenhar funções de blindagem térmica, impedindo que a componente inorgânica sofra efeitos do calor).

A presença do grupo Cr neste estudo foi de enorme importância, uma vez que permitiu validar o tratamento com ácido acético para amostras contendo elevadas quantidades de carbonatos. Por outro lado, verificou-se (como esperado) que este processo é específico para os carbonatos. No entanto, a remoção de carbonatos da matriz óssea, em meio aquoso, está associada à recristalização da biapatite durante a qual pode haver reentrada de aniões OH^- na sua estrutura, nos locais deixados pelos carbonatos removidos pelo ácido (Figura 17). Tal explica a alteração dos índices espectroscópicos associados aos carbonatos (C/P, C/C, API e BPI) assim como relacionados com os hidroxilos (OH/P). Porém, o efeito do ácido só se faz sentir nestes dois tipos de iões (CO_3^{2-} e OH^-) não afetando os fosfatos. Estes resultados não estão de acordo com Snoeck *et al.*,¹ que verificaram que o índice OH/P não sofria alterações com o tratamento com ácido acético.

Ao avaliar as perdas de massa verificou-se que estas variaram para cada conjunto de amostras considerado. O grupo CEI/XXI apresentou perdas de massa mais elevadas enquanto as amostras Cr apresentaram perdas de massa menores. Isto está em contradição com os resultados obtidos para os outros índices, nomeadamente API, BPI e C/P que diminuiram bastante após o tratamento com ácido, principalmente para

as amostras Cr. Infelizmente, constatou-se a posteriori que estas diferenças de massa estavam relacionadas com o procedimento experimental aplicado a cada conjunto de amostras: filtradas sob vácuo vs. centrifugadas. As amostras filtradas sob vácuo (CEI/XXI) apresentavam perdas de massa superiores às amostras centrifugadas (Arq, ArqR e Cr). Uma hipótese é que durante a filtração sob vácuo as partículas mais finas tenham atravessado ou ficado presas nas fibras do filtro, sendo contabilizadas como perdas, enquanto que, no caso da centrifugação tal não acontece, sendo toda a amostra devidamente quantificada. Como as quantidades de amostra utilizadas neste estudo foram muito pequena, as perdas de massa através da filtração sob vácuo, por muito mínimas que sejam, tem um impacto muito grande nas diferenças relativas antes e após o tratamento enviesando os nossos resultados. Conclui-se assim que, em estudos com ossos queimado em pó, deve ser utilizada a centrifugação em vez da filtração sob vácuo, como método de tratamento da amostra para que não ocorra perdas de massa indevidas.

5. Conclusão

O desenvolvimento de novos métodos para discriminar ossos recentes de ossos arqueológicos é absolutamente essencial em contextos forense, para que uma investigação criminal não seja iniciada sem que seja necessário. Os componentes orgânicos e inorgânicos do osso fornecem um espectro de FTIR-ATR característico, sendo esta uma técnica analítica extremamente adequada para fornecer informações rigorosas sobre a composição do osso.

O tratamento das amostras de ossos humanos queimados com ácido acético surgiu em 2014 como uma hipótese promissora, proposta por Snoeck *et al.*¹ para a distinção entre ossos recentes e ossos arqueológicos. Neste estudo, encontraram-se efeitos causados pelo ácido acético que foram propostos como sendo possivelmente específicos dos dois casos. No presente estudo, este método foi avaliado em restos humanos esqueletizados – recentes e arqueológicos – de várias proveniências, utilizando o tratamento com ácido acético (em condições otimizadas) e análise por espectroscopia de FTIR-ATR. Foram assim analisados 4 conjuntos distintos de ossos humanos queimados, sendo pois mais vasto e representativo do que o previamente levado a cabo por Snoeck *et al.*,^c em apenas dois grupos de amostras (amostras modernas de osso animal e arqueológicas humanas).

Verificou-se que o tratamento com ácido acético é um método eficaz e seletivo para remover os carbonatos exógenos das amostras ósseas. No entanto, conclui-se que as alterações provocadas pelo tratamento com ácido acético não são suficientes para distinguir amostras recentes de amostras arqueológicas, já que as diferenças encontradas entre as coleções não possuem significância estatística e não geram intervalos de variação específicos para cada conjunto de ossos. Deste modo, o presente estudo não corrobora as conclusões reportadas por Snoeck *et al.*¹ No entanto, é possível que o índice C/C apresente de facto algum potencial para discriminar restos recentes de restos antigos, especificamente no que se refere a ossos cremados *versus* ossos arqueológicos. De facto, embora não tenha sido possível distinguir amostras modernas não cremadas de amostras arqueológicas, o tratamento com ácido acético mostrou-se promissor para discriminar amostras queimadas com tecidos moles de diferentes proveniências (modernas vs. antigas).

Contudo, para confirmar este potencial será importante incluir em futuros estudos um conjunto de amostras recentes queimadas em condições distintas das amostras queimadas experimentalmente e em crematório. Visto que as amostras cremadas não são encontradas normalmente em contextos forenses, o seu efeito “baralhador” não é uma variável que tenha de ser tida em consideração, em condições normais.

6. Referências

1. Snoeck, C., Lee-Thorp, J. A. & Schulting, R. J. *From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **416**, 55–68 (2014).
2. Mamede, A.P. *Burned Bones: A comparison of methodological approaches to assess heat-induced alterations.* (Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, 2017).
3. Mamede, A. P., Gonçalves, D., Marques, M. P. M. & Luís, A. E. *Burned bones tell their own stories : A review of methodological approaches to assess heat- induced diagenesis. Appl. Spectrosc. Rev.* **53**, 603-635 (2018).
4. Cattaneo, C. *Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. Forensic Sci. Int.* **165**, 185–193 (2007).
5. Marques, M. P. M. *et al. Heat-induced Bone Diagenesis Probed by Vibrational Spectroscopy. Sci. Rep. 8, Article 15935* (2018) doi:10.1038/s41598-018-34376-w.
6. Ubelaker, D. H. *The forensic evaluation of burned skeletal remains: A synthesis. Forensic Sci. Int.* **183**, 1–5 (2009).
7. Festa, G. *et al. First analysis of ancient burned human skeletal remains probed by neutron and optical vibrational spectroscopy. Sci. Advance* **5**, (6) eaaw1292 (2019).
8. Gonçalves, D. *et al. Chemosteometric regression models of heat exposed human bones to determine their pre-burnt metric dimensions. Am. J. Phys. Anthropol.* **173**, 734-747 (2020) doi:10.1002/ajpa.24104.
9. Pedrosa, M., Curate, F., Batista de Carvalho, L. A. E., Marques, M. P. M. & Ferreira, M. T. *Beyond metrics and morphology: the potential of FTIR-ATR and chemometrics to estimate age-at-death in human bone. Int. J. Legal Med.* **134**, 1905–1914 (2020).
10. Vassalo, A. R., Cunha, E., de Carvalho, L. A. E. B. & Gonçalves, D. *Rather yield than break: assessing the influence of human bone collagen content on heat-induced warping through vibrational spectroscopy. Int. J. Legal Med.* **130**, 1647–1656 (2016).
11. Blau, S. & Briggs, C. A. *The role of forensic anthropology in Disaster Victim Identification (DVI). Forensic Sci. Int.* **205**, 29–35 (2011).

12. Íscan, MY. *Global forensic anthropology in the 21st century*. *Forensic Sci. Int.* **117**, 1–6 (2001).
13. Ubelaker, D. H. *Introduction to forensic anthropology*. *Forensic Anthropology and Medicine: Complementary Sciences From Recovery to Cause of Death* (Humana Press Inc., 2006). doi:10.1007/978-1-59745-099-7_1.
14. Beasley, M. M., Bartelink, E. J., Taylor, L. & Miller, R. M. *Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: Implications for assessment of bone bioapatite diagenesis*. *J. Archaeol. Sci.* **46**, 16–22 (2014).
15. Mamede, A. P. et al. *Potential of Bioapatite Hydroxyls for Research on Archeological Burned Bone*. *Anal. Chem.* **90**, 11556–11563 (2018).
16. Mamede, A. P. et al. *Biomaterials from human bone-probing organic fraction removal by chemical and enzymatic methods*. *RSC Adv.* **8**, 27260–27267 (2018).
17. Gonçalves, D. et al. *Crystal clear: Vibrational spectroscopy reveals intrabone, intraskeleton, and interskeleton variation in human bones*. *Am. J. Phys. Anthropol.* **166**, 296–312 (2018).
18. Mamede, A. P. et al. *Human bone probed by neutron diffraction: The burning process*. *RSC Adv.* **9**, 36640–36648 (2019).
19. Festa, G. et al. *Old burned bones tell us about past cultures*. *SpectroscopyEurope* **31**, 2–5 (2019).
20. Thompson, T. J. U. *Recent advances in the study of burned bone and their implications for forensic anthropology*. *Forensic Sci. Int.* **146**, 203–205 (2004).
21. Wright, L. E. & Schwarcz, H. P. *Infrared and isotopic evidence for diagenesis of bone apatite at Dos Pilas, Guatemala: Palaeodietary implications*. *J. Archaeol. Sci.* **23**, 933–944 (1996).
22. Lee-Thorp, J. A. & van der Merwe, N. J. *Aspects of the chemistry of modern and fossil biological apatites*. *J. Archaeol. Sci.* **18**, 343–354 (1991).
23. Strydonck, M., Boudin, M. & de Mulder, G. *¹⁴C Dating of cremated bones: the issue of sample contamination*. *Radiocarbon* **51**, 553–568 (2009).

24. Mignolet, A., Derenne, A., Smolina, M., Wood, B. R. & Goormaghtigh, E. *FTIR spectral signature of anticancer drugs. Can drug mode of action be identified? Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 85–101 (2016).
 25. Baker, M. J. *et al. Clinical applications of infrared and Raman spectroscopy: State of play and future challenges. Analyst* **143**, 1735–1757 (2018).
 26. Martin, D. *et al. Shedding light into the health-beneficial properties of Corema album—A vibrational spectroscopy study. J. Raman Spectrosc.* **51**, 313–322 (2020).
 27. Batista De Carvalho, A. L. M. *et al. Chemotherapeutic response to cisplatin-like drugs in human breast cancer cells probed by vibrational microspectroscopy. Faraday Discuss.* **187**, 273–298 (2016).
 28. Marques, M. P. M. *et al. Osteometrics in burned human skeletal remains by neutron and optical vibrational spectroscopy. R. Soc. Chem.* **6**, 68638–68641 (2016).
 29. Naia, M. J. T. *Determinação do Intervalo Postmortem através do decréscimo de citrato e DNA em ossos: Influência das condições tropicais.* (Tese de Mestrado, Universidade do Porto, 2014).
 30. Buekenhout, I. *Quando só restam ossos: Estudo da degradação e alteração óssea para estimativa do intervalo post-mortem,* Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, 2014.
 31. Ferreira, M. T. S. *Para lá da morte: Estudo tafonómico da decomposição cadavérica e da degradação óssea e implicações na estimativa do intervalo pós-morte,* Tese de doutoramento em Antropologia Forense, Universidade de Coimbra, 2012.
 32. Zazzo, A., Saliège, J. F., Person, A. & Boucher, H. *Radiocarbon dating of calcined bones: Where does the carbon come from? Radiocarbon* **51**, 601–611 (2009).
 33. Lanting, J. N. & Brindley, A. L. *Dating Cremated Bone: The Dawn of a New Era. Source J. Irish Archaeol.* **9**, 1–7 (1998).
 34. Lanting, J. N., Aerts-Bijma, A. T. & Van Der Plicht, J. *Dating of cremated bones. Radiocarbon* **43**, 249–254 (2001).
 35. Olsen, J. *et al. Characterisation and blind testing of radiocarbon dating of cremated bone. J. Archaeol. Sci.* **35**, 791–800 (2008).
-

36. Nielsen-Marsh, C. M. & Hedges, R. E. M. *Patterns of diagenesis in bone I: The effects of site environments. J. Archaeol. Sci.* **27**, 1139–1150 (2000).
 37. McMillan, R., Snoeck, C., de Winter, N. J., Claeys, P. & Weis, D. *Evaluating the impact of acetic acid chemical pre-treatment on 'old' and cremated bone with the 'Perio-spot' technique and 'Perios-endos' profiles. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **530**, 330–344 (2019).
 38. Garvie-Lok, S. J., Varney, T. L. & Katzenberg, M. A. *Preparation of bone carbonate for stable isotope analysis: The effects of treatment time and acid concentration. J. Archaeol. Sci.* **31**, 763–776 (2004).
 39. Snoeck, C., Staff, R. A. & Brock, F. *A reassessment of the routine pretreatment protocol for radiocarbon dating cremated bones. Radiocarbon* **58**, 1–8 (2016).
 40. Krueger, H. W. & Sullivan, C. H. *Models for Carbon Isotope Fractionation Between Diet and Bone. Am. Chem. Soc.* 205–220 (1984) doi:10.1021/bk-1984-0258.ch014.
 41. Price, T. D., Blitz, J., Burton, J. & Ezzo, J. A. *Diagenesis in prehistoric bone: Problems and solutions. J. Archaeol. Sci.* **19**, 513–529 (1992).
 42. Yoder, C. J. & Bartelink, E. J. *Effects of different sample preparation methods on stable carbon and oxygen isotope values of bone apatite: A comparison of two treatment protocols. Archaeometry* **52**, 115–130 (2010).
 43. Trueman, C. N. G., Behrensmeyer, A. K., Tuross, N. & Weiner, S. *Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: Diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. J. Archaeol. Sci.* **31**, 721–739 (2004).
 44. Koch, P. L., Tuross, N. & Fogel, M. L. *The effects of sample treatment and diagenesis on the isotopic integrity of carbonate in biogenic hydroxylapatite. J. Archaeol. Sci.* **24**, 417–429 (1997).
 45. Lee-Thorp, J. A. *Stable carbon isotopes in Deep Time: The diets of fossil fauna and hominids. Department of Archaeology vol. PhD thesis (University of Cape Town, 1989).*
 46. Nielsen-Marsh, Christina M. Hedges, E. M. *Dissolution experiments on modern and diagenetically altered bone and the effect on the infrared splitting factor. Bull. la société Géologique Fr.* **168 (4)**, 485–490 (1997).
-

47. Krueger, H. W. *Exchange of carbon with biological apatite. J. Archaeol. Sci.* **18**, 355–361 (1991).
48. Sponheimer, M. & Lee-Thorp, J. A. *Alteration of enamel carbonate environments during fossilization. J. Archaeol. Sci.* **26**, 143–150 (1999).
49. Balasse, M., Ambrose, S. H., Smith, A. B. & Price, T. D. *The seasonal mobility model for prehistoric herders in the south-western Cape of South Africa assessed by isotopic analysis of sheep tooth enamel. J. Archaeol. Sci.* **29**, 917–932 (2002).
50. Bone, P. *Preservation of Biogenic Carbon Isotopic Signals in Plio-pleistocene Bone and tooth mineral. in Biogeochemical Approaches to Paleodietary Analysis* (ed. Ambrose and Katzenberg) 89–90 (2000).
51. Lima, C. *Caracterização Bioquímica de lesões neoplásicas via espectroscopia de Absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier. Biomass Chem Eng* vol. 49, Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2015.
52. Stipe, B. C., Rezaei, M. A. & Ho, W. *Single-molecule vibrational spectroscopy and microscopy. Science (80-).* **280**, 1732–1735 (1998).
53. Gore, R. C. *Infrared Spectroscopy. Analytical Chemistry* vol. 28 577–578 (1956).
54. Leitão, T. M. D. *Aplicações da espectroscopia de infravermelho próximo em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa* (Teste de Mestrado, Universidade Fernando Pessoa, 2012).
55. Monteiro, G. *Análise de Revestimentos Orgânicos por Espectroscopia de Infravermelho*, Tese de Mestrado, Universidade técnica de Lisboa, 2007.
56. Anthony T. Tu. *Raman spectroscopy in Biology: Principles and applications.* in (ed. Wiley, J. e S.) 456–460 (copyright, 1982).
57. McNesby, K. L. & Pesce-Rodriguez, R. A. *Applications of Vibrational Spectroscopy in the Study of Explosives. Handb. Vib. Spectrosc.* (2006) doi:10.1002/0470027320.s7208.
58. Guedes, D. dos S. *How old are you? An Attempt of estimating age at death through FTIR-ATR analysis of human bones and teeth.* (Tese de Mestrado em Química Forense, Universidade de Coimbra, 2019).

59. Thompson, T. J. U., Islam, M., Piduru, K. & Marcel, A. *An investigation into the internal and external variables acting on crystallinity index using Fourier Transform Infrared Spectroscopy on unaltered and burned bone. Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **299**, 168–174 (2011).
 60. Clarke, B. *Normal bone anatomy and physiology. Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **3 Suppl 3**, 131–139 (2008).
 61. Ellingham, S. T. D., Thompson, T. J. U. & Islam, M. *The Effect of Soft Tissue on Temperature Estimation from Burnt Bone Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. J. Forensic Sci.* **61**, 153–159 (2016).
 62. Wopenka, B. & Pasteris, J. D. *A mineralogical perspective on the apatite in bone. Mater. Sci. Eng. C* **25**, 131–143 (2005).
 63. Madupalli, H., Pavan, B. & Tecklenburg, M. M. J. *Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite. J. Solid State Chem.* **255**, 27–35 (2017).
 64. Rey, C., Collins, B., Goehl, T., Dickson, I. R. & Glimcher, M. J. *The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study. Calcif. Tissue Int.* **45**, 157–164 (1989).
 65. Gonçalves, D., Cunha, E. & Thompson, T. J. U. *Estimation of the pre-burning condition of human remains in forensic contexts. Int. J. Legal Med.* **129**, 1137–1143 (2015).
 66. Person, A. *et al. Early Diagenetic Evolution of Bone Phosphate: An X-ray Diffractometry Analysis. J. Archaeol. Sci.* **22**, 211–221 (1995).
 67. Weiner, S. & Bar-Yosef, O. *States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey. J. Archaeol. Sci.* **17**, 187–196 (1990).
 68. Baptista, A. M. da C. *Estimativa do Intervalo Post-mortem a partir da Composição Química Óssea Analisada por FTIR-ATR*, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, 2020).
 69. Roschger, A. *et al. Relationship between the v_2PO_4 /amide III ratio assessed by Raman spectroscopy and the calcium content measured by quantitative backscattered electron microscopy in healthy human osteonal bone. J. Biomed. Opt.* **19**, 065002 (2014).
-

70. Thompson, T. J. U., Gauthier, M. & Islam, M. *The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone. J. Archaeol. Sci.* **36**, 910–914 (2009).
 71. Trueman, C. N., Privat, K. & Field, J. *Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral? Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **266**, 160–167 (2008).
 72. Keough, N., L'Abbé, E. N., Steyn, M. & Pretorius, S. *Assessment of skeletal changes after post-mortem exposure to fire as an indicator of decomposition stage. Forensic Sci. Int.* **246**, 17–24 (2015).
 73. Thompson, T. J. U., Islam, M. & Bonniere, M. *A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra. J. Archaeol. Sci.* **40**, 416–422 (2013).
 74. Hudson, B. S. *Inelastic Neutron Scattering: A Tool in Molecular Vibrational Spectroscopy and a Test of ab Initio Methods. J. Phys. Chem. A* **105**, 3949–3960 (2001).
 75. Farlay, D., Panczer, G., Rey, C., Delmas, P. D. & Boivin, G. *Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. J. Bone Miner. Metab.* **28**, 433–445 (2010).
 76. Lebon, M. *et al. Imaging fossil bone alterations at the microscale by SR-FTIR microspectroscopy. J. Anal. At. Spectrom.* **26**, 922–929 (2011).
 77. Hudson, B. S. *Vibrational spectroscopy using inelastic neutron scattering: Overview and outlook. Vib. Spectrosc.* **42**, 25–32 (2006).
 78. Leventouri, T. *et al. Crystal Structure Studies of Human Dental Apatite as a Function of Age. Int. J. Biomater.* **2009**, Article 698547, 1–6 (2009).
 79. Costa, C. *Caracterização de alguns parâmetros de qualidade da polpa de fruta por FTIR-ATR*, Tese de doutoramento, Universidade da Beira Interior, 2016.
 80. Deróide, H. M. dos S. *Estudo da espectroscopia no infravermelho via transformada de Fourier e dos métodos de transmitância e refletância*, Universidade Estadual de Maringá (Brasil), 2016.
 81. Stuart, B. *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications. Journal of Chemical*
-

Information and Modeling vol. 110 (Wiley, 2017).

82. Mohamed, M. A., Jaafar, J., Ismail, A. F., Othman, M. H. D. & Rahman, M. A. *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Membrane Characterization* (Elsevier B.V., 2017). doi:10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2.
83. Smith, B. C. *Fundamentals of Fourier Transform infrared spectroscopy. Sereal Untuk* vol. 51 (2011).
84. Surovell, T. A. & Stiner, M. C. *Standardizing infra-red measures of bone mineral crystallinity: An experimental approach. J. Archaeol. Sci.* **28**, 633–642 (2001).
85. Medeiros, A. R. B. *De. Uso de ATR / FTIR e FTNIR associado a técnicas quimiométricas para quantificação de aditivos em gasolina automotiva*, Mestrado em Química, Universidade de Brasília, 2009.
86. Ferrão, M. F. *Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. Tecno-Lógica* **5**, 65–85 (2001).
87. Ferreira, M. T. *et al. New data about the 21st Century Identified Skeletal Collection (University of Coimbra, Portugal). Int. J. Legal Med.* **135**, 1087–1094 (2021).
88. Ferreira, M. T. *et al. A new forensic collection housed at the University of Coimbra, Portugal: The 21st century identified skeletal collection. Forensic Sci. Int.* **245**, 202.e1-202.e5 (2014).
89. Agerskov Rose, H. *et al. Radiocarbon Dating Cremated Bone: A Case Study Comparing Laboratory Methods. Radiocarbon* **61**, 1581–1591 (2019).
90. Snoeck, C., Brock, F. & Schulting, R. J. *Carbon Exchanges between Bone Apatite and Fuels during Cremation: Impact on Radiocarbon Dates. Radiocarbon* **56**, 591–602 (2014).
91. Kennedy, K. *The wrong urn: Commingling of cremains in Mortuary Practices. J. Forensic Sci.* **41**, 689–692 (1996).

7. Anexos

Tabela I. Tabela com Índices espectroscópicos, médias, desvios padrão e coeficiente de variação das amostras do esqueleto 188 da CEI/XXI queimado experimentalmente a 450 °C, pré e pós-tratamento com ácido acético.

Amostra	Pré-Tratamento					Pós-Tratamento				
	CI	C/P	API	BPI	C/C	CI	C/P	API	BPI	C/C
CEI/XXI-Fd1	-	0,31	0,18	1,35	0,99	3,67	0,21	0,22	1,06	1,07
CEI/XXI-Fp1	3,50	0,27	0,21	1,32	1,01	3,65	0,37	0,33	-	1,05
CEI/XXI-Rd1	3,30	0,30	0,20	1,50	1,00	3,48	0,24	0,25	1,20	1,05
CEI/XXI-Rp1	3,17	0,29	0,15	1,31	0,99	3,83	0,21	0,22	1,12	1,03
CEI/XXI-TIBd1	3,24	0,31	0,22	1,41	0,99	3,48	0,24	0,26	1,21	1,03
CEI/XXI-TIBp1	3,46	0,29	0,22	1,43	1,02	3,66	0,23	0,27	1,18	1,06
CEI/XXI-ULd1	3,23	0,30	0,22	1,39	1,01	3,76	0,25	0,33	1,32	1,05
CEI/XXI-ULp1	3,40	0,28	0,22	1,37	1,03	3,72	0,25	0,29	1,31	1,06
CEI/XXI-Ud1	3,45	0,31	0,23	1,57	1,00	3,51	0,24	0,27	1,20	1,05
CEI/XXI-Up1	3,37	0,29	0,19	1,41	0,99	3,66	0,24	0,23	1,28	1,02
Média	3,35	0,30	0,20	1,42	1,00	3,64	0,24	0,27	1,23	1,05
Desvio Padrão	0,12	0,01	0,02	0,08	0,01	0,12	0,02	0,04	0,11	0,02
Coeficiente de Variação	3,53%	4,52%	9,83%	5,74%	1,40%	3,27%	8,23%	15,24%	8,94%	1,44%

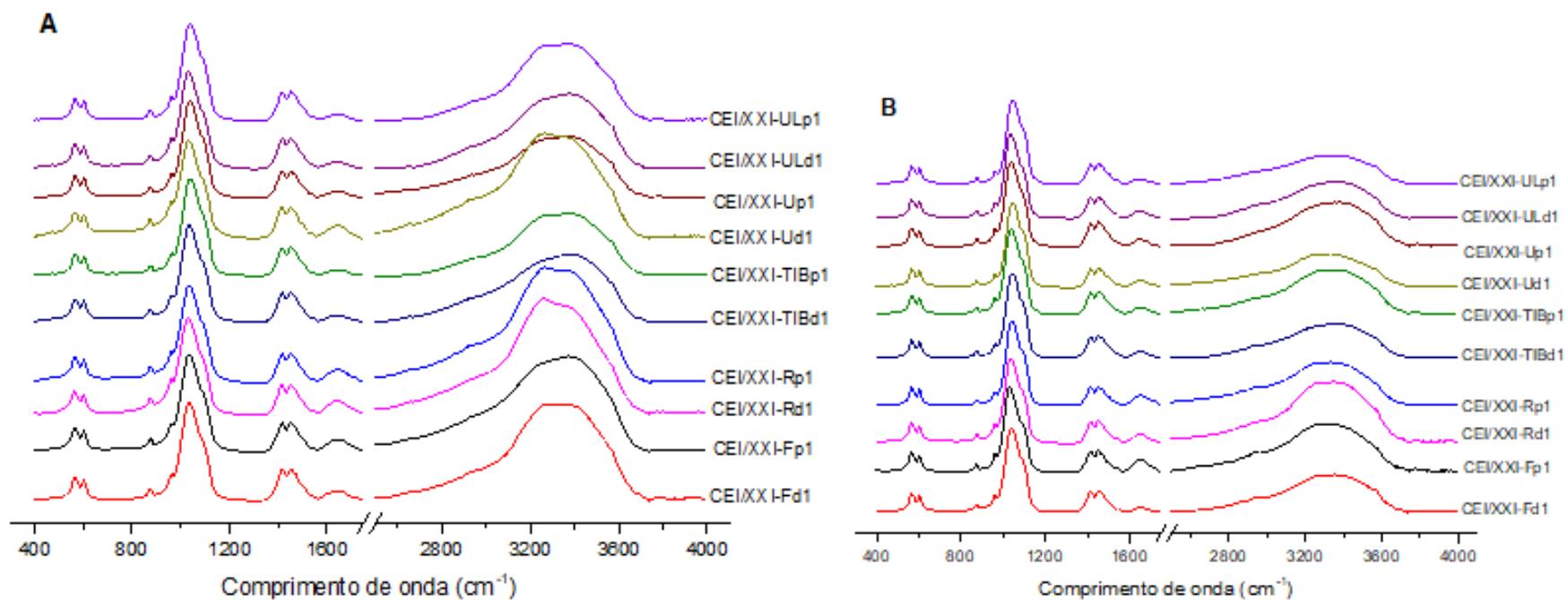


Figura I. Espectros das amostras da CEI/XXI a 450°C pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) com ácido acético 0,1M durante 4h.

Tabela II. Tabela com Índices espectroscópicos, médias, desvios padrão e coeficiente de variação das amostras do esqueleto 116 da CEI/XXI queimado experimentalmente a 700 °C, antes e pós-tratamento com ácido acético.

Amostra	Pré-Tratamento						Pós-Tratamento					
	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P
CEI/XXI-Fd2	4,83	0,22	0,43	0,95	1,14	0,77	5,37	0,08	0,07	0,38	1,26	0,60
CEI/XXI-Fp2	4,90	0,13	0,20	0,63	1,13	0,65	5,24	0,09	0,09	0,43	1,27	0,58
CEI/XXI-Rp2	5,05	0,18	0,26	0,83	1,07	0,70	4,92	0,12	0,11	0,55	1,22	0,65
CEI/XXI-TIBd2	4,85	0,18	0,23	0,79	1,07	0,68	5,25	0,09	0,08	0,44	1,24	0,54
CEI/XXI-TIBp2	4,72	0,18	0,24	0,88	1,09	0,63	4,96	0,11	0,12	0,56	1,26	0,58
CEI/XXI-ULd2	4,93	0,17	0,24	0,83	1,07	0,47	5,01	0,12	0,12	0,61	1,16	0,61
CEI/XXI-ULp2	4,39	0,20	0,26	0,90	1,03	0,48	5,26	0,12	0,15	0,61	1,16	0,46
CEI/XXI-Ud2	4,98	0,17	0,25	0,79	1,07	0,47	5,22	0,10	0,12	0,52	1,25	0,57
CEI/XXI-Up2	5,01	0,17	0,27	0,85	1,06	0,48	4,93	0,12	0,13	0,60	1,21	0,57
Média	4,85	0,18	0,26	0,83	1,08	0,59	5,13	0,11	0,11	0,52	1,23	0,57
Desvio Padrão	0,20	0,02	0,07	0,09	0,03	0,12	0,17	0,02	0,03	0,09	0,04	0,05
Coeficiente de Variação	4,12%	13,50%	26,63%	10,91%	3,21%	19,91%	3,32%	15,04%	23,76%	16,49%	3,32%	9,16%

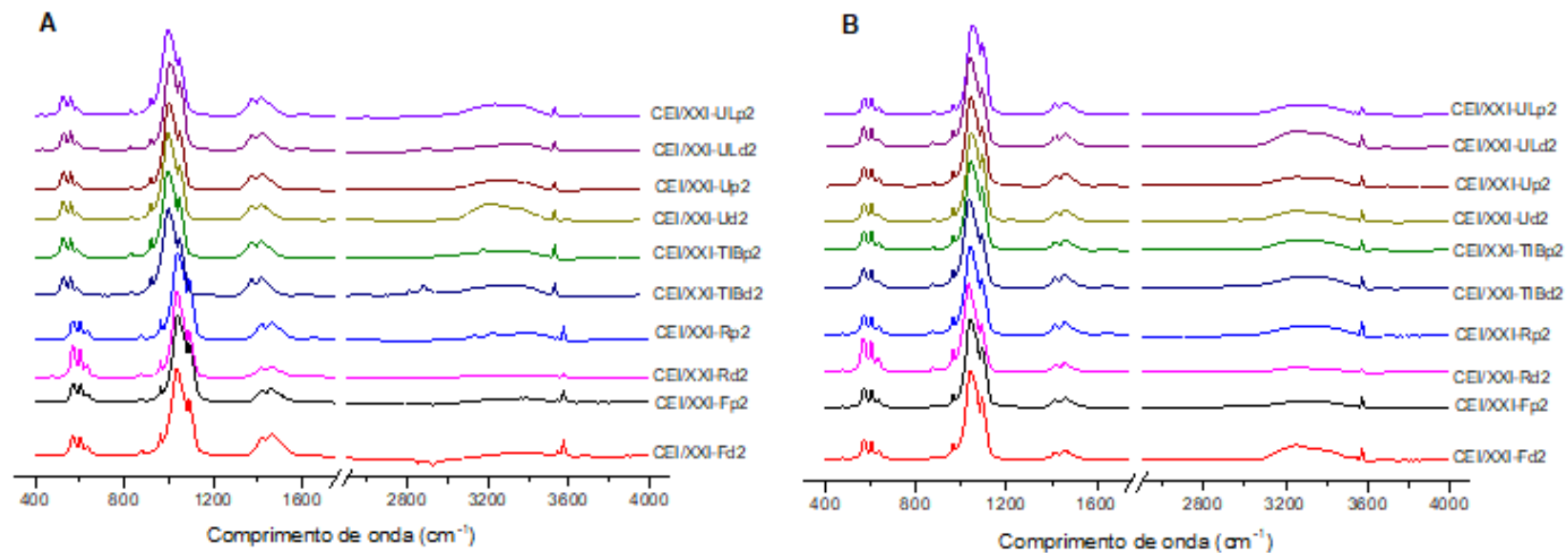


Figura II. Espectros das amostras da CEI/XXI a 700 °C pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) com ácido acético 0,1M

Tabela III. Tabela com Índices espectroscópicos, médias, desvios padrão e coeficiente de variação das amostras do esqueleto 100 queimado a 800 °C pré e pós-tratamento com ácido acético.

Amostra	Pré-Tratamento						Pós-Tratamento					
	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P
CEI/XXI-Fd3	3,67	0,19	0,25	0,96	1,15	0,29	4,23	0,16	0,25	0,84	1,19	0,36
CEI/XXI-Fp3	3,64	0,21	0,28	1,02	1,10	0,31	4,03	0,17	0,28	0,85	-	0,31
CEI/XXI-Rd3	3,84	0,23	0,33	1,16	1,06	0,31	4,23	0,15	0,22	0,79	1,17	0,34
CEI/XXI-Rp3	3,94	0,17	0,26	0,90	1,16	0,45	4,15	0,15	0,22	0,80	1,16	0,35
CEI/XXI-TIBd3	3,57	0,21	0,29	0,99	1,08	0,36	4,16	0,17	0,24	0,85	1,15	0,35
CEI/XXI-TIBp3	3,74	0,24	0,35	1,22	1,05	0,36	4,26	0,15	0,22	0,81	1,19	0,32
CEI/XXI-ULd3	3,87	0,23	0,35	1,20	1,07	0,32	3,92	0,18	0,27	0,90	1,15	0,35
CEI/XXI-ULp3	3,57	0,19	0,25	0,89	1,14	0,32	-	0,16	0,26	0,85	1,17	0,34
CEI/XXI-Ud3	3,50	0,17	0,19	0,79	1,18	0,36	3,31	0,15	0,38	1,34	1,18	0,62
CEI/XXI-Up3	3,74	0,21	0,31	1,07	1,10	0,39	4,99	0,08	0,03	0,23	1,24	-
Média	3,72	0,21	0,29	1,02	1,11	0,34	4,14	0,15	0,24	0,83	1,18	0,39
Desvio Padrão	0,14	0,02	0,05	0,14	0,05	0,05	0,43	0,03	0,09	0,26	0,03	0,07
Coeficiente de Variação	4,27 %	9,71%	17,82%	13,88%	4,50%	14,12%	7,59%	17,55%	36,38%	31,46%	2,18%	18,54%

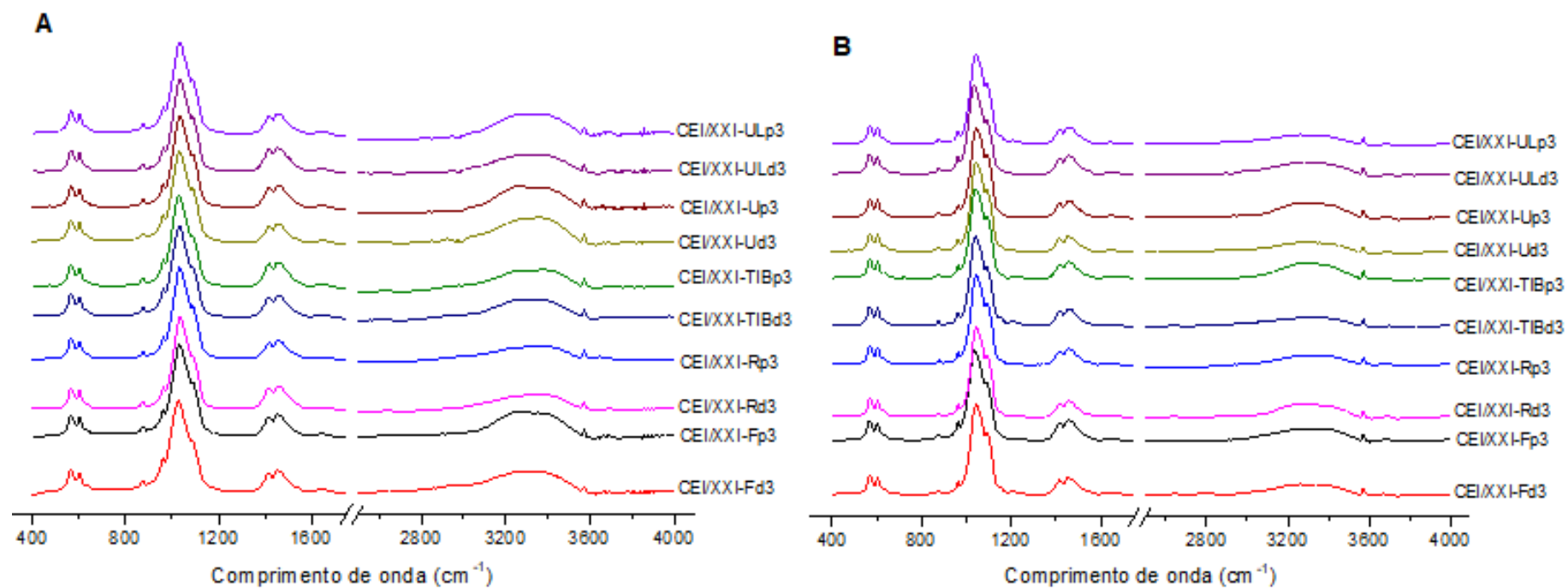


Figura III. Espectros das amostras da CEI/XXI à temperatura de 800 °C pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) com ácido acético

Tabela IV. Tabela com Índices espectroscópicos, médias, desvios padrão e coeficiente de variação das amostras do esqueleto 91 queimado experimentalmente a 900 °C, pré e pós tratamento com ácido acético.

Amostra	Pré-Tratamento						Pós-Tratamento					
	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P
CEI/XXI-Fd4	4,47	-	0,13	-	1,04	0,54	5,26	0,09	0,10	0,42	1,14	0,46
CEI/XXI-Fp4	3,84	0,22	0,37	1,12	0,98	0,49	5,68	0,07	0,08	0,37	1,18	0,44
CEI/XXI-Rd4	3,85	0,19	0,28	0,84	0,99	0,64	5,61	0,06	0,04	0,29	1,21	0,45
CEI/XXI-Rp4	3,86	0,19	0,28	0,84	1,00	0,49	5,86	0,07	0,07	0,33	1,21	0,46
CEI/XXI-TIBd4	4,83	0,19	0,30	0,82	1,01	0,64	5,69	0,07	0,07	0,34	1,20	0,44
CEI/XXI-TIBp4	3,73	0,20	0,29	0,85	0,97	0,67	5,00	0,08	0,07	0,39	1,11	0,49
CEI/XXI-ULd4	4,52	0,17	0,27	0,80	1,00	0,63	5,48	0,08	0,09	0,37	1,15	0,46
CEI/XXI-ULp4	4,29	0,14	0,24	0,61	1,03	0,51	5,06	0,09	0,10	0,44	1,13	0,44
CEI/XXI-Ud4	4,27	0,19	0,30	0,84	1,01	0,50	-	0,06	0,06	0,32	1,22	0,44
CEI/XXI-Up4	4,36	0,21	0,35	1,0	1,00	0,47	5,66	0,08	0,09	0,38	1,16	0,44
Média	4,19	0,19	0,28	0,86	1,00	0,55	5,48	0,07	0,08	0,36	1,17	0,57
Desvio Padrão	0,39	0,02	0,07	0,14	0,02	0,07	0,30	0,01	0,02	0,04	0,04	0,06
Coeficiente de Variação	9,31%	12,17%	24,98%	16,19%	2,01%	12,73%	5,52%	14,40%	26,26%	12,87%	3,24%	94,06

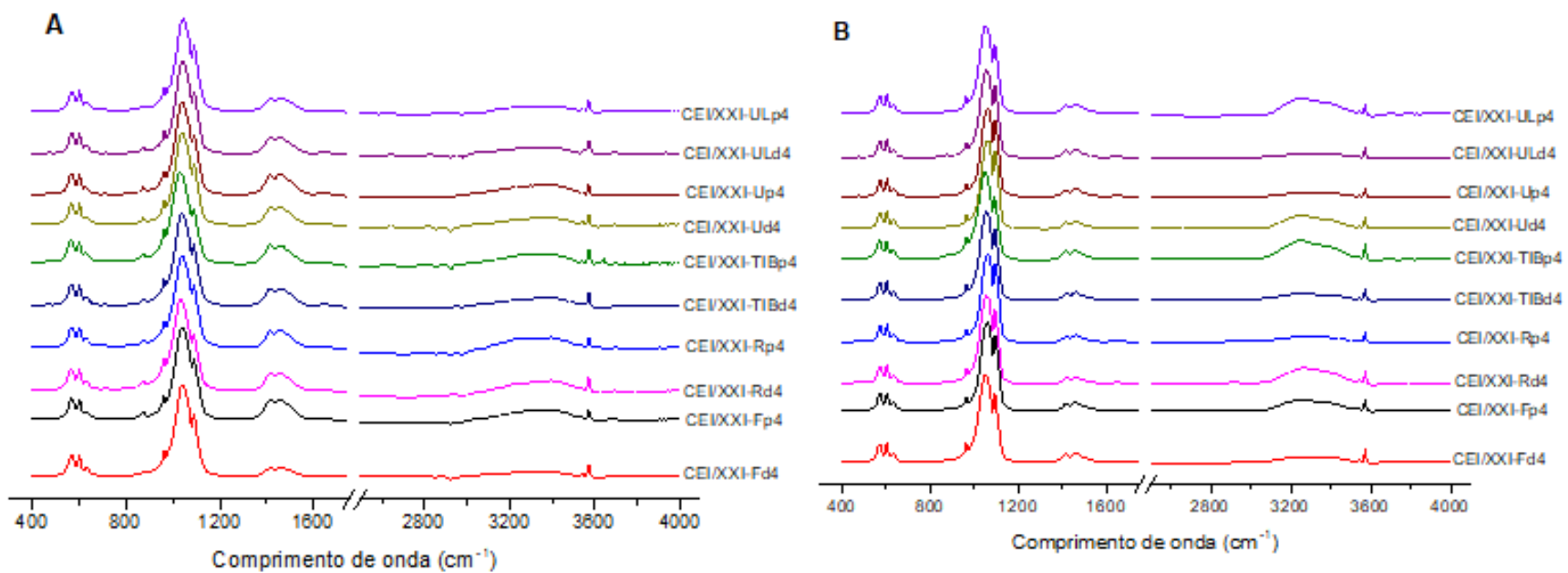


Figura IV. Espectros das amostras da CEI/XXI à temperatura de 900 °C pré do tratamento (A) e pós-tratamento (B) com ácido acético 0,1M

Tabela V. Tabela com Índices espectroscópicos, médias, desvios padrão e coeficiente de variação das amostras provenientes do Hospital de Santo António no Porto queimadas experimentalmente a 900 °C, pré e pós tratamento.

Amostra	Pré-Tratamento						Pós-Tratamento					
	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P
ArqR1	3,92	-	0,45	-	1,19	0,63	4,77	0,03	0,004	0,12	1,68	0,68
ArqR2	4,88	0,15	0,51	0,67	1,64	0,82	6,08	0,03	0,02	0,15	1,30	0,58
ArqR3	5,27	0,15	0,47	0,67	1,51	0,81	4,76	0,02	0,02	0,09	2,22	0,57
ArqR4	4,99	0,16	0,52	0,66	1,45	0,78	6,28	0,00	0,02	0,02	2,50	0,82
ArqR5	5,92	0,08	0,27	0,39	1,34	0,90	5,49	0,01	0,01	0,04	1,81	
ArqR6	5,96	0,04	0,07	0,18	1,39	1,02	6,00	0,03	0,02	0,11	1,57	0,91
ArqR7	5,04	0,01	0,03	0,05	1,80	0,99	6,11	0,01	0,02	0,03	2,26	0,96
ArqR8	6,38	0,01	0,01	0,05	1,22	-	6,18	0,003	0,005	0,01	2,84	1,19
ArqR9	5,59	0,01	0,03	0,05	2,07	1,07	5,06	0,01	0,05	0,05	2,65	1,06
ArqR10	4,54	0,01	0,02	0,03	2,16	0,69	5,02	0,01	0,03	0,03	3,00	0,74
ArqR11	5,34	0,01	0,03	0,03	1,87	1,05	4,77	0,01	0,01	0,02	2,06	0,99
ArqR12	4,60	0,01	0,02	0,03	2,39	0,66	5,13	0,01	0,03	0,04	2,19	0,73
ArqR13	4,73	0,01	0,04	0,05	2,02	0,87	5,33	0,01	0,03	0,05	2,35	0,82
ArqR14	4,52	0,01	0,02	0,05	1,93	-	5,00	0,01	0,03	0,05	2,40	0,50
Média	5,12	0,05	0,18	0,22	1,71	0,85	5,43	0,01	0,02	0,05	2,20	0,81
Desvio Padrão	0,67	0,06	0,21	0,27	0,38	0,16	0,58	0,01	0,01	0,04	0,48	0,16
Coeficiente de Variação	13,14%	123,66%	119,90%	120,87%	21,85%	17,87%	10,72%	72,90%	64,89%	73,86%	21,99%	19,70%

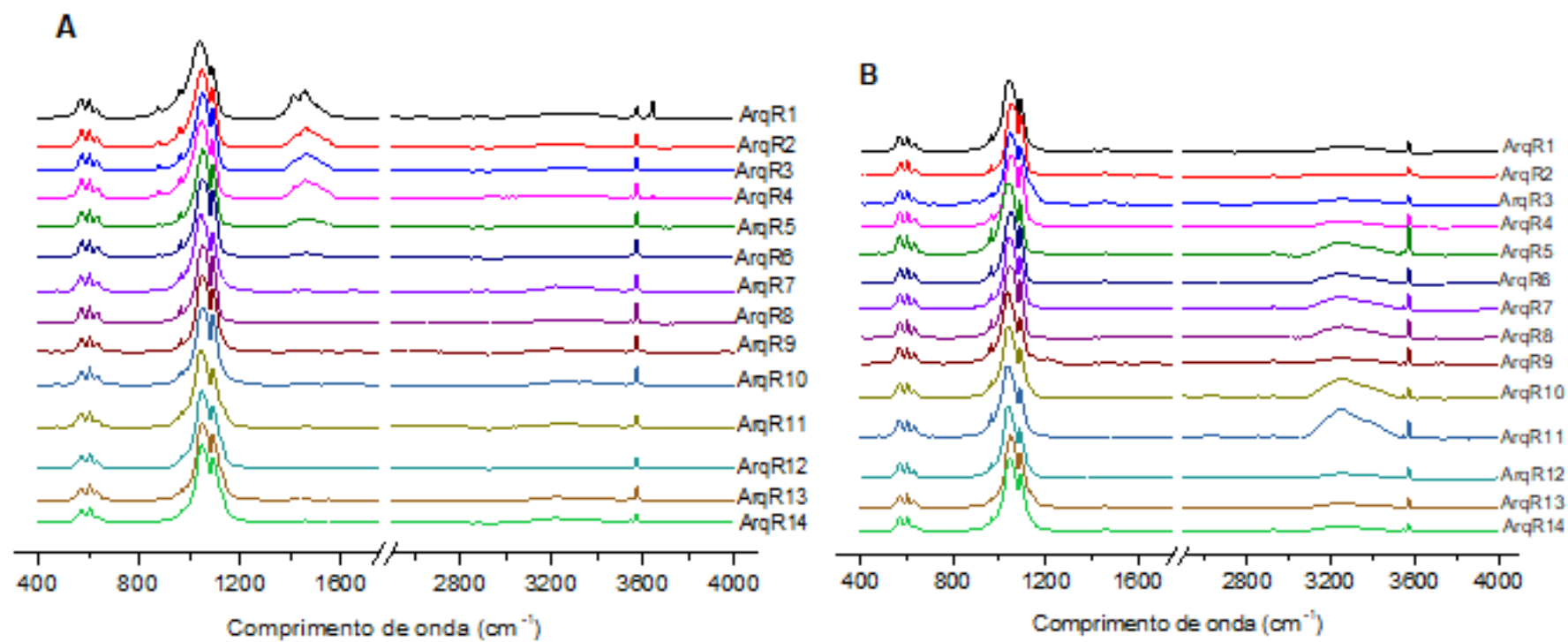


Figura V. Espectros do Cemitério de Santo António (ArqR) pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) com ácido acético

Tabela VI. Tabela com Índices espectroscópicos, médias, desvios padrão e coeficiente de variação calculados para as amostras da necrópole “El Inchildero” pré e pós o tratamento com ácido acético.

Amostra	Pré-tratamento						Pós-Tratamento					
	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P
Arq1-d	5,34	0,08	0,65	0,35	1,00	0,59	5,35	0,06	0,06	0,29	2,02	0,60
Arq3-d	4,47	0,14	0,07	0,58	1,40	0,47	5,73	0,06	0,0003	0,30	1,59	0,69
Arq4-d	4,98	0,14	0,04	0,64	1,59	0,57	4,86	0,12	0,04	0,59	1,63	0,75
Arq5-f	5,05	0,16	0,12	0,77	1,41	0,44	5,01	0,13	0,05	0,56	1,55	0,60
Arq6-c	4,38	0,12	0,04	0,55	1,59	0,56	5,47	0,10	0,04	0,48	1,60	0,61
Arq7-d	4,56	0,18	0,11	0,79	1,09	0,53	5,48	0,07	0,02	0,30	1,54	0,78
Arq8-d	4,37	0,31	0,39	1,45	1,12	0,60	5,92	0,08	0,02	0,37	1,61	0,56
Arq9-c	5,20	0,10	0,02	0,45	1,62	0,52	6,10	0,07	0,02	0,33	1,57	0,71
Arq10-d	5,56	0,09	0,15	0,41	1,84	0,52	5,04	0,11	0,01	0,46	1,60	0,52
Arq11-d	4,98	0,08	0,07	0,34	1,04	0,73	5,68	0,06	0,05	0,28	2,03	0,46
Arq12-d	4,90	0,10	0,14	0,36	1,57	0,58	5,50	0,07	0,07	0,36	1,95	0,83
Arq13-d	4,66	0,21	0,20	0,92	1,27	0,60	-	0,19	0,07	-	1,36	0,60
Arq14-f	4,80	0,15	0,08	0,67	1,36	0,54	5,11	0,14	0,07	0,63	1,45	0,66
Arq15-d	5,27	0,09	0,04	0,42	1,64	0,58	5,03	0,10	0,02	0,43	1,66	0,54
Arq16-d	-	0,09	0,08	0,41	1,30	0,76	4,52	0,07	0,02	0,31	1,49	0,87
Arq17-d	4,62	0,10	0,09	0,45	1,23	0,76	4,89	0,15	0,04	0,73	1,61	0,77
Arq18-d	4,41	0,16	0,04	0,71	1,51	0,73	4,19	0,15	0,04	0,63	1,52	0,57
Média	4,90	0,14	0,13	0,59	1,37	0,59	5,29	0,10	0,04	0,44	1,63	0,65
Desvio Padrão	0,39	0,06	0,16	0,27	0,22	0,10	0,49	0,04	0,02	0,15	0,19	0,12
Coeficiente de Variação	7,86%	41,93%	123,07%	45,76%	16,19%	16,64%	9,26%	39,20%	61,24%	33,13%	11,68%	17,65%

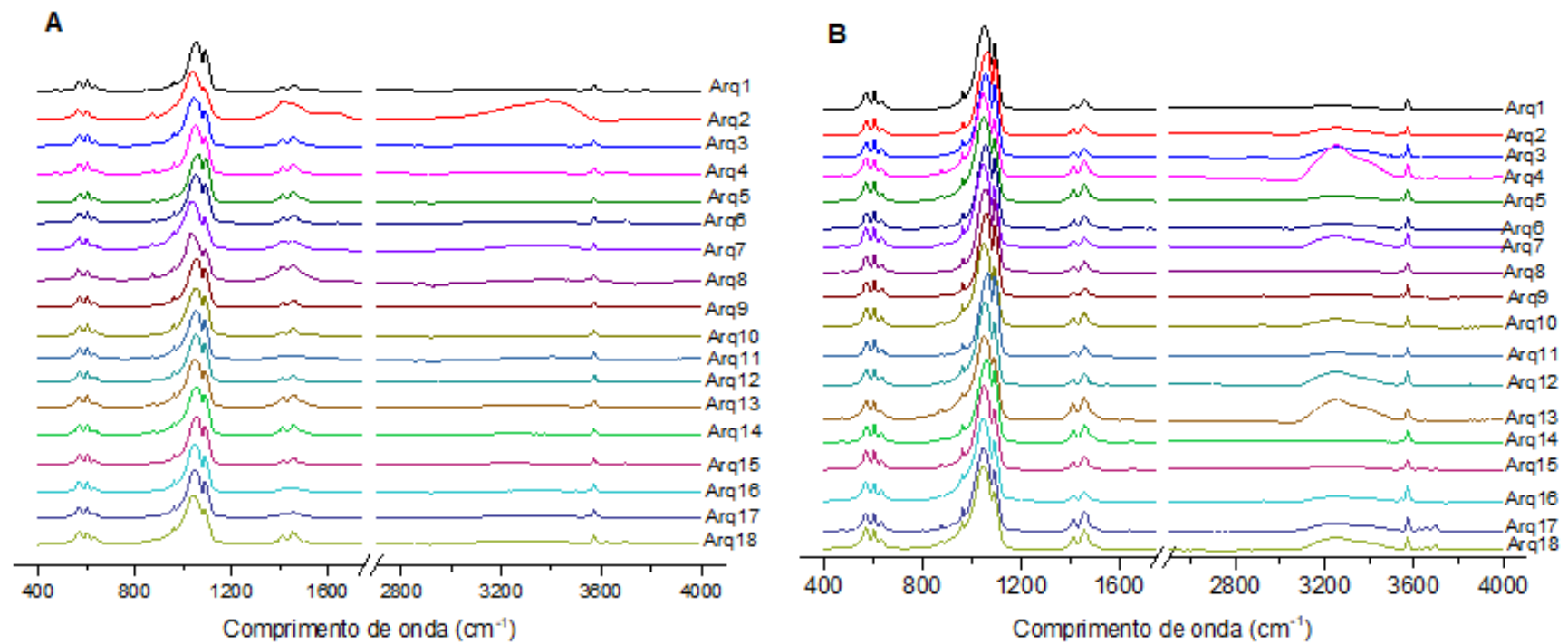


Figura VI. Espectros das amostras da Necrópole "El Inchidero" pré-tratamento (A) e pós-tratamento (B) com ácido acético 0,1M

Tabela VII. Estatística descritiva das amostras provenientes do crematório de Trieste em Itália, pré-tratamento e pós-tratamento com ácido acético.

Amostra	Pré-Tratamento						Pós-Tratamento					
	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P	CI	C/P	API	BPI	C/C	OH/P
Cr1	4,08	0,16	0,27	0,62	1,48	0,13	6,73	0,01	0,04	0,03	2,72	0,13
Cr3	3,93	0,30	0,41	1,25	1,20	0,65	5,46	0,09	0,02	0,42	1,60	0,65
Cr4	4,88	0,15	0,51	0,67	1,64	1,67	4,87	0,03	0,19	0,14	2,80	1,07
Cr5	5,24	0,15	0,47	0,67	1,52	0,86	6,55	0,01	0,13	0,05	4,04	0,86
Cr6	4,96	0,16	0,52	0,66	1,45	0,84	6,06	0,02	0,13	0,08	3,13	0,84
Cr7	5,96	0,13	0,50	0,61	1,48	0,84	6,53	0,02	0,07	0,08	2,40	0,84
Cr8	5,96	-	0,29	-	1,35	-	5,79	0,01	0,07	0,04	3,78	-
Cr9	5,13	0,19	0,51	0,84	1,13	1,34	5,08	0,01	0,06	0,04	3,15	1,34
Cr10	4,37	0,19	0,87	0,92	1,55	1,31	6,24	0,01	0,07	0,03	4,14	1,31
Cr11	-	0,23	0,37	0,72	1,27	0,98	6,84	0,01	0,03	0,03	2,27	0,98
Cr12	5,60	0,16	0,46	0,76	1,43	0,97	4,75	0,02	0,15	0,10	2,69	0,97
Cr13	4,22	0,21	0,52	0,82	1,43	1,32	5,31	0,03	0,08	0,13	1,86	1,32
Cr14	4,72	0,19	0,54	0,78	1,30	0,91	7,08	0,01	0,05	0,04	2,77	0,91
Cr15	4,42	0,16	0,40	0,68	1,46	0,93	5,70	0,02	0,15	0,09	3,29	0,93
Cr16	5,27	0,17	0,48	0,73	1,34	0,87	6,75	0,01	0,07	0,04	3,08	0,87
Cr17	4,48	0,27	0,51	1,16	1,20	0,80	-	0,06	0,03	0,26	1,74	0,80
Cr18	4,52	0,14	0,33	0,61	1,56	0,72	6,09	0,03	0,12	0,13	2,54	0,72
Cr19	5,15	0,13	0,37	0,56	1,46	1,0	7,04	0,01	0,05	0,04	3,16	1,00
Cr20	5,50	0,18	0,70	0,78	1,46	1,06	5,01	0,03	0,19	0,15	2,61	1,06
Cr21	4,41	0,28	0,49	1,12	1,17	0,57	5,99	0,03	0,09	0,17	2,15	0,57
Cr22	5,33	0,16	0,47	0,67	1,59	0,76	6,53	0,02	0,14	0,08	3,10	0,76
Cr23	5,11	0,19	0,48	0,86	1,55	0,57	5,72	0,02	0,23	0,10	3,66	0,57
Cr24	5,19	0,12	0,24	0,52	1,44	0,73	6,51	0,02	0,07	0,12	2,12	0,73
Média	4,95	0,18	0,47	0,75	1,42	0,89	5,99	0,02	0,10	0,09	2,86	0,85
Desvio Padrão	0,58	0,05	0,14	0,16	0,14	0,22	0,71	0,02	0,06	0,06	0,66	0,26
Coeficiente de variação	11,72%	26,46	30,09%	21,33%	9,99%	24,25%	11,85%	86,21%	58,94%	66,03%	22,95%	29,74%

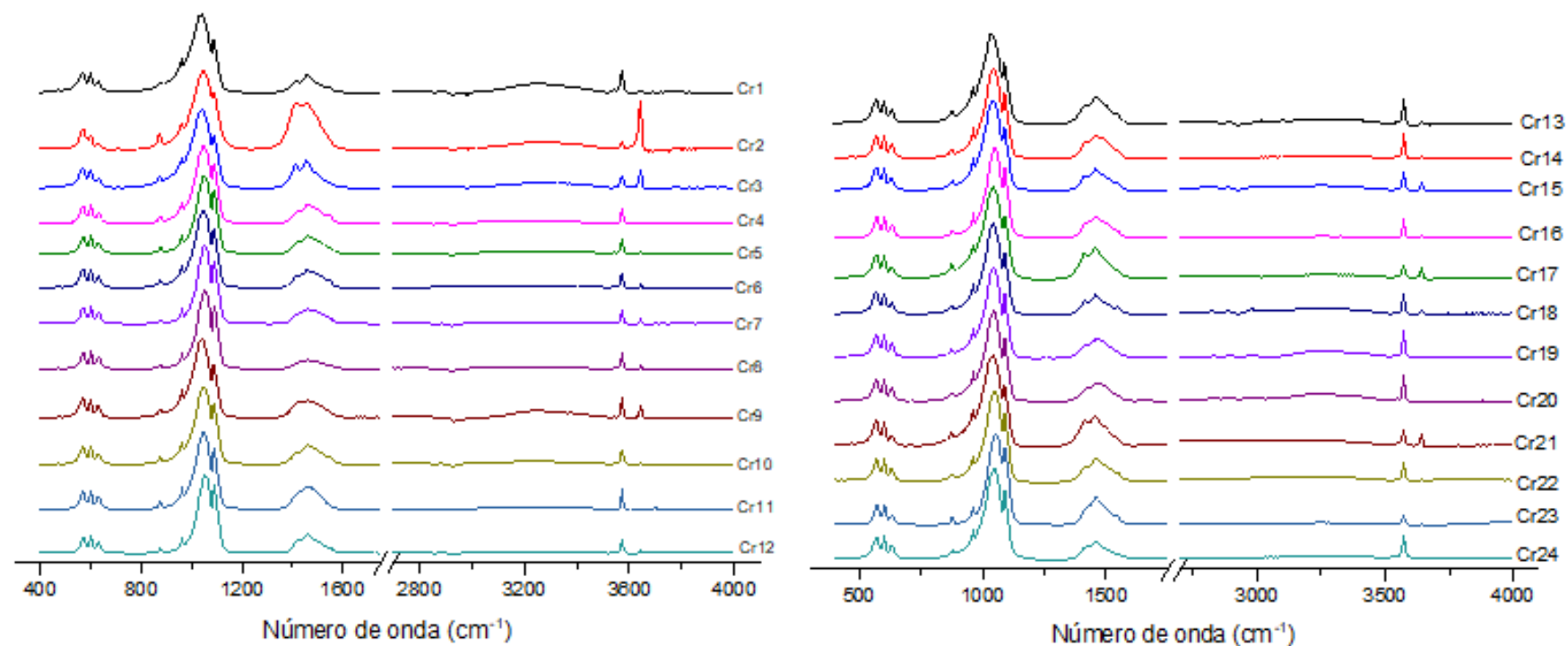


Figura VII. Espectros das amostras do crematório de Trieste (Cr) pré-tratamento com ácido acético.

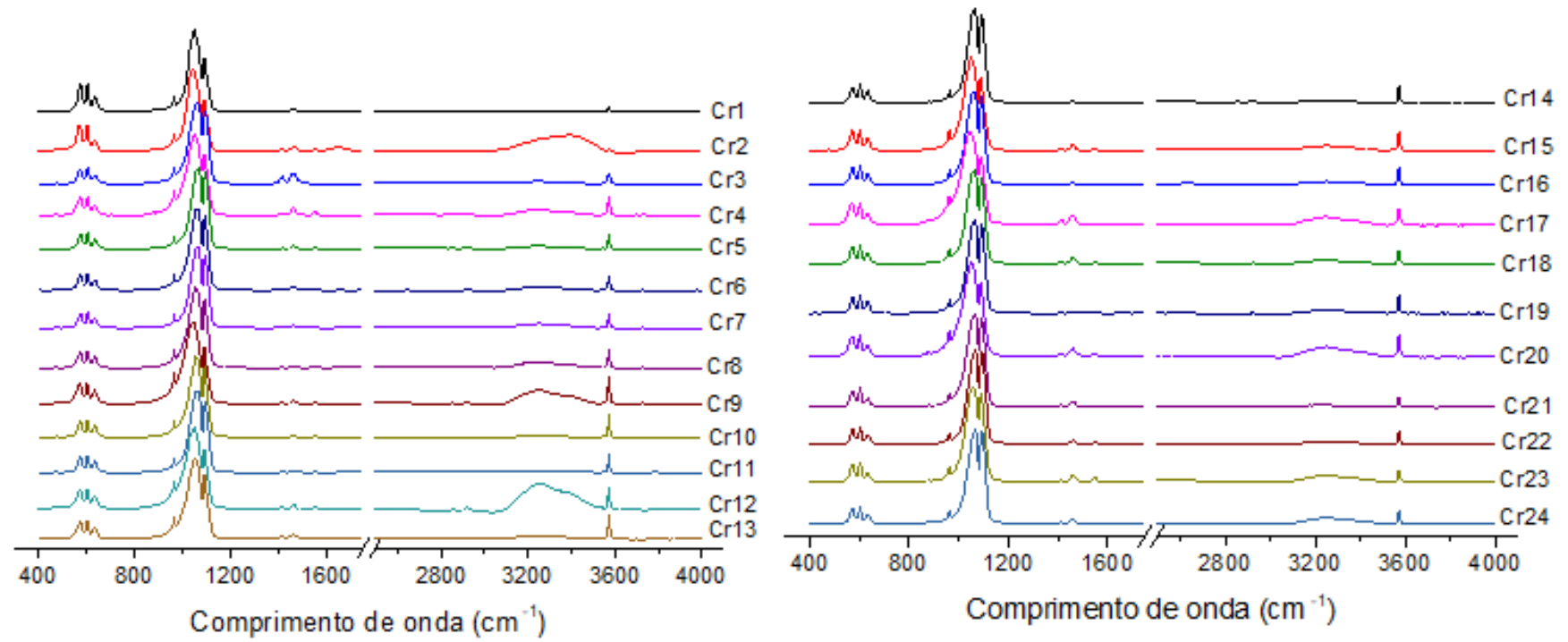


Figura VIII. Espectros das 24 amostras do crematório de Trieste (Cr) pós-tratamento com ácido acético 0,1M durante 4h

Estatística Descritiva

Tabela VIII. Valores das Diferenças relativas da massa médias (Dif. Média), desvio padrão, diferença relativa da massa máxima e mínima (Dif. Máxima e Dif. Mínima, respetivamente) e o coeficiente de variação para todas as coleções de amostras.

Coleção	N	Dif. Média (%)	Desvio padrão	Dif. Máxima (%)	Dif. Mínima (%)	Coeficiente de variação (%)
450	10	68,62	7,90	81,71	54,60	11,51
700	9	75,28	11,90	90,07	56,02	15,82
800	10	69,48	13,01	95,77	54,18	18,73
900	10	65,48	14,82	90,36	41,90	23,69
ArqR	14	50,99	21,08	84,85	18,34	41,33
Arq	17	48,68	13,67	80,26	25,87	28,08
Cr	23	45,96	10,85	70,46	32,05	23,60

Tabela IX. Valores das Diferenças relativas médias (Dif. Média), desvio padrão, diferença relativa máxima e mínima (Dif. Máxima e Dif. Mínima, respetivamente) e o coeficiente de variação do IC, para todas as coleções de amostras.

Coleções	N	Dif. Média (%)	Desvio padrão	Dif. Máxima (%)	Dif. Mínima (%)	Coeficiente de variação (%)
450	10	8,8556	6,16807	21,06	1,65	69,68
700	10	5,9667	6,82043	19,79	-2,55	114,28
800	10	13,3588	9,57364	33,45	1,38	71,67
900	10	31,5156	14,01437	51,76	17,52	44,47
ArqR	14	7,0950	13,47554	25,71	-10,67	189,95
Arq	18	8,66	14,30701	35,30	-12,97	165,21
Cr	24	22,6771	20,28989	64,69	-15,17	89,47

Tabela X. Valores das Diferenças relativas médias (Dif. Média), desvio padrão, diferença relativa máxima e mínima (Dif. Máxima e Dif. Mínima, respectivamente) e o coeficiente de variação do C/P, para todas as coleções de amostras.

Coleções	N	Dif. Média (%)	Desvio padrão	Dif. Máxima (%)	Dif. Mínima (%)	Coeficiente de variação (%)
450	9	-20,0589	6,82868	-8,38	-32,67	-34,04%
700	9	-39,0622	10,97176	-27,46	-62,78	-28,08%
800	10	-25,2890	15,67915	-11,08	-62,26	-62,0%
900	9	-60,1867	10,92403	-32,88	-68,24	-18,15%
ArqR	10	-57,8444	33,92448	-7,19	-97,87	-58,65%
Arq	14	-26,8521	21,65889	-5,51	-73,72	-80,66%
Cr	22	-87,9332	7,14319	-70,40	-96,98	-8,12%

Tabela XI. Valores das diferenças relativas médias (Dif. Média), desvio padrão, diferença relativa máxima e mínima (Dif. Máxima e Dif. Mínima, respectivamente) e o coeficiente de variação do API, para todas as coleções de amostras.

Coleções	N	Dif. Média (%)	Desvio padrão	Dif. Máxima (%)	Dif. Mínima (%)	Coeficiente de variação (%)
450	10	31,3530	15,42092	58,22	13,64	49,19%
700	90	-56,0356	12,09918	-43,81	-84,19	-21,59%
800	6	-35,7567	27,54091	-16,00	-88,97	-77,02%
900	10	-69,1120	18,39956	-21,64	-86,93	-26,62%
ArqR	10	-72,9370	32,67246	-7,42	-99,08	-44,79
Arq	14	-57,4150	27,22864	-8,97	-99,57	-47,42%
Cr	23	-78,3096	12,05348	-51,59	-93,99	-15,39%

Tabela XII. Valores das Diferenças relativas médias (Dif. Média), desvio padrão, diferença relativa máxima e mínima (Dif. Máxima e Dif. Mínima, respetivamente) e o coeficiente de variação do BPI, para todas as coleções de amostras.

Coleções	N	Dif. Média (%)	Desvio padrão	Dif. Máxima (%)	Dif. Mínima (%)	Coeficiente de variação (%)
450	9	-14,5278	7,16317	-4,30	-23,67	-49,29%
700	9	-36,4267	10,01747	-26,48	-59,80	-27,50%
800	9	-25,3511	22,21614	-4,47	-78,69	-87,63%
900	9	-56,88	11,81103	-27,87	-67,10	-20,77%
ArqR	11	-48,5155	36,95065	-2,92	-97,55	-76,16%
Arq	12	-27,8017	22,01235	-6,35	-74,51	-79,18%
Cr	21	-87,9095	6,55536	-77,13	-97,20	-7,46%

Tabela XIII. Valores das Diferenças relativas médias (Dif. Média), desvio padrão, diferença relativa máxima e mínima (Dif. Máxima e Dif. Mínima, respetivamente) e o coeficiente de variação do C/C, para todas as coleções de amostras.

Coleções	N	Dif. Média (%)	Desvio padrão	Dif. Máxima (%)	Dif. Mínima (%)	Coeficiente de variação (%)
450	10	4,3590	1,44074	7,29	2,19	33,07%
700	9	13,4311	2,56777	16,90	9,05	19,12%
800	8	6,85	4,74365	12,77	0,33	69,23%
900	10	16,7820	4,58478	21,74	9,47	27,32%
ArqR	12	40,2292	33,55174	132,09	9,88	83,40%
Arq	15	26,2493	33,90966	102,46	0,58	125,37%
Cr	22	101,6441	43,82661	180,26	30,27	43,12%

Tabela XIV. Valores das Diferenças relativas médias (Dif. Média), desvio padrão, diferença relativa máxima e mínima (Dif. Máxima e Dif. Mínima, respectivamente) e o coeficiente de variação do OH/P, para todas as coleções de amostras.

Coleções	N	Dif. Média (%)	Desvio padrão	Dif. Máxima (%)	Dif. Mínima (%)	Coeficiente de variação (%)
700	9	-6,53	6,24661	2,6	-15,13	-95,69
800	9	6,38	15,1921	38,37	-8,18	238,29
900	10	6,89	9,69334	25,4	-5,98	140,67
ArqR	14	-2,72	12,7796	9,7	-33,96	-470,08
Arq	17	3,922	11,2606	27,57	-22,05	287,13
Cr	21	4,195	8,99285	32,16	-8,7	214,36