**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

Éverton Sérgio Estracanholi

**Determinação do intervalo pós-morte por espectroscopia
de fluorescência**

**São Carlos
2008**

ÉVERTON SÉRGIO ESTRACANHOLLI

**Determinação do intervalo pós-morte por espectroscopia de
fluorescência**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Orientador: Prof. Dr. Vanderlei Salvador
Bagnato

São Carlos
2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Estracanholti, Éverton Sérgio

Determinação do intervalo pós-morte por espectroscopia de fluorescência / Everton Sérgio Estracanholti; orientador Vanderlei Salvador Bagnato.-- São Carlos, 2008.

95 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Física - Área de concentração: Física Aplicada) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Espectroscopia. 2. Fluorescência. 3. Intervalo pós-morte. 4. Análise de componentes principais. I.Título.

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400,
13560-970 São Carlos, SP

Fone/Fax (16) 3373-9777

www.ifsc.usp.br

svposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Éverton Sérgio Estracanholi

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada.

Aprovado em: 17/07/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Marco Aurélio Guimarães

Instituição: FMRP/USP

Assinatura

Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Dedico este trabalho a Deus e minha família, que sempre me apoiou em todas as situações e me forneceu todas as condições necessárias para meu sucesso, dentre elas o amor e carinho que ilumina todos os meus dias.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste Trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato, pela orientação, paciência, amizade, confiança e incentivo.

Às minhas co-orientadoras, Cristina Kurachi e Priscila F. C. Menezes pela instrução, orientação e colaboração na realização e compreensão dos experimentos.

Ao amigo José R. B. Vicente que compartilhou as madrugadas de realização de experimentos e tantos momentos de descontração.

Aos colegas do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, pelo apoio técnico e colaboração que possibilitaram a realização do trabalho.

Aos amigos do grupo de Óptica e do laboratório de Biofotônica, que me acompanharam durante toda a minha jornada, contribuindo para o desenvolvimento do trabalho com comentários, críticas, sugestões e todo o apoio que tanto necessitei.

Aos meus familiares, pela confiança, incentivo, carinho e todo apoio que depositam em mim.

À todos os meus amigos, que sempre me incentivaram a prosseguir em meu caminho, me dando forças nas dificuldades e compartilhando dos bons momentos.

Ao Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro e infra-estrutura.

Resumo

Neste trabalho estamos propondo um novo método para a determinação do intervalo pós-morte, tendo em vista a necessidade de métodos que forneçam resultados em um curto período de tempo de análise e, ao mesmo tempo, tenha uma precisão semelhante à dos métodos utilizados atualmente. Além disso, é muito importante que sua aquisição seja viável para as instituições interessadas em tal análise, seja para fins como perícia criminal, instituições de pesquisa, instituto médico-legal ou para re-implante de órgãos amputados. Com estas motivações, o objetivo do trabalho é verificar se a técnica de espectroscopia de fluorescência apresenta sensibilidade suficiente para diferenciar os tecidos que estão em diferentes estágios de decomposição, uma vez que a técnica já tem sido muito utilizada para caracterização de tecidos biológicos com outras aplicações. Durante a realização do trabalho e análise dos dados obtidos (espectros de fluorescência), consideradas as dificuldades encontradas para a caracterização temporal das informações, são propostas formas de análise pertinentes. Dentre as análises realizadas, é apresentado o cálculo de análise em componentes principais, onde a diagonalização de matrizes de covariância permite identificar os padrões nos espectros obtidos. Uma interpretação dos dados obtidos de um primeiro grupo de animais utilizados (ratos da raça *Wistar*) foi feita, criando modelos matemáticos que descrevam as variações observadas em função do tempo, e logo a seguir foi realizado o processo de validação, onde o modelo matemático é posto à prova através da determinação do intervalo pós-morte de outro grupo de animais, cujos valores são conhecidos – estes dados, porém, não foram utilizados para a criação do modelo. A seguir, os resultados obtidos neste trabalho foram comparados com alguns resultados encontrados na literatura obtida, de onde foi possível concluir que o trabalho respondeu positivamente às expectativas.

Palavras-chave: Espectroscopia. Fluorescência. Intervalo pós-morte. Análise de componentes principais.

Abstract

In this study we propose a new method to evaluate the post-mortem interval, due to a need for methods that simultaneously provide results in a short analysis period of time and present accuracy similar to the methods currently used. Furthermore, it is very important to emphasize that the acquisition system must be practical and accessible in relations to costs getting possible the utilization for different institutions as: judicial expertise, research institutions, medical-legal institutes or to re-implantation of organ amputees. With these goals as motivation, the purpose of this study was to validate the fluorescence spectroscopy as a technique sufficiently sensitive to distinguish tissues in several stages of decomposition, since this technique has been widely used for characterization of biological tissue with other applications. Considering the difficulties found for temporal characterizations obtained by fluorescence spectra analysis any relevant ways of analysis were proposed. Among them we presented the Principal Components Analysis calculation, on which the diagonalization of covariance matrices allows us to identify standard in the obtained spectra. The interpretation of the data obtained from a first group of animals (breed: Wistar rats) was realized, creating mathematical models that describe the changes observed over time. Immediately after, the validation process was applied, where the mathematical model was tested, determining the post-mortem interval of another animals group whose values was known. However these data was not used to create the model. Afterwards, the results obtained in this study were compared to those from literature, and this comparison gotten possible to conclude that the study showed a positive response to the expectations.

Key-words: Spectroscopy. Fluorescence. Póst-mortem interval. Principal component análisis.

Lista de Figuras

Figura 1: Alojamento dos animais no IFSC/USP	27
Figura 2: Gaveteiro no interior da capela, onde os animais são mantidos após o sacrifício	28
Figura 3: Foto da capela onde os animais mortos foram mantidos e do sistema de exaustão..	29
Figura 4: Esquema da montagem experimental com o sistema de aquisição de dados	30
Figura 5: Obtenção do espectro de fluorescência da pele de um rato morto há 96 horas	31
Figura 6: Espectros de fluorescência de 3 animais em 3 tempos distintos de pós-morte.....	34
Figura 7: Variação no tecido analisado de dois animais com IPM igual à 96 horas	35
Figura 8: Espectros de fluorescência característicos do fígado, da pele e do rim para um animal com IPM igual a 0 hora	37
Figura 9: Diagrama em blocos da análise dos dados obtidos	40
Figura 10: Variação dos picos de emissão em função do tempo.....	43
Figura 11: Distribuições das razões dos picos em vários tempos.....	44
Figura 12: Evolução temporal do valor médio da razão entre picos	45
Figura 13: Espectro de fluorescência da pele de um rato <i>in vivo</i> representado graficamente..	48
Figura 14: Representação da disposição de todos dados de forma matricial	49
Figura 15: Representação da disposição dos dados na nova base	52
Figura 16: Componente principal 1 <i>versus</i> Componente principal 2	53
Figura 17: PC1 <i>versus</i> PC2 dos espectros no intervalo de 0 à 96 horas pós-morte.....	55
Figura 18: Regiões representativas dos pontos obtidos dos espectros para cada horário.....	56
Figura 19: Validação das componentes principais de dois animais para o intervalo pós-morte igual a 0 hora	57
Figura 20: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 24 horas	58
Figura 21: Validação das componentes principais de dois animais para o intervalo pós-morte igual a 48 horas.....	58

Figura 22: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 72 horas	59
Figura 23: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 96 horas	60
Figura 24: Representação dos centros das componentes principais	63
Figura 25: Projeção dos centros dos grupos na melhor reta que passa pelo conjunto de centros	64
Figura 26: Evolução temporal da distância entre os centros dos grupos pelo método PCA Próprio	65
Figura 27: PC1 versus PC2 dos espectros no intervalo de 0 à 96 horas pós-morte.....	68
Figura 28: Regiões representativas dos pontos obtidos dos espectros para cada horário.....	69
Figura 29: Validação das componentes principais de dois animais para o intervalo pós-morte igual a 0 hora.	70
Figura 30: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 24 horas.	70
Figura 31: Validação das componentes principais de dois animais para o intervalo pós-morte igual a 48 horas.....	71
Figura 32: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 72 horas.	71
Figura 33: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 96 horas.	72
Figura 34: Representação dos centros das componentes principais	75
Figura 35: Evolução temporal da distância entre os centros dos grupos pelo método PCA Matlab	76
Figura 36: As duas maiores componentes principais (PC1 versus PC2), para os espectros de fluorescência obtidos a partir da excitação com laser de 408nm	79
Figura 37: Componentes principais para 0 Hora e 24 Horas separados para cada animal.....	81
Figura 38: Componentes principais para 48 Horas e 72 Horas separados para cada animal ...	82
Figura 39: Componentes principais para 96 Horas separados para cada animal.....	82
Figura 40: Variação temporal do coeficiente angular médio obtido das componentes principais pelo método PCA Próprio com excitação em 408nm	83

Lista de Quadros

Quadro 1: Número de animais nos grupos de treinamento e validação	31
Quadro 2: Valores de IPM obtidos para os animais de teste do método da razão entre picos. 47	
Quadro 3: Valores dos pontos que formam o espectro de fluorescência representados de forma matricial	48
Quadro 4: Validação para 0 hora com as probabilidades calculadas para cada intervalo pós-morte	61
Quadro 5: Validação para 24 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	61
Quadro 6: Validação para 48 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	61
Quadro 7: Validação para 72 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	61
Quadro 8: Validação para 96 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	61
Quadro 9: Tempo de óbito do grupo de teste determinado pelo método da distância entre os centros dos grupos das componentes principais	66
Quadro 10: Validação para 0 hora com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	73
Quadro 11: Validação para 24 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	73
Quadro 12: Validação para 48 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	73
Quadro 13: Validação para 72 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	73
Quadro 14: Validação para 96 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte	73
Quadro 15: Tempo de óbito do grupo de teste determinado pelo método da distância entre os centros dos grupos das componentes principais	77
Quadro 16: Valor médio dos coeficientes angulares para cada intervalo pós-morte	83
Quadro 17: Intervalo pós-morte determinado para o grupo de validação através das componentes principais obtidas pela espectros com excitação em 408nm	84

Quadro 18: Métodos cronotanatognóticos atuais, com os respectivos modelos animais utilizados, IPM em que o trabalho foi realizado e seus valores de desvio nas medições feitas	91
--	----

Lista de Abreviaturas ou Siglas

°C – grau Celsius

ATP – adenosina trifosfato

FAD – Flavina adenina dinucleotídeo

g – grama

h – hora

IPM – intervalo pós-morte

nm – nanômetro

K⁺ – íon de potássio

Mg⁺⁺ – íon de manganês

ms – milisegundo

mW – miliWatt

Na⁺ – íon de sódio

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

PCA – *Principal Component Anlysis* (Análise de Componentes Principais)

PC1 – *Principal Component 1* (Componente Principal 1)

PC2 – *Principal Component 2* (Componente Principal 2)

s – segundo

UV – ultravioleta

Sumário

1.	Introdução	14
1.1	Alguns métodos cronotanotognóticos atuais	16
1.2	Método proposto de cronotanotognose: Espectroscopia de fluorescência	21
2.	Materiais e Métodos.....	27
2.1	Aparato Experimental.....	27
2.2	Procedimento Experimental	30
3.	Resultados Obtidos e Discussão	33
3.1	Primeiro método de análise: Razão entre picos.....	41
3.2	Segundo método de análise: Análise das Componentes Principais (PCA)	48
3.2.1	Método “PCA próprio”, com excitação 532nm, normalizado em 597nm	54
3.2.2	Método “PCA Matlab”, com excitação 532nm, normalizado em 597nm	67
3.2.3	Método “PCA próprio”, com excitação em 408nm, normalizado em 488nm..	78
4.	Conclusão.....	86
	Referências	93

1. Introdução

Praticamente todos os métodos cronotanatognóticos são baseados em observações dos estágios dos fenômenos pós-morte que ocorrem em cadáveres. O problema desses métodos é que os fenômenos pós-morte nem sempre ocorrem no mesmo intervalo de tempo devido ao grande número de fatores que influenciam esses processos. Existem fenômenos transformativos, destrutivos e até mesmo conservativos que podem acelerar, retardar ou até mesmo suprimir alguns estágios do processo de decomposição do corpo. Fenômenos estes que podem estar presentes ou não, dependendo de todo um conjunto de muitas variáveis formado pelas circunstâncias ambientais ao qual o corpo está sujeito e pelas características do próprio corpo. Portanto, a maioria dos métodos utilizados para determinação do intervalo pós-morte (IPM) são aproximações, uma vez que há uma grande indeterminação nos horários em que esses fenômenos cadavéricos ocorrem, principalmente nos métodos baseados em uma simples caracterização visual.

Dentro desse quadro vamos propor neste trabalho um novo método para determinação do intervalo pós-morte que não é baseado em características simplesmente visuais, mas que tem como principal fundamento a caracterização dos estágios de decomposição através da obtenção de informações do tecido em decomposição pela técnica de espectroscopia por fluorescência.

Uma vez que após a morte do indivíduo um processo de decomposição é iniciado nos órgãos e tecidos, caracterizado por cada um dos fenômenos cadavéricos e, portanto ocorrendo modificações na composição química dos mesmos, esperamos que através da espectroscopia de fluorescência possamos observar essas mudanças nos espectros e correlacionar com o intervalo pós-morte. A espectroscopia de fluorescência tem se mostrado uma técnica alternativa muito importante para a caracterização de sistemas biológicos, como por exemplo,

no auxílio de diagnóstico de lesões em tecidos (1-3), na detecção de tecido dental cariado (4-6), na identificação de cancro cítrico em pomares de laranja (7), dentre várias outras aplicações. Em todas essas aplicações a técnica se mostrou possuir sensibilidade suficiente para diferenciar as variações teciduais devido aos vários fenômenos que ocorrem em várias circunstâncias.

Baseando-se nessa capacidade tão importante de diferenciação de tecidos biológicos estamos interessados em verificar se essa técnica de espectroscopia óptica possui a sensibilidade suficiente para diferenciar o tecido biológico em vários intervalos pós-morte. Sabemos que, logo após cessar as reações metabólicas que caracterizam um ser como vivo, começam a ocorrer várias modificações nos tecidos, causadas por vários fenômenos, como por exemplo, a falta de oxigênio, a falta de adenosina trifosfato (ATP), o início da proliferação de microorganismos da flora intestinal, entre outros, iniciando o processo de decomposição. Neste caso, iremos estudar se a variação nos espectros de fluorescência para cada tecido analisado em um mesmo IPM pode ser diferenciada da variação devido aos distintos horários pós-morte, gerando um padrão de variação temporal. Queremos definir um método que torne possível caracterizar um espectro de fluorescência obtido em um intervalo pós-morte de tal forma que, com a informação obtida, seja possível a criação de um banco de dados em que numa análise comparativa de um espectro referente a um intervalo pós-morte desconhecido esse valor possa ser determinado.

No caso específico da pele, órgão de investigação, os principais fatores que modificam e/ou influenciam o espectro de fluorescência coletado são: ressecamento, contaminação por difusão de compostos de origem não dérmica (por exemplo produtos de degradação interna do músculo, posição do corpo e portanto formação ou ausência de hipóstases, contato com vários tipos possíveis de solo).

Outra característica importante dessa técnica é a rapidez com que o resultado pode ser obtido. As técnicas baseadas em alguma análise laboratorial existentes na atualidade com a finalidade de determinação do intervalo pós-morte implicam em um tempo necessário para estudo do cadáver ou em uma remoção do corpo do local onde foi encontrado para o transporte à um centro médico legal para a realização da necropsia pelo médico legista ou perito. Além de que, muitos desses métodos utilizam equipamentos que são economicamente inviáveis de serem adquiridos por departamentos de algumas áreas de interesse (8-19). Um dos principais problemas dessas técnicas é que como consequência dos métodos utilizados há um acréscimo de tempo no fornecimento do resultado de cronotanatognose, que muitas vezes é fundamental para a elucidação de um crime ou mesmo para outros fins de estudo que não estejam relacionados à criminalística. Uma vez que o método proposto aqui esteja comprovado é possível criar um software e um equipamento portátil que levado na cena onde se encontra o cadáver, pode-se fornecer o resultado do intervalo pós-morte instantaneamente.

Dentro do erro que é possível ocorrer devido ao fato dos estágios de decomposição não ocorrerem de maneira uniforme e similar em todos os indivíduos, esperamos que esse método apresente uma precisão muito satisfatória na determinação do IPM quando comparado com os métodos atuais (8-19).

1.1 Alguns métodos cronotanatognóticos atuais

Como já citado anteriormente, as técnicas cronotanatognóticas são baseadas em observações das características dos estágios dos fenômenos cadavéricos. Antes de falar sobre os métodos de determinação do intervalo pós-morte em si, devemos nos situar dentro de um quadro onde estamos realizando os experimentos, conhecendo alguns dos vários processos que ocorrem depois da ocorrência do óbito. Os vários fenômenos cadavéricos são separados basicamente em três tipos (8):

- Fenômenos abióticos: São os fenômenos que ocorrem em todos os casos de morte, violenta ou não e independem de como ocorreu a morte. Começam a ocorrer logo após a morte, quando ainda não ocorreu a proliferação bacteriana. Esses fenômenos são: resfriamento, lividez/hipóstase e rigidez.
- Fenômenos transformativos: São processos que evoluem da putrefação (grande proliferação bacteriana) que começa a ocorrer logo após a morte até a completa dissolução dos tecidos moles. São eles: surgimento de coloração e manchas, formação gasosa e deformação do corpo, redução dos tecidos e esqueletização.
- Fenômenos conservativos: São processos conseqüentes de alguns fatores climáticos e do próprio corpo que acabam por conservar os cadáveres. São eles: mumificação, saponificação e petrificação.

Baseado na observação desses fenômenos os principais métodos de determinação do intervalo pós-morte e suas características são citados a seguir (8-19).

Esfriamento do cadáver (“Algor Mortis”)

Uma vez cessadas as funções vitais do corpo, todos os processos metabólicos e a circulação sanguínea, que são processos responsáveis por manter a temperatura do corpo da maioria dos humanos constante e em torno de 36°C, o corpo apresenta a tendência em atingir um equilíbrio térmico com o ambiente que o cerca. Estima-se que o corpo humano perca em torno de 1°C por hora após a morte. Portanto, medindo-se a temperatura do cadáver seria possível determinar o intervalo pós-morte, geralmente obtida de regiões que não estão em contato direto com o ambiente, como nas axilas e na região retal, porém esse método além de válido apenas para as primeiras hora (em torno de 10 horas) apresenta uma imprecisão que está relacionada a essa velocidade com que se atinge o equilíbrio, que é uma junção de fatores muito específicos como, por exemplo, a temperatura ambiente que pode oscilar bastante, a

quantidade de gordura e tecidos adiposos no corpo que em maior quantidade se torna um isolante térmico retardando a queda de temperatura, o volume corporal total (o corpo de uma criança esfria mais rápido que o corpo de um adulto) e as vestes que cobrem o corpo.

Lividez/Hipóstase

Lividez e hipóstase são características distintas que ocorrem simultaneamente como consequência do mesmo fenômeno. Quando cessa a circulação sanguínea, pela ação da força gravitacional o sangue tende a acumular-se em regiões mais baixas, próximas ao solo, então a região mais alta do corpo (mais elevada) tende a ficar com menos sangue e assim, essas regiões com menos sangue adquirem uma descoloração bem característica dos cadáveres, sendo denominada de lividez cadavérica. A região mais baixa onde o sangue começa a se acumular toma uma coloração vermelho-arroxeadada e é conhecida como hipóstase ou manchas de hipostase. Esse fenômeno começa a ocorrer logo que cessa a circulação sanguínea, e, portanto logo que se dá a morte. Nas primeiras horas após a morte se fizermos uma pressão nas regiões de hipóstases o sangue se espalhará e então a coloração característica desaparecerá por alguns instantes. Transcorridas algumas horas, em torno de 6 a 15 horas, essa pressão feita nas hipóstases não mais farão a coloração característica das mesmas sumirem. As hipóstases são bem visíveis em casos como asfixia ou onde não houve sangramento, mas não são freqüentes em casos de forte hemorragia grave.

Relaxamento muscular

Entre o período de 0 a 6 horas após a morte ocorre um relaxamento muscular do indivíduo, uma vez que cessam todos os controles musculares. Por volta da 4ª hora esse relaxamento começa a desaparecer e inicia-se a rigidez cadavérica.

Rigidez cadavérica (“Rigor Mortis”)

A rigidez cadavérica inicia-se entre 2 e 4 horas após a morte e dura em torno de 12 a 24 horas, até o início da putrefação. Com a presença de ATP a interação entre a actina e a miosina mantém a musculatura relaxada, mas uma vez sem as funções metabólicas, a falta de ATP causa o enrijecimento dos músculos. Porém, a rigidez do corpo tem influência de vários fatores como, por exemplo, um choque emocional nos minutos que antecedem a morte pode causar uma rigidez mais precoce, ou então um retardo quando um indivíduo morre subitamente e nos últimos instantes de vida tenha realizado um esforço físico considerável ou se for um indivíduo forte ou atlético. Além desses fatores do próprio indivíduo e da forma da morte também há a influência do clima, pois em temperaturas mais baixas o fenômeno inicia-se mais rapidamente que em temperaturas mais altas.

Segundo Relaxamento

Entre 12 e 18 horas o rigor mortis vai desaparecendo e começa a ocorrer um segundo relaxamento da musculatura, diferenciando-se do primeiro relaxamento por assumir uma forma de flacidez dos tecidos. Esse segundo relaxamento é diferenciado do primeiro ao se aplicar uma pressão na carne e esta deixar um afundamento visível não retornando a posição original.

Nível de potássio, cálcio e alguns íons no humor vítreo

Após a morte ocorre uma variação na concentração de algumas substâncias que estão presentes no humor vítreo dos olhos, como o potássio, o cálcio e alguns íons como o Mg^{++} , K^+ e o Na^+ . Através de medições dessa concentração é possível determinar o intervalo pós-morte. Essa técnica tem precisão de 12 horas pós-morte para climas quentes e de 24 horas para climas mais frios.

Coagulação sanguínea

Após aproximadamente 2 horas do óbito o sangue começa a se coagular nas câmaras cardíacas e nos vasos, começando a se desfazer após 8 horas.

Conteúdo gástrico

Em média sabe-se quanto tempo cada tipo de alimento demora a ser digerido pelo corpo humano e, portanto sabe-se quanto tempo determinados alimentos podem permanecer no estômago após a sua ingestão. Através de uma análise da composição do conteúdo gástrico do corpo é possível então determinar um limite superior do tempo de óbito que pode ir de 1 ou 2 horas para líquidos como água, chá, café e leite até 4 ou 5 horas para carne de porco, legumes e couve.

Estágios da putrefação

A putrefação se dá início pela proliferação bacteriana intestinal. Os seus estágios são caracterizados por alguns fenômenos. Entre 18 e 24 horas após o óbito surge uma mancha verde na região abdominal do indivíduo. Essa mancha é proveniente da formação da sulfa-hemoglobina, substância esverdeada derivada da hemoglobina, combinada com o gás sulfídrico, produto da putrefação. Os gases liberados pela putrefação comprimem a vesícula contra outros órgãos e o músculo abdominal, então ocorre a autólise da parede da vesícula pelos próprios componentes da bile que termina por se espalhar pelos órgãos e abdômen manchando-os de verde. Esse fenômeno caracteriza o período cromático. Após este se inicia o período enfisematoso, que se inicia após 24 horas e é caracterizado pelo surgimento do enfisema de face, da genitália e da circulação póstuma de Brouardel entre 48 e 72 horas pós-morte. Em torno de uma semana após o óbito tem início o processo coliquativo que pode perdurar por tempos diversos, sendo caracterizado pela desagregação do conjunto corpóreo,

pelos tecidos e órgãos amolecidos e em menor volume. O próximo estágio é o processo de esqueletização, que geralmente é confundido com o fim do processo coliquativo por não apresentar um fim bem definido e durar por um tempo indeterminado até que o cadáver seja reduzido somente às suas partes ósseas.

Entomologia forense

Entomologia forense é um ramo que se baseia no estudo do ciclo de vida de insetos e outros artrópodes para determinação do tempo de óbito (20,21). Através de uma análise do estágio de vida dos insetos e dos tipos de insetos que são encontrados no cadáver, como ovo ou larva e conhecendo-se bem o período de reprodução desses insetos é possível determinar as circunstâncias envolvidas no crime, interligar a vítima a suspeitos e determinar o tempo de óbito. Os vários tipos de insetos se instalam no corpo em diferentes fases da decomposição. Porém, dependendo da situação do ambiente ou do crime a chegada dos insetos pode ser atrasada ou acelerada, além de que os tipos de animais existentes no ambiente podem variar, além de que o desenvolvimento das fases imaturas de alguns insetos, como as moscas, pode variar muito em função da variação da temperatura (20,21).

1.2 Método proposto de cronotanatognose: Espectroscopia de fluorescência

Com o objetivo de apresentar um método de determinação do intervalo pós-morte que não seja baseado em conclusões subjetivas e ao mesmo tempo seja capaz de fornecer um resultado em poucos instantes indicamos como alternativa a espectroscopia de fluorescência. Antes de entrar em detalhes sobre as características da técnica é preciso ter em mente o princípio básico sobre a qual a técnica se apóia.

Conforme nos ensina a mecânica quântica, um elétron que está em uma órbita em torno do núcleo de um átomo (ou molécula) não pode possuir qualquer energia, e conseqüentemente não pode estar em uma órbita a uma distância qualquer do núcleo. Os valores de energia que um elétron pode ter são bem definidos e, portanto as órbitas também são bem específicas, o que caracteriza os chamados níveis eletrônicos. O conjunto dos possíveis níveis de energia é determinado pelo potencial ao qual o elétron é submetido, isto é, a composição do núcleo ao redor do qual o elétron está orbitando e os outros elétrons que estão presentes. Assim como um elemento químico é caracterizado pela composição do núcleo (pelo número de prótons), então podemos caracterizar esse elemento pelos possíveis níveis de energia que o elétron pode ocupar ao estar orbitando esse elemento.

Ao incidir luz em um material, dentre os vários fenômenos que podem ocorrer, um de grande interesse é a absorção. A absorção ocorre se a energia da luz incidente tiver um valor igual à diferença de energia entre um nível permitido e o nível mais baixo no qual o elétron se encontra, e assim o elétron que absorveu a luz é promovido a nível mais externo de maior energia. Porém, esses níveis mais energéticos colocam o elétron em um estado mais instável, e o elétron permanece nesse nível por um tempo e então tende a decair para níveis de menor energia que são mais estáveis. Quando o elétron passa a um nível de menor energia ocorre a emissão de um fóton com a mesma energia correspondente a diferença de energia do nível em que o elétron se encontra e o nível para o qual ele decai.

Esses níveis de energia podem se apresentar do tipo singleto ($S = 0$) ou tripleto ($S = 1$) dependendo da disposição do *spin* dos elétrons que ocupam esses níveis. Em um estado singleto os spins dos elétrons estão com orientações opostas, e estes são ditos estar desemparelhados. Já em um estado tripleto os spins possuem a mesma orientação, e os elétrons são ditos estar emparelhados (22). Quando as transições eletrônicas de decaimento com emissão radiativa ocorrem para elétrons possuem a mesma multiplicidade de spin então

chamamos de *fluorescência*. Essas transições são permitidas pela mecânica quântica e possuem uma taxa típica de 10^8 s^{-1} , resultando em um tempo de vida (período em que o elétron permanece no estado excitado) de aproximadamente 10^{-8} s . Já as transições entre estados de diferentes multiplicidades de spin, geralmente de um estado excitado tripleto para o estado fundamental singlete, caracteriza o processo conhecido como *fosforescência*, que possui uma probabilidade muito menor de ocorrer, possuindo tempo de vida que pode variar de milisegundos até segundos (23,24).

Para situações onde o estudo é realizado com gases em baixas temperaturas e pressão, onde as interações entre as moléculas são extremamente reduzidas, o elétron que foi excitado do estado fundamental para um estado excitado através da absorção de um fóton se mantém nesse estado durante um determinado momento e então decai para o estado fundamental emitindo um fóton com a mesma energia do fóton absorvido, sendo esse fenômeno conhecido como *fluorescência ressonante*. Já para o caso em que o meio de análise são gases que estão fora destas condições ou então seja um líquido ou um sólido, o processo não ocorre da mesma forma. Nesses casos existe uma interação muito grande entre as moléculas do meio, e dessa forma uma vez que o elétron seja promovido a um estado excitado estas interações fazem com que o elétron perca parte de sua energia para processos não radiativos, como por exemplo, interações vibracionais, que são processos extremamente rápidos (da ordem de 10^{-15} s). Sendo assim, quando os elétrons decaem para o estado fundamental a sua energia é menor e, portanto a energia do fóton emitido também é menor (e o comprimento de onda da luz é maior), e dessa maneira a luz observada na emissão está deslocada para valores de maior comprimento de onda que a luz fornecida ao sistema para excitação eletrônica.

Como os processos de transição interna dos níveis vibracionais são muito mais rápidos que a fluorescência, então as emissões de fluorescência ocorrem nas transições do menor nível vibracional para o estado fundamental, e dessa forma, os espectros de fluorescência

obtidos refletem os níveis mais baixos dos modos vibracionais, que dependem de cada molécula, conforme já explanado. Dessa forma, é possível utilizar a informação obtida pela emissão de fótons por fluorescência para realizar a caracterização de moléculas. Uma vez que cada composto tem uma fluorescência bem característica (que depende da luz utilizada para promover a excitação), é possível diferenciá-lo dentre outros compostos.

Quando tratamos de meios mais complexos de estudo, que é o nosso caso, onde utilizamos tecido biológico, é preciso saber que a luz pode interagir de diversas maneiras com as moléculas que estão presentes nestes meios. Estas moléculas que interagem com a luz são os *cromóforos*. Os cromóforos podem ser classificados em três grupos. O primeiro grupo, que é o tipo mais importante para a realização deste trabalho são os *fluoróforos*, que interagem com a luz incidente de forma a re-emitir luz na forma de fluorescência. Um segundo grupo são os *absorvedores*, que absorvem a luz, mas não convertem em fluorescência. E o terceiro grupo é formado pelos *espalhadores*, que apenas refletem a luz incidente sem modificar sua energia, e conseqüentemente o comprimento de onda (23-25).

Esses grupos de cromóforos têm uma influência muito grande nos resultados obtidos ao tentar observar a fluorescência. Se o meio apresentar uma quantia muito grande de absorvedores então poucos fótons irão interagir com os fluoróforos, e conseqüentemente a intensidade de luz convertida em fluorescência será muito pequena, sendo de difícil detecção, além de que, esses cromóforos absorvedores vão acabar por absorver a própria luz fluorescente emitida, reduzindo-a mais ainda. A presença elevada de espalhadores também é um fator negativo, pois uma vez que a luz seja muito espalhada pelo tecido, esta atingirá pontos cada vez mais distantes do ponto de coleta, e dessa forma a intensidade captada também será reduzida (26).

Com essas interações em mente, quando coletamos um espectro de fluorescência devemos lembrar que a informação que estamos analisando é uma parte que restou da

combinação de todos esses fatores, absorção e espalhamento da luz utilizada para promover a excitação, absorção e espalhamento de parte da fluorescência emitida.

Nessa nova aplicação da técnica de espectroscopia de fluorescência para determinar o intervalo pós-morte espera-se que o método venha se mostrar uma importante ferramenta para a distinção entre os tecidos analisados com vários IPM. Uma vez sabendo que as reações que ocorrem quando os processos metabólicos são interrompidos e os processos de decomposição passam a atuar modificam a composição química dos tecidos, esperamos que tanto a quantidade como a variabilidade de tipos de cromóforos varie em função do intervalo pós-morte. Utilizando a metodologia proposta queremos observar se é possível detectar as modificações espectrais devido a essas variações nos cromóforos, além de obter um padrão de variação em função do tempo.

É muito importante para o sucesso dessa técnica que a fonte de luz utilizada seja um laser, pois uma de suas principais características é um fator extremamente crucial para o bom desempenho da técnica, a monocromaticidade. A monocromaticidade da fonte de luz permite uma melhor seletividade das transições eletrônicas, gerando um número muito grande de fótons com a mesma energia para promover a excitação e, portanto um número grande de fótons provindo da fluorescência com a mesma energia, sendo assim a detecção mais eficiente (26,27). Devido ao alto valor de energia e à alta absorção pelo tecido biológico, geralmente emprega-se luz violeta, azul e verde para promover a excitação eletrônica.

Dentre o vasto conjunto de fluoróforos que compõe o tecido biológico e estão sujeitos às variações por degradação em função do aumento do intervalo pós-morte podemos ressaltar alguns. Estando relacionado ao metabolismo energético da célula e, portanto com uma probabilidade de apresentar variações muito grandes temos a nicotinamida adenina dinucleotídeo na sua forma reduzida (NADH) e a flavina adenina dinucleotídeo na sua forma oxidada (FAD) (25,27). O triptofano é um dos aminoácidos aromáticos que mais contribui

para a fluorescência emitida pelas proteínas. O colágeno e a elastina presentes nos tecidos biológicos também são importantes contribuintes para a autofluorescência, uma vez que a emissão está associada à presença das ligações cruzadas entre as cadeias de aminoácidos.

No grupo dos absorvedores merece destaque a hemoglobina e as proteínas, pois além de estarem presentes em grandes quantidades são grandes absorvedores de luz principalmente na região do UV, que é uma das regiões mais utilizadas para realizar a excitação do tecido.

Além dos fatores relacionados à composição tecidual existe outros fenômenos que podem alterar os espectros de fluorescência, como por exemplo as condições superficiais do tecido, pois se este for liso ou rugoso, estiver úmido ou ressecado, entre outras condições, são fatores que podem promover mais ou menos espalhamento ou absorção da luz, gerando condições que podem levar ao fracasso do experimento se forem desprezados.

A partir desses princípios de variação da quantidade e da diversidade dos compostos (principalmente fluoróforos) estarem correlacionados com a intensidade de fluorescência captada, queremos verificar a hipótese de poder observar as modificações que ocorrem com o tecido em vários intervalos pós-morte através de variações espectrais, uma vez que ocorrem inúmeras modificações na composição tecidual após cessar os processos metabólicos. Através de análises dos espectros de fluorescência queremos detectar essas variações sem necessitar da realização de medidas específicas de análises químicas de concentração desses compostos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Aparato Experimental

Ratos machos da raça *Wistar* com peso médio de 250g foram utilizados neste estudo. Os animais eram provenientes do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) e o protocolo experimental utilizado foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (Processo nº 044/2006). Os animais foram mantidos sem qualquer restrição de água ou alimentação até a realização do experimento, mantidos em um alojamento de animais no laboratório de Biofotônica no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC/USP), onde foram bem acondicionados e alimentados, conforme a figura 1.

Figura 1: Alojamento dos animais no IFSC/USP

Foram mortos dois animais por procedimento, através da inalação de dióxido de carbono (CO_2) em uma câmara vedada com controle de fluxo do gás.

Os animais mortos foram mantidos em uma capela de aço inoxidável, sob condição ambiental e acondicionados em compartimentos para individualização e identificação dos grupos (figura 2). Na capela existe uma tela que impede a entrada de insetos, duas entradas semiviedadas que permite o manuseio das amostras, um orifício lateral para a entrada da sonda óptica, uma saída de ar que leva os gases provindos da decomposição dos animais a uma chaminé com exaustor. Os gases são imediatamente incinerados antes de serem lançados na atmosfera, através de uma chama que é mantida acesa constantemente por dois botijões de gás e um circuito eletrônico (figura 3).

Figura 2: Gaveteiro no interior da capela, onde os animais são mantidos após a morte

Figura 3: Foto da capela onde os animais mortos foram mantidos e do sistema de exaustão

Para a obtenção dos espectros de fluorescência utilizamos duas fontes de luz para realizar a excitação eletrônica dos constituintes da amostra, um laser do Neodímio: YAG dobrado com intensidade máxima de emissão em 532nm, com 10mW de potência, e um laser de diodo com intensidade máxima de emissão em 408nm. Através de uma sonda de investigação óptica tipo Y cujo diâmetro da fibra é de 50 μ m (Oceanoptics, USA), composta de duas fibras que são dispostas em formato “Y”, uma fibra conduz a luz de excitação até a superfície do tecido, enquanto a outra coleta a luz emitida pelo tecido.

Dois filtros do tipo “passa alta” foram utilizados, um para cada fonte de luz, sendo um em 532nm e outro em 408nm, que são posicionados entre a fibra óptica de coleta e o detector, permitindo assim a passagem de luz com comprimentos de onda superiores ao comprimento de onda dos lasers de excitação.

Após a filtragem da luz de emissão refletida, a luz provinda da fluorescência do tecido é levada ao detector, que é um espectrofluorímetro modelo SF2000 (Oceanoptics, USA), responsável por converter o sinal luminoso em um sinal digital e enviar essa informação até um microcomputador. Através de um software de aquisição de dados OOBbase (Oceanoptics, USA), o sinal digital é então mostrado em uma forma gráfica denominada “espectro de fluorescência”

que informa a intensidade de radiação eletromagnética em função do comprimento de onda. Esse sistema de aquisição de dados com a montagem experimental está esquematizado na figura 4.

Figura 4: Esquema da montagem experimental com o sistema de aquisição de dados

2.2 Procedimento Experimental

Para a realização do experimento utilizamos 51 animais que foram separados em 2 grupos, um primeiro de 35 animais que foram analisados para a criação de um modelo (*training group*) e um segundo de 16 animais que serviram para fazer a validação do modelo (grupo de validação). Cada grupo foi morto em um período diferente e mantido na capela durante o tempo necessário para a realização do experimento. Analisamos neste experimento a pele dos animais, sendo que para a obtenção dessas medidas foi necessária a remoção do pêlo dos mesmos no horário de realização dos experimentos em cada IPM determinado. Inicialmente os pêlos dos animais foram removidos manualmente para a obtenção de uma área de 5 cm². Em cada IPM colhemos 40 espectros de cada animal em pontos distintos.

Os animais foram divididos nos grupos de treinamento e validação mostrados no quadro 1.

IPM (h)	Treinoamento	Validação
0	7	2
24	7	4
48	7	2
72	7	4
96	7	4

Quadro 1: Número de animais nos grupos de treinamento e validação

Para a obtenção dos espectros de fluorescência posicionamos a ponta da sonda óptica que é revestida com um filme plástico, sendo este substituído quando analisamos outro animal, em leve contato com o tecido em análise, de forma a ficar perpendicular a superfície deste. A configuração de tempo de integração utilizado foi de 200ms para os espectros obtidos pela excitação com laser de 532nm e outro tempo de 500ms quando utilizamos o laser de 408nm. Conforme demonstrado na figura 5, após o posicionamento da sonda óptica nesta posição descrita o espectro é então salvo no arquivo, com os valores de intensidade em função do comprimento de onda detectado.

Figura 5: Obtenção do espectro de fluorescência da pele de um rato morto há 96 horas

Após a aquisição dos dados estes foram tratados com os softwares matemáticos Matlab7[®] e Microsoft Excel[®], onde realizamos uma análise visual dos espectros com a finalidade de identificar padrões de variação em função do tempo. Da investigação do comportamento dos espectros de fluorescência decide-se utilizar 2 métodos estatísticos de análise.

Os espectros apresentam um comportamento bem característico de duas bandas de emissão, cujas intensidades relativas variam em função do tempo. Tendo em vista a necessidade dessa correlação de variações temporais, mas com a dificuldade devido às dispersões observadas utiliza-se um cálculo baseado em distribuição da razão da intensidade das bandas e outro baseado na análise da covariância entre os dados.

Após uma série de manipulações dos dados através de cálculos de distribuições, variância entre dados, diagonalização de matrizes, entre outros, é possível apresentar os dados obtidos dos espectros de forma a possibilitar uma observação de um outro ponto de vista mais privilegiado.

Através dessa nova representação dos dados, é preciso fazer novas análises de interpretação destes, buscando detectar o padrão de evolução temporal. Com essa finalidade, realiza-se outra série de cálculos e a inserção de novos métodos de análise de onde obtemos resultados que podem se apresentar de duas maneiras. De uma das interpretações obtemos um método que fornece probabilidades do intervalo pós-morte ser um valor, dentre um conjunto de valores pré-estabelecidos, a cada 24 horas nesse período, dentre as 96 horas. De outra interpretação possível obtivemos um método que fornece um valor de IPM com uma margem de erro.

Os métodos de calcular o intervalo pós-morte são então verificados numa etapa de validação, onde comparamos os resultados obtidos para determinar esse valor de um conjunto de animais com horário conhecido mas que não foram utilizados para a primeira análise. Dessa forma pode-se testar a eficiência tanto da técnica quanto dos métodos de análise.

3. Resultados Obtidos e Discussão

Apresentamos aqui os resultados obtidos a partir dos espectros de fluorescência e um detalhamento de cada método matemático utilizado com seus fundamentos quando analisados sobre cada um destes procedimentos matemáticos. Para cada um dos dois métodos de análise realizamos as interpretações pertinentes dos dados, fazendo novas análises dentro de cada método, na busca de observar um padrão de variação em função do tempo. Para cada método descrevemos as interpretações feitas e os cálculos realizados com os seus respectivos resultados, concluindo a fase de *training*. O próximo passo a partir de então é a realização da fase de validação, onde podemos verificar a validade do modelo criado na fase de *training*. Para isso realizamos novas medidas de obtenção de espectros de fluorescência, porém, agora as medidas são realizadas com o grupo de teste, composto de 16 novos animais que foram mantidos nas mesmas condições do primeiro grupo que gerou o banco de dados e o modelo.

Dessa forma podemos determinar o intervalo pós-morte desse segundo grupo pelos dados obtidos das análises de cada método, e comparando com os valores encontrados com os valores reais podemos verificar a validade da técnica.

Uma vez concluída a coleta dos espectros de fluorescência segue uma das mais importantes tarefas deste trabalho, que se trata de decidir qual método utilizar para analisá-los de forma que possamos distinguir os espectros obtidos em distintos intervalos pós-morte. Antes de mostrar o caminho que foi seguido vamos mostrar as circunstâncias que nos levaram a fazer essa escolha.

Inicialmente vamos olhar para os dados que temos a mão, isto é, alguns dos espectros que obtivemos para a medida de fluorescência com excitação em 532nm, da pele de três animais em três distintos intervalos pós-morte, 0 hora (logo no instante que se constata o óbito), 24 horas e 72 horas após o óbito, que estão representados na figura 6.

Figura 6: Espectros de fluorescência de 3 animais em 3 tempos distintos de pós-morte

Podemos ver pelos espectros acima que existe uma variação na forma dos espectros quanto às várias condições em que foram obtidos, isto é, variando-se o intervalo pós-morte, o animal que se analisa e o próprio ponto de coleta de fluorescência em um mesmo animal. Observamos que para uma medida realizada num mesmo intervalo pós-morte há uma variação quanto ao animal em análise, e que mesmo realizando uma medida no mesmo animal em pontos distintos do tecido num mesmo horário há também uma significativa variação na forma espectral, além da variação observada num mesmo animal em diferentes intervalos pós-morte, que é o alvo de nosso estudo.

Através dessas observações podemos concluir que além da informação da degradação do tecido devido ao intervalo pós-morte contida nos espectros há outras informações devido a outros fatores também inclusos nesses dados que podem ser confundidos com a informação que estamos buscando.

Além dos fatores citados há ainda outros fatores importantes que também causam variações na forma do espectro que podem interferir na interpretação dos dados, dentre os quais

podemos observar alguns, como o fato de o tecido não ser perfeitamente homogêneo e, portanto as pequenas variações da constituição do tecido são detectadas como variações na forma do espectro. O fato de a própria decomposição não ocorrer de forma homogênea no tecido (figura 7), é um fator muito importante, e uma vez sendo intrínseco ao experimento em questão é também um fator responsável por inserir uma imprecisão nos resultados.

Figura 7: Variação no tecido analisado de dois animais com IPM igual à 96 horas

Outro fator importante que interfere na forma dos espectros está relacionado ao manuseio do equipamento por parte do pesquisador no momento da coleta da medida. Como já sabemos, o ângulo da fibra óptica sobre o tecido causa modificações na forma do espectro, uma vez que diferentes comprimentos de onda possuem diferentes valores de coeficiente de reflexão e de refração para diferentes ângulos quando a luz passa de um meio para outro, o que ocorre com a luz da fluorescência que é proveniente do tecido até incidir na fibra óptica.

Por esses motivos sempre que fizemos uma coleta de dados essa foi feita na mesma região do órgão e sempre com a fibra óptica perpendicular a superfície, minimizando esses efeitos, porém mesmo assim esses fatores ainda estão presentes nos dados, mas de forma mais reduzida.

A fim de observar as variações espectrais devido à decomposição do tecido sem que as variações da não homogeneidade do mesmo ou as variações na forma da coleta dos espectros mascarem essas observações, concluímos que a melhor forma de realizar a análise dos dados tem que ser um método estatístico que considere todos esses fatores, mas que ao mesmo tempo seja capaz de diferenciá-los.

Apesar de haver uma relativa variação no espectro devido à variação do ponto onde se faz a coleta dos dados, é de se esperar que essa variação esteja dentro de um certo limite, pois o espectro de um determinado tipo de tecido é muito característico, sendo muito fácil ver a diferença de um espectro de fluorescência de tecidos de órgãos distintos obtidos com a excitação em 532nm, como por exemplo, da própria pele, do fígado e do rim, como é mostrado na figura 8.

Figura 8: Espectros de fluorescência característicos do fígado, da pele e do rim para um animal com IPM igual a 0 hora

Dos gráficos acima vemos que cada tecido possui um espectro de fluorescência muito característico, pois enquanto a pele possui dois picos de emissão bem característicos, o rim e o fígado apresentam apenas um, e mesmo assim estes dois últimos podem ser facilmente distinguidos pela diferença da largura de banda dessas emissões. Embora esses espectros possam variar devido às mudanças na composição de cada tecido ou pela não homogeneidade destes ou ainda pela variação de animal para animal, as variações nos espectros ainda são muito menores que as variações observadas quanto à diferença na natureza do tecido.

Desde que os animais estejam mantidos nas mesmas condições climáticas, que são fatores externos que podem interferir no processo de decomposição, como temperatura, umidade, luz, atmosfera, conjuntos de biótipos, entre outros, então devemos esperar que as variações espectrais devido à decomposição do tecido sejam a mesma para todos os animais,

pois uma vez que os processos de putrefação estão ocorrendo sob as mesmas condições é de se esperar que os produtos resultantes desses processos estejam presentes no mesmo período e em quantidades muito próximas.

Para determinar o intervalo pós-morte a partir desses espectros de fluorescência os métodos estatísticos de análise dos dados devem então diferenciar um padrão de variação que seja devido à decomposição do tecido dentre as variações espectrais devido a esse conjunto de outros fatores externos (variações de cada animal, de cada ponto de coleta de medida e do manuseio do equipamento por parte do pesquisador).

Um método utilizado para verificar a variação espectral em função do intervalo pós-morte é baseado na observação de que no decorrer do tempo, o espectro de fluorescência da pele apresenta uma variação peculiar na sua forma, onde notamos que as intensidades relativas de dois picos (600 e 630nm) variam em função do tempo.

Um outro método estatístico capaz de tal tarefa de diferenciar as variações espectrais, é baseado na análise de variâncias de um conjunto de variáveis, que agrupa amostras semelhantes e separa amostras distintas possibilitando um método de classificação de grupos, é conhecido como Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA), também conhecido como análise de dados multivariados (28).

O PCA é um dos mais antigos métodos de ordenação, o mais conhecido e com mais exemplos de aplicação em geologia, química, física, e outras áreas que dependem de análise de correlação de um conjunto de várias variáveis (29-32). Esse método foi proposto inicialmente por Pearson em 1901 e desenvolvido por Hotelling 30 anos depois, mas passou a ser utilizado em classificações químicas apenas na década de 70 e posteriormente aplicada em análises multivariadas (33,34). O método de análise de componentes principais nada mais é do que a diagonalização (busca pelos autovalores e autovetores) de matrizes de covariância e de matrizes formadas por coeficientes de correlação. Esse método consiste em uma transformação linear da matriz formada pelas “n” variáveis em análise em um conjunto de outras “n” variáveis de tal

que forma que a maior variável nova seja responsável pela maior variabilidade possível (e, portanto maior representabilidade) dos dados, a segunda maior variável pela maior representabilidade dos dados restantes e assim sucessivamente até que todas as “n” novas variáveis expliquem exatamente o conjunto de medidas.

Esse método pode ser capaz de nos ajudar a reconhecer o padrão do processo de decomposição nos tecidos, pois através da análise das centenas de variáveis que estamos trabalhando (os comprimentos de onda) podemos reconhecer e distinguir os padrões que caracterizam cada tecido do padrão da decomposição em si.

A seguir temos um diagrama em blocos (figura 9) com a esquematização de todo o processo de análise dos dados que foi realizada, desde a obtenção dos espectros de fluorescência até a correlação dos dados com o intervalo pós-morte.

Figura 9: Diagrama em blocos da análise dos dados obtidos

3.1 Primeiro método de análise: Razão entre picos

Conforme já citado anteriormente, observamos que no decorrer do tempo ocorre o surgimento de duas bandas bem características no espectro de fluorescência da pele dos animais quando utilizamos excitação em 532nm, sendo os comprimentos de onda de máxima intensidade em 600nm e 630nm (figura 10). Sabemos que a intensidade de fluorescência observada depende de vários fatores, como a intensidade do laser utilizado na excitação, a sensibilidade do espectrofotômetro, o manuseio da fibra óptica, das condições do tecido em análise, então não podemos analisar as intensidades nesses comprimentos de onda isoladamente. Porém todos esses fatores devem alterar a intensidade dos espectros de fluorescência da mesma forma em todos os comprimentos de onda, isto é, não devem alterar a sua forma, portanto ao realizar uma medida obtemos uma curva que pode ser descrita da seguinte maneira:

$$F(\lambda) = A \cdot f(\lambda) \quad (1)$$

Onde:

$F(\lambda)$ = valor medido da amplitude do espectro para um comprimento de onda λ ;

$f(\lambda)$ = valor da amplitude do espectro para um comprimento de onda λ para uma situação ideal;

A = um coeficiente que depende de todos os fatores que influenciam na medida e não possui nenhuma dependência com λ ;

Se calcularmos a razão entre a intensidade de luz para dois comprimentos de onda obtidos de um mesmo espectro podemos eliminar a influencia desses fatores.

$$\alpha = \frac{F(\lambda_i)}{F(\lambda_j)} \quad (2)$$

Onde:

α é a razão entre dois pontos do espectro;

$F(\lambda_j)$ = valor da amplitude do espectro para um comprimento de onda λ_j ;

$F(\lambda_i)$ = valor da amplitude do espectro para um comprimento de onda λ_i ;

Dessa forma os fatores experimentais que influenciam na intensidade do espectro são eliminados, porém ainda temos que levar em consideração os fatores intrínsecos ao tecido, como a variação devido ao ponto em que se faz a coleta da luz e a variação que ocorre de um animal para outro. Por isso, para cada intervalo pós-morte determinado para a coleta dos dados obtemos 40 espectros para cada um dos 7 animais, sendo no total 280 espectros por horário. Dessa forma podemos calcular o valor dessa razão para todos os espectros e assim obter uma distribuição da razão entre esses dois picos para cada IPM e assim ver como essa distribuição evolui no tempo.

Conforme mostra a figura 10, apresentamos os espectros de fluorescência típicos obtidos da pele de um animal quando se utiliza o laser de 532nm para excitação, apresentando as duas bandas de máxima emissão que foram levadas em consideração para o cálculo da razão.

Figura 10: Variação dos picos de emissão em função do tempo

Para o total de 280 espectros por horário de óbito obtemos os 280 valores da razão do primeiro pico (600nm) pelo segundo (630nm). Levando em consideração todos os intervalos pós-morte onde realizamos a coleta, o menor valor da razão entre picos foi de 0.645 e o maior valor foi de 1.545. Então dividimos esse intervalo a cada 0,01 e contamos quantos valores de razão estão contidos em cada intervalo, obtendo como resultado as distribuições dessas razões representadas na figura 11.

Figura 11: Distribuições das razões dos picos em vários tempos

Dessas distribuições das razões entre picos podemos confirmar, como era de esperar, as variações inerentes ao sistema em cada horário de medida, pois obtivemos uma distribuição com larguras típicas em torno de 0.2, que nesse intervalo de 0.645 a 1.545 nos mostra que os dados estão centrados em torno de um valor médio, mas mesmo assim existe uma variação que não

pode ser desprezada. Essas distribuições comprovam que existe variação no sistema responsável por acrescentar imprecisão no experimento, e como essas variações são inerentes do próprio processo de decomposição e do sistema biológico em si, então não podem ser removidas. Observamos que para os horários mais avançados (72 horas e 96 horas) as distribuições vão se tornando mais largas, indicando que a decomposição não está ocorrendo exatamente da mesma forma em todos os animais e em todos os pontos do tecido, o que tem como consequência o fato de o erro para a determinação do intervalo de óbito ser maior para tempos longos por esse método e mais eficiente para tempos curtos.

Esses mesmos dados mostram ainda que apesar dessas variações existe uma evolução temporal dessas curvas de distribuição, pois com o passar do tempo o valor médio da razão tende a assumir valores cada vez mais elevados. Essa observação nos permite fazer uma caracterização do tecido em função do tempo. Podemos observar no gráfico da figura 12 como que o valor médio dessas razões varia em função do intervalo pós-morte, assim como o desvio padrão desse valor médio representado pelas barras de erro.

Figura 12: Evolução temporal do valor médio da razão entre picos

Dessa curva obtivemos a uma dependência temporal da razão entre os picos, de onde é possível determinar o intervalo pós-morte pela equação:

$$IPM = 41.5 + \left[10.6 \ln \left(\frac{1.1 - R}{R - 1.4} \right) \right] \quad (3)$$

$$\Delta IPM = 1.2 + \left| 1.1 \ln \left(\frac{1.1 - R}{R - 1.4} \right) \right| + \left| \frac{10.6}{(R - 1.4)(1.1 - R)} [(1.1 - R)(\Delta R + 0.005) + (R - 1.4)(\Delta R + 0.007)] \right| \quad (4)$$

Onde:

IPM = intervalo pós-morte;

R = razão entre as intensidades dos picos de emissão;

ΔIPM = erro propagado no cálculo do intervalo pós-morte;

Através da equação 4 podemos calcular o tempo de órbita para o nosso grupo de validação, composto de 16 animais. Para cada animal do grupo de teste obtemos 40 espectros da pele em pontos distintos, e assim calculamos o valor médio das 40 razões entre picos. A partir desse valor com a equação obtida acima determinamos o tempo de órbita, conforme mostra o quadro 2.

IPM Real (h)	IPM Calculado (h)	Erro propagado (h)
0 hora Anim1	0*	_*
0 hora Anim2	0*	_*
24 horas Anim1	30	13
24 horas Anim2	26	21
24 horas Anim3	36	6
24 horas Anim4	33	7
48 horas Anim1	42	7
48 horas Anim2	38	16
72 horas Anim1	52	10
72 horas Anim2	43	7
72 horas Anim3	59	18
72 horas Anim4	51	11
96 horas Anim1	53	7
96 horas Anim2	57	14
96 horas Anim3	96*	_*
96 horas Anim4	55	11

Quadro 2: Valores de IPM obtidos para os animais de teste do método da razão entre picos. *Os valores são indefinidos nesse intervalo de análise e são obtidos por extrapolação

Embora os valores obtidos da razão entre picos para 0 hora estejam em uma região onde a equação é indefinida, quando comparamos esse valor no gráfico obtido pelo grupo *training* pode-se concluir que, por extrapolação, seria referente ao menor valor definido pela curva, isto é, 0 hora. Porém, como a incerteza nesse valor também não é definida nesse intervalo, então não é possível fazer a propagação de erros seguindo a equação 4.

Conforme já era previsto pela análise dos dados na etapa de *training*, os intervalos pós-morte obtidos para tempos curtos (até 48 horas) se mostraram mais satisfatórios do que os resultados para tempos longos (acima de 48 horas).

Podemos determinar a eficiência do método levando em conta a incerteza no valor do IPM obtido, e verificando se os valores reais estão dentro desse limite determinado. Para esse método, com os resultados obtidos do quadro 2, concluímos que em 50% dos valores obtidos o valor real está dentro da faixa determinada. Dessas incidências de acerto podemos verificar ainda que se dividirmos o experimento em dois grupos de intervalo pós-morte, um até 48 horas e outro acima de 48 horas, então a taxa de acerto passa a ser de 75% para o primeiro grupo e

25% para o segundo. Essa observação indica fortemente que esse método é melhor para esses intervalos curtos (até 48 horas).

3.2 Segundo método de análise: Análise das Componentes Principais (PCA)

Antes de descrever o processo de análise em componentes principais propriamente dito, é muito importante ter um breve conhecimento do que são as matrizes de covariância e correlação utilizadas no processo e como obtê-las. Os dados obtidos de um experimento observados em uma curva (figura 13) podem ser armazenados em uma matriz, em particular nesse caso dos espectros de fluorescência onde cada espectro é composto por um conjunto de pontos de intensidade em função do comprimento de onda é comum a representação matricial de um espectro, conforme mostra o quadro 3.

Figura 13: Espectro de fluorescência da pele de um rato *in vivo* representado graficamente

Intensidade	27.598	30.643	33.988	37.789	...	...	199.963	198.497
Comp. Onda	540.09	540.43	540.77	541.11	...	...	749.55	749.86

Quadro 3: Valores dos pontos que formam o espectro de fluorescência representados de forma matricial

O que estamos buscando é um método de analisar a variação da forma do espectro em função da degradação do tecido devido à decomposição, isto é, os processos pós-morte. A variação que pode ocorrer num espectro nada mais é que uma mudança no valor da intensidade para determinados comprimentos de onda em várias proporções que podem ser distintas. Dessa forma, cada comprimento de onda é uma variável que assume valores que dependem do momento e do tecido em que o espectro foi obtido. Nesse nosso equipamento utilizado para obtenção dos espectros temos um total de 638 pontos, e, portanto 638 variáveis. Queremos saber então, como as mudanças dessas 638 variáveis estão correlacionadas com o tempo pós-morte. O conjunto de todas as medidas realizadas forma então uma matriz de dados “Q” (figura 14).

O diagrama ilustra a estrutura de uma matriz de dados 'Q'. A matriz é representada por uma grade de células. As colunas são rotetadas no topo como 'Variável 1', 'Variável 2', seguida de pontos de reticência, e 'Variável n'. As linhas são rotetadas à esquerda como 'Horário 1', 'Horário 2', seguida de pontos de reticência, e 'Horário n'. A grade contém 10 colunas e 10 linhas, representando as medições de intensidade para cada variável em cada horário.

	Variável 1	Variável 2	...	...	Variável n
Horário 1					
Horário 2					
⋮					
Horário n					

Figura 14: Representação da disposição de todos dados de forma matricial

Nesse momento é interessante observar que devemos normalizar os nossos dados caso as medidas tenham sido realizadas em condições distintas como, por exemplo, o tempo de integração ao qual o espectrofotômetro expôs o sensor para fazer a medida de intensidade luminosa. É importante notar que a forma com que se faz a normalização dos dados influencia fortemente os resultados finais obtidos, uma vez que dependendo do método utilizado esse processo pode modificar a correlação entre as variáveis. O método escolhido aqui para a normalização dos dados foi o de tomar o valor de um comprimento de onda fixo e fazer com

que nesse valor todos os espectros tivessem intensidade igual a um, e assim os demais pontos do espectro sofrem uma mudança de valor na mesma proporção deste. O comprimento de onda escolhido foi o valor correspondente ao de maior intensidade de fluorescência quando medido num animal com tempo de óbito igual a zero, sendo esse valor igual a 597nm e 488nm para os espectros obtidos com excitação em 532nm e 408nm respectivamente.

Após a normalização dos dados fazemos então uma transformação na nossa matriz da seguinte maneira:

$$X_{ij} = \left(\frac{q_{ij} - \bar{q}_j}{\sigma_j} \right) \quad (5)$$

Onde:

X_{ij} é o elemento da nossa nova matriz de dados;

q_{ij} é o elemento da matriz de dados correspondente a i-ésima medida da variável j;

$\bar{q}_j$ é o valor médio da variável j;

σ_j é o desvio padrão da variável j;

Essa transformação (autoescalonamento) tem como finalidade expressar cada variável em termos das variações inerentes ao sistema. Essa modificação na apresentação dos dados mantém a informação estatística do sistema e transforma as variáveis de tal forma que agora possuam valor médio nulo e desvio padrão igual a um (33,35). Esse exemplo de transformação citado acima e utilizado no processamento dos dados é uma das possíveis transformações a serem realizadas.

Se X é a nossa nova matriz de dados, composta pelos elementos X_{ij} da equação 5, então a matriz de correlação R formada pelos coeficientes de correlação desses dados fica da seguinte maneira:

$$R = X^T \cdot X \quad (6)$$

E os elementos da matriz R são dados por (31,36):

$$r_{jj'} = \sum_{i=1}^n x_{ij} x_{ij'} = \sum_{i=1}^n \frac{(q_{ij} - \bar{q}_j) \cdot (q_{ij'} - \bar{q}_{j'})}{\sigma_j \cdot \sigma_{j'}} \quad (7)$$

Os valores $r_{jj'}$ são então uma covariância padronizada entre -1 e 1. É interessante observar que essa matriz é Hermitiana (simétrica, no caso de variáveis reais, que é o nosso caso). Podemos ainda verificar que os elementos ao longo da diagonal principal da matriz de correlação (elementos em que $j=j'$) correspondem à variância da variável q_j (37,38). Como observado anteriormente, a matriz de correlação R é Hermitiana e, portanto os seus autovalores são reais e positivos e seus autovetores são ortogonais.

Ao diagonalizar a matriz de correlação encontramos os seus autovalores representados pela matriz K e seus autovetores pela matriz V:

$$K = \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \lambda_2 & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & 0 \\ 0 & 0 & \dots & \lambda_n \end{bmatrix} \quad V = \begin{bmatrix} \uparrow & \uparrow & \uparrow & \dots & \uparrow \\ v_1 & v_2 & v_3 & \dots & v_n \\ \downarrow & \downarrow & \downarrow & \dots & \downarrow \end{bmatrix}$$

Como a matriz que diagonalizamos era uma matriz de correlação, com elementos proporcionais ao desvio padrão, temos que o resultado encontrado é uma nova base formada pelo conjunto dos autovetores de R de tal forma que cada autovetor represente uma parte da variância total, e parte essa que é única de cada autovetor, uma vez que eles são ortogonais entre si. Cada λ_i na matriz K corresponde então a variância total dos dados explicado por cada autovetor v_i , e portanto, através desses autovalores podemos determinar quais componentes principais (ou qual componente da nova base formada pelos autovetores) explicam a maior

quantidade dos dados e com que proporção pela simples relação do valor de cada autovalor dividido pela soma de todos os autovalores, isto é $\lambda_i / \sum \lambda_i$.

Uma vez encontrada a base que maximiza as variâncias do conjunto de dados, o que fazemos é “projetar” os dados nessa base:

$$S = V \cdot Q \quad (8)$$

Onde S é o conjunto de dados projetados na nova base e é conhecida como *score*.

Essa transformação de base dos dados da matriz X na matriz S pela base que maximiza as variâncias é conhecida como Transformação de Karhunen-Loève (37).

A matriz dos *scores* representa então os dados nessa nossa nova base e fica da seguinte forma:

	PC1	PC2	...	...	PCn
Horário 1					
Horário 2					
⋮					
Horário n					

Figura 15: Representação da disposição dos dados na nova base

Agora, ao invés da análise dos dados ser feita na base das variáveis que eram definidas como sendo o valor da intensidade em cada comprimento de onda, analisamos no espaço das variâncias desses valores. Essa mudança de dados permite uma redução muito significativa da dimensão em que os dados são analisados, uma vez que em poucas dimensões (ou poucas componentes principais) podemos observar a maior parte das informações dos dados. Tomando o caso deste experimento como exemplo, quando fazemos uma análise na faixa de emissão de

fluorescência pela excitação do laser verde obtemos como medida a intensidade de fluorescência em 638 valores de comprimentos de onda, isto é, temos 638 variáveis a serem analisadas. Quando calculamos as componentes principais desse sistema podemos representar em torno de 90% das informações do sistema, isto é, do espectro obtido, em apenas duas componentes dessa nova base. Portanto o gráfico das componentes principais (PC1 *versus* PC2) nos fornece um ponto de vista muito privilegiado para a análise dos dados do que nas 638 dimensões que tínhamos anteriormente. Em outras palavras, temos uma redução bastante significativa do número de variáveis analisadas, neste caso específico, os comprimentos de onda que trazem a mesma informação são considerados uma única vez e aqueles que não apresentam nenhuma correlação podem ser descartados.

Um gráfico típico de PC1 *versus* PC2 é mostrado abaixo, obtido de medições de 40 espectros fluorescência da pele de cada rato no conjunto de 7 ratos num experimento com uma medição diária por 4 dias consecutivos. Cada ponto representa um espectro de fluorescência coletado.

Figura 16: Componente principal 1 *versus* Componente principal 2

Vemos que as medidas realizadas em cada dia se agrupam, como era de se esperar, pois os espectros de fluorescência obtidos no mesmo dia são mais semelhantes entre si que os

espectros obtidos em dias distintos. A partir desses conjuntos de pontos que caracteriza cada intervalo pós-morte podemos utilizar vários métodos matemáticos para a determinação do tempo de óbito, como será explanado mais a diante.

O princípio básico da análise das componentes principais já foi descrito anteriormente, porém, é preciso ressaltar que esse método apresenta algumas pequenas variações devido as possíveis formas distintas de se obter matrizes de covariância que podem ser diagonalizadas. Para a realização desse estudo utilizamos duas maneiras de obter as componentes principais. Um primeiro conjunto de componentes principais, que chamamos de “PCA próprio”, foi obtido seguindo o método já descrito anteriormente, e um segundo conjunto de componentes principais, que chamamos de “PCA Matlab” foi obtido a partir de um pacote matemático disponível no software científico Matlab7[®], cujos cálculos explícitos das matrizes de covariância não estão disponíveis aos usuários. Vamos apresentar a seguir os resultados obtidos quando calculamos as componentes principais a partir dos espectros de fluorescência, sendo que estamos utilizando apenas as duas maiores componentes, uma vez que representam mais de 90% dos dados. As possíveis maneiras de como determinar o intervalo pós-morte através das componentes principais para cada um dos dois métodos é específico para cada método e será explicado em cada conjunto de resultados apresentado.

3.2.1 Método “PCA próprio”, com excitação 532nm, normalizado em 597nm

Os espectros de fluorescência foram obtidos pela excitação com laser de comprimento de onda de 532nm, e estes foram normalizados pelo pico de maior intensidade no intervalo pós-morte de 0 horas. Após todo o processo matemático, cada um dos 280 espectros por horário é representado por um ponto no diagrama de PC1 *versus* PC2.

Figura 17: PC1 *versus* PC2 dos espectros no intervalo de 0 à 96 horas pós-morte

É possível ver da figura 17 que as medidas relativas ao mesmo intervalo pós-morte se agrupam em torno de uma região, o que é uma das características que se espera obter de uma análise em componentes principais, onde amostras semelhantes se agrupem numa mesma região e amostras distintas se mantenham espaçadas nesse espaço de PC1 *versus* PC2. Pode-se notar também nessa forma de análise que os conjuntos de pontos relativos a um mesmo intervalo pós-morte apresentem uma dispersão, pois como já foi observado anteriormente, existe variação nos espectros para medidas obtidas em um mesmo horário mostrando, portanto, que estes resultados estão em total concordância com os resultados anteriores.

Desse gráfico podemos ver claramente que o conjunto de pontos relativos aos horários de 0 hora e 24 horas se separam muito bem entre si e dos demais grupos, o que é muito importante, pois isso indica que para esses horários ocorre uma grande variação no tecido e, portanto é possível distinguir esses grupos, o que não ocorre com os grupos relativos aos

horários acima de 72 horas, onde existe uma sobreposição de pontos que faz com que haja uma incerteza maior nos resultados.

3.2.1.1 Determinação do tempo de óbito através da contagem de pontos em cada região

Para uma melhor visualização dos dados e desenvolvimento de um método para determinar o intervalo pós-morte para o grupo de validação, onde esse valor é dado como sendo desconhecido para um animal a ser testado, traçamos limites ao redor dos pontos criando regiões referentes ao intervalo pós-morte, apresentado na figura 18.

Figura 18: Regiões representativas dos pontos obtidos dos espectros para cada horário

A partir dessas regiões definidas podemos determinar uma probabilidade de uma medida que é realizada em um animal cujo intervalo pós-morte é desconhecido pertencer a um desses determinados grupos. A idéia se baseia em primeiramente fazer um conjunto de medidas de espectros de fluorescência, que quando representados nessa base já determinada pelo banco de dados, será representado por um ponto. A seguir fazemos uma contagem do total de pontos que

incide dentro de uma região qualquer, e posteriormente calculamos a razão entre o número de pontos no interior de cada região individual e esse número total, fornecendo a proporção de pontos de cada região, que pode ser interpretada como a probabilidade de o animal pertencer a cada um desses grupos.

A seguir apresentamos os resultados obtidos para cada animal do grupo de validação nesses determinados intervalos pós-morte, quando comparados com as regiões obtidas dos animais do grupo *training* que geraram esse banco de dados formado por essas regiões (figura 19 à figura 23).

Figura 19: Validação das componentes principais de dois animais para o intervalo pós-morte igual a 0 hora

Figura 20: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 24 horas

Figura 21: Validação das componentes principais de dois animais para o intervalo pós-morte igual a 48 horas

Figura 22: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 72 horas

Figura 23: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 96 horas

Para os animais do grupo de validação é muito claro que os pontos correspondentes a cada horário testado se sobrepõem, pelo menos em parte e para quase todos os animais, com a região correspondente ao mesmo intervalo pós-morte gerado pelo grupo *training*, com algumas exceções, como por exemplo, o 1º e o 4º animal testados do horário 96 horas. Esses resultados mostram que existe uma grande semelhança entre os dois resultados, o do grupo de *training* e o de validação, levando a uma confirmação do princípio.

A partir desses dados e do processo de contagem de pontos descrito acima, calculamos as probabilidades dos animais pertencerem a cada intervalo pós-morte, mostrado nos quadros 4 ao quadro 8.

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)
0	97.5	99,2
24	2.5	0.8
48	0	0
72	0	0
96	0	0

Quadro 4: Validação para 0 hora com as probabilidades calculadas para cada intervalo pós-morte

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)	Prob. Anim3 (%)	Prob. Anim4 (%)
0	2.3	6	16.5	0
24	54.5	72.5	59.5	53.4
48	38.1	20.9	22.5	45.7
72	5.1	0.6	1.5	0.9
96	0	0	0	0

Quadro 5: Validação para 24 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)
0	1.6	0
24	39.2	1.4
48	43.5	31
72	15.7	36.1
96	0	31.5

Quadro 6: Validação para 48 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)	Prob. Anim3 (%)	Prob. Anim4 (%)
0	0	4.1	0	2
24	8.1	36.4	0	4.3
48	38.3	39.4	31.5	40
72	37.7	19.3	34.1	40.8
96	15.9	0.8	34.4	12.9

Quadro 7: Validação para 72 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)	Prob. Anim3 (%)	Prob. Anim4 (%)
0	0	0	0	1.1
24	3.1	1.4	0	3.1
48	45.8	38	23.6	27.6
72	45.4	41.2	38.2	52.6
96	5.7	19.4	38.2	15.6

Quadro 8: Validação para 96 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

Conforme poderíamos concluir desde os dados do grupo *training* (figuras 17 e 18), os horários de IPM igual a 0 hora e 24 horas devem ser os horários de melhor concordância entre

os valores de IPM estimado e o valor real, devido ao fato desses grupos apresentarem uma menor sobreposição com o conjunto de todos os horários no plano PC1 *versus* PC2. Essa conclusão é confirmada quando observamos os animais do grupo de validação, onde todos os animais com IPM igual a 0 hora e 24 horas tiveram a maior probabilidade calculada nos respectivos horários que correspondem a esse valor real. Analisando somente esses dois IPM, como todos os animais foram previstos corretamente obtemos, portanto um acerto de 100%.

Podemos concluir também, que para os IPM iguais a 0, 24 e 48 horas, as probabilidades são centradas nos valores reais de intervalo pó-morte de forma que os valores possuem baixa dispersão, isto é, as probabilidades são muito altas próximas do horário real e praticamente nulas (senão nulas para a maioria desses casos) para os horários distantes destes. Esse fato não se repete para os IPM de 72 e 96 horas, onde vemos que a distribuição das probabilidades é relativamente mais larga.

Devido a grande dispersão dos dados e sua sobreposição, os animais testados para intervalos pós-morte longos (72 horas e 96 horas) não se mostraram como sendo totalmente previsíveis. Porém, mesmo a maior probabilidade calculada não sendo referente ao valor correspondente ao horário real, podemos ver que esse valor de máxima probabilidade foi se deslocando em função do tempo, fazendo com que as probabilidades dos IPM menores fossem diminuindo e até mesmo se anulando para alguns animais (1º e 3º animal do horário 72 horas, e o 1º, 2º e 3º animal do horário 96 horas).

3.2.1.2 Determinação do IPM através de um “fit linear” dos centros dos grupos

A partir dos dados do grupo *training* representado nas duas maiores componentes principais podemos calcular os centros de cada um desses grupos, com a finalidade de tornar

mais evidente a evolução temporal da posição desses grupos e assim observar um padrão (figura 24).

Figura 24: Representação dos centros das componentes principais

Da representação dos centros dos grupos podemos ver claramente que embora haja uma dispersão muito grande do conjunto de pontos composto por todas as medidas, quando observamos o centro de cada grupo fica evidente que existe uma grande correlação entre eles e o tempo, pois existe um comportamento linear entre PC1 e PC2 conforme o intervalo pós-morte aumenta.

Propomos um método para calcular o IPM pela posição dos grupos nos intervalos determinados na fase *training*, mas que diferentemente do método da contagem dos pontos por região forneça uma equação da posição do ponto em função do tempo, de forma que ao invés de se obter probabilidades para os horários pré-definidos pode-se encontrar um valor do IPM para um horário intermediário. O método consiste em uma análise dos centros dos grupos, onde traçamos a melhor reta que passa por esses pontos (figura 24) e então projetamos os centros de

cada grupo sobre essa reta de forma que o ponto será projetado na posição sobre a reta que minimiza a sua distância desta, conforme o exemplo na figura 25.

Figura 25: Projeção dos centros dos grupos na melhor reta que passa pelo conjunto de centros

A partir dos centros dos grupos projetados sobre a reta calculamos então a distância entre cada projeção de centro sobre a reta com a origem, isto é, a projeção do centro do grupo referente ao IPM de 0 hora, e assim podemos traçar uma curva da distância das projeções dos centros em função do tempo, o que nos fornece o gráfico representado na figura 26.

Figura 26: Evolução temporal da distância entre os centros dos grupos pelo método PCA Próprio

É evidente, pela figura 26, que existe uma grande linearidade entre as distâncias das projeções dos centros e o intervalo pós-morte. Dessa maneira, é perfeitamente possível correlacionar a posição de um ponto nesse plano PC1 *versus* PC2 de uma medida de um animal que não faz parte desse grupo *training* com o tempo, o que é realizado com o grupo de validação para a verificação desse modelo.

Dessa curva acima obtivemos então a seguinte relação entre a distância dos centros dos grupos e o intervalo pós-morte:

$$IPM = (31,5D - 2,6) \quad (9)$$

$$\Delta IPM = (4,6D + 8,2) \quad (10)$$

Onde:

IPM = intervalo pós-morte;

D = distância das projeções dos centros dos grupos na melhor reta que passa pelo conjunto de pontos, calculado pelo método dos mínimos quadrados;

Δ IPM = erro propagado no cálculo do intervalo pós-morte;

Então, repetindo o procedimento de projeção dos centros dos grupos de PC's medidos agora para o grupo de validação, mas com centros projetados sobre a reta obtida pelo grupo *training*, é possível obter através do valor da distância do ponto projetado ao ponto relativo ao tempo inicial (0 hora) o valor do IPM para cada animal.

Com o nosso grupo de validação encontramos os tempos de óbito por esse método descrito, e os resultados são mostrados no quadro 9.

IPM Real (h)	IPM Calculado (h)	Erro propagado (h)
0 hora Anim1	17	11
0 hora Anim2	24	12
24 horas Anim1	17	11
24 horas Anim2	9	10
24 horas Anim3	24	12
24 horas Anim4	22	12
48 horas Anim1	35	9
48 horas Anim2	60	9
72 horas Anim1	89	10
72 horas Anim2	39	14
72 horas Anim3	82	21
72 horas Anim4	55	17
96 horas Anim1	55	17
96 horas Anim2	64	18
96 horas Anim3	82	21
96 horas Anim4	56	17

Quadro 9: Tempo de óbito do grupo de teste determinado pelo método da distância entre os centros dos grupos das componentes principais

Pode-se concluir desses dados que conforme o tecido analisado é pertencente a um intervalo pós-morte maior, o valor obtido pelo método também aumenta, mostrando que o método é eficiente em detectar as variações na composição das amostras. Embora alguns valores

obtidos possam parecer muito discrepantes em relação ao valor real, alguns resultados estão próximos do valor verdadeiro quando se observa a margem de erro.

Como já era esperado tanto pela equação 10 quanto pelos argumentos já apresentados anteriormente referente às variações do tecido em função do tempo, o erro propagado tende a ser maior com o tempo, o que é observado nesse conjunto de dados e através da variável D , distância dos centros, que vai aumentando em relação à origem com o passar do tempo e, portanto aumentando o erro propagado.

Podemos determinar a eficiência do método levando em conta a incerteza no valor do IPM obtido, e verificando se os valores reais estão dentro desse limite determinado. Para esse método, com os resultados obtidos do quadro 9, concluímos que em 37.5% dos valores obtidos o valor real está dentro da faixa determinada.

3.2.2 Método “PCA Matlab”, com excitação 532nm, normalizado em 597nm

Os espectros de fluorescência utilizados são os mesmos do cálculo pelo método “PCA Próprio”, porém os componentes principais foram calculados pelos pacotes do software Matlab[®]. Cada um dos 280 espectros por horário é representado por um ponto no diagrama de PC1 versus PC2 abaixo.

Figura 27: PC1 versus PC2 dos espectros no intervalo de 0 à 96 horas pós-morte

É possível ver da figura 27 que as medidas relativas ao mesmo intervalo pós-morte também tendem a se agrupar em torno de uma região, embora haja uma grande sobreposição de pontos relativos a grupos distintos, de forma semelhante ao que observamos pela análise através do método de “PCA Próprio”. Porém, nesse método de calcular as componentes principais (“PCA Matlab”), vemos que essa sobreposição dos grupos é maior, o que implica numa maior dificuldade de distinção e classificação de pontos pertencentes a um horário a ser determinado no grupo de validação.

Desse gráfico podemos ver que apesar da sobreposição existe uma menor dispersão do conjunto de todos os grupos em torno da direção que os dados tendem a se propagar em função do tempo, tendendo a um agrupamento mais próximo de um comportamento linear, o que fica mais evidente quando observamos a representação dos centros de cada grupo, conforme é mostrado adiante.

3.2.2.1 Determinação do tempo de óbito através da contagem de pontos em cada região

Novamente determinamos curvas ao redor dos pontos no plano de PC1 versus PC2 criando regiões referentes ao horário pós-morte, apresentado na figura 28.

Figura 28: Regiões representativas dos pontos obtidos dos espectros para cada horário

A seguir apresentamos os resultados obtidos para cada animal do grupo de validação nesses determinados intervalos pós-morte, quando comparados com as regiões obtidas dos animais do grupo *training* que geraram esse banco de dados formado por essas regiões (figura 29 à figura 33).

Figura 29: Validação das componentes principais de dois animais para o intervalo pós-morte igual a 0 hora.

Figura 30: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 24 horas.

Figura 31: Validação das componentes principais de dois animais para o intervalo pós-morte igual a 48 horas.

Figura 32: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 72 horas.

Figura 33: Validação das componentes principais de quatro animais para o intervalo pós-morte igual a 96 horas.

Para os animais do grupo de validação vemos novamente que os pontos correspondentes a cada horário se sobrepõem, pelo menos em parte, com a região correspondente ao mesmo intervalo pós-morte gerado pelo grupo de *training*, mostrando que existe uma grande semelhança entre os dois resultados, o do grupo de *training* e o de validação.

A partir desses dados e do processo de contagem utilizado no método anterior calculamos as probabilidades das medidas dos animais pertencerem a cada intervalo pós-morte, mostrado nos quadros 10 ao 14.

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)
0	53.8	58.9
24	46.2	41.1
48	0	0
72	0	0
96	0	0

Quadro 10: Validação para 0 hora com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)	Prob. Anim3 (%)	Prob. Anim4 (%)
0	33.7	38.5	33.1	33.1
24	32.8	37.8	33.1	33.1
48	27.3	22.7	33.1	33.1
72	1.8	0.3	0	0
96	4.4	0.7	0.7	0.7

Quadro 11: Validação para 24 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)
0	26	7.6
24	28	13.1
48	30.3	34.5
72	3	17.8
96	12.7	27

Quadro 12: Validação para 48 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

IMP (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)	Prob. Anim3 (%)	Prob. Anim4 (%)
0	7.3	20.2	0	8.5
24	1.9	23.8	0.4	3.2
48	32.4	28.8	24.2	32
72	29.2	8.2	33.7	28.3
96	29.2	19	41.7	28

Quadro 13: Validação para 72 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

IPM (h)	Prob. Anim1 (%)	Prob. Anim2 (%)	Prob. Anim3 (%)	Prob. Anim4 (%)
0	1.6	2.7	0	10.6
24	1.9	3.2	0	2.2
48	32.4	32	33.3	31.7
72	31.7	30.1	33.3	27.5
96	32.4	32	33.3	28

Quadro 14: Validação para 96 horas com as probabilidade calculadas para cada intervalo pós-morte

Analogamente ao método “PCA Próprio”, analisando as figuras 27 e 28, os horários de IPM igual a 0 hora e 24 horas devem ser os horários de melhor resultado devido a apresentarem

uma menor sobreposição com todos os conjuntos de horários no plano PC1 *versus* PC2. Essa conclusão é confirmada quando observamos que as distribuições de probabilidades estão centradas muito próximas dos respectivos valores reais de IPM. Novamente observamos que para esses dois horários, os valores possuem baixa dispersão, isto é, as probabilidades são muito altas próximas dos horários reais e praticamente nulas (senão nulas para a maioria desses casos) para os horários distantes destes.

A partir de 48 horas pode-se notar que a distribuição de probabilidades passa a ser mais larga, de forma que a incerteza no valor passa a ser maior, conforme já era esperado pela grande dispersão e sobreposição dos dados do grupo *training*, e das observações de inomogeneidade dos tecidos.

Os animais testados para intervalos pós-morte mais longos (72 horas e 96 horas) não se mostraram como sendo totalmente previsíveis. Porém, mesmo a maior probabilidade calculada nem sempre sendo referente ao valor correspondente ao horário real, podemos ver que esse valor de máxima probabilidade foi se deslocando em função do tempo, fazendo com que as probabilidades dos IPM menores como 0 hora e 24 horas fossem diminuindo e até mesmo se anulando para alguns animais (3º animal do horário 72 horas e o 3º animal do horário 96 horas).

3.2.2.2 Determinação do IPM através de um “fit linear” dos centros dos grupos

A partir dos dados do grupo *training* representado nas duas maiores componentes principais, pode-se calcular os centros de cada um desses grupos, da mesma forma como realizado anteriormente (figura 34).

Figura 34: Representação dos centros das componentes principais

Comparando esse resultado com o obtido pelo método “PCA Próprio” da figura 25 concluímos que este método “PCA Matlab” apresentou uma disposição de dados de tal forma que os centros dos grupos estão mais próximos da melhor equação de reta que se pode traçar por esse conjunto utilizando o método dos mínimos quadrados, o que mostra uma boa correlação entre a evolução temporal e a posição de cada grupo.

Novamente fazemos o procedimento onde traçamos a melhor reta que passa por esses pontos e então projetamos os centros de cada grupo sobre essa reta de forma que o ponto seja projetado na posição sobre a reta que minimiza a sua distância desta.

A partir dos centros projetados sobre a reta calculamos então a distância entre cada projeção de centro sobre a reta com a origem, isto é, a projeção do centro do grupo referente ao

horário 0 hora, e assim podemos traçar uma curva da distância das projeções dos centros em função do tempo, o que nos fornece o gráfico da figura 35:

Figura 35: Evolução temporal da distância entre os centros dos grupos pelo método PCA Matlab

É evidente, pela figura 35, que existe uma grande linearidade entre as distâncias das projeções dos centros e o intervalo pós-morte. Dessa maneira, é perfeitamente possível correlacionar a posição de um ponto nesse plano PC1 *versus* PC2 de uma medida de um animal que não faz parte desse grupo *training* com o tempo, o que novamente é realizado com o grupo de validação para a verificação desse modelo.

Dessa curva acima obtemos então a seguinte relação entre a distância dos centros dos grupos e o intervalo pós-morte:

$$IPM = (28,9D - 2,2) \quad (11)$$

$$\Delta IPM = (4,2D + 8,1) \quad (12)$$

Onde:

IPM = intervalo pós-morte;

D = distância das projeções dos centros dos grupos na melhor reta que passa pelo conjunto de pontos calculada pelo método dos mínimos quadrados;

ΔIPM = erro propagado no cálculo do intervalo pós-morte;

Então, repetindo o procedimento de projeção dos centros dos grupos de PC's medidos agora para o grupo de validação, mas com centros projetados sobre a reta obtida pelo grupo *training*, é possível obter através do valor da distância do ponto projetado ao ponto relativo ao tempo inicial (0 hora) o valor do IPM para cada animal.

Com o nosso grupo de validação encontramos os tempos de órbita por esse método descrito, e os resultados são mostrados no quadro 15.

IPM Real (h)	IPM Calculado (h)	Erro propagado (h)
0 hora Anim1	18	29
0 hora Anim2	25	38
24 horas Anim1	18	47
24 horas Anim2	9	49
24 horas Anim3	26	18
24 horas Anim4	23	18
48 horas Anim1	38	21
48 horas Anim2	44	58
72 horas Anim1	61	36
72 horas Anim2	41	27
72 horas Anim3	81	32
72 horas Anim4	57	35
96 horas Anim1	57	19
96 horas Anim2	65	39
96 horas Anim3	84	17
96 horas Anim4	58	31

Quadro 15: Tempo de órbita do grupo de teste determinado pelo método da distância entre os centros dos grupos das componentes principais

Como já era esperado tanto pela equação 12 quanto pelos argumentos já apresentados anteriormente referente às variações do tecido em função do tempo, o erro tende a ser maior com o tempo, o que é observado nesse conjunto de dados de através da variável D, distância dos centros, que vai aumentando em relação à origem com o passar do tempo, e, portanto aumentando o erro propagado.

Conforme previsto, a incerteza no valor determinado para o intervalo pós-morte é maior para esse método “PCA Matlab” do que para o método “PCA Próprio” devido a maior sobreposição dos grupos quando analisamos as duas maiores componentes principais.

Mesmo tendo uma incerteza relativamente grande no valor do IPM obtido, o quadro 15 mostra que a maioria dos resultados obtidos (81%) abrange o valor real.

3.2.3 Método “PCA próprio”, com excitação em 408nm, normalizado em 488nm

Calculamos as componentes principais para os espectros de fluorescência que foram obtidos pela excitação com laser de 408nm. Esse experimento é mesmo que o demonstrado anteriormente com as medidas realizadas no mesmo horário, com os mesmo animais, com a única diferença do laser de excitação que foi utilizado. As duas maiores componentes principais são mostradas na figura 36.

Figura 36: As duas maiores componentes principais (PC1 versus PC2), para os espectros de fluorescência obtidos a partir da excitação com laser de 408nm

Vemos que num gráfico das duas maiores componentes principais (PC1 versus PC2) cada grupo possui uma tendência em seguir um comportamento linear, diferente do que observamos quando encontramos as componentes principais para o mesmo experimento com o laser de excitação em 532nm. Observamos ainda que esse comportamento linear possui uma tendência de todos os grupos passarem por um ponto em comum. Para cada grupo de um único horário pós-morte composto da medida realizada de 7 animais fizemos o cálculo da melhor reta que passa pelo conjunto de dados. Após encontrarmos a equação da melhor reta para todos os horários individuais, encontramos o ponto que estaria em comum com todas as retas, isto é, o ponto para onde todas as retas convergiriam através de um método matemático que consiste em encontrar um ponto desse espaço, onde estão as 5 equações de reta (dos 5 horários pós-morte), que minimiza a soma das distâncias ao quadrado desse ponto e cada reta, dada pela seguinte equação:

$$d_1^2 = (x - x_0)^2 + (y_1 - y_0)^2 \quad (13)$$

$$d_2^2 = (x - x_0)^2 + (y_2 - y_0)^2 \quad (14)$$

$$d_3^2 = (x - x_0)^2 + (y_3 - y_0)^2 \quad (15)$$

$$d_4^2 = (x - x_0)^2 + (y_4 - y_0)^2 \quad (16)$$

$$d_5^2 = (x - x_0)^2 + (y_5 - y_0)^2 \quad (17)$$

Onde temos que: $y_n = a_n \cdot x + b_n$ são as equações das retas;

x_0 e y_0 são as coordenadas do ponto que estamos procurando;

d_n^2 é a distância ao quadrado da distância euclidiana do ponto à reta;

Fazemos então a soma das distâncias ao quadrado:

$$F = d_1^2 + d_2^2 + d_3^2 + d_4^2 + d_5^2 \quad (18)$$

E determinamos os valores de x_0 e y_0 que minimizam essa soma:

$$x_0 = - \frac{-a_4(b_1 + b_2 + b_3 + b_5) - a_2(b_1 + b_3 + b_4 + b_5) - a_5(b_1 + b_2 + b_3 + b_4)}{2[-a_4(a_1 + a_2 + a_3 + a_5) - a_1a_3 - a_5a_3 - a_5a_1 - a_2(a_1 + a_3 + a_5) + \sum_{n=1}^5 a_n^2]} + \frac{-a_1(b_2 + b_3 + b_4 + b_5) - a_3(b_1 + b_2 + b_4 + b_5) + 4\sum_{n=1}^5 a_n b_n}{2[-a_4(a_1 + a_2 + a_3 + a_5) - a_1a_3 - a_5a_3 - a_5a_1 - a_2(a_1 + a_3 + a_5) + \sum_{n=1}^5 a_n^2]} \quad (19)$$

$$\begin{aligned}
y_0 = & \frac{a_4^2(b_1 + b_2 + b_3 + b_5) - a_2(a_5b_5 + a_1b_1 + a_3b_3 + a_3b_2) + a^2(b_3 + b_4 + b_5)}{2[-a_4(a_1 + a_2 + a_3 + a_5) - a_1a_3 - a_5a_3 - a_5a_1 - a_2(a_1 + a_3 + a_5) + \sum_{n=1}^5 a_n^2]} + \\
& \frac{a_2^2b_1 + a_3^2(b_1 + b_2 + b_4 + b_5) - a_4(a_5b_4 + a_2b_4 + a_5b_5 + a_1b_1 + a_2b_2 + a_3b_3 + a_3b_4 + a_1b_4) +}{2[-a_4(a_1 + a_2 + a_3 + a_5) - a_1a_3 - a_5a_3 - a_5a_1 - a_2(a_1 + a_3 + a_5) + \sum_{n=1}^5 a_n^2]} + \\
& \frac{a_5^2(b_1 + b_2 + b_3 + b_4) + a_1^2(b_2 + b_3 + b_4 + b_5) - a_2b_2(a_1 + a_5)}{2[-a_4(a_1 + a_2 + a_3 + a_5) - a_1a_3 - a_5a_3 - a_5a_1 - a_2(a_1 + a_3 + a_5) + \sum_{n=1}^5 a_n^2]} + \\
& \frac{-a_5(a_1b_5 + a_3b_3 + a_3b_5 + a_1b_1) - a_1a_3(b_1 + b_3)}{2[-a_4(a_1 + a_2 + a_3 + a_5) - a_1a_3 - a_5a_3 - a_5a_1 - a_2(a_1 + a_3 + a_5) + \sum_{n=1}^5 a_n^2]} \quad (20)
\end{aligned}$$

Uma vez determinado x_0 e y_0 , analisamos separadamente cada grupo referente a medida realizada em um mesmo horário post-mortem e separando ainda esse grupo por animais e calculamos a melhor reta que passa pelo conjunto de pontos de um único animal e que passa por x_0 e y_0 . Essas retas estão mostradas nas figuras abaixo:

Figura 37: Componentes principais para 0 Hora e 24 Horas separados para cada animal

Figura 38: Componentes principais para 48 Horas e 72 Horas separados para cada animal

Figura 39: Componentes principais para 96 Horas separados para cada animal

Para cada intervalo pós-morte temos então 7 equações de reta. Fazemos então o cálculo do valor médio do coeficiente angular dessas retas para cada horário, obtendo o resultado do quadro 16.

IPM (h)	Coef. Angular	Desvio_coef.
0	0.1691	0.02729
24	0.2457	0.04
48	0.3406	0.04704
72	0.4084	0.02377
96	0.4534	0.00492

Quadro 16: Valor médio dos coeficientes angulares para cada intervalo pós-morte

Então é possível correlacionar o intervalo pós-morte do animal com o coeficiente angular da melhor reta que passa pelo conjunto de pontos do gráfico de PC1 *versus* PC2 que passa por esse ponto comum a todos os grupos. O valor do coeficiente angular médio em função do intervalo pós-morte é mostrado na figura 40.

Figura 40: Variação temporal do coeficiente angular médio obtido das componentes principais pelo método PCA Próprio com excitação em 408nm

Vemos do resultado expresso na figura 40 uma dependência linear no valor do coeficiente angular em função do tempo. Dessa forma, podemos determinar o IPM dos animais do grupo de validação utilizando uma equação linear determinada por esse conjunto de pontos obtidos do grupo *training*. A equação que determina o intervalo pós-morte em função do

coeficiente angular com o erro propagado é fornecido pela equação 21 e equação 22 respectivamente:

$$IPM = (327,87Coef_ang - 58,09) \quad (21)$$

$$\Delta IPM = (22,93Coef_ang + 327,87\Delta Coef_ang + 0,05) \quad (22)$$

Onde:

IPM = intervalo pós-morte;

Coef_ang = valor do coeficiente angular de PC1 versus PC2;

ΔIPM = erro propagado no cálculo do intervalo pós-morte;

$\Delta Coef_ang$ = imprecisão no cálculo do coeficiente angular de PC1 versus PC2;

Para o grupo de validação os valores de tempo de órbita com o erro propagado encontrados seguindo as equações acima estão dispostos no quadro 17.

IPM Real (h)	Tempo de órbita (h)	Erro propagado (h)
0 hora Anim1	-7	5
0 hora Anim2	0	6
24 horas Anim1	56	11
24 horas Anim2	54	9
24 horas Anim3	47	8
24 horas Anim4	35	7
48 horas Anim1	57	9
48 horas Anim2	51	10
72 horas Anim1	86	11
72 horas Anim2	83	11
72 horas Anim3	99	12
72 horas Anim4	79	11
96 horas Anim1	82	11
96 horas Anim2	90	11
96 horas Anim3	88	11
96 horas Anim4	79	10

Quadro 17: Intervalo pós-morte determinado para o grupo de validação através das componentes principais obtidas pela espectros com excitação em 408nm

Podemos determinar a eficiência do método levando em conta a incerteza no valor do IPM obtido, e verificando se os valores reais estão dentro desse limite determinado. Para esse método, com os resultados obtidos do quadro 17 concluímos que em 50% dos valores obtidos, o valor real está dentro da faixa determinada.

Analisando os dados da figura 36 é de se esperar que a sobreposição dos grupos para os horários acima de 48 horas implique em uma maior imprecisão nos valores determinados, porém, observando os resultados do quadro 17 concluímos que tanto para intervalos curtos (de até 48 horas), como horários longos (acima de 48 horas) a taxa de acerto foi de 50%, sendo importante salientar que a margem de erro é praticamente a mesma em todos os intervalos e, portanto pode-se concluir desses resultados que o experimento se mostrou ser mais preciso para tempos superiores a 48 horas, o que apresenta uma aparente contradição. Porém, através de uma análise mais detalhada, através dos dados da figura 40 podemos ver que não há nenhuma contradição, pois fica bem claro que os desvios médios dos coeficientes angulares para os intervalos de 72 horas e 96 horas vão se tornando menor em função do aumento do tempo. Isso mostra que para esses intervalos pós-morte, as informações obtidas dos animais através dos espectros de fluorescência pela excitação com laser de 408nm apresentaram ser mais semelhantes entre si do que para os horários menores, acarretando em um aumento na precisão.

Porém, essa informação apenas indica que os animais são mais semelhantes entre si, mas não excluem o fato de os dados apresentarem variações em função do ponto de coleta, o que também pode ser observado pela dispersão dos dados da figura 36.

4. Conclusão

Através das observações diretas dos espectros de fluorescência pode-se concluir que muitos fatores estão presentes e interferindo em um experimento que envolve a observação da evolução da decomposição do tecido biológico. Os animais utilizados foram criados da mesma maneira, tratados igualmente com a mesma alimentação, sendo da mesma idade e aproximadamente do mesmo tamanho. Foram submetidos ao mesmo procedimento de sacrifício e após sua morte mantidos sob as mesmas condições ambientais, mas mesmo assim acabaram por mostrar nos resultados obtidos que apresentam uma variação antes mesmo do processo de decomposição se iniciar. Essas variações para cada indivíduo acabaram sendo detectadas pela técnica de espectroscopia de fluorescência, o que acabou interferindo nos experimentos e nos forçando a encontrar uma maneira matemática de conseguir identificar os diferentes padrões de comportamento espectral devido aos distintos fatores. A técnica mostrou-se sensível o suficiente para detectar também as variações teciduais de um mesmo indivíduo, que são provenientes da diferença da composição local do tecido onde se faz a análise, mostrando as variações espectrais em um mesmo animal, em um mesmo intervalo pós-morte, mesmo este tendo sido o horário inicial, onde ainda não ocorreu nenhuma modificação devido à decomposição.

Além de todos os fatores já descritos que influenciam os dados obtidos há um que não pode deixar de ser discutido e merece tanta atenção quanto aos demais por ser uma provável causa de inserção de erros e variações no experimento. Em experimentos anteriores foi verificado que a remoção do pêlo dos animais no instante que se determina o óbito torna a pele muito mais frágil nessa região. Esse fato implica em consequências indesejáveis, pois devido ao inchaço do abdômen devido os gases no interior do intestino do animal faz com que a camada mais externa da pele (exoderme) se rompa nessas regiões, expondo parte das camadas mais internas da pele (mesoderme), alterando todo o meio de análise. Nesses casos em que a pele é

removida no estágio inicial do experimento é possível observar uma modificação nessa região devido ao procedimento, através de ressecamentos e modificações visíveis da maleabilidade e estrutura da pele. Por esses motivos o pêlo somente foi removido momentos antes de se fazer a coleta dos espectros de fluorescência. Porém, a remoção total dos pêlos sem danificar a pele nem impregnar esta com algum resíduo que possa interferir no experimento é uma tarefa que não pode ser dita como sendo trivial. A remoção através de lâminas é insatisfatória, pois mantém na pele os pêlos, que mesmo sendo extremamente curtos são suficientes para emitir uma intensidade de fluorescência maior que a própria pele. A utilização de produtos químicos utilizados atualmente para a remoção de pêlos também foi descartada por oferecer o risco de alterar a pele ou permanecer impregnado nesta, alterando os dados a serem obtidos.

Nesse âmbito decidimos optar por seguir o procedimento de remoção manualmente, porém esse método também teve consequências de alterações na pele, pois nesse processo é possível que a remover os pêlos acabe acarretando em lesões no tecido, que acabam alterando as suas características superficiais. Outro problema nesse método é que a partir de aproximadamente 72 horas as características de resistência mecânica da pele estão alteradas de tal forma que ao remover o pêlo remove-se uma camada fina da superfície da pele junto, que também influencia em alterações nas medidas coletadas. Com a finalidade de remover esse fator do conjunto de fontes de erros temos como sugestão para trabalhos futuros a utilização de animais que apresentem uma quantidade muito reduzida de pêlos, como por exemplo, camundongos do tipo *Hairless*.

Além dessas variações que são inerentes ao sistema biológico, a variação dos espectros devido à evolução do processo de decomposição foi possível de ser detectada já no primeiro método de análise realizado, o método da razão entre os picos de emissão de fluorescência, onde foi possível determinar o IPM dos animais do grupo de validação com uma incerteza média de 12 horas e uma taxa de acerto maior para os horários inferiores a 48 horas. Essa forma de análise dos dados é muito importante também por apresentar através das dispersões nas

distribuições uma maneira diferente de observar a grande variação que ocorre entre os animais e entre os pontos de coleta. Podemos concluir ainda nesse método de análise, de acordo com as observações diretas na pele do animal (figura 7) e de acordo com o esperado, como que a decomposição não ocorre na mesma velocidade para todos os animais, assim como nem de maneira homogênea em um mesmo animal.

O método de análise das componentes principais também mostrou ser uma ferramenta matemática muito poderosa e importante para a análise dos espectros de fluorescência. Através das observações das componentes principais obtidas quando utilizamos o laser de 532nm para promover a excitação do compostos do tecido pode-se observar assim como no método descrito anteriormente, como que o processo de decomposição vai evoluindo no tempo, mostrando um aumento na dispersão dos grupos relativos a cada IPM, tanto para o método de “PCA Próprio” quanto no método “PCA Matlab”. A análise das componentes principais fornece também uma idéia da variação dos dados quanto ao animal em análise quanto ao ponto de coleta, uma vez que se esses fatores não existissem era de se esperar uma sobreposição de todos os pontos de um determinado horário, o que não ocorre.

Embora os dados representados por PC1 *versus* PC2 para o método “PCA Matlab” apresentem uma menor dispersão para cada horário isolado, o que é uma boa característica, ao mesmo tempo ele apresenta uma grande sobreposição de pontos de horários distintos, o que é ruim, mostrando que a distinção entre os espectros quanto ao IPM por esse método não é tão grande. Já no método “PCA Próprio”, apesar da dispersão dos pontos relativos a um mesmo horário ser relativamente grande, é possível distinguir melhor as regiões relativas a cada IPM, permitindo uma melhor separação e identificação dos grupos. Com base nessas observações o método “PCA Próprio” se mostrou se mais eficiente que o método “PCA Matlab”.

Analizando os resultados obtidos para a análise de determinação do intervalo pós-morte através da contagem de pontos em cada região das delimitada podemos confirmar a conclusão de que o método “PCA Próprio” foi mais eficiente que o método “PCA Matlab”, pois vemos

que a distribuição das probabilidades é mais estreita e centrada ao redor do valor real para o primeiro método do que para o segundo. Esse método de análise dos dados ofereceu resultados muito satisfatórios para os animais com intervalos pós-morte iguais a 0 hora e 24 horas, uma vez que as probabilidades obtidas apresentam valores muito alto para os respectivos horários que correspondem aos IPM reais, chegando a valores calculados superiores a 90% de probabilidade para alguns casos.

Através dos resultados obtidos no procedimento de determinação do intervalo pós-morte através de um “fit linear” dos centros dos grupos observamos que as incertezas nos valores calculados são muito altas e mesmo assim as taxas de acerto foram baixas, o que é consequência direta de o procedimento ter uma dependência muito grande da posição do centro de cada grupo correspondente a cada horário. Uma vez que os grupos apresentam uma dispersão muito grande, uma consequência direta é que a posição do centro apresente um desvio elevado, resultando que a análise seja imprecisa e acabe acarretando em um erro grande.

Tanto pelo método de análise da razão entre picos de emissão de fluorescência quanto pelo método de análise de componentes principais, para os espectros obtidos com excitação em 532nm, podemos concluir que ambos mostraram que a técnica de espectroscopia de fluorescência apresenta sensibilidade suficiente para distinguir o tecidos dos animais nos diferentes intervalos pós-morte entre 0 hora e 96 horas, e maior eficiência para os IPM de até 48 horas.

Quando analisamos os resultados obtidos pela análise dos espectros de fluorescência com excitação em 408nm através das análises de componentes principais obtemos um conjunto de dados com algumas características distintas dos obtidos com excitação em 532nm, mas também com algumas semelhanças. O método de obtenção dessas componentes principais foi o “PCA próprio”, onde foi possível reconhecer um padrão no conjunto de dados. Dentre as semelhanças podemos destacar o fato de que os conjuntos de pontos referentes a um mesmo intervalo pós-morte também se agruparam, além de estar arranjado de tal forma que é possível

diferenciar os grupos dos horários distintos nesse plano de PC1 *versus* PC2. Assim como verificado nas outras análises de componentes principais, nesta última também há uma maior sobreposição de dados para os horários superiores a 48 horas, o que indicaria a princípio uma imprecisão maior na determinação dos IPM nesses horários.

Uma análise das componentes principais para esses espectros fornece um resultado distinto dos analisados anteriormente quando se observa que nesse caso os pontos relativos a cada intervalo pós-morte apresenta um comportamento de distribuição de forma a ter uma tendência a se posicionar de forma linear, gerando assim uma reta para cada horário. Além de cada conjunto de pontos de cada horário ter esse comportamento linear é evidente que essas retas têm uma tendência a se encontrar em um ponto, isto é, têm um ponto em comum.

A diferença entre os resultados obtidos com a mudança do laser não se restringe apenas nesses comportamentos citados, ela se torna ainda maior quando observamos os resultados da validação realizada para esse método, onde nos deparamos com o fato de que a incerteza no valor calculado, obtida através do erro propagado, se mantém praticamente constante (em torno de 11 horas) para todos os valores obtidos e ao mesmo tempo a taxa de acerto nos valores sendo a mesma para IPM tanto inferiores quanto superiores a 48 horas. Essas observações permitem concluir que essa forma de análise é mais precisa para intervalos mais longos (maiores que 48 horas). Essa conclusão é contrária ao que se esperava quando analisamos a sobreposição desses grupos com esses intervalos pós-morte superiores a 48 horas.

Porém, a análise da dispersão dos coeficientes angulares mostrou que os dados obtidos dos vários animais para 72 horas e 96 horas eram mais parecidos entre si do que nos outros horários, o que explicaria como que a precisão pode ser maior para esses horários.

Essa diferença de resultados observada quando se utiliza as duas fontes de luz distintas pode ser explicada pelo fato de sabermos que modificando a fonte de luz responsável por promover a excitação das substâncias presentes no tecido, acabamos por modificar o conjunto das biomoléculas que emitem fluorescência que estão fazendo parte da análise, e dessa forma,

os compostos que podem ser observados com uma fonte de luz podem a passar despercebidos pela outra e vice-versa. Baseando-se nessa idéia é plausível a hipótese de que a partir de 72 horas algum (ou alguns) composto, que é excitado e emite fluorescência quando se utiliza luz com 408nm e não é excitado com 532nm, que estava presente desde o início começa a ser consumido pela decomposição nesse horário ou então que esse composto passe a ser liberado pelo processo de decomposição tornando-se presente em quantidade suficiente para ser detectado a partir desse horário.

Dessa última conclusão é possível observar que a variação no comprimento de onda do laser utilizado para promover a excitação foi responsável pela obtenção de um conjunto de dados e informações que são complementares e podem juntas fornecer uma melhor forma de se obter uma informação sobre o meio em análise e um melhor resultado para a determinação do tempo de óbito para esse intervalo de 0 hora até 96 horas.

Com a finalidade de situar os resultados aqui apresentados, vamos compará-los com os valores obtidos por outros métodos cronotanatognóticos da atualidade (9-17).

Método	Modelo Animal	IPM Analisado (h)	*Desvio (h)
Coloração de hipóstases	Humano	0 a 30	16
		0 a 72	24
Concentração de H-MRS no cérebro	Ovino	50 a 100	10
		100 a 200	50
Degradação protéica (Troponin I)	Bovino	0 a 10	9
		0 a 70	20
Degradação DNA	Humano	3 a 56	15
Integridade do RNA	Humano	0 a 40	10
Concentração de K⁺ no humor vítreo^{**}	Humano	0 a 30	10
Concentração de K⁺ no humor vítreo^{**}	Humano	0 a 133	23
Variação da impedância da pele^{**}	Ratos	0 a 120	27
Variação da impedância da pele^{**}	Ratos	0 a 504	240

Quadro 18: Métodos cronotanatognóticos atuais, com os respectivos modelos animais utilizados, IPM em que o trabalho foi realizado e seus valores de desvio nas medições feitas. * Resultados obtidos da interpretação dos dados fornecidos nos trabalhos publicados. ** Resultados obtidos de distintos trabalhos publicados

Observando as incertezas nos valores que são analisados em cada uma das técnicas citadas, podemos concluir que os resultados obtidos neste trabalho apresentam-se como sendo muito satisfatórios, uma vez em alguns dos experimentos realizados (como por exemplo, o método “PCA próprio”, com excitação em 408nm) os desvios nos valores obtidos chegam a ser inferiores a muitos destes trabalhos que foram tomados como referência, sendo o nosso valor da ordem de 10 horas para todo o intervalo pós-morte de 0 a 96 horas.

Com os resultados apresentados neste trabalho pode-se afirmar que dentro dos limites apresentados aqui, a técnica de espectroscopia de fluorescência possui a sensibilidade necessária para distinguir as variações na composição dos tecido dos animais devido ao processo de decomposição, sendo que através dos espectros obtidos essas variações podem ser quantificadas através dos métodos matemáticos demonstrados e assim determinar o intervalo pós-morte que é desconhecido.

Dessa forma, um experimento com possibilidade de grande sucesso e que daria continuidade deste trabalho seria uma análise que utilizasse um número muito maior de comprimentos de onda de excitação, técnica esta conhecida como multiexcitação, onde seria possível observar a emissão de fluorescência de um conjunto muito maior de compostos presentes no tecido e, portanto com muito mais informações, permitindo assim que a técnica tenha a possibilidade de ser aperfeiçoada para fornecer resultados mais precisos e que abranjam um intervalo pós-morte maior que o analisado aqui.

Referências

1. BADIZADEGAN, K., et al. Spectroscopic diagnosis and imaging of invisible pre-cancer. *Faraday Discussions*, v.126, p. 265-279,2004
2. WAGNIERES, G.A; STAR,W.M.; WILSON,B.C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochemistry and Photobiology*, v.68, n.5, p.603-32,1998.
3. LOSCHENOV, V.B., KONOV,V.I.; PROKHOROV,A.M. Photodynamic therapy and fluorescence diagnostics. *Laser Physics*, v.10, n.6,p.1188-1207,2000.
4. STOOKEY, G.K., The evolution of caries detection. *Dimensions of Dental Hygiene*, p. 12-14, october 2003.
5. MELLER, C., et al. A new in vivo method for measuring caries activity using quantitative light-induced fluorescence. *Caries Research*, v.40, n.2, p. 90-96, 2006.
6. FIGUEIREDO, A.C.R.; KURACHI,C.; BAGNATO,V.S. Comparison of fluorescence detection of carious dentin for different excitation wavelengths. *Caries Research*, v.39, n.5, p. 393-396, 2005.
7. MARCASSA, L.G., et al. Fluorescence spectroscopy applied to orange trees. *Laser Physics*, v.16, n.5, p. 884-888,2006.
8. DOREA, L.E., *Fenômenos cadavéricos & testes simples para cronotanatognose. prática policial*. Porto Alegre: Sagra Luzzato, 1995.p.69.
9. VANEZIS, P.; TRUJILLO, O. Evaluation of hypostasis using a colorimeter measuring system and its application to assessment to the post-mortem interval (time of death). *Forensic Science International*, v. 78, n.1, p. 19-28,1996.
10. SCHEURER, E., et al. Statistical evaluation of time-dependent metabolite concentrations: estimation of post-mortem intervals based on in situ H-1-MRS the brain. *Nmr in Biomedicine*, v.18, n.3, p. 163-172,2005.
11. SABUCEDO, A.J.; FURTON,K.G. Estimation of postmortem interval using the protein marker cardiac troponin I. *Forensic Science International*, v.134, n.1, p. 11-16,2003.
12. JOHNSON, L.A.; FERRIS,J.A.J. Analysis of postmortem DNA degradation by single-cell gel electrophoresis. *Forensic Science International*, v.126, n.1, p. 43-47,2002.
13. STAN, A.D., et al. Human postmortem tissue: What quality markers matter? *Brain Research*, v.1123, p. 1-11, 2006.
14. ZHOU, B., et al. The determination of potassium concentration in vitreous humor by low pressure ion chromatography and its application in the estimation of *postmortem*

- interval. *Journal of Chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v. 852, n.1-2, p. 278-281, 2007.
15. MADEA, B. ; RODIG, A. Time of death dependent criteria in vitreous humor - accuracy of estimating the time since death. *Forensic Science International*, v. 164, n.2-3, p. 87-92, 2006.
 16. QUERIDO, D. A preliminary investigation into postmortem changes in skinfold impedance during the early postmortem period in rats. *Forensic Science International*, v. 96, n.2-3, p. 107-114, 1998.
 17. QUERIDO, D.; PHILLIPS, M.R.B. Estimation of postmortem interval temperature-correction of extracellular abdominal impedance during the first 21 days of death. *Forensic Science International*, v. 116, n.2-3, p. 133-138, 2001.
 18. PRIETO-CASTELLO, M.J. et al. Application of biochemical and X-ray diffraction analyses to establish the postmortem interval, *Forensic Science International*, v.172, n.2-3, p. 112-118, 2007.
 19. VANRELL, J.P. *Mecanismo da morte*. Disponível em: <<http://www.pericias-forenses.com.br/mecamorte.htm>>. Acesso em: 16 de junho de 2008.
 20. HUNTINGTON, T.E.; HIGLEY, L.G.; BAXENDALE, F.P. Maggot development during morgue storage and its effect on estimating the post-mortem interval. *Journal of Forensic Sciences*, v. 52, n.2, p. 453-458, 2007.
 21. AMENDT, J. et al. Best practice in forensic entomology - standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine*, v. 121, n.2, p. 90-104, 2007.
 22. COHEN-TANNOUDJI, C.; DIU, B.; LALOË, F. *Quantum mechanics*. New York: John Wiley & Sons, 1977. v.2. p.1528.
 23. RAMANUJAM, N. *Fluorescence spectroscopy in vivo*. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester, John Wiley & Sons, 2000. p.20-56.
 24. LAKOWICZ, J.R. *Principle of fluorescence spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983. v.1. p.496..
 25. GEORGAKOUDI, I. NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes. *Cancer Research*, v.62, n.3, p. 682-7, 2002.
 26. CHEONG, W.; PRAHL, A.S.; WELCH, A.J. A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE Quantum Electronics*, v.26, p. 2166-2185, 1990.
 27. KURACHI, C., *Espectroscopia de fluorescência na detecção de lesões quimicamene induzida por agentes carcinogênicos na borda lateral da língua - estudo in vivo*. 2005. Tese de doutorado - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005.

28. DAVIES, A.M.C.; FEARN, T. Back to basics: the principles of principal component analysis. *Spectroscopy Europe*. p. 20-23, jan.2005.
29. LANDIM, P.M.B. *Análise estatística de dados geológicos multivariados*. Departamento de Geologia Aplicada, Universidade do estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.rc.unesp.br/igce/aplicada/DIDATICOS/LANDIM/multivariados.pdf>>. Acesso em: 18/06/2008.
30. SENA, M.M.; POPPI, R. J.; FIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, v.23, n.4, p. 547- 556, 2000.
31. VALDERRAMA, P.; J.W.B. BRAGA,J.W.B.; POPPI,R.J. Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n.2, p. 259-266,2007.
32. LOPES, J.A. *Principal components analysis*. Lisboa: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.2007. Disponível em: <http://www.deetc.isel.ipl.pt/comunicacoesep/disciplinas/pes/pes_pt.htm>. Acesso em: 08 de Setembro de 2007.
33. BARROS NETO, B., SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química. Nova.*, v.29 n.6 , p. 1401-6, 2006.
34. FERREIRA, M.M.C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v. 22, n.5, p. 724-73, 1999.
35. MOITA NETO, J.M., ; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química. Nova*, v. 21, n.4, p. 467-469,1998.
36. GONÇALVES DE SOUZA, A.J. *Análise em componentes principais*. Technical University of Lisbon.,2007. Disponível em: < <http://biomonitor.ist.utl.pt/~ajsousa/>>. Acesso em: 17 de Junho de 2008.
37. COSTA, L.F. *Shape analysis and classification : theory and practice*. Boca Raton, Crc Press, 2001.p.456.
38. CHAVES DAS NEVES, H.J., *The web page chemometrics text book*. 1996. Disponível em: < <http://www.dq.fct.unl.pt/qof/chemidx1.html#index>>. Acesso em: 10 de março de 2008.