



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Mariana de Sousa Lopes França Pedrosa

**PARA ALÉM DA MÉTRICA E DA  
MORFOLOGIA:**

INFLUÊNCIA DA IDADE À MORTE, SEXO, DENSIDADE  
MINERAL ÓSSEA, MASSA ÓSSEA E PRESERVAÇÃO NA  
ANÁLISE QUÍMICA POR FTIR-ATR

Dissertação no âmbito do Mestrado em Antropologia Forense orientada pela  
Professora Doutora Maria Teresa Ferreira e pelo Doutor Francisco Curate e apresentada  
ao Departamento Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade de Coimbra

Julho de 2019

Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra

**PARA ALÉM DA MÉTRICA E DA MORFOLOGIA:  
Influência da idade à morte, sexo, densidade mineral  
óssea, massa óssea e preservação na análise química  
por FTIR-ATR**

Mariana de Sousa Lopes França Pedrosa

Dissertação de Mestrado na área científica de Antropologia Forense orientada pela Professora Doutora Maria Teresa Ferreira e pelo Doutor Francisco Curate e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2019



UNIVERSIDADE DE  
**COIMBRA**



# Agradecimentos

A realização desta tese de mestrado contou com grandes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Em primeiro lugar, quero agradecer aos meus orientadores – a Professora Doutora Maria Teresa Ferreira e o Doutor Francisco Curate – pela confiança que depositaram em mim ao permitirem que desenvolvesse este trabalho de forma autónoma, pelo apoio e acompanhamento ao longo de todo o percurso, opiniões críticas e total disponibilidade para solucionar dúvidas e problemas, bem como a partilha de conhecimentos indispensáveis a este projeto.

Aos Professores Doutores Luís Batista de Carvalho e Maria Paula Marques, por tão bem me receberem na Unidade de I&D Química-Física Molecular da Universidade de Coimbra, quero agradecer a disponibilidade de equipamento de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), sem o qual não teria sido possível realizar a análise espectroscópica e a todos os seus colaboradores sempre estiveram disponíveis. Um especial obrigada à Adriana Mamede, por estar sempre disponível para me responder às minhas questões existenciais.

Agradeço também ao Laboratório de Antropologia Forense por permitir o acesso a esqueletos da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI e por me ter “acolhido” para a realização deste projeto.

Ao Calil, pela sua disponibilidade incansável para o precioso esclarecimento de dúvidas (e claro, também pela amizade!).

Ao David Navega, por (indiretamente) me ter incentivado e auxiliado no tratamento estatístico.

À “Elite”, pela amizade e apoio... Este ano sem vocês teria sido muito menos colorido!

Por último, mas não menos importante, um obrigada à minha família, amigos e ao Guilherme que sempre me apoiaram e por nunca me terem deixado desistir, mesmo quando tudo parecia desmoronar.



# Resumo

Na Antropologia Forense, a aplicação de métodos bioantropológicos para a estimativa do perfil biológico de restos esqueléticos humanos é, muitas vezes, dificultada pelas má preservação e representatividade esquelética, comprometendo a sua fiabilidade. Portanto, o desenvolvimento de métodos alternativos para a estimativa do perfil biológico de restos humanos, sem ter de recorrer à análise métrica e morfológica dos ossos, é um dos aspetos fundamentais em contextos forenses.

A idade e o sexo do indivíduo podem provocar alterações na morfologia, massa e dimensão dos ossos, bem como na sua composição química. Nesse sentido, esta investigação teve como objetivo fulcral avaliar se os conteúdos de colagénio ósseo (Am/P), carbonato tipo A (API), carbonato tipo (BPI), a relação entre o conteúdo de carbonato (A e B) e o carbonato tipo B (C/C), a razão carbonato-fosfato (C/P) e o índice de cristalinidade (IC), índices espectroscópicos a partir de relações entre bandas obtidas através da FTIR-ATR, são métodos viáveis para a estimativa de dois parâmetros do perfil biológico: idade à morte e sexo. Para tal, recorreu-se a uma amostra de fémures e úmeros de 80 indivíduos provenientes da Coleção de Esqueletos Identificados do Séc. XXI.

Concluiu-se que, com o avanço da idade, os fémures das mulheres apresentam valores do IC mais baixos, mas o BPI e o C/P aumentam, sendo a deformação e o desordenamento da rede cristalina provavelmente afetada pela integração do conteúdo de carbonato do tipo B.

Adicionalmente, apurou-se se os mesmos rácios diferiam consoante o índice de preservação geral, a massa óssea do úmero e do fémur, o conteúdo mineral ósseo (total e do colo femoral), a densidade mineral óssea, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward), e a área (total e do colo femoral). Constatou-se que apenas a DMO do sexo feminino apresentava uma relação significativa com os índices femorais em estudo, enquanto o Am/P e o API nos homens correlacionaram-se com a área total do fémur das regiões de interesse e a área do colo do fémur, muito provavelmente devido a diferenças existentes na estrutura e fisiologia, bem como resistência mecânica.

Os rácios aqui analisados, sobretudo o IC e o BPI, revelam uma possibilidade de um novo método para estimar a idade   morte, sendo o sexo já conhecido, auxiliando deste modo a avalia o do perfil biológico quando os métodos convencionais não podem ser aplicados. Investiga es futuras são necessárias para uma melhor compreensão e fiabilidade dos resultados obtidos.

**Palavras-chave:** Antropologia Forense; Antropologia Química; Bioapatite; Espectroscopia IV; Perfil Biol gico

# *Abstract*

In Forensic Anthropology, the application of bioanthropological methods for estimating the biological profile of human skeletal remains is often hampered by poor preservation and skeletal representativeness, compromising its reliability. Therefore, the development of alternative methods for the estimation of the biological profile of human remains, without having to resort to the osteometric and osteomorphological analysis, is one of the fundamental aspects in Forensic Anthropology.

Age, as well as sex, may cause changes in bone morphology, mass and size, along with its chemical composition. In this sense, this research had as main objective to evaluate whether bone collagen (Am/P), carbonate type A (API), carbonate type B (BPI) contents, the relationship between carbonate (A and B) and carbonate type B contents (C/C), crystallinity index (CI) and carbonate-phosphate ratio (C/P), obtained through FTIR-ATR, are feasible methodologies for the estimation of two parameters of the biological profile: age at death and sex. For this, a sample of femurs and humeri of 80 individuals from the 21<sup>st</sup> Century Identified Skeletal Collection was used.

It was concluded that with advancing age females have lower CI values, but BPI and C/P increase, with the deformation and disruption of the crystalline lattice probably affected by the incorporation of type B.

In addition, it was determined whether the same ratios differed according to the rate of general preservation, bone mass of the humerus and femur, BMC (total and femoral neck), BMD (total, femoral neck, great trochanter, intertrochanteric region and Ward's area) and the area (total and femoral neck). It was found that only female BMD had a significant relation with the femoral indexes under study, whereas the Am/P and the API in males correlated with the total proximal femur area of the regions of interest and the femoral neck area, most likely due to differences in structure and physiology, as well as mechanical resistance.

The ratios analysed here, especially the CI and BPI, reveal a possibility of a new methodology to estimate the age at death, once the sex is already known, thus helping the assessment of the biological profile when conventional methods cannot be applied.



Future research is necessary for a better understanding and reliability of the results obtained.

**Keywords:** Bioapatite; Biological Profile; Chemical Anthropology; Forensic Anthropology; IR Spectroscopy.

# Sumário

<b>Agradecimentos</b>	<b>I</b>
<b>Resumo e Palavras-chave</b>	<b>III</b>
<b>Abstract and Keywords</b>	<b>V</b>
<b>Sumário</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>XV</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Tecido Ósseo	2
1.2. Osteoporose e Densidade Mineral Óssea	4
1.3. Espectroscopia de Infravermelho	9
1.3.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – Reflexão Total Atenuada	11
1.4. Diagénese	14
1.4.1. Índice de Cristalinidade	16
1.5. Aplicação dos Índices em Estudo na Antropologia Forense – Estado da Arte	19
1.5.1. Efeito da Preservação	19
1.5.2. Efeito da Idade	21
1.5.3. Efeito da Osteoporose	23
1.6. Objetivos	24
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>25</b>
2.1. Seleção e recolha da amostra	25
2.2. Método FTIR-ATR	26
2.3. Tratamento Estatístico	27
2.4. Erros Intra e Inter-Observador	28
<b>3. Resultados</b>	<b>31</b>
3.1. Erros Intra e Inter-Observador	31
3.2. Índices calculados através dos espectros FTIR-ATR	31
3.2.1. Diferenças entre o fémur e o úmero	31

3.2.2. Correlações	35
<b>4. Discussão</b>	<b>43</b>
<b>5. Conclusões e Perspetivas Futuras</b>	<b>59</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	<b>63</b>
<b>Apêndices</b>	<b>91</b>

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Principais substituições químicas na rede cristalina da bioapatite ( <i>adaptado de Mamede et al., 2018</i> ).....	2
<b>Figura 1.2.</b> Representação esquemática das transições vibracionais correspondentes à absorção da radiação IV.....	9
<b>Figura 1.3.</b> Representação esquemática do modo FTIR-ATR ( <i>adaptado de Mamede et al., 2018</i> ).....	12
<b>Figura 1.4.</b> Espectro representativo de FTIR de uma amostra de osso. As bandas $\text{PO}_4^{3-}$ e $\text{CO}_3^{2-}$ da bioapatite e amida I–III relativas ao colagénio encontram-se assinaladas ( <i>adaptado de Kimura-Suda et al., 2013</i> ).....	13
<b>Figura 1.5.</b> Representação esquemática de um espectro de FTIR de uma amostra óssea na região dos $450\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas ao cálculo do índice de cristalinidade ( <i>adaptado de Mamede et al., 2018</i> ).....	17
<b>Figura 2.1.</b> Exemplo de um osso (úmero direito do indivíduo CEI/XXI 7), cuja massa óssea não foi determinada, dado a extremidade proximal estar muito fragmentada.....	26
<b>Figura 3.1.</b> Espectros de FTIR–ATR, na região do infravermelho médio, exibindo as bandas de interesse (componentes mineral e orgânica) para amostras de fémur e úmero do esqueleto CEI/XXI_47 (indivíduo do sexo masculino com 57 anos de idade à morte).....	32
<b>Figura 3.2.</b> Correlação da Idade com o IC do fémur na amostra feminina .....	36
<b>Figura 3.3.</b> Correlação do IC do fémur com a DMO do colo femoral (A) e a DMO da Área de Ward (B) na amostra feminina .....	36
<b>Figura 3.4.</b> Comparação do API do fémur com o sexo .....	37
<b>Figura 3.5.</b> Correlação da área do colo femoral com o API femoral na amostra masculina .....	38
<b>Figura 3.6.</b> Correlação da área do colo femoral com o BPI femoral na amostra masculina .....	39
<b>Figura 3.7.</b> Correlação do Índice de Preservação Geral (IPG) com o C/C femoral na amostra feminina .....	40
<b>Figura 3.8.</b> Correlação da área total do fémur proximal com o Am/P femoral na amostra masculina .....	41



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1.</b> Principais bandas de absorção no infravermelho para amostras de osso humano.....	14
<b>Tabela 2.1.</b> Razões utilizados para avaliar a composição química das amostras ósseas e publicações relevantes para detalhes do protocolo ( <i>adaptado de Mamede et al., 2018</i> ) .....	27
<b>Tabela 3.1.</b> Erro técnico de medição (ETM), erro técnico de medição relativo (% ETM) e coeficiente de fiabilidade (R) para avaliação dos erros intra e inter-observador .....	31
<b>Tabela 3.2.</b> Estatística descritiva dos parâmetros calculados a partir de dados de FTIR-ATR.....	33
<b>Tabela 3.3.</b> Estatística descritiva e resultado do teste Mann-Whitney (MW) sobre as diferenças das medianas ( $M_d$ ) dos índices químicos calculados para a amostra total ( $n = 80$ ), sexo masculino ( $n = 36$ ) e sexo feminino ( $n = 44$ ) .....	34
<b>Tabela A.1.</b> Lista de indivíduos da CEI/XXI utilizados neste estudo .....	91
<b>Tabela A.2.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson, para a amostra total e de acordo com o sexo, entre o IC do fêmur e as variáveis em estudo .....	92
<b>Tabela A.3.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman, para a amostra total e de acordo com o sexo, entre o IC do fêmur e as variáveis em estudo .....	93
<b>Tabela A.4.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson, para a amostra total e de acordo com o sexo, entre o IC do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero .....	94
<b>Tabela A.5.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o IC do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	95
<b>Tabela A.6.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o API do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	96
<b>Tabela A.7.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o API do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	97

<b>Tabela A.8.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o API do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	98
<b>Tabela A.9.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o API do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	99
<b>Tabela A.10.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o BPI do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	100
<b>Tabela A.11.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o BPI do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	101
<b>Tabela A.12.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o BPI do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	102
<b>Tabela A.13.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o BPI do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	103
<b>Tabela A.14.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/C do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	104
<b>Tabela A.15.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o C/C do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	105
<b>Tabela A.16.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/C do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	106
<b>Tabela A.17.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o C/C do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	107
<b>Tabela A.18.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/P do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	108
<b>Tabela A.19.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o C/P do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	109

<b>Tabela A.20.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/P do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	110
<b>Tabela A.21.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/P do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	111
<b>Tabela A.22.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o Amida I/P do fémur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	112
<b>Tabela A.23.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o Amida I/P do fémur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	113
<b>Tabela A.24.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o Amida I/P do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	114
<b>Tabela A.25.</b> Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o Amida I/P do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo .....	115
<b>Tabela A.26.</b> Estatística descritiva e resultado do teste t sobre as diferenças das médias ( $\bar{x}$ ) dos índices químicos calculados nos dois grupos, homens ( $n = 36$ ) e mulheres ( $n = 44$ ) .....	116





# Lista de Abreviaturas

**%ETM:** Erro Técnico de Medição Relativo

**Am/P:** Conteúdo de Colagénio

**API:** Conteúdo de Carbonato Tipo A

**ATR:** Reflexão Total Atenuada

**BPI:** Conteúdo de Carbonato Tipo B

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

**C/P:** Carbonato-Fosfato

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

**CMO:** Conteúdo Mineral Ósseo

**DMO:** Densidade Mineral Óssea

**DPA:** Absorciometria Dupla de Fotões

**DXA:** Absorciometria por Raios-X de Dupla Energia

**ETM:** Erro Técnico de Medição

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

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

**GAGs:** Glicosaminoglicanos

**IC:** Índice de Cristalinidade

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

**IPG:** Índice de Preservação Esquelética Geral

**IR-SF:** Fator de desdobramento

**IV:** Espectroscopia de Infravermelho

**PNCs:** Proteínas não colagénicas



# 1. Introdução

A Antropologia Forense pode definir-se como a aplicação dos conhecimentos da Antropologia Biológica em contextos legais (American Board of Forensic Anthropology, [www.theabfa.org](http://www.theabfa.org)).

A importância dos restos osteológicos humanos para a identificação de vítimas em investigações forenses é inquestionável (por exemplo, os ataques terroristas de 11 de setembro de 2001 ou o incêndio florestal em Pedrógão Grande a 17 de junho de 2017). O exame dos restos esqueléticos humanos pode permitir estimar o perfil biológico (ancestralidade, sexo, idade à morte e estatura) e identificar fatores de individualização e, assim, contribuir para a identificação positiva do indivíduo, para a exclusão de um suspeito ou para a restrição de pessoas desaparecidas (Cattaneo, 2007; Cunha, 2014). Além disso, caso haja a presença de traumatismos *peri mortem*, estes podem estar associados à causa da morte e auxiliar a inferir sobre as circunstâncias da morte (Pickering e Bachman, 2009; Christensen *et al.*, 2014; Cunha, 2014).

No entanto, os vestígios ósseos podem ser encontrados em diversas condições e não ser possível a sua análise morfológica e métrica, impedindo que sejam traçados perfis biológicos fidedignos dos restos mortais, o que tem implicações importantes na resolução dos casos forenses (Cattaneo, 2007; Işcan e Steyn, 2013; Cunha, 2014; Mundorff *et al.*, 2014; Kahana, 2015). A identificação odontológica, por sua vez, também só é possível quando os registos dentários *ante mortem* existem e se encontram disponíveis (Pretty e Sweet, 2001; Carneiro *et al.*, 2014). Além do mais, estas abordagens são dependentes de observações e/ou medições que podem ser subjetivas, consoante o grau de conhecimento e a experiência do antropólogo forense. Outros métodos para solucionar esta questão, como testes de DNA nuclear e mitocondrial, envolvem técnicas destrutivas, dispendiosas e morosas, e seria necessária uma amostra de DNA do indivíduo em questão ou de um parente próximo para comparação (Damann e Edson 2008; Mundorff *et al.* 2008; Yazedjian e Kešetović 2008; Kahana, 2015). Embora estes métodos sejam altamente precisos para a identificação, as limitações de tempo e recursos, bem como as crenças culturais da família do defunto, bem como a análise das evidências primárias (como o DNA

Para além da métrica e da morfologia

e as impressões digitais) não ser possível, podem negar o uso de métodos analíticos destrutivos em alguns contextos (Perrone *et al.*, 2014; Cunha e Cattaneo, 2017).

Assim, o desenvolvimento de novos métodos para a estimativa do perfil biológico de restos esqueléticos humanos é um dos aspetos fundamentais em contextos forenses.

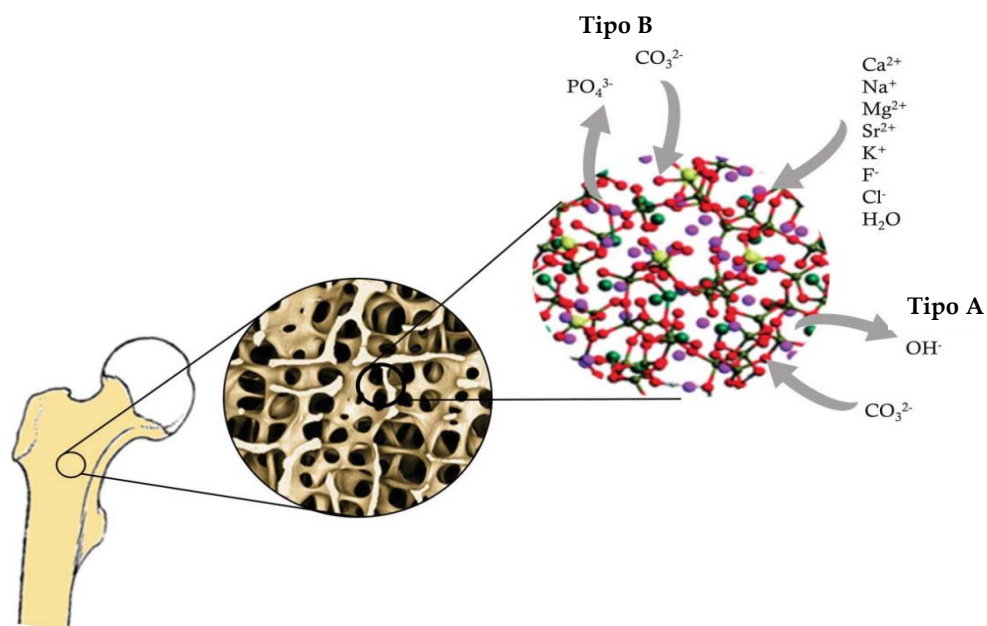
### 1.1. *Tecido Ósseo*

O tecido ósseo e outras calcificações biológicas desempenham um papel importante no bom funcionamento do corpo humano e dos animais vertebrados (Madupalli *et al.*, 2017). A nível macroscópico, o esqueleto humano consiste em aproximadamente 80% de osso cortical (ou compacto), constituindo a superfície óssea externa, e aproximadamente 20% de osso trabecular (ou esponjoso), compondo a porção interior dos ossos (Lee e Einhorn, 2001; Guimarães *et al.*, 2016). A estrutura e composição dos ossos individuais varia e geralmente estão relacionadas com a função específica desempenhada pelo osso: o osso compacto confere proteção e suporte e resiste às forças produzidas pelo peso e movimento, enquanto que o esponjoso é muito poroso, com uma estrutura semelhante a uma esponja, e mais vascular e metabolicamente ativo do que o osso cortical (White e Folkens, 2005; White *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2016).

O osso é um material heterogéneo, contendo constituintes orgânicos e inorgânicos, além da água: da massa total do osso, 60% é atribuído à fase inorgânica (aumentando para 70% no osso seco), 25% para os componentes orgânicos e cerca de 10% para água (Boskey *et al.*, 2001; Lee e Einhorn, 2001; Wang *et al.*, 2010). A fração orgânica, que fornece resistência e elasticidade ao tecido (Wilson *et al.*, 2005, 2006; Nagy *et al.*, 2008; Nikel *et al.*, 2012; Patonai *et al.*, 2013), é constituída predominantemente por fibras de colagénio do tipo I, contendo também proteínas não colagénicas (PNCs), como osteocalcina, osteonectina, osteopontina e sialoproteína óssea (Roach, 1994), que fornecem resistência estrutural adicional, bem como funções regulatórias e de sinalização (Carden e Morris, 2000), e outros compostos orgânicos, como glicosaminoglicanos (GAGs) (Vejlens, 1971; Wise *et al.*, 2007; Boskey e Robey, 2007; Zhu *et al.*, 2013) e citrato (Hu, 2010).

As propriedades específicas do mineral ósseo refletem as suas funções fisiológicas, tanto de reservatório iônico como de suporte mecânico, fornecendo rigidez, densidade e força (Wilson *et al.*, 2005, 2006; Nikel *et al.*, 2012; Hollund *et al.*, 2013). A componente inorgânica tem uma composição e estrutura semelhantes aos minerais do grupo apatite – bioapatite –, um mineral de fosfato de cálcio carbonatado pouco cristalino com a fórmula geral  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-y}(\text{CO}_3)_{x+y}$ , sendo semelhante à hidroxiapatite quando  $x=y=0$ . Embora o mineral ósseo seja frequentemente referido como hidroxiapatite na literatura, é um equívoco, uma vez que se trata de uma apatite não estequiométrica, podendo ser substituído por uma grande variedade de iões (Munro *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2016).

O substituinte predominante é o ião carbonato (cerca de 2-8% em massa), dependendo da espécie, idade e tipo de tecido (ossos, esmalte, dentina ou calcificação patológica), em dois locais aniônicos da estrutura da hidroxiapatite: os grupos hidroxilo (tipo A) e fosfato (tipo B) na matriz da hidroxiapatite, sendo este último o principal tipo de substituição (Paschalis *et al.*, 1996; Landi *et al.*, 2003; Awonusi *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2008; Boskey e Coleman, 2010; Marques *et al.*, 2016; Madupalli *et al.*, 2017), como esquematicamente se encontra representado na Figura 1.1. Ademais, é necessário que haja equilíbrio de carga (Tacker, 2008). Uma vez que os grupos carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) têm uma



**Figura 1.1.** Principais substituições químicas na rede cristalina da bioapatite (reproduzido de Mamede *et al.*, 2018).

Para além da métrica e da morfologia

carga e geometria diferente do fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e são muito maiores que os grupos hidróxilo ( $\text{OH}^-$ ), a sua presença na rede cristalina gera distorções que levam a uma diminuição na cristalinidade da bioapatite (Michel *et al.*, 1995; Astala e Stott., 2005; Wopenka e Pasteris, 2005; Madupalli *et al.*, 2017). Além destas substituições, quantidades variáveis de outros iões, como flúor ( $\text{F}^-$ ), cloreto ( $\text{Cl}^-$ ), bromo ( $\text{Br}^-$ ) e magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), podem também ser incorporadas na rede cristalina, dependendo do ambiente químico do tecido (Person *et al.*, 1995; Carden e Morris, 2000; Boskey *et al.*, 2001). A presença de substituições iónicas na estrutura da bioapatite influencia a ordem atómica de longo alcance dos cristais e, portanto, desempenha um papel importante na determinação das propriedades físicas e químicas do mineral ósseo, como a solubilidade e o tamanho do cristal (LeGeros, 1981; Wopenka e Pasteris, 2005; Dal Sasso *et al.*, 2016).

As quantidades relativas dos constituintes do tecido ósseo, bem como o seu arranjo geométrico e espacial, são variáveis, dependendo de vários fatores: idade do indivíduo (cronológica vs biológica); idade e tipo de tecido; dieta; metabolismo; condições patológicas; intervalo *post mortem*; e o tipo de solo em contacto com os restos mortais (Bacon, 1990; Penel *et al.*, 1998; Boskey e Camacho, 2007).

## 1.2. Osteoporose e Densidade Mineral Óssea

A osteoporose, também conhecida como “doença silenciosa” (Boskey e Coleman, 2010), é uma patologia esquelética sistémica e metabólica, correlacionada com a diminuição da massa óssea (osteopenia) e a diminuição da densidade mineral óssea (DMO), o que enfraquece a integridade da microarquitetura do tecido ósseo, resultando numa maior fragilidade óssea e num conseqüente aumento do risco de fratura e à alteração de proteínas, como o colagénio (Consensus Development Conference, 1991, 1993; NIH, 2001; Kimura-Suda *et al.*, 2013; Spinek *et al.*, 2016).

Existem dois tipos de osteoporose: osteoporose primária, causada pela perda óssea relacionada com a idade, sendo mais comum em mulheres mais idosas; e osteoporose secundária, independente da idade ou sexo, é causada por um distúrbio específico subjacente, desde uma patologia crónica, como a hemofilia ou diabetes, a repouso

prolongado (Kimura-Suda et al., 2013; Boskey e Imbert, 2017), bem como a fármacos, por exemplo, utilizados no tratamento de doenças não-esqueléticas, ou mesmo défices nutricionais persistentes (Boskey e Imbert, 2017).

Os principais fatores de risco para a osteoporose incluem: sexo, menopausa precoce, principalmente se for cirúrgica, idade tardia na menarca, baixo pico de massa óssea, baixo índice de massa corporal, nutrição irregular, dieta pobre em cálcio e vitamina D, sedentarismo/atividade física insuficiente, abuso de álcool, tabagismo, tratamento prolongado com corticoides em doses superiores a 7,5 mg/dia de prednisona e diversas doenças crónicas (McKay *et al.*, 1998; Ibáñez, 2003; Roy *et al.*, 2005; Sinaki, 2007; Wilsgaard *et al.*, 2009; Özbaş *et al.*, 2012; Spinek *et al.*, 2016). A idade, a baixa densidade mineral óssea e a prevalência de fraturas são os fatores de risco mais importantes para futuras fraturas, mas o poder preditivo destas variáveis ainda é insuficiente para prever quem eventualmente terá uma fratura ou identificar inequivocamente grupos de alto risco (Genant *et al.*, 2008).

A massa óssea em qualquer altura da vida de uma pessoa reflete na totalidade, os eventos que foram impostos ao esqueleto ao longo dos anos. Nos adultos, esses eventos incluem todos os outros que influenciaram a aquisição de osso durante o período de crescimento. Após uma aquisição gradual e linear de tecido ósseo até à adolescência, dá-se a aceleração do crescimento devido à puberdade, com um intenso ganho de osso até ser atingido o pico de massa óssea. A massa óssea total corporal permanece relativamente estável até aos 50 anos de idade, altura em que uma perda óssea progressiva começa a ser detetada em homens. No caso das mulheres, a perda da massa óssea não é tão progressiva, mas rápida, devido à menopausa (Curate, 2011, 2014). No entanto, em regiões específicas, como a metáfise proximal do fémur, a perda óssea começa sensivelmente na terceira década de vida. A osteoporose, apesar de mais frequentemente encontrada em mulheres pós-menopáusicas, não é uma doença exclusiva das mulheres; ocorre, embora em menor grau, em homens e em indivíduos mais jovens (Paschalis *et al.*, 1997b; Boskey e Coleman, 2010).

Os ossos humanos são órgãos dinâmicos que se remodelam ao longo da vida e podem ser diferenciados com base na sua estrutura. Estima-se que, em adultos, cerca de 5-10% do esqueleto seja substituído por ano, havendo maior remodelação óssea para o osso



Para além da métrica e da morfologia

trabecular comparativamente com o cortical (Guimarães *et al.*, 2016). A quantidade de osso que um indivíduo possui é determinada pela taxa de remodelação óssea, equilíbrio entre o processo de remoção do osso existente pelos osteoclastos (reabsorção) e a substituição de osso pelos osteoblastos (formação) (Boskey *et al.*, 2005; Fratzl *et al.*, 2007; Boskey e Coleman, 2010). Com a idade, e nos casos de osteoporose, a quantidade de osso depositado a cada ciclo de remodelamento diminui (Szulc e Seeman, 2009), uma vez que a atividade de reabsorção óssea ocorre a uma taxa que não pode ser igualada pela atividade de formação de osso, independentemente do seu grau (Boskey *et al.*, 2005; Boskey e Coleman, 2010), sendo a única exigência para a formação óssea a reparação de micro e macro-danos quando o crescimento cessa (Szulc e Seeman, 2009).

O dramático desequilíbrio entre a formação e reabsorção ósseas nos primeiros anos após a cessação da função ovariana é responsável pela taxa acelerada de perda óssea pós-menopáusicas. Atualmente, há evidências claras de que a perda óssea persiste em mulheres idosas, mas os mecanismos responsáveis são ainda controversos (Chapuy *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1994). Geralmente, a perda óssea que ocorre na pós-menopausa tardia é atribuída a uma diminuição da formação óssea relacionada com a idade. Esta suposição resulta de estudos histológicos indicando um declínio na função dos osteoblastos com a idade (Garnero *et al.*, 1996).

O diagnóstico da osteoporose é realizado com base na determinação densitométrica, tendo considerações práticas em termos de tomada de decisões clínicas sobre prevenção e tratamento. É, por conseguinte, essencial dispor de instrumentos confiáveis e precisos que possam medir a massa óssea e a densidade mineral óssea (DMO), e compará-las com populações de referência (Ibáñez, 2003).

O método mais validado e utilizado que permite avaliar a DMO com grande precisão e reprodutibilidade consiste na Absorciometria por Raios-X de Dupla Energia (DXA). Uma avaliação por DXA determinará a densidade mineral óssea, sendo esta o “padrão ouro” para o diagnóstico de osteoporose e uma componente importante na avaliação do risco de fratura (Lewiecki *et al.*, 2004; Watts, 2004; Genant *et al.*, 2008; Albergaria *et al.*, 2018).

A DXA consiste na emissão de dois feixes de energia distintos a partir de uma fonte de raios-X, em vez de uma fonte radioativa, alcançando maior precisão do que a

Absorciometria Dupla de Fótons (DPA). Usando dois feixes de energia diferentes, pode corrigir a atenuação produzida pelos tecidos moles, tal como a DPA. Porém, a DXA é o método mais difundido atualmente, tendo substituído-a devido à sua baixa radiação (não necessita de uma fonte isotópica), à sua capacidade de medir tanto o esqueleto axial como o apendicular, reprodutibilidade, facilidade de uso, e ter demonstrado um valor preditivo de fratura (Jergas e Genant 1993; Ibáñez, 2003; Taicher *et al.*, 2003; Rizer, 2006). Contudo, tem um elevado custo e exige espaço e pessoal técnico especializado para o seu manejo (Ibáñez, 2003) e a DMO medida pela DXA é influenciada pela geometria óssea (ou macro-arquitetura) do local medido (Miller e McClung, 1996; Fratzl *et al.*, 2007).

Uma determinada área (cm<sup>2</sup>) do osso é irradiada com raios-X e é medida a sua atenuação através da espessura (cm) deste. O uso de dois comprimentos de onda de raios-X diferentes permite a separação da absorção no tecido orgânico e absorção no mineral ósseo, dando uma medida da quantidade de mineral encontrado pelo feixe (Kanis e Glüer, 2000; Fratzl *et al.*, 2007). O aparelho representa os valores do conteúdo mineral ósseo (CMO), em g, que depois é convertido numa quantidade total de mineral ósseo por unidade de área (DMO), em g/cm<sup>2</sup> (Watts, 2004; Faulkner e Miller, 2007; Fratzl *et al.*, 2007).

Os densitómetros analisam qualquer peça óssea, inclusive o esqueleto total (Ibáñez, 2003). Os exames mais triviais são realizados à coluna lombar, fornecendo valores da DMO para cada uma das vértebras, bem como em diferentes localizações da anca: colo femoral, grande trocânter e região intertrocantérica. Ademais, fornecem também os valores da “anca total” e da área de Ward (Jergas e Genant, 1993; Bonnick e Lewis, 2006; Bonnick, 2010; Curate, 2011). Esta última representa uma área variável, não anatómica, definida pelo software da máquina, correspondendo à área de menor DMO da anca (Bonnick, 2010). Dada a reduzida precisão das medidas da DMO relativas a esta região, não deve ser utilizada para o diagnóstico da osteoporose (Curate, 2011). O parâmetro “anca total” traduz-se numa razão entre as somas do CMO do colo do fémur, grande trocânter e a região intertrocantérica/diáfise e a soma das respetivas áreas (Watts, 2004):

$$\frac{\text{CMO}_{\text{colo femoral}} + \text{CMO}_{\text{trocânter}} + \text{CMO}_{\text{diáfise}}}{\text{Área}_{\text{colo femoral}} + \text{Área}_{\text{trocânter}} + \text{Área}_{\text{diáfise}}}$$

Para além da métrica e da morfologia

Uma das dificuldades na interpretação dos resultados da DMO é que esta mede a quantidade total de mineral num volume de tecido ósseo e, portanto, combina dois efeitos: a quantidade de mineral por volume ósseo e a quantidade de material ósseo por volume de tecido (Fratzl *et al.*, 2007). Além disso, a DMO detém apenas um valor, ficando aquém de refletir a heterogeneidade do tecido ósseo (Yerramshetty *et al.*, 2006). A DXA proporciona um diagnóstico claro da osteoporose em amostras esqueléticas provenientes tanto de contextos arqueológicos como de forenses. Porém, é incapaz de detetar modificações no conteúdo mineral ósseo fomentadas por processos tafonómicos (Agarwal, 2008; Curate, 2011).

Os resultados obtidos pela DXA são expressos em T-score e Z-score. O parâmetro T-score compara os resultados da DMO do paciente com os de uma população adulta jovem saudável do mesmo sexo (Faulkner e Miller, 2007; Curate, 2011), representando um número absoluto em unidades de desvio-padrão, podendo apresentar valores positivos ou negativos, conforme se encontre abaixo ou acima dos valores esperados para o pico de massa óssea na população de referência (Watts, 2004; Curate, 2011, 2014). O Z-score compara a DMO relativamente à média de um grupo de indivíduos da mesma faixa etária, sexo e ancestralidade (O'Brien, 2001). Um valor diminuto de Z-score indica que a DMO é mais baixa que o esperado e pode indiciar uma causa secundária para a osteoporose dado que a perda de massa óssea é maior do que aquela que pode ser explicada pela menopausa ou idade (Watts, 2004; Faulkner e Miller, 2007; Bonnicks, 2010; Curate, 2011).

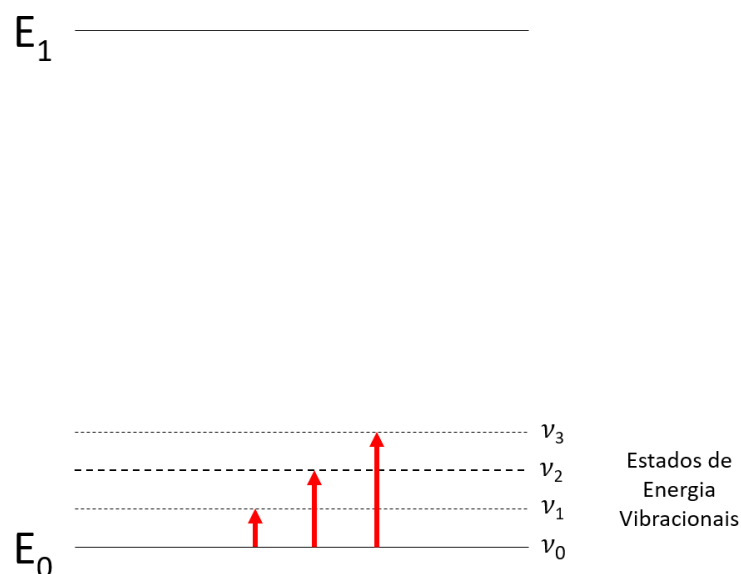
De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a medição da densidade mineral óssea no colo do fémur é o melhor meio para poder diagnosticar osteoporose nas mulheres, dado que a DMO começa a diminuir em torno dos 40-50 anos, correspondendo à fase da vida em que ocorrem a peri-menopausa e a menopausa, tendo sido definidas quatro categorias (WHO, 1994; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009):

- Normal (T-score  $\geq -1.0$ )
- Baixa massa óssea, conhecida como osteopenia ( $-1.0 < \text{T-score} < -2.5$ )
- Osteoporose (T-score  $\leq -2.5$ )
- Osteoporose severa (T-score  $\leq -2.5$  com historial de fratura)

### 1.3. Espectroscopia de Infravermelho

O osso é um sistema complexo com muitas variáveis que afetam a sua composição, formação e resistência. Os processos macroscópicos, facilmente observados, são sustentados por processos microscópicos que não são notados diretamente. Muitos dos métodos utilizados no estudo do tecido ósseo são inadequados para explorar todas as interações que ocorrem num sistema tão dinâmico, bem como para fornecer informações quantitativas e qualitativas a nível molecular de qualquer composto (Carden e Morris, 2000; Kimura-Suda *et al.*, 2013).

A espectroscopia de infravermelho (IV) é uma técnica utilizada para investigar a matéria (nos estados cristalino ou não-cristalino), sendo aplicável a sistemas moleculares em qualquer estado de agregação (Ellis e Goodacre, 2006; Butu *et al.*, 2014). Ademais, a espectroscopia de IV é baseada no princípio de que os átomos dentro das moléculas não se encontram imóveis: eles oscilam continuamente em torno das suas posições de equilíbrio, alterando os ângulos e comprimentos das ligações (Stuart, 2005). Um espectro vibracional resulta de transições entre estados de energia vibracional quantificados, cada modo vibracional fundamental,  $i$ , que envolve deslocamentos quase harmónicos dos átomos, correspondendo a uma frequência característica,  $\nu_i$  (Figura 1.2) (Griffiths, 2006; Mamede *et al.*, 2018).



**Figura 1.2.** Representação esquemática das transições vibracionais correspondentes à absorção da radiação IV.

Para além da métrica e da morfologia

A espectroscopia de infravermelho é baseada na absorção de radiação eletromagnética em frequências que correspondem aos modos vibracionais de uma molécula, isto é, a luz incidente com a mesma energia de uma transição vibracional específica é absorvida, originando uma banda espectral (Stuart e Ando, 1997; Coates, 2000; Stuart, 2005; Griffiths, 2006). No entanto, a absorção na faixa de IV ocorre somente se, durante a vibração, ocorrer uma mudança no momento do dipolo elétrico molecular: quando a radiação eletromagnética, com frequência correspondente a um movimento vibracional, interage com o momento dipolar flutuante da molécula é absorvida (Coates, 2000; Stuart, 2005; Ferrer, 2012; Woess *et al.*, 2017; Morrien, 2018). Caso as moléculas não apresentem alteração do momento dipolar durante uma vibração ou este seja igual a zero (vibrações de grupos funcionais homonucleares e ligações apolares), estas não absorvem a radiação infravermelha e, portanto, não são detetadas (Morrien, 2018).

A região espectral de infravermelho pode ser subdividida em três regiões: distante (*far infrared*,  $<200\text{ cm}^{-1}$ ), média (*medium infrared*,  $200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ) e próxima (*near infrared*,  $4000\text{--}13000\text{ cm}^{-1}$ ) (Khan *et al.*, 2012; Mamede *et al.*, 2018). Na região média, entre os  $450\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ , ocorrem os sinais atribuíveis aos componentes ósseos (Carden e Morris, 2000; Grunenwald *et al.*, 2014).

Os espectros são únicos para cada espécie molecular (MacFadden *et al.*, 2004; Paschalis, 2009; Paschalis *et al.*, 2011). Atuam como uma impressão digital característica de uma substância (bio)química, sobretudo no intervalo abaixo de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , e podem ser analisados para obter informações exclusivas sobre a estrutura molecular, já que as bandas de absorção num determinado número de onda são características de grupo(s) funcional(ais) particulares (Schmitt e Flemming, 1998; Ellis e Goodacre, 2006; Beasley *et al.*, 2014; Pestle *et al.*, 2014; Dutta, 2017). Como duas impressões digitais nunca coincidem, da mesma forma não há duas estruturas moleculares distintas que produzam o mesmo espectro de infravermelho (Ferrer, 2012; Dutta, 2017). Ou seja, uma molécula desconhecida pode ser identificada caso o seu espectro infravermelho seja idêntico ao de uma molécula conhecida. Todavia, a interpretação é difícil e geralmente apenas os grupos funcionais presentes na sua estrutura conseguem ser identificados e caracterizados (Monnier, 2018).

### 1.3.1. *Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier – Reflexão Total Atenuada (FTIR–ATR)*

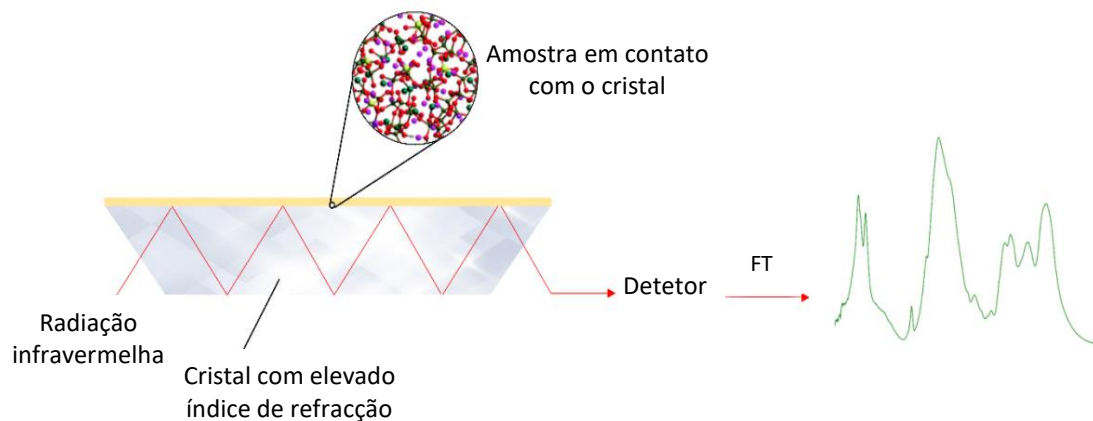
A Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica convencional que usa um algoritmo matemático, a transformada de Fourier (TF), permitindo a conversão de um sinal sinusoidal do domínio do tempo (interferograma) para o domínio da frequência (Ellis e Goodacre, 2006; Beasley *et al.*, 2014; Dutta, 2017). A espectroscopia de FTIR é uma das técnicas mais utilizadas para analisar a estrutura e composição do material ósseo, dado ser muito eficaz e sensível nas análises tanto da componente orgânica do osso como da mineral (Boskey e Camacho, 2007; Lebon *et al.*, 2010, 2014; Amarante, 2016).

Como todos os sinais da amostra alcançam o detetor simultaneamente, a maioria das medições por FTIR é feita em questão de segundos, em vez de vários minutos, tornando-se assim possível aumentar o número de “scans” para aumentar a razão sinal/ruído – vantagem Fellgett (Gomes, 2015; Dutta, 2017). Além disso, os instrumentos utilizados para a técnica de FTIR são auto-calibrados, ou seja, nunca precisam ser calibrados pelo utilizador. Estas vantagens tornam as medições feitas por FTIR extremamente precisas e reproduzíveis, permitindo a análise de espectros complexos, em que o número total de bandas e a sua sobreposição dificultam a determinação de características espectrais individuais (Gomes, 2015; Dutta, 2017). A intensidade da absorvância é proporcional à concentração da molécula absorvente. Assim, a espectroscopia FTIR pode fornecer não só informações sobre as espécies moleculares presentes, como também da sua concentração numa amostra (Sponheimer e Lee-Thorp, 1999). No entanto, esta técnica tem algumas limitações, principalmente relacionadas com a fiabilidade e sensibilidade em termos de identificação de mudanças na cristalinidade (Hollund *et al.*, 2013).

O modo de refletância é baseada na radiação que é refletida da superfície de uma amostra. Existem três tipos: especular, difusa e atenuação total (Monnier, 2018). O modo de refletância total atenuada (*Attenuated Total Reflection, ATR*) consiste num feixe de radiação que entra num cristal com um alto índice de refração (normalmente de seleneto de zinco (ZnSe) ou de diamante) e é refletido internamente caso o ângulo de incidência na interface amostra-cristal for maior do que o ângulo crítico (Bruno, 1999; Thompson *et*

Para além da métrica e da morfologia

*al.*, 2009; Ferrer, 2012; Beasley *et al.*, 2014; Monnier, 2018), conforme representado na Figura 1.2. A interação entre a radiação e a amostra ocorre nesta superfície e depende das características da amostra e do ambiente (Mamede *et al.*, 2018).

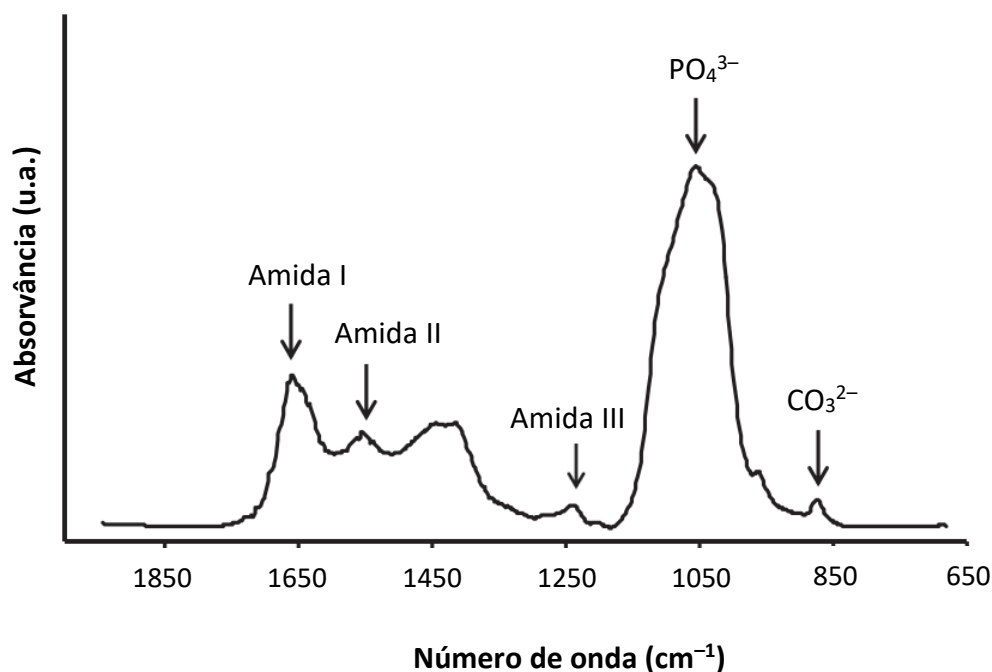


**Figura 1.3.** Representação esquemática do modo FTIR-ATR (*adaptado de Mamede et al., 2018*).

O surgimento da espectroscopia de FTIR-ATR como uma técnica analítica inestimável sobrepondo-se à FTIR-KBr (modo de FTIR de transmissão convencional, com a amostra diluída em KBr), pode ser atribuída a vários fatores: a preparação da amostra é mais rápida, menos trabalhosa, dispendiosa e destrutiva, maximizando a reprodutibilidade dos sinais, independentemente dos protocolos seguidos pelo operador; evita problemas de saturação e dispersão ótica; a variação do espectro devido à preparação da amostra é mínima, dado que não requer qualquer tipo de solvente ou meio de suporte e o impacto da preparação da amostra devido ao KBr; diferenças de tamanho de partículas nos resultados são bastante reduzidos e poder se repetir a análise da mesma amostra o número de vezes que pretendermos (Thompson *et al.*, 2009; Hollund *et al.*, 2013; Beasley *et al.*, 2014). A grande consideração a ter em mente na técnica de FTIR-ATR é a necessidade de obter um bom contato ótico entre a superfície da amostra e o cristal (Ferrer, 2012).

As bandas de absorvância observadas num espectro podem ser atribuídas às vibrações internas de grupos moleculares/funcionais particulares, tais como carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) e fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Beasley *et al.*, 2014; Dutta, 2017). A Figura 1.3 mostra o espectro típico de FTIR do tecido ósseo, onde podem ser observadas as bandas de  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ , amida I, amida II e amida III. Tanto  $\text{PO}_4^{3-}$  como  $\text{CO}_3^{2-}$  são derivados de minerais ósseos

(principalmente bioapatite e apatite carbonatada), e as amidas I-III são derivadas de proteínas, principalmente de colagénio do tipo I (Kimura-Suda e Ito, 2017). As atribuições das bandas FTIR estão resumidas na Tabela 1.1.



**Figura 1.4.** Espectro representativo de FTIR de uma amostra de osso. As bandas  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  da bioapatite e amida I-III relativas ao colagénio encontram-se assinaladas (*adaptado de Kimura-Suda et al., 2013*).

**Tabela 1.1.** Principais bandas de absorção no infravermelho para amostras de osso humano.

Banda de absorção ( $\text{cm}^{-1}$ )	Descrição	Referência
470	$\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$	Morris e Finney, 2004; Pestle <i>et al.</i> , 2014
565, 603	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$	Carden e Morris, 2000; Morris e Finney, 2004
700	$\nu_4(\text{CO}_3^{2-})$	Taylor <i>et al.</i> , 2001
872	$\nu_2(\text{CO}_3^{2-})_B$	Rey <i>et al.</i> , 1989; Shemesh, 1990; Bazin <i>et al.</i> , 2009
878	$\nu_2(\text{CO}_3^{2-})_A$	
911	$\nu(\text{C-N})_{\text{Prolina}}$ (colagénio)	Morris e Finney, 2004



Para além da métrica e da morfologia

960	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$	Carden e Morris, 2000; Morris e Finney, 2004; Pestle <i>et al.</i> , 2014
1005	$\nu_1(\text{HPO}_4^{2-})$	Carden e Morris, 2000
1035	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$	Wright e Schwarcz, 1996; Morris e Finney, 2004
1090	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ (presença de fluorapatite)	Patonai <i>et al.</i> , 2013
1242	Amida III $\nu(\text{C} - \text{N}) + \delta(\text{N} - \text{H})$ (colagénio)	Marques <i>et al.</i> , 2016
1415	$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_B$	Sponheimer e Lee-Thorp, 1999
1450	$(\text{CO}_3^{2-})_A + (\text{CO}_3^{2-})_B$	Snoeck <i>et al.</i> , 2014
1460	$\delta(\text{CH}_2)_{\text{lípidos} + \text{colagénio}}$	Pestle <i>et al.</i> , 2014
1540	$\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_A$	Thompson <i>et al.</i> , 2013
1540 – 1580	Amida II $\nu(\text{C} - \text{N}) + \delta(\text{N} - \text{H})$ (colagénio)	Carden e Morris, 2000; Marques <i>et al.</i> , 2016
1660	Amida I $\nu(\text{C} = \text{O})$ (colagénio)	Marques <i>et al.</i> , 2016

$\nu$  – alongação;  $\delta$  – deformação no plano;  $(\text{CO}_3^{2-})_A$  – carbonato tipo A;  $(\text{CO}_3^{2-})_B$  – carbonato tipo B

#### 1.4. Diagéneses

A diagéneses é um processo complexo que envolve alterações físicas e químicas *post mortem* na composição morfológica dos ossos e dos dentes. O tecido ósseo sofre modificações na estrutura molecular, particularmente do osso trabecular, em parte devido à sua maior área superficial (Nielsen-Marsh e Hedges, 2000a; Carvalho *et al.*, 2004; Stathopoulou *et al.*, 2008; Perrone *et al.*, 2014; Guimarães *et al.*, 2016). Vários agentes tafonómicos, como ataques microbianos, temperatura, humidade, água, pH, a captação ou troca iónica e as condições do ambiente de enterramento, incluindo condições geológicas e subterrâneas locais (Nielsen-Marsh e Hedges, 2000a; Tütken e Vennemann, 2011; Hollund *et al.*, 2013), podem alterar essa composição mineral e, por sua vez,

afetarão a sua utilidade, independentemente do contexto específico de aplicação (Thompson *et al.*, 2013).

Para além dos fatores acima referenciados, o tipo de solo do enterramento (composição química e pH) e as condições climáticas e ambientais (chuva, águas subterrâneas, erosão) desempenham um papel crucial na diagénese, afetando a concentração elementar dos ossos enterrados (Reiche *et al.*, 2003; Carvalho e Marques, 2008), induzindo substituições iónicas no mineral ósseo, através de processos de difusão por troca iónica (Trueman *et al.*, 2004; Carvalho e Marques, 2008). Assim, concentrações elevadas de iões acessórios podem servir como indicador de alteração diagenética (Thomas *et al.*, 2007).

As alterações na composição química da bioapatite nos ossos inumados seguem processos que muitas vezes são bastante semelhantes aos do corpo humano vivo. Em ambos os casos, esses processos dependem do raio e da carga dos iões, das condições de estabilidade e da composição do fluido circundante (Johnsson, 1997). A diagénese de ossos sepultados tem sido estudada extensivamente. Avanços recentes nesse campo incluem o reconhecimento do papel do ambiente hidrológico do sepultamento (Hedges *et al.*, 1995; Nielsen-Marsh e Hedges, 2000a), a íntima associação entre alteração dos componentes minerais e orgânicos do osso (Collins *et al.*, 2002) e o papel dos microrganismos na diagénese (Child, 1995; Hedges *et al.*, 1995), uma vez que a preservação do osso pode ser grandemente influenciada pelo ambiente do enterramento, e os ossos podem ser gravemente degradados química e/ou fisicamente, o que pode deixá-los suscetíveis ao ataque microbiológico, aumentando a porosidade óssea (Collins *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2004).

Tais processos, causados pela atividade microbiana ou condições físico-químicas ambientais, como o pH ou a composição dos sedimentos, podem levar rapidamente à degradação parcial ou completa da matéria orgânica (principalmente colagénio) e à sua lixiviação pelas águas (Collins *et al.*, 2002; Lebon *et al.*, 2010).

Na diagénese, o osso sofre alterações na estrutura/composição molecular, incluindo processos de dissolução, precipitação, absorção, substituição mineral e recristalização (Carvalho *et al.*, 2004). A recristalização (associada à decomposição do colagénio) leva a um aumento do tamanho dos cristais, à depleção de carbonato e à absorção de aniões do

Para além da métrica e da morfologia

ambiente (por exemplo, fluoreto) (Stathopoulou *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009, 2011; King *et al.*, 2011; Vassalo *et al.*, 2016; Marques *et al.*, 2018). Também através da troca iónica, o mineral ósseo pode facilmente incorporar ou absorver uma variedade de espécies iónicas dissolvidas na água subterrânea, como carbonatos, fosfatos, cálcio e estrôncio (Wright e Schwarcz, 1996; Hollund *et al.*, 2013). Ademais, a presença de metal numa sepultura pode levar à incorporação de iões metálicos no osso (King *et al.*, 2011).

Foram sugeridos indicadores de qualidade do estado de preservação óssea com base na avaliação de características dos espectros de infravermelho, como o fator de desdobramento (IR-SF), mais comumente designado por índice de cristalinidade (IC) (Weiner e Bar-Yosef, 1990), a avaliação das bandas de absorção no infravermelho características da fase inorgânica do osso (Stiner *et al.*, 1995, 2001; Yizhaq *et al.* 2005) e a razão carbonato/fosfato (C/P) relacionada com o conteúdo de carbonato vs. fosfato (Wright e Schwarcz 1996; D'Elia *et al.*, 2007). Valores diminutos de C/P indicam perda diagenética de carbonato, possivelmente durante um rearranjo ou dissolução da fase mineral. Valores semelhantes ao osso fresco podem indicar ambos os processos (Nielsen-Marsh e Hedges, 2000a). A espectroscopia de infravermelho tornou-se, assim, uma importante ferramenta para a investigação da diagénese.

#### 1.4.1. Índice de Cristalinidade

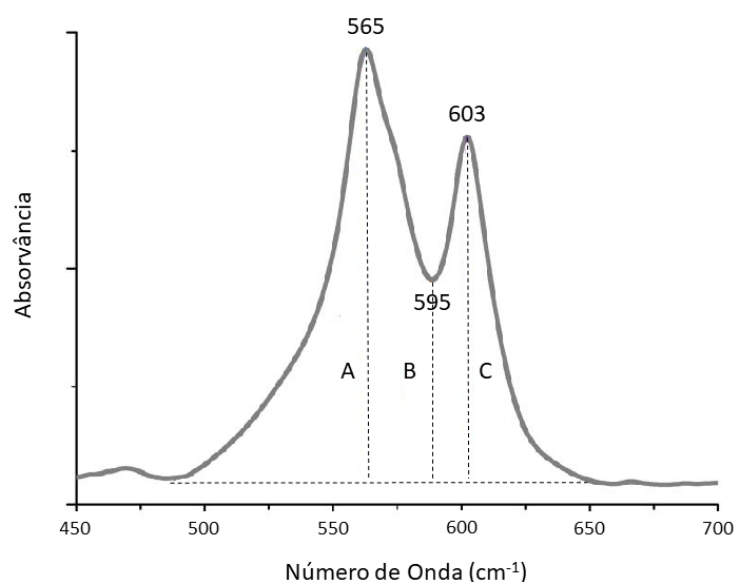
A cristalinidade é um indicador do tamanho e da ordem dentro da rede cristalina (Surovell e Stiner, 2001; Pucéat *et al.*, 2004; Beasley *et al.*, 2014; Mamede *et al.*, 2018). A cristalinidade global do material pode sofrer modificações provocadas pela diagénese.

O índice de cristalinidade (IC) é uma medida da ordem estrutural cristalina e da composição do osso, tendo sido usado para estudar as alterações na microestrutura óssea, que está diretamente relacionada com o comprimento médio do cristal (Sillen, 1989; Shemesh, 1990; Weiner e Bar-Yosef, 1990; Pleshko *et al.*, 1991; Wright e Schwarcz, 1996; Sponheimer e Lee-Thorp, 1999; Stiner *et al.*, 2001; Trueman *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2013; Beasley *et al.*, 2014), sendo comumente utilizado para determinar o estado geral de preservação de ossos arqueológicos e paleontológicos (Trueman *et al.*, 2008).

A espectroscopia FTIR é geralmente usada para determinar a cristalinidade, bem como a extensão da substituição química na bioapatite (Shemesh, 1990; Munro *et al.*, 2007). O IC é um cálculo matemático baseado em dados espectrais (Thompson *et al.*, 2011), o qual é obtido através da seguinte equação (como representado na Figura 1.5):

$$IC = \frac{A + B}{C} = \frac{Abs_{565} + Abs_{603}}{Abs_{595}}$$

onde  $Abs_{565}$  e  $Abs_{603}$  correspondem aos máximos das bandas atribuídas ao modo de alongação antisimétrica do fosfato ( $\nu_4(PO_4^{3-})$ ), que é triplamente degenerada e aparece dividida em dois picos bem definidos (devido ao campo elétrico anisotrópico da bioapatite), e  $Abs_{595}$  refere-se ao ponto mínimo entre estes sinais.



**Figura 1.5.** Representação esquemática de um espectro de FTIR de uma amostra óssea na região dos 450-700  $cm^{-1}$ , relacionadas ao cálculo do índice de cristalinidade

Os valores do IC no osso moderno inalterado normalmente situam-se em torno de 2,50 – 3,25, mas o valor aumenta conforme a estrutura cristalina se torna mais ordenada (Weiner e Bar-Yosef, 1990; Wright e Schwarcz, 1996; Stiner *et al.*, 1995, 2001; Yizhaq *et al.* 2005; Munro *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2008; Trueman *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009). Em ossos não queimados, um valor de IC superior a 3 pode indicar alterações diagenéticas (Stiner *et al.*, 2001; Olsen *et al.*, 2008).

Para além da métrica e da morfologia

Durante a inumação, vários processos químicos e biológicos podem atuar destrutivamente sobre a fração mineral e orgânica do osso, resultando no estado de preservação deficiente, havendo um aumento do IC (Nielsen-Marsh e Hedges, 1999). Após a morte, devido à diagénese, a estrutura cristalina do osso altera-se muito lentamente, ficando com uma composição mais ordenada e/ou cristais maiores, com um aumento associado no tamanho total do cristal, refletindo-se, assim, num valor do IC mais elevado (Bartsiokas e Middleton, 1992; Surovell e Stiner, 2001; Munro *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2008). Mudanças na porosidade óssea resultantes de várias outras vias diagenéticas foram também associadas a mudanças no IC (Nielsen-Marsh e Hedges, 1999), assim como o grau de conteúdo orgânico do osso (Trueman *et al.*, 2008).

Quando o osso é fresco e inalterado, a estrutura cristalina é pouco ordenada, (Paschalis *et al.*, 1997a; Thompson *et al.*, 2011), em parte devido à substituição de carbonato, e contém pequenos cristais, causando desordem cristalina (Wang *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2011). O osso inalterado tem, portanto, um baixo IC. A cristalinidade não é uniforme em todo o esqueleto e varia entre os diferentes tecidos mineralizados do corpo humano (Nakano *et al.*, 2002). A idade também demonstrou ter influência na cristalinidade, sendo o osso mais jovem menos cristalino do que o osso mais maduro (Paschalis *et al.*, 1997a).

Apesar de o IC ser um índice abundantemente utilizado, existem diversos problemas, sendo os principais: a) distinguir entre mudanças no índice devido à diagénese óssea normal (Bartsiokas e Middleton, 1992; Trueman *et al.*, 2008); b) ser uma construção numérica inteiramente arbitrária (Piga *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009); c) ser influenciado pela preparação da amostra (Surovell e Stiner, 2001; Nakano *et al.*, 2002; Hollund *et al.*, 2013).

Em suma, a diagénese óssea tem sido associada com uma variedade de substituições, principalmente aniónicas (e.g., halogéneos para  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  para  $\text{PO}_4^{3-}$  ou  $\text{OH}^-$ ), bem como com mudanças na cristalinidade (Shemesh, 1990; Surovell e Stiner, 2001; Trueman *et al.*, 2004).

### 1.5. *Aplicação dos Índices em Estudo na Antropologia Forense – Estado da Arte*

Nos últimos anos, a espectroscopia vibracional tornou-se uma das ferramentas mais importantes para a caracterização e identificação molecular, tendo-se mostrado útil para a Antropologia Biológica (Stiner *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 2002; Wopenka e Pasteris, 2005; Wang *et al.*, 2010; Hollund *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2018; Marques *et al.*, 2018). Embora tenham sido realizados estudos forenses das propriedades visuais e físicas dos ossos, houve menos investigações sobre as alterações na estrutura química dos ossos num contexto forense.

#### 1.5.1. *Efeito da Preservação*

A espectroscopia de infravermelho é ideal para a investigação do tecido ósseo com fins forenses, e muitos esforços têm sido dedicados ao estudo das alterações *post mortem* dos ossos, tendo como finalidade um melhor entendimento dos processos que afetam o osso após a morte, os mecanismos pelos quais a alteração óssea ocorre e as taxas de alteração (Wang *et al.*, 2017). Alguns estudos indicam que um espectro de FTIR obtido a partir de amostras de osso fornece informação sobre a preservação da componente inorgânica, assim como da componente orgânica (Maspero *et al.*, 2011; Paschalis *et al.*, 2011).

Vários autores propuseram que mudanças na cristalinidade estão inerentemente ligadas à alteração diagenética (Tuross *et al.*, 1989; Shemesh, 1990; Surovell e Stiner, 2001; Stiner *et al.*, 2001; Person *et al.*, 1995, 1996; Wright e Schwarcz, 1996; Patonai *et al.*, 2013; Lee-Thorp e Sponheimer, 2003; Trueman *et al.*, 2004; Lebon *et al.*, 2010; Piga *et al.*, 2016). Após a morte, a cristalinidade pode aumentar à medida que os cristais de bioapatite crescem e se reorganizam (Sillen, 1989; Weiner e Bar-Yosef, 1990; Surovell e Stiner, 2001; Stiner *et al.*, 2001; Munro *et al.*, 2007). Este aumento da cristalinidade *post mortem* está frequentemente correlacionado com outros índices, como o aumento da razão carbonato-fosfato, C/P (e.g., Person *et al.*, 1995; Sillen e Parkington, 1996; Lee-Thorp e Sponheimer, 2003), uma vez que o carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) é menos estável e mais suscetível à

Para além da métrica e da morfologia

diagénese do que o fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Lee-Thorp e van der Merwe, 1991; Wright e Schwarcz, 1996; MacFadden *et al.*, 2004). O carbonato biogénico natural no osso tem um rácio C/P de  $\sim 0,360$  (Brock *et al.*, 2010). A perda de carbonato na bioapatite devido à recristalização pós-deposicional ou alterações derivadas da queima resultam na diminuição da proporção C/P (Stiner *et al.*, 1995), diminuindo para 0,1 em amostras altamente degradadas (Smith *et al.*, 2007).

O índice de cristalinidade (IC) tem sido usado como um meio de determinar o grau de degradação/preservação de uma amostra óssea, pois diversos estudos encontraram uma correlação geral entre o aumento do IC e a alteração diagenética dos ossos (Weiner e Bar Yosef, 1990; Bartsiakos e Middleton, 1992; Sillen e Morris, 1996; Wright e Schwarcz, 1996; Nielsen-Marsh e Hedges, 2000). Porém, estudos mais recentes não encontraram correlação entre a cristalinidade e as biomoléculas contidas no osso (Lee-Thorp e Sponheimer, 2003; Pucéat *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2009; Lebon *et al.*, 2010), concluindo-se que o IC, por si só, não é uma diretriz fiável como sinal biogénico da preservação da componente mineral (Brock *et al.*, 2010). Isto pode ser devido à contínua mudança na cristalinidade após a perda do material orgânico, refutando assim a relação entre os dois (Trueman *et al.*, 2008; Brock *et al.*, 2010).

A cristalinidade está inversamente relacionada com a relação carbonato-fosfato (Smith *et al.*, 2007; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2013), mais precisamente ao carbonato do tipo B (Yerramshetty *et al.*, 2006). Ou seja, uma menor proporção de carbonato para fosfato deve ser associada a cristais maiores. O  $\text{CO}_3^{2-}$  está presente na fase mineral da bioapatite do osso numa concentração excedida apenas pelo cálcio e fosfato, desempenhando um papel significativo em vários processos biológicos, como a reabsorção óssea (Rey *et al.*, 1989). Ademais, a presença de iões  $\text{CO}_3^{2-}$  pode estar relacionada com a redução da cristalinidade do mineral no osso cortical devido à existência de defeitos na rede cristalina (Legros *et al.*, 1987). O aumento da concentração destes iões pode também estar relacionada com a variação do tamanho dos cristais (Legros *et al.*, 1987).

Embora o cálculo do IC seja simples, existem algumas dificuldades devido à natureza das mudanças de cristalinidade no osso. Sabe-se que a quantidade de  $\text{CO}_3^{2-}$  na bioapatite afeta o valor do IC porque o processo de substituição de  $\text{PO}_4^{2-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$  produz cristais

menores e com maior tensão (Wright e Schwarcz, 1996). Portanto, as amostras altamente carbonatadas têm um baixo valor de IC. Ademais, aumentos na cristalinidade podem produzir um IC constante se houver compensação apropriada de carbonato (Pucéat *et al.*, 2004).

### 1.5.2. Efeito da Idade

O conhecimento da estrutura e composição precisas do osso e da sua alteração com a idade é vital para distinguir diferenças devidas à medicação ou enfermidades e para fornecer um modelo mineral ósseo para diferentes estádios etários (Kuhn *et al.*, 2008), pois fatores com o envelhecimento e patologias diminuem a massa óssea, reorganizam a microarquitetura do osso e comprometem as propriedades e estrutura dos tecidos (Raghavan *et al.*, 2012).

A fração inorgânica da matriz óssea tem sido extensivamente estudada por espectroscopia de infravermelho. A estrutura química do mineral ósseo não é estática, contendo uma variedades de inclusões e substituições que evoluem com a idade: tanto o teor de carbonato, que substituem os iões  $\text{HPO}_4^{2-}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  (Pellegrino e Biltz, 1972; Legros *et al.*, 1987; Rey *et al.*, 1991; Handschin e Stern, 1995; Miller *et al.*, 2001; Tarnowski *et al.*, 2002; Kuhn *et al.*, 2008; Raghavan *et al.*, 2012), como o índice de cristalinidade aumentam (Grynypas, 1976; Grynypas *et al.*, 1984; Ascenzi *et al.*, 1977; Bonar *et al.*, 1983; Matsushima e Hikichi, 1989; Handschin e Stern, 1992, 1995; Paschalis *et al.*, 1996; Bigi *et al.*, 1997; Raghavan *et al.*, 2012), mas a quantidade de iões ortofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-} + \text{PO}_4^{3-}$ ) nos minerais ósseos é inversamente proporcional à idade (Pellegrino e Blitz, 1972; Grynypas *et al.*, 1984; Legros *et al.*, 1987; Rey *et al.*, 1989, 1990, 1994). Também as análises de carbonato através da técnica de FTIR indicam um aumento da cristalinidade em amostras com uma idade superior em relação às mais jovens (Kuhn *et al.*, 2008). Legros *et al.* (1987) conseguiu relacionar o aumento de carbonato, que substitui os iões  $\text{HPO}_4^-$ , com a idade conforme evidenciado pelas razões carbonato-fosfato (C/P) constantes.

Num estudo com osteões humanos (Paschalis *et al.*, 1996) e de babuínos machos com idades entre o nascimento e os 32 anos (Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009), a relação média de C/P, também designada de relação carbonato-mineral (extensão da substituição de



Para além da métrica e da morfologia

carbonato na rede da bioapatite), aumentou com a idade cronológica e a cristalinidade aumentou com a idade até atingir um plateau (Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009; Burket *et al.*, 2011). Contudo, Turunen e colaboradores (2011) afirmam que a cristalinidade é independente da idade do animal. Ademais, Sillen e Morris (1996) mostraram que todos os ossos do estudo apresentavam um índice de cristalinidade relativamente alto, que se observou aumentar irregularmente com a idade.

As mudanças da cristalinidade (aumento ou diminuição) relacionadas à idade no período de crescimento e na maturidade têm que ser geralmente interpretadas como um equilíbrio resultante do processo de remodelação constante (reabsorção, formação) que ocorre no osso (Handschin e Stern, 1995).

A diminuição da produção de proteína com a idade foi relatada por Grynypas *et al.* (1994), onde uma comparação de osso trabecular de colos femorais humanos mostrou que indivíduos mais jovens (idades entre 18-37 anos) tinham mais proteínas da matriz óssea extracelular do que indivíduos com idades entre 51-79 anos. Isso também foi demonstrado em culturas de osteoblastos indiferenciados (pré-osteoblastos) obtidos de osso trabecular humano desde o embrião até aos 60 anos de idade (Fedarko *et al.*, 1992).

Os estudos sobre apatite óssea animal – murganhos (Pleshko *et al.*, 1991; Tarnowski *et al.*, 2002; Raghavan *et al.*, 2012), pintos (Pellegrino e Biltz, 1972; Grynypas *et al.*, 1984; Rey *et al.*, 1989, 1990, 1991), coelhos (Landi *et al.*, 2003; Turunen *et al.*, 2011), vacas (Thompson *et al.*, 2011), cães (Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2010), primatas não-humanos (Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009; Burket *et al.*, 2011) – são relativamente abundantes, enquanto sobre a bioapatite do osso humano são escassos (Rey *et al.*, 1989; Handschin e Stern, 1992, 1995; Paschalis *et al.*, 1996; Very *et al.*, 1997). No entanto, sabe-se que a fauna não é um substituto fiável, dado que os conteúdos de carbonato e hidrogenofosfato variam de uma espécie de animal para outra e com a idade dentro de uma dada espécie (Legros *et al.*, 1987), não se podendo extrapolar valores experimentais e conclusões de estudos faunísticos.

### 1.5.3. Efeito da Osteoporose

A cristalinidade, ou seja, o tamanho do cristal e a perfeição das apatites, são de grande interesse biomédico, porque os cristais menores, mais imperfeitos, sujeitos à dissolução, podem afetar a extensão da perda óssea na osteoporose e noutras doenças ósseas metabólicas (Thompson *et al.*, 1983; Pleshko *et al.*, 1991).

A osteoporose altera a heterogeneidade em nanoescala das propriedades do material e da composição do tecido ósseo (Burket *et al.*, 2011). Relativamente a esta patologia, alguns estudos, recorrendo a Espectroscopia de IV, foram realizados (e.g., Paschalis *et al.*, 1997b; Gadaleta *et al.*, 2000; Paschalis *et al.*, 2003, 2004; Boskey *et al.*, 2005; Paschalis *et al.*, 2016). Em termos da componente mineral, a literatura é muito díspar e variável: tanto nos modelos animais como em humanos, foi relatado que o mineral ósseo osteoporótico consiste, caracteristicamente, em cristais maiores e mais perfeitos do que os no osso normal (Baud *et al.*, 1976; Chatterji *et al.*, 1981; Boskey, 2007; Boskey e Robey, 2007), menores e menos perfeitos (Rai e Behari, 1986; Grynepas e Holmyard, 1988), ou que não existem diferenças (Grynepas *et al.*, 1987 *in* Paschalis *et al.*, 1997b). Mais recentemente, correlações positivas entre o conteúdo mineral e cristalinidade, e cristalinidade e maturidade do colagénio foram relatadas em ossos de murganhos (Blank *et al.*, 2003). Em ossos humanos, a cristalinidade e maturidade do colagénio aumentam (Paschalis *et al.*, 1997b; Gadaleta *et al.*, 2000; Ou-Yang *et al.*, 2002; Paschalis *et al.*, 2003; Paschalis *et al.*, 2004; Boskey e Camacho, 2007; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2010), bem como a quantidade de carbonato (Boskey *et al.*, 2005; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2010), não sendo estes estudos conclusivos. De facto, a osteoporose parece envolver um envelhecimento avançado do osso que normalmente seria considerado imaturo (Carden e Morris, 2000).

Estudos realizados examinaram as dissimilaridades entre os tecidos ósseos cortical e trabecular. No entanto, nunca houve tentativa de distinguir diferenças ósseas entre o sexo masculino e feminino. Estudos acerca da relação entre a densidade mineral óssea (DMO) ou a massa óssea e os rácios que são alvo de análise neste trabalho são igualmente inexistentes.

### 1.6. *Objetivos*

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar se, através da espectroscopia de infravermelho na sua versão de refletância total atenuada (FTIR-ATR), os rácios dos conteúdos de colagénio ósseo (Am/P), carbonato tipo A (API), carbonato tipo B (BPI), a relação entre o conteúdo de carbonato (A e B) e o carbonato tipo B (C/C), a razão carbonato-fosfato (C/P) e o índice de cristalinidade (IC) são métodos fiáveis para estimar a idade à morte e o sexo de um indivíduo. Para tal, analisou-se o osso compacto do fémur e úmero humanos, sendo que este último serviu como controlo, para verificar se existem diferenças entre as razões calculadas nos dois ossos. Ademais, investigou-se se existe ou não correlação entre os índices acima referidos e as seguintes variáveis: índice de preservação geral (IPG) (Ferreira e Cunha, 2012), massa óssea do úmero e do fémur, Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) (total e do colo femoral), Densidade Mineral Óssea (DMO) (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e a área (total e do colo femoral) usada para o cálculo da DMO, tendo estas três últimas sido determinadas por Curate (2011) através da Absorciometria Bifotónica de Raios-X.

Espera-se que esta investigação venha a ser muito útil para, no futuro, se desenvolverem novos métodos para estimar alguns parâmetros do perfil biológico de um indivíduo, nomeadamente a idade à morte e o sexo, através de compostos químicos do tecido ósseo que levem à identificação individual, sem ter de recorrer à análise métrica e morfológica dos ossos.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Seleção e recolha da amostra

A amostra analisada foi constituída por oitenta dos trezentos e dois indivíduos que perfazem a Coleção dos Esqueletos Identificados do Século XXI (CEI/XXI), provenientes do Laboratório de Antropologia Forense da Universidade de Coimbra (Ferreira *et al.*, 2014) cuja densidade mineral óssea (resultados obtidos por Curate, 2011) e índice de preservação geral (IPG; dados ainda não publicados) eram conhecidos. Os esqueletos que compunham a amostra possuíam idades à morte compreendidas entre os 33 e 97 anos ( $\bar{x}=76,3$ ; DP =15,4), sendo que os 44 indivíduos do sexo feminino (55%) apresentavam idades entre os 50 e 97 anos ( $\bar{x}=82,0$ ; DP =10,9) e os 36 do sexo masculino (45%) entre os 33 e os 92 anos ( $\bar{x}=69,3$ ; DP =17,2) (Tabela A.1).

O presente estudo focou-se em dois ossos longos – fémur e úmero – do mesmo esqueleto, uma vez que são mais resistentes aos efeitos diagenéticos (Boaks *et al.*, 2014).

Para a análise da massa óssea dos fémur e úmero, cada peça óssea foi pesada individualmente duas vezes numa balança de precisão KERN PCB versão 1.5 02/2013, com uma resolução de 0,1g. Devido à dimensão da balança, fez-se uso de um tabuleiro, para que os ossos pudessem ser pesados. No caso do fémur, foi sempre pesado o osso cuja DMO foi avaliada – maioritariamente do lado esquerdo, exceto quando foram alvo de tratamento cirúrgico (por exemplo, prótese), tendo o úmero do mesmo indivíduo sido pesado do mesmo lado. Caso estes se encontrassem muito fragmentados ou danificados (Figura 2.1), ou tenham posteriormente sido queimados, não se procedeu à sua pesagem.

Para a análise química, na seleção das amostras foi dada preferência ao tecido ósseo compacto, uma vez que é menos suscetível à diagénese (Grupe, 1988). Nos ossos longos, todas as amostras foram retiradas da porção medial da diáfise, sendo que do fémur retirou-se na norma posterior e no úmero na norma anterior. Removeu-se a camada mais exterior do osso cortical com recurso a um bisturi, de forma a evitar contaminação da amostra. Todas as amostras foram raspadas com um bisturi, produzindo um pó fino adequado para FTIR-ATR, e armazenadas em *eppendorfs* devidamente identificados.

Para além da métrica e da morfologia



**Figura 2.1.** Exemplo de um osso (úmero direito do indivíduo CEI/XXI\_7), cuja massa óssea não foi determinada, dado a extremidade proximal estar muito fragmentada.

## 2.2. Método FTIR-ATR

Os espectros de FTIR-ATR foram adquiridos num espectrómetro Bruker Optics Vertex 70, pertencente à Unidade de I&D “Química-Física Molecular” da Universidade de Coimbra, purgado com ar isento de vapor de água e CO<sub>2</sub>, na gama do infravermelho médio (400 – 4000 cm<sup>-1</sup>) usando um desdobrador de feixe de Ge em substrato de KBr e um detetor de mercúrio cádmio telureto (MTC) de banda larga refrigerado com nitrogénio líquido. As medições foram feitas para pó de osso num acessório ATR de reflexão única (Bruker Platinum ATR) com cristal de diamante. Os espectros foram corrigidos para a dependência da frequência da radiação incidente, da profundidade de penetração na amostra da componente do campo elétrico da radiação (considerando o índice de reflexão médio da amostra 1,25), utilizando o *Opus Spectroscopy Software, Version 7.2*. Os espectros, para cada amostra, correspondem à soma de 128 scans, com uma resolução de 2 cm<sup>-1</sup> e apodizados com uma função de Blackman-Harris de três termos.

O tratamento espectral foi efetuado recorrendo ao programa OriginPro 9.1. A intensidade das bandas foi medida pela absorbância através do cálculo do valor máximo (altura do pico) após a correção da linha de base e normalização dos espectros (em relação à banda de fosfato a cerca de 1035 cm<sup>-1</sup>). Isso resultou numa linha de base comparável entre espectros e consistência de pó diferente (Gonçalves *et al.*, 2018). Para averiguar as diferenças espectrais das amostras ósseas, devido às variáveis em estudo, foram aplicadas diversas relações matemáticas, as quais são definidas na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Razões utilizados para avaliar a composição química das amostras ósseas e publicações relevantes para detalhes do protocolo (*adaptado de Mamede et al., 2018*).

<b>Parâmetro</b>	<b>Equação</b>	<b>Referência</b>
<b>Índice de Cristalinidade (IC)</b>	$\frac{\text{Abs}(602 \text{ cm}^{-1}) + \text{Abs}(562 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(590 \text{ cm}^{-1})}$	Weiner e Bar-Yosef, 1990
<b>Carbonato-Fosfato (C/P)</b>	$\frac{\text{Abs}(1415 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(1035 \text{ cm}^{-1})}$	Wright e Schwarcz 1996; Trueman <i>et al.</i> , 2008; Thompson <i>et al.</i> , 2009
<b>Conteúdo de Carbonato Tipo A (API)</b>	$\frac{\text{Abs}(1540 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(603 \text{ cm}^{-1})}$	Sponheimer e Lee-Thorp, 1999
<b>Conteúdo de Carbonato Tipo B (BPI)</b>	$\frac{\text{Abs}(1415 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(603 \text{ cm}^{-1})}$	Sponheimer e Lee-Thorp, 1999; Snoeck <i>et al.</i> 2014
<b>Carbonato (A+B) para Carbonato Tipo B (C/C)</b>	$\frac{\text{Abs}(1450 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(1415 \text{ cm}^{-1})}$	Thompson <i>et al.</i> , 2009; Snoeck <i>et al.</i> , 2014
<b>Conteúdo de colagénio ósseo (Am/P)</b>	$\frac{\text{Abs}(1650 \text{ cm}^{-1})}{\text{Abs}(1035 \text{ cm}^{-1})}$	Lebon <i>et al.</i> , 2014 ; Dal Sasso <i>et al.</i> , 2016

### 2.3 Tratamento Estatístico

A subsequente análise estatística dos dados obtidos foi realizada com auxílio do *software RStudio* que utiliza a linguagem de programação R para computação estatística e gráficos.

Primeiramente, realizou-se a exploração dos dados através da média, mediana, desvio-padrão e do intervalo de confiança de 95%. Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre o fémur e úmero no que diz respeito aos índices acima referidos, foi aplicado um teste não-paramétrico para variáveis independentes, Mann-Whitney, dado este teste não assumir nenhum tipo de distribuição das amostras. A hipótese nula afirma que as duas médias são iguais e a hipótese alternativa que diferem (Fay e Proschan, 2010).

Para verificar a existência de diferenças médias entre o grupo de indivíduos do sexo masculino e grupo de indivíduos do sexo feminino, em relação aos rácios calculados, procedeu-se à realização do teste *t* para amostras independentes.

Para além da métrica e da morfologia

As relações entre os índices químicos calculados para o fémur e úmero e as variáveis em estudo (para a amostra total e em função do sexo) foram calculadas através de dois coeficientes de correlação: Pearson e Spearman. A correlação de Pearson ( $r$ ) quantifica a força e direção da relação linear entre duas variáveis contínuas. Uma relação é linear quando a mudança numa variável é associada a uma mudança proporcional na outra variável (Espírito-Santo e Daniel, 2017).

A correlação de Spearman ( $\rho$ ) avalia a relação monotónica entre duas variáveis contínuas ou ordinais. Numa relação monotónica, as variáveis tendem a mudar juntas, mas não necessariamente a uma taxa constante. As cautelas, força da correlação, direção e interpretação seguem as diretrizes das enunciadas para as correlações de Pearson (Hauke e Kossowski, 2011).

Para o teste e cada coeficiente de correlação realizados, foi adotado um nível de significância de 95%, ou seja, o  $p$ -value menor ou igual a 0,05 foi considerado como significativo.

#### 2.4 Erros Intra e Inter-observador

Para inferência dos erros intra e inter-observador da massa óssea de todos os fémures e úmeros pesados, aplicou-se o cálculo do Erro Técnico de Medição (ETM). O ETM é obtido a partir da replicação de medidas num mesmo indivíduo ou grupo de indivíduos, pelo mesmo observador ou por dois ou mais observadores (Ulijaszek e Kerr, 1999). O erro inter-observador foi obtido com o auxílio da Eduarda Silva (aluna do Mestrado de Antropologia Forense) com experiência idêntica à autora. O ETM absoluto pode ser calculado através da Equação 1,

$$ETM = \sqrt{\frac{\sum di^2}{2n}} \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $\sum d^2$  é o somatório dos desvios (diferença entre a primeira e a segunda medição) elevados à segunda potência,  $n$  o número de peças ósseas medidas, neste caso, e  $i$  o número de desvios. O Erro Técnico de Medição relativo é expresso pela Equação 2,

$$\%ETM = \frac{ETM}{VAV} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

sendo *VAV* o valor médio das médias da primeira e segunda medição. Quanto menor o valor de %ETM, melhor (Perini *et al.*, 2005).





## 3. Resultados

### 3.1. Erros Intra e Inter-Observador

Para calcular os erros intra e inter-observador, todas as pesagens efetuadas aos 56 úmeros e 56 fémures que não se encontravam muito danificados e/ou fragmentados dos 80 indivíduos da amostra em estudo foram replicadas. Encontram-se descritos na Tabela 3.1.1 os resultados referentes ao erro técnico de medição (ETM), ao erro técnico de medição relativo (%ETM) e ao coeficiente de fiabilidade (R).

**Tabela 3.1.** Erro técnico de medição (ETM), erro técnico de medição relativo (% ETM) e coeficiente de fiabilidade (R) para avaliação dos erros intra e inter-observador.

	<i>Intra-observador</i>			<i>Inter-observador</i>		
	<i>ETM (dg)</i>	<i>%ETM</i>	<i>R</i>	<i>ETM (dg)</i>	<i>%ETM</i>	<i>R</i>
Massa Óssea do Fémur	0,311	0,110	1,000	0,094	0,033	1,000
Massa Óssea do Úmero	0,169	0,177	1,000	0,100	0,104	1,000

É possível verificar que tanto o %ETM intra como o inter-observador apresentam todos os resultados inferiores a 0,5%, verificando-se uma excelente replicabilidade. Todos os valores do R são iguais a 1,000, indicando que não existe variância das medições, não havendo erros de pesagem. Dado não existirem diferenças significativas entre as pesagens no erro intra-observador, optou-se por utilizar os resultados da primeira pesagem para as futuras análises.

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

#### 3.2.1. Diferenças entre o fémur e o úmero

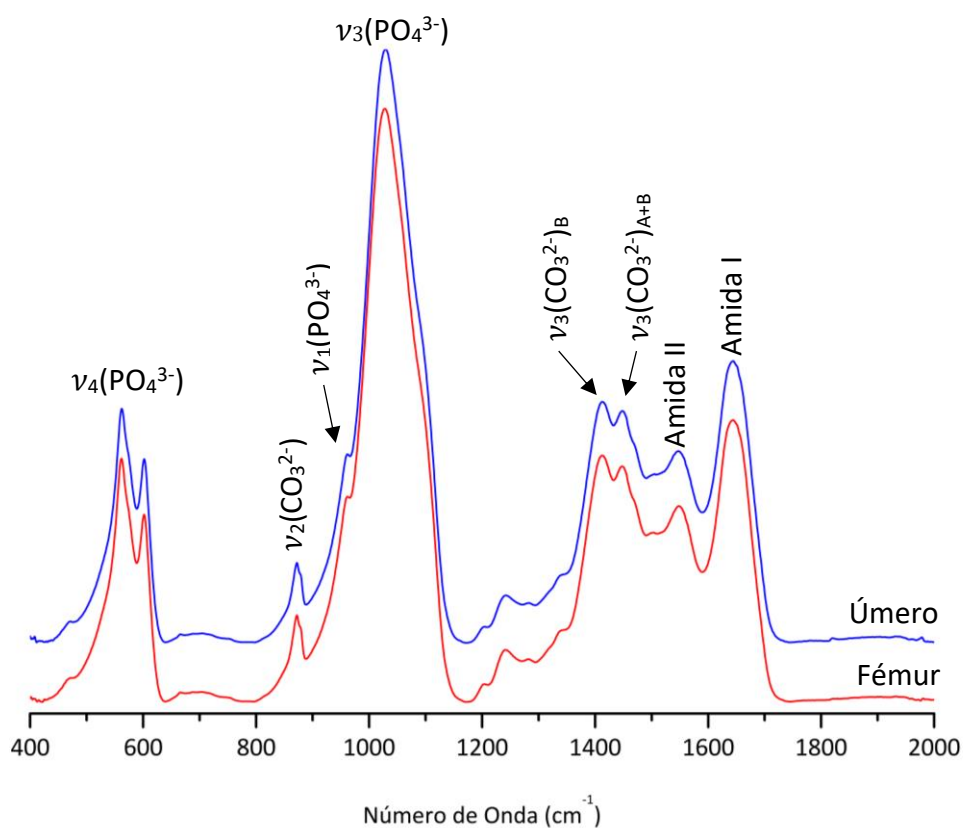
A Figura 3.1 apresenta um espectro típico de FTIR-ATR de um fémur e de um úmero do mesmo indivíduo na região dos 400 – 2000  $\text{cm}^{-1}$ , onde se observam sinais

Para além da métrica e da morfologia

correspondentes aos principais grupos funcionais/iões presentes: fosfato (da apatite biológica), carbonato (da sua substituição pelos grupos hidroxilo e fosfato na bioapatite) e amida I – III, dos constituintes proteicos do osso (principalmente colágeno tipo I). Os espectros estão normalizados segunda a banda  $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$  da bioapatite, pressupondo-se que a quantidade desta é estandardizada.

Não se observaram diferenças entre as intensidades espectrais dos dois ossos. Os espectros dos dois ossos não foram sobrepostos, pois dado terem valores de intensidade muito semelhantes, não era observá-los em simultâneo ao mesmo nível.

Foram aplicadas as relações matemáticas detalhadas na Tabela 2.1 para 80 indivíduos, 44 do sexo feminino e 36 do sexo masculino, cujos resultados se encontram sumariados na Tabela 3.2. Além disso, através do teste Mann-Whitney verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o úmero e o fémur para todos os índices calculados exceto o API (Tabela 3.3), tendo os valores do conteúdo de carbonato do tipo A do fémur e do úmero uma distribuição semelhante.



**Figura 3.1.** Espectros de FTIR-ATR, na região do infravermelho médio, exibindo as bandas de interesse (componentes mineral e orgânica) para amostras de fémur e úmero do esqueleto CEI/XXI\_47 (indivíduo do sexo masculino com 57 anos de idade à morte).

**Tabela 3.2.** Estatística descritiva dos parâmetros calculados a partir de dados de FTIR-ATR.

		<i>n</i>	IC		API		BPI		C/C		C/P		Am/P	
			$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$	$\bar{x}$	$\sigma$
Fémur	Feminino	44	3,176	0,122	1,003	0,112	1,205	0,145	0,983	0,028	0,376	0,046	0,469	0,041
	Masculino	36	3,184	0,183	0,931	0,078	1,154	0,164	0,984	0,042	0,361	0,052	0,442	0,029
	Total	80	3,179	0,151	0,971	0,104	1,182	0,155	0,983	0,035	0,370	0,049	0,456	0,039
Úmero	Feminino	44	3,299	0,191	0,999	0,119	1,125	0,193	1,013	0,046	0,350	0,062	0,475	0,045
	Masculino	36	3,295	0,189	0,968	0,094	1,091	0,149	1,015	0,043	0,339	0,050	0,464	0,043
	Total	80	3,297	0,189	0,985	0,109	1,110	0,174	1,014	0,044	0,345	0,057	0,470	0,044

**Tabela 3.3.** Estatística descritiva e resultado do teste Mann-Whitney (MW) sobre as diferenças das medianas ( $M_d$ ) dos índices químicos calculados para a amostra total, homens e mulheres.

Índice	Sexo	Osso	$M_d$	ic95%*	MW	<i>p-value</i>
<b>IC</b>	Feminino	Fémur	3,141	3,139 – 3,213	620	< 0,005
		Úmero	3,334	3,241 – 3,357		
	Masculino	Fémur	3,115	3,122 – 3,246	410	< 0,001
		Úmero	3,328	3,231 – 3,359		
	Total	Fémur	3,134	3,146 – 3,213	2021	< 0,0001
		Úmero	3,331	3,255 – 3,339		
<b>API</b>	Feminino	Fémur	0,993	0,969 – 1,037	1031	> 0,05
		Úmero	0,976	0,963 – 1,035		
	Masculino	Fémur	0,917	0,905 – 0,957	482	> 0,05
		Úmero	0,964	0,936 – 0,999		
	Total	Fémur	0,958	0,948 – 0,994	2921	> 0,05
		Úmero	0,975	0,961 – 1,009		
<b>BPI</b>	Feminino	Fémur	1,200	1,161 – 1,249	1213	< 0,05
		Úmero	1,086	1,066 – 1,184		
	Masculino	Fémur	1,197	1,099 – 1,209	832	< 0,05
		Úmero	1,101	1,040 – 1,141		
	Total	Fémur	1,197	1,148 – 1,217	4035	< 0,005
		Úmero	1,094	1,071 – 1,148		
<b>C/C</b>	Feminino	Fémur	0,973	0,974 – 0,991	611	< 0,005
		Úmero	1,018	0,999 – 1,027		
	Masculino	Fémur	0,966	0,969 – 0,998	355	< 0,001
		Úmero	1,019	1,000 – 1,029		
	Total	Fémur	0,972	0,975 – 0,991	1896	< 0,0001
		Úmero	1,018	1,004 – 1,023		
<b>C/P</b>	Feminino	Fémur	0,373	0,362 – 0,390	1220	< 0,05
		Úmero	0,344	0,331 – 0,369		
	Masculino	Fémur	0,374	0,344 – 0,379	842	< 0,05
		Úmero	0,345	0,322 – 0,356		
	Total	Fémur	0,373	0,358 – 0,380	4080	< 0,005
		Úmero	0,344	0,332 – 0,358		
<b>Am/P</b>	Feminino	Fémur	0,472	0,456 – 0,481	867	> 0,05
		Úmero	0,477	0,461 – 0,488		
	Masculino	Fémur	0,443	0,432 – 0,451	464	< 0,05
		Úmero	0,456	0,449 – 0,478		
	Total	Fémur	0,454	0,448 – 0,465	2598	< 0,05
		Úmero	0,472	0,460 – 0,479		

\* Intervalo de confiança a 95%

De facto, quando se observam os valores médios, bem como os desvios-padrão e mediana associados, são aparentes as dissemelhanças, mesmo entre sexos, salvo os conteúdos de carbonato do tipo A para a amostra total e de proteína – mineral para o sexo feminino. Através do cálculo do intervalo de confiança de 95% (ic95%), essa disparidade é ainda mais notória e perceptível, sendo que para o IC e o C/C nenhum dos ic95% para o fémur e para o úmero se interseccionam, tanto para a amostra total como entre sexos. Para o IC, os valores são mais elevados no úmero e no sexo feminino. Pelo contrário, os fémures e no sexo masculino, o C/C apresenta valores superiores e tanto o BPI como o C/P é inferior no úmero e nos homens.

É de notar que os valores do *p-value* indicados como inferiores a 0,05, tinham valores muito próximos deste, estando ligeiramente abaixo do nível de significância.

### 3.2.2. Correlações

Tanto no fémur como no úmero, na amostra geral, o IC não se alterou significativamente com nenhuma das variáveis em estudo (Tabelas A.2 – A.5), incluindo o sexo (Tabela A.26). No entanto, para as mulheres, o índice de cristalinidade do fémur diminuiu significativamente com o aumento da idade à morte, de forma moderada (*Pearson*  $p < 0,01$ ,  $r = -0,4337$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,3097$ ; Figura 3.2). Também na amostra feminina, as DMO do colo femoral (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = 0,3063$ ; Figura 3.3A) e da área de Ward (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = 0,3480$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = 0,3510$ ; Figura 3.3B) correlacionaram-se com o IC do fémur de forma significativa.

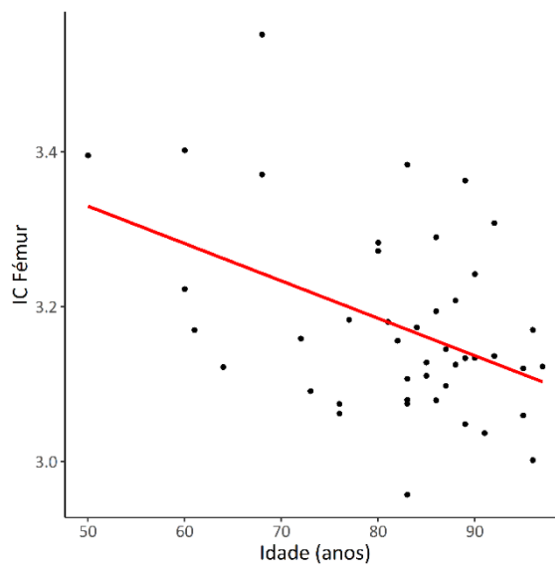
Apesar das correlações calculadas para a amostra total serem estatisticamente não significativas, as associações entre o IC femoral e as DMO da região intertrocantérica e do grande trocânter, bem como com a massa óssea do fémur foram correlações marginalmente significativas ( $p < 0,08$ ).

Relativamente ao valor do API do fémur, este correlaciona-se de forma negativa e significativa com a área total do fémur proximal (*Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = -0,2567$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,2737$ ), em como o CMO total (*Pearson*  $p < 0,03$ ;  $r = -0,2463$ ) e o CMO do colo femoral (*Pearson*  $p < 0,05$ ;  $r = -0,2456$ ), mas os coeficientes de correlação são baixos

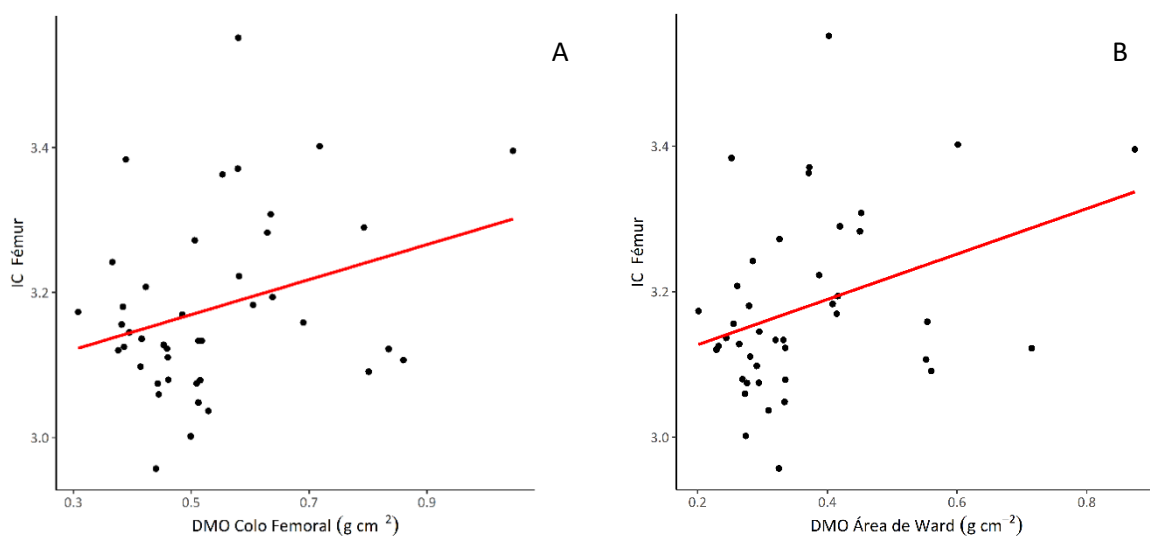
Para além da métrica e da morfologia

(Tabelas A.6 e A.7). Para as correlações entre o API femoral e o CMO do colo do fémur (*Spearman*  $p = 0,0622$ ) e a DMO do grande trocânter (*Pearson*  $p = 0,0525$ ), a sua significância estatística falhou ligeiramente o limiar de significância adotado neste estudo.

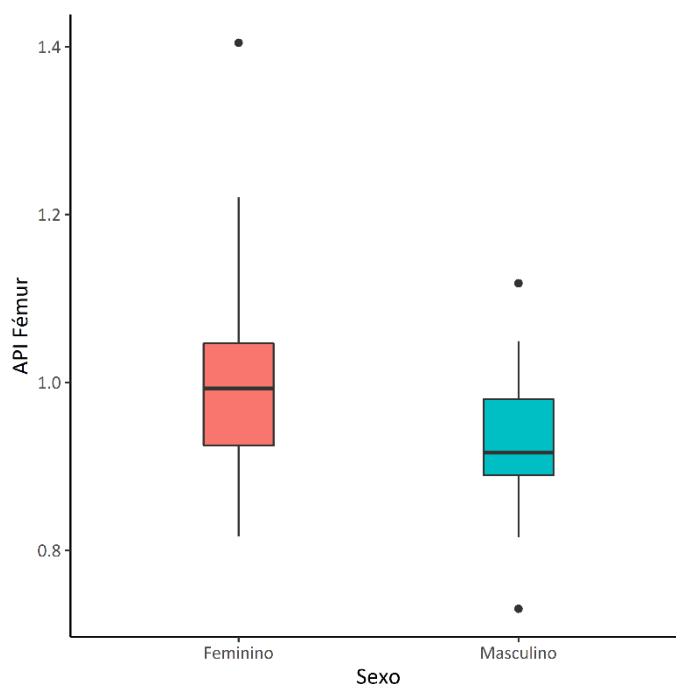
Também se verificou que existem diferenças entre os sexos (Teste  $t = 3,381$ ;  $p < 0,005$ ; Figura 3.4), sendo que para os homens têm valores mais diminutos do que as mulheres (Tabela A.26). Na amostra feminina não se verificou qualquer relação estatisticamente significativa entre o API do fémur e as variáveis em estudo, ao contrário dos homens, cujo



**Figura 3.2.** Correlação da Idade com o IC do fémur na amostra feminina.



**Figura 3.3.** Correlação do IC do fémur com a DMO do colo femoral (A) e a DMO da Área de Ward (B) na amostra feminina.



**Figura 3.4.** Comparação do API do fémur com o sexo.

valor da área do colo femoral aumenta significativamente com a diminuição do API femoral (*Pearson*  $p < 0,005$ ,  $r = 0,4883$ ; *Spearman*  $p < 0,001$ ,  $\rho = 0,5571$ ; Figura 3.5).

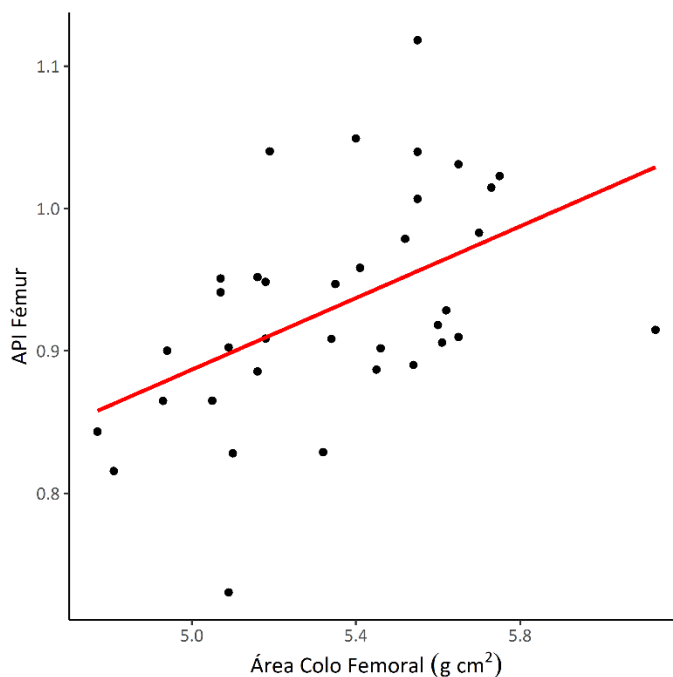
O conteúdo de carbonato do tipo A no úmero não tem uma associação significativa com as variáveis em análise (Tabelas A.8 e A.9), inclusive o sexo (Tabela A.26). Porém, para os valores das diferentes DMO's, o API no úmero varia moderadamente no sexo feminino (total: *Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = 0,3910$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = 0,3184$ ; colo femoral: *Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = 0,3674$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = 0,3149$ ; grande trocânter: *Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = 0,3273$ ; região intertrocantérica: *Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = 0,3719$ ; *Spearman*  $p > 0,05$ <sup>1</sup>; área de Ward: *Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = 0,3427$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = 0,3557$ ).

O conteúdo de carbonato tipo B, tanto no fémur como no úmero, não se relaciona com nenhuma das variáveis em estudo (Tabelas A.10 – A.13, A.26), à exceção da idade à morte com o BPI femoral (*Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = 0,2563$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = 0,2397$ ). Identicamente, no grupo das mulheres, o BPI aumenta com a idade (*Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = 0,3255$ ), mas correlaciona-se de forma inversa com as DMO do colo femoral (*Pearson*  $p <$

<sup>1</sup> A correlação de Spearman entre a DMO da região intertrocantérica e o API do úmero é quase significativa:  $p = 0,0570$ ;  $\rho = 0,2960$ .



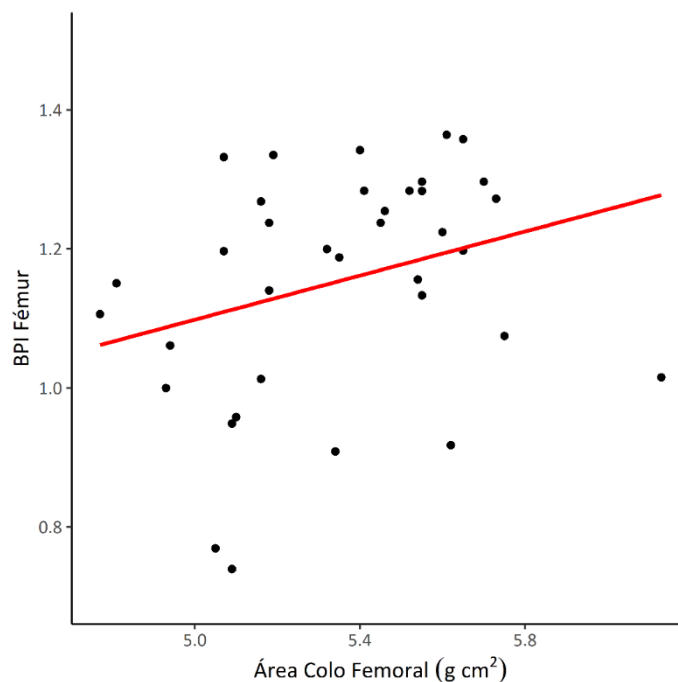
Para além da métrica e da morfologia



**Figura 3.5.** Correlação da área do colo femoral com o API femoral na amostra masculina.

0,05;  $r = -0,3413$ ), grande trocânter (*Pearson*  $p < 0,05$ ;  $r = -0,3117$ ) e da área de Ward (*Pearson*  $p < 0,05$ ;  $r = -0,3345$ ). É de notar que estas variáveis, segundo o coeficiente de correlação de Spearman, o BPI do fémur varia de forma volúvel com o seu incremento (Idade:  $p = 0,0555$ ; DMO colo femoral:  $p = 0,0618$ ; DMO grande trocânter:  $p = 0,0782$ ; DMO área de Ward:  $p = 0,0766$ ). Também no sexo feminino o CMO do colo femoral é quase significativa (*Pearson*  $p = 0,0529$ ; *Spearman*  $p = 0,0580$ ). Na amostra masculina, tal como o API, o BPI femoral varia moderadamente com o aumento da área do colo femoral (*Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = 0,3664$ ; Figura 3.6).

No que se refere ao índice carbonato (do tipo A e B) para o carbonato tipo B, este diminui com a idade à morte (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = -0,2361$ ; Tabela A.14) e com o aumento da massa óssea do fémur (*Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,2849$ ; Tabela A.15). No entanto, estas associações são baixas, não existindo qualquer outra correlação entre o C/C e as restantes variáveis em estudo para o fémur (apesar da DMO da área de Ward ser aproximadamente significativa (*Pearson*  $p = 0,0748$ ; Tabelas A.14 e A.15), bem como para o úmero (Tabelas A.16 e A.17).



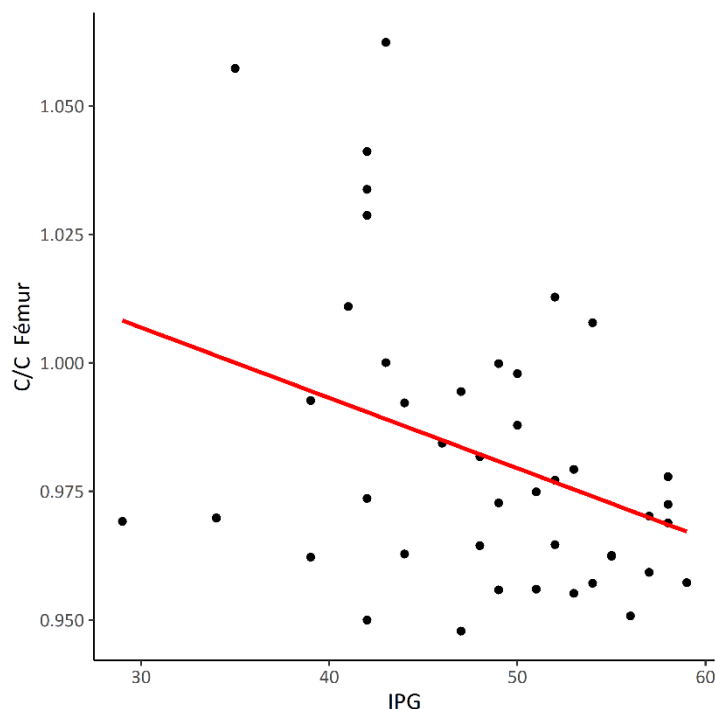
**Figura 3.6.** Correlação da área do colo femoral com o BPI femoral na amostra masculina.

Embora não haja uma correlação entre o C/C e o sexo (Tabela A.26), para as mulheres, este índice, no fémur, tem uma associação significativa de forma moderada com a idade (*Pearson*  $p < 0,02$ ;  $r = -0,3720$ ), bem como com o índice de preservação geral (*Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = -0,3569$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,3382$ ; Figura 3.7) e as DMO da região intertrocanterica (*Pearson*  $p < 0,05$ ;  $r = 0,3188$ ) e da área de Ward (*Pearson*  $p < 0,05$ ;  $r = 0,3312$ ). É de salientar que o C/C varia de forma inconstante com o aumento das DMO total (*Pearson*  $p = 0,0569$ ) e da região intertrocanterica (*Pearson*  $p = 0,0622$ ), quase atingindo a significância estatística.

As correlações de Pearson e Spearman para o índice carbonato – fosfato femoral e do úmero podem ser analisadas através das Tabelas A.18 – A.21. Para a amostra geral, as variáveis em análise não exerceram um efeito significativo sobre o C/P, tanto no fémur como no úmero, nomeadamente o sexo (Tabela A.26), salvo a idade à morte para o C/P femoral (*Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = 0,2612$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = 0,2434$ ). Contudo, esta correlação é fraca.

Quando realizada a análise por sexo, é possível observar que a amostra feminina mantém uma associação com a idade estatisticamente significativa, mas de forma moderada (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = 0,3492$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = 0,3114$ ). Ademais, existe uma relação

Para além da métrica e da morfologia



**Figura 3.7.** Correlação do Índice de Preservação Geral (IPG) com o C/C femoral na amostra feminina.

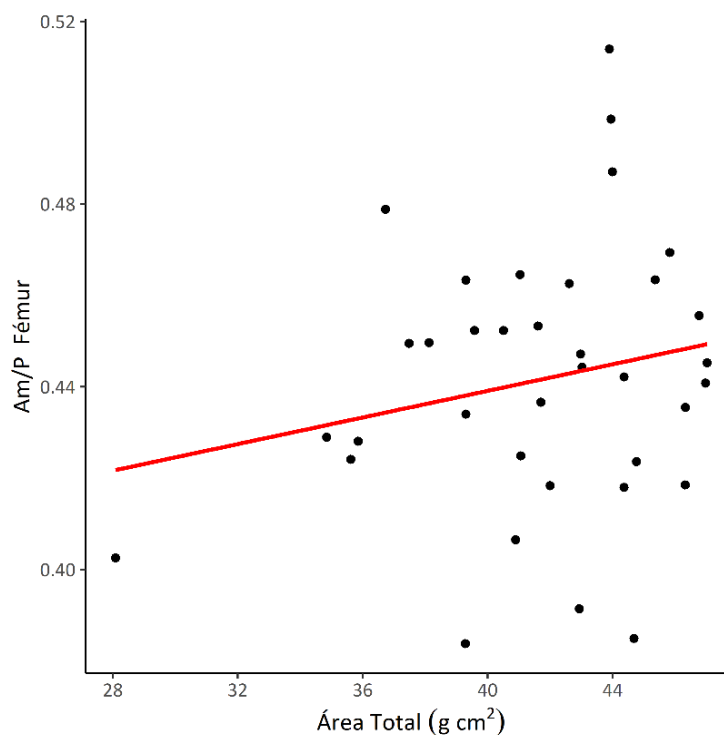
significativa e moderada entre o C/P femoral e as DMO total (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = -0,3129$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,3174$ ), do colo femoral (*Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = -0,3764$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,3507$ ), do grande trocânter (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = -0,3385$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,3289$ ) e da área de Ward (*Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = -0,3695$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,3283$ ), bem como entre o C/P no fêmur e o CMO do colo femoral (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = -0,3568$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,3649$ ). Além do mais, o índice carbonato – fosfato diminui com o incremento da DMO na região intertrocantérica, tanto no fêmur como no úmero, mas a tendência não atinge significância estatística (*Pearson*  $p = 0,0643$  (fêmur);  $p = 0,0696$  (úmero)).

Por fim, no que diz respeito ao índice Amida I fosfato, no fêmur, este tem uma associação fraca, mas estatisticamente significativa, com diversas variáveis (Tabelas A.22 e A.23): a área total do fêmur proximal (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = -0,2677$ ; *Spearman*  $p < 0,02$ ,  $\rho = -0,2952$ ), os CMO total (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = -0,2539$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,2442$ ) e do colo femoral (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = -0,2613$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,2387$ ), a DMO do grande trocânter (*Pearson*  $p < 0,05$ ;  $r = -0,2450$ ) e a massa óssea (*Pearson*  $p < 0,05$ ,  $r = -0,2710$ ; *Spearman*  $p < 0,05$ ,  $\rho = -0,2772$ ). No que concerne ao sexo, existe também uma

correlação de forma moderada com o índice Am/P femoral (Teste  $t = 3,411$ ;  $p < 0,005$ ), mas o mesmo não se verificou no úmero (Tabela A.26). Não obstante, aquando o estudo por sexo, apenas se observa uma variação moderada entre o Am/P e a área do colo femoral no sexo masculino (*Pearson*  $p < 0,02$ ,  $r = 0,4097$ ; *Spearman*  $p < 0,02$ ,  $\rho = 0,4004$ ; Figura 3.8) e entre o mesmo índice no úmero e a DMO do colo do fémur na amostra feminina (*Pearson*  $p < 0,05$ ;  $r = 0,3077$ ).

É ainda de salientar que a correlação entre o índice Amida I fosfato e a DMO do colo femoral, para a amostra total, aproxima-se muito do nível de significância adotado neste estudo (*Pearson*  $p = 0,0547$ ), bem como a área do colo femoral (*Pearson*  $p = 0,0665$ ; *Spearman*  $p = 0,0634$ ) e as DMO do grande trocânter, para a correlação de *Spearman* ( $p = 0,0675$ ) e a total (*Pearson*  $p = 0,0771$ ) se encontram ligeiramente abaixo do nível de significância.

Os valores dos coeficientes de correlação de *Pearson* e *Spearman* entre o Am/P do úmero e as respetivas variáveis analisadas encontram-se sumariados nas Tabelas A.24 e A.25, respetivamente.



**Figura 3.8.** Correlação da área total do fémur proximal com o Am/P femoral na amostra masculina.



## 4. Discussão

O presente estudo prendeu-se essencialmente com a tentativa da estimativa da idade à morte e do sexo através da análise química do fémur e do úmero, mediante os rácios IC, BPI, API, C/C, C/P e Am/P e na avaliação da sua relação com diversas variáveis: IPG, massa óssea do úmero e do fémur, CMO (total e do colo femoral), DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocanteriana e área de Ward) e a área (total e do colo femoral). Para isto utilizou-se uma amostra de 80 indivíduos da CEI/XXI. No presente capítulo discutir-se-ão os principais resultados obtidos, cotejando-os com estudos da mesma natureza, realizados previamente.

A avaliação espectroscópica por FTIR-ATR de amostras ósseas homogeneizadas fornece informações sobre a composição química média das amostras em estudo (Petra *et al.*, 2005), sendo uma técnica quantitativa, dado apenas fornecer detalhes sobre os grupos funcionais/iões presentes numa amostra (Pestle *et al.*, 2014). Além disso, também permite a determinação das quantidades relativas de mineral e matriz presentes (Miller *et al.*, 2001).

No entanto, uma dificuldade inerente associada à análise de amostras biológicas é a heterogeneidade do tecido. Isto poderá explicar o porquê de as correlações significativamente estatísticas entre os índices químicos calculados e as variáveis em estudo serem mais fracas, embora a amostragem tenha sido realizada na camada superficial no ponto medial das diáfises do fémur e do úmero, reduzindo o efeito das variáveis influenciadoras e aumentando a comparabilidade com outros estudos (Thompson *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2018).

Os ossos humanos são bastante variáveis em termos de estrutura, forma e tamanho, e essas variáveis podem, de alguma forma, interferir nos parâmetros ósseos, especialmente com a cristalinidade (Reznikov *et al.*, 2015; Gourrier *et al.*, 2017). Através do teste de Mann-Whitney foram observadas diferenças estatisticamente significativas em todos os índices entre o fémur e o úmero, com exceção do API e o Am/P para o sexo feminino (Tabela 3.3). A composição química do osso é muito específica, independentemente do tipo de osso, embora a especificidade varie de acordo com cada índice (Gonçalves *et al.*,

Para além da métrica e da morfologia

2018). As dessemelhanças notadas poderão estar relacionadas com diferenças na estrutura e remodelação ósseas (Thompson *et al.*, 2013). Além disso, alterações diagenéticas e/ou diferenças localizadas no ambiente geoquímico do enterramento, podem motivar uma variabilidade intraindividual (Francalacci e Tarli, 1988).

O índice de cristalinidade (IC) reflete uma combinação dos tamanhos relativos dos cristais e a extensão em que os átomos estão ordenados na rede cristalina (Shemesh, 1990; Stiner *et al.*, 1995). Os IC calculados segundo a equação matemática presente na Tabela 2.1 encontram-se em conformidade com os valores obtidos em estudos anteriores (Weiner e Bar-Yosef, 1990; Wright e Schwarcz, 1996; Stiner *et al.*, 1995, 2001; Yizhaq *et al.* 2005; Munro *et al.*, 2007; Olsen *et al.*, 2008; Trueman *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009). Ao contrário da maior parte da literatura existente (Grynopas *et al.*, 1976, 1984; Ascenzi *et al.*, 1977; Bonar *et al.*, 1983; Bigi *et al.*, 1997; Matsushima e Hikichi, 1989; Rey *et al.*, 1991; Handschin e Stern, 1992, 1995; Paschalis *et al.*, 1996; Boskey *et al.*, 2005; Raghavan *et al.*, 2012), não só não houve qualquer relação estatisticamente significativa do IC com a idade na amostra total (Akkus *et al.*, 2003), como este também diminuiu progressivamente com a idade à morte no sexo feminino. Isto demonstra que com o avanço da idade, a estrutura cristalina vai ficando mais desorganizada e/ou contendo cristais pequenos, originando desordem cristalina (Wang *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2011).

Quanto menor o tamanho dos nanocristais da apatite óssea, maior é a área de superfície em comparação com a mesma massa de cristais de tamanho maior. Fisiologicamente, os cristais de bioapatite atuam como um reservatório iónico (por exemplo, cálcio). Uma maior área de superfície dos cristais resulta numa percentagem muito maior de iões constituintes que poderão reagir com outros iões e/ou outros constituintes orgânicos dos fluidos extracelulares, tornando a apatite óssea relativamente reativa (Driessens *et al.*, 1978; LeGeros, 1991; Lee-Thorp, 2002; Glimcher, 2006), fornecendo aos cristais uma organização ideal para a troca desses iões com os fluidos extracelulares.

Segundo Handschin e Stern (1992), a cristalinidade aumenta substancialmente entre o nascimento e os 30 anos. Nos indivíduos com idades compreendidas entre os 30 e os 80 anos parece não haver variação apreciável na cristalinidade da bioapatite. Estes autores também verificaram que existe uma ligeira diminuição da cristalinidade para idades superiores a 80 anos, que poderá ser causada por uma atrofia óssea (osteoporose),

afetando o osso compacto mais antigo de uma maneira específica. No presente estudo, nenhum indivíduo tinha uma idade à morte inferior a 30 anos, havendo apenas 8 com idades compreendidas entre os 30 e os 60 anos e mais de 50% da amostra ( $n = 43$ ) tinha uma idade cronológica igual ou superior a 80 anos. Além disso, na amostra feminina, 31 das 44 mulheres em estudo, ou seja 71%, tinham uma idade muito avançada (idade à morte maior ou igual a 80 anos) e nenhuma tinha uma idade inferior a 30 anos, não havendo uma distribuição equitativa das faixas etárias.

A principal característica da banda  $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$  entre os 602-610  $\text{cm}^{-1}$  é que esta diminui gradualmente durante o envelhecimento e a maturação da fase mineral. Este fenómeno está associado a um leve deslocamento da posição das principais bandas de fosfato em direção a um maior número de onda e a uma mudança na sua intensidade relativa (Rey *et al.*, 1990). Portanto, um decréscimo do valor da cristalinidade provoca uma consequente diminuição na intensidade da banda  $\nu_4$  do fosfato. No entanto, há que referir que Rey e colaboradores (1990) utilizaram ossos de aves com, no máximo, 3 anos de idade.

Além da desigual distribuição etária dos indivíduos em estudo, diversos fatores poderão ter contribuído para a discrepância entre os valores do IC obtidos na presente investigação e os resultados da literatura existente:

(i) o método aplicado para calcular o índice de cristalinidade ser distinto e/ou não se ter empregue a mesma técnica de FTIR (Yerramshetty *et al.*, 2006), bem como não fazerem a correção ATR ou efetuam-na mas com um índice de reflexão média díspar;

(ii) heterogeneidade do tecido. Por exemplo, segundo Boskey e colaboradores (2005), numa amostra de 22 pacientes (sendo 16 deles mulheres), há um aumento da cristalinidade no osso trabecular com a idade à morte. No entanto, Trueman e co-autores (2004) afirmam que não existem diferenças significativas entre a cristalinidade do osso cortical e trabecular;

(iii) de acordo com alguns autores (Stiner *et al.*, 1995; Trueman *et al.*, 2004), a duração do período de inumação poderá afetar também o valor do IC na camada mais superficial do osso cortical, sendo que com o aumento do período de inumação, incrementa também a cristalinidade.



Para além da métrica e da morfologia

Também diferenças na localização anatómica da amostragem (Gonçalves *et al.*, 2018) ou o tratamento estatístico dos dados (por exemplo, agrupamento de décadas vs regressão linear) podem provocar desigualdades entre os resultados dos estudos (Yerramshetty *et al.*, 2006). Também estudos cujo tamanho amostral é muito diminuto, potencialmente fornecem resultados menos representativos, dado que o erro de medição pode facilmente alterar a variabilidade no IC resultante (Surovell e Stiner, 2001; Gonçalves *et al.*, 2018).

Estudos anteriores foram parcial ou totalmente focados em ossos de fauna (e.g., Pellegrino e Biltz, 1972; Grynepas *et al.*, 1984; Rey *et al.*, 1989, 1990, 1991; Pleshko *et al.*, 1991; Tarnowski *et al.*, 2002; Landi *et al.*, 2003; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009, 2010; Burket *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2011; Turunen *et al.*, 2011; Raghavan *et al.*, 2012) e em esqueletos humanos os dados disponíveis são limitados. Como os ossos de fauna apresentam diferenças na microestrutura dos tecidos mineralizados podem, por exemplo, ocasionar diferenças nos valores do IC (Nakano *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2018). Além do mais, há uma grande diversidade na proporção e composição óssea entre as classes de espécies, e a diversidade deve-se principalmente aos grupos inorgânicos (fosfato e carbonato, por exemplo) (Gamsjaeger *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019). Assim, os resultados obtidos em estudos faunísticos não devem ser extrapolados para valores experimentais adquiridos no osso humano.

A proporção de carbonato para fosfato (C/P) indica o nível de substituição de carbonato. Segundo Nielsen-Marsh e Hedges (2000b), o osso fresco tem valores de C/P de  $0,34 \pm 0,1$ . Apesar dos resultados obtidos do rácio carbonato-fosfato serem superiores ( $0,370 \pm 0,049$ ), são concordantes com as conclusões acima referidas, bem como outros estudos (Patonai *et al.*, 2013; Longato *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2018) dado se terem analisado ossos secos que possivelmente tiveram um ganho de carbonato do ambiente de sepultamento (Nielsen-Marsh e Hedges, 2000b).

É possível observar a partir dos dados (Tabelas A.17 e A.18) que a razão C/P é monotónica e diretamente proporcional à idade à morte, tal como observado em diversos estudos (Akkus *et al.*, 2004; Yerramshetty *et al.*, 2006; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009), tendo maior expressão na amostra feminina. Porém, segundo Paschalis e colaboradores (1996),

a relação  $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ , revela que esta é inversamente proporcional à idade óssea, mas Rey e co-autores (1991), ao descrever o teor absoluto de carbonato através do índice carbonato – fosfato, relataram que este aumenta com o incremento da idade óssea. A comparação com estes dois estudos não deve ser realizada, dado a idade óssea (idade biológica) e a idade à morte (idade cronológica) não serem termos equivalentes (Klepinger, 2006; İşcan e Steyn, 2013). Ademais, os resultados da presente investigação e os descritos por Paschalis *et al.* (1996) diferem, uma vez que eles não homogeneizaram a amostra para a análise química por FTIR, sendo o estudo confinado a apenas osteões. Para mais, utilizam dados obtidos em apenas dois pacientes.

Na nossa pesquisa verificou-se que existe uma correlação positiva entre o BPI femoral ( $\text{CO}_3^{2-}$  substituem os iões  $\text{PO}_4^{3-}$  presentes na bioapatite) e a idade à morte na amostra total, estando em condordância com vários estudos publicados (Legros *et al.*, 1987; Rey *et al.*, 1991; Paschalis *et al.*, 1996; Yerramshetty *et al.*, 2006), e no grupo das mulheres. O mesmo foi observado por Paschalis e colaboradores (1996) que verificaram que o conteúdo do carbonato do tipo B aumentava com o crescimento da maturação óssea (sendo que esta foi examinada em função da idade). A presença de iões  $\text{CO}_3^{2-}$  do tipo B pode estar relacionada com a baixa cristalinidade mineral no osso cortical, devido à existência de defeitos na rede cristalina causada pela presença de iões tais como o ião carbonato (Legros *et al.*, 1987).

A substituição do  $\text{CO}_3^{2-}$  desempenha um papel importante nas propriedades ósseas (Rey *et al.*, 1991). Além disso, sabe-se que a quantidade de  $\text{CO}_3^{2-}$  na apatite biológica afeta o valor do IC, dado que o processo de substituição de  $\text{PO}_4^{3-}$  por  $\text{CO}_3^{2-}$  produz cristais menores (os iões carbonato são inibidores do crescimento dos cristais de bioapatite) e com maior tensão estrutural (causada por distorções e defeitos na rede cristalina), dado possuírem carga e geometria diferentes dos iões  $\text{PO}_4^{3-}$ , levando ao aumento da desordem e à redução da perfeição cristalográfica (Wright e Schwarcz, 1996; Ou-Yang *et al.*, 2002; MacFadden *et al.*, 2004; Antonakos *et al.*, 2007; Rey *et al.*, 2007; Grunenwald *et al.*, 2014; Snoeck *et al.*, 2014; Thompson, 2015). Amostras com alto teor de carbonato tipo B têm, portanto, um baixo valor de IC (Shemesh, 1990; Wright e Schwarcz, 1996). Esta hipótese é concordante com os dados obtidos com a associação dos dois índices referidos anteriormente com a idade à morte. Ademais, um aumento na cristalinidade pode ainda

Para além da métrica e da morfologia

produzir um IC constante se houver compensação de carbonato (Pucéat *et al.*, 2004). Assim, a diminuição da cristalinidade e o aumento do conteúdo de carbonato do tipo B, poderá indicar que o ião carbonato poderá ser um fator predominante na regulação biológica ou no controlo da cristalinidade dos cristais da apatite biológica.

O índice C/C representa a relação entre os carbonatos (A + B) para os carbonatos do tipo B. A sua diminuição linear (fraca) com a idade à morte, demonstra um aumento de uma proporção díspar de carbonatos do tipo A para o tipo B, causada ou por uma diminuição dos carbonatos do tipo B ou por um aumento dos carbonatos A. Como foi referido anteriormente, verificou-se que com o avançar da idade, há um incremento de substituições de fosfato por carbonato do tipo B. No entanto, não se observou qualquer relação da idade com o carbonato tipo A, apesar de Miller e colaboradores (2001) terem verificado um aumento do conteúdo de carbonato do tipo A com o amadurecimento dos cristais ósseos. Uma possível explicação para os valores obtidos do índice C/C poderá ser a influência da banda a  $1460\text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta(\text{CH}_2)_{\text{colagénio} + \text{lípidos}}$ , dado a sua sobreposição parcial com a banda  $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_{\text{A} + \text{B}}$ , a  $1450\text{ cm}^{-1}$ , podendo levar a interpretações erróneas (Rey *et al.*, 1989; Petra *et al.*, 2005; Mamede *et al.*, 2018). Portanto, a utilização do C/C na relação com a idade à morte (ou qualquer outro parâmetro) para fins forenses não parece ser viável.

Casuccio (1962) encontrou um conteúdo crescente de colagénio no tecido ósseo trabecular das vértebras lombares humanas, enquanto outros relataram uma diminuição na quantidade de colagénio no fémur e no osso íliaco humanos com a idade (Rogers *et al.*, 1952; Eastoe, 1968). Também Very e colaboradores (1997) observaram um decréscimo no conteúdo orgânico (através da banda de colagénio Amida I) com a idade à morte. Similarmente, através da análise da hidroxiprolina, um aminoácido essencial presente no colagénio, Bailey e co-autores (1999) verificaram que a concentração total do colagénio no osso diminuía com a idade, não havendo diferenças entre sexos. Os resultados obtidos por Vassalo *et al.* (2016), através do índice Am/P, calculado do mesmo modo que neste estudo, apoiam esta hipótese. Segundo diversos investigadores (Zioupos *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2002; Ruppel *et al.*, 2006), a degradação do colagénio começa ainda em vida e aumenta gradualmente com a idade. Contrariamente a estes estudos, não se encontrou nenhum efeito da idade no conteúdo de colagénio (calculado através

da fórmula Am/P, descrita na Tabela 2.1) tanto do fêmur como do úmero, indo de acordo com Dequeker e Merlevede (1971), que não obtiveram nenhuma associação entre o conteúdo de colagénio e a idade no osso ilíaco, e Akkus *et al.* (2003). Uma possível explicação para essa controvérsia é a diminuição da massa óssea total com a idade, especialmente significativa em mulheres (Dequeker *et al.*, 1971).

Relativamente ao sexo, foi frequentemente descrito que as mulheres após a menopausa estão mais propícias à osteoporose e à perda de resiliência do esqueleto (Curate, 2014). Verificou-se que existem diferenças significativas para os conteúdos de carbonato tipo A e de colagénio entre os sexos, sendo os valores inferiores para o sexo masculino. Esta dessemelhança poderá estar relacionada com o facto de os valores para cada um dos parâmetros ser bastante distinto entre homens e mulheres (Tabelas 3.1, 3.2 e A.26).

O ambiente do enterramento (composição de águas subterrâneas e sedimentos, pH do solo, pressão mecânica, fatores biológicos, transporte de partículas, entre outras) determina em grande parte a preservação do osso (Nielsen-Marsh e Hedges, 2000a; Reiche *et al.*, 2003) e, portanto, é de grande importância entender os processos de alteração em solos e o impacto das condições ambientais na preservação óssea.

As apatites biológicas são um continuum de estruturas que diferem em tipo e grau de substituições, função, cristalinidade e, portanto, todas com implicações para a forma e função *in vivo*, e alterações *post mortem* ou diagénese (Driessens *et al.*, 1978; LeGeros, 1991; Lee-Thorp, 2002).

O índice de cristalinidade (IC, também designado de fator de desdobramento, *IR-SF*) é um dos parâmetros mais utilizados para estimar a alteração diagenética, sendo que este aumenta com os processos diagenéticos (Weiner e Bar Yosef, 1990; Bartsiakas e Middleton, 1992; Sillen e Morris, 1996; Wright e Schwarcz, 1996; Stiner *et al.*, 2001; Piga *et al.*, 2016). Os nanocristais de bioapatite tendem a recristalizar numa estrutura termodinamicamente mais estável, implicando uma estrutura cristalina mais ordenada, um tamanho de cristal maior e, portanto, uma redução significativa da área de superfície específica (Hedges *et al.* 1995; Nielsen-Marsh e Hedges, 2000a; Dal Sasso *et al.*, 2016). No entanto, nenhuma relação direta pôde ser observada entre o índice de preservação geral (IPG) e a cristalinidade, exibindo para ambos valores dispersos. Assim, estes resultados

Para além da métrica e da morfologia

confirmam que o IC não pode ser aplicado como representante da avaliação do estado de preservação (Pucéat *et al.*, 2004; Trueman *et al.*, 2008; Lebon *et al.*, 2010), pelo menos segundo o IPG.

É de ressaltar que existe algum debate sobre se os valores de IC aumentam devido a um aumento no tamanho do cristal ou à remoção de cristais menos solúveis e menos ordenados (Wright e Schwarcz, 1996; Thompson *et al.*, 2011). Person e colaboradores (1996) argumentaram a importância da fase orgânica em proteger a fração inorgânica de alterações tendo, portanto, influência sobre o IC - embora isto só ocorre até ao ponto em que há perda da fase orgânica da bioapatite. Trueman *et al.* (2008) e Lebon *et al.* (2010) concordam, explorando mais especificamente sobre o significado da fase orgânica na redução da porosidade óssea e, portanto, na exposição da superfície do cristal ao meio ambiente. Ademais, Nielsen-Marsh e Hedges (2000a) afirmam que o aumento do IC devido à dissolução diferencial dos cristais menores é insuficiente para explicar o estado de diversas matrizes minerais, tendo observado que a perda dos componentes menos cristalinos por dissolução<sup>2</sup> não explicam a magnitude da alteração dos valores do IC. Assim, a recristalização, com as suas implicações para incorporar ou substituir material exógeno, é um fato (Hedges, 2002).

Diversos estudos reportam que as fases mineral e orgânica ósseas estão intimamente ligadas e as alterações *post mortem* da estrutura cristalina é frequentemente associada à perda de material orgânico, dado que o rompimento do tecido cristalino promove um aumento da difusão da água e acelera a quebra do componente orgânico (Sillen e Parkington, 1996; Nielsen-Marsh e Hedges, 1999, 2000a; Collins *et al.*, 2002; Trueman *et al.*, 2004, 2008). No entanto, não foi observável uma associação entre o conteúdo de colagénio e o IPG dos indivíduos em estudo, não havendo uma diretriz válida e preditiva para o estado de preservação. É de notar que os estudos acima referidos trabalharam todos com amostras arqueológicas, cujo conteúdo de colagénio é, regra geral, bastante

---

<sup>2</sup> A dissolução remove o mineral do osso, da mesma forma que remove os carbonatos e fosfatos dos sedimentos circundantes. A recristalização envolve a reorganização molecular da bioapatite, mas não é necessariamente independente da dissolução (Hedges *et al.*, 1995; Stiner *et al.*, 2001). Embora estes processos diagenéticos possam ser induzidos por muitos fatores, a água e o pH neutro ou ácido são essenciais para a dissolução e a recristalização (Weiner e Bar-Yosef, 1990; Stiner *et al.*, 1995, 2001).

inferior ao das amostras forenses (Vassalo *et al.*, 2016). Além disso, a preservação do colagénio depende estritamente das condições climáticas e de enterramento, em particular da temperatura e do pH das soluções do solo (Hedges *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2007; Dal Sasso *et al.*, 2016). A degradação do colagénio pode ser causada por hidrólise química, alteração da fração mineral óssea e/ou degradação microbiana (Collins *et al.*, 2002). Por sua vez, a perda de colagénio pode desempenhar um papel significativo na recristalização da bioapatite, uma vez que os nanocristais acabam por ser expostos ao ambiente de sepultamento, estando, portanto, mais suscetíveis a alterações (Collins *et al.*, 2002; Dal Sasso *et al.*, 2016).

Conforme diversos estudos (Stiner *et al.*, 1995; Nielsen-Marsh e Hedges, 2000a; Smith *et al.*, 2007), baixos valores de C/P indicam perda diagenética de carbonato, possivelmente durante o rearranjo ou dissolução da fase mineral, resultando num mau estado de preservação óssea. Porém, não se verificou qualquer associação entre a razão carbonato-fosfato e o IPG esquelético da amostra sob análise.

Atualmente, ainda é debatido se índices como o IC e C/P avaliam com precisão a diagénese de amostras de apatite biológica (Lee-Thorp e Sealy, 2008; Stathopoulou *et al.*, 2008; Trueman *et al.*, 2004, 2008). No entanto, os profissionais continuam a aplicar essas técnicas na ausência de medidas de diagénese melhores e mais acessíveis a fim de avaliar o estado de preservação ósseo. Poderá também não haver associação entre os índices calculados e o IPG (à exceção do C/C), possivelmente dado os valores calculados serem muito semelhantes e/ou o IPG representar a preservação total do esqueleto e não apenas do osso em questão. Outra possibilidade é que tanto o úmero como o fémur, devido ao seu tamanho relativo e robustez, são mais resistentes aos efeitos diagenéticos (Child, 1995; Jans *et al.*, 2004). Ademais, o tecido cortical, devido a ser menos poroso do que o osso trabecular, é muito menos suscetível a alterações *post mortem* (Carvalho e Marques, 2008).

A osteoporose é uma doença óssea metabólica caracterizada pelo aumento da reabsorção óssea em relação à formação que altera a heterogeneidade em nanoescala das propriedades do material e composição do tecido ósseo (Gadeleta *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2003; Boskey e Mendelsohn, 2005; Burket *et al.*, 2011). A frequência da osteoporose aumenta significativamente nas classes etárias mais avançadas, em ambos os sexos,

Para além da métrica e da morfologia

sendo superior no sexo feminino (Dias, 1998; Tenenhouse *et al.*, 2000; Canhão *et al.*, 2005; Woolf e Akesson, 2008; Shin, 2010; Curate 2011, 2014).

A densidade mineral óssea (DMO) medida no fémur proximal é considerada um preditor da resistência óssea (Fratzl *et al.*, 2004; Dall'ara *et al.*, 2013, 2016). A DMO consiste na quantidade mineral óssea por unidade de área de osso sondada, correspondendo o mineral em questão, à bioapatite (Cerroni *et al.*, 2000; Watts, 2004; Bonnick e Lewis, 2006; Faulkner e Miller, 2007). A DMO areal ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), medida por DXA, representa uma integração das contribuições do osso cortical e trabecular osso dentro da área digitalizada (Cheng *et al.*, 1997).

O conteúdo mineral ósseo (CMO) humano varia entre 35 a 65% de acordo com a idade, sexo e saúde do indivíduo (Nicholson, 1996). O declínio do CMO e, conseqüentemente da DMO, com o aumento da idade pode levar à osteopenia e em casos mais extremos à osteoporose (Kirchengast *et al.*, 2001), havendo diferenças entre os sexos e os grupos étnicos (Jergas e Genant, 1993). Nas mulheres, a DMO começa a diminuir em torno dos 40 a 50 anos, correspondendo à fase da vida em que ocorrem a perimenopausa e a menopausa (Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009), sendo nesta faixa etária que a prevalência da osteoporose incrementa (Yang *et al.*, 2004; Larijani *et al.*, 2005; Povoroznyuk *et al.*, 2007; Curate, 2011). Embora os homens não experimentem o equivalente à menopausa, os seus níveis circulantes de esteróides sexuais biologicamente disponíveis caem progressivamente com o envelhecimento e levam a aumentos na reabsorção óssea e perda óssea naqueles com níveis circulantes mais baixos (Khosla *et al.*, 1998, 2002).

Este estudo demonstra que, apesar de a DMO não estar relacionada com a cristalinidade para a amostra total, nas mulheres esta aumenta linearmente com o incremento da DMO do colo femoral e da área de Ward. Ou seja, mulheres cujas DMO anteriormente referidas sejam diminutas (osteopénicas ou osteoporóticas), contêm cristais menos perfeitos e mais pequenos (Rai e Behari, 1986; Grynypas e Holyard, 1988), provavelmente afetando negativamente as propriedades mecânicas do osso (Paschalis *et al.*, 1997a,b). No entanto, é de notar que alguma da literatura afirma que ossos osteoporóticos (Baud *et al.*, 1976; Chatterji *et al.*, 1981; Boskey, 2007; Boskey e Robey, 2007) têm uma cristalinidade superior ao osso humano normal (Boskey *et al.*, 2005; Boskey, 2007; Paschalis *et al.*, 1997a,b, 2004, 2011), dado que, por razões físico-químicas, geralmente os cristais de

menor dimensão são reabsorvidos durante a remodelação, persistindo dentro da matriz os cristais maiores e mais perfeitos, contribuindo para a natureza frágil do osso osteoporótico (Boskey, 2007; Boskey e Robey, 2007). Burnell e colaboradores (1980) observaram que a densidade mineral óssea total aumentava em função do tamanho do cristal, pois à medida que a área superficial diminui com o aumento do tamanho médio dos cristais com a idade, a densidade incrementa.

Em Portugal, os bisfosfonatos (alendronato, risedronato e ibandronato) são considerados os fármacos de primeira linha para a terapêutica da osteoporose (Marques *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2018). Diversos estudos sugerem que a terapia com bifosfonatos evita o crescimento e a dissolução de cristais (menor cristalinidade), bem como inibe a reabsorção mediada pelos osteoclastos (Grynpas, 1993), mantendo ou aumentando a massa óssea e aumenta o CMO e, por sua vez, a DMO (Greenspan *et al.*, 1994; Black *et al.*, 1996; Pols *et al.*, 1999; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2010,2013; Donnelly *et al.*, 2012), alterando também as propriedades minerais da matriz óssea (Donnelly *et al.*, 2012). Deve-se ressaltar que também a deficiência de vitamina D pode causar uma diminuição da DMO, devido à minoração de formação de minerais (Dickson e Kodicek, 1979), bem como da cristalinidade (Rai e Behari, 1986).

Na amostra femoral feminina, com o aumento das diferentes DMO (com exceção da DMO intertrocanteriana) em análise, é possível observar um decaimento da relação C/P (Tabelas A.17 e A.18). Na mesma amostra também se nota um decaimento do conteúdo de carbonato do tipo B (Tabelas A.8 e A.9) com o incremento das DMO do colo femoral, grande trocânter e da área de Ward. Níveis mais elevados de  $\text{PO}_4^{3-}$  estimulam mais a formação óssea e aumentam a mineralização, sendo o fosfato fisiologicamente mais importante na regulação da formação óssea do que na reabsorção (Rai e Behari, 1986). Portanto, quanto maior o conteúdo de carbonato na bioapatite, menor a sua DMO devido a uma menor formação óssea que poderá levar à osteoporose. Além disso, sabe-se que as substituições de carbonato por fosfato que ocorrem na bioapatite com a idade reduzem a rigidez da matriz óssea (Akkus *et al.*, 2004). Segundo Isaksson e co-autores (2010), como o conteúdo do carbonato do tipo B parece estar relacionado com a taxa de remodelação óssea, dado o  $\text{CO}_3^{2-}$  substituir os iões  $\text{PO}_4^{3-}$  nos cristais de bioapatite ao longo do tempo, o parâmetro C/P aparenta ser um bom indicador da atividade de remodelação



Para além da métrica e da morfologia

óssea. No entanto, Thompson e colaboradores (1983), mostraram que os cristais maiores e mais perfeitos no osso osteoporótico, ou seja, em ossos cuja DMO é diminuta, tinham menor conteúdo de  $\text{CO}_3^{2-}$  do que os cristais menores e menos perfeitos do osso normal. Similarmente, observou-se na amostra feminina que o parâmetro  $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$  diminui à medida que o CMO do colo femoral aumenta. Curate (2011) verificou que a DMO e o CMO do colo do fémur estão muito correlacionados. Portanto, dado a DMO consistir numa equação matemática entre o CMO e a área de osso investigada, com o decréscimo da quantidade mineral óssea, conseqüentemente os valores da densidade óssea irão ser menores. Contrariamente, a relação C/C aumenta com o incremento das DMO da região intertrocantérica e da área de Ward, refletindo um aumento do carbonato tipo A em relação ao tipo B, provavelmente devido a uma transferência de sítios B para A (Mamede *et al.*, 2018).

A fração de carbonato do tipo A em apatites biológicas em todos os casos relatados é muito baixa (LeGeros *et al.*, 1969; Snoeck *et al.*, 2014; Madupalli *et al.*, 2017), dado a carbonatação do tipo B da apatite biológica ser favorecida cineticamente, possivelmente pela substituição do  $\text{CO}_3^{2-}$  por  $\text{PO}_4^{3-}$  causar menos perturbação na rede cristalina da bioapatite (Madupalli *et al.*, 2017). Segundo Wright e Schwarcz (1996), num dos dois locais carbonatados permutáveis no osso, a substituição é rápida e completa durante o enterro, enquanto no outro permuta mais lentamente. Isto poderá representar os carbonatos tipo B e A, respetivamente. Os valores calculados para o conteúdo de carbonato do tipo A (API) foram mais elevados do que os obtidos por Snoeck e co-autores (2014). Isto poder-se-á dever ao facto de estes terem utilizado ossos frescos de fauna. De resto, o API femoral tem uma associação negativa com o CMO total e do colo femoral (Tabelas A.5 e A.6), que conseqüentemente iria diminuir os valores das respetivas DMO, mas não existe significância estatística. Curiosamente, o conteúdo de carbonato do tipo A no úmero na amostra feminina é diretamente proporcional a todas as DMO em estudo (Tabela A.7). Dado as médias dos API do fémur e do úmero, bem como os seus correspondentes intervalos de confiança serem semelhantes, seria de esperar que houvesse também uma correlação entre o API femoral e a DMO.

No entanto, os valores API não levam a uma interpretação clara, posto que é possível que tenha havido sobrestimação destes. A banda a  $1540\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao carbonato do tipo

A,  $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_A$ , é consideravelmente afetada pela interferência da banda Amida II, sobrepondo-se (Snoeck *et al.*, 2014; Mamede *et al.*, 2018). Ademais, Madupalli e colaboradores (2017) sugerem que a presença de uma quantidade substancial de carbonato do tipo B na rede cristalina afeta fortemente as frequências vibracionais do carbonato do tipo A,  $\nu_3(\text{CO}_3^{2-})_A$ .

A banda Amida I, tipicamente observada na região 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$ , é a banda de absorção mais intensa do colagénio. Resulta principalmente da vibração de elongação C=O e está diretamente relacionada com a conformação da cadeia principal (Figueiredo *et al.*, 2012). O índice Am/P é representativo da quantidade de colagénio presente normalizada à quantidade de mineral ósseo. Segundo Figueiredo e co-autores (2012), o inverso de Am/P (P/Am) é um indicador importante da maturação ou envelhecimento do osso e está linearmente relacionado com a densidade mineral óssea. O mesmo foi observado entre a razão Am/P femoral e a DMO do grande trocânter na amostra total. O conteúdo de colagénio tem um efeito significativo sobre as propriedades mecânicas do osso: a diminuição do colagénio da matriz cortical vai fazer com que haja uma redução na resistência mecânica da matriz óssea (Danielsen *et al.*, 1986). Também se verificou uma associação, apesar de ser fraca, entre o conteúdo de colagénio no úmero e a DMO do colo femoral no grupo das mulheres. Tal como no API, poder-se-á dever ao facto de, no sexo feminino, não se observarem diferenças significativas entre o valor de Am/P do úmero e do fémur (Tabela 3.2.1.2.).

Embora a perda óssea na osteoporose esteja geralmente relacionada com a densidade óssea, estudos biomecânicos demonstram que outras propriedades do osso, como a arquitetura e a composição química, contribuem para a sua resistência. Por exemplo, o tamanho, a orientação e o arranjo local das partículas minerais são importantes determinantes da resistência óssea (Martin e Ishida, 1989; Huang *et al.*, 2003).

Uma diminuição da cristalinidade associada a uma diminuição do conteúdo de proteína, bem como o aumento de BPI (e consequentemente do rácio C/P) com a diminuição da DMO, são fatores que tornam os ossos frágeis (menos resistentes e flexíveis e mecanicamente menos fortes). O tecido ósseo é um nanocompósito orgânico-inorgânico cuja rigidez é fornecida pelos nanocristais de bioapatite, incorporados nas fibrilhas de colagénio, uma proteína fibrosa, de uma forma muito especial e altamente organizada

Para além da métrica e da morfologia

(Rey *et al.*, 2009). É a ligação entre a componente orgânica à componente inorgânica mineral óssea que proporciona resistência ao osso (Huang *et al.*, 2003) e que garante as excelentes propriedades mecânicas da matriz mineralizada (Roschger *et al.*, 2001).

Ao longo da vida, a área da seção transversal do colo do fémur e a massa óssea diminuem, sendo essa diminuição mais pronunciada nas mulheres do que nos homens (Duan *et al.*, 2003; Riggs *et al.*, 2004). Essa perda pode ser induzida pela menopausa ou pelo simples facto de o colo do fémur ser um local de suporte do peso corporal (Riggs *et al.*, 2004). Além disso, com o envelhecimento, as diferenças relacionadas com o sexo na geometria e morfologia ósseas tornam-se mais pronunciadas (Yates *et al.*, 2007). A área total na amostra geral tendeu a aumentar com a diminuição do API e do conteúdo de colagénio. No entanto, na amostra masculina observou-se um aumento da área do colo femoral com um incremento do Am/P e do conteúdo de carbonato (tanto do tipo A como do tipo B). Segundo diversos autores (Bouxsein *et al.*, 1995; Courtney *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1997), a área do colo femoral está correlacionada com a capacidade de suporte/carga do fémur, estando associada de forma significativa com a resistência femoral (Cheng *et al.*, 1997). De acordo com alguns estudos, verificou-se que houve um aumento da área do colo femoral com o aumento da idade apenas nos homens (Beck *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1997). Esta alteração na estrutura óssea pode resultar na redistribuição do material restante para obter uma resistência mecânica ideal (Ruff e Hayes, 1988; Beck *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1997).

Estudos anteriores observaram que a resistência óssea está altamente correlacionada com a DMO (Cheng *et al.*, 1997; Dall'Ara *et al.*, 2016) ou com o conteúdo mineral ósseo (Jurist e Foltz, 1977; Leichter *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 2000). É sabido que o CMO total aumenta com a idade durante o crescimento e desenvolvimento e o seu declínio ocorre com o envelhecimento do indivíduo (Boskey e Coleman, 2010). Tal como com a área total, os índices API e Am/P do fémur diminuíram com o incremento dos CMO total e do colo femoral na amostra total. Uma hipótese poderá ser que, com o envelhecimento, os homens, parecem compensar a diminuição do CMO do colo do fémur relacionada com a idade, aumentando a área do colo femoral.

Segundo a correlação entre o rácio Am/P do fémur e a massa óssea (Tabelas A.21 e A.22), apesar de fraca, parece haver uma quantidade decrescente de colagénio com o aumento

da massa óssea. Contudo, de acordo com Nielsen-Marsh e Hedges (2000b), a perda de massa óssea tem uma relação muito próxima com a estrutura interna do osso, nomeadamente o conteúdo proteico, sendo que amostras com maior percentagem de nitrogénio tinham uma menor perda óssea. Como o colagénio tipo – I é o principal componente proteico no osso, a redução dos valores Am/P do fémur com a sua massa óssea presumivelmente envolve uma hidrólise significativa do colagénio (Trueman *et al.*, 2004). No entanto, foi demonstrado que a intensidade relativa da banda Amida I do colagénio pode aumentar com a sua desnaturação (Paschalis *et al.*, 2001). Porém, o destino mais comum do osso é a dissolução da fase mineral, levando, em última análise, à perda óssea (Smith *et al.*, 2007).

Alterações na rede de colagénio no osso potencialmente podem levar à variação das propriedades mecânicas do osso e podem ocorrer a diferentes níveis: desnaturação do colagénio, caracterizada pela perda da sua estrutura secundária e/ou terciária devido à quebra de pontes de hidrogénio, e clivagem de moléculas triplas helicoidais (Wang *et al.*, 2001; Koon *et al.*, 2010). As ligações cruzadas intermoleculares do colagénio desempenham um papel importante na manutenção da estabilidade estrutural da rede colagenosa (Oxlund *et al.*, 1996). Morfologicamente, mudanças na orientação espacial, no arranjo e na geometria das fibrilhas de colagénio podem afetar as propriedades biomecânicas do osso (Wang *et al.*, 2000). Quando as moléculas de colagénio são de alguma forma desnaturadas ou clivadas, elas são mecanicamente menos estáveis e perdem potencialmente a sua resistência (Wang *et al.*, 2000). Os modos de vibração de proteína Amida I podem sofrer alterações de número de onda e intensidade como resultado de mudanças na estrutura secundária do colagénio (Paschalis *et al.*, 1997a).

Na condição patológica mais significativa associada à deterioração da qualidade óssea e da integridade mecânica – osteoporose – não consiste apenas numa simples perda de massa óssea, mas envolve mudanças significativas na bioquímica da molécula de colagénio constituinte e, conseqüentemente, nas propriedades físicas das suas fibras (Bailey *et al.*, 1992, 1993; Knott *et al.*, 1995; Knott e Bailey, 1998; Wang *et al.*, 2002).

É de salientar que o conteúdo de colagénio, dado pela razão entre a banda Amida I e o pico do fosfato,  $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$ , pode ter diminuído com o aumento da massa óssea, DMO do grande trocânter, bem como das CMO total e do colo do fémur devido às várias razões

Para além da métrica e da morfologia

acima explanadas, como o também o pico da banda Amida I pode ter aumentado, mas o da banda  $\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$  incrementar a uma taxa mais elevada, fazendo com que o parâmetro Am/P diminua.

Também o índice C/C diminuiu com o aumento da massa óssea na amostra total. No entanto, como já foi referido anteriormente, dado a banda correspondente à quantidade de  $\text{CO}_3^{2-}$  do tipo A e B ( $1400\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ) poder ficar sobreposta com várias bandas de absorção de componentes orgânicos – proteínas (CH, Amida II, COO-), glicosaminoglicanos (NH) ou lípidos ( $\text{CH}_2$ ) (Termine *et al.*, 1973; Rey *et al.*, 1989; Petra *et al.*, 2005; Mamede *et al.*, 2018) – pode levar a interpretações falsas, não sendo um parâmetro fidedigno.

## 5. Conclusão e Perspetivas Futuras

A investigação de restos esqueléticos cuja identificação é desconhecida, é um aspeto crucial da Antropologia Forense, sendo a estimativa da idade à morte e a diagnose sexual sempre um passo preliminar importante na fase de investigação dos casos, numa tentativa de estimar o perfil biológico.

A espectroscopia de infravermelho FTIR-ATR é uma ferramenta altamente especializada para estudar as modificações físico-químicas das frações inorgânica e orgânica do tecido ósseo, fornecendo-nos informações detalhadas. A pequena quantidade de amostra necessária para análise, o seu baixo custo e a quantificação fácil são grandes vantagens quando comparadas a outras técnicas. Embora o FTIR-ATR não possa substituir completamente a análise de DNA, ela pode ser utilizada como uma técnica complementar. Assim, o desenvolvimento de uma técnica rápida, direta e fiável para estimar a idade à morte e o sexo dos restos esqueléticos é um dos aspetos mais urgentes da Antropologia Forense.

A aplicação dos índices Am/P, API, BPI, C/C, C/P e IC em úmeros e fémures de restos esqueletizados tinha como objetivo estabelecer uma nova metodologia para a estimativa da idade à morte e do sexo, sem recorrer à análise osteométrica e osteomorfológica quando esta não é possível.

Para tal, em primeiro lugar, verificou-se uma diferença substancial entre o fémur e o úmero, com exceção dos índices API e Am/P para o sexo feminino, enfatizando a importância da amostragem específica. A adoção de uma estratégia de amostragem padronizada é vital para uma comparação adequada de dados entre estudos.

Alterações dependentes da idade na matriz óssea em humanos afetam diferentes componentes da matriz de diferentes maneiras. Um só constituinte pode ter implicações profundas nas mudanças de outros componentes. Apesar de décadas de investigação, os problemas da natureza exata da fase mineral do osso e as modificações que sofre com o tempo e o envelhecimento nunca foram satisfatoriamente resolvidos.

Para além da métrica e da morfologia

Com o progresso da idade à morte, sobretudo nas mulheres, a estrutura cristalina é mais desordenada tendo mais deformações e cristais menores, devido a uma maior incorporação de carbonato do tipo B na rede cristalina, implicando uma diminuição do valor do IC e um aumento do BPI e C/P. No entanto, para uma verdadeira compreensão da mudança de todos estes índices, é necessário incluir indivíduos não-adultos e adultos jovens em investigações futuras.

É importante também sublinhar que alguns oligoelementos provocam um efeito na rede cristalina da apatite biológica. Por exemplo,  $Mg^{2+}$  pode substituir o ião cálcio na estrutura da bioapatite e a presença de  $CO_3^{2-}$  reduz o seu efeito destabilizador (Bigi *et al.*, 1997). Também a extensão da incorporação de carbonato é influenciada pela presença de catiões como  $Na^+$  e  $K^+$ , que favorecem uma maior incorporação de  $CO_3^{2-}$ , e  $Sr^{2+}$ , que limita a extensão da incorporação do anião carbonato (Driessens *et al.*, 1978; LeGeros e LeGeros, 1984). Seria, portanto, importante apurar se estes iões estão também relacionados com o avançar da idade.

No que diz respeito ao IPG, não foi observada nenhuma associação, com exceção do C/C, demonstrando que não existe uma relação entre as razões aqui estudadas e a preservação óssea. No entanto, isto poder-se-á dever ao facto que o IPG não exprime a preservação específica do osso, mas sim do esqueleto em geral. Além disso, variações das condições locais de enterramento podem contribuir para aumentar a variabilidade do estado de alteração óssea num sepultamento. Também o período de inumação, característica principal diagenética da fração mineral (Hedges *et al.*, 1995), pode afetar os valores obtidos dos parâmetros em estudo. Análises químicas do solo do enterramento dos indivíduos podem permitir uma melhor compreensão da sua interação com os restos cadavéricos e um melhor entendimento das variações pós-deposicionais.

Alterações na composição química decorrentes de doenças ósseas têm sido discutidas. O estabelecimento de alterações naturais no osso associadas à idade, como a deterioração das propriedades mecânicas do osso, também pode ser importante para o entendimento de formas mais sérias de osteoporose senil, osteoporose pós-menopausa e outras doenças ósseas metabólicas patológicas. Os valores da DMO no fémur proximal total e das suas regiões de interesse mostraram uma relação com os todos os índices femorais, com exceção do API e do Am/P, apenas no sexo feminino. Na amostra total, houve uma

associação os CMO total e do colo femoral com os parâmetros API e Am/P, sendo que estes se correlacionaram com a área total do fémur das regiões de interesse e a área do colo femoral no grupo masculino. Assim, homens e mulheres apresentaram diferentes alterações relacionadas com a sua composição química na DMO, CMO e área sondada implicando diferenças na estrutura e força mecânica nas regiões femorais proximais onde a DMO foi analisada.

Doenças ósseas como a osteoporose são caracterizadas por conteúdo mineral anormal de tecido, deposição e turnover (Miller *et al.*, 2001). Assim, no futuro devem ser realizados estudos para avaliar diferenças entre os índices aplicados nesta investigação em indivíduos saudáveis *versus* indivíduos osteoporóticos. Ao fazer isso, esperamos identificar quaisquer anormalidades fisiológicas que ocorram na deposição mineral óssea, levando à patologia. Além disso, é sabido que o tratamento para a osteoporose aumenta o valor da DMO. Assim, futuramente, um estudo comparativo entre mulheres osteoporóticas com e sem tratamento deve ser realizada para verificar se os bifosfonatos, no caso de Portugal, afetam ou não os parâmetros em estudo e averiguar se é possível observar se houve ou não terapia farmacológica.

Em suma, a análise espectroscópica de infravermelho FTIR-ATR é a ferramenta ideal para estabelecer as importantes propriedades químicas do tecido ósseo e entender melhor como estas se alteram, sobretudo, variações relacionadas com a idade à morte e DMO na cristalinidade mineral e substituições não estequiométricas na rede cristalina. Esta abordagem será de utilidade indiscutível na antropologia forense, como também na arqueologia.

Alguns destes parâmetros mostraram ter grande potencial quanto à estimativa da idade à morte, sobretudo para o sexo feminino, nomeadamente o IC e o BPI por FTIR-ATR. Além disso, os conhecimentos adquiridos a partir dessa investigação são bastante inovadores e contribuem para os trabalhos científicos sobre a estimativa da idade à morte e do sexo e patologias, nomeadamente a osteoporose, sendo de particular importância em contextos forenses. Mais estudos ainda são necessários para confirmar as presentes conclusões e um melhor entendimento das questões abordadas nesta dissertação.





## 6. Referências Bibliográficas

- Agarwal, S. 2008. Light and Broken Bones: Examining and Interpreting Bone Loss and Osteoporosis in Past Populations. *In: Katzenberg, A.; Saunders, S. (eds.). Biological Anthropology of the Human Skeleton*. Hoboken, John Wiley & Sons: 387-410. ISBN: 9780471793724.
- Akkus, O., Adar, F.; Schaffler, M. B. 2004. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*, 34(3): 443-453. DOI: 10.1016/j.bone.2003.11.003.
- Akkus, O.; Polyakova-Akkus, A.; Adar, F.; Schaffler, M. B. 2003. Aging of Microstructural Compartments in Human Compact Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(6): 1012-1019. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.6.1012.
- Albergaria, B. H.; Chalem, M.; Clark, P.; Messina, O. D.; Pereira, R. M. R.; Vidal, L. F. 2018. Consensus statement: osteoporosis prevention and treatment in Latin America — current structure and future directions. *Archives of Osteoporosis*, 13(1): 90. DOI: 10.1007/s11657-018-0505-x.
- Amarante, A. 2016. Burned bones vs unburned bones: a pilot study about the impact of differential post-depositional taphonomy on bioanthropological research. Dissertação em Evolução e Biologia Humanas apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- American Board of Forensic Anthropology. *Official website* [Acedido em 15 de Maio de 2019]. Disponível em: [www.theabfa.org](http://www.theabfa.org).
- Antonakos, A.; Liarakis, E.; Leventouri, T. 2007. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*, 28(19): 3043-3054. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.028.
- Ascenzi, A.; Bonucci, E.; Ostrowski, K.; Sliwowski, A.; Dziedzic-Goçławska, A.; Stachowicz, W.; Michalik, J. 1977. Initial Studies on the Crystallinity of the Mineral Fraction and Ash Content of Isolated Human and Bovine Osteons Differing in Their Degree of Calcification. *Calcified Tissue Research*, 23(1): 7-11. DOI: 10.1007/BF020 12760.
- Astala, R.; Stott, M. J. 2005. First Principles Investigation of Mineral Component of Bone: CO<sub>3</sub> Substitutions in Hydroxyapatite. *Chemistry of Materials*, 17(16): 4125-4133. DOI: 10.1021/cm050523b.
- Awonusi, A.; Morris, M. D.; Tecklenburg, M. M. 2007. Carbonate Assignment and Calibration in the Raman Spectrum of Apatite. *Calcified Tissue International*, 81(1): 46-52. DOI: 10.1007/s00223-007-9034-0.

- Bacon, G. E. 1990. The dependence of human bone texture on life style. *Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences*, 240(1298): 363-370. DOI: 10.1098/rspb.1990.0042.
- Bailey, A. J.; Sims, T. J.; Ebbesen, E. N.; Mansell, J. P.; Thomsen, J. S.; Mosekilde, L. 1999. Age-Related Changes in the Biochemical Properties of Human Cancellous Bone Collagen: Relationship to Bone Strength. *Calcified Tissue International*, 65(3): 203-210. DOI: 10.1007/s002239900683.
- Bailey, A. J.; Wotton, S. F.; Sims, T. J.; Thompson, P. 1992. Post-translational modifications in the collagen of human osteoporotic femoral head. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185(3), 801-805. DOI: 10.1016/0006-291X(92)91697-O.
- Bailey, A. J.; Wotton, S. F.; Sims, T. J.; Thompson, P. W. 1993. Biochemical changes in the collagen of human osteoporotic bone matrix. *Connective tissue research*, 29(2): 119-132. DOI: 10.3109/03008209309014239.
- Bartsiokas, A.; Middleton, A. P. 1992. Characterization and dating of recent and fossil bone by X-ray diffraction. *Journal of Archaeological Science*, 19(1): 63-72. DOI: 10.1016/0305-4403(92)90007-P.
- Baud, C. A.; Pouëzat, J. A.; Tochon-Danguy, H. J. 1976. Quantitative Analysis of Amorphous and Crystalline Bone Tissue Mineral in Women with Osteoporosis. In: Nielsen S.P.; Hjørting-Hansen E. (eds.) *Calcified Tissues 1975*. Springer, Berlin, Heidelberg: 452-456. ISBN: 978-3-662-29272-3.
- Bazin, D.; Chappard, C.; Combes, C.; Carpentier, X.; Rouzière, S.; André, G.; Matzen, G.; Allix, M.; Thiaudière, D.; Reguer, S.; Jungers, P.; Daudon, M. 2009. Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterise bones. *Osteoporosis International*, 20(6): 1065–1075. DOI: s00198-009-0868-3.
- Beasley, M. M.; Bartelink, E. J.; Taylor, L.; Miller, R. M. 2014. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis. *Journal of Archaeological Science*, 46: 16-22. DOI: 10.1016/j.jas.2014.03.008.
- Beck, T. J.; Ruff, C. B.; Scott, W. W.; Plato, C. C.; Tobin, J. D.; Quan, C. A. 1992. Sex differences in geometry of the femoral neck with aging: A structural analysis of bone mineral data. *Calcified tissue international*, 50(1): 24-29. DOI: 10.1007/BF00297293.
- Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Ripamonti, A.; Roveri, N.; Romanello, M.; Suarez, K. N.; Moro, L. 1997. Chemical and Structural Characterization of the Mineral Phase from Cortical and Trabecular Bone. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 68(1): 45-52. DOI: 10.1016/S0162-0134(97)00007-X.
- Black, D. M.; Cummings, S. R.; Karpf, D. B.; Cauley, J. A.; Thompson, D. E.; Nevitt, M. C.; Bauer, D. C.; Genant, H. K.; Haskell, W. L.; Marcus, R.; Ott, S. M.; Torner, J. C.;

- Quandt, S. A.; Reiss, T. F.; Ensrud, K.E. 1996. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. *The Lancet*, 348(9041): 1535-1541. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)07088-2.
- Blank, R. D.; Baldini, T. H.; Kaufman, M.; Bailey, S.; Gupta, R.; Yershov, Y.; Boskey, A. L.; Coppersmith, S. N.; Demant, P.; Paschalis, E. P. 2003. Spectroscopically Determined Collagen Pyr/deH-DHLNL Cross-Link Ratio and Crystallinity Indices Differ Markedly in Recombinant Congenic Mice with Divergent Calculated Bone Tissue Strength. *Connective Tissue Research*, 44(3-4): 134-142. DOI: 10.1080/03008200390223918.
- Boaks, A.; Siwek, D.; Mortazavi, F. 2014. The temporal degradation of bone collagen: A histochemical approach. *Forensic Science International*, 240: 104-110. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.04.008.
- Bonar, L. C.; Roufousse, A. H.; Sabine, W. K.; Grynpsas, M. D.; Glimcher, M. J. 1983. X-Ray Diffraction Studies of the Crystallinity of Bone Mineral in Newly Synthesized and Density Fractionated Bone. *Calcified Tissue International*, 35(1): 202-209. DOI: 10.1007/BF02405032.
- Bonnick, S. 2010. Bone Densitometry in clinical Practice - Application and interpretation. Totowa, Humana Press. ISBN: 978-1-60327-499-9.
- Bonnick, S.; Lewis, L. 2006. *Bone Densitometry for Technologists*. Tottowa, Human Press. ISBN: 978-1-59259-992-9.
- Boskey, A. L. 2007. Osteoporosis and Osteopetrosis. In: Bäuerlein, E. (ed.) *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation*. Wiley-VCH, Weinheim: 59-79. DOI: 10.1002/9783527619443.ch49.
- Boskey, A.; Camacho, N. P. 2007. FT-IR imaging of native and tissue-engineered bone and cartilage. *Biomaterials*, 28(15): 2465-2478. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.11.043.
- Boskey, A. L.; Coleman, R. 2010. Aging and Bone. *Journal of Dental Research*, 89(12): 1333-1348. DOI: 10.1177/0022034510377791.
- Boskey, A. L.; DiCarlo, E.L.; Paschalis, E.; West, P.; Mendelsohn, R. 2005. Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high-and low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. *Osteoporosis International*, 16(12): 2031-2038. DOI: 10.1007/s00198-005-1992-3.
- Boskey, A. L.; Imbert, L. 2017. Bone quality changes associated with aging and disease: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1410(1): 93-106. DOI: 10.1111/nyas.13572.
- Boskey, A. L.; Mendelsohn, R. 2005. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vibrational Spectroscopy*, 38(1-2): 107-114. DOI: 10.1016/j.vibspec.2005.02.015.

Para além da métrica e da morfologia

- Boskey, A. L.; Robey, P. G. 2007. The Composition of Bone. In: Rosen, C. J. (ed.). *Primer on the bone metabolic diseases and disorders of mineral metabolism*. Wiley-Blackwell: 32-38. ISBN: 9781119266594.
- Boskey, J. A.; Gokhale, A. L.; Robey, P. G. 2001 The Biochemistry of Bone. In: Marcus, R.; Feldman, D.; Nelson, D.; Rosen, C. (eds.). *Osteoporosis I*. San Diego, Academic Press: 107–188. ISBN: 9780123705440.
- Bouxsein, M. L.; Courtney, A. C.; Hayes, W. C. 1995. Ultrasound and densitometry of the calcaneus correlate with the failure loads of cadaveric femurs. *Calcified Tissue International*, 56(2): 99-103. DOI: 10.1007/BF00296338.
- Brock, F.; Higham, T.; Ramsey, C. B. 2010. Pre-screening techniques for identification of samples suitable for radiocarbon dating of poorly preserved bones. *Journal of Archaeological Science*, 37(4): 855-865. DOI: 10.1016/j.jas.2009.11.015.
- Bruno, T. J. 1999. Sampling accessories for infrared spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 34(1-2): 91-120. DOI: 10.1081/ASR-100100840.
- Burket, J.; Gourion-Arsiquaud, S.; Havill, L. M.; Baker, S. P.; Boskey, A. L.; van der Meulen, M. C. 2011. Microstructure and nanomechanical properties in osteons relate to tissue and animal age. *Journal of Biomechanics*, 44(2): 277-284. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2010.10.018.
- Burnell, J. M.; Baylink, D. J.; Chestnut III, C. H.; Mathews, M. W.; Teubner, E. J. 1982. Bone matrix and mineral abnormalities in postmenopausal osteoporosis. *Metabolism*, 31(11): 1113-1120. DOI: 10.1016/0026-0495(82)90161-5.
- Burnell, J. M.; Teubner, E. J.; Miller, A. G. 1980. Normal maturational changes in bone matrix, mineral, and crystal size in the rat. *Calcified Tissue International*, 31(1): 13-19. DOI: 10.1007/BF02407162.
- Butu, M.; Rodino, S.; Pentea, M.; Negrea, A.; Petrache, P.; Butnariu, M. 2014. IR spectroscopy of the flour from bones of European hare. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures*, 9(4): 1317-1322.
- Canhão, H.; Fonseca, J. E.; Queiroz, M. V. 2005. Epidemiologia da Osteoporose, Mecanismos de Remodelação Óssea e Factores Protectores do Osso. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 30: 225-240.
- Carden, A.; Morris, M. D. 2000. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *Journal of Biomedical Optics*, 5(3): 259-269. DOI: 10.1117/1.429994.
- Carneiro, J. L.; Santos, A.; Magalhães, T.; Afonso, A.; Caldas, I. M. 2014. Human identification using dental techniques: A case report. *Medicine, Science and the Law*, 55(2): 78-81. DOI: 10.1177/0025802414531752.
- Carvalho, M. L.; Marques, A. F. 2008. Diagenesis evaluation in Middle Ages human bones using EDXRF. *X-Ray Spectrometry*, 37(1): 32-36. DOI: 10.1002/xrs.1006.

- Carvalho, M. L.; Marques, A. F.; Lima, M. T.; Reus, U. 2004. Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 59(8): 1251-1257. DOI: 10.1016/j.sab.2004.01.019.
- Casuccio, C. 1962. An Introduction to the Study of Osteoporosis (Biochemical and Biophysical Research in Bone Ageing). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 55: 663-668. DOI: 10.1177/003591576205500815.
- Cattaneo, C. 2007. Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. *Forensic Science International*, 165(2-3): 185-193. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.05.018.
- Cerroni, A. M.; Tomlinson, G. A.; Turnquist, J. E.; Grynopas, M. D. 2000. Bone mineral density, osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. *American Journal of Physical Anthropology*, 113(3): 389-410. DOI: 10.1002/1096-8644(200011)113:3<389::AID-AJPA9>3.0.CO;2-I.
- Chapuy, M. C.; Arlot, M. E.; Duboeuf, F.; Brun, J.; Crouzet, B.; Arnaud, S.; Delmas, P. D., Meunier, P. J. 1992. Vitamin D3 and Calcium to Prevent Hip Fractures in Elderly Women. *New England Journal of Medicine*, 327(23): 1637-1642. DOI: 10.1056/NEJM199212033272305.
- Chatterji, S.; Wall, J. C.; Jeffery, J. W. 1981. Age-Related Changes in the Orientation and Particle Size of the Mineral Phase in Human Femoral Cortical Bone. *Calcified Tissue International*, 33(1): 567-574. DOI: 10.1007/BF02409493.
- Cheng, X. G.; Lowet, G.; Boonen, S.; Nicholson, P. H. F.; Brys, P.; Nijs, J.; Dequeker, J. 1997. Assessment of the strength of proximal femur in vitro: Relationship to femoral bone mineral density and femoral geometry. *Bone*, 20(3): 213-218. DOI: 10.1016/S8756-3282(96)00383-3.
- Child, A. M. 1995. Towards and Understanding of the Microbial Decomposition of Archaeological Bone in the Burial Environment. *Journal of Archaeological Science*, 22(2): 165-174. DOI: 10.1006/jasc.1995.0018.
- Christensen, A.; Nicholas Passalacqua, N.; Bartelink, E. (eds.). 2014. *Forensic anthropology: current methods and practice*. Academic Press. ISBN: 9780124186712.
- Coates, J. 2000. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In: Meyers, R.A. (ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Chichester, Reino Unido, John Wiley & Sons, Ltd.: 10815–10837. ISBN: 9780470027318.
- Collins, M. J.; Nielsen–Marsh, C. M.; Hiller, J.; Smith, C. I.; Roberts, J. P.; Prigodich, R. V.; Wess, T. J.; Csapò, J.; Millard, A. R.; Turner–Walker, G. 2002. The survival of organic matter in bone: a review. *Archaeometry*, 44(3): 383-394. DOI: 10.1111/1475-4754.t01-1-00071.

- Consensus Development Conference. 1991. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine*, 90: 107–110. DOI: 10.1016/0002-9343(91)90512-V.
- Consensus Development Conference. 1993. Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine*, 94: 646–650. DOI: 10.1016/0002-9343(93)90218-E.
- Courtney, A. C.; Wachtel, E. F.; Myers, E. R.; Hayes, W. C. 1995. Age-related reductions in the strength of the femur tested in a fall-loading configuration. *The Journal Of Bone And Joint Surgery*, 77(3): 387-395. DOI: 10.2106/00004623-199503000-00008.
- Cunha, E. 2014. A antropologia forense passo a passo. In: Gomes, A. (coord.). *Enfermagem Forense*. Lisboa, Lidel: 280-288.
- Cunha, E.; Cattaneo, C. 2017. Historical Routes and Current Practice for Personal Identification. In: Ferrara, Santo Davide (Ed.). *P5 Medicine and Justice*. Springer: 398-411. DOI: 10.1007/978-3-319-67092-8\_25.
- Curate F. 2011. *O Perímetro do Declínio: Osteoporose e Fraturas de Fragilidade em Três Amostras Osteológicas Identificadas Portuguesas – Séculos XIX & XX*. Tese de Doutoramento em Antropologia Biológica apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Curate, F. 2014. Osteoporosis and paleopathology: a review. *Journal of Anthropological Sciences*, 92: 119-146. DOI: 10.4436/JASS.92003.
- Dal Sasso, G.; Lebon, M.; Angelini, I.; Maritan, L.; Usai, D.; Artioli, G. 2016. Bone diagenesis variability among multiple burial phases at Al Khiday (Sudan) investigated by ATR-FTIR spectroscopy. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 463: 168-179. DOI: 10.1016/j.palaeo.2016.10.005.
- Dall’Ara, E.; Eastell, R.; Viceconti, M.; Pahr, D.; Yang, L. 2016. Experimental validation of DXA-based finite element models for prediction of femoral strength. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 63: 17-25. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2016.06.004.
- Dall’Ara, E.; Luisier, B.; Schmidt, R.; Pretterklieber, M.; Kainberger, F.; Zysset, P.; Pahr, D. 2013. DXA predictions of human femoral mechanical properties depend on the load configuration. *Medical Engineering & Physics*, 35(11): 1564-1572. DOI: 10.1016/j.medengphy.2013.04.008.
- Damann, F.E.; Edson, S.M., 2008. Sorting and identifying commingled remains of U.S. war dead: The collaborative roles of JPAC and AFDIL. In: Adams, B.J.; Byrd, J.E. (eds.). *Recovery, Analysis, and Identification of Commingled Human Remains*. Totowa, Humana Press: 301–315. ISBN: 978-1-59745-316-5.

- Danielsen, C. C.; Andreassen, T. T.; Mosekilde, L. 1986. Mechanical properties of collagen from decalcified rat femur in relation to age and *in vitro* maturation. *Calcified Tissue International*, 39(2): 69-73. DOI: 10.1007/BF02553293.
- D'Elia, M.; Gianfrate, G.; Quarta, G.; Giotta, L.; Giancane, G.; Calcagnile, L. 2007. Evaluation of possible contamination sources in the <sup>14</sup>C analysis of bone samples by FTIR spectroscopy. *Radiocarbon*, 49(2): 201-210. DOI: 10.1017/S0033822 200042120.
- Dequeker, J.; Merlevede, W. 1971. Collagen content and collagen extractability pattern of adult human trabecular bone according to age, sex and amount of bone mass. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 244(2): 410-420. DOI: 10.1016/0304-4165(71)90243-1.
- Dequeker, J.; Remans, J.; Franssen, R.; Waes, J. 1971. Ageing patterns of trabecular and cortical bone and their relationship. *Calcified Tissue Research*, 7(1): 23-30. DOI: 10.1007/BF02062590.
- Dias, A. 1998. Epidemiologia da osteoporose. In: Queiroz, M. (ed.). *Osteoporose*. Lisboa, Lidel: 25-40.
- Dickson, I. R.; Kodicek, E. 1979. Effect of vitamin D deficiency on bone formation in the chick. *Biochemical Journal*, 182(2): 429-435. DOI: 10.1042/bj1820429.
- Donnelly, E.; Meredith, D. S.; Nguyen, J. T.; Gladnick, B. P.; Rebolledo, B. J.; Shaffer, A. D.; Lorich, D. G.; Lane, J. M.; Boskey, A. L. 2012. Reduced cortical bone compositional heterogeneity with bisphosphonate treatment in postmenopausal women with intertrochanteric and subtrochanteric fractures. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(3), 672-678. DOI: 10.1002/jbmr.560.
- Driessens, F. C. M.; Van Dijk, J. W. E.; Borggreven, J. M. P. M. 1978. Biological calcium phosphates and their role in the physiology of bone and dental tissues I. Composition and solubility of calcium phosphates. *Calcified Tissue Research*, 26(1): 127-137. DOI: 10.1007/BF02013247.
- Duan, Y.; Beck, T. J.; Wang, X. F.; Seeman, E. 2003. Structural and Biomechanical Basis of Sexual Dimorphism in Femoral Neck Fragility Has Its Origins in Growth and Aging. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(10): 1766-1774. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.10.1766.
- Dutta, A. 2017. Fourier Transform Infrared Spectroscopy. In: Thomas, S.; Thomas, R.; Zachariah, A.; Mishra, R. (eds.). *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, Elsevier: 73-93. ISBN: 9780323461467.
- Eastoe, J. E. 1968. Chemical aspects of the matrix concept in calcified tissue organisation. *Calcified Tissue Research*, 2(1): 1-19. DOI: 10.1007/BF02279189.
- Ellis, D. I.; Goodacre, R. 2006. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*, 131(8): 875-885. DOI: 10.1039/b602376m.



- Espírito-Santo, H.; Daniel, F. 2017. Calcular e apresentar tamanhos do efeito em trabalhos científicos (2): Guia para reportar a força das relações. *Revista Portuguesa de Investigação Comportamental e Social*, 3(1): 53-64. DOI: 10.7342/ismt.rpics.2017.3.1.48.
- Faulkner, K.; Miller, P. 2007. Clinical Use of Bone Densitometry. In: Marcus, R.; Feldman, D.; Nelson, D.; Rosen, C. (eds.). *Osteoporosis I*. San Diego, Academic Press: 1493-1518. ISBN: 9780123705440.
- Fay, M. P.; Proschan, M. A. 2010. Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Statistics Surveys*, 4: 1-39. DOI: 10.1214/09-SS051.
- Fedarko, N. S.; Vetter, U. K.; Weinstein, S.; Robey, P. G. 1992. Age-Related Changes in Hyaluronan, Proteoglycan, Collagen, and Osteonectin Synthesis by Human Bone Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 151(2): 215-227. DOI: 10.1002/jcp.1041510202.
- Ferreira, M. T.; Cunha, E. 2012. Será credível estimar o PMI em restos cadavéricos em avançado estado de decomposição?. *Cadernos do GEEvH*, 2: 7-20.
- Ferreira, M. T.; Vicente, R.; Navega, D.; Gonçalves, D.; Curate, F.; Cunha, E. 2014. A New Forensic Collection Housed at the University of Coimbra, Portugal: the 21<sup>st</sup> Century Identified Skeletal Collection. *Forensic Science International*, 245: 202.e1-202.e5. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.09.021.
- Ferrer, N. 2012. Applications of Fourier transform infrared spectroscopy. In: Centres Científics i Tecnològics, Universitat de Barcelona (eds.). *Handbook of instrumental techniques for materials, chemical and biosciences research - Part II: Chemical technologies (ChT)*, Barcelona: 1-9.
- Figueiredo, M. M.; Gamelas, J. A. F.; Martins, A. G. 2012. Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy. In: Theophanides, T. (ed.). *Infrared spectroscopy – Life and Biomedical Sciences*. InTech: 315-338. ISBN: 978-953-51-0538-1.
- Francalacci P.; Tarli S. B. 1988 Multielementary Analysis of Trace Elements and Preliminary Results on Stable Isotopes in Two Italian Prehistoric Sites. Methodological Aspects. In: Grupe G.; Herrmann B. (eds.). *Trace Elements in Environmental History. Proceedings in Life Sciences*. Berlim, Heidelberg, Springer: 41-52. ISBN: 978-3-642-73297-3.
- Fratzl, P.; Gupta, H. S.; Paschalis, E. P.; Roschger, P. 2004. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14): 2115-2123. DOI: 10.1039/B402005G.
- Fratzl, P.; Roschger, P.; Fratzl-Zelman, N.; Paschalis, E. P.; Phipps, R.; Klaushofer, K. 2007. Evidence that Treatment with Risedronate in Women with Postmenopausal

- Osteoporosis Affects Bone Mineralization and Bone Volume. *Calcified Tissue International*, 81(2): 73-80. DOI: 10.1007/s00223-007-9039-8.
- Gadeleta, S. J.; Boskey, A. L.; Paschalis, E.; Carlson, C.; Menschik, F.; Baldini, T.; Peterson, M.; Rimnac, C. M. 2000. A Physical, Chemical, and Mechanical Study of Lumbar Vertebrae from Formal, Ovariectomized, and Nandrolone Decanoate-Treated Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*). *Bone*, 27(4): 541-550. DOI: 10.1016/S8756-3282(00)00362-8.
- Gamsjaeger, S.; Buchinger, B.; Zwettler, E.; Recker, R.; Black, D.; Gasser, J. A.; Eriksen, E. F.; Klaushofer, K.; Paschalis, E. P. 2011. Bone material properties in actively bone-forming trabeculae in postmenopausal women with osteoporosis after three years of treatment with once-yearly Zoledronic acid. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(1): 12-18. DOI: 10.1002/jbmr.180.
- Garnero, P.; Sornay-Rendu, E.; Chapuy, M. C.; Delmas, P. D. 1996. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(3): 337-349. DOI: 10.1002/jbmr.5650 110307.
- Genant, H. K.; Engelke, K.; Prevrhal, S. 2008. Advanced CT bone imaging in osteoporosis. *Rheumatology*, 47(Supplement 4): iv9-iv16. DOI: 10.1093/rheumatology/ken 180.
- Glimcher, M. J. 2006. Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64(1): 223-282. DOI: 10.2138/rmg.2006.64.8.
- Gomes, T. F. R. 2015. Análise de toners remanufaturados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Dissertação em Química Forense apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Coimbra.
- Gonçalves, D.; Vassalo, A. R.; Mamede, A. P.; Makhoul, C.; Piga, G.; Cunha, E.; Marques, M. P. M.; Batista de Carvalho, L. A. E. 2018. Crystal clear: Vibrational spectroscopy reveals intrabone, intraskeleton, and interskeleton variation in human bones. *American journal of physical anthropology*, 166(2): 296-312. DOI: 10.1002/ajpa.23430.
- Gourion-Arsiquaud, S.; Allen, M. R.; Burr, D. B.; Vashishth, D.; Tang, S. Y.; Boskey, A. L. 2010. Bisphosphonate treatment modifies canine bone mineral and matrix properties and their heterogeneity. *Bone*, 46(3): 666-672. DOI: 10.1016/j.bone.2009.11.011.
- Gourion-Arsiquaud, S.; Burket, J. C.; Havill, L. M.; DiCarlo, E.; Doty, S. B.; Mendelsohn, R.; van der Meulen, M. C. H.; Boskey, A. L. 2009. Spatial Variation in Osteonal Bone Properties Relative to Tissue and Animal Age. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(7): 1271-1281. DOI: 10.1359/jbmr.090201.
- Gourion-Arsiquaud, S.; Lukashova, L.; Power, J.; Loveridge, N.; Reeve, J.; Boskey, A. L. 2013. Fourier Transform Infrared Imaging of Femoral Neck Bone: Reduced

- Heterogeneity of Mineral-to-Matrix and Carbonate-to-Phosphate and More Variable Crystallinity in Treatment-Naive Fracture Cases Compared With Fracture-Free Controls. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(1): 150-161. DOI: 10.1002/jbmr.1724.
- Gourrier, A.; Chadeaux, C.; Lemaitre, E.; Bellot-Gurlet, L.; Reynolds, M.; Burghammer, M.; Plazanet, M.; Boivin, G.; Farlay, D.; Bunk, O.; Reiche, I. 2017. Nanoscale modifications in the early healing stages of bone are heterogeneous at the microstructural scale. *PLoS ONE*, 12(4): e0176179. DOI: 10.1371/journal.pone.0176179.
- Greenspan, S. L.; Myers, E. R.; Maitland, L. A.; Resnick, N. M.; Hayes, W. C. 1994. Fall Severity and Bone Mineral Density as Risk Factors for Hip Fracture in Ambulatory Elderly. *JAMA*, 271(2): 128-133.
- Griffiths, P. R. 2006 Introduction to Vibrational Spectroscopy. In: Chalmers, J. M.; Griffiths, P. R. (eds.). *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, Chichester, Reino Unido, John Wiley & Sons, Ltd.: 33-43. ISBN: 978-0-471-98847-2.
- Grunenwald, A.; Keyser, C.; Sautereau, A. M.; Crubézy, E.; Ludes, B.; Drouet, C. 2014. Revisiting carbonate quantification in apatite (bio) minerals: a validated FTIR methodology. *Journal of Archaeological Science*, 49: 134-141. DOI: 10.1016/j.jas.2014.05.004.
- Grupe, G. 1988. Impact of the choice of bone samples on trace element data in excavated human skeletons. *Journal of Archaeological Science*, 15(2): 123-129. DOI: 10.1016/0305-4403(88)90002-7.
- Grynopas, M. 1976. The crystallinity of bone mineral. *Journal of Materials Science*, 11(9): 1691-1696. DOI: 10.1007/BF00737525.
- Grynopas, M. 1993. Age and disease-related changes in the mineral of bone. *Calcified Tissue International*, 53(1): S57-S64. DOI: 10.1007/BF01673403.
- Grynopas, M. D.; Bonar, L. C.; Glimcher, M. J. 1984. Failure to Detect an Amorphous Calcium-Phosphate Solid Phase in Bone Mineral: A Radial Distribution Function Study. *Calcified Tissue International*, 36(1): 291-301. DOI: 10.1007/BF02405333.
- Grynopas, M. D.; Holmyard, D. 1988. Changes in Quality of Bone Mineral on Aging and in Disease. *Scanning Microscopy*, 2(2): 1045-1054.
- Grynopas, M. D.; Tupy, J. H.; Sodek, J. 1994. The Distribution of Soluble, Mineral-Bound, and Matrix-Bound Proteins in Osteoporotic and Normal Bones. *Bone*, 15(5): 505-513. DOI: 10.1016/8756-3282(94)90274-7.
- Guimarães, D.; Dias, A. A.; Carvalho, M.; Carvalho, M. L.; Santos, J. P.; Henriques, F. R.; Curate, F.; Pessanha, S. 2016. Quantitative determinations and imaging in different structures of buried human bones from the XVIII-XIXth centuries by energy

- dispersive X-ray fluorescence—Postmortem evaluation. *Talanta*, 155: 107-115. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.04.028.
- Handschin, R. G.; Stern, W. B. 1992. Crystallographic Lattice Refinement of Human Bone. *Calcified Tissue International*, 51(2): 111-120. DOI: 10.1007/BF00298498.
- Handschin, R. G.; Stern, W. B. 1995. X-Ray Diffraction Studies on the Lattice Perfection of Human Bone Apatite (Crista Iliaca). *Bone*, 16(4): S355-S363. DOI: 10.1016/S87 56-3282(95)80385-8.
- Hauke, J.; Kossowski, T. 2011. Comparison of Values of Pearson's and Spearman's Correlation Coefficients on the Same Sets of Data. *Quaestiones Geographicae*, 30(2): 87-93. DOI: 10.2478/v10117-011-0021-1.
- Hedges, R. E. 2002. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 44(3): 319-328. DOI: 10.1111/1475-4754.00064.
- Hedges, R. E.; Millard, A. R.; Pike, A. W. G. 1995. Measurements and Relationships of Diagenetic Alteration of Bone from Three Archaeological Sites. *Journal of Archaeological Science*, 22(2): 201-209. DOI: 10.1006/jasc.1995.0022.
- Hollund, H. I.; Ariese, F.; Fernandes, R.; Jans, M. M. E.; Kars, H. 2013. Testing an alternative high-throughput tool for investigating bone diagenesis: FTIR in attenuated total reflection (ATR) mode. *Archaeometry*, 55(3): 507-532. DOI: 10.1111/j.1475-4754.2012.00695.x.
- Hu, Y. Y.; Rawal, A.; Schmidt-Rohr, K. 2010. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(52): 22425-22429. DOI: 10.1073/pnas.1009219107.
- Huang, R. Y.; Miller, L. M.; Carlson, C. S.; Chance, M. R. 2003. In situ chemistry of osteoporosis revealed by synchrotron infrared microspectroscopy. *Bone*, 33(4): 514-521. DOI: 10.1016/S8756-3282(03)00233-3.
- Ibáñez, R. 2003. Bone mineral density measurement techniques. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(Supl. 3): 19-27.
- Isaksson, H.; Turunen, M. J.; Rieppo, L.; Saarakkala, S.; Tamminen, I. S.; Rieppo, J.; Kröger, H.; Jurvelin, J. S. 2010. Infrared spectroscopy indicates altered bone turnover and remodeling activity in renal osteodystrophy. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(6): 1360-1366. DOI: 10.1002/jbmr.10.
- Işcan, M. Y.; Steyn, M. (eds.). 2013. *The Human Skeleton in Forensic Medicine*. EUA, Charles C Thomas Publisher, LTD. ISBN: 9780398088781.
- Jans, M. M. E.; Nielsen-Marsh, C. M.; Smith, C. I.; Collins, M. J.; Kars, H. 2004. Characterisation of microbial attack on archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 31(1): 87-95. DOI: 10.1016/j.jas.2003.07.007.

- Jergas, M.; Genant, H. K. 1993. Current methods and recent advances in the diagnosis of osteoporosis. *Arthritis & Rheumatism*, 36(12): 1649-1662. DOI: 10.1002/art.1780361203.
- Johnsson, K. 1997. Chemical Dating of Bones Based on Diagenetic Changes in Bone Apatite. *Journal of Archaeological Science*, 24(5): 431-437. DOI: 10.1006/jasc.1996.0127.
- Jones, G.; Nguyen, T.; Sambrook, P.; Kelly, P. J.; Eisman, J. A. 1994. Progressive loss of bone in the femoral neck in elderly people: longitudinal findings from the Dubbo osteoporosis epidemiology study. *BMJ*, 309(6956): 691-695. DOI: 10.1136/bmj.309.6956.691
- Jurist, J. M.; Foltz, A. S. 1977. Human ulnar bending stiffness, mineral content, geometry and strength. *Journal of Biomechanics*, 10(8): 455-459. DOI: 10.1016/0021-9290(77)90099-9.
- Kahana, T. 2015. Anthropology. In: Byard, R.; Payne-James, J. (eds.). *Encyclopedia of Forensic Sciences and Legal Medicine*. Elsevier: 80-142. ISBN: 9780128000342.
- Kanis, J. A.; Glüer, C. C. 2000. An Update on the Diagnosis and Assessment of Osteoporosis with Densitometry. *Osteoporosis International*, 11(3): 192-202. DOI: 10.1007/s001980050281
- Khan, J. I.; Kennedy, T. J.; Christian Jr, D. R. 2012. *Basic Principles of Forensic Chemistry*. Springer Science & Business Media. ISBN: 978-1-59745-437-7.
- Khosla, S.; Melton III, L. J.; Atkinson, E. J.; O'fallon, W. M.; Klee, G. G.; Riggs, B. L. 1998. Relationship of Serum Sex Steroid Levels and Bone Turnover Markers with Bone Mineral Density in Men and Women: A Key Role for Bioavailable Estrogen. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(7): 2266-2274. DOI: 10.1210/jcem.83.7.4924.
- Khosla, S.; Melton III, L. J.; Riggs, B. L. 2002. Estrogen and the male skeleton. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(4): 1443-1450. DOI: 10.1210/jcem.87.4.8417.
- Kimura-Suda, H.; Ito, T. 2017. Bone quality characteristics obtained by Fourier transform infrared and Raman spectroscopic imaging. *Journal of Oral Biosciences*, 59(3): 142-145. DOI: 10.1016/j.job.2017.04.002.
- Kimura-Suda, H.; Kajiwara, M.; Sakamoto, N.; Kobayashi, S.; Ijio, K.; Yurimoto, H.; Yamato, H. 2013. Studies on bone metabolism by using isotope microscopy, FTIR imaging, and micro-Raman spectroscopy. *Journal of Oral Biosciences*, 55(2): 61-65. DOI: 10.1016/j.job.2013.04.006.
- King, C. L.; Tayles, N.; Gordon, K. C. 2011. Re-examining the chemical evaluation of diagenesis in human bone apatite. *Journal of Archaeological Science*, 38(9): 2222-2230. DOI: 10.1016/j.jas.2011.03.023.

- Kirchengast, S.; Peterson, B.; Hauser, G.; Knogler, W. 2001. Body composition characteristics are associated with the bone density of the proximal femur end in middle-and old-aged women and men. *Maturitas*, 39(2): 133-145. DOI: 10.1016/S0378-5122(01)00205-5.
- Klepinger, L. L. (ed.). 2006. *Fundamentals of Forensic Anthropology*. Nova Jérsea, John Wiley & Sons. ISBN: 9780471210061.
- Knott, L.; Bailey, A. J. 1998. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*, 22(3): 181-187. DOI: 10.1016/S8756-3282(97)00279-2.
- Knott, L.; Whitehead, C. C.; Fleming, R. H.; Bailey, A. J. 1995. Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone. *Biochemical Journal*, 310(3): 1045-1051. DOI: 10.1042/bj3101045.
- Koon, H. E.; O'connor, T. P.; Collins, M. J. 2010. Sorting the butchered from the boiled. *Journal of Archaeological Science*, 37(1): 62-69. DOI: 10.1016/j.jas.2009.08.015.
- Kuhn, L. T.; Grynepas, M. D.; Rey, C. C.; Wu, Y.; Ackerman, J. L.; Glimcher, M. J. 2008. A Comparison of the Physical and Chemical Differences Between Cancellous and Cortical Bovine Bone Mineral at Two Ages. *Calcified Tissue International*, 83(2): 146-154. DOI: 10.1007/s00223-008-9164-z.
- Landi, E.; Celotti, G.; Logroscino, G.; Tampieri, A. 2003. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. *Journal of the European Ceramic Society*, 23(15): 2931-2937. DOI: 10.1016/S0955-2219(03)00304-2.
- Larijani, B.; Hossein-Nezhad, A.; Mojtahedi, A.; Pajouhi, M.; Bastanhagh, M. H.; Soltani, A.; Mirfezi, S.; Dashti, R. 2005. Normative data of bone Mineral Density in healthy population of Tehran, Iran: A Cross sectional study. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 6(38): 1-6. DOI: 10.1186/1471-2474-6-38.
- Lebon, M.; Reiche, I.; Bahain, J. J.; Chadefaux, C.; Moigne, A. M.; Fröhlich, F.; Sémah, F. Schwarcz, H.P.; Falgueres, C. 2010. New parameters for the characterization of diagenetic alterations and heat-induced changes of fossil bone mineral using Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of Archaeological Science*, 37(9): 2265-2276. DOI: 10.1016/j.jas.2010.03.024.
- Lebon, M.; Zazzo, A.; Reiche, I. 2014. Screening in situ bone and teeth preservation by ATR-FTIR mapping. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 416: 110-119. DOI: 10.1016/j.palaeo.2014.08.001.
- Lee, C. A.; Einhorn, T. A. 2001. The Bone Organ System: Form and Function. In: Marcus, R.; Feldman, D.; Kelsey, J. (eds). *Osteoporosis I*. San Diego, Academic Press: 3-20. ISBN: 9780123705440.3-20.

- Lee-Thorp, J. 2002. Two decades of progress towards understanding fossilization processes and isotopic signals in calcified tissue minerals. *Archaeometry*, 44(3): 435-446. DOI: 10.1111/1475-4754.t01-1-00076.
- Lee-Thorp, J.; Sealy, J. 2008. Beyond documenting diagenesis: The fifth international bone diagenesis workshop. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 3(266): 129-133. DOI: 10.1016/j.palaeo.2008.03.025.
- Lee-Thorp, J.; Sponheimer, M. 2003. Three case studies used to reassess the reliability of fossil bone and enamel isotope signals for paleodietary studies. *Journal of Anthropological Archaeology*, 22(3): 208-216. DOI: 10.1016/S0278-4165(03)00035-7.
- Lee-Thorp, J. A.; van der Merwe, N. J. 1991. Aspects of the chemistry of modern and fossil biological apatites. *Journal of Archaeological Science*, 18(3): 343-354. DOI: 10.1016/0305-4403(91)90070-6.
- LeGeros, R. Z. 1981. Apatites in biological systems. *Progress in Crystal Growth and Characterization*, 4(1-2): 1-45. DOI: 10.1016/0146-3535(81)90046-0.
- LeGeros, R. Z. 1991. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*. Paris, Karger: 172-201. DOI: 10.1159/000419241.
- LeGeros, R. Z.; Trautz, O. R.; Klein, E.; LeGeros, J. P. 1969. Two types of carbonate substitution in the apatite structure. *Experientia*, 25(1): 5-7. DOI: 10.1007/BF01903856.
- LeGeros, R. Z.; Legeros, J. P. 1984. Phosphate Minerals in Human Tissues. In: Nriagu, J.O.; Moore, P.B. (eds). *Phosphate Minerals*. Springer, Berlin, Heidelberg: 351-385. DOI: 10.1007/978-3-642-61736-2\_12.
- Legros, R.; Balmain, N.; Bonel, G. 1987. Age-Related Changes in Mineral of Rat and Bovine Cortical Bone. *Calcified Tissue International*, 41(3): 137-144. DOI: 10.1007/BF02563793.
- Leichter, I.; Margulies, J. Y.; Weinreb, A.; Mizrahi, J.; Robin, G. C.; Makin, M. D.; Conforty, B. Makin, M. D.; Bloch, B. 1982. The Relationship Between Bone Density, Mineral Content, and Mechanical Strength in the Femoral Neck. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (163): 272-281.
- Lewiecki, E.; Watts, N.; McClung, M.; Petak, S.; Bachrach, L.; Shepherd, J.; Downs Jr., R. 2004. Special report on the official positions of the International Society for Clinical Densitometry. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89: 3651-3655. DOI: 10.1007/s00198-004-1677-3.
- Longato, S.; Wöss, C.; Hatzer-Grubwieser, P.; Bauer, C.; Parson, W.; Unterberger, S. H.; Kuhn, V.; Pemberger, N.; Pallua, A. K.; Recheis, W.; Lackner, R.; Stalder, R.; Pallua, J. D. 2015. Post-mortem interval estimation of human skeletal remains by micro-

- computed tomography, mid-infrared microscopic imaging and energy dispersive X-ray mapping. *Analytical Methods*, 7(7): 2917-2927. DOI: 10.1039/c4ay02943g.
- MacFadden, B. J.; Labs-Hochstein, J.; Quitmyer, I.; Jones, D. S. 2004. Incremental growth and diagenesis of skeletal parts of the lamnoid shark *Otodus obliquus* from the early Eocene (Ypresian) of Morocco. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 206(3-4): 179-192. DOI: 10.1016/j.palaeo.2004.01.002.
- Madupalli, H.; Pavan, B.; Tecklenburg, M. M. 2017. Carbonate substitution in the mineral component of bone: Discriminating the structural changes, simultaneously imposed by carbonate in A and B sites of apatite. *Journal of Solid State Chemistry*, 255: 27-35. DOI: 10.1016/j.jssc.2017.07.025.
- Mamede, A. P.; Gonçalves, D.; Marques, M. P. M.; Batista de Carvalho, L. A. 2018. Burned bones tell their own stories: A review of methodological approaches to assess heat-induced diagenesis. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(8): 603-635. DOI: 10.1080/05704928.2017.1400442.
- Marques, A.; Rodrigues, A. M.; Romeu, J. C.; Ruano, A.; Barbosa, A. P.; Simões, E., Águas, F.; Canhão, H.; Alves, J. D.; Lucas, R.; Branco, J. C.; Laíns, J.; Mascarenhas, M.; Simões, S.; Tavares, V.; Lourenço, O.; da Silva, J. A. 2016. Multidisciplinary Portuguese recommendations on DXA request and indication to treat in the prevention of fragility fractures. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 41(4): 305-321.
- Marques, M. P. M.; Gonçalves, D.; Amarante, A. I. C.; Makhoul, C. I.; Parker, S. F.; Batista de Carvalho, L. A. E. 2016. Osteometrics in burned human skeletal remains by neutron and optical vibrational spectroscopy. *RSC Advances*, 6(73): 68638-68641. DOI: 10.1039/c6ra13564a.
- Marques, M. P. M.; Mamede, A. P.; Vassalo, A. R.; Makhoul, C.; Cunha, E.; Gonçalves, D.; Parker, S. F.; Batista de Carvalho, L. A. E. 2018. Heat-induced Bone Diagenesis Probed by Vibrational Spectroscopy. *Scientific reports*, 8(1). DOI: 10.1038/s41598-018-34376-w.
- Martin, R. B.; Ishida, J. 1989. The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bone strength. *Journal of Biomechanics*, 22(5): 419-426. DOI: 10.1016/0021-9290(89)90202-9.
- Maspero, F.; Sala, S.; Fedi, M. E.; Martini, M.; Papagni, A. 2011. A new procedure for extraction of collagen from modern and archaeological bones for <sup>14</sup>C dating. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(6): 2019-2023. DOI: 10.1007/s00216-011-5252-4.
- Matsushima, N.; Hikichi, K. 1989. Age changes in the crystallinity of bone mineral and in the disorder of its crystal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 992(2): 155-159. DOI: 10.1016/0304-4165(89)90004-4.
- McKay, H. A.; Bailey, D. A.; Mirwald, R. L.; Davison, K. S.; Faulkner, R. A. 1998. Peak bone mineral accrual and age at menarche in adolescent girls: a 6-year longitudinal



- study. *The Journal of Pediatrics*, 133(5): 682-687. DOI: 10.1016/S0022-3476(98)70112-X.
- Michel, V.; Ildefonse, P.; Morin, G. 1995. Chemical and structural changes in *Cervus elaphus* tooth enamels during fossilization (Lazaret cave): a combined IR and XRD Rietveld analysis. *Applied Geochemistry*, 10(2): 145-149. DOI: 10.1016/0883-2927(95)00001-Z.
- Miller, L. M.; Vairavamurthy, V.; Chance, M. R.; Mendelsohn, R.; Paschalis, E. P.; Betts, F.; Boskey, A. L. 2001. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the  $\nu_4$   $\text{PO}_4^{3-}$  vibration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1527(1-2): 11-19. DOI: 10.1016/S0304-4165(01)00093-9.
- Miller, P. D.; McClung, M. 1996. Prediction of Fracture Risk I: Bone Density. *The American Journal of the Medical Sciences*, 312(6): 257-259. DOI: 10.1016/S0002-9629(15)41840-3.
- Morrien, G. F. 2018. A review of infrared spectroscopy in microarchaeology: Methods, applications, and recent trends. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 18: 806-823. DOI: 10.1016/j.jasrep.2017.12.029.
- Morris, M. D.; Finney, W. F. 2004. Recent developments in Raman and infrared spectroscopy and imaging of bone tissue. *Spectroscopy*, 18(2): 155-159. DOI: 10.1155/2004/765753.
- Munro, L. E.; Longstaffe, F. J.; White, C. D. 2007. Burning and boiling of modern deer bone: Effects on crystallinity and oxygen isotope composition of bioapatite phosphate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 249(1-2): 90-102. DOI: 10.1016/j.palaeo.2007.01.011.
- Mundorff, A.Z.; Shaler, R., Bieschke, E.; Mar-Cash, E. 2008. Marrying anthropology and DNA: Essential for solving complex commingling problems in cases of extreme fragmentation. In: Adams, B.J.; Byrd, J.E. (eds.). *Recovery, Analysis, and Identification of Commingled Human Remains*. Totowa, Humana Press: 285–299. ISBN: 978-1-59745-316-5.
- Mundorff, A.Z.; Shaler, R., Bieschke, E.; Mar-Cash, E. 2014. Marrying anthropology and DNA: Essential for solving complex commingling problems in cases of extreme fragmentation. In: Adams, B.; Byrd, J. (eds.). *Commingled Human Remains*. London, Academic Press: 257-274. ISBN: 9780124059184.
- Nakano, T.; Umakoshi, Y.; Tokumura, A. 2002. Variation in Crystallinity of Hydroxyapatite and the Related Calcium Phosphates by Mechanical Grinding and Subsequent Heat Treatment. *Metallurgical and materials transactions A*, 33(3): 521-528. DOI: 10.1007/s11661-002-0114-5.
- Nagy, G.; Lorand, T.; Patonai, Z.; Montsko, G.; Bajnoczky, I.; Marcsik, A.; Mark, L. 2008. Analysis of pathological and non-pathological human skeletal remains by FT-IR

- spectroscopy. *Forensic Science International*, 175(1): 55-60. DOI: 10.1016/j.forsciint.2007.05.008.
- Nicholson, R. A. 1996. Bone Degradation, Burial Medium and Species Representation: Debunking the Myths, an Experiment-based Approach. *Journal of Archaeological Science*, 23(4): 513-533. DOI: 10.1006/jasc.1996.0049
- Nielsen-Marsh, C. M.; Hedges, R. E. M. 1999. Bone porosity and the use of mercury intrusion porosimetry in bone diagenesis studies. *Archaeometry*, 41(1): 165-174. DOI: 10.1111/j.1475-4754.1999.tb00858.x.
- Nielsen-Marsh, C. M.; Hedges, R. E. 2000a. Patterns of Diagenesis in Bone I: The Effects of Site Environments. *Journal of Archaeological Science*, 27(12): 1139-1150. DOI: 10.1006/jasc.1999.0537.
- Nielsen-Marsh, C. M.; Hedges, R. E. 2000b. Patterns of Diagenesis in Bone II: Effects of Acetic Acid Treatment and the Removal of Diagenetic  $\text{CO}_3^{2-}$ . *Journal of Archaeological Science*, 27(12): 1151-1159. DOI: 10.1006/jasc.1999.0538.
- NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. 2001. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *The Journal of the American Medical Association*, 285(6):785-795. DOI: 10.1001/jama.285.6.785.
- Nikel, O.; Laurencin, D.; Bonhomme, C.; Sroga, G. E.; Besdo, S.; Lorenz, A.; Vashishth, D. 2012. Solid State NMR Investigation of Intact Human Bone Quality: Balancing Issues and Insight into the Structure at the Organic–Mineral Interface. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(10): 6320-6331. DOI: 10.1021/jp2125312.
- O'Brien, M. 2001. Exercise and osteoporosis. *Irish Journal of Medical Science*, 170(1): 58-62. DOI: 10.1007/BF03167724.
- Olsen, J.; Heinemeier, J.; Bennike, P.; Krause, C.; Hornstrup, K. M.; Thorne, H. 2008. Characterisation and blind testing of radiocarbon dating of cremated bone. *Journal of Archaeological Science*, 35(3): 791-800. DOI: 10.1016/j.jas.2007.06.011.
- Ou-Yang, H.; Paschalis, E. P.; Boskey, A. L.; Mendelsohn, R. 2002. Chemical Structure-Based Three-Dimensional Reconstruction of Human Cortical Bone from Two-Dimensional Infrared Images. *Applied Spectroscopy*, 56(4): 419-422. DOI: 10.1366/0003702021955033.
- Oxlund, H.; Sekilde, L.; Ørtoft, G. 1996. Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone*, 19(5): 479-484. DOI: 10.1016/S8756-3282(96)00283-9.
- Özbaş, H.; Onrat, S. T.; Özdamar, K. 2012. Genetic and environmental factors in human osteoporosis. *Molecular Biology Reports*, 39(12): 11289-11296. DOI: 10.1007/s11033-012-2038-5.
- Paschalis, E. P. 2009. Fourier transform infrared analysis and bone. *Osteoporosis International*, 20(6): 1043-1047. DOI: 10.1007/s00198-009-0857-6.

- Paschalis, E. P.; Betts, F.; DiCarlo, E.; Mendelsohn, R.; Boskey, A. L. 1997a. FTIR Microspectroscopic Analysis of Normal Human Cortical and Trabecular Bone. *Calcified Tissue International*, 61(6): 480-486. DOI: 10.1007/s002239900.
- Paschalis, E. P.; Betts, F.; DiCarlo, E.; Mendelsohn, R.; Boskey, A. L. 1997b. FTIR microspectroscopic analysis of human iliac crest biopsies from untreated osteoporotic bone. *Calcified tissue international*, 61(6), 487-492. DOI: 10.1007/s002239900372.
- Paschalis, E. P.; Boskey, A. L.; Kassem, M.; Eriksen, E. F. 2003. Effect of Hormone Replacement Therapy on Bone Quality in Early Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(6): 955-959. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.6. 955.
- Paschalis, E. P.; DiCarlo, E.; Betts, F.; Sherman, P.; Mendelsohn, R.; Boskey, A. L. 1996. FTIR Microspectroscopic Analysis of Human Osteonal Bone. *Calcified Tissue International*, 59(6): 480-487. DOI: 10.1007/BF00369214.
- Paschalis, E. P.; Fratzl, P.; Gamsjaeger, S.; Hassler, N.; Brozek, W.; Eriksen, E. F.; Rauch, F.; Glorieux, F. H.; Shane, E.; Dempster, D.; Cohen, A.; Recker, R.; Klaushofer, K. 2016. Aging Versus Postmenopausal Osteoporosis: Bone Composition and Maturation Kinetics at Actively-Forming Trabecular Surfaces of Female Subjects Aged 1 to 84 Years. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31(2), 347-357. DOI: 10.1002/jbmr.2696.
- Paschalis, E. P.; Mendelsohn, R.; Boskey, A. L. 2011. Infrared Assessment of Bone quality: A Review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(8): 2170-2178. DOI: 10.1007/s11999-010-1751-4.
- Paschalis, E. P.; Shane, E.; Lyritis, G.; Skarantavos, G.; Mendelsohn, R.; Boskey, A. L. 2004. Bone Fragility and Collagen Cross-Links. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(12): 2000-2004. DOI: 10.1359/JBMR.040820.7
- Paschalis, E. P.; Verdelis, K.; Doty, S. B.; Boskey, A. L.; Mendelsohn, R.; Yamauchi, M. I. Y. M. 2001. Spectroscopic Characterization of Collagen Cross-Links in Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(10): 1821-1828. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.10.1821.
- Patonai, Z.; Maasz, G.; Avar, P.; Schmidt, J.; Lorand, T.; Bajnoczky, I.; Mark, L. 2013. Novel dating method to distinguish between forensic and archeological human skeletal remains by bone mineralization indexes. *International Journal of Legal Medicine*, 127(2): 529-533. DOI: 10.1007/s00414-012-0785-4.
- Pellegrino, E. D.; Biltz, R. M. 1972. Mineralization in the Chick Embryo. *Calcified Tissue Research*, 10(1): 128-135. DOI: 10.1007/BF02012542.
- Penel, G.; Leroy, G.; Rey, C.; Bres, E. 1998. MicroRaman Spectral Study of the PO<sub>4</sub> and CO<sub>3</sub> Vibrational Modes in Synthetic and Biological Apatites. *Calcified Tissue International*, 63(6): 475-481. DOI: 10.1007/s002239900561.

- Perini, T. A.; Oliveira, G. L.; Ornellas, J.S.; Oliveira, F.P. 2005. Cálculo do erro técnico de medição em antropometria. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 11 (1): 86-90. DOI: 10.1590/S1517-86922005000100009.
- Perrone, A.; Finlayson, J. E.; Bartelink, E. J.; Dalton, K. D. 2014. Application of Portable X-ray Fluorescence (XRF) for Sorting Commingled Human Remains. In: Adams, B.; Byrd, J. (eds.). *Commingled Human Remains*. London, Academic Press: 145-165. ISBN: 9780124059184.
- Person, A.; Bocherens, H.; Mariotti, A.; Renard, M. 1996. Diagenetic evolution and experimental heating of bone phosphate. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 126(1-2): 135-149. DOI: 10.1016/S0031-0182(97)88906-7.
- Person, A.; Bocherens, H.; Saliège, J. F.; Paris, F.; Zeitoun, V.; Gérard, M. 1995. Early Diagenetic Evolution of Bone Phosphate: An X-ray Diffractometry Analysis. *Journal of Archaeological Science*, 22(2): 211-221. DOI: 10.1006/jasc.1995.0023.
- Pestle, W. J.; Ahmad, F.; Vesper, B. J.; Cordell, G. A.; Colvard, M. D. 2014. Ancient bone collagen assessment by hand-held vibrational spectroscopy. *Journal of Archaeological Science*, 42: 381-389. DOI: 10.1016/j.jas.2013.11.014.
- Petra, M.; Anastassopoulou, J.; Theologis, T.; Theophanides, T. 2005. Synchrotron micro-FT-IR spectroscopic evaluation of normal paediatric human bone. *Journal of Molecular Structure*, 733(1-3): 101-110. DOI: 10.1016/j.molstruc.2004.07.041.
- Pickering, R.; Bachman, D. (eds.). 2009. *The use of forensic anthropology*. Boca Raton, Flórida, CRC Press.
- Piga, G.; Baró, M. D.; Escobal, I. G.; Gonçalves, D.; Makhoul, C.; Amarante, A.; Malgosa, A.; Enzo, S.; Garroni, S. 2016. A structural approach in the study of bones: fossil and burnt bones at nanosize scale. *Applied Physics A*, 122(12): 1031. DOI: 10.1007/s00339-016-0562-1.
- Piga, G.; Malgosa, A.; Thompson, T. J. U.; Enzo, S. 2008. A new calibration of the XRD technique for the study of archaeological burned human remains. *Journal of Archaeological Science*, 35(8): 2171-2178. DOI: 10.1016/j.jas.2008.02.003.
- Pleshko, N.; Boskey, A.; Mendelsohn, R. 1991. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite minerals. *Biophysical Journal*, 60(4): 786-793. DOI: 10.1016/S0006-3495(91)82113-0.
- Pols, H. A.; Felsenberg, D.; Hanley, D. A.; Štěpán, J.; Munoz-Torres, M.; Wilkin, T. J.; Qinsheng, G.; Galich, A. M.; Vandormael, K.; Yates, A. J.; Stych, B. 1999. Multinational, Placebo-Controlled, Randomized Trial of the Effects of Alendronate on Bone Density and Fracture Risk in Postmenopausal Women with Low Bone Mass: Results of the FOSIT Study. *Osteoporosis International*, 9(5): 461-468. DOI: 10.1007/PL00004171.

- Povoroznyuk, V. V.; Dzerovich, N. I.; Karasevskaya, T. A. 2007. Bone Mineral Density in Ukrainian Women of Different Age. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1119(1): 243-252. DOI: 10.1196/annals.1404.019.
- Pretty, I. A.; Sweet, D. 2001. A look at forensic dentistry – Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *British Dental Journal*, 190(7): 359-366. DOI: 10.1038/sj.bdj.4800972a.
- Pucéat, E.; Reynard, B.; Lécuyer, C. 2004. Can crystallinity be used to determine the degree of chemical alteration of biogenic apatites?. *Chemical Geology*, 205(1-2): 83-97. DOI: 10.1016/j.chemgeo.2003.12.014.
- Raghavan, M.; Sahar, N. D.; Kohn, D. H.; Morris, M. D. 2012. Age-specific profiles of tissue-level composition and mechanical properties in murine cortical bone. *Bone*, 50(4): 942-953. DOI: 10.1016/j.bone.2011.12.026.
- Raj, D. V.; Behari, J. 1986. Biophysical characterization of osteoporotic bone. *Environmental Research*, 40(1): 68-83. DOI: 10.1016/S0013-9351(86)80082-2.
- Reiche, I.; Favre-Quattropani, L.; Vignaud, C.; Bocherens, H.; Charlet, L.; Menu, M. 2003. A multi-analytical study of bone diagenesis: the Neolithic site of Bercy (Paris, France). *Measurement Science and Technology*, 14(9): 1608. DOI: 10.1088/0957-0233/14/9/312.
- Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Glimcher, M. J. 2009. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis International*, 20(6): 1013-1021. DOI: 10.1007/s00198-009-0860-y.
- Rey, C.; Collins, B.; Goehl, T.; Dickson, I. R.; Glimcher, M. J. 1989. The Carbonate Environment in Bone Mineral: A Resolution-Enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study. *Calcified Tissue International*, 45(3): 157-164. DOI: 10.1007/BF02556059.
- Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Sfihi, H.; Barroug, A. 2007. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2): 198-205. DOI: 10.1016/j.msec.2006.05.015.
- Rey, C.; Kim, H. M.; Glimcher, M. J. 1994. Maturation of Poorly Crystalline Synthetic and Biological Apatites. In: Brown, P. W.; Constantz, B. (eds.). *Hydroxyapatite and Related Materials*. CRC Press: 181-187. ISBN: 0-8493-4750-5.
- Rey, C.; Renugopalakrishnan, V.; Collins, B.; Glimcher, M. J. 1991. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study of the Carbonate Ions in Bone Mineral During Aging. *Calcified Tissue International*, 49(4): 251-258. DOI: 10.1007/BF02556214.
- Rey, C.; Shimizu, M.; Collins, B.; Glimcher, M. J. 1990. Resolution-Enhanced Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study of the Environment of Phosphate Ions in the Early Deposits of a Solid Phase of Calcium-Phosphate in Bone and Enamel, and

- their Evolution with Age. I: Investigations in the  $\nu_4$  PO<sub>4</sub> domain. *Calcified Tissue International*, 46(6): 384-394. DOI: 10.1007/BF02554969.
- Reznikov, N.; Chase, H.; Brumfeld, V.; Shahar, R.; Weiner, S. 2015. The 3D structure of the collagen fibril network in human trabecular bone: Relation to trabecular organization. *Bone*, 71: 189-195. DOI: 10.1016/j.bone.2014.10.017.
- Riggs, B. L.; Melton III, L. J.; Robb, R. A.; Camp, J. J.; Atkinson, E. J.; Peterson, J. M.; Rouleau, P. A.; McCollough, C. H.; Bouxsein, M. L.; Khosla, S. 2004. Population-Based Study of Age and Sex Differences in Bone Volumetric Density, Size, Geometry, and Structure at Different Skeletal Sites. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(12): 1945-1954. DOI: 10.1359/JBMR.040916.
- Rizer, M. K. 2006. Osteoporosis. *Primary Care Clinics in Office Practice*, 33: 943–951. DOI: 10.1016/j.pop.2006.09.004.
- Roach, H. I. 1994. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell Biology International*, 18(6): 617-628. DOI: 10.1006/cbir.1994.1088.
- Rodrigues, A. M.; Canhão, H.; Marques, A.; Ambrósio, C.; Borges, J.; Coelho, P.; Costa, L.; Fernandes, S.; Gonçalves, I.; Gonçalves, M. J.; Guerra, M.; Marques, M. L.; Pimenta, S.; Pinto, P.; Sequeira, G.; Simões, E.; Teixeira, L.; Vaz, C.; Vieira-Sousa, E.; Vieira, R.; Alvarenga, F.; Araújo, F.; Barcelos, A.; Barcelos, F.; Barros, R.; Bernardes, M.; Canas da Silva, J.; Cordeiro, A.; Costa, M.; Cunha-Miranda, L.; Cruz, M.; Duarte, A. C.; Duarte, C.; Faustino, A.; Figueiredo, G.; Fonseca, J. E.; Furtado, C.; Gomes, J.; Lopes, C.; Mourão, A. F.; Oliveira, M.; Pimentel-Santos, F. M.; Ribeiro, A.; Sampaio da Nóvoa, T.; Santiago, M.; Silva, C.; Silva-Dinis; Sousa, S.; Tavares-Costa, J.; Terroso, G.; Vilar, A.; Branco, J. C.; Tavares, V.; Romeu, J. C.; da Silva, J. A. P. 2018. Portuguese recommendations for the prevention, diagnosis and management of primary osteoporosis – 2018 update. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 43(1): 123-144.
- Rogers, H. J.; Weidmann, S. M.; Parkinson, A. 1952. Studies on the skeletal tissues. 2. The collagen content of bones from rabbits, oxen and humans. *Biochemical Journal*, 50(4): 537-542. DOI: 10.1042/bj0500537.
- Roschger, P.; Rinnerthaler, S.; Yates, J.; Rodan, G. A.; Fratzl, P.; Klaushofer, K. 2001. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. *Bone*, 29(2): 185-191. DOI: 10.1016/S8756-3282(01)00485-9.
- Roy, D.; Swarbrick, C.; King, Y.; Pye, S.; Adams, J.; Berry, J.; Silman, A.; O'Neill, T. 2005. Differences in peak bone mass in women of European and South Asian origin can be explained by differences in body size. *Osteoporosis International*, 16(10): 1254-1262. DOI: 10.1007/s00198-005-1837-0.

- Ruff, C. B.; Hayes, W. C. 1988. Sex differences in age-related remodeling of the femur and tibia. *Journal of Orthopaedic Research*, 6(6): 886-896. DOI: 10.1002/jor.1100060613.
- Ruppel, M. E.; Burr, D. B.; Miller, L. M. 2006. Chemical makeup of microdamaged bone differs from undamaged bone. *Bone*, 39(2): 318-324. DOI: 10.1016/j.bone.2006.02.052.
- Schmitt, J.; Flemming, H. C. 1998. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(1): 1-11. DOI: 10.1016/S0964-8305(98)80002-4.
- Schwarz, C.; Debruyne, R.; Kuch, M.; McNally, E.; Schwarcz, H.; Aubrey, A. D.; Bada, J.; Poinar, H. 2009. New insights from old bones: DNA preservation and degradation in permafrost preserved mammoth remains. *Nucleic Acids Research*, 37(10): 3215-3229. DOI: 10.1093/nar/gkp159.
- Shemesh, A. 1990. Crystallinity and diagenesis of sedimentary apatites. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54(9): 2433-2438. DOI: 10.1016/0016-7037(90)90230-I.
- Shin, C. S.; Choi, H. J.; Kim, M. J.; Kim, J. T.; Yu, S. H.; Koo, B. K.; Cho, H. I.; Cho, S. W.; Kim, S. W.; Park, Y. J.; Jang, H. C.; Kim, S. Y.; Cho, N. M. 2010. Prevalence and risk factors of osteoporosis in Korea: A community-based cohort study with lumbar spine and hip bone mineral density. *Bone*, 47(2): 378-387. DOI: 10.1016/j.bone.2010.03.017.
- Sillen, A. 1989. Diagenesis of the inorganic phase of cortical bone. In: Douglas, P. T. (ed.) *The Chemistry of Prehistoric Human Bone*. Cambridge: Cambridge University Press: 211-229. ISBN: 0521362164.
- Sillen, A.; Morris, A. 1996. Diagenesis of bone from Border Cave: implications for the age of the Border Cave hominids. *Journal of Human Evolution*, 31(6): 499-506. DOI: 10.1006/jhev.1996.0075.
- Sillen, A.; Parkington, J. 1996. Diagenesis of Bones from Eland's Bay Cave. *Journal of Archaeological Science*, 23(4): 535-542. DOI: 10.1006/jasc.1996.0050.
- Sinaki, M. 2007. The Role of Physical Activity in Bone Health: A New Hypothesis to Reduce Risk of Vertebral Fracture. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 18(3): 593-608. DOI: 10.1016/j.pmr.2007.04.002.
- Smith, C. I.; Nielsen-Marsh, C. M.; Jans, M. M. E.; Collins, M. J. 2007. Bone diagenesis in the European Holocene I: Patterns and mechanisms. *Journal of Archaeological Science*, 34(9): 1485-1493. DOI: 10.1016/j.jas.2006.11.006.
- Snoeck, C.; Lee-Thorp, J. A.; Schulting, R. J. 2014. From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 416: 55-68. DOI: 10.1016/j.palaeo.2014.08.002.

- Spinek, A. E.; Lorkiewicz, W.; Mietlińska, J.; Sewerynek, E.; Kłys, A.; Caramelli, D.; Żądzińska, E. 2016. Evaluation of chronological changes in bone fractures and age-related bone loss: A test case from Poland. *Journal of Archaeological Science*, 72: 117-127. DOI: 10.1016/j.jas.2016.06.007.
- Sponheimer, M.; Lee-Thorp, J. A. 1999. Alteration of Enamel Carbonate Environments during Fossilization. *Journal of Archaeological Science*, 26(2): 143-150. DOI: 10.1006/jasc.1998.0293
- Stathopoulou, E. T.; Psycharis, V.; Chryssikos, G. D.; Gionis, V.; Theodorou, G. 2008. Bone diagenesis: new data from infrared spectroscopy and X-ray diffraction. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266(3-4): 168-174. DOI: 10.1016/j.palaeo.2008.03.022.
- Stiner, M. C.; Kuhn, S. L.; Surovell, T. A.; Goldberg, P.; Meignen, L.; Weiner, S.; Bar-Yosef, O. 2001. Bone Preservation in Hayonim Cave (Israel): a Macroscopic and Mineralogical Study. *Journal of Archaeological Science*, 28(6): 643-659. DOI: 10.1006/jasc.2000.0634.
- Stiner, M. C.; Kuhn, S. L.; Weiner, S.; Bar-Yosef, O. 1995. Differential Burning, Recrystallization, and Fragmentation of Archaeological Bone. *Journal of Archaeological Science*, 22(2): 223-237. DOI: 10.1006/jasc.1995.0024.
- Stuart, B. 2005. Infrared spectroscopy. In: Seidel, A. (ed.). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, Hoboken, NJ, EUA, John Wiley & Sons, Inc.: 1–20. ISBN: 978-0-471-48494-3.
- Stuart, B. H.; Ando, D. J. 1997. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. Chichester, Reino Unido, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-471-97414-7.
- Surovell, T. A.; Stiner, M. C. 2001. Standardizing Infra-red Measures of Bone Mineral Crystallinity: an Experimental Approach. *Journal of Archaeological Science*, 28(6): 633-642. DOI: 10.1006/jasc.2000.0633.
- Szulc, P.; Seeman, E. 2009. Thinking inside and outside the envelopes of bone. *Osteoporosis International*, 20(8): 1281-1288. DOI: 10.1007/s00198-009-0994-y.
- Tacker, R. C. 2008. Carbonate in igneous and metamorphic fluorapatite: Two type A and two type B substitutions. *American Mineralogist*, 93(1): 168-176. DOI: 10.2138/am.2008.2551.
- Taicher, G. Z.; Tinsley, F. C.; Reiderman, A. Heiman, M. L. 2003. Quantitative magnetic resonance (QMR) method for bone and whole-body-composition analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(6): 990-1002. DOI: 10.1007/s00216-003-2224-3.
- Tarnowski, C. P.; Ignelzi Jr, M. A.; Morris, M. D. 2002. Mineralization of Developing Mouse Calvaria as Revealed by Raman Microspectroscopy. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(6): 1118-1126. DOI: 10.1359/jbmr.2002.17.6.1118.



- Taylor, M. G.; Parker, S. F.; Simkiss, K.; Mitchell, P. C. 2001. Bone mineral: evidence for hydroxy groups by inelastic neutron scattering. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3(8): 1514-1517. DOI: 10.1039/b005666i.
- Tenenhouse, A.; Joseph, L.; Kreiger, N.; Poliquin, S.; Murray, T. M.; Blondeau, L.; Berger, C.; Hanley, D.A.; Prior, J. C.; CaMos Research Group. 2000. Estimation of the Prevalence of Low Bone Density in Canadian Women and Men Using a Population-Specific DXA Reference Standard: The Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CaMos). *Osteoporosis International*, 11(10): 897-904. DOI: 10.1007/s001980070050.
- Termine, J. D.; Eanes, E. D.; Greenfield, D. J.; Nysten, M. U.; Harper, R. A. 1973. Hydrazine-deproteinated bone mineral. *Calcified Tissue Research*, 12: 73-90. DOI: 10.1007/BF02013723.
- Thomas, D. B.; Fordyce, R. E.; Frew, R. D.; Gordon, K. C. 2007. A rapid, non-destructive method of detecting diagenetic alteration in fossil bone using Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(12): 1533-1537. DOI: 10.1002/jrs.1851.
- Thompson, D. D.; Posner, A. S.; Laughlin, W. S.; Blumenthal, N. C. 1983. Comparison of Bone Apatite in Osteoporotic and Normal Eskimos. *Calcified Tissue International*, 35(1): 392-393. DOI: 10.1007/BF02405064.
- Thompson, T. J. U. 2015. The Analysis of Heat-Induced Crystallinity Change in Bone. In: Schmidt, C. W.; Symes, S. A. (eds.). *The Analysis of Burned Human Remains*. San Diego, California, Academic Press: 323-337. ISBN: 9780128004517.
- Thompson, T. J. U.; Gauthier, M.; Islam, M. 2009. The application of a new method of Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of burned bone. *Journal of Archaeological Science*, 36(3): 910-914. DOI: 10.1016/j.jas.2008.11.013.
- Thompson, T. J. U.; Islam, M.; Bonniere, M. 2013. A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra. *Journal of Archaeological Science*, 40(1): 416-422. DOI: 10.1016/j.jas.2012.07.008.
- Thompson, T. J. U.; Islam, M.; Piduru, K.; Marcel, A. 2011. An investigation into the internal and external variables acting on crystallinity index using Fourier Transform Infrared Spectroscopy on unaltered and burned bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 299(1-2): 168-174. DOI: 10.1016/j.palaeo.2010.10.044.
- Trueman, C. N.; Behrensmeyer, A. K.; Tuross, N.; Weiner, S. 2004. Mineralogical and compositional changes in bones exposed on soil surfaces in Amboseli National Park, Kenya: diagenetic mechanisms and the role of sediment pore fluids. *Journal of Archaeological Science*, 31(6): 721-739. DOI: 10.1016/j.jas.2003.11.003.
- Trueman, C. N.; Privat, K.; Field, J. 2008. Why do crystallinity values fail to predict the extent of diagenetic alteration of bone mineral?. *Palaeogeography,*

- Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 266(3-4): 160-167. DOI: 10.1016/j.palaeo.2008.03.038.
- Tsai, K. S.; Cheng, W. C.; Sanchez, T. V.; Chen, C. K.; Chieng, P. U.; Yang, R. S. 1997. Bone densitometry of proximal femur in Chinese subjects: Gender differences in bone mass and bone areas. *Bone*, 20(4): 365-369. DOI: 10.1016/S8756-3282(97)00094-X.
- Tuross, N.; Behrensmeyer, A. K.; Eanes, E. D.; Fisher, L. W.; Hare, P. E. 1989. Molecular preservation and crystallographic alterations in a weathering sequence of wildebeest bones. *Applied Geochemistry*, 4(3): 261-270. DOI: 10.1016/0883-2927(89)90027-9.
- Turunen, M. J.; Saarakkala, S.; Rieppo, L.; Helminen, H. J.; Jurvelin, J. S.; Isaksson, H. 2011. Comparison Between Infrared and Raman Spectroscopic Analysis of Maturing Rabbit Cortical Bone. *Applied Spectroscopy*, 65(6): 595-603. DOI: 10.1366/10-06193.
- Tütken, T.; Vennemann, T. W. 2011. Fossil bones and teeth: preservation or alteration of biogenic compositions? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 1(310): 1-8. DOI: 10.1016/j.palaeo.2011.06.020.
- Ulijaszek, S.J.; Kerr, D.A. 1999. Anthropometric measurement error and the assessment of nutritional status. *British Journal of Nutrition*, 82:165-177. DOI: 10.1017/S0007114599001348.
- Vassalo, A. R.; Cunha, E.; de Carvalho, L. A. B.; Gonçalves, D. 2016. Rather yield than break: assessing the influence of human bone collagen content on heat-induced warping through vibrational spectroscopy. *International Journal of Legal Medicine*, 130(6): 1647-1656. DOI: 10.1007/s00414-016-1400-x.
- Vejlens, L. 1971. Glycosaminoglycans of human bone tissue. *Calcified Tissue Research*, 7(1): 175-190. DOI: 10.1007/BF02062605
- Very, J. M.; Gibert, R.; Guilhot, B.; Debout, M.; Alexandre, C. 1997. Effect of Aging on the Amide Group of Bone Matrix, Measured by FTIR Spectrophotometry, in Adult Subjects Deceased as a Result of Violent Death. *Calcified Tissue International*, 60(3): 271-275. DOI: 10.1007/s002239900228.
- Wang, Q.; Li, W.; Liu, R.; Zhang, K.; Zhang, H.; Fan, S.; Wang, Z. 2019. Human and non-human bone identification using FTIR spectroscopy. *International Journal of Legal Medicine*, 133(1): 269-276. DOI: 10.1007/s00414-018-1822-8.
- Wang, Q.; Zhang, Y.; Lin, H.; Zha, S.; Fang, R.; Wei, X.; Fan, S.; Wang, Z. 2017. Estimation of the late postmortem interval using FTIR spectroscopy and chemometrics in human skeletal remains. *Forensic Science International*, 281: 113-120. DOI: 10.1016/j.forsciint.2017.10.033.

- Wang, X.; Bank, R. A.; TeKoppele, J. M.; Agrawal, C. M. 2001. The role of collagen in determining bone mechanical properties. *Journal of Orthopaedic Research*, 19(6): 1021-1026. DOI: 10.1016/S0736-0266(01)00047-X
- Wang, X.; Bank, R. A.; TeKoppele, J. M.; Hubbard, G. B.; Althanasidou, K. A.; Agrawal, C. M. 2000. Effect of Collagen Denaturation on the Toughness of Bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 371: 228-239. DOI: 10.1097/00003086-200002000-00027.
- Wang, X.; Shen, X.; Li, X.; Agrawal, C. M. 2002. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31(1): 1-7. DOI: 10.1016/S8756-3282(01)00697-4.
- Wang, X. Y.; Zuo, Y.; Huang, D.; Hou, X. D.; Li, Y. B. 2010. Comparative Study on Inorganic Composition and Crystallographic Properties of Cortical and Cancellous Bone. *Biomedical and Environmental Sciences*, 23(6): 473-480. DOI: 10.1016/S0895-3988(11)60010-X.
- Watts, N. 2004. Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Osteoporosis International*, 15: 847-854. DOI: 10.1007/s00198-004-1681-7.
- Weiner, S.; Bar-Yosef, O. 1990. States of Preservation of Bones from Prehistoric Sites in the Near East: A Survey. *Journal of Archaeological Science*, 17(2): 187-196. DOI: 10.1016/0305-4403(90)90058-D.
- White, T. D.; Black, M. T.; Folkens, P. A. (eds.). 2012. *Human Osteology*. San Diego, California, Academic Press. ISBN: 9780123741349.
- White, T. D.; Folkens, P. A. (eds.). 2005. *The Human Bone Manual*. San Diego, California, Elsevier Academic Press. ISBN: 9780120884674.
- Wilsgaard, T.; Emaus, N.; Ahmed, L. A.; Grimnes, G.; Joakimsen, R. M.; Omsland, T. K.; Berntsen, G. R. 2009. Lifestyle Impact on Lifetime Bone Loss in Women and Men: the Tromsø Study. *American Journal of Epidemiology*, 169(7): 877-886. DOI: 10.1093/aje/kwn407.
- Wilson, E. E.; Awonusi, A.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Tecklenburg, M. M.; Beck, L. W. 2005. Highly Ordered Interstitial Water Observed in Bone by Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(4): 625-634. DOI: 10.1359/JBMR.041217.
- Wilson, E. E.; Awonusi, A.; Morris, M. D.; Kohn, D. H.; Tecklenburg, M. M.; Beck, L. W. 2006. Three Structural Roles for Water in Bone Observed by Solid-State NMR. *Biophysical Journal*, 90(10): 3722-3731. DOI: 10.1529/biophysj.105.070243.
- Wise, E. R.; Maltsev, S.; Davies, M. E.; Duer, M. J.; Jaeger, C.; Loveridge, N.; Murray, R. C.; Reid, D. G. 2007. The organic– mineral interface in bone is Predominantly

- Polysaccharide. *Chemistry of Materials*, 19(21): 5055-5057. DOI: 10.1021/cm702054c.
- Woess, C.; Unterberger, S. H.; Roeder, C.; Ritsch-Martel, M.; Pemberger, N.; Cemper-Kiesslich, J.; Hatzer-Grubwieser, P.; Parson, W.; Pallua, J. D. 2017. Assessing various Infrared (IR) microscopic imaging techniques for post-mortem interval evaluation of human skeletal remains. *PLoS ONE*, 12(3): e0174552. DOI: 10.1371/journal.pone.0174552.
- Woolf, A. D.; Akesson, K. 2008. *Osteoporosis: an Atlas of Investigation and Management*. Oxford, Clinical Publishing.
- Wopenka, B.; Pasteris, J. D. 2005. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering C*, 25(2): 131-143. DOI: 10.1016/j.msec.2005.01.008.
- World Health Organization (WHO). 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992].
- Wright, L. E.; Schwarcz, H. P. 1996. Infrared and Isotopic Evidence for Diagenesis of Bone Apatite at Dos Pilas, Guatemala: Palaeodietary Implications. *Journal of Archaeological Science*, 23(6): 933-944. DOI: 10.1006/jasc.1996.0087.
- Yang, T. S.; Chen, Y. R.; Chen, Y. J.; Chang, C. Y.; Ng, H. T. 2004. Osteoporosis: prevalence in Taiwanese women. *Osteoporosis International*, 15(4): 345-347. DOI: 10.1007/s00198-003-1509-x.
- Yates, L. B.; Karasik, D.; Beck, T. J.; Cupples, L. A.; Kiel, D. P. 2007. Hip structural geometry in old and old-old age: Similarities and differences between men and women. *Bone*, 41(4): 722-732. DOI: 10.1016/j.bone.2007.06.001.
- Yazedjian, L.; Kešetović, R. 2008. The application of traditional anthropological methods in a DNA-led identification process. In: Adams, B.J.; Byrd, J.E. (eds.). *Recovery, Analysis, and Identification of Commingled Human Remains*. Totowa, Humana Press: 271–284. ISBN: 978-1-59745-316-5.
- Yizhaq, M.; Mintz, G.; Cohen, I.; Khalaily, H.; Weiner, S.; Boaretto, E. 2005. Quality controlled radiocarbon dating of bones and charcoal from the early Pre-Pottery Neolithic B (PPNB) of Motza (Israel). *Radiocarbon*, 47(2): 193-206. DOI: 10.1017/S003382220001969X.
- Yerramshetty, J. S.; Lind, C.; Akkus, O. 2006. The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. *Bone*, 39(6): 1236-1243. DOI: 10.1016/j.bone.2006.06.002.
- Zhu, W.; Robey, P. G.; Boskey, A. L. 2013. The Regulatory Role of Matrix Proteins in Mineralization of Bone. In: Marcus, R.; Feldman, D.; Nelson, D.; Rosen, C. (eds.).

Para além da métrica e da morfologia

*Osteoporosis I (Fourth Edition)*. San Diego, Academic Press: 235-255. ISBN: 9780123705440.

Ziopoulos, P.; Currey, J. D.; Hamer, A. J. 1999. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(2): 108-116. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199905)45:2<108::AID-JBM5>3.0.CO;2-A.

# Apêndices

A. 1. Lista de indivíduos da CEI/XXI utilizados neste estudo.

ID	Idade	Sexo	Ano da Morte	ID	Idade	Sexo	Ano da Morte
1	64	F	2 000	45	84	F	2 000
2	60	F	2 000	46	84	M	1 997
3	80	F	2 001	47	57	M	2 000
4	76	F	2 001	48	89	M	2 001
5	73	F	2 001	50	89	F	2 000
6	85	M	2 001	51	70	M	2 000
7	86	F	2 001	52	85	F	2 000
8	83	F	2 001	53	77	F	2 000
9	88	M	2 001	54	97	F	2 001
10	68	F	2 001	55	87	F	2 001
11	61	M	2 001	56	87	F	2 000
12	76	M	2 001	57	85	M	1 999
13	68	F	2 001	58	60	M	1 999
14	34	M	2 001	59	85	F	1 999
15	88	M	2 001	60	95	F	1 999
16	88	F	2 001	61	82	F	1 999
18	74	M	2 001	62	60	M	2 000
19	72	F	2 001	63	64	M	2 000
20	92	F	2 000	65	81	F	2 000
21	84	M	2 001	67	91	F	2 000
22	61	F	2 001	68	89	F	2 000
23	74	M	2 001	69	83	F	1 996
25	83	F	1 998	70	90	F	1 996
27	79	M	1 998	71	67	M	2 000
28	78	M	1 998	72	81	M	2 000
29	74	M	1 998	73	92	F	2 000
30	44	M	1 998	74	43	M	1 995
31	90	F	1 998	75	86	F	2 000
33	78	M	1 998	76	60	F	2 000
34	33	M	1 998	78	38	M	2 001
35	75	M	2 000	79	74	M	2 000
36	65	M	1 997	80	88	F	2 001
37	86	F	1 995	81	96	F	2 001
38	50	F	2 000	82	96	F	1 999
39	90	M	2 000	83	61	M	2 001
40	95	F	2 000	84	76	F	2 001
41	92	M	2 000	85	89	F	2 000
42	34	M	2 000	87	83	F	2 000
43	72	M	2 000	88	80	F	2 001
44	82	M	1 997	89	83	F	2 000

F – Feminino; M – Masculino

**Tabela A.2.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o IC do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

	IC - Pearson								
	Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Idade	80	-0,121	0,285	<b>44</b>	<b>-0,4337</b>	<b>0,0033**</b>	36	0,0422	0,8069
IPG	80	0,0002	0,9989	44	-0,229	0,1349	36	0,2020	0,2374
Área total	71	0,0357	0,7673	35	0,0131	0,9404	36	0,1252	0,467
CMO total	71	-0,022	0,8553	35	0,1687	0,3328	36	-0,1122	0,5145
DMO total	78	0,0386	0,7374	42	0,2718	0,08169	36	-0,1581	0,3569
<b>Fêmur</b> Área colo femoral	71	-0,0342	0,7771	35	-0,0348	0,8427	36	-0,0095	0,9563
CMO colo femoral	71	-0,0149	0,9019	35	0,2240	0,1958	36	-0,1266	0,4618
DMO colo femoral	78	0,0519	0,6518	<b>42</b>	<b>0,3063</b>	<b>0,0485*</b>	36	-0,1362	0,4283
DMO grande trocânter	78	0,0276	0,8108	42	0,2736	0,0796	36	-0,1839	0,2829
DMO região intertrocantérica	78	0,0369	0,7481	42	0,2803	0,0721	36	-0,1726	0,3142
DMO área de Ward	78	0,0942	0,4118	<b>42</b>	<b>0,3480</b>	<b>0,0239*</b>	36	-0,0712	0,6800
Massa óssea (fêmur)	54	-0,1876	0,1663	29	-0,0126	0,9483	27	-0,2002	0,3166

\* significativo para  $\alpha = 0,05$  \*\*significativo para  $\alpha = 0,01$

**Tabela A.3.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o IC do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

	IC - Spearman									
	Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino			
	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	
Fêmur	Idade	80	-0,1047	0,3555	44	<b>-0,3097</b>	<b>0,0408*</b>	36	0,0624	0,7179
	IPG	80	-0,0098	0,9309	44	-0,2349	0,1248	36	0,1153	0,5032
	Área total	71	-0,0586	0,6273	35	0,0126	0,9427	36	0,1389	0,4192
	CMO total	71	-0,1026	0,3943	35	0,1583	0,3639	36	-0,0525	0,7610
	DMO total	78	-0,0446	0,6981	42	0,1886	0,2317	36	-0,1297	0,4508
	Área colo femoral	71	-0,1252	0,2982	35	-0,0719	0,6815	36	0,0426	0,8050
	CMO colo femoral	71	-0,1006	0,4041	35	0,1857	0,2854	36	-0,1258	0,4649
	DMO colo femoral	78	-0,0312	0,7865	42	0,2258	0,1504	36	-0,1508	0,3799
	DMO grande trocânter	78	-0,0361	0,7537	42	0,2149	0,1717	36	-0,1873	0,2741
	DMO região intertrocântérica	78	-0,0719	0,5317	42	0,1546	0,3282	36	-0,1647	0,3370
	DMO área de Ward	78	0,0190	0,8689	42	<b>0,3150</b>	<b>0,0422*</b>	36	-0,1266	0,4617
	Massa óssea (fêmur)	54	-0,2512	0,0618	29	-0,0123	0,9494	27	-0,0611	0,7623

\* significativo para  $\alpha = 0,05$



**Tabela A.4.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o IC do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		IC – Pearson								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	-0,0186	0,8700	44	-0,1716	0,2655	36	0,0885	0,6078
	IPG	80	0,1148	0,3108	44	0,0359	0,8169	36	0,2148	0,2085
	DMO total	78	-0,0434	0,7062	42	0,1071	0,4997	36	-0,2615	0,1234
	DMO colo femoral	78	0,0123	0,9146	42	0,2159	0,1697	36	-0,2145	0,2088
	DMO grande trocânter	78	-0,0444	0,6992	42	0,1274	0,4214	36	-0,2850	0,0869
	DMO região intertrocantérica	78	-0,0631	0,5830	42	0,0761	0,6319	36	-0,2793	0,0990
	DMO área de Ward	78	-0,0158	0,8909	42	0,2091	0,1838	36	-0,2533	0,1361
	Massa óssea (úmero)	56	0,0596	0,6627	29	0,1309	0,4987	27	-0,1427	0,4778

**Tabela A.5.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o IC do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		IC – Spearman								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	-0,0764	0,5004	44	-0,1000	0,5184	36	0,0327	0,8497
	IPG	80	0,1466	0,1945	44	0,0734	0,6358	36	0,2744	0,1054
	DMO total	78	-0,0243	0,8331	42	0,1177	0,4577	36	-0,2370	0,1641
	DMO colo femoral	78	0,0421	0,7141	42	0,1989	0,2066	36	-0,1920	0,2619
	DMO grande trocânter	78	-0,0159	0,8900	42	0,1396	0,3781	36	-0,2850	0,0921
	DMO região intertrocantérica	78	-0,0376	0,7441	42	0,1220	0,4414	36	-0,2703	0,1109
	DMO área de Ward	78	0,0599	0,6025	42	0,2327	0,1380	36	-0,1539	0,3701
	Massa óssea (úmero)	56	0,0756	0,5797	29	0,2050	0,2862	27	-0,1313	0,5139

**Tabela A.6.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o API do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

	API - Pearson								
	Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Idade	80	0,1557	0,1679	44	0,0202	0,8964	36	0,0100	0,9536
IPG	80	0,0528	0,6416	44	-0,0517	0,7388	36	0,0776	0,6528
Área total	<b>71</b>	<b>-0,2567</b>	<b>0,0307*</b>	35	-0,1600	0,3586	36	0,2709	0,1100
CMO total	<b>71</b>	<b>-0,2463</b>	<b>0,0384*</b>	35	-0,1772	0,3084	36	0,2671	0,1153
DMO total	78	-0,1795	0,1158	42	-0,0789	0,6196	36	0,1690	0,3245
<b>Fêmur</b> Área colo femoral	71	-0,1996	0,0951	35	-0,0655	0,7084	<b>36</b>	<b>0,4883</b>	<b>0,0025**</b>
CMO colo femoral	<b>71</b>	<b>-0,2456</b>	<b>0,0390*</b>	35	-0,2498	0,1478	36	0,2495	0,1422
DMO colo femoral	78	-0,1851	0,1047	42	-0,1400	0,3767	36	0,1321	0,4426
DMO grande trocânter	78	-0,2204	0,0525	42	-0,1240	0,4342	36	0,1067	0,5356
DMO região intertrocantérica	78	-0,1551	0,1752	42	-0,0381	0,8109	36	0,1769	0,3020
DMO área de Ward	78	-0,1368	0,2322	42	-0,0547	0,7308	36	0,0970	0,5735
Massa óssea (fêmur)	54	-0,2263	0,0936	29	-0,2068	0,2817	27	0,2214	0,2670

\* significativo para  $\alpha = 0,05$  \*\*significativo para  $\alpha = 0,01$

**Tabela A.7.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o API do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

	API - Spearman								
	Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Idade	80	0,0890	0,4323	44	-0,0027	0,9862	36	-0,0734	0,6704
IPG	80	0,0381	0,7374	44	-0,1074	0,4876	36	0,0673	0,6955
Área total	<b>71</b>	<b>-0,2737</b>	<b>0,0209*</b>	35	-0,1695	0,3304	36	0,2096	0,2200
CMO total	71	-0,2272	0,0569	35	-0,0521	0,7663	36	0,2901	0,0861
DMO total	78	-0,1421	0,2145	42	0,0343	0,8294	36	0,1458	0,3961
<b>Fémur</b> Área colo femoral	71	-0,1727	0,1498	35	0,0363	0,8360	<b>36</b>	<b>0,5571</b>	<b>0,0004**</b>
CMO colo femoral	71	-0,2225	0,0622	35	-0,1116	0,5232	36	0,2504	0,1408
DMO colo femoral	78	-0,1317	0,2504	42	-0,0134	0,9330	36	0,1797	0,2944
DMO grande trocânter	78	-0,1847	0,1054	42	-0,0017	0,9915	36	0,1037	0,5471
DMO região intertrocântérica	78	-0,1289	0,2608	42	0,0917	0,5634	36	0,1538	0,3705
DMO área de Ward	78	-0,1076	0,3482	42	0,0476	0,7648	36	0,1290	0,4535
Massa óssea (fémur)	54	-0,2169	0,1083	29	-0,0975	0,6147	27	0,1679	0,4026

\* significativo para  $\alpha = 0,05$  \*\*significativo para  $\alpha = 0,001$

**Tabela A.8.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o API do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocântérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		API – Pearson								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	0,0066	0,9539	44	-0,2149	0,1612	36	0,0899	0,6023
	IPG	80	-0,0568	0,6167	44	-0,2272	0,1380	36	0,1481	0,3886
	DMO total	78	0,0959	0,4037	<b>42</b>	<b>0,3910</b>	<b>0,0105*</b>	36	-0,0781	0,6505
	DMO colo femoral	78	0,0877	0,4454	<b>42</b>	<b>0,3674</b>	<b>0,0167*</b>	36	-0,0918	0,5945
	DMO grande trocânter	78	0,0362	0,7530	<b>42</b>	<b>0,3273</b>	<b>0,0344*</b>	36	-0,1609	0,3485
	DMO região intertrocântérica	78	0,0830	0,4701	<b>42</b>	<b>0,3719</b>	<b>0,0153*</b>	36	-0,1009	0,5582
	DMO área de Ward	78	0,0678	0,5550	<b>42</b>	<b>0,3427</b>	<b>0,0263*</b>	36	-0,1117	0,5165
	Massa óssea (úmero)	56	-0,1351	0,3208	29	0,2392	0,2114	27	0,0702	0,7280

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.9.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o API do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		API – Spearman								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	-0,0933	0,4103	44	-0,2845	0,0613	36	0,0478	0,7819
	IPG	80	-0,0492	0,6647	44	-0,2422	0,1311	36	0,1169	0,4970
	DMO total	78	0,0851	0,4590	<b>42</b>	<b>0,3184</b>	<b>0,0399*</b>	36	-0,1242	0,4705
	DMO colo femoral	78	0,1067	0,3526	<b>42</b>	<b>0,3149</b>	<b>0,0422*</b>	36	-0,0165	0,9240
	DMO grande trocânter	78	0,034	0,7676	42	0,2076	0,1870	36	-0,1736	0,3112
	DMO região intertrocantérica	78	0,069	0,5481	42	0,2960	0,0570	36	-0,1411	0,4119
	DMO área de Ward	78	0,1106	0,3352	<b>42</b>	<b>0,3557</b>	<b>0,0208*</b>	36	-0,0636	0,7126
	Massa óssea (úmero)	56	-0,1018	0,4552	29	0,2232	0,2445	27	0,0501	0,8041

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.10.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o BPI do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		BPI - Pearson								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Fêmur	Idade	<b>80</b>	<b>0,2563</b>	<b>0,0217*</b>	<b>44</b>	<b>0,3213</b>	<b>0,0335*</b>	36	0,1366	0,4271
	IPG	80	0,0967	0,3933	44	0,2032	0,1859	36	-0,0769	0,6556
	Área total	71	-0,1144	0,3421	35	-0,1302	0,4561	36	0,0661	0,7019
	CMO total	71	-0,1053	0,3822	35	-0,278	0,1058	36	0,1944	0,2558
	DMO total	78	-0,1228	0,2841	42	-0,278	0,0746	36	0,3428	0,1628
	Área colo femoral	71	0,0203	0,8668	35	0,1005	0,5656	36	0,2932	0,0826
	CMO colo femoral	71	-0,1152	0,3389	35	-0,33	0,0529	36	0,1753	0,3065
	DMO colo femoral	78	-0,1489	0,1932	42	<b>-0,3413</b>	<b>0,0270*</b>	36	0,1179	0,4933
	DMO grande trocânter	78	-0,1340	0,2422	42	<b>-0,3117</b>	<b>0,0445*</b>	36	0,1686	0,3256
	DMO região intertrocântérica	78	-0,1084	0,3447	42	-0,2546	0,1037	36	0,1766	0,3029
	DMO área de Ward	78	-0,1763	0,1226	42	<b>-0,3345</b>	<b>0,0340*</b>	36	0,0318	0,8539
	Massa óssea (fêmur)	54	0,0543	0,6909	29	-0,1351	0,4847	27	0,2652	0,1813

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.11.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o BPI do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		BPI - Spearman								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Fêmur	Idade	80	<b>0,2397</b>	<b>0,0322*</b>	44	0,2908	0,0555	36	0,1358	0,4297
	IPG	80	0,1187	0,2944	44	0,2091	0,1731	36	-0,0215	0,9008
	Área total	71	-0,0559	0,6436	35	-0,1919	0,2695	36	0,0830	0,6302
	CMO total	71	-0,0595	0,6221	35	-0,2776	0,1064	36	0,2208	0,1955
	DMO total	78	-0,0918	0,4242	42	-0,2435	0,1202	36	0,1474	0,3910
	Área colo femoral	71	0,0887	0,4619	35	0,0579	0,7412	<b>36</b>	<b>0,3664</b>	<b>0,0280*</b>
	CMO colo femoral	71	-0,0862	0,4746	35	-0,3236	0,0580	36	0,1865	0,2761
	DMO colo femoral	78	-0,1049	0,3607	42	-0,2908	0,0618	36	0,1382	0,4214
	DMO grande trocânter	78	-0,1107	0,3348	42	-0,2748	0,0782	36	0,2050	0,2303
	DMO região intertrocântérica	78	-0,0692	0,5469	42	-0,2011	0,2015	36	0,1682	0,3267
	DMO área de Ward	78	-0,1279	0,2643	42	-0,2762	0,0766	36	0,0764	0,6577
	Massa óssea (fêmur)	54	0,0951	0,4858	29	-0,1172	0,5447	27	0,1722	0,3905

\* significativo para  $\alpha = 0,05$



**Tabela A.12.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o BPI do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		BPI – Pearson								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	0,082	0,4698	44	0,0230	0,8820	36	0,0732	0,6715
	IPG	80	-0,0813	0,4734	44	-0,1604	0,2984	36	-0,0024	0,9891
	DMO total	78	0,0223	0,8462	42	0,1037	0,5133	36	0,0708	0,6816
	DMO colo femoral	78	-0,0377	0,7433	42	0,0221	0,8897	36	-0,0164	0,9245
	DMO grande trocânter	78	-0,0117	0,9188	42	0,0463	0,7708	36	0,0553	0,7485
	DMO região intertrocantérica	78	0,0329	0,7750	42	0,1106	0,4857	36	0,0888	0,6067
	DMO área de Ward	78	-0,032	0,7812	42	0,0174	0,9127	36	-0,0047	0,9784
	Massa óssea (úmero)	56	-0,178	0,1893	29	0,1036	0,5929	27	0,1028	0,6099

**Tabela A.13.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o BPI do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		BPI – Spearman								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	0,0599	0,5975	44	-0,0392	0,8007	36	0,0778	0,6519
	IPG	80	-0,0760	0,5030	44	-0,1570	0,3086	36	-0,0295	0,8643
	DMO total	78	0,0452	0,6945	42	0,0923	0,5610	36	0,0378	0,8266
	DMO colo femoral	78	-0,0118	0,9180	42	0,0238	0,8810	36	0,0178	0,9181
	DMO grande trocânter	78	0,0203	0,8596	42	0,0411	0,7961	36	0,0587	0,7338
	DMO região intertrocantérica	78	0,0473	0,6809	42	0,0727	0,6473	36	0,0647	0,7076
	DMO área de Ward	78	-0,0236	0,8375	42	0,0249	0,8757	36	-0,0268	0,8768
	Massa óssea (úmero)	56	-0,1672	0,2182	29	0,0672	0,7289	27	0,0287	0,887

**Tabela A.14.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/C do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

	C/C - Pearson								
	Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Idade	<b>80</b>	<b>-0,2361</b>	<b>0,0350*</b>	<b>44</b>	<b>-0,3720</b>	<b>0,0130*</b>	36	-0,1901	0,2668
IPG	80	-0,0407	0,7199	<b>44</b>	<b>-0,3569</b>	<b>0,0174*</b>	36	0,2326	0,1722
Área total	71	-0,0032	0,9788	35	-0,0379	0,8291	36	0,0537	0,7556
CMO total	71	-0,0027	0,9820	35	0,1840	0,2900	36	-0,0996	0,5633
DMO total	78	0,0634	0,5816	42	0,2961	0,0569	36	-0,1060	0,5384
<b>Fêmur</b> Área colo femoral	71	-0,1045	0,3860	35	-0,1867	0,2828	36	-0,0978	0,5704
CMO colo femoral	71	-0,0094	0,9380	35	0,1536	0,3784	36	-0,0915	0,5955
DMO colo femoral	78	0,0639	0,5786	42	0,2696	0,0842	36	-0,0741	0,6674
DMO grande trocânter	78	0,0423	0,7132	42	0,2903	0,0622	36	-0,1483	0,3881
DMO região intertrocantérica	78	0,0684	0,5518	<b>42</b>	<b>0,3188</b>	<b>0,0396*</b>	36	-0,1176	0,4947
DMO área de Ward	78	0,1364	0,2337	<b>42</b>	<b>0,3312</b>	<b>0,0322*</b>	36	0,0288	0,8677
Massa óssea (fêmur)	54	-0,1713	0,2068	29	-0,0102	0,9579	27	-0,2025	0,3111

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.15.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o C/C do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

	C/C - Spearman								
	Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Idade	80	-0,1047	0,3552	44	-0,1029	0,5063	36	-0,1908	0,2650
IPG	80	-0,0525	0,6440	<b>44</b>	<b>-0,3382</b>	<b>0,0247*</b>	36	0,2063	0,2274
Área total	71	-0,0461	0,7029	35	-0,0182	0,9173	36	0,0357	0,8364
CMO total	71	-0,0814	0,4997	35	0,1611	0,3553	36	-0,1336	0,4373
DMO total	78	-0,0437	0,7043	42	0,1827	0,2468	36	-0,1537	0,3709
<b>Fêmur</b> Área colo femoral	71	-0,1445	0,2292	35	-0,1387	0,4267	36	-0,1167	0,4980
CMO colo femoral	71	-0,0932	0,4396	35	0,1101	0,5290	36	-0,1588	0,3548
DMO colo femoral	78	-0,0499	0,6645	42	0,1448	0,3602	36	-0,1305	0,4481
DMO grande trocânter	78	-0,0425	0,7120	42	0,1875	0,2343	36	-0,2173	0,2031
DMO região intertrocantérica	78	-0,0666	0,5623	42	0,1543	0,3293	36	-0,1902	0,2664
DMO área de Ward	78	-0,0149	0,8972	42	0,1506	0,3412	36	-0,0906	0,5992
Massa óssea (fêmur)	<b>54</b>	<b>-0,2849</b>	<b>0,0333*</b>	29	-0,0842	0,6640	27	-0,2051	0,3047

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.16.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/C do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		C/C – Pearson								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	-0,1117	0,3238	44	-0,1535	0,3199	36	-0,0864	0,6164
	IPG	80	0,1306	0,2481	44	0,0961	0,5349	36	0,1901	0,2667
	DMO total	78	-0,0113	0,9221	42	0,0266	0,8670	36	-0,1197	0,4869
	DMO colo femoral	78	0,0544	0,6363	42	0,1110	0,4841	36	-0,0326	0,8504
	DMO grande trocânter	78	-0,0085	0,9408	42	0,0494	0,7562	36	-0,1425	0,4071
	DMO região intertrocantérica	78	-0,0340	0,7678	42	0,0080	0,9598	36	-0,1596	0,3526
	DMO área de Ward	78	0,0356	0,7568	42	0,0973	0,5400	36	-0,0542	0,7537
	Massa óssea (úmero)	56	0,1230	0,3650	29	0,0296	0,8787	27	-0,0765	0,7046

**Tabela A.17.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o C/C do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		C/C – Spearman								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	-0,1111	0,3264	44	-0,1080	0,4851	36	-0,0352	0,8386
	IPG	80	0,1416	0,2101	44	0,0836	0,5897	36	0,2173	0,2031
	DMO total	78	-0,0028	0,9803	42	0,0346	0,8278	36	-0,1246	0,4691
	DMO colo femoral	78	0,0539	0,6390	42	0,1039	0,5127	36	-0,0638	0,7115
	DMO grande trocânter	78	0,0091	0,9369	42	0,0491	0,7574	36	-0,1514	0,3782
	DMO região intertrocantérica	78	-0,0137	0,9050	42	0,0529	0,7393	36	-0,1739	0,3105
	DMO área de Ward	78	0,065	0,5717	42	0,1224	0,4401	36	-0,0505	0,7701
	Massa óssea (úmero)	56	0,1412	0,2994	29	0,0998	0,6066	27	-0,0656	0,7449

**Tabela A.18.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/P do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

	C/P - Pearson								
	Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Idade	<b>80</b>	<b>0,2612</b>	<b>0,0193*</b>	<b>44</b>	<b>0,3492</b>	<b>0,0201*</b>	36	0,1364	0,4276
IPG	80	0,1014	0,3709	44	0,2409	0,1152	36	-0,1054	0,5408
Área total	71	-0,1272	0,2904	35	-0,1312	0,4527	36	0,0084	0,9611
CMO total	71	-0,1152	0,3389	35	-0,2998	0,0801	36	0,1702	0,3210
DMO total	78	-0,1354	0,2373	<b>42</b>	<b>-0,3129</b>	<b>0,0436*</b>	36	0,1598	0,3518
<b>Fêmur</b> Área colo femoral	71	0,0101	0,9333	35	0,0862	0,6223	36	0,2424	0,1544
CMO colo femoral	71	-0,1312	0,2756	<b>35</b>	<b>-0,3568</b>	<b>0,0354*</b>	36	0,1483	0,3880
DMO colo femoral	78	-0,1686	0,1400	<b>42</b>	<b>-0,3764</b>	<b>0,0140*</b>	36	0,1032	0,5491
DMO grande trocânter	78	-0,1439	0,2086	<b>42</b>	<b>-0,3385</b>	<b>0,0283*</b>	36	0,1642	0,3385
DMO região intertrocantérica	78	-0,1172	0,3066	42	-0,2881	0,0643	36	0,1822	0,2875
DMO área de Ward	78	-0,2029	0,0748	<b>42</b>	<b>-0,3695</b>	<b>0,0160*</b>	36	0,0027	0,9874
Massa óssea (fêmur)	54	0,0642	0,6383	29	-0,1645	0,3939	27	0,2721	0,1697

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.19.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o C/P do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

	C/P - Spearman								
	Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Idade	<b>80</b>	<b>0,2434</b>	<b>0,0296*</b>	<b>44</b>	<b>0,3114</b>	<b>0,0397*</b>	36	0,1211	0,4817
IPG	80	0,1340	0,2360	44	0,2607	0,0874	36	-0,0397	0,8181
Área total	71	-0,0818	0,4975	35	-0,2123	0,2208	36	0,0265	0,8780
CMO total	71	-0,0862	0,4750	35	-0,3238	0,0578	36	0,1876	0,2731
DMO total	78	-0,1272	0,2671	<b>42</b>	<b>-0,3174</b>	<b>0,0405*</b>	36	0,1391	0,4183
<b>Fêmur</b> Área colo femoral	71	0,0747	0,5357	35	0,0339	0,8466	36	0,2879	0,0886
CMO colo femoral	71	-0,1051	0,3832	<b>35</b>	<b>-0,3649</b>	<b>0,0312*</b>	36	0,1660	0,3331
DMO colo femoral	78	-0,1390	0,2249	<b>42</b>	<b>-0,3507</b>	<b>0,0228*</b>	36	0,1398	0,4162
DMO grande trocânter	78	-0,1407	0,2193	<b>42</b>	<b>-0,3289</b>	<b>0,0334*</b>	36	0,1834	0,2843
DMO região intertrocântérica	78	-0,0986	0,3904	42	-0,2697	0,0841	36	0,1669	0,3305
DMO área de Ward	78	-0,1672	0,1434	<b>42</b>	<b>-0,3283</b>	<b>0,0338*</b>	36	0,0499	0,7724
Massa óssea (fêmur)	54	0,0780	0,5579	29	-0,2286	0,2330	27	0,2143	0,2831

\* significativo para  $\alpha = 0,05$



**Tabela A.20.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o C/P do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		C/P – Pearson								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	0,1071	0,3444	44	0,0753	0,6270	36	0,0767	0,6568
	IPG	80	-0,073	0,5200	44	-0,1382	0,3711	36	-0,0199	0,9082
	DMO total	78	-0,0053	0,9633	42	0,0594	0,7089	36	0,0671	0,6974
	DMO colo femoral	78	-0,0663	0,5641	42	-0,0353	0,8243	36	-0,0054	0,9749
	DMO grande trocânter	78	-0,0296	0,7971	42	0,0064	0,9679	36	0,0745	0,6660
	DMO região intertrocantérica	78	0,0065	0,9553	42	0,6613	0,0696	36	0,0840	0,6261
	DMO área de Ward	78	-0,0665	0,5630	42	-0,0478	0,7638	36	-0,0022	0,9899
	Massa óssea (úmero)	56	-0,1788	0,1873	29	0,0304	0,8757	27	0,1317	0,5126

**Tabela A.21.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o C/P do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		C/P – Spearman								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	0,0798	0,4814	44	-0,0042	0,9786	36	0,0682	0,6929
	IPG	80	0,0796	0,4828	44	-0,1738	0,2593	36	-0,0753	0,6625
	DMO total	78	0,0185	0,8721	42	0,0813	0,6089	36	0,0489	0,7770
	DMO colo femoral	78	-0,0388	0,7359	42	0,0067	0,9663	36	0,0216	0,9004
	DMO grande trocânter	78	0,0020	0,9860	42	0,0265	0,8677	36	0,0929	0,5898
	DMO região intertrocantérica	78	0,0208	0,8564	42	0,0666	0,6751	36	0,0712	0,6800
	DMO área de Ward	78	-0,0536	0,6414	42	-0,0075	0,9626	36	-0,0196	0,9098
	Massa óssea (úmero)	56	-0,1641	0,2270	29	0,0121	0,9504	27	0,0360	0,8584

**Tabela A.22.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o Amida I/P do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		Amida I/P - Pearson								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Fêmur	Idade	80	0,1246	0,2708	44	0,0278	0,8579	36	-0,0845	0,6243
	IPG	80	0,019	0,8672	44	-0,1019	0,5105	36	0,2050	0,2303
	Área total	<b>71</b>	<b>-0,2677</b>	<b>0,0240*</b>	35	-0,1648	0,3441	36	0,2038	0,2332
	CMO total	<b>71</b>	<b>-0,2539</b>	<b>0,0327*</b>	35	-0,1791	0,3032	36	0,2151	0,2076
	DMO total	78	-0,2013	0,0771	42	-0,1019	0,5209	36	0,1403	0,4146
	Área colo femoral	71	-0,2190	0,0665	35	-0,0943	0,5899	<b>36</b>	<b>0,4097</b>	<b>0,0131*</b>
	CMO colo femoral	<b>71</b>	<b>-0,2613</b>	<b>0,0278*</b>	35	-0,2244	0,1107	36	0,2112	0,2164
	DMO colo femoral	78	-0,2190	0,0547	42	-0,1870	0,2356	36	0,1044	0,5445
	DMO grande trocânter	<b>78</b>	<b>-0,2450</b>	<b>0,0306*</b>	42	-0,1338	0,3982	36	0,0452	0,7935
	DMO região intertrocântérica	78	-0,1713	0,1337	42	-0,0571	0,7195	36	0,1618	0,3458
	DMO área de Ward	78	-0,1724	0,1311	42	-0,0963	0,5439	36	0,0573	0,7399
	Massa óssea (fêmur)	<b>54</b>	<b>-0,2710</b>	<b>0,0434*</b>	29	-0,2901	0,1268	27	0,2098	0,2935

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.23.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o Amida I/P do fêmur e as variáveis em estudo, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		Amida I/P - Spearman								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Fêmur	Idade	80	0,0682	0,5476	44	-0,0044	0,9775	36	-0,1989	0,2448
	IPG	80	0,0087	0,9387	44	-0,1316	0,3944	36	0,0441	0,7984
	Área total	<b>71</b>	<b>-0,2952</b>	<b>0,0124*</b>	35	-0,1714	0,3248	36	0,1291	0,4530
	CMO total	<b>71</b>	<b>-0,2442</b>	<b>0,0401*</b>	35	-0,0692	0,6929	36	0,2507	0,1403
	DMO total	78	-0,1680	0,1415	42	-0,0139	0,9306	36	0,1687	0,3252
	Área colo femoral	71	-0,2215	0,0634	35	-0,0439	0,8024	<b>36</b>	<b>0,4004</b>	<b>0,0155*</b>
	CMO colo femoral	<b>71</b>	<b>-0,2387</b>	<b>0,0450*</b>	35	-0,1558	0,3716	36	0,2621	0,1226
	DMO colo femoral	78	-0,1691	0,1390	42	-0,0956	0,5469	36	0,2224	0,1923
	DMO grande trocânter	78	-0,2081	0,0675	42	-0,0254	0,8733	36	0,0950	0,5816
	DMO região intertrocântérica	78	-0,1555	0,1740	42	0,0411	0,7962	36	0,1609	0,3486
	DMO área de Ward	78	-0,1586	0,1654	42	-0,0512	0,7474	36	0,1272	0,4599
	Massa óssea (fêmur)	<b>54</b>	<b>-0,2772</b>	<b>0,0386</b>	29	-0,2433	0,2034	27	0,2210	0,2680

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.24.** Resultados dos coeficientes de correlação de Pearson entre o Amida I/P do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		Amida I/P – Pearson								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>	<i>n</i>	<i>r</i>	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	-0,0338	0,7658	44	-0,2234	0,1449	36	0,0063	0,9711
	IPG	80	-0,0324	0,7754	44	-0,1787	0,2458	36	0,1089	0,5279
	DMO total	78	0,0558	0,6278	42	0,2986	0,0589	36	-0,0506	0,7694
	DMO colo femoral	78	0,1004	0,3816	<b>42</b>	<b>0,3077</b>	<b>0,0474*</b>	36	0,0228	0,8950
	DMO grande trocânter	78	0,0084	0,9416	42	0,2487	0,1123	36	-0,1211	0,4815
	DMO região intertrocantérica	78	0,0356	0,7568	42	0,2666	0,0879	36	-0,0801	0,6426
	DMO área de Ward	78	0,0627	0,5855	42	0,2566	0,1009	36	-0,0179	0,9173
	Massa óssea (úmero)	56	-0,0893	0,5159	29	0,0888	0,6470	27	0,1403	0,4853

\* significativo para  $\alpha = 0,05$

**Tabela A.25.** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman entre o Amida I/P do úmero e a idade à morte, IPG, DMO (total, colo femoral, grande trocânter, região intertrocantérica e área de Ward) e massa óssea do úmero, para a amostra total e de acordo com o sexo.

		Amida I/P – Spearman								
		Total			Sexo Feminino			Sexo Masculino		
		<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>	<i>n</i>	$\rho$	<i>p-value</i>
Úmero	Idade	80	-0,1123	0,3214	44	-0,2420	0,1135	36	-0,0725	0,6742
	IPG	80	-0,0173	0,8789	44	-0,1846	0,2304	36	0,1514	0,3782
	DMO total	78	0,0225	0,8450	42	0,1822	0,2480	36	-0,0749	0,6641
	DMO colo femoral	78	0,0839	0,4650	42	0,2106	0,1806	36	0,0708	0,6816
	DMO grande trocânter	78	-0,0240	0,8345	42	0,0830	0,6013	36	-0,1007	0,5591
	DMO região intertrocantérica	78	0,0035	0,9757	42	0,1626	0,3035	36	-0,0979	0,5698
	DMO área de Ward	78	0,0648	0,5732	42	0,2000	0,2041	36	0,0090	0,9584
	Massa óssea (úmero)	56	-0,1040	0,4454	29	-0,0219	0,9101	27	0,0913	0,6506

**Tabela A.26.** Estatística descritiva e resultado do teste t sobre as diferenças das médias ( $\bar{x}$ ) dos índices químicos calculados nos dois grupos, homens ( $n = 36$ ) e mulheres ( $n = 44$ ).

	Índice	Sexo	$\bar{x}$	ic95%*	Teste t	<i>p-value</i>
Fémur	IC	Feminino	3,176	3,139 – 3,213	- 0,223	> 0,05
		Masculino	3,184	3,122 – 3,246		
	API	Feminino	1,003	0,969 – 1,037	3,381	<b>&lt; 0,005</b>
		Masculino	0,931	0,905 – 0,957		
	BPI	Feminino	1,205	1,161 – 1,249	1,459	> 0,05
		Masculino	1,154	1,099 – 1,209		
	C/C	Feminino	0,983	0,974 – 0,991	- 0,119	> 0,05
		Masculino	0,984	0,969 – 0,998		
	C/P	Feminino	0,376	0,362 – 0,390	1,332	> 0,05
		Masculino	0,361	0,344 – 0,379		
	Am/P	Feminino	0,469	0,456 – 0,481	3,411	<b>&lt; 0,005</b>
		Masculino	0,442	0,432 – 0,451		
Úmero	IC	Feminino	3,299	3,241 – 3,357	0,101	> 0,05
		Masculino	3,295	3,231 – 3,359		
	API	Feminino	0,999	0,963 – 1,035	1,311	> 0,05
		Masculino	0,968	0,936 – 0,999		
	BPI	Feminino	1,125	1,066 – 1,184	0,905	> 0,05
		Masculino	1,091	1,040 – 1,141		
	C/C	Feminino	1,013	0,999 – 1,027	- 0,188	> 0,05
		Masculino	1,015	1,000 – 1,029		
	C/P	Feminino	0,350	0,331 – 0,369	0,918	> 0,05
		Masculino	0,339	0,322 – 0,356		
	Am/P	Feminino	0,475	0,461 – 0,488	1,098	> 0,05
		Masculino	0,464	0,449 – 0,478		

\* Intervalo de confiança a 95%