



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cristiana Romão Monteiro

MORE THAN MEETS THE EYE
ALTERAÇÕES NA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA
COM O AUMENTO DA TEMPERATURA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Evolução e Biologia
Humanas 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.

Agosto de 2019

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

MORE THAN MEETS THE EYE
**ALTERAÇÕES NA DENSIDADE MINERAL
ÓSSEA COM O AUMENTO DA
TEMPERATURA**

Cristiana Romão Monteiro

Dissertação no âmbito do Mestrado em Evolução e Biologia Humanas 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.

Agosto de 2019



**UNIVERSIDADE D
COIMBRA**

Agradecimentos

O presente trabalho, apesar de apresentar autoria de apenas uma pessoa, não poderia ter sido realizado sem o contributo de muitas outras. Em primeiro lugar, tenho de agradecer aos meus orientadores, Doutor Francisco Curate, Doutor David Gonçalves e Professora Doutora Maria Teresa Ferreira, pela confiança que depositaram em mim para desenvolver este tema, pelo incentivo, pelo apoio e ajuda para arranjar soluções em situações menos felizes, nomeadamente na paragem de funcionamento da maioria dos equipamentos aqui utilizados, pelas críticas construtivas e pela partilha dos seus conhecimentos, constantes e essenciais para o desenvolvimento desta tese.

Não podia deixar de agradecer à Doutora Anabela Albuquerque e à Técnica de Diagnóstico e Terapêutica Izilda Ferreira, do serviço de Medicina Nuclear do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, por toda a disponibilidade e simpatia e pela assistência nas medições de densitometria bifotónica.

Ao Laboratório de Antropologia Forense, por me permitir realizar a tese com uma amostra da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI e pelo bom ambiente e camaradagem no “local de trabalho”. Ao Centro de Investigação em Antropologia e Saúde, nomeadamente ao Doutor Vítor Matos, pela disponibilização de materiais essenciais à realização deste projeto. Ao Professor Doutor Luís Batista de Carvalho, por me receber na Unidade de I&D Química-Física Molecular e disponibilizar o equipamento de FTIR-ATR, necessário à realização de espectroscopia de infravermelho.

À Carolina e à Cristiana, por me terem incentivado a ter vida social durante os dois anos de mestrado. A todas as pessoas de que me aproximei neste último ano, pela ajuda, pelo incentivo, pelos desabafos, pela amizade e por me lembrarem que existe sempre alguém a quem as situações correm pior durante a tese e que esse alguém era “eu”! À Catarina, por ser a minha parceira de laboratório e pela ajuda na componente prática deste trabalho. Ao Calil, pela companhia nas longas horas tardias durante a realização das queimas, por todos os esclarecimentos e por me incentivar sempre a ser melhor. Aos meus colegas do Mestrado em Evolução e Biologia Humanas e da Pós-graduação em Antropologia Forense, pela amizade e apoio nestes dois anos. Todos vocês foram imprescindíveis para a realização desta tese.

Por último, aos meus pais, por todos os sacrifícios. Posso não vos agradecer tanto e tão regularmente como deveria, por isso esta é a minha deixa para vos demonstrar a minha eterna gratidão. Também, a restantes familiares e amigos, por todo o apoio.

Resumo

A queima de restos humanos é uma prática funerária comum em contextos arqueológicos, mas restos queimados podem também estar associados a acidentes, crimes ou desastres em massa. De modo a compreender as alterações no osso provocadas pelo aumento da temperatura, têm sido realizados vários estudos debruçando-se tanto sobre a macroscopia como a microestrutura do osso. Uma técnica que estuda a parte mineral óssea, mais precisamente a sua densidade, é a DXA (densitometria bifotónica), sendo utilizada em contexto clínico para o diagnóstico da osteoporose.

Com este estudo pretendeu-se determinar até que ponto é exequível a análise da densidade mineral óssea em ossos queimados e assim legitimar inferências ao nível da paleopatologia, nomeadamente acerca da deteção de osteoporose. Para o efeito aplicou-se a DXA ao estudo de ossos queimados. Numa primeira abordagem, foi necessário entender o efeito que a possível assimetria bilateral e a aplicação de consolidante têm sobre o elemento ósseo. De seguida, estudaram-se as alterações que ocorrem no osso com o aumento da temperatura, através de análises densitométricas. Procurou-se também avaliar, através de análises de infravermelho, se existe alguma correlação entre a cristalinidade do osso, queimado a diversas temperaturas máximas, e a densidade mineral óssea.

Para tal, foram selecionados três elementos ósseos (fémur, patela e primeiro metatársico) de duas amostras. Uma constituída por 6 esqueletos femininos e 6 esqueletos masculinos, previamente queimados, a diferentes temperaturas. Outra constituída por 5 esqueletos femininos e 5 esqueletos masculinos, que foram queimados durante este estudo, a temperaturas máximas de 600°C, 700°C, 800°C, 900°C e 1000°C.

Observou-se assimetria bilateral entre antímeros para todos os indicadores e o consolidante aplicado influenciou as medições de densitometria nas zonas intertrancantérica e total do fémur. Na análise pré- e pós-queima, a densidade mineral óssea (DMO) aumentou com o aumento da temperatura máxima da queima. Ademais, o índice de cristalinidade (IC) aumentou com o incremento da temperatura máxima da queima até aos 800°C, estabilizando nas queimas de 900°C e 1000°C. Não foram

encontradas correlações relevantes entre os vários indicadores e as variáveis temperatura e IC. Portanto, este último não revelou ser um bom *proxy* para a densidade mineral óssea.

Este estudo serviu como um teste preliminar ao potencial dos estudos de densidade mineral óssea em ossos queimados, evidenciando que alguns indicadores, nomeadamente as zonas “Neck” e “Ward” para a área e conteúdo mineral ósseo (CMO) e as zonas “Inter” e “Total” para a DMO, poderão conter alguma utilidade apesar das alterações térmico-induzidas. Trabalhos futuros, com um aumento significativo da amostra, permitirão retirar conclusões mais sólidas sobre esta questão.

Palavras-chave: Antropologia Biológica, Antropologia Forense, DXA, FTIR-ATR, índice de cristalinidade, ossos queimados.

Abstract

The burning of human remains is frequently found at archaeological sites, however burned remains can also be associated to recent events such as accidents, crimes or mass disasters. In order to understand bone alterations due to increasing temperature, there have been several studies that focus not only on the macroscopy but also on the microstructure of bone. A methodology that allows the study of the mineral part of the bone, more precisely its density, is DXA (*Dual X-ray Absorptiometry*), being used under clinical environments in order to diagnose osteoporosis.

With this study, we intended to determine how practicable bone mineral density analysis is in burned bones and therefore legitimize inferences on paleopathology, namely on the detection of osteoporosis. For that purpose, DXA was applied to the study of burned bones. In a first approach, it was necessary to understand the effect of bilateral asymmetry and preservative application on bone analyses. Then, bone alterations due to increasing temperature were studied, through densitometry analysis. Also, through infrared analysis, correlations between bone mineral density and bone crystallinity were investigated according to heat increment.

For such purpose, three bones were selected (femur, patela and first metatarsal) from two sets of samples. One of them was composed of six female skeletons and six male skeletons, previously burned, at different temperatures. The other was composed of five female skeletons and five male skeletons, burned during this study at maximum temperatures of 600°C, 700°C, 800°C, 900°C and 1000°C.

Bilateral asymmetry between antimeres was observed for all indicators and preservative application influenced densitometry measurements at the intertrochanteric and total femur regions. Bone mineral density increased with increasing maximum burning temperature. Moreover, crystallinity index augmented alongside to increasing maximum temperature up to 800°C, stabilizing at higher temperatures. Relevant correlations weren't found between the several indicators, maximum temperature and crystallinity index. Therefore, the latter cannot act as a good proxy for bone mineral density.

This study is a preliminary test to the study of burned bones mineral density, highlighting the possible analytical potential of some indicators, namely “Neck” and “Ward” regions for area and mineral density content; and “Inter” and “Total” regions for bone mineral density. Results suggest that these regions may be of use regardless of burn alterations. Future studies, with a significant sample increase will allow for more solid conclusions to be withdrawn on this matter.

Key-words: Biological Anthropology, Forensic Anthropology, DXA, FTIR-ATR, crystallinity index, burned bones.

Tábua de Matérias

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Tábua de Matérias	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista da Abreviaturas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Estado da arte	1
1.1.1. O osso enquanto órgão: composição e organização.....	1
1.1.1.1. Efeito da diagênese: recristalização	3
1.1.2. Ossos submetidos a elevadas temperaturas.....	3
1.1.2.1. Cristalinidade e porosidade: alterações provocadas pelo fogo na microestrutura.....	4
1.1.2.2. Medição da cristalinidade no osso.....	6
1.1.2.3. Alterações na dimensão.....	9
1.1.3. Densidade Mineral Óssea.....	9
1.1.3.1. Aplicação da DMO na estimativa do perfil biológico.....	11
1.2. Objetivos	13
2. Material e Métodos	15
2.1. Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI.....	15
2.1.1. Escolha da amostra.....	16
2.2. Métodos.....	18
2.2.1. Queima	18

2.2.2. Osteodensitometria.....	19
2.2.3. FTIR-ATR.....	24
3. Resultados.....	27
3.1. Assimetria bilateral	27
3.2. Diferenças pré- e pós-consolidante	30
3.3. Diferenças pré- e pós-queima.....	33
3.4. Diferenças entre osso queimando e antímero não-queimado	37
3.5. Correlações com a temperatura	39
3.6. Correlações com o índice de cristalinidade.....	40
3.7. Influência da queima na classificação da OMS para osteoporose.....	43
4. Discussão.....	45
4.1. Assimetria bilateral	45
4.2. Diferenças pré- e pós-consolidante	48
4.3. Diferenças pré- e pós-queima.....	49
4.4. Influência da queima na classificação da OMS para osteoporose.....	56
5. Conclusões e Considerações Futuras	59
6. Referências Bibliográficas.....	61
Apêndices.....	75

Lista de Figuras

Figura 1. Disposição dos ossos no forno elétrico Barracha K-3 trifásico 14A.	19
Figura 2. Osteodensitômetro Hologic QDR4500 elite do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra.	20
Figura 3. Exemplo da análise realizada pelo densitômetro, com foco nas áreas em estudo. A) Fémur com a ROI colo femoral a azul, a ROI trocânter a laranja, ROI intertrocânterica a verde e ROI área total como a soma das zonas anteriores. B) Metatársicos e patelas ilustrando a área total	21
Figura 4. Exemplo dos resultados obtidos por DXA, para as várias regiões e parâmetros, juntamente com a classificação para osteoporose da OMS.	24
Figura 5. Exemplo das zonas de amostragem para os três ossos: a) fémur, b) patela e c) primeiro metatársico.	25
Figura A.1. Exemplo dos resultados obtidos pela DXA.	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de esqueletos presentes na coleção, por sexo e intervalo de idade. ...	16
Tabela 2. Amostra de esqueletos selecionada para estudo.	17
Tabela 3. Classificações para osteopenia e osteoporose, de acordo com a OMS	22
Tabela 4. Estatística descritiva e teste das diferenças entre antímeros não queimados, segundo o teste de wilcoxon.	29
Tabela 5. Erros de medida e diferenças relativas para as zonas “Neck” e “Total” da DMO (n=50)	30
Tabela 6. Estatística descritiva e teste das diferenças antes e após a aplicação do consolidante no mesmo osso, segundo o teste de Wilcoxon.	32
Tabela 7. Estatística descritiva e teste das diferenças antes e após a queima no mesmo osso, segundo o teste de Wilcoxon.	35
Tabela 8. Diferenças relativas por sexo e por temperatura, para cada indicador.	36
Tabela 9. Valores em bruto e diferenças relativas para o índice de cristalinidade (IC) por sexo e por temperatura, para cada osso (fémur, patela e primeiro metatársico).	38
Tabela 10. Estatística descritiva e teste das diferenças entre o antímero não queimado e o antímero queimado, segundo o teste de Wilcoxon.	38
Tabela 11. Correlações de Spearman entre os indicadores de área, DMO e CMO e a temperatura máxima (600°C, 700°C, 800°C, 900°C e 1000°C) a que os ossos foram queimados. Os resultados são apresentados para a amostra total, amostra composta por mulheres (M) e amostra composta por homens (H).	40
Tabela 12. Correlações entre os indicadores e os índices de cristalinidade, segundo o teste de Spearman.	42
Tabela 13. Resultado obtido pela DXA, segundo a classificação da OMS para as várias etapas da análise da densidade mineral óssea, em fêmures.	43
Tabela 14. Resultados de DMO para estudos publicados sobre assimetria bilateral.	47

Tabela 15. Comparação dos IC obtidos com valores de IC reportados noutros estudos. .	55
Tabela 16. Indicadores com melhores resultados para cada análise.	56
Tabela A.2. Diferenças relativas para o estudo da assimetria bilateral entre antímeros não queimados para cada parâmetro, em cada indivíduo.	76
Tabela A.3. Diferenças relativas pré- e pós-consolidante para cada indicador, em cada indivíduo.	80
Tabela A.4. Diferenças relativas pré- e pós-queima para cada indicador, em cada indivíduo.	84

Lista de Abreviaturas

ATR: reflexão total atenuada

CEI/XXI: Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI

CMO: conteúdo mineral ósseo

DMO: densidade mineral óssea

DPA: *Dual-Photon Absorptiometry*

DXA: *Dual X-ray Absorptiometry* – densitometria bifotônica

FTIR: espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

ETM: erro técnico de medição

ETMr: erro técnico de medição relativo

IC: índice de cristalinidade

Inter: região intertrocantérica

KBr: brometo de potássio

MT1: primeiro metatársico

Neck: colo femoral

OMS: Organização Mundial da Saúde

ROI: região de interesse

SEM: microscopia eletrônica

SPA: *Single-Photon Absorptiometry*

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

Total: área total

Troch: trocânter

Ward: área de Ward

XRD: difração de raio-X

1. Introdução

O estudo de ossos submetidos a elevadas temperaturas é essencial para compreender este processo tafonómico. Este é um tema importante tanto em contextos arqueológicos como forenses, pois o processo de queima ocorre em várias circunstâncias, como por exemplo ao nível das práticas funerárias encontradas no registo arqueológico ou a utilização do fogo para destruição de provas físicas (nomeadamente cadáveres) em casos forenses (Waterhouse, 2010; Cordner *et al.*, 2011; Alunni *et al.*, 2014; De Becdelievre *et al.*, 2015).

A necessidade do estudo destes processos advém das várias alterações que podem ocorrer num osso, desde microscópicas (Forbes, 1941; Posner, 1969; Bonucci e Graziani, 1975; Herrmann, 1977; Bradtmiller e Buikstra, 1984; Shipman *et al.*, 1984) a macroscópicas (Baby, 1954; Binford, 1963; Thurman e Willmore, 1981; Shipman *et al.*, 1984) e que dificultam a análise antropológica.

Um grande número das propriedades afetadas pela queima de ossos tem sido amplamente estudado (Thompson, 2004), no entanto ainda não foi estudada a associação entre a temperatura e a densidade mineral óssea. Esta análise pode ser realizada utilizando as mesmas técnicas utilizadas para a medição de densidade mineral óssea em contextos clínicos ou epidemiológicos e utilizando diferentes ossos. A avaliação da densidade mineral óssea em ossos queimados poderá facultar novos dados para a compreensão do processo da queima e do seu efeito no osso, assim como para o auxílio da estimativa do perfil biológico.

1.1. Estado da arte

1.1.1. O osso enquanto órgão: Composição e organização

O osso é um órgão dinâmico essencial para o normal funcionamento do corpo humano. As suas características tornam-no vital nas funções de locomoção, suporte,

regulação de homeostase mineral, proteção dos órgãos internos e reserva de cálcio (Einhorn, 1996; Cullinane, 2000; Marks e Odgren, 2002). Observa-se, portanto, uma relação forma-função na arquitetura do osso (Cullinane e Einhorn, 2002).

O osso é constituído por tecido ósseo, que por sua vez é composto por uma fase orgânica (que compreende cerca de 70% do tecido), uma fase inorgânica (compreende cerca de 25% do tecido) e água. A fase orgânica é composta por colagénio tipo-I, proteínas não-colagénicas e outras células. A componente inorgânica é composta, em cerca de 95%, por um mineral de fosfato de cálcio, análogo a cristais de cálcio de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) impregnada com impurezas (restantes 5%). Este cristal apresenta uma forma plana, com um comprimento entre 20 e 80 nm, o que o torna muito reactivo, uma vez que as suas impurezas podem substituir grupos químicos da hidroxiapatite (Einhorn, 1996; Marks e Odgren, 2002).

O tecido ósseo pode ser dividido em tecido primário (“woven”, ou tecido imaturo/não-lamelar) e tecido secundário (ou tecido maduro/lamelar) que resulta da remodelação do tecido primário. Ainda, o tecido primário contém cristais com um tamanho médio inferior ao do tecido lamelar e, conseqüentemente, está menos mineralizado. Assim, uma vez que na altura do nascimento todo o osso é constituído por osso não-lamelar e vai sendo substituído, ao longo dos anos, por osso lamelar, infere-se que os não-adultos e adultos irão ter estados de mineralização diferentes, pois possuem cristais com tamanhos diferentes. Não obstante, apesar de o esqueleto, eventualmente, atingir a maturidade esquelética, ou seja, o término da formação óssea, o osso continua a remodelar-se ao longo da vida. Assim, o tecido formado inicialmente (não-lamelar) é um aglomerado desorganizado de proteínas colagénicas e não-colagénicas que provocam a precipitação de minerais. Após a sua remodelação, o tecido ósseo (lamelar) apresenta-se organizado em camadas de minerais (Einhorn, 1996).

Em termos de arquitetura óssea, o tecido ósseo pode ser organizado em tecido trabecular (esponjoso) e tecido cortical (compacto). O tecido esponjoso apresenta apenas um quarto (1/4) da massa do tecido cortical, organizando-se numa grelha porosa tridimensional, orientada ao longo de linhas de estresse. Este tipo de tecido encontra-se maioritariamente nas extremidades dos ossos longos ou em ossos curtos e em alguns ossos irregulares e planos (Einhorn, 1996). Estes dois tipos de osso têm funções diferentes; nomeadamente, o osso esponjoso realiza sobretudo funções metabólicas,

enquanto o osso cortical realiza maioritariamente funções mecânicas e de proteção (Marks e Odgren, 2002).

1.1.1.1. Efeito da diagénese: recristalização e porosidade

Uma vez depositados no ambiente, os ossos sofrem processos *postmortem*, que resultam em alterações físicas e químicas – diagénese (Keenan e Engel, 2017). Nomeadamente, estes processos provocam a perda gradual da matéria orgânica (principalmente colagénio), o que aumenta a porosidade no osso. Por sua vez, este aumenta a área de contacto com a água no ambiente de deposição, o que promove a substituição de iões na molécula de apatite, ocorrendo recristalização. Vários autores reportaram um aumento no tamanho dos cristais (Tuross *et al.*, 1989; Schoeninger *et al.*, 1989; Trueman *et al.*, 2004) e aumento de cristalinidade (Schoeninger *et al.*, 1989; Hedges *et al.*, 1995; Nielsen-Marsh e Hedges, 2000).

O impacto da diagénese no osso, ou seja, no seu estado de preservação, tem sido medido através de vários métodos (Schoeninger *et al.*, 1989; Nielsen-Marsh e Hedges, 1999; Nielsen-Marsh e Hedges, 2000; Keenan *et al.*, 2015), entre os quais a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) (Stiner *et al.*, 2001; Stathopoulou *et al.*, 2008; Lebon *et al.*, 2010; King *et al.*, 2011). Para o efeito, vários índices quimiométricos têm sido utilizados, com particular destaque para o índice de cristalinidade (IC) (Weiner e Bar-Yosef, 1990).

Apesar de haver alterações na cristalinidade do osso através da diagénese, este não é o único evento em que ocorre este tipo de processo. Também quando submetido a elevadas temperaturas, a estrutura dos cristais no osso é alterada, como irá ser discutido mais à frente (Capítulo 1.1.2.1).

1.1.2. Ossos submetidos a elevadas temperaturas

Frequentemente, os restos humanos evidenciam sinais de terem sido expostos a elevadas temperaturas, cujas causas podem ser diversas, como cremações, queimas acidentais, tentativas de ocultar um crime, desastres, entre outras (Waterhouse, 2010; Cordner *et al.*, 2011; Alunni *et al.*, 2014; Becdelievre *et al.*, 2015).

Na Europa existem cremações humanas desde o Mesolítico (Arts, 1987 in Schurr *et al.*, 2015) até à atualidade, no entanto, o registo da cremação mais antiga é atribuído a um contexto australiano, no Lago Mungo, tendo sido proposta uma datação de 40.000 anos (Bowler *et al.*, 2003).

As cremações consistem na queima de um corpo e a sua intensidade está dependente de, entre outros, três princípios básicos mais importantes: temperatura, duração e (disponibilidade de) oxigénio. A cremação pode ter como resultado um processo completo, com oxidação total do esqueleto ou um processo parcial (McKinley, 2015; Schurr *et al.*, 2015).

O estudo destas práticas começou por ter um objetivo arqueológico (Webb e Snow, 1945 in Symes *et al.*, 2015), de modo a elucidar sobre o seu processo, com a finalidade de interpretar padrões culturais. Não obstante, foram esses estudos que contribuíram com os conteúdos básicos necessários para o estudo de ossos queimados em contexto forense (Symes *et al.*, 2015).

Tanto para a antropologia das populações do passado como para a antropologia forense, os ossos queimados impõem um grande problema. As elevadas temperaturas, não só provocam alterações físicas e químicas, macroscópicas e microscópicas no osso, mas também promovem elevados níveis de fragmentação, porque o tornam mais quebradiço (Waterhouse, 2013a; Waterhouse, 2013b; Waterhouse, 2013c).

1.1.2.1. Cristalinidade e porosidade: alterações provocadas pelo fogo na microestrutura

Quando submetidos a elevadas temperaturas, os ossos sofrem variadas alterações como mudança de cor, perda de volume, fraturas ou porosidade (Thompson, 2004). A mudança de cor, juntamente com o padrão de fraturas, constitui um grupo de alterações de segundo nível, caracterizado por alterações macroscópicas. Por outro lado, as alterações microscópicas são denominadas por alterações de primeiro nível (Thompson e Ulguim, 2016).

Uma das alterações que tem ganho protagonismo na última década, e que importa analisar neste estudo, remete para as alterações ao nível da componente inorgânica do osso, ou seja, o modo como o aumento da temperatura altera a parte mineral do osso.

A organização do osso, e mais especificamente, a sua parte inorgânica já foram descritas na *secção 1.1.1*. Deste modo, verifica-se que o osso fresco (ou seja, sem ter sofrido nenhuma alteração) apresenta uma estrutura mineral fracamente organizada e contendo cristais de pequeno tamanho. Por outro lado, quando o osso é recristalizado (por diagénese ou por exposição a elevada temperatura), essa estrutura mineral torna-se cada vez mais organizada e os cristais aumentam de tamanho (Thompson *et al.*, 2011).

Vários estudos reportam que não existem grandes alterações na parte mineral do osso até aos 500°C. Com um aumento de temperatura até aos 100°C, o osso perde água constituída por fracas ligações, seguido por uma segunda fase em que perde água fortemente ligada à estrutura mineral, até aos 250°C (Etok *et al.*, 2007). Segundo Person *et al.* (1996), as alterações nesta componente só começam com a perda da matéria orgânica do osso que expõe a parte mineral, pois funciona como uma proteção à matéria inorgânica. Esta perda prolonga-se até por volta dos 500°C, sendo que aos 600°C toda a matéria orgânica foi geralmente destruída, associada ao aumento do tamanho e espessura dos cristais (Etok *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2010). Também perto dos 500°C, a combustão da matéria orgânica está associada à formação de alguma quantidade de “carvão” (Etok *et al.*, 2007) característico da cor negra visível no osso a esta temperatura. A partir desta temperatura, também esse “carvão” é destruído e os cristais continuam a aumentar de tamanho até aos 800°C (Etok *et al.*, 2007). No entanto, outros autores afirmam que no intervalo dos 700°C-850°C é que existe um evidente crescimento dos cristais (Piga *et al.*, 2008) Ao atingir os 900°C a matriz óssea torna-se completamente cristalina com um aspeto amorfo e granular (Castillo *et al.*, 2013), como resultado da sinterização e fusão dos cristais (Ellingham *et al.*, 2015).

Em 2004, Thompson organizou estes vários eventos provocados pelo aumento da temperatura, redefinindo as amplitudes de temperatura das quatro etapas de degradação óssea térmico-induzida proposta por Mayne Correia (1997). Numa primeira fase ocorre Desidratação, que consiste na perda de água, entre os 100°C e os 600°C; seguido de Decomposição, perda da componente orgânica, entre os 300°C e os 800°C; numa terceira fase desenrola-se uma Inversão, onde ocorrem alterações na fase inorgânica, entre os 500°C e os 1100°C e por ultimo a Fusão, caracterizada pela coalescência dos cristais, que ocorre em temperaturas superiores aos 700°C (Thompson *et al.*, 2013).

O IC tem sido usado para avaliar as alterações de cristalinidade do osso. Este pode ser medido utilizando difração de raio-X, FTIR e espectroscopia de *Raman*, no entanto, estas metodologias produzem IC's diferentes que não são passíveis de ser diretamente comparados (Thompson *et al.*, 2013). Além disso, é necessário ter alguma cautela ao utilizar estas metodologias, uma vez que resultados obtidos para ossos arqueológicos (com alterações diagenéticas) podem mimetizar resultados obtidos para ossos submetidos a baixas temperaturas, não sendo a sua diferenciação fácil de fazer (Pijoan *et al.*, 2007; Piga *et al.*, 2016).

O estudo da cristalinidade óssea tem tido várias aplicações tanto para a área forense, como para a Bioarqueologia, uma vez que pode dar informações relativamente a práticas funerárias, nomeadamente ao contexto de deposição do osso (ou esqueleto) (Thompson, 2015).

A cristalinidade não é o único parâmetro da componente inorgânica do osso a sofrer alterações térmico-induzidas. Também a porosidade do osso apresenta variações em função da temperatura a que é sujeito. Um estudo realizado por Figueiredo *et al.* (2010) revelou que, em osso fresco humano, esta encontra-se em valores baixos (~9%), refletindo um osso compacto. Verifica-se que com um aumento de temperatura a 600°C, existe um aumento significativo de porosidade (porosidade ~47%), consistente com a perda de água e de matéria orgânica a que se assiste a esta temperatura. Aos 900°C observou-se uma diminuição de porosidade (porosidade ~38%) e aos 1200°C são atingidos valores semelhantes aos de osso fresco (porosidade ~11%). Esta diminuição em porosidade surge como consequência do aumento em tamanho dos cristais (Figueiredo *et al.*, 2010).

Estas variações na microestrutura do osso, nomeadamente nos cristais e porosidade, ao longo do aumento de temperatura, irão influenciar a quantidade e estrutura da componente mineral do osso (Figueiredo *et al.*, 2010). Assim, a densidade mineral óssea, também irá, possivelmente, variar quando esses dois fatores são alterados.

1.1.2.2. Medição da cristalinidade no osso

A aplicação da espectroscopia de infravermelho ao estudo da cristalinidade ocorreu na década de 1960 por Termine e Posner (Termine e Posner, 1966). No entanto,

o seu uso em ossos queimados só aconteceu mais recentemente (Stiner, 1995; Stiner, 2001; Munro *et al.*, 2007). Esta técnica tem a vantagem de poder analisar amostras nos três estados físicos, desde líquidos, gases, fibras, pós, entre outros (Stuart, 2004; Thompson, 2009).

Este método baseia-se no conhecimento de que as ligações moleculares, sob certas condições, sofrem vibração, rotação e torção. Assim, quando há absorção de luz proveniente de uma fonte de luz contínua da região do infravermelho, as ligações moleculares sofrem transições de vibração (Siebert e Hildebrandt, 2008).

A instrumentalização da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) consiste numa fonte que emite radiação, passando por um interferómetro e atravessa a amostra até ser detetada por um detetor (Stuart, 2004). O sinal é depois amplificado e convertido em formato digital para ser transferido para o computador (Stuart, 2004).

O FTIR aumentou a qualidade dos espectros e minimizou o tempo necessário para a recolha dos dados (Stuart, 2004). Esta pode ser dividida em duas metodologias para a análise de amostras sólidas: ATR (reflexão total atenuada) e KBr (brometo de potássio). Enquanto o primeiro analisa as alterações num feixe infravermelho internamente reflectido em contacto directo com a amostra, o KBr utiliza um meio de suporte de brometo de potássio para realizar as medições (Thompson, 2009).

A técnica do ATR baseia-se no fenómeno de reflexão interna total (Stuart, 2004). O feixe de radiação ao atingir o cristal sofrerá reflexão interna total quando o ângulo de incidência na interface (amostra/cristal) é superior ao ângulo crítico. O ângulo crítico surge da razão entre os índices refractivos de duas superfícies (Stuart, 2004; Thompson *et al.*, 2009; Mamede *et al.*, 2018). O feixe perde energia no comprimento de onda em que o material absorve radiação, em que essa radiação atenuada é medida e convertida numa função de comprimento de onda, resultando no espectro de absorção característico da amostra (Stuart, 2004). Esse espectro traduz a quantidade de luz absorvida, sendo expressa em unidades de absorvância (eixo YY), enquanto a transição vibracional é traduzida em comprimento de onda, cm^{-1} (eixo XX).

O FTIR-ATR é considerado mais vantajoso em relação ao KBr, pois a preparação da amostra é mais rápida, o seu impacto nos resultados é reduzido e há minimização na variação do espectro quando obtido por vários investigadores distintos

(Thompson *et al.*, 2009; Mamede *et al.*, 2018). Por seu lado, problemas de replicabilidade têm sido descritos na literatura para o modo KBr (Surovell e Stiner, 2001; Thompson *et al.*, 2013).

Esta metodologia já é amplamente utilizada em vários estudos para o cálculo do IC (Stathopoulou *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2018), permitindo, a avaliação da cristalinidade do osso, através da medição da organização dos cristais no osso a partir de bandas de fosfato (Thompson, 2015).

O IC é calculado através da equação:

$$IC = \left(\frac{A_{565} + A_{605}}{A_{595}} \right)$$

Em que o A corresponde à absorvância num comprimento de onda x (nm^{-1}). Os comprimentos de onda 565cm^{-1} e 605cm^{-1} correspondem a duas bandas de vibração de fosfato, $\nu_4 \text{PO}_4$ (Lebon *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2013).

As primeiras aplicações do índice de cristalinidade remetem para a área da arqueologia (Shemesh, 1990; Weiner e Bar-Yosef, 1990) na análise de sedimentos. O seu uso em ossos começou com o objectivo de avaliar o grau de alterações diagenéticas ocorridas (Weiner e Bar-Yosef, 1990; Stiner *et al.*, 1995), permitindo comentar sobre a qualidade do osso relativamente à preservação de evidências biomoleculares nessa amostra. Ainda assim, apesar de aceite por muitos (Person, 1996; Fredericks *et al.*, 2012), existem autores que consideram que a correlação entre a preservação e a cristalinidade do osso não é forte o suficiente para ser usada (Trueman *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2009; Lebon *et al.*, 2010).

A utilização do IC em ossos queimados tem sido estudada na distinção entre osso queimado e osso não queimado (e.g., Pijoan *et al.*, 2007), ossos queimados a diferentes temperaturas (e.g., Squires *et al.*, 2011), ossos queimados em diferentes condições (e.g., Lebon *et al.*, 2010), na estimativa da temperatura a que os ossos foram queimados (e.g., Ellingham *et al.*, 2015; Thompson, 2004; Thompson, 2005), entre outros. Ainda assim, apesar do amplo campo de investigação desta área, a maioria dos estudos apresentam amostras pequenas, dificultando a extrapolação dos seus resultados para estudo em contextos diferentes (Thompson *et al.*, 2011).

1.1.2.3. Alterações na dimensão

Uma outra alteração térmico-induzida importante corresponde à dimensão do osso, uma vez que vai influenciar as medições de densidade, pois estas são dependentes da área em análise. As alterações na dimensão podem-se revelar através de aumento ou diminuição do volume do osso (Thompson *et al.*, 2017). A temperaturas mais baixas, verificam-se pequenas alterações na dimensão da peça óssea. Por outro lado, com temperaturas superiores, a partir dos 700°C, estas alterações verificam-se numa maior escala (Thompson, 2005; Thompson *et al.*, 2017).

Este tipo de alteração provoca uma inviabilidade na utilização de métodos métricos “tradicionais” para a estimativa do sexo e idade à morte de indivíduos; tendo-se tentado criar outros mais específicos a ossos calcinados (Van Vark *et al.*, 1996; Wahl, 1996; Gonçalves, 2011; Gonçalves *et al.*, 2013).

Aparentemente, os métodos morfológicos para a estimativa destes parâmetros ainda são passíveis de se utilizar uma vez que a alteração da dimensão do osso não modifica os caracteres utilizados, apenas altera a sua dimensão, continuando a estarem presentes (Thompson, 2005).

1.1.3. Densidade Mineral Óssea

A medição da densidade mineral óssea foi introduzida em 1890 numa publicação sobre trabalhos dentários, utilizando técnicas radiográficas (Dennis, 1987 *in* Lewiecki e Binkley, 2017).

No entanto, só na década de 1960 é que se assistiu ao primeiro grande desenvolvimento desta metodologia, com a introdução da *Single-Photon Absorptiometry* (SPA) (Cameron e Sorenson, 1963). Esta técnica utiliza um feixe fotónico monocromático e de baixa energia (gerado por um radioisótopo) para medir a energia absorvida pelo osso. A energia medida é assumida como diretamente proporcional ao conteúdo mineral ósseo, permitindo quantificá-lo (Cameron e Sorenson, 1963; Cohn *et al.*, 1978). Enquanto considerada como um avanço relativamente à tecnologia anterior, a SPA tem em conta os efeitos dos tecidos moles que rodeiam o

osso (Cameron e Sorenson, 1963), no entanto, ainda está limitada ao esqueleto apendicular (e.g., rádio e calcâneo) (Cohn *et al.*, 1978; Lewiecki e Binkley, 2017).

O desenvolvimento seguinte na quantificação da densidade mineral óssea foi a introdução da técnica *Dual-Photon Absorptiometry* (DPA). A DPA difere da SPA por utilizar dois radioisótopos que emitem energia fotônica a níveis diferentes ou por utilizar apenas um radioisótopo, mas que emite energia fotônica a níveis diferentes. Com esta nova técnica, a quantificação da densidade mineral óssea já não estava limitada apenas ao esqueleto apendicular, sendo possível realizar medição no esqueleto axial. Ainda assim, a DPA apresentava limitações como a longa duração dos exames, baixa resolução de imagem, degradação da fonte de radiação e baixa precisão (Lewiecki e Binkley, 2017).

Apesar de largamente utilizado em investigação, o DPA foi sendo substituído pela *Dual X-ray Absorptiometry* (DXA). A DXA, ou densitometria bifotônica, utiliza dois feixes de energia de fótons com diferentes níveis de energia gerados por um tubo de raio-X (Bonnick, 1998), permitindo uma maior discriminação entre os tecidos moles e o osso (Miller, 2017), relativamente às técnicas que a precederam.

A sua implementação como “gold standard” deveu-se a vários fatores como elevada precisão e exatidão, baixa exposição a radiação, curta duração do exame que pode ser realizado em poucos minutos, baixo custo, fácil preparação/instalação do paciente (Blake e Fogelman, 2002; Blake e Fogelman, 2010; Schwarz *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2012; Lewiecki e Binkley, 2017; Miller, 2017). Assim, todas as vantagens inerentes a esta técnica tornaram-na na principal metodologia para o diagnóstico de osteoporose, avaliação do risco de fratura e acompanhamento da resposta a tratamentos (Blake e Fogelman, 2010). Não obstante, existem vários estudos que relatam os erros em exames utilizando DXA. (Blake e Fogelman, 2009; Carey e Delaney, 2017).

Atualmente, a DXA é a técnica de quantificação da densidade mineral óssea mais utilizada, tanto em clínica como em investigação (Lewiecki e Binkley, 2017). No entanto, apesar do seu grande uso, até ao momento ainda não foi aplicada a ossos queimados. Todas as vantagens mencionadas acima, como a rapidez e baixo custo são características ideais para explorar uma nova metodologia para estudar ossos nesta condição. Devido às alterações na microestrutura dos ossos queimados, nomeadamente na composição e organização da componente mineral, é de esperar que a densidade

mineral óssea também seja alterada. Ao utilizar a técnica de DXA em ossos queimados, poderemos obter novos dados sobre as alterações que ocorrem na sua microestrutura e, potencialmente, auxiliar em métodos de estimativa de perfil biológico.

1.1.3.1. Aplicação da DMO na estimativa do perfil biológico

Apesar da densidade mineral óssea ter uma maior aplicação em clínica, também já houve tentativas, mais recentes, de a aplicar a contextos forenses e arqueológicos. Estes estudos têm procurado correlacionar os valores da DMO com fatores reprodutivos, a prevalência de fraturas ou a estimativa do perfil biológico, nomeadamente com a ancestralidade, sexo e idade à morte (e.g., Castillo e Ruiz, 2011; Curate *et al.*, 2017; Navega *et al.*, 2018; Paschall e Ross, 2018).

A estimativa do perfil biológico do indivíduo é dificultada pelas alterações físicas provocadas nos ossos submetidos a temperaturas elevadas. A mudança na forma e a diminuição de volume são alguns dos fatores que irão influenciar o uso de métodos métricos para a estimativa do sexo e idade. Noutras situações, a fragmentação dos ossos, não permite de todo a aplicabilidade destes métodos. Apesar de já existirem estudos no sentido de dar resposta a estes problemas (e.g., Gonçalves *et al.*, 2013), estes ainda não são suficientes para chegar a uma estimativa precisa. Assim, o uso de densitometria em casos de ossos queimados poderá ser um método com potencial para contribuir com novas informações capazes de estimar um perfil biológico mais rigoroso.

O dimorfismo sexual é uma característica muito pronunciada em primatas, seja através das diferenças em tamanho corporal ou no desenvolvimento do canino (McPherson, 2013). No entanto, em humanos, essas diferenças são mais subtis, mas ainda assim o esqueleto apresenta diferenças suficientes para um diagnóstico acertado na maioria dos casos (White *et al.*, 2011), tendo sido desenvolvidos métodos morfológicos e métricos para o realizar (e.g., Buikstra e Ubelaker, 1994; Frutos, 2005; Dabbs e Moore-Jansen, 2010; Spradley e Jantz, 2011).

Relativamente à densidade mineral óssea entre sexos, verifica-se que em adultos, é superior em homens, na maioria dos locais, como na área total e no colo femoral (Henry e Eastell, 2000). Por outro lado, num estudo realizado em vários pares de gémeos jovens adultos, não se verificaram diferenças entre sexos no colo femoral, mas

o sexo masculino apresentou maior DMO na zona do rádio e o sexo feminino apresentou maior DMO na zona lombar da coluna vertebral (Kelly *et al.*, 1990). No entanto, é de referir que a análise destes dados deve ser feita com extrema cautela pois os exames utilizando densitometria bifotónica, estão dependentes da área em análise, sendo influenciados pelo tamanho do osso. Portanto, a generalização de que o sexo masculino apresenta maior DMO do que o sexo feminino, relaciona-se com o facto de que o primeiro, tendencialmente, apresenta um esqueleto maior e conseqüentemente uma área de osso maior (Parsons *et al.*, 1996; Seeman, 1998; Henry e Eastell, 2000).

A correlação entre a DMO e o sexo, com um objetivo de aplicação forense, foi estudada por Castillo e Ruiz (2011). Neste estudo foram encontradas diferenças entre sexos, em que os homens apresentaram valores de DMO superiores aos das mulheres, em todas as áreas analisadas pela DXA. Mais recentemente, Curate *et al.* (2017) propuseram modelos para a estimativa do sexo com base na área total da extremidade proximal do fémur, medida pela DXA, que apresentaram precisão.

Também as quantidades da componente mineral óssea variam com a idade e são traduzidas pela taxa de mineralização. Esta taxa é extremamente alta na vida *in utero* e no início da infância, moderadamente alta durante a infância, alta durante a adolescência e apenas moderada durante a vida adulta. Não obstante, a mineralização óssea e a absorção óssea surgem relacionadas, de modo a garantir que existe disponibilidade de minerais para cada estágio (Hillman, 1996).

Assim, estando a massa óssea dependente do tamanho do osso e da densidade do tecido mineralizado (Bonjour e Rizzoli, 1996), pode-se generalizar a sua evolução, dizendo que a quantidade óssea aumenta com o crescimento em ambos os sexos (Rodan *et al.*, 2002). Este valor atinge um pico na década dos 20 anos de idade do indivíduo e começa a decrescer no final da terceira década. Nas mulheres, verifica-se uma perda rápida de quantidade óssea nos primeiros cinco a dez anos após a menopausa, seguido de um decréscimo lento. Por outro lado, nos homens, após os 40 anos de idade, verifica-se também um decréscimo lento (Melton, 1995 *in* Rodan *et al.*, 2002; Rodan *et al.*, 2002; Wahner, 1996). Esta perda de massa óssea, ao longo da vida, é determinada pela relação entre a quantidade de osso reabsorvido e a quantidade de osso formado (Rodan *et al.*, 2002).

Castillo e Ruiz (2011) estudaram a relação entre a perda de massa óssea e a idade. Neste trabalho, os autores concluíram que existe perda de óssea com o aumento da idade, tendo esta atingido um pico máximo por volta dos 30-35 anos, e decrescendo a partir dos 40 anos de idade. Ainda, foram sugeridas duas regressões lineares (uma para cada sexo) para estimar a idade, tornando-se esta numa nova tentativa de determinar a idade através da medição da densidade.

Posteriormente, Curate *et al.* (2013a) tentaram determinar se esta técnica para estimativa da idade era transversal a outras populações, utilizando uma amostra de coleções portuguesas. Este estudo revelou, para a amostra em estudo, um erro absoluto superior a 10 anos, o que os autores não consideram como sendo aceitável em contextos forenses, uma vez que já existem outras técnicas de estimativa de idade à morte que apresentam o mesmo nível de erro (Meindl e Lovejoy, 1985; Brooks e Suchey, 1990; Lovejoy *et al.*, 1985) e que os métodos através de dentes apresentam um erro menor (Lamendin *et al.*, 1992; Solheim 1993; Cameriere, 2004).

Mais recentemente, Navega *et al.* (2018) utilizaram a densitometria para a aquisição de dados, com o objetivo de criar um método computacional estatístico para estimativa da idade à morte. Esta nova metodologia, apesar de algumas limitações na amostra, mostrou potencial na sua utilização e futura exploração. Bethard *et al.* (2019) testaram esta metodologia, encontrando uma baixa correlação entre a idade à morte predita e a idade à morte real, aconselhando cautela na sua utilização.

1.2. Objetivos

Com o presente trabalho pretendeu-se estudar a influência da queima na densidade mineral óssea. Pretendeu-se apurar o potencial para o desenvolvimento de um método a aplicar ao estudo de ossos queimados, de modo a verificar quais os contributos que pode dar para o estudo da densidade óssea, nomeadamente em casos de osteoporose nas áreas da paleopatologia em cremações.

Para além de se estudar a densidade e conteúdo minerais ósseos antes e depois da queima, pretendeu-se também averiguar qual a potencial assimetria bilateral em

restos humanos e quais as suas implicações ao nível da aplicação do método. Além disso, também se pretendeu investigar a influência da aplicação do consolidante no osso na recolha de dados de densitometria. Ainda, pretendeu-se estudar possíveis alterações na cristalinidade, recorrendo ao cálculo do índice de cristalinidade a partir da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

As alterações serão analisadas em três ossos (fémur, patela e primeiro metatársico), de modo a perceber eventuais diferenças inter-osso na sua manifestação.

Por último, a partir dos dados obtidos, tentou-se perceber quais as implicações que estas alterações acarretam para uma possível estimativa da idade à morte e do sexo a partir da densidade mineral óssea.

2. Material e métodos

2.1. Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI

A Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI (CEI/XXI) resulta de um protocolo realizado entre o então Departamento de Antropologia, atualmente integrado no Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, com a Câmara Municipal de Santarém (Ferreira *et al.*, 2014). Esta coleção é originária do cemitério do Capuchos, localizado em Santarém e é atualmente constituída por 302 indivíduos identificados. Estes indivíduos são acompanhados de registos de inumação, exumação, nome, idade à morte, sexo e nacionalidade. No entanto, devido à proteção de dados pessoais, o nome do indivíduo apenas consta numa base de dados de acesso restrito e é-lhe atribuído um número em série, com o qual é identificado (Ferreira *et al.*, 2014).

Os indivíduos desta coleção apresentam idades à morte que variam dos 25 aos 101 anos e é composta por 162 esqueletos do sexo feminino e 140 esqueletos do sexo masculino. Até ao momento, ainda não existe nenhum indivíduo não-adulto nesta coleção (Tabela 1).

Ferreira *et al.* (2014) referiram que a Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI apresenta um bom estado de preservação e de representação óssea, justificando a ausência de alguns ossos pela falha em recuperar ossos mais pequenos durante a exumação.

Englobada nesta coleção, encontram-se alguns esqueletos experimentalmente queimados que permitem investigações inéditas em restos humanos alterados por elevadas temperaturas, recriando assim parcialmente o tipo de restos encontrados em cenários de fogo. Com este propósito, até agora, já foram queimados 42 esqueletos, de ambos os sexos e a várias temperaturas. Os indivíduos desta sub-coleção apresentam um intervalo de idade à morte desde os 62 até aos 90 anos. Dos 25 esqueletos do sexo feminino, o esqueleto com menor idade à morte apresenta 62 anos e o esqueleto com

maior idade à morte apresenta 90 anos. Dos 17 esqueletos do sexo masculino, o esqueleto com menor idade à morte apresenta 68 anos e o esqueleto com maior idade à morte apresenta 88 anos.

Tabela 1:

Número de esqueletos presentes na coleção, por sexo e intervalo de idade.

	[20-30[[30-40[[40-50[[50-60[[60-70[[70-80[[80-90[[90-100[[100-101[
	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q
Feminino	1	0	2	0	3	0	4	0	14	1	27	5	69	17	37	1	2	0
Masculino	3	0	5	0	5	0	6	0	26	1	38	8	43	8	13	0	0	0
Totais	4		7		8		10		40		65		112		50		2	
Total																		300

T = total; Q = queimado

Nota: existe um esqueleto do sexo feminino (CEI/XXI_163) e outro do sexo masculino (CEI/XXI_121) com idade desconhecida.

2.1.1. Escolha da amostra

Para a realização deste estudo foram selecionados, de ambas as lateralidades, os fêmures, patelas e primeiros metatársicos de 12 indivíduos (6 masculinos e 6 femininos) previamente submetidos a queima de metade do esqueleto da Coleção de Esqueletos Identificados do Século XXI. Foram ainda escolhidos outros 10 indivíduos (5 masculinos e 5 femininos) da mesma coleção para realizar o processo de queima (Tabela 2).

Estes ossos foram escolhidos com base em dois critérios: 1) o seu potencial para a avaliação da DMO e 2) a sua preservação em contextos arqueológicos e forenses envolvendo ossos queimados. Esta última tende a ser melhor em ossos pequenos (Gonçalves, 2012; McKinley, 2015) como é o caso da patela e metatársicos. No entanto, estudos de DMO raramente incidem sobre estes dois elementos. No caso do fémur, apesar da sua preservação não estar entre as mais elevadas, ele constitui o osso mais estudado ao nível da DMO.

No entanto, é de referir que os esqueletos disponíveis para estudo apresentam idade avançada, o que acarreta alguns problemas ao nível da sua análise uma vez que existe elevada probabilidade de apresentarem uma diminuição da densidade mineral óssea e a maioria dos ossos possuir osteófitos. Além disso, a amostra é pouco representativa ao nível da distribuição etária estando sub-representada por indivíduos de idades jovens e médias. No entanto, este problema não era contornável tendo em conta que essas idades estão elas próprias sub-representadas na CEI/XXI.

As análises de FTIR foram realizadas apenas na amostra de esqueletos para queimar, uma vez que se trata de uma análise pré- e pós-queima.

Tabela 2:

Amostra de esqueletos selecionada para estudo.

	Esqueletos previamente queimados				Esqueletos queimados neste estudo			
	Feminino	Idade à morte	Masculino	Idade à morte	Feminino	Idade à morte	Masculino	Idade à morte
Nº dos esqueletos	CEI/XXI 5	73	CEI/XXI 15	88	CEI/XXI 13	68	CEI/XXI 11	61
	CEI/XXI 85	89	CEI/XXI 29	74	CEI/XXI 75	86	CEI/XXI 63	64
	CEI/XXI 97	88	CEI/XXI 35	75	CEI/XXI 105	89	CEI/XXI 249	85
	CEI/XXI 102	69	CEI/XXI 77	68	CEI/XXI 167	82	CEI/XXI 274	93
	CEI/XXI 161	82	CEI/XXI 86	78	CEI/XXI 269	78	CEI/XXI 276	90
	CEI/XXI 166	81	CEI/XXI 160	87				

2.2. Métodos

Da amostra escolhida, tal como mencionado acima, parte já se encontrava queimada, enquanto outra foi submetida ao processo de queima. Após esta etapa, os ossos selecionados (fémur, patela e primeiro metatársico) foram analisados através de densitometria, de modo a obter os valores de área, DMO e CMO, para se realizarem comparações nas suas alterações no mesmo osso antes e depois da queima e entre antímeros.

Os resultados obtidos pela densitometria foram analisados estatisticamente. Diferenças relativas entre os dois antímeros do mesmo indivíduo foram calculadas de modo a explorar a assimetria bilateral caso a caso. Esta foi também explorada a partir de testes estatísticos de forma a apurar eventuais diferenças estatísticas entre as duas amostras. A mesma abordagem foi utilizada para investigar diferenças pré- e pós-consolidação e diferenças pré- e pós-queima nos ossos em estudo. A análise estatística foi realizada através do programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 23 (SPSSInc, Chicago IL). Utilizou-se o teste de Wilcoxon, de modo a medir diferenças entre os dois grupos em análise e teste de Spearman para avaliar possíveis correlações entre os vários indicadores que serão descritos de seguida.

2.2.1. Queima

Antes de se proceder ao processo de queima, os esqueletos escolhidos foram exaustivamente analisados. Inicialmente, os esqueletos candidatos foram estudados de modo a verificar a sua possibilidade para queima, evitando aqueles que apresentam patologias, próteses ou características de interesse para outros estudos. Foram ainda excluídos todos aqueles cuja utilização está interdita pelas regras do Laboratório de Antropologia Forense. Após a seleção dos esqueletos, foi realizado um inventário, indicando quais as peças ósseas presentes/ausentes e o seu estado de preservação. Posteriormente foram realizadas medições e pesagens de todos os ossos. Por último, foi realizado um registo fotográfico e retiradas as amostras para FTIR (o procedimento apresenta-se infra).

As queimas foram realizadas num forno elétrico Barracha K-3 trifásico 14A, a temperaturas de interesse (Figura 1). As temperaturas máximas escolhidas foram 600°C, 700°C, 800°C, 900°C e 1000°C, pois correspondem a etapas com diferentes alterações na microestrutura. A progressão do incremento de temperatura do forno foi registada através de filmagem. De notar que apenas metade do esqueleto, ou seja, apenas uma lateralidade, a direita, foi queimada.

Após a queima, foi repetido todo o estudo realizado previamente à queima, de modo a ficarem registadas todas as alterações que possam ter ocorrido, permitindo a disponibilidade de dados para estudos futuros.

Como último passo, as peças ósseas foram tratadas com consolidante, *Primal SF-016 AC-33*, de modo a minimizar problemas futuros de conservação.



Figura 1. Disposição dos ossos no forno elétrico Barracha K-3 trifásico 14A.

2.2.2. Osteodensitometria

Para a análise da amostra, foram realizados exames de densitometria bifotónica (DXA), através de um osteodensitómetro Hologic QDR4500 elite, no Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (Figura 2), seguindo as recomendações protocoladas para o seu uso. Em cada dia que o aparelho foi utilizado, realizou-se uma calibração antes de se proceder aos exames com um *fântomas* de modo a garantir o controlo da qualidade da análise do aparelho, uma vez que possui uma densidade conhecida pela Hologic (Curate, 2011). Após a calibração, o osso em análise foi colocado em posição anatómica

numa caixa de arroz. A caixa de arroz foi utilizada porque imita a densidade dos tecidos moles, tal como reportado noutros trabalhos (e.g., Curate, 2011).



Figura 2. Osteodensitómetro Hologic QDR4500 elite do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra.

Para a obtenção dos resultados do fémur foram utilizados os programas *Left Hip* e *Right Hip*, respetivamente, caso se tratasse do fémur esquerdo ou direito. Tanto para as patelas como para os primeiros metatársicos, foi utilizado o programa *Lumbar Spine* porque não existe um programa específico para estes dois ossos. Uma vez que todos os programas correspondem a zonas do corpo, como anca ou coluna vertebral, coincidindo com as áreas de interesse para a densitometria clínica, foi necessário adaptá-los às análises pretendidas. Assim, as patelas e primeiros metatársicos foram posicionados sequencialmente, na vertical, de modo a “imitar” a posição de vértebras numa coluna vertebral. Como este programa avalia cada vértebra individualmente, nesta situação também avalia cada peça óssea (patela ou primeiro metatársico) individualmente.

Através dos exames aos fémures, foram obtidos os valores de área em cm^2 , conteúdo mineral ósseo (CMO) em gramas e densidade mineral óssea (DMO) em g/cm^2 nas regiões de interesse (ROI) área total (“Total”), colo femoral (“Neck”), trocânter (“Troch”), região intertrocantérica (“Inter”) e área de Ward (“Ward”) (cf. Apêndice 1). Por outro lado, os exames realizados através do *Lumbar Spine*, indicam os valores de

densidade mineral óssea (DMO) e conteúdo mineral ósseo (CMO) para a área total da peça óssea (Figura 3).

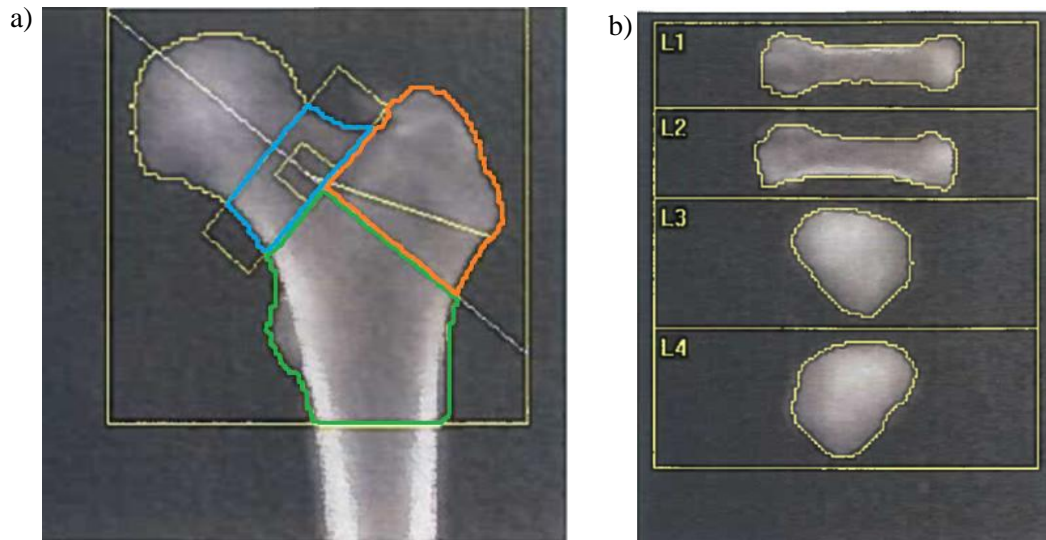


Figura 3. Exemplo da análise realizada pelo densitômetro, com foco nas áreas em estudo. a) Fêmur com a ROI colo femoral a azul, a ROI trocânter a laranja, ROI intertrocânterica a verde e ROI área total como a soma das zonas anteriores. b) Metatársicos e patelas ilustrando a área total.

A DXA fornece informações sobre o T-score e o Z-score. O T-score é calculado pela diferença entre a DMO mensurada (DMO) e a DMO em jovens adultos saudáveis (com sexo e ancestralidade correspondente) (DMOr) em relação ao desvio padrão da população de jovens adultos (Blake e Fogelman, 2009). O Z-score mede a distância entre o valor de DMO mensurado (DMO) e o valor médio de uma população normal apropriada (DMOam). Este valor é medido em unidades de desvio padrão (Wahner, 1996). No entanto, o Z-score apenas é calculado para indivíduos com idade inferior a 85 anos, uma vez que esta é a idade máxima da população apropriada com que as aquisições são comparadas por este osteodensitômetro. Estes scores são calculados do seguinte modo:

$$T - score = \left(\frac{DMO - DMOr}{dp} \right) \quad Z - score = \left(\frac{DMO - DMOam}{dp} \right)$$

Nota: DMO - densidade mineral óssea; DMOr - densidade mineral óssea de referência; DMOam - densidade mineral óssea de uma amostra semelhante; dp - desvio padrão.

A OMS (Organização Mundial da Saúde) criou classificações para osteopenia e osteoporose, através dos valores de T-score (Tabela 3), para mulheres após a menopausa caucasianas (WHO, 1994). A osteoporose é definida como uma patologia do esqueleto caracterizada por baixa massa óssea com deterioração da microarquitetura do osso provocando um aumento da sua fragilidade e risco de fratura (Consensus development conference, 1993), estando estabelecida a DXA como o melhor método para o seu diagnóstico (WHO, 1994). Assim, a osteoporose pode ser categorizada como (WHO, 1994; Kanis e Glüer, 2000; Blake e Folgeman, 2010; Curate, 2011):

Tabela 3:

Classificações para Osteopenia e Osteoporose, de acordo com a OMS

Terminologia	T-score
Normal	$T \geq 1,0$
Osteopenia	$-2,5 < T < -1,0$
Osteoporose	$T \leq -2,5$
Osteoporose severa	$T \leq -2,5$ com presença de pelo menos uma fratura de fragilidade

Esta classificação é obtida automaticamente pela DXA, com base no resultado de menor T-score para região total ou colo femoral (Lewiecki *et al.*, 2008), juntamente com os resultados para os parâmetros de área, DMO e CMO (Figura 4).

DXA Results Summary:

Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ²)	T - score	PR (%)	Z - score	AM (%)
Neck	4.30	2.49	0.580	-2.4	68	-0.7	88
Troch	8.87	4.91	0.553	-1.5	79	-0.3	96
Inter	16.99	14.02	0.825	-1.8	75	-0.6	89
Total	30.16	21.42	0.710	-1.9	75	-0.5	92
Ward's	1.09	0.46	0.418	-2.7	57	-0.3	93

Total BMD CV 1.0%, ACF = 1.021, BCF = 0.976, TH = 1.751
 WHO Classification: Osteopenia
 Fracture Risk: Increased

Figura 4. Exemplo dos resultados obtidos por DXA, para as várias regiões e parâmetros, juntamente com a classificação para osteoporose da OMS.

Para o estudo da assimetria bilateral foi também utilizado todo o procedimento acima descrito, no entanto é preciso ter em atenção que esta é uma questão importante maioritariamente para estudos clínicos, uma vez que pode ter implicações para um diagnóstico de osteoporose. Ou seja, caso se verifique assimetria bilateral relevante, ao examinar apenas um dos dois fêmures, podem surgir duas problemáticas: 1) ao fémur examinado é diagnosticado osteoporose e são recomendados tratamentos que podem ser desnecessários; ou 2) ao fémur examinado não é diagnosticado osteoporose e não são recomendados tratamentos que podem ser precisos. O curso de ação pode ter de ser revisto caso uma diferença importante entre os dois antímeros seja encontrada. Por outro lado, em estudos antropológicos, como o trabalho de Curate *et al.* (2013b), esta pode não ser uma questão tão relevante, uma vez que não tem implicações diretas na saúde do indivíduo a ser examinado. No entanto, noutros estudos, é uma questão a ter em atenção, uma vez que pode vir a influenciar um possível diagnóstico de perfil biológico. Neste caso em particular, o estudo da assimetria bilateral vem dar possíveis informações sobre o comportamento da temperatura na densidade mineral óssea em comparação com o seu antímero, ou seja, se produz maior assimetria ou se reduz, ou chega mesmo a anular, essa assimetria bilateral óssea.

A influência do posicionamento do osso para análise pode ser medida através do cálculo do erro intra-observador, uma vez que todas as medições neste estudo foram realizadas pelo mesmo operador. O erro intra-observador consiste no cálculo estatístico das diferenças obtidas na medição do mesmo objeto, em pelo menos dois momentos diferentes. Por outro lado, o erro inter-observador consiste nas diferenças obtidas na medição de objeto por dois operadores diferentes. Em Curate (2011), onde foi utilizado o mesmo instrumento de DXA, de modo a avaliar o erro intra-observador, foi calculado o erro técnico de medição (ETM), para as variáveis DMOColo e DMOTotal. Sendo uma estimativa de precisão absoluta (Ulijaszek e Kerr, 1999; Ward e Jamison, 1991), é calculado do seguinte modo:

$$ETM = \sqrt{(\sum D^2)/2N}$$

Em que D corresponde à diferença entre as medições e N corresponde ao tamanho da amostra. Curate (2011) também calculou o erro técnico de medição relativo (ETMr),

que se obtém através da divisão do valor de ETM pelo valor médio da variável avaliada, multiplicando por 100 (Ulijaszek e Kerr, 1999; Ward e Jamison, 1991).

2.2.3. FTIR-ATR

Para a análise da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), procedeu-se à amostragem dos ossos escolhidos, consistindo numa pequena porção de pó de osso obtida com recurso a um bisturi e armazenado num tubo de *eppendorf*. As amostras do fémur foram retiradas abaixo do pequeno trocânter, as da patela no plano superior e as do primeiro metatársico no plano infero-lateral da diáfise (Figura 5). As amostragens foram realizadas de modo a serem localizadas o mais próximo possível da zona a ser analisada pela densitometria, mas sem interferir com a área a ser analisada.

O programa OPUS *Spectroscopy Software Version 6* foi utilizado para aquisição dos espectros obtidos num espectrómetro Bruker Optics Vertex 70. A amostra foi analisada sobre um diamante acessório Platinum ATR, com um alcance de 400-4000 cm^{-1} . O espectro foi obtido com uma resolução de 2 cm^{-1} e consistiu numa soma de 128 scans. O background foi subtraído e o espectro normalizado utilizando o programa *OriginPro*.

A aquisição dos dados sobre o IC irá permitir averiguar se existe uma correlação entre as alterações na cristalinidade detetadas pelo FTIR e as alterações detetadas pela densitometria.



Figura 5 – Exemplo das zonas de amostragem para os três ossos: a) fêmur, b) patela e c) primeiro metatársico.

More than meets the eye

3. Resultados

De modo a melhorar o tratamento de dados, foram procurados e removidos os *outliers*. Devido aos vários parâmetros avaliados, esta secção foi subdividida na análise da assimetria bilateral, da influência do consolidante, das diferenças pré- e pós-queima, de correlações e, por último, da influência da queima da classificação da OMS.

3.1. Assimetria bilateral

A assimetria bilateral nos ossos em análise (fémur, patela e primeiro metatársico) foi estudada, através do teste não paramétrico para amostras emparelhadas - Wilcoxon. Assim, testaram-se as diferenças entre o lado esquerdo e o lado direito. Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Segundo o Teste de Wilcoxon, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as duas lateralidades para todos os parâmetros analisados. Foram também calculadas as diferenças relativas entre antímeros para cada parâmetro, em cada indivíduo (cf. Apêndice 2).

Todavia, o cálculo das diferenças relativas para cada indivíduo sugeriu que existem claras diferenças entre os antímeros.

A diferença relativa máxima para a assimetria bilateral verificou-se na zona “Ward” da DMO no fémur do indivíduo 13, de sexo feminino (21,87%).

Na área do fémur, a zona “Neck”, “Total” e “Ward” apresentaram em quase todos os casos diferenças inferiores a 5%, sendo as suas maiores diferenças de 8,15% para o indivíduo 249 (sexo masculino), de -8,88% também para o indivíduo 249 de 11,00% para o indivíduo 269 (sexo feminino), respectivamente.

Por outro lado, tanto na DMO como no CMO do fêmur, cerca de metade dos indicadores apresentaram diferenças superiores a 5%, nalguns casos ultrapassando os 20%.

No geral, os indivíduos 63 e 274 (ambos de sexo masculino) apresentaram as menores diferenças relativas. Inclusive, muitos das diferenças relativas máximas para alguns dos parâmetros são inferiores a 5%.

Para além das diferenças relativas também foram calculados os coeficientes de variação (Tabela 4). Ao analisar este parâmetro, verificou-se que existe uma baixa variação nos indicadores “Neck” e “Ward” da área do fêmur, para ambos os antímeros. Os maiores coeficientes de variação encontraram-se na zona “Ward” da DMO do fêmur, para o lado esquerdo e na zona “Total” do CMO do fêmur, para o lado direito.

A influência do posicionamento do osso para análise foi avaliada através do ETM e do ETMr, procedimento reportado noutra estudo (Curate, 2010). Utilizando os dados cedidos pelo autor (Curate, 2010), foram calculadas as médias das diferenças relativas entre as medições, para as mesmas duas zonas “Neck” e “Total”, de modo a comparar com as diferenças relativas obtidas neste estudo entre antímeros (Tabela 5).

As diferenças encontradas entre antímeros devido ao posicionamento do elemento ósseo durante a análise apresentaram percentagens baixas (Tabela 5).

Tabela 4:

Estatística descritiva e teste das diferenças entre antúmeros não queimados, segundo o teste de Wilcoxon.

Osso	Característica	Zona	Esquerdo						Direito						Wilcoxon	
			n	Média	Desvio padrão	Mediana	Amplitude	Coefficiente de variação	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Amplitude	Coefficiente de variação	Z	Sig.
Fémur	Área	Neck	10	4,99	0,36	4,93	1,07	7,21%	10	5,10	0,43	5,26	1,25	8,43%	44	0,092
		Troch	10	11,90	1,68	12,09	5,36	14,12%	10	11,60	1,55	11,74	4,94	13,36%	18	0,333
		Inter	10	20,23	3,33	19,52	11,45	16,46%	10	20,26	3,06	20,02	8,84	15,10%	28	0,959
		Total	10	37,12	4,73	37,42	15,43	12,74%	10	36,96	4,51	36,81	12,21	12,20%	24	0,721
		Ward	10	1,08	0,04	1,08	0,15	3,70%	10	1,09	0,04	1,10	0,13	3,67%	25	0,767
	DMO	Neck	10	0,64	0,17	0,58	0,41	26,56%	10	0,63	0,17	0,57	0,42	26,98%	23	0,646
		Troch	10	0,57	0,15	0,53	0,44	26,32%	10	0,57	0,16	0,51	0,48	28,07%	13	0,260
		Inter	10	0,92	0,21	0,87	0,58	22,83%	10	0,90	0,21	0,83	0,60	23,33%	17	0,285
		Total	10	0,77	0,18	0,70	0,51	23,38%	10	0,76	0,19	0,68	0,46	25,00%	18	0,333
		Ward	10	0,41	0,14	0,35	0,36	34,15%	10	0,41	0,13	0,39	0,39	31,71%	29	0,878
	CMO	Neck	10	3,19	0,91	2,73	2,16	28,53%	10	3,22	0,89	2,69	2,21	27,64%	29	0,878
		Troch	10	6,89	2,32	5,91	7,23	33,67%	9	6,16	1,94	5,21	4,94	31,49%	14	0,314
		Inter	10	18,85	6,35	15,11	16,94	33,69%	10	18,34	5,88	15,20	15,34	32,06%	15	0,203
		Total	10	28,93	9,29	22,90	22,76	32,11%	10	28,30	9,19	22,83	23,42	32,47%	12	0,114
		Ward	10	0,44	0,15	0,37	0,37	34,09%	10	0,44	0,14	0,43	0,36	31,82%	22	0,574
Patela	Área		10	12,30	1,77	12,27	5,38	14,39%	9	12,32	1,65	11,89	4,73	13,39%	12	0,214
	DMO		10	0,48	0,08	0,47	0,29	16,67%	9	0,51	0,06	0,50	0,198	11,76%	29	0,441
	CMO		10	5,96	1,47	5,54	4,82	24,66%	9	5,57	0,99	5,55	3,11	17,77%	17	0,514
MT1	Área		10	10,49	1,24	10,60	3,43	11,82%	10	10,40	1,30	10,90	3,31	12,50%	25	0,799
	DMO		10	0,35	0,06	0,37	0,17	17,14%	9	0,33	0,05	0,34	0,15	15,15%	11,5	0,192
	CMO		10	3,68	0,77	3,67	2,52	20,92%	9	3,36	0,69	3,60	2,01	20,54%	13	0,260

Tabela 5:

Erros de medida e diferenças relativas para as zonas “Neck” e “Total” da DMO (n=50).

Zona	ETM	ETMr (%)	Diferenças relativas (%)
DMOcolo	0,021	2,72	1,09
DMOtotal	0,004	0,42	0,26

3.2. Diferenças pré- e pós-consolidante

A aplicação do consolidante é uma etapa comum no procedimento a realizar quando são experimentalmente queimados novos esqueletos. Tem como principal propósito minimizar a fragilidade dos ossos queimados quando são manuseados. Assim, foi imperativo avaliar a sua influência nas medições do densitômetro, de modo a verificar se a amostra de esqueletos queimados para esta investigação poderia ser aumentada pelos esqueletos da coleção previamente queimados no âmbito de outras investigações. Tal seria apenas possível se a assimetria bilateral fosse reduzida e a diferença entre pré- e pós-consolidação fossem reduzidas.

Os resultados obtidos a partir da utilização do teste de Wilcoxon (Tabela 6), para a área do fêmur, indicaram que a zona “Inter” pós-consolidante foi significativamente maior que a pré-consolidante ($Z=50$, $p=0,022$), tal como a zona “Total” pós-consolidante foi significativamente maior que a pré-consolidante ($Z= 44$, $p=0,011$). Relativamente à DMO no fêmur, também as zonas “Inter” e “Total” pós-consolidante foram significativamente mais elevadas aos valores pré-consolidante ($Z= 49,5$, $p =0,025$; em ambas). Para a CMO no fêmur, o teste de Wilcoxon indicou que a zona “Inter” pós-consolidante foi significativamente maior à pré-consolidante ($Z=55$, $p =0,005$) e a zona “Total” pós-consolidante foi significativamente maior à pré-consolidante ($Z=28$, $p =0,018$).

Relativamente à patela, o teste de Wilcoxon indicou que a área pós-consolidante foi significativamente maior que a área pré-consolidante ($Z=5$, $p =0,038$), e a “DMO”

pós- consolidante também foi significativamente maior que a pré-consolidante ($Z=36$, $p=0,012$).

Para o primeiro metatársico, apenas a área pós-consolidante foi significativamente maior que a pré-consolidante ($Z=0$, $p=0,005$).

Para a interpretação da influência do consolidante também foram analisadas as diferenças relativas para cada indicador, em cada indivíduo (cf. Apêndice 3).

Tal como seria de esperar, tendo em conta os resultados anteriores, a maioria das diferenças (superiores a 5%) encontraram-se nas zonas “Inter” e “Total” da área, DMO e CMO do fémur. Apesar de também se observarem grandes diferenças noutras zonas, estas foram pontuais.

Também para a patela, quando existem diferenças relativas superiores a 5%, estas apareceram, maioritariamente, na área e na DMO. Enquanto para o primeiro metatársico, as diferenças relativas máximas aparentaram estar dispersas pelos vários parâmetros.

Para além das diferenças relativas também foi calculado o coeficiente de variação para os dados pré- e pós-consolidante (Tabela 6). Para este parâmetro verificou-se que existiu menor variação para os indicadores “Neck” e “Ward” na área do fémur (7,28% e 5,50%, respectivamente, para antes do consolidante e 8,50% e 5,50%, respectivamente, para depois da aplicação consolidante).

Tabela 6:

Estatística descritiva e teste das diferenças antes e após a aplicação do consolidante no mesmo osso, segundo o teste de Wilcoxon.

Osso	Característica	Zona	Antes do consolidante					Depois do consolidante					Wilcoxon			
			n	Média	Desvio padrão	Mediana	Amplitude	Coefficiente de variação	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Amplitude	Coefficiente de variação	Z	Sig.
Fémur	Área	Neck	10	4,67	0,34	4,78	1,01	7,28%	10	4,59	0,39	4,65	1,35	8,50%	17,5	0,553
		Troch	10	9,91	1,64	9,47	5,37	16,55%	10	9,97	1,45	9,94	4,67	14,54%	32	0,646
		Inter	10	17,08	2,46	16,22	7,81	14,40%	10	18,87	3,45	17,51	9,89	18,28%	50	0,022
		Total	10	31,66	3,86	30,76	12,90	12,19%	10	33,42	4,68	32,07	14,05	14,00%	51	0,017
		Ward	10	1,09	0,06	1,07	0,25	5,50%	10	1,09	0,06	1,07	0,20	5,50%	8,5	0,674
	DMO	Neck	10	0,72	0,20	0,69	0,68	27,78%	9	0,76	0,18	0,74	0,52	23,68%	25	0,767
		Troch	10	0,65	0,17	0,63	0,57	26,15%	9	0,62	0,14	0,60	0,37	22,58%	36	0,110
		Inter	10	0,99	0,22	0,96	0,68	22,22%	10	1,02	0,23	1,01	0,70	22,55%	49,5	0,025
		Total	10	0,84	0,19	0,81	0,58	22,62%	10	0,87	0,20	0,84	0,62	22,99%	49,5	0,025
		Ward	10	0,50	0,13	0,50	0,34	26,00%	10	0,50	0,15	0,52	0,45	30,00%	35,5	0,415
	CMO	Neck	10	3,38	0,99	2,98	3,11	29,29%	9	3,52	0,98	2,90	2,46	27,84%	21	0,859
		Troch	10	6,55	2,63	5,09	7,57	40,15%	9	6,04	1,86	5,14	5,12	30,79%	30	0,374
		Inter	10	16,95	4,62	14,03	11,66	27,26%	10	19,31	6,10	16,81	15,90	31,59%	55	0,005
		Total	10	26,87	8,03	21,91	20,98	29,88%	8	25,59	6,23	22,13	14,75	24,35%	28	0,018
		Ward	10	0,54	1,14	0,56	0,37	211,11%	9	0,57	0,12	0,63	0,32	21,05%	21	0,235
Patela	Área	10	11,07	2,15	10,72	7,67	19,42%	9	10,83	1,96	10,54	5,02	18,10%	5	0,038	
	DMO	10	0,55	0,14	0,53	0,53	25,45%	8	0,58	0,08	0,58	0,20	13,79%	36	0,012	
	CMO	10	5,95	1,46	5,70	4,79	24,54%	10	5,93	1,44	5,66	4,63	24,28%	25	0,799	
MTI	Área	10	9,50	1,35	9,11	4,55	14,21%	10	8,95	1,35	8,90	4,60	15,08%	0	0,005	
	DMO	10	0,40	0,10	0,39	0,31	25,00%	9	0,38	0,07	0,39	0,26	18,42%	26	0,678	
	CMO	10	3,75	0,93	3,60	3,10	24,80%	10	3,60	0,93	3,61	3,53	25,83%	17	0,284	

3.3. Diferenças pré- e pós-queima

A influência da temperatura foi analisada através da comparação dos dados “pré-queima” e “pós-queima”. Os resultados da aplicação do teste de Wilcoxon encontram-se na Tabela 7.

Para a área do fêmur, todas as zonas, com exceção da zona “Ward”, apresentaram diferenças significativas. A zona “Neck” antes da queima foi significativamente superior à zona depois da queima ($Z=0$, $p=0,005$), tal como a zona “Troch” ($Z=1$, $p=0,007$), a zona “Inter” ($Z=4$, $p=0,017$) e a zona “Total” ($Z=0$, $p=0,005$).

Relativamente à DMO no fêmur, encontraram-se diferenças significativas em todas as zonas. A zona “Neck” antes da queima foi significativamente superior à zona depois da queima ($Z=51$, $p=0,017$), tal como a zona “Troch” ($Z=55$, $p=0,005$), a zona “Inter” ($Z=50$, $p=0,022$), a zona “Total” ($Z=51$, $p=0,017$) e a zona “Ward” ($Z=55$, $p=0,005$).

Ainda, no CMO no fêmur, encontraram-se diferenças significativas apenas na zona “Ward”, em que esta zona antes da queima foi significativamente superior à zona depois da queima ($Z=52$, $p=0,012$).

Para a patela apenas a área antes da queima foi significativamente superior à área depois da queima ($Z=5$, $p=0,038$). Enquanto no primeiro metatársico, tanto a área como a DMO apresentaram diferenças significativas. A área antes da queima foi significativamente superior à área depois da queima ($Z=5$, $p=0,022$), tal como a DMO ($Z=51$, $p=0,028$).

Foi também realizado o cálculo das diferenças relativas para cada indicador, por indivíduo (cf. Apêndice 4) e ordenado em função da temperatura máxima (Tabela 8). Os indicadores referentes à área do fêmur, no geral, apresentaram um comportamento uniforme de redução em função da temperatura, no entanto existiram alguns valores anómalos. A exceção a esta tendência na área fêmur foi a zona “Ward” que apresentou, aparentemente, um comportamento aleatório. Por outro lado, os indicadores referentes à DMO do fêmur apresentaram, em geral, um comportamento uniforme de aumento, mas ainda assim com alguns valores anómalos. Por último, no fêmur, os indicadores

referentes ao CMO, apresentaram um comportamento aparentemente aleatório, com exceção da zona “Ward” que aparentou uma tendência para aumentar em função da temperatura a partir dos 700°C.

Na patela, os indicadores referentes à área apresentaram um comportamento quase uniforme de aumento, apesar de se verificarem valores atípicos. Por outro lado, tanto os indicadores de DMO como os de CMO neste osso apresentaram um comportamento inicial de redução e de seguida um comportamento de aumento a partir dos 700/800°C.

No primeiro metatársico, todos os indicadores apresentaram comportamentos distintos. Os indicadores referentes à área apresentaram um comportamento quase uniforme de redução em função da temperatura, no entanto com um valor atípico. Relativamente à DMO, estes indicadores apresentaram um comportamento quase uniforme de aumento em função da temperatura, mas ainda assim com alguns valores anómalos. Por último, os indicadores referentes ao CMO apresentaram um comportamento aparentemente aleatório.

Os coeficientes de variação analisados para este estudo (Tabela 7) continuaram a apresentar menor variação para os indicadores “Neck” e “Ward” na área do fémur. Antes da queima, a zona “Neck” apresentou coeficiente de variação de 8,43% enquanto depois da queima diminuiu para 7,28%. A zona “Ward” apresentou uma variação de 3,67% antes da queima aumentando para 5,50% depois da queima.

Tabela 7:

Estatística descritiva e teste das diferenças antes e após a queima no mesmo osso, segundo o teste de Wilcoxon.

Osso	Característica	Zona	Antes						Depois						Wilcoxon	
			n	Média	Desvio padrão	Mediana	Amplitude	Coefficiente de variação	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Amplitude	Coefficiente de variação	Z	Sig.
Fémur	Área	Neck	10	5,10	0,43	5,26	1,25	8,43%	10	4,67	0,34	4,78	1,01	7,28%	0	0,005
		Troch	10	11,60	1,55	11,74	4,94	13,36%	10	9,91	1,64	9,47	5,37	16,55%	1	0,007
		Inter	10	20,26	3,06	20,02	8,84	15,10%	10	17,08	2,46	16,22	7,81	14,40%	4	0,017
		Total	10	36,96	4,51	36,81	12,21	12,20%	10	31,66	3,86	30,76	12,90	12,19%	0	0,005
		Ward	10	1,09	0,04	1,10	0,13	3,67%	10	1,09	0,06	1,07	0,25	5,50%	16,5	0,833
	DMO	Neck	10	0,63	0,17	0,57	0,42	26,98%	10	0,72	0,20	0,69	0,68	27,78%	51	0,017
		Troch	10	0,57	0,16	0,51	0,48	28,07%	10	0,65	0,17	0,63	0,57	26,15%	55	0,005
		Inter	10	0,90	0,21	0,83	0,60	23,33%	10	0,99	0,22	0,96	0,68	22,22%	50	0,022
		Total	10	0,76	0,19	0,68	0,46	25,00%	10	0,84	0,19	0,81	0,58	22,62%	51	0,017
		Ward	10	0,41	0,13	0,39	0,39	31,71%	10	0,50	0,13	0,50	0,34	26,00%	55	0,005
	CMO	Neck	10	3,22	0,89	2,69	2,21	27,64%	10	3,38	0,99	2,98	3,11	29,29%	42	0,138
		Troch	9	6,16	1,94	5,21	4,94	31,49%	10	6,55	2,63	5,09	7,57	40,15%	19	0,678
		Inter	10	18,34	5,88	15,20	15,34	32,06%	10	16,95	4,62	14,03	11,66	27,26%	13	0,139
		Total	10	28,30	9,19	22,83	23,42	32,47%	10	26,87	8,03	21,91	20,98	29,88%	10	0,074
		Ward	10	0,44	0,14	0,43	0,36	31,82%	10	0,54	1,14	0,56	0,37	211,11%	52	0,012
Patela	Área	9	12,32	1,65	11,89	4,73	13,39%	10	11,07	2,15	10,72	7,67	19,42%	5	0,038	
	DMO	9	0,51	0,06	0,50	0,198	11,76%	10	0,55	0,14	0,53	0,53	25,45%	35	0,139	
	CMO	9	5,57	0,99	5,55	3,11	17,77%	10	5,95	1,46	5,70	4,79	24,54%	21	0,859	
MT1	Área	10	10,40	1,30	10,90	3,31	12,50%	10	9,50	1,35	9,11	4,55	14,21%	5	0,022	
	DMO	9	0,33	0,05	0,34	0,15	15,15%	10	0,40	0,10	0,39	0,31	25,00%	41	0,028	
	CMO	9	3,36	0,69	3,60	2,01	20,54%	10	3,75	0,93	3,60	3,10	24,80%	33	0,214	

Tabela 8:

Diferenças relativas por sexo e por temperatura, para cada indicador.

	Sexo	600°C	700°C	800°C	900°C	1000°C
Fémur Área Neck	F	-4,88	-7,68	-12,98	-13,16	-3,95
	M	-3,77	-7,82	-7,39	-10,91	-10,28
Fémur Área Troch	F	-10,44	-7,91	-16,59	-24,82	-15,11
	M	4,12	-5,05	-27,09	-15,28	-25,34
Fémur Área Inter	F	0,78	-18,13	-25,73	-30,67	-21,19
	M	-17,50	-17,15	17,84	-20,73	-14,05
Fémur Área Total	F	-3,95	-13,54	-21,17	-26,69	-16,94
	M	-9,36	-11,86	-1,74	-17,7	-17,21
Fémur Área Ward	F	-9,91	-3,60	-3,54	16,82	1,83
	M	-4,46	5,00	2,88	0,00	0,00
Fémur DMO Neck	F	6,36	15,38	26,99	28,40	26,21
	M	3,50	3,57	-8,28	17,08	29,60
Fémur DMO Troch	F	2,79	14,69	20,45	27,27	22,24
	M	2,86	6,11	5,63	11,44	23,96
Fémur DMO Inter	F	2,17	7,37	21,24	25,36	24,73
	M	-3,80	1,22	-0,30	17,38	18,38
Fémur DMO Total	F	4,55	8,42	20,03	24,73	23,10
	M	-3,29	1,28	4,12	14,87	22,66
Fémur DMO Ward	F	5,83	26,04	46,99	62,26	29,19
	M	1,77	2,95	15,59	26,74	36,83
Fémur CMO Neck	F	1,21	6,64	10,53	11,59	21,29
	M	-0,47	-4,52	-15,29	4,31	16,08
Fémur CMO Troch	F	-7,95	5,54	0,39	-4,22	3,67
	M	7,15	0,79	-22,95	-5,63	-7,55
Fémur CMO Inter	F	3,07	-12,09	-9,98	-13,03	-1,71
	M	-20,66	-16,16	17,51	-6,94	1,82
Fémur CMO Total	F	0,47	-6,22	-5,35	-8,49	2,19
	M	-12,35	-10,73	2,18	-5,49	1,57
Fémur CMO Ward	F	-2,94	22,5	43,33	85,71	30,43
	M	-1,59	7,81	19,35	27,27	36,00
Patela Área	F	2,67	-3,29	-9,19	-10,68	-16,61
	M	-1,71	-0,40	0,08	-24,74	-12,48
Patela DMO	F	-3,56	-1,14	17,87	12,87	21,81
	M	-2,22	-0,96	-2,32	34,31	23,30
Patela CMO	F	-1,06	-4,61	7,21	0,71	1,58
	M	-3,97	-1,23	-2,18	0,98	7,94
MT1 Área	F	-0,35	-1,71	-9,83	-23,88	-15,65
	M	3,81	-1,98	-5,51	-24,78	-3,33
MT1 DMO	F	8,64	10,79	11,87	23,12	46,9
	M	-6,86	-8,43	17,11	58,04	4,81
MT1 CMO	F	8,85	9,29	0,83	-6,11	23,96
	M	-3,30	-10,35	10,46	18,50	1,36

As alterações no IC com o aumento da temperatura foram analisadas (Tabela 9). Ao longo de toda a experiência, verificou-se sempre um aumento do índice de cristalinidade. Para o fêmur, as menores diferenças relativas foram de 27,83% e de 29,23%, correspondendo ao estudo das queimas com menor aumento de temperatura (600°C). A maior diferença relativa ocorreu na queima de 900°C (111,74%) no sexo feminino, seguida da queima de 1000°C (94,73%) também no sexo feminino. No sexo masculino, a maior diferença foi de 88,76% na queima de 800°C.

Para a patela, verificou-se um aumento das diferenças relativas com o aumento da temperatura, até aos 900/1000°C, onde existiu uma diminuição.

No primeiro metatársico verificou-se um aumento das diferenças com a temperatura e um aparente decréscimo a partir das queimas a 900°C.

3.4. Diferenças entre osso não queimado e antímero queimado

Com base nos resultados obtidos anteriormente, não foi possível realizar este estudo, ou seja, a influência do consolidante e as claras diferenças entre antímeros (assimetria bilateral) impossibilitaram a extrapolação para uma comparação entre um osso não queimado e o seu antímero queimado.

No entanto, devido à baixa variação da zona “Ward” na área do fêmur, foi decidido que seria importante verificar se a análise conjunta, para este indicador, da presente amostra e da amostra de esqueletos previamente queimados seria possível (Tabela 10). Segundo o teste não paramétrico para amostras emparelhadas Wilcoxon, na área do fêmur, a zona “Ward” do antímero não queimado não apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao antímero queimado ($Z=96$, $p=0,736$).

Tabela 9:

Valores em bruto e diferenças relativas para o índice de cristalinidade (IC) por sexo e por temperatura, para cada osso (fémur, patela e primeiro metatársico).

		Antes	600°C	DR%	Antes	700°C	DR%	Antes	800°C	DR%	Antes	900°C	DR%	Antes	1000°C	DR%
Fémur	F	2,93	3,75	27,83	2,89	5,36	85,28	2,94	5,61	90,75	2,93	6,21	111,74	2,90	5,65	94,73
	M	2,92	3,77	29,23	2,98	5,26	76,74	2,86	5,39	88,76	3,05	5,23	71,35	3,29	5,64	71,42
Patela	F	2,87	3,78	31,87	3,01	5,17	71,68	2,91	5,57	91,41	2,95	5,55	88,07	3,24	5,36	65,42
	M	2,94	3,58	21,65	3,05	5,31	73,80	2,93	5,26	79,24	3,01	5,75	91,06	3,15	5,04	59,77
MT1	F	3,45	3,78	9,57	3,09	4,00	29,46	2,88	6,29	118,47	2,91	6,02	106,52	3,19	5,60	75,69
	M	2,92	3,59	22,76	2,99	4,74	58,38	2,86	5,53	93,53	3,05	5,51	80,29	-	-	-

Tabela 10:

Estatística descritiva e teste das diferenças entre o antímero não queimado e o antímero queimado, segundo o teste de Wilcoxon.

Osso	Característica	Zona	Antímero não queimado						Antímero Queimado						Wilcoxon	
			n	Média	Desvio padrão	Mediana	Amplitude	Coefficiente de variação	n	Média	Desvio padrão	Mediana	Amplitude	Coefficiente de variação	Z	Sig.
Fémur	Área	Ward	22	1,11	0,06	1,11	0,29	0,05	22	1,11	0,06	1,11	0,25	0,05	96	0,736

3.5. Correlações com a temperatura

As correlações entre os vários indicadores e a temperatura foram testadas através do teste de correlação de Spearman. Os resultados encontram-se na Tabela 11. Os indicadores respetivos à área do fémur, em geral, não apresentaram nenhuma correlação com a temperatura; exceto a zona “Ward” que apresentou uma correlação de 0,790 para a amostra total e uma correlação de 0,900 nos indivíduos do sexo feminino. Os indicadores de DMO no fémur também não apresentaram nenhuma correlação com a temperatura, tal como os indicadores de CMO no fémur. As únicas exceções são a DMO na zona “Troch” que apresentou uma correlação máxima nos indivíduos do sexo feminino e o CMO na zona “Ward” que apresentou uma correlação de 0,900 nos indivíduos do sexo feminino.

Os indicadores respetivos à área da patela apresentaram uma correlação de -0,788 na amostra total e uma correlação de -0,900 quando se analisaram apenas os indivíduos no sexo masculino. Ainda, os indicadores respetivos à DMO da patela apresentaram uma correlação de 0,691 com a temperatura.

Por último, relativamente ao primeiro metatársico, apenas os indicadores respetivos à DMO apresentaram uma correlação significativa com a temperatura máxima, neste caso de 0,900 nos indivíduos do sexo masculino.

Deste modo, em nenhum indicador e nenhum osso se observou uma correlação estatisticamente significativa com a temperatura máxima nos dois sexos.

Tabela 11:

Correlações de Spearman entre os indicadores de área, DMO e CMO e a temperatura máxima (600°C, 700°C, 800°C, 900°C e 1000°C) a que os ossos foram queimados. Os resultados são apresentados para a amostra total, amostra composta por mulheres (M) e amostra composta por homens (H).

	Temperatura								
	n	Total	Sig.	n	M	Sig.	n	H	Sig.
Fémur Área Neck	10	-0,123	0,735	5	-0,300	0,624	5	-0,200	0,747
Fémur Área Troch	10	-0,345	0,329	5	-0,700	0,188	5	-0,500	0,391
Fémur Área Inter	10	0,000	1,000	5	-0,100	0,873	5	-0,100	0,873
Fémur Área Total	10	-0,123	0,735	5	-0,100	0,873	5	-0,400	0,505
Fémur Área Ward	10	0,790	0,007	5	0,900	0,037	5	0,671	0,215
Fémur DMO Neck	10	0,271	0,449	5	0,400	0,505	5	0,700	0,188
Fémur DMO Troch	10	0,271	0,449	5	1,000	>0,001	5	-0,100	0,873
Fémur DMO Inter	10	0,148	0,684	5	0,300	0,624	5	0,300	0,624
Fémur DMO Total	10	0,320	0,367	5	0,700	0,188	5	0,600	0,285
Fémur DMO Ward	10	0,246	0,493	5	0,700	0,188	5	0,100	0,873
Fémur CMO Neck	10	0,320	0,367	5	0,700	0,188	5	0,600	0,285
Fémur CMO Troch	10	0,198	0,584	5	0,821	0,089	5	-0,200	0,747
Fémur CMO Inter	10	0,173	0,633	5	0,205	0,741	5	0,500	0,391
Fémur CMO Total	10	0,185	0,608	5	0,500	0,391	5	0,100	0,873
Fémur CMO Ward	10	0,345	0,329	5	0,900	0,037	5	0,300	0,624
Patela Área	10	-0,788	0,007	5	-0,800	0,104	5	-0,900	0,037
Patela DMO	10	0,691	0,027	5	0,821	0,089	5	0,600	0,285
Patela CMO	10	-0,123	0,735	5	-0,100	0,873	5	-0,200	0,747
MT1 Área	10	-0,482	0,159	5	-0,300	0,624	5	-0,800	0,104
MT1 DMO	10	0,492	0,148	5	0,900	0,037	5	0,100	0,873
MT1 CMO	10	0,320	0,367	5	0,600	0,285	5	-0,200	0,747

3.6. Correlações com o índice de cristalinidade

As correlações entre os vários indicadores e os índices de cristalinidade foram testadas, utilizando o teste de correlação de Spearman. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Os indicadores respetivos à área do fémur apenas apresentaram correlações com o índice de cristalinidade, na zona “Troch” e na zona “Ward”. Na zona “Troch” existiu

uma correlação negativa estatisticamente significativa ($r_s=-0,636$), quando comparado com a amostra total e uma correlação negativa estatisticamente significativa ($r_s = -0,900$) quando analisados apenas os indivíduos do sexo masculino. Na zona “Ward” existiu uma correlação positiva estatisticamente significativa ($r_s=0,903$) quando comparado com a amostra total e uma correlação positiva estatisticamente significativa ($r_s=1,000$) quando analisados apenas os indivíduos do sexo feminino. Os indicadores respetivos à DMO no fémur apenas apresentaram uma correlação positiva estatisticamente significativa ($r_s=0,900$) com o índice de cristalinidade na zona “Troch” quando comparada apenas com os indivíduos do sexo feminino. Os indicadores de CMO do fémur, aparentemente, não apresentaram nenhuma correlação com o índice de cristalinidade.

Relativamente à patela, apenas no indicador de DMO se verificou uma correlação positiva estatisticamente significativa ($r_s=0,736$) com o índice de cristalinidade.

Por último, os indicadores respetivos ao primeiro metatársico, aparentemente, não apresentaram nenhuma correlação com os índices de cristalinidade.

Resumindo, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada simultaneamente em ambos os sexos para nenhum dos indicadores e nenhum dos ossos.

Tabela 12:

Correlações entre os indicadores e os índices de cristalinidade, segundo o teste de Spearman.

	Índice de Cristalinidade								
	n	total	Sig.	n	F	Sig.	n	M	Sig.
Fémur Área Neck	10	-0,200	0,580	5	0,000	1,000	5	-0,200	0,747
Fémur Área Troch	10	-0,636	0,048	5	-0,600	0,285	5	-0,900	0,037
Fémur Área Inter	10	-0,115	0,751	5	0,300	0,624	5	0,100	0,873
Fémur Área Total	10	-0,297	0,405	5	0,300	0,624	5	-0,500	0,391
Fémur Área Ward	10	0,903	>0,001	5	1,000	>0,001	5	0,447	0,450
Fémur DMO Neck	10	-0,139	0,701	5	>0,001	1,000	5	0,300	0,624
Fémur DMO Troch	10	-0,055	0,881	5	0,900	0,037	5	-0,600	0,285
Fémur DMO Inter	10	-0,297	0,405	5	-0,100	0,873	5	-0,200	0,747
Fémur DMO Total	10	-0,091	0,803	5	0,400	0,505	5	0,000	1,000
Fémur DMO Ward	10	-0,055	0,881	5	0,500	0,391	5	-0,100	0,873
Fémur CMO Neck	10	-0,055	0,881	5	0,400	0,505	5	0,100	0,873
Fémur CMO Troch	10	-0,128	0,725	5	0,667	0,219	5	-0,800	0,104
Fémur CMO Inter	10	-0,292	0,413	5	-0,051	0,935	5	-0,200	0,747
Fémur CMO Total	10	-0,195	0,590	5	0,300	0,624	5	-0,600	0,285
Fémur CMO Ward	10	-0,006	0,987	5	0,800	0,104	5	-0,200	0,747
Patela Área	10	-0,455	0,187	5	-0,600	0,285	5	-0,400	0,505
Patela DMO	10	0,736	0,015	5	0,821	0,089	5	0,500	0,391
Patela CMO	10	0,200	0,580	5	0,700	0,188	5	0,300	0,624
MT1 Área	9	-0,217	0,576	5	0,500	0,391	4	-0,400	0,600
MT1 DMO	9	0,183	0,637	5	0,500	0,391	4	-0,400	0,600
MT1 CMO	9	0,167	0,668	5	0,800	0,104	4	-0,800	0,200

3.7. Influência da queima na classificação da OMS para osteoporose

As classificações para a densitometria, segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), para os fêmures analisados, durante as várias etapas pré- e pós-queima, estão descritas na Tabela 13. Os antímeros não queimados apresentaram diagnósticos diferentes em dois casos: indivíduos CEI/XXI 105 e CEI/XXI 11, feminino e masculino, respectivamente. Os indivíduos do sexo feminino apresentaram todos osteopenia ou osteoporose, enquanto os indivíduos do sexo masculino, apresentaram, na sua maioria, fêmures com classificação “normal” para a densidade, segundo a OMS. Os fêmures, quando submetidos à queima, ou mantiveram a sua classificação da OMS ou subiram de classificação, ou seja, passaram para uma classificação que reporta maior densidade. Por outro lado, ao nível de diagnóstico, o consolidante não acarretou alterações.

Tabela 13:

Resultado obtido pela DXA, segundo a classificação da OMS para as várias etapas da análise da densidade mineral óssea, em fêmures.

Fémur	Sexo	Temperatura	Antímero (esquerdo) não queimado	Antímero (direito) antes da queima	DMO Total antes da queima	Antímero (direito) depois da queima (antes/depois do consolidante)	DMO Total depois da queima	Diferença Relativa (%)
CEI/XXI 105	F	600°C	Osteopenia	Osteoporose	0,637	Osteopenia/Osteopenia	0,666	4,55
CEI/XXI 269	F	700°C	Osteopenia	Osteopenia	0,653	Osteopenia/Osteopenia	0,708	8,42
CEI/XXI 75	F	800°C	Osteoporose	Osteoporose	0,619	Osteopenia/Osteopenia	0,743	20,03
CEI/XXI 167	F	900°C	Osteoporose	Osteoporose	0,554	Osteopenia/Osteopenia	0,691	24,73
CEI/XXI 13	F	1000°C	Osteopenia	Osteopenia	0,710	Normal/Normal	0,874	23,10
CEI/XXI 249	M	600°C	Normal	Normal	0,973	Normal/Normal	0,941	-3,29
CEI/XXI 276	M	700°C	Normal	Normal	1,012	Normal/Normal	1,025	1,28
CEI/XXI 274	M	800°C	Osteoporose	Osteoporose	0,558	Osteoporose/Osteoporose	0,581	4,12
CEI/XXI 63	M	900°C	Normal	Normal	1,009	Normal/Normal	1,159	14,87
CEI/XXI 11	M	1000°C	Normal	Osteopenia	0,843	Normal/Normal	1,034	22,66

More than meets the eye

4. Discussão

4.1. Assimetria bilateral

Os resultados sugerem que as diferenças entre antímeros não são estatisticamente significativas. Contudo, as variações bilaterais individuais observadas poderão ser relevantes do ponto de vista prático, pois não irão refletir o mesmo grau de alterações quando submetidos ao processo de queima. De certa forma, isto vai ao encontro de trabalhos anteriores. Na maioria dos estudos de assimetria bilateral em contexto clínico, apesar de reportarem correlações entre os valores dos antímeros, estes apresentaram diferenças significativas, em pelo menos uma zona (Hamdy *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2012; Lilley *et al.*, 1992; Schwarz *et al.*, 2011).

Vários autores sugerem como justificações para estas diferenças o posicionamento do osso para a análise, a predisposição genética, a dominância de um dos antímeros, patologias, entre outros (Hamdy *et al.*, 2006; Lilley *et al.*, 1992). No presente trabalho, as condições patológicas poderão ser excluídas, pois a presença de lesões visíveis macroscopicamente foi um dos critérios de exclusão dos indivíduos aquando da seleção da amostra. De igual modo, a influência do posicionamento do osso durante a análise por DXA apresentou erros intra-observador baixos. Uma vez que as diferenças relativas entre antímeros são, na sua maioria, superiores aos erros encontrados, pode-se concluir que o posicionamento do osso para a análise não é o agente causador dos resultados que indicam a existência de assimetria bilateral. Porém, este erro pode funcionar como uma agravante para as diferenças encontradas.

Para a DMO, a maior diferença relativa foi de -21,87% na zona “Ward” do indivíduo 13 (sexo feminino). No entanto, muitos estudos de assimetria bilateral em contextos clínicos não utilizam esta região. Assim, sem contar com essa zona, verificou-se que a maior diferença relativa se encontrava na zona “Neck” (-13,69%) do indivíduo 75 (sexo feminino). Schwarz *et al.* (2011) reportou para esta zona, numa amostra de mulheres com idades compreendidas entre os 65-84 anos, apenas uma correlação moderada entre os fémures antímeros. Noutro estudo, Hamdy *et al.* (2006) também verificaram que apesar dos fémures antímeros apresentarem médias semelhantes, apresentavam diferenças significativas. Hwang *et al.* (2012) compararam a DMO em

diferentes regiões de fêmures antímeros. Nesse estudo, os autores encontraram diferenças significativas para as zonas “Neck” e “Troch”, enquanto as zonas “Inter” e “Total” não apresentaram diferenças significativas. Por sua vez, Lopes *et al.* (2009) encontraram uma correlação elevada da DMO entre antímeros nas zonas “Neck” e “Total”.

Apesar de alguns autores (Hwang *et al.*, 2012) encontrarem diferenças significativas para a região “Neck”, verifica-se que, tal como noutros estudos onde essas diferenças não foram encontradas (Hamdy *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2011), não obstante a serem estudadas amostras diferentes (Tabela 14), a amplitude de resultados obtidos pelas suas médias enquadra os resultados em bruto de DMO obtidos neste estudo para ossos não queimados.

Relativamente ao CMO, também as maiores diferenças se encontraram nos mesmos locais que a DMO. Ou seja, na zona “Ward” do indivíduo 13 (-21,05%) e na zona “Neck” do indivíduo 75 (-20,91%).

A maioria dos estudos de assimetria bilateral disponíveis remete para contextos clínicos, com o objetivo de avaliar a influência da análise unilateral/bilateral dos fêmures para um diagnóstico de osteoporose. Uma vez que a osteoporose é uma patologia com maior incidência em mulheres após a menopausa (> 50 anos de idade) (Curate, 2010), estes estudos também estão direcionados para amostras compostas por indivíduos do sexo feminino. Assim, a maioria das comparações realizadas foi feita apenas com cerca de 50% da amostra do presente estudo (ou seja, com a amostra do sexo feminino). Seja como for, a consulta dos vários estudos sobre esta problemática é indicativa da existência de assimetria bilateral considerável, tornando a extrapolação de um antímero para o outro não recomendável.

Tabela 14.

Resultados de DMO para estudos publicados sobre assimetria bilateral

	Amostra	Esquerdo						Direito					
		n	Colo femoral	Trocânter	Intertrocantérica	Total	Ward	N	Colo femoral	Trocânter	Intertrocantérica	Total	Ward
Presente estudo		10	0,64±0,17	0,57±0,15	0,92±0,21	0,77±0,18	0,41±0,14	10	0,63±0,17	0,57±0,16	0,90±0,21	0,76±0,19	0,41±0,13
Hwang et al. (2012)	Mulheres, >50 anos	384	0,551±0,11	0,516±0,09	0,843±0,17	0,697±0,17	-	384	0,533±0,15	0,519±0,10	0,838±0,17	0,693±0,16	-
Schwarz et al. (2011)	Mulheres, 65-84 anos	616	0,870±0,007	-	-	-	-	610	0,880±0,009	-	-	-	-
Hamdy et al. (2006)	Mulheres, 50-92 anos	3012	0,686±0,13	0,615±0,13	-	-	-		0,697±0,13	0,619±0,13	-	-	-
Pierre et al. (2010)	19 homens + 1 mulher	20	0,84±0,14	0,78±0,13	1,16±0,17	1,01±0,15	-	20	0,84±0,13	0,77±0,11	1,15±0,17	1,00±0,14	-

4.2. Diferenças pré- e pós-consolidante

Neste estudo, foram encontradas diferenças significativas para as zonas “Inter” e “Total” do fêmur, na área, DMO e CMO, antes e depois da aplicação do consolidante. Novamente, uma possível justificação para as diferenças encontradas está eventualmente relacionada com o posicionamento do fêmur durante a análise. No entanto, como visto no subcapítulo anterior, as diferenças relativas encontradas neste estudo são maioritariamente superiores ao erro intra-observador. Ademais, verifica-se que são nas mesmas zonas, “Inter” e “Total”, para os diferentes indicadores, onde se encontram estas diferenças, sugerindo que não são aleatórias. Por outro lado, o facto de haver diferença numa das variáveis (área, DMO ou CMO), também se pode traduzir em diferenças nas restantes, uma vez que as três são estatisticamente interdependentes; o cálculo da DMO consiste na divisão do CMO pela área, assim, o aumento de uma das variáveis, irá influenciar as restantes.

A aplicação de consolidante é uma prática que teve como objetivo minimizar a fragilidade do material em estudo, neste caso, dos ossos queimados. Dos vários tipos de consolidantes existentes, o *Primal*, comumente usado em contextos arqueológicos, é um consolidante acrílico (Lopez-Polín, 2012), tornando o osso mais resistente a fraturas e com um aspeto brilhante. Apesar da influência do consolidante para o estudo de ossos ainda ser um campo pouco explorado, já existem algumas tentativas para perceber o seu efeito no osso macro- e microscopicamente. No entanto, ainda nenhum estudo foi focado no consolidante utilizado nesta experiência. Rossi *et al.* (2004) reportaram que um dos consolidantes testados, *Acryloid B-72*, é recomendado para a consolidação de restos cremados, quando se pretendem fazer análises à microestrutura do osso, como preparações histológicas. Por outro lado, Chadeaux *et al.* (2008) utilizaram técnicas de análise química para verificar a influência de consolidantes (*Paraloid B72* e *Rhodopas M*) no seu estudo. Estes autores assinalaram que os tratamentos de consolidação aplicados não alteraram a porosidade do osso, mas modificaram a sua cristalinidade, através de análises de microscopia eletrónica (SEM) e difração de raio-X (XRD).

O consolidante, apesar de utilizado com o intuito de maximizar a preservação do osso irá, em última análise, influenciar análises posteriores. Para certos estudos, como a análise da topografia do osso, ADN, ^{14}C ou isótopos estáveis, estas interferências podem ser ultrapassadas pelo protocolo de consolidação a adotar (Lopez-Polín, 2012).

No entanto, uma vez que aqui está em estudo a parte mineral do osso, as diferenças significativas encontradas na amostra pré- e pós-consolidante podem ser corroboradas pelos resultados de Chadeaux *et al.* (2008), em que foram reportadas alterações na cristalinidade do osso. Não obstante, uma vez que se tratam de consolidantes diferentes, as alterações provocadas por cada um podem não ser exatamente as mesmas.

De modo a compreender melhor o efeito que o consolidante tem sobre a cristalinidade do osso, é recomendável que se realizem mais estudos pré- e pós-consolidante, não só com um aumento da amostra, mas também com a utilização de outras técnicas, como microscopia eletrônica, difração de raio-X ou espectroscopia e infra-vermelho, que contribuam com mais informação sobre a microestrutura do osso.

4.3. Diferenças pré- e pós-queima

Na presente análise, foram encontradas diferenças significativas para a área do fémur, patela e primeiro metatársico antes e depois da queima. Efectivamente, verificou-se que, com a queima, ocorreu uma diminuição da área média em todos os parâmetros do fémur, excepto na zona “Ward”. No entanto, uma vez que a zona “Ward” não é uma zona física específica, apenas indica a zona de menor densidade, o seu tamanho é variável (Khan *et al.*, 2004). Esta diminuição geral do tamanho dos ossos devido à queima já foi amplamente reportada (Van Vark *et al.*, 1996; Shipman *et al.*, 1984; Thompson, 2005; Gonçalves, 2011). As análises desta amostra foram realizadas na epífise proximal do fémur, na patela e no primeiro metatársico, sendo regiões e ossos mais ricos em osso esponjoso. Thompson (2005) verificou que a ocorrência de diminuição de tamanho ocorria maioritariamente nas epífises, devido à sua natureza de osso esponjoso. O autor justificou que, apesar do osso esponjoso ser o mais flexível (em comparação com o osso compacto), este é funcionalmente rígido de modo a absorver forças com várias direções, sugerindo a presença de uma orientação aleatória do colagénio. Assim, após a destruição do colagénio pelo aumento da temperatura, esses espaços com orientações aleatórias serão mais fracos do que o osso compacto sem o colagénio (Thompson, 2005). Outros autores apoiam esta observação de que é osso

esponjoso que apresenta maiores alterações na dimensão devido à queima (Gonçalves *et al.*, 2012).

Ao analisar a influência das temperaturas máximas na área, verificou-se que existe, no geral, uma diminuição uniforme em todos os indivíduos analisados. Tal como anteriormente, a zona “Ward” foi a exceção, muito provavelmente devido ao mesmo motivo, ou seja, por não se tratar de uma área de localização homogênea. As queimas a uma temperatura máxima de 600°C apresentaram baixas diferenças relativas para as várias áreas, tal como seria de esperar, pois a diminuição de tamanho é baixa nas primeiras fases da queima (Thompson, 2005). A esta temperatura, verificaram-se, no geral, diferenças relativas até cerca de 10% (com algumas exceções que constituíram *outliers*: ver Tabela 4). Para os 700°C (1-18%) e 800°C (2-27%) verificaram-se maiores diminuições de tamanho, atingindo-se as maiores diferenças relativas aos 900°C (11-31%). Estas maiores reduções de tamanho dos ossos vêm de encontro aos resultados de Shipman *et al.* (1984) que concluíram que a percentagem de encolhimento aumenta em função da temperatura máxima atingida.

Para queimas com temperaturas máximas de 1000°C, as áreas no geral, sofreram menores decrementos de tamanho, ou seja, as diferenças relativas pré- e pós-queima forem baixas (3-25%). Estes resultados contrariam os resultados reportados por Thompson (2005), que coloca os grandes graus de encolhimento durante a fase de fusão (a temperaturas acima de 700°C). No entanto, esta discrepância nos resultados pode ser devida à duração das queimas. Enquanto Thompson (2005) realizou queimas até 45 minutos, neste estudo as queimas até à temperatura desejada tiveram uma duração de 4 horas, tendo sido já reportado que a duração da queima apresenta influência nas alterações do osso (Snoeck *et al.*, 2014). Também é de notar que este não é um estudo longitudinal, ou seja, não foi possível documentar as alterações ocorridas no mesmo osso ao longo do incremento de temperatura. Assim, ao serem utilizados diferentes ossos para se estudarem diferentes temperaturas, pode-se estar a contribuir para reforçar o aparecimento de resultados aleatórios/atípicos.

Tendo em conta que as alterações na parte mineral do osso só ocorrem após a perda da matéria orgânica (Person *et al.*, 1996), em teoria, é mais relevante realizar este estudo a partir dos 600°C, porque a partir desta temperatura temos a certeza que, no geral, praticamente toda a parte orgânica foi destruída (Etok *et al.*, 2007; Figueiredo *et*

al., 2010). Com a perda da matéria orgânica, ocorre um aumento dos poros (Figueiredo *et al.*, 2010), que contribui para as alterações ao nível da parte inorgânica do osso.

Relativamente à densidade mineral óssea, também foram encontradas diferenças significativas entre o pré- e o pós-queima em todas as zonas do fêmur. Foram encontradas diferenças significativas no primeiro metatársico, mas não na patela. Estas diferenças devem-se às alterações que ocorrem na microestrutura do osso, nomeadamente na cristalinidade.

A DMO apresentou, no geral, um aumento uniforme em todos os indivíduos com o aumento da temperatura. Segundo vários autores (Etok *et al.*, 2007; Figueiredo *et al.*, 2010), com o aumento da temperatura, também aumenta a cristalinidade, devido ao aumento do tamanho dos cristais e à sua coalescência. Este aumento dos cristais dá-se até aos 800°C, temperatura a partir da qual estabilizam (Etok *et al.*, 2007). No entanto, este plateau não se traduz nos resultados obtidos. Apenas nalguns casos (4 casos num total de 10) se vê os valores das diferenças de DMO a estabilizarem, nos restantes casos as diferenças continuam a aumentar ou a diminuir, aparentemente de modo aleatório.

As diferenças relativas na DMO apresentadas pela patela e pelo primeiro metatársico apresentaram, em função do aumento da temperatura máxima, um comportamento aparentemente aleatório.

O CMO não apresentou diferenças significativas no fêmur, com a exceção da zona “Ward”, na patela, nem no primeiro metatársico. Voltando a relembrar que as três variáveis (área, DMO e CMO) constituem elementos da mesma equação matemática, em que se obtém a DMO através da divisão do conteúdo mineral ósseo pela área, ao não existirem diferenças no CMO enquanto a área diminui, então matematicamente o valor de DMO irá aumentar (como reportado anteriormente).

Os indicadores referentes ao CMO com o aumento das temperaturas máximas das queimas, por outro lado, apresentaram um comportamento aparentemente aleatório. Para esta análise, apenas a zona “Ward” apresentou uma tendência de aumento a partir dos 700°C, com uma diminuição nas queimas à temperatura máxima de 1000°C. Tendo em conta que a zona “Ward” corresponde à zona com menor densidade, verificou-se que para a densidade mais baixa, as diferenças no conteúdo mineral foram aumentando. Este aumento a partir dos 700°C poderá refletir as alterações que se verificam na parte

mineral do osso que, como referido anteriormente, se iniciam a partir dos 600°C. Por outro lado, a diminuição dessas diferenças no CMO pode ser consequência da estabilização do crescimento dos cristais e da sua sinterização que se verifica a partir dos 900°C (Figueiredo *et al.*, 2010; Ellingham *et al.*, 2015).

A zona “Ward”, aparentemente, é a região com maior potencial para o estudo das alterações pré- e pós-queima, pois foi a que apresentou menor quantidade de valores aleatórios. Não obstante, continua a ser uma região heterogénea, ou seja, não é necessariamente localizada no mesmo local anatómico em diferentes fémures (Khan *et al.*, 2004). Assim, é necessário continuar a estudar esta problemática para, por um lado, se entender melhor as alterações que se verificam nesta zona, e por outro, se com um aumento da amostra, se detetam outros indicadores com maior utilidade para traduzir as alterações que ocorrem pós-queima.

Outra questão que se deve analisar, uma vez que também está dependente da temperatura, diz respeito às diferenças no índice de cristalinidade pré- e pós-queima. As correlações significativas encontradas entre os vários indicadores e a temperatura ou entre os vários indicadores e o índice de cristalinidade apresentam um cenário aparentemente aleatório. No geral, não houve correlações entre os vários indicadores e a temperatura e IC. Para as poucas correlações que se observaram, não existiu um conjunto de indicadores representativo dessas correlações ou uma correlação num indicador específico que fosse transversal a ambos os sexos. Este fenómeno pode dever-se ao reduzido tamanho da amostra em análise que compromete os resultados, sendo necessário aumentar a amostra de modo a perceber se existe de facto alguma correlação entre as várias variáveis.

Não obstante, a zona “Ward” da área do fémur apresenta elevada correlação tanto com a temperatura como com o índice de cristalinidade, para a amostra total e para o sexo feminino. Também a zona “Troch” da DMO no fémur apresenta correlação elevada com as duas variáveis (temperatura e IC), para o sexo feminino. Tal como a DMO na patela apresenta correlação com as duas variáveis, mas para a amostra total. Ademais, as restantes correlações encontradas, só estão relacionadas com uma das variáveis. No entanto, seria provavelmente expectável que as correlações observadas para uma variável fossem também observadas para a segunda variável, uma vez que

existe uma conexão entre as duas, ou seja, um aumento na temperatura traduz-se num aumento do IC.

Já está amplamente estabelecido que o IC para osso humano inalterado ronda em média os 2,50-3,25 (Thompson *et al.*, 2009), apesar de outros autores terem obtido alguns resultados mais elevados, reportando uma média de IC de 3,55 (Gonçalves *et al.*, 2018). A amostra pré-queima apresentou um IC de 2,86-3,45, estando em concordância com os valores reportados. As amostras foram obtidas de três ossos distintos por indivíduo, o que permitiu verificar que apesar de algumas variações, os valores intra-indivíduo são relativamente semelhantes. Thompson *et al.* (2011) reportou que as diferenças ao longo de um elemento ósseo são pequenas; e aqui verifica-se que as diferenças entre diferentes elementos ósseos do mesmo indivíduo também não produzem grandes diferenças. Mais recentemente, Gonçalves *et al.* (2018) avaliaram a influência do local de amostragem do osso no índice de cristalinidade, utilizando ossos humanos. Os autores não encontraram diferenças significativas no IC, em amostras retiradas em diferentes zonas do mesmo osso. Ao analisarem diferenças entre ossos do mesmo esqueleto, debruçaram-se sobre as diferenças entre os dois tipos de osso (esponjoso e compacto), encontrando diferenças significativas no IC. Assim sendo, uma eventual correlação entre o IC e os parâmetros para a densidade mineral óssea poderá variar em função do tipo de osso.

Por outro lado, a amostra pós-queima levou a uma variação do IC entre 3,58-6,29, dependendo da temperatura máxima atingida; ou seja, verificou-se um aumento do IC quando submetido a temperaturas elevadas. Vários autores justificam o aumento do IC, com a maior ordenação da estrutura dos cristais (Stiner *et al.*, 2001; Munro *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2008; Trueman *et al.*, 2008). Porém, este fenómeno pode ocorrer tanto devido a alterações diagenéticas como a alterações térmico-induzidas (Trueman *et al.*, 2008; Amarante, 2016).

Com o aumento da temperatura máxima da queima, os IC's foram variando. Aos 600°C, a amostra apresentou um intervalo de IC de 3,58-3,78; aos 700°C, um intervalo de IC de 4,00-5,36; aos 800°C um intervalo de IC de 5,26-6,29; aos 900°C, um intervalo de IC de 5,23-6,21 e aos 1000°C, um intervalo de IC de 5,04-5,65. Verificou-se um aumento do IC com o aumento da temperatura até aos 800°C, estabilizando aos 900°C e 1000°C. Os valores de IC aqui obtidos, para cada temperatura, estão dentro dos

intervalos esperados e reportados noutros trabalhos (Gonçalves *et al.*, 2018). No entanto, a amostra é demasiado pequena para realizar inferências mais arrojadas.

De modo a perceber o significado dos valores de IC obtidos, foram recolhidos para comparação os valores de IC de outros estudos, adquiridos por FTIR-ATR (Tabela 15). De notar que a composição das amostras diverge, sendo praticamente toda constituída por ossos de fauna frescos, a única exceção é o estudo de Gonçalves *et al.* (2018) onde utilizaram ossos humanos. A comparação com fauna é indireta pois diferenças microestruturais entre ossos de fauna e ossos humanos poderão induzir diferentes reações à queima (Gonçalves *et al.*, 2018).

A análise entre um antímero não queimado e o antímero queimado foi impossibilitada pelos resultados obtidos anteriormente. A existência de diferenças entre antímeros não queimados e a influência do consolidante nas análises de densitometria, não permitiram o aumento da amostra com os esqueletos previamente queimados da Coleção, uma vez que inutiliza a extrapolação dos resultados de um osso não queimado para o seu antímero também não queimado (previamente à queima). Ainda assim, devido às condições apresentadas pela zona “Ward”, para a qual não se encontraram diferenças tão importantes, foi decidido realizar esta análise para a área desta zona. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas, e, portanto, este indicador não permite obter novos dados para esta análise. A ausência de diferenças significativas reflete que a análise por DXA não deteta diferenças na área entre o osso queimado e o não-queimado. Ademais, é importante relembrar que a zona “Ward” não é uma zona específica, mas sim o local de menor densidade. Porém, uma vez que, no geral, a área dos ossos diminui com a queima, seria de esperar que possivelmente também a área de Ward diminuísse, no entanto, tal não se verificou, enfatizando a imprevisibilidade deste indicador.

Assim, ao agrupar os melhores indicadores para cada parâmetro estudado da influência da queima na densidade mineral óssea (Tabela 16), verifica-se que os resultados dos vários estudos nem sempre são concordantes. Todavia, é possível indicar quais os que aparentam apresentar maior potencial para serem estudados novamente no futuro. Tanto para a área como para o conteúdo mineral ósseo os indicadores que prometem melhores resultados remetem para as zonas “Neck” e “Ward”, enquanto a DMO apresenta como melhores indicadores as zonas “Inter” e “Total”.

Tabela 15.

Comparação dos IC obtidos com valores de IC reportados noutros estudos.

	Amostra	Duração	600	700	800	900	1000
Presente estudo*	Fémur humano	4 horas	3,76	5,31	5,50	5,72	5,65
	Patela humana	4 horas	3,68	5,24	5,42	5,65	5,20
	MT1 humano	4 horas	3,69	4,37	5,90	5,77	5,60
Thompson <i>et al.</i> (2009)	Ossos longos ovelha (S1)	15min	4,11	4,44	5,95	6,34	-
Thompson <i>et al.</i> (2009)	Ossos longos ovelha (S1)	45 min	-	5,1	6,3	7,56	-
Thompson <i>et al.</i> (2009)	Ossos longos ovelha (S2)	15min	-	4,55	-	4,67	-
Thompson <i>et al.</i> (2009)	Ossos longos ovelha (S2)	45 min	-	5,56	-	5,77	-
Thompson <i>et al.</i> (2013)	Costela ovelha (S1)	45 min	3,92	4,16	6,11	4,80	4,75
Thompson <i>et al.</i> (2013)	Costela ovelha (S2)	45 min	4,84	6,52	5,94	5,32	4,82
Thompson <i>et al.</i> (2011)	Fémur vaca + Ossos longos ovelha (superfície interna)	15min	-	3,80	-	4,32	-
Thompson <i>et al.</i> (2011)	Fémur vaca + Ossos longos ovelha (superfície interna)	45 min	-	4,72	-	5,39	-
Thompson <i>et al.</i> (2011)	Fémur vaca + Ossos longos ovelha (superfície externa)	15min	-	3,91	-	3,92	-
Thompson <i>et al.</i> (2011)	Fémur vaca + Ossos longos ovelha (superfície externa)	45 min	-	4,64	-	5,35	-
Snoeck <i>et al.</i> , (2014)*		4 horas	4,78	6,00	5,51	5,01	-
Gonçalves <i>et al.</i> , 2018	Osso humano maioritariamente compacto	variável	3,76	4,45	5,64	5,73	5,52
Gonçalves <i>et al.</i> , 2018	Osso humano maioritariamente esponjoso	variável	3,71	4,14	5,70	5,49	5,57

* Os valores obtidos para a amostra deste trabalho e do trabalho de Snoeck *et al.* (2014) foram obtidos através do cálculo da média.

Tabela 16.

Indicadores com melhores resultados para cada análise.

	Coefficientes com menor variação	Menores diferenças relativas	Correlações temperatura	Correlações IC
Área	Neck Ward	Neck	Ward	Troch Ward
DMO	Inter Total	Inter Total	Troch	Ward
CMO	Neck	Ward*	Ward	-

* Diferença relativa elevada, mas o único indicador que apresentou comportamento uniforme

4.4. Influência da queima na classificação da OMS para osteoporose

Os resultados obtidos pela densitometria bifotônica reportam uma classificação, que segundo a OMS, está dividida em “Normal”, “Osteopenia” e “Osteoporose”. A prevalência de osteopenia e osteoporose em mulheres após a menopausa (Curate, 2010) foi também encontrada neste estudo, através do predomínio das classificações “Osteopenia” e “Osteoporose” em mulheres sobre a classificação “Normal” em homens, numa amostra com idades avançadas, como referido anteriormente.

A existência de assimetria bilateral já foi mencionada acima. Porém, verifica-se que nalguns casos essa assimetria é suficiente para indicar duas classificações diferentes entre os fêmures (indivíduos CEI/XXI 105 e CEI/XXI 11). Quando essas disparidades são encontradas em contexto clínico, podem por exemplo manifestar uma influência na decisão de um tratamento para o paciente (Hwang *et al.*, 2012). No entanto, em contextos arqueológicos, essa assimetria na classificação não assume uma influência tão grande quando se pretende estudar a incidência de osteoporose.

Quando submetidos à queima, os fêmures em 50% dos casos mantiveram a mesma classificação da OMS e nos restantes 50% dos casos passaram para a

classificação acima de maior densidade, ou seja, de “Osteoporose” para “Osteopenia” ou de “Osteopenia” para “Normal”. Contudo, em três dos cinco casos em que as classificações se mantiveram, estes pertenceram a homens com classificação “Normal”, ou seja, mesmo que tenham aumentado de densidade, mantiveram-se na mesma classificação porque não existe outra acima. Ademais, para o sexo masculino, não aparentam existir alterações na classificação com o aumento da temperatura, com exceção da queima à temperatura máxima de 1000°C em que houve uma transição de “Osteopenia” para “Normal”. Em relação ao sexo feminino em quatro dos cinco casos houve uma alteração na classificação, dos quais três casos mudaram de “Osteoporose” para “Osteopenia” e num caso mudou de “Osteopenia” para “Normal”. Com a exceção dos 700°C, existe sempre uma alteração da classificação, que traduz o aumento da cristalinidade no osso.

Contrariamente aos resultados obtidos acima que indicam que a aplicação de consolidante influencia as medições por DXA, este não alterou as classificações obtidas na análise. Isto sugere que as alterações provocadas pelo consolidante não são suficientes para alterar o diagnóstico na maioria das vezes.

Apesar de ser necessário continuar a estudar esta dinâmica com uma amostra maior, prevê-se que em casos práticos envolvendo restos cremados, um indivíduo com reduzida massa óssea apresentaria muito provavelmente a mesma classificação antes da queima visto que um incremento da densidade mineral óssea aparenta estar associado à queima.

More than meets the eye

5. Conclusões e Considerações Futuras

A queima de restos humanos é uma prática comum não só em contextos arqueológicos, mas também em contextos forenses, como um meio de esconder um crime ou como resultado de acidentes, desastres em massa, entre outros. Assim, torna-se imperativo conhecer as alterações térmico-induzidas ocorridas no osso, de modo a retirar o máximo de informação quer sobre a vítima quer sobre o contexto. A densitometria bifotónica, apesar de comumente utilizada em contexto clínico, nunca foi empregue em ossos queimados. Este método provou ser capaz de detetar as alterações que ocorrem na parte mineral do osso com o aumento da temperatura, nomeadamente através do aumento ou diminuição dos parâmetros área, DMO e CMO. Efetivamente verificou-se aumento da densidade mineral óssea com o aumento da temperatura máxima da queima. Com estes resultados não só é possível cimentar o que já se sabia sobre as alterações da cristalinidade no osso com a queima, mas também introduzir uma técnica com grandes potencialidades para o estudo da parte inorgânica do osso quando submetido a elevadas temperaturas.

Para estudos de patologia, nomeadamente osteoporose, em cremações, seja em contexto arqueológico ou forense, as análises de DXA aparentam ter potencial para obter informações relevantes. Apesar deste ser ainda um estudo preliminar, já foi possível encontrar algumas tendências. O aumento de densidade mineral óssea térmico-induzido (a elevadas temperaturas) poderá reforçar diagnósticos de osteopenia e osteoporose detetados em restos humanos queimados.

Uma grande limitação deste estudo é o baixo tamanho da amostra, que impediu que se pudessem retirar conclusões mais seguras. Porém, este é um ponto de partida para a exploração do efeito das alterações térmico-induzidas num novo parâmetro ósseo. A inclusão de um maior número de indivíduos, em investigações futuras, permitirá concluir de forma mais sólida se são observáveis diferenças entre sexos. Além disso, com a adição de indivíduos de outras faixas etárias, poderão ser estudadas as alterações na cristalinidade em função da idade. A continuação do estudo em paralelo deste índice

More than meets the eye

de cristalinidade será útil para verificar se efectivamente existe correlação entre a ordem da estrutura dos cristais dada por este índice e os dados de densidade obtidos por DXA. Uma eventual correlação significaria que este índice poderia ser um *proxy* de massa óssea.

6. Referências Bibliográficas

- Alunni, V.; Grevin, G.; Buchet, L.; Quatrehomme, G. 2014. Forensic aspect of cremations on wooden pyre. *Forensic Science International*, 241: 167-172. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.05.023.
- Amarante, A. I. C. D. C. 2016. *Burned bones vs unburned bones: a pilot study about the impact of differential post-depositional taphonomy on bioanthropological research*. Dissertação de Mestrado em Evolução e Biologia Humanas. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Baby, R. S. 1954. Hopewell Cremation Practices. *Papers in Archaeology*. Columbus: Ohio Historical Society, 1-7.
- Bethard, J. D.; Berger, J. M.; Maiers, J.; Ross, A. H. 2019. Bone Mineral Density Adult Age Estimation in Forensic Anthropology: A Test of the DXAGE Application. *Journal of Forensic Sciences*, 64(4), 1125-1128. DOI: 10.1111/1556-4029.13987.
- Binford, L. R. 1963. An analysis of cremations from three Michigan sites. *Wisconsin Archaeologist*, 44:98-110
- Blake, G. M.; Fogelman, I. 2002. Methods and clinical issues in bone densitometry and quantitative ultrasonometry. In: Bilezikian, J. P.; Raisz, L. G.; Rodan G. A. (eds.). *Principles of bone biology*. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 1573-1585. ISBN: 978-0-12-098652-1.
- Blake, G. M.; Fogelman, I. 2009. The clinical role of dual energy X-ray absorptiometry. *European Journal of Radiology*, 71(3): 406-414. DOI: 10.1016/j.ejrad.2008.04.062.
- Blake, G. M.; Fogelman, I. 2010. An update on dual-energy x-ray absorptiometry. *Seminars in Nuclear Medicine*, 40(1):62-73. DOI: 10.1053/j.semnuclmed.2009.08.001.
- Bonjour, J. P.; Rizzoli, R. 1996. Bone acquisition in adolescence. In: Marcus, R.; Feldman; D.; Kelsey J. (eds.). *Osteoporosis*. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 465-476. ISBN: 978-0673469960.
- Bonnick, S. L. 1998. *Bone densitometry in clinical practice*. Totowa, NJ, Humana Press. DOI: 978-1-4757-2782-1.

- Bonucci, E; Graziani, G. 1975. Comparative thermogravimetric, X-ray diffraction and electron microscope investigations of burnt bones from recent, ancient, and prehistoric age. *Atti Memorie Accademia Nazionale die Lincei Scienze, Fisiche, Matematiche Naturali Series*, 8(59):517-534.
- Bowler, J. M.; Johnston, H.; Olley, J. M.; Prescott, J. R.; Roberts, R. G.; Shawcross, W.; Spooner, N. A. 2003. New ages for human occupation and climatic change at Lake Mungo, Australia. *Nature*, 421(6925): 837. DOI: 10.1038/nature01383.
- Bradtmiller, B; Buikstra J. E. 1984. Effects of burning on human bone microstructure: a preliminary study. *Journal of Forensic Sciences*, 29(2): 535-540. DOI: 10.1520/JFS11701J.
- Brooks, S.; Suchey, J. M. 1990. Skeletal age determination based on the os pubis: a comparison of the Acsádi-Nemeskéri and Suchey-Brooks methods. *Human Evolution*, 5(3): 227-238. DOI: 10.1007/BF02437238.
- Buikstra, J. E.; Ubelaker, D. H. 1994. Standards for data collection from human skeletal remains. *Arkansas Archaeological Survey Research Series*, 44: 206.
- Cameriere, R.; Ferrante, L.; Cingolani, M. 2004. Variations in pulp/tooth area ratio as an indicator of age: a preliminary study. *Journal of Forensic Science*, 49(2): 1-3. DOI: 10.1520/JFS2003259.
- Cameron, J. R.; Sorenson, J. 1963. Measurement of bone mineral in vivo: an improved method. *Science*, 142(3589): 230-232. DOI:10.1126/science.142.3589.230.
- Carey, J. J.; Delaney, M. F. 2017. Utility of DXA for monitoring, technical aspects of DXA BMD measurement and precision testing. *Bone*, 104: 44-53. DOI: 10.1016/j.bone.2017.05.021.
- Castillo, R. F.; Ruiz, M. D. C. L. 2011. Assessment of age and sex by means of DXA bone densitometry: application in forensic anthropology. *Forensic Science Internaitonal*, 209: 53-58. DOI: 10.1016/j.forsciint.2010.12.008.
- Castillo, R. F.; Ubelaker, D. H.; Acosta, J. A. L.; de la Fuente, G. A. C. 2013. Effects of temperature on bone tissue. Histological study of the changes in the bone matrix. *Forensic Science International*, 226(1-3): 33-37. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.11.012.
- Chadefaux, C.; Vignaud, C.; Menu, M.; Reiche, I. 2008. Effects and efficiency of consolidation treatments on Palaeolithic reindeer antler. Multi-analytical study by means of XRD, FT-IR microspectroscopy, SEM, TEM and μ -

- PIXE/PIGE analyses. *Applied Physics A*, 92(1), 171-177. DOI: 10.1007/s00339-008-4469-3.
- Cohn, S. H.; Aloia, J. F.; Letteri, J. M. 1978. Non-invasive measurements of bone mass and their clinical significance. *Calcified Tissue Research*, 26: 1-3. DOI: 10.1007/BF02013225.
- 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.
- Cordner, S. M.; Woodford, N.; Basset, R. 2011. Forensic aspects of the 2009 Victorian bushfires disaster. *Forensic Science International*, 205 (1-3): 2-7. DOI: 10.1016/j.forsciint.2010.08.008.
- Correia, P. M. 1997. Fire modification of bone: a review of the literature. In: Sorg, M. H.; Haglund, W. D. (eds.). *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*. Boca Raton, Florida, CRC Press: 275-293. ISBN: 978-0849394348.
- Cullinane, D. M. 2000. Axial versus appendicular: constraint versus selection. *American Zoologist*, 40(1): 136-145. DOI: 10.1093/icb/40.1.136.
- Cullinane, D. M.; Einhorn, T. A. 2002. Biomechanics of bone. In: Bilezikian, J. P.; Raisz, L. G.; Rodan, G. A. (eds.). *Principles of bone biology*. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 17-32. ISBN: 978-0-12-098652-1.
- Curate, F. 2011. *O Perímetro do Declínio. Osteoporose e Fracturas de Fragilidade em Três Amostras Osteológicas Identificadas Portuguesas–Séculos XIX & XX*. Dissertação de Doutoramento em Antropologia Biológica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Curate, F.; Albuquerque, A.; Cunha, E. M. 2013a. Age at death estimation using bone densitometry: Testing the Fernández Castillo and López Ruiz method in two documented skeletal samples from Portugal. *Forensic Science International*, 226(1-3): 296-e1. DOI: 10.1016/j.forsciint.2012.12.002.
- Curate, F.; Albuquerque, A.; Correia, J.; Ferreira, I.; Pedroso de Lima, J.; Cunha, E. 2013b. A glimpse from the past: osteoporosis and osteoporotic fractures in a Portuguese identified skeletal sample. *Acta Reumatologica Portuguesa*, 38: 20-27.

- Curate, F.; Albuquerque, A.; Ferreira, I.; Cunha, E. 2017. Sex estimation with the total area of the proximal femur: a densitometric approach. *Forensic Science International*, 275: 110-116. DOI: 10.1016/j.forsciint.2017.02.035.
- Dabbs, G. R.; Moore-Jansen, P. H. 2010. A method for estimating sex using metric analysis of the scapula. *Journal of Forensic Sciences*, 55(1): 149-152. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2009.01232.x.
- De Becdelievre, C.; Thiol, S.; Santos, F.; Rottier, S. 2015. From fire-induced alterations on human bones to the original circumstances of the fire: an integrated approach of human cremains drawn from a Neolithic collective burial. *Journal of Archaeological Science: Reports*, 4: 210-225. DOI: 10.1016/j.jasrep.2015.08.030.
- Ellingham, S. T.; Thompson, T. J.; Islam, M.; Taylor, G. 2015. Estimating temperature exposure of burnt bone - a methodological review. *Science & Justice*, 55(3): 181-188. DOI: 10.1016/j.scijus.2014.12.002.
- Einhorn, T. A. 1996. The bone organ system: form and function. In: Marcus, R.; Feldman, D.; Kelsey, J. (eds.). *Osteoporosis*. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 3-22. ISBN: 978-0673469960.
- Etok, S. E.; Valsami-Jones, E.; Wess, T. J.; Hiller, J. C.; Maxwell, C. A.; Rogers, K. D.; Manning, D. A. C.; White, M. L.; Lopez-Capel, E.; Collins, M. J.; Buckley, M.; Penkman, K. E. H.; Woodgate, S. L. 2007. Structural and chemical changes of thermally treated bone apatite. *Journal of Materials Science*, 42(23): 9807-9816. DOI: 10.1007/s10853-007-1993-z.
- Ferreira, M. T.; Vicente, R.; Navega, D.; Gonçalves, D.; Curate, F.; Cunha, E. 2014. A new forensic collection housed at the University of Coimbra, Portugal: the 21st century identified skeletal collection. *Forensic Science International*, 245: 202.e1-202.e5. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.09.021.
- Figueiredo, M.; Fernando, A.; Martins, G.; Freitas, J.; Judas, F.; Figueiredo, H. 2010. Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramics International*, 36(8): 2383-2393. DOI: 10.1016/j.ceramint.2010.07.016.
- Forbes, G. 1941. The effects of heat on the histological structure of bone. *Police Journal* 14:50-60. DOI: 10.1177/0032258X4101400108.

- Fredericks, J. D.; Bennett, P.; Williams, A.; Rogers, K. D. 2012. FTIR spectroscopy: A new diagnostic tool to aid DNA analysis from heated bone. *Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 375-380. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.07.014.
- Frutos, L. R. 2005. Metric determination of sex from the humerus in a Guatemalan forensic sample. *Forensic Science International*, 147(2-3): 153-157. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.09.077.
- Gonçalves, D. 2011. The reliability of osteometric technics for the sex determination of burned human skeletal remains. *Homo- Journal of Comparative Human Biology*, 62(5): 351-358. DOI: 10.1016/j.jchb.2011.08.003.
- Gonçalves, D. M. D. S. 2012. *Cremins. The Value of Quantitative Analysis for the Bioanthropological Research of Burned Human Skeletal Remains*. Dissertação de Doutorado em Antropologia Biológica. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra.
- Gonçalves, D.; Thompson, T. J.; Cunha, E. 2013. Osteometric sex determination of burned human skeletal remains. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(7): 906-911. DOI: 10.1016/j.jflm.2013.07.003.
- Gonçalves, D.; Vassalo, A. R.; Mamede, A. P.; Makhoul, C.; Piga, G.; Cunha, E.; Marque, 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.
- Kanis, J.; Glüer, C. C. 2000. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporosis International*, 11: 192–202. DOI: 10.1007/s001980050281.
- Keenan, S. W.; Engel, A. S.; Roy, A.; Bovenkamp-Langlois, G. L. 2015. Evaluating the consequences of diagenesis and fossilization on bioapatite lattice structure and composition. *Chemical Geology*, 413:18-27. DOI: 10.1016/j.chemgeo.2015.08.005.
- Keenan, S. W.; Engel, A. S. 2017. Early diagenesis and recrystallization of bone. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 196: 209-223. DOI: 10.1016/j.gca.2016.09.033.

- Kelly, P. J.; Twomey, L.; Sambrook, P. N.; Eisman, J. A. 1990. Sex differences in peak adult bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(11): 1169-1175. DOI: 10.1002/jbmr.5650051112.
- Khan, A. A.; Bachrach, L.; Brown, J. P.; Hanley, D. A.; Josse, R. G.; Kendler, D. L.; Leib, E. S.; Lentle, B. C.; Leslie, W. D.; Lewiecki, E. M.; Miller, P. D.; Nicholson, R. L.; O'Brien, C.; Olszynski, W. P.; Theriault, M. Y. D.; Watts, N. B. 2004. Standards and guidelines for performing central dual-energy x-ray absorptiometry in premenopausal women, men, and children: a report from the Canadian panel of the international society of clinical densitometry. *Journal of Clinical Densitometry*, 7(1): 51-63. DOI: 10.1385/JCD:7:1:51.
- 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.
- Hamdy, R.; Kiebzak, G. M.; Seier, E.; Watts, N. B. 2006. The prevalence of significant left-right differences in hip bone mineral density. *Osteoporosis international*, 17(12), 1772-1780. DOI: 10.1007/s00198-006-0192-0.
- Hedges, R.E.M.; 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: 201-209. DOI: 10.1006/jasc.1995.0022.
- Henry, Y. M.; Eastell, R. 2000. Ethnic and gender differences in bone mineral density and bone turnover in young adults: effect of bone size. *Osteoporosis International*, 11(6): 512-517. DOI: 10.1007/s001980070094.
- Herrmann, B. 1977. On histological investigations of cremated human remains. *Journal of Human Evolution*, 6:101-102. DOI: 10.1016/S0047-2484(77)80112-7.
- Hillman, L. 1996. Bone mineral acquisition in utero and during infancy and childhood. *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Treatment*, 2: 449-64.
- Hwang, H. J.; Park, S. Y.; Lee, S. H.; Han, S. B.; Ro, K. H. 2012. Differences in bone mineral density between the right and left hips in postmenopausal women. *Journal of Korean Medical Science*, 27(6), 686-690. DOI: 10.3346/jkms.2012.27.6.686.
- Lamendin, H.; Baccino, E.; Humbert, J. F.; Tavernier, J. C.; Nossintchouk, R. M.; Zerilli, A. 1992. A simple technique for age estimation in adult corpses:

- the two criteria dental method. *Journal of Forensic Science*, 37(5): 1373-1379. DOI: 10.1520/JFS13327J.
- Lebon, M.; Reiche, I.; Bahain, J. J.; Chadeaux, C.; Moigne, A. M.; Fröhlich, F.; Sémah, F.; Schwarcz, H. P.; Falguères, C. 2010. New parameters for the characterization of diagenetic alterations and heat-induced changes of fossil bone mineral using Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of Archaeological Science*, 37(9): 2265-2276. DOI: 10.1016/j.jas.2010.03.024.
- Lewiecki, E. M.; Gordon, C. M.; Baim, S.; Leonard, M. B.; Bishop, N. J.; Bianchi, M. L.; Kalkwarf, H. J.; Langman, C. B.; Plotkin, H.; Rauch, F.; Zemel, B. S.; Binkley, N.; Bilezikian, J. P.; Kendler, D. L.; Hans, D. B.; Silverman, S. 2008. International Society for Clinical Densitometry 2007 adult and pediatric official positions. *Bone*, 43(6), 1115-1121.
- Lewiecki, E. M.; Binkley, N. 2017. DXA: 30 years and counting: Introduction to the 30th anniversary issue. *Bone*, 104: 1-3. DOI: 10.1016/j.bone.2016.12.013
- Lilley, J.; Walters, B. G.; Heath, D. A.; Drolc, Z. 1992. Comparison and investigation of bone mineral density in opposing femora by dual-energy X-ray absorptiometry. *Osteoporosis International*, 2(6), 274-278. DOI: 10.1007/BF01623182.
- Lopes, J. B.; Danilevicius, C. F.; Caparbo, V. F.; Takayama, L.; Carvalho, J. F.; Pereira, R. M. 2009. Effect of the bilateral hip bone density measurement on clinical practice in elderly subjects. *Maturitas*, 63(3), 257-260. DOI: 10.1016/j.maturitas.2009.05.007.
- Lopez-Polin, L. 2012. Possible interferences of some conservation treatments with subsequent studies on fossil bones: A conservator's overview. *Quaternary International*, 275: 120-127. DOI: 10.1016/j.quaint.2011.07.039.
- Lovejoy, C. O.; Meindl, R. S.; Mensforth, R. P.; Barton, T. J. 1985. Multifactorial determination of skeletal age at death: a method and blind tests of its accuracy. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1): 1-14. DOI: 10.1002/ajpa.1330680102.
- 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.

- Marks, S. C.; Odgren, P. R. 2002. Structure and development of the skeleton. *In*: Bilezikian, J. P.; Raisz L. G.; Rodan, G. A. (eds.). *Principles of bone biology*. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 3-15. ISBN: 978-0-12-098652-1.
- McKinley, J. I. 2015. The heat of the pyre. *In*: Schmidt, C.W.; Symes S. A. (eds.). *The analysis of burned human remains*. 2nd edition. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 181-202. ISBN: 9780128005217.
- McPherson, F. J. 2013. Sexual dimorphism in primates. *Journal of Primatology*, 2: 2. DOI: 10.4172/2167-6801.1000e121.
- Meindl, R. S.; Lovejoy, C. O. 1985. Ectocranial suture closure: a revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1): 57-66. DOI: 10.1002/ajpa.1330680106.
- Miller, P. D. 2017. The history of bone densitometry. *Bone*, 104: 4-6. DOI: 10.1016/j.bone.2017.06.002.
- 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: 90-102. DOI: 10.1016/j.palaeo.2007.01.011.
- 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: j.forsciint.2007.05.008.
- Navega, D.; Coelho, J. D. O.; Cunha, E.; Curate, F. 2018. DXAGE: A new method for age at death estimation based on femoral bone mineral density and artificial neural networks. *Journal of Forensic Sciences*, 63(2): 497-503. DOI: 10.1111/1556-4029.13582.
- Nielsen-Marsh, C. M.; Hedges, R. E. 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. 2000. 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.

- Parsons, T. J.; Prentice, A.; Smith, E. A.; Cole, T. J.; Compston, J. E. 1996. Bone mineral mass consolidation in young British adults. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11(2): 264-274. DOI: 10.1002/jbmr.5650110216.
- Paschall, A.; Ross, A. H. 2018. Biological sex variation in bone mineral density in the cranium and femur. *Science & Justice*, 58(4): 287-291. DOI: 10.1016/j.scijus.2018.01.002.
- 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.
- 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*, 35:2171-2178. DOI: 10.1016/j.jas.2008.02.003.
- 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.
- Pijoan, C. M.; Mansilla, J.; Leboreiro, I.; Lara, V. H.; Bosch, P. 2007. Thermal alterations in archaeological bones. *Archaeometry*, 49(4): 713-727. DOI: 10.1111/j.1475-4754.2007.00331.x.
- Posner, A. S. 1969. Crystal chemistry of bone mineral. *Physiological Reviews*, 49(4):760-792. DOI: 10.1152/physrev.1969.49.4.760.
- Rodan, G. A.; Raisz, L. G.; Bilezikian, J. P. 2002. Pathology of Osteoporosis. In: Bilezikian, J. P.; Raisz; L. G.; Rodan; G. A. (eds.). *Principles of bone biology*. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 1275-1289. ISBN: 978-0-12-098652-1.
- Rossi, D.; De Gruchy, S.; Lovell, N. C. 2004. A comparative experiment in the consolidation of cremated bone. *International Journal of Osteoarchaeology*, 14(2): 104-111. DOI: 10.1002/oa.715.
- Schoeninger, M. J.; Moore, K. M.; Murray, M. L.; Kingston, J. D. 1989. Detection of bone preservation in archaeological and fossil samples. *Applied Geochemistry*, 4: 281-292. DOI: 10.1016/0883-2927(89)90030-9.
- Schurr, M. R.; Hayes, R. G.; Cook, D. C. 2015. Thermally induced changes. In: Schmidt, C.W.; Symes, S. A. (eds.). *The analysis of burned human*

- remains*. 2nd edition. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 105-118. ISBN: 9780128005217.
- 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.
- Schwarz, P.; Jørgensen, N. R.; Jensen, L. T.; Vestergaard, P. 2011. Bone mineral density difference between right and left hip during ageing. *European Geriatric Medicine*, 2(2): 82-86. DOI: 10.1016/j.eurger.2011.01.008.
- Seeman, E. 1998. Growth in bone mass and size—are racial and gender differences in bone mineral density more apparent than real?. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(5): 1414-1419. DOI: 10.1210/jcem.83.5.4844.
- 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.
- Shipman, P.; Foster, G.; Schoeninger, M. 1984. Burnt bones and teeth: an experimental study of colour, morphology, crystal structure and shrinkage. *Journal of Archaeological Science*, 11(4): 307-325. DOI: 10.1016/0305-4403(84)90013-X.
- 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.
- Solheim, T. 1993. A new method for dental age estimation in adults. *Forensic Science International*, 59(2): 137-147. DOI: 10.1016/0379-0738(93)90152-Z
- Spradley, M. K.; Jantz, R. L. 2011. Sex estimation in forensic anthropology: skull versus postcranial elements. *Journal of Forensic Sciences*, 56(2): 289-296. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2010.01635.x.
- Squires, K. E.; Thompson, T. J.; Islam, M.; Chamberlain, A. 2011. The application of histomorphometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy to the analysis of early Anglo-Saxon burned bone. *Journal of Archaeological Science*, 38(9): 2399-2409. DOI: 10.1016/j.jas.2011.04.025.

- 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. 2004. Infrared Spectroscopy: fundamentals and applications. Hoboken, Nova Jersey, John Wiley & Sons Ltd. ISBN: 9780470854280.
- Surovell, T.A.; Stiner, M. C. 2001. Standardizing infra-red measures of bone mineral crystallinity: an experimental approach. *Journal of Archaeological Science*, 28:633-642. DOI: 10.1006/jasc.2000.0633.
- Symes, S. A.; Rainwater, C. W.; Chapman, E. N.; Gipson, D. R.; Piper, A. L. 2015. Patterned thermal destruction in a forensic setting. In: Schmidt, C.W.; Symes; S. A. (eds.). *The analysis of burned human remains*. 2nd edition. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 17-59. ISBN: 9780128005217.
- Termine, J. D.; Posner, A. S. 1966. Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions. *Science*, 153(3743), 1523-1525. DOI: 10.1126/science.153.3743.1523.
- Thompson, T. 2004. Recent advances in the study of burned bone and their implications for forensic anthropology. *Forensic Science International*, 146: S203-S205. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.09.063.
- Thompson, T. 2005. Heat-induced dimensional changes in bone and their consequences for forensic anthropology. *Journal of Forensic Science*, 50(5): JFS2004297-8. DOI: 10.1520/JFS2004297.
- 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.; Piduru, K.; Marcel, A. 2011. An investigation into the internal and external variables acting on crystallinity index using Fourier Transform Infrared Spectroscopy on unaltered and burned bone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 299(1-2): 168-174. DOI: 10.1016/j.palaeo.2010.10.044.
- Thompson, T. J. U.; 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. 2015. The analysis of heat-induced crystallinity change in bone. In: Schmidt, C.W.; Symes, S. A. (eds.). *The analysis of burned human remains*. 2nd edition. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 323-337. ISBN: 9780128005217.
- Thompson, T.; Ulguim, P.F. 2016. Burned Human Remains. In: Blau, S.; Ubelaker, D. H. (eds.). *Handbook of forensic anthropology and archaeology*. Abingdon, Routledge: 391-401. ISBN: 9781629583853.
- Thompson, T. J. U.; Gonçalves, D.; Squires, K.; Ulguim, P. 2017. Thermal Alteration on the Body. In: Schotsmans, E. M. J.; Márquez-Grant, N.; Forbes, S. L. (eds.). *Taphonomy of human remains: forensic analysis of the dead and the depositional environment*. Hoboken, Nova Jersey, John Wiley & Sons Ltd: 318-334. ISBN: 9781118953358.
- Thurman, M. D.; Willmore, L. J. 1981. A replicative cremation experiment. *North American Archaeologist*, 2(4): 275-283. DOI: 10.2190/29A5-84ED-4MB8-EP3M.
- Trueman, C. N.; Behrensmeier, 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.

- Tuross, N.; Behrensmeyer, A. K.; Eanes, E. D. 1989. Strontium increases and crystallinity changes in taphonomic and archaeological bone. *Journal of Archaeological Science*, 16(6): 661-672.
- Ulijaszek, S.; Kerr, D. 1999. Anthropometric measurement error and the assessment of nutritional status. *British Journal of Nutrition*, 82: 165-177. DOI: 10.1016/0305-4403(89)90030-7.
- van Vark, G.N.; Amesz-Voorhoeve, W.; Cuijpers, A. 1996. Sex-diagnosis of human cremated skeletal material by means of mathematical-statistical and data-analytical methods. *Homo*, 47: 305-338.
- Wahl, J. K. 1996. Erfahrungen zur metrischen Geschlechtsdiagnose bei Leichenbränden. *Homo*, 47(1-3): 339-359.
- Wahner, H. W. 1996. Use of densitometry in management of osteoporosis. In: Marcus, R.; Feldman, D.; Kelsey, J. (eds.). *Osteoporosis*. Cambridge, Massachusetts, Academic Press: 1055-1074. ISBN: 978-0673469960.
- Ward, R.; Jamison, P. 1991. Measurement precision and reliability in craniofacial anthropometry: implications and suggestions for clinical applications. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology*, 11: 156-164.
- Waterhouse, K. B. 2010. A Review of Fire-Related Deaths in Alberta. *Canadian Society of Forensic Science Journal*, 43(4): 171-180. DOI: 10.1080/00085030.2010.10768134.
- Waterhouse, K. 2013a. The effect of weather conditions on burnt bone fragmentation. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(5): 489-495. DOI: 10.1016/j.jflm.2013.03.016.
- Waterhouse, K. 2013b. The effect of victim age on burnt bone fragmentation: Implications for remains recovery. *Forensic Science International*, 231(1-3): 409-e1. DOI: 10.1016/j.forsciint.2013.04.032.
- Waterhouse, K. 2013c. Post-burning fragmentation of calcined bone: Implications for remains recovery from fatal fire scenes. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(8): 1112-1117. DOI: 10.1016/j.jflm.2013.10.004.
- Weiner, S; Bar-Yosef, O. 1990. States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: a survey. *Journal of Archaeological Science*, 17:187-196. DOI: 10.1016/0305-4403(90)90058-D.

More than meets the eye

White, T. D.; Black, M. T.; Folkens, P. A. 2011. *Human Osteology*. 3th edition. Cambridge, Massachusetts, Academic Press. ISBN: 9780080920856.

World Health Organization. 1994. *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis*. Geneva, Technical Report Series, WHO. ISBN: 9241208430.

Apêndices

A.1. Exemplo dos resultados obtidos pela DXA.

Name: CEI XXI 13 Patient ID: DOB: 01 January 1951	Sex: Female Ethnicity: White	Height: Weight: Age: 68
---	---------------------------------	-------------------------------

Referring Physician: ANTROPOLOGIA

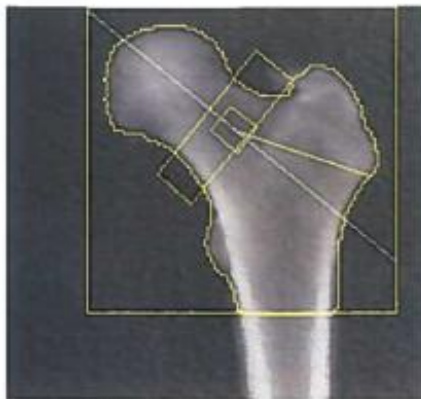


Image not for diagnostic use
k = 1.157, d0 = 58.1
94 x 94
NECK -49 x 15

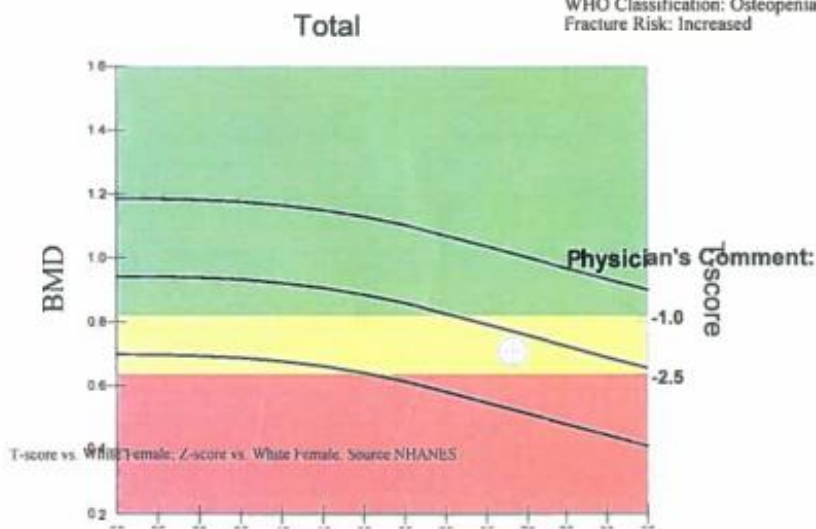
Scan Information:

Scan Date: 07 March 2019 ID: K03071941
Scan Type: a Left Hip
Analysis: 07 March 2019 18:25 Version 12.6:5
Left Hip
Operator:
Model: QDR 4500C (S/N 47998)
Comment:

DXA Results Summary:

Region	Area (cm ²)	BMC (g)	BMD (g/cm ³)	T-score	PR (%)	Z-score	AM (%)
Neck	4.44	2.43	0.547	-2.7	64	-1.0	83
Troch	8.28	4.76	0.575	-1.3	82	-0.0	99
Inter	17.80	14.45	0.812	-1.9	74	-0.7	88
Total	30.52	21.64	0.709	-1.9	75	-0.5	92
Ward's	1.10	0.38	0.343	-3.3	47	-0.9	76

Total BMD CV 1.0%, ACF = 1.021, BCF = 0.976, TH = 1.805
WHO Classification: Osteopenia
Fracture Risk: Increased



HOLOGIC

A.2. Diferenças relativas para o estudo da assimetria bilateral entre antímeros não queimados para cada parâmetro, em cada indivíduo.

<u>Indivíduo 105</u>																					
Temperatura: 600°C, F																					
	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Não queimado	4,46	11,59	15,95	32,00	1,06	0,588	0,433	0,899	0,687	0,324	2,62	5,02	14,34	21,99	0,34	9,87	0,481	4,74	8,48	0,380	3,23
Para queimar	4,51	10,54	15,33	30,38	1,11	0,550	0,394	0,830	0,637	0,309	2,48	4,15	12,72	19,35	0,34	10,48	0,449	4,71	8,66	0,301	2,60
Diferença relativa (%)	1,12	-9,06	-3,89	-5,06	4,72	-6,46	-9,01	-7,68	-7,28	-4,63	-5,34	-17,33	11,30	12,01	0,00	6,18	-6,65	-0,63	2,12	-20,79	-19,50

<u>Indivíduo 249</u>																					
Temperatura: 600°C, M																					
	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Não queimado	4,91	13,64	27,40	45,95	1,05	0,827	0,662	1,071	0,924	0,550	4,06	9,04	29,35	42,44	0,58	14,90	0,460	6,86	11,91	0,420	5,00
Para queimar	5,31	12,39	24,17	41,87	1,12	0,801	0,734	1,133	0,973	0,565	4,25	9,09	27,39	40,73	0,63	15,21	0,496	7,55	11,29	0,510*	5,76*
Diferença relativa (%)	8,15	-9,16	-11,79	-8,88	6,67	-3,14	10,88	5,79	5,30	2,73	4,68	0,55	-6,68	-4,03	8,62	2,08	7,83	10,06	-5,21	21,43	15,20

Indivíduo 269

																Temperatura: 700°C, F					
	Fémur										Patela					MT1					
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
Não queimado	4,92	9,99	17,77	32,67	1,00	0,577	0,467	0,841	0,687	0,354	2,84	4,67	14,94	22,45	0,35	12,42	0,504	6,26	10,06	0,246	2,48
Para queimar	5,21	9,73	18,81	33,74	1,11	0,520	0,463	0,787	0,653	0,361	2,71	4,51	14,80	22,02	0,40	11,84	0,495	5,86	9,38	0,241	2,26
Diferença relativa (%)	5,89	-2,60	5,85	3,28	11,00	-9,88	-0,86	-6,42	-4,95	1,98	-4,58	-3,43	-0,94	-1,92	14,29	-4,67	-1,79	-6,39	-6,76	-2,03	-8,87

Indivíduo 276

																Temperatura: 700°C, M					
	Fémur										Patela					MT1					
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
Não queimado	4,93	11,67	18,32	34,92	1,05	0,860	0,719	1,223	1,003	0,640	4,24	8,39	22,41	35,03	0,68	12,23	0,540	6,60	11,84	0,322	3,82
Para queimar	4,73	12,09	19,18	36,00	1,00	0,840	0,736	1,229	1,012	0,643	3,98	8,90	23,57	36,44	0,64	12,50	0,520	6,49	11,11	0,356	3,96
Diferença relativa (%)	-4,06	3,60	4,69	3,09	-4,76	-2,33	2,36	0,49	0,90	0,47	-6,13	6,08	5,18	4,03	-5,88	2,21	-3,70	-1,67	-6,17	10,56	3,66

Indivíduo 75

																Temperatura: 800°C, F					
	Fémur										Patela					MT1					
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
Não queimado	4,86	13,16	20,71	38,73	1,15	0,453	0,445	0,738	0,603	0,279	2,20	5,86	15,28	23,34	0,32	11,49	0,421	4,84	11,88	0,371	4,41
Para queimar	5,16	11,39	20,87	37,42	1,13	0,515	0,445	0,739	0,619	0,266	2,66	5,07	15,43	23,16	0,30	10,56	0,526	5,55	10,68	0,337	3,60
Diferença relativa (%)	6,17	-13,45	0,77	-3,38	-1,74	13,69	0,00	0,14	2,65	-4,66	20,91	-13,48	0,98	-0,77	-6,25	-8,09	24,94	14,67	10,10	-9,16	-18,37

More than meets the eye

Indivíduo 274

Temperatura: 800°C, M

	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Não queimado	5,51	12,89	19,04	37,44	1,11	0,453	0,451	0,652	0,553	0,282	2,50	5,81	12,41	20,72	0,31	13,89	0,363	5,04	10,76	0,257	2,76
Para queimar	5,55	12,66	17,99	36,20	1,04	0,459	0,444	0,670	0,558	0,295	2,55	5,62	12,05	20,21	0,31	13,32	0,345*	4,59	11,62	0,263	3,06
Diferença relativa (%)	0,73	-1,78	-5,51	-3,31	-6,31	1,32	-1,55	2,76	0,90	4,61	2,00	-3,27	-2,90	-2,46	0,00	-4,10	-4,96	-8,93	7,99	2,33	10,87

Indivíduo 167

Temperatura: 900°C, F

	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Não queimado	5,32	12,09	19,99	37,40	1,04	0,453	0,493	0,677	0,586	0,298	2,41	5,96	13,53	21,90	0,31	12,31	0,468	5,76	10,21	0,345	3,52
Para queimar	5,47	11,28	23,87	40,62	1,07	0,426	0,462	0,627	0,554	0,257	2,33	5,21	14,96	22,50	0,28	11,89	0,474	5,64	11,81	0,333	3,93
Diferença relativa (%)	2,82	-6,70	19,41	8,61	2,88	-5,96	-6,29	-7,39	-5,46	-13,76	-3,32	-12,58	10,57	2,74	-9,68	-3,41	1,28	-2,08	15,67	-3,48	11,65

Indivíduo 63

Temperatura: 900°C, M

	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Não queimado	5,24	13,61	22,03	40,87	1,11	0,833	0,875	1,236	1,064	0,593	4,36	11,90	27,22	43,48	0,66	14,45	0,657	9,49	10,54	0,407	4,29
Para queimar	5,41	13,81	23,15	42,37	1,07	0,773	0,874	1,145	1,009	0,516	4,18	12,07*	26,51	42,77	0,55	14,19	0,647	9,19*	11,62	0,367	4,27
Diferença relativa (%)	3,24	1,47	5,08	3,67	-3,60	-7,20	-0,11	-7,36	-5,17	-12,98	-4,13	1,43	-2,61	-1,63	-16,67	-1,80	-1,52	-3,16	10,25	-9,83	-0,47

Indivíduo 13

																	Temperatura: 1000°C, F																				
																	Patela			MT1																	
																	Fémur																				
																	Área					DMO					CMO										
																	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
Não queimado Para queimar Diferença relativa (%)	4,44	8,28	17,80	30,52	1,10	0,547	0,575	0,812	0,709	0,343	2,43	4,76	14,45	21,64	0,38	9,52	0,491	4,67	8,60	0,388	3,34																
	4,30	8,87	16,99	30,16	1,09	0,580	0,553	0,825	0,710	0,418	2,49	4,91	14,02	21,42	0,46	8,73*	0,509	4,44	8,50	0,339	2,88																
	-3,15	7,13	-4,55	-1,18	-0,91	6,03	-3,83	1,60	0,14	21,87	2,47	3,15	-2,98	-1,02	21,05	-8,30	3,67	-4,93	-1,16	-12,63	-13,77																

Indivíduo 11

																	Temperatura: 1000°C, M																				
																	Patela			MT1																	
																	Fémur																				
																	Área					DMO					CMO										
																	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
Não queimado Para queimar Diferença relativa (%)	5,31	12,09	23,32	40,72	1,11	0,802	0,619	1,051	0,890	0,400	4,26	7,48	24,52	36,26	0,45	11,95	0,445	5,32	10,66	0,366	3,90																
	5,35	13,22	22,27	40,84	1,11	0,848	0,601	0,985	0,843	0,448	4,54	7,95	21,93	34,41	0,50	10,90	0,485	5,29	9,30	0,395	3,67																
	0,75	9,35	-4,50	0,29	0,00	5,74	-2,91	-6,28	-5,28	12,00	6,57	6,28	-	-5,10	11,11	-8,79	8,99	-0,56	-12,76	7,92	-5,90																

* indica outlier.

A.3. Diferenças relativas pré- e pós-consolidante para cada indicador, em cada indivíduo.

<u>Indivíduo 105</u>																					
Temperatura: 600°C, F																					
	Fémur					CMO					Patela			MT1							
	Área					DMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO					
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	4,29	9,44	15,45	29,18	1,00	0,585	0,405	0,848	0,666	0,327	2,51	3,82	13,11	19,44	0,33	10,76	0,433	4,66	8,63	0,327	2,83
Depois	4,25	9,43	16,85	30,52	1,11	0,606	0,418	0,881	0,700	0,352	2,58	3,94	14,84	21,35	0,39	10,05	0,463	4,65	8,19	0,353	2,89
Diferença relativa (%)	-0,93	-0,11	9,06	4,59	11,00	3,59	3,21	3,89	5,11	7,65	2,79	3,14	13,20	9,83	18,18	-6,60	6,93	-0,21	-5,10	7,95	2,12

<u>Indivíduo 249</u>																					
Temperatura: 600°C, M																					
	Fémur					CMO					Patela			MT1							
	Área					DMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO					
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	5,11	12,90	19,94	37,95	1,07	0,829	0,755	1,090	0,941	0,575	4,23	9,74	21,73	35,70	0,62	14,95	0,485	7,25	11,72	0,475	5,57
Depois	5,11	11,98	24,60	41,69	1,06	0,835	0,756	1,194	1,024	0,596	4,26	9,06	29,38	42,70*	0,63	13,37	0,550	7,35	11,07	0,394	4,36
Diferença relativa (%)	0,00	-7,13	23,37	9,86	-0,93	0,72	0,13	9,54	8,82	3,65	0,71	-6,98	35,20	19,61	1,61	10,57	13,40	1,38	-5,55	-17,05	21,72

<u>Indivíduo 269</u>																					
Temperatura: 700°C, F																					
	Fémur					CMO					Patela			MT1							
	Área					DMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO					
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	4,81	8,96	15,40	29,17	1,07	0,600	0,531	0,845	0,708	0,455	2,89	4,76	13,01	20,65	0,49	11,45	0,488	5,59	9,22	0,267	2,47
Depois	4,62	9,37	16,64	30,63	1,07	0,595	0,520	0,838	0,704	0,453	2,75	4,87	13,94	21,56	0,49	11,54	0,505	5,83	8,86	0,240	2,12
Diferença relativa (%)	-3,95	4,58	8,05	5,01	0,00	-0,83	-2,07	-0,83	-0,56	-0,44	-4,84	2,31	7,15	4,41	0,00	0,79	3,48	4,29	-3,90	-10,11	14,17

Indivíduo 276																	Temperatura: 700°C, M				
	Fémur										Patela			MT1							
	Área					DMO					CMO			Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO		
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter							Total	Ward
Antes	4,36	11,48	15,89	31,73	1,05	0,870	0,781	1,244	1,025	0,662	3,80	8,97	19,76	32,53	0,69	12,45	0,515	6,41	10,89	0,326	3,55
Depois	4,79	10,98	18,17	33,95	1,05	0,869	0,789	1,268	1,057	0,674	4,16	8,67	23,05	35,88	0,71	12,35	0,521	6,43	10,36	0,351	3,63
Diferença relativa (%)	9,86	-4,36	14,35	7,00	0,00	-0,11	1,02	1,93	3,12	1,81	9,47	-3,34	16,65	10,30	2,90	-0,80	1,17	0,31	-4,87	7,67	2,25

Indivíduo 75																	Temperatura: 800°C, F				
	Fémur										Patela			MT1							
	Área					DMO					CMO			Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO		
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter							Total	Ward
Antes	4,49	9,50	15,50	29,50	1,09	0,654	0,536	0,896	0,743	0,391	2,94	5,09	13,89	21,92	0,43	9,59	0,620	5,95	9,63	0,377	3,63
Depois	4,79	9,96	14,71	29,46	1,09	0,606	0,553	0,945	0,758	0,385	2,90	5,50	13,91	22,32	0,42	8,71	0,664	5,78	9,58	0,387	3,71
Diferença relativa (%)	6,68	4,84	-5,10	-0,14	0,00	-7,34	3,17	5,47	2,02	-1,53	-1,3	8,06	0,14	1,82	-2,33	-9,18	7,10	-2,86	-0,52	2,65	2,20

Indivíduo 274																	Temperatura: 800°C, M				
	Fémur										Patela			MT1							
	Área					DMO					CMO			Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO		
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter							Total	Ward
Antes	5,14	9,23	21,20	35,57	1,07	0,421	0,469	0,668	0,581	0,341	2,16	4,33	14,16	20,65	0,37	13,33	0,337	4,49	10,98	0,308	3,38
Depois	4,30	9,99	24,54	38,82	1,09	0,317*	0,466	0,649	0,565	0,220	1,36*	4,66	15,92	21,93	0,24*	13,50	0,340*	4,59	9,97	0,321	3,20
Diferença relativa (%)	-16,34	8,23	15,75	9,14	1,87	-24,70	-0,64	-2,84	-2,75	-35,48	-37,04	7,62	12,43	6,20	-35,14	1,28	0,89	2,23	-9,20	4,22	-5,33

More than meets the eye

Indivíduo 167

Temperatura: 900°C, F

	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	4,75	8,48	16,55	29,78	1,25	0,547	0,588	0,786	0,691	0,417	2,60	4,99	13,01	20,59	0,52	10,62	0,535	5,68	8,99	0,410	3,69
Depois	4,62	8,51	16,76	29,88	1,25	0,561	0,595	0,804	0,707	0,452	2,59	5,06	13,48	21,13	0,56	8,90	0,602	5,36	8,18	0,438	3,58
Diferença relativa (%)	-2,74	0,35	1,27	0,34	0,00	2,56	1,19	2,29	2,32	8,39	-0,38	1,40	3,61	2,62	7,69	-16,20	12,52	-5,63	-9,01	6,83	-2,98

Indivíduo 63

Temperatura: 900°C, M

	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	4,82	11,70	18,35	34,87	1,07	0,905	0,974	1,344	1,159	0,654	4,36	11,39	24,67	40,42	0,70	10,68	0,869	9,28	8,74	0,580	5,06
Depois	4,95	12,10	21,04	38,08	1,05	0,926	0,991*	1,351	1,181	0,624	4,58	11,99*	28,42	44,99*	0,66	10,54	0,872*	9,19	7,92	0,713*	5,65
Diferença relativa (%)	2,70	3,42	14,66	9,21	-1,87	2,32	1,75	0,52	1,90	-4,59	5,05	5,27	15,20	11,31	-5,71	-1,31	0,35	-0,97	-9,38	22,93	11,66

Indivíduo 13

Temperatura: 1000°C, F

	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	4,13	7,53	13,39	25,05	1,11	0,732	0,676	1,029	0,874	0,540	3,02	5,09	13,78	21,89	0,60	7,28	0,620	4,51	7,17	0,498	3,57
Depois	3,76	7,43	16,44	27,64	1,07	0,741	0,692	1,076	0,927	0,591	2,79	5,14	17,69	25,62	0,63	7,02*	0,650	4,56	6,47	0,496	3,21
Diferença relativa (%)	-8,96	-1,33	22,78	10,34	-3,60	1,23	2,37	4,57	6,06	9,44	-7,62	0,98	28,37	17,04	5,00	-3,57	4,84	1,11	-9,76	-0,40	-10,08

Indivíduo 11																Temperatura: 1000°C, M						
	Fémur										Patela			MT1								
	Área					DMO					CMO			Área			DMO			CMO		
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO	
Antes	4,80	9,87	19,14	33,81	1,11	1,099	0,745	1,166	1,034	0,613	5,27	7,35	22,33	34,95	0,68	9,54	0,598	5,71	8,99	0,414	3,72	
Depois	4,68	9,91	18,92	33,51	1,05	1,077	0,747	1,189	1,043	0,643	5,04	7,41	22,50	34,95	0,68	8,48	0,652	5,52	8,94	0,408	3,65	
Diferença relativa (%)	-2,50	0,41	-1,15	-0,89	-5,41	-2,00	0,27	1,97	0,87	4,89	-4,36	0,82	0,76	0,00	0,00	-11,11	9,03	-3,33	-0,56	-1,45	-1,88	

* indica outlier.

A.4. Diferenças relativas pré- e pós-queima para cada indicador, em cada indivíduo.

Indivíduo 105																					
Temperatura: 600°C, F																					
	Fémur															Patela			MTI		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	4,51	10,54	15,33	30,38	1,11	0,550	0,394	0,830	0,637	0,309	2,48	4,15	12,72	19,35	0,34	10,48	0,449	4,71	8,66	0,301	2,60
Depois	4,29	9,44	15,45	29,18	1,00	0,585	0,405	0,848	0,666	0,327	2,51	3,82	13,11	19,44	0,33	10,76	0,433	4,66	8,63	0,327	2,83
Diferença relativa (%)	-4,88	-10,44	0,78	-3,95	-9,91	6,36	2,79	2,17	4,55	5,83	1,21	-7,95	3,07	0,47	-2,94	2,67	3,56	-1,06	-0,35	8,64	8,85

Indivíduo 249																					
Temperatura: 600°C, M																					
	Fémur															Patela			MTI		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	5,31	12,39	24,17	41,87	1,12	0,801	0,734	1,133	0,973	0,565	4,25	9,09	27,39	40,73	0,63	15,21	0,496	7,55	11,29	0,510*	5,76*
Depois	5,11	12,90	19,94	37,95	1,07	0,829	0,755	1,090	0,941	0,575	4,23	9,74	21,73	35,70	0,62	14,95	0,485	7,25	11,72	0,475	5,57
Diferença relativa (%)	-3,77	4,12	-	-9,36	-4,46	3,50	2,86	-3,80	-3,29	1,77	-0,47	7,15	-	-	-1,59	-1,71	-2,22	-3,97	3,81	-6,86	-3,30

Indivíduo 269																					
Temperatura: 700°C, F																					
	Fémur															Patela			MTI		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	5,21	9,73	18,81	33,74	1,11	0,520	0,463	0,787	0,653	0,361	2,71	4,51	14,80	22,02	0,40	11,84	0,495	5,86	9,38	0,241	2,26
Depois	4,81	8,96	15,40	29,17	1,07	0,600	0,531	0,845	0,708	0,455	2,89	4,76	13,01	20,65	0,49	11,45	0,488	5,59	9,22	0,267	2,47
Diferença relativa (%)	-7,68	-7,91	-	-	-3,60	15,38	14,69	7,37	8,42	26,04	6,64	5,54	-	-6,22	22,50	-3,29	-1,14	-4,61	-1,71	10,79	9,29

Indivíduo 276																					
Temperatura: 700°C, M																					
	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	4,73	12,09	19,18	36,00	1,00	0,840	0,736	1,229	1,012	0,643	3,98	8,90	23,57	36,44	0,64	12,50	0,520	6,49	11,11	0,356	3,96
Depois	4,36	11,48	15,89	31,73	1,05	0,870	0,781	1,244	1,025	0,662	3,80	8,97	19,76	32,53	0,69	12,45	0,515	6,41	10,89	0,326	3,55
Diferença relativa (%)	-7,82	-5,05	-17,15	-11,86	5,00	3,57	6,11	1,22	1,28	2,95	-4,52	0,79	-16,16	-10,73	7,81	-0,40	-0,96	-1,23	-1,98	-8,43	-10,35

Indivíduo 75																					
Temperatura: 800°C, F																					
	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	5,16	11,39	20,87	37,42	1,13	0,515	0,445	0,739	0,619	0,266	2,66	5,07	15,43	23,16	0,30	10,56	0,526	5,55	10,68	0,337	3,60
Depois	4,49	9,50	15,50	29,50	1,09	0,654	0,536	0,896	0,743	0,391	2,94	5,09	13,89	21,92	0,43	9,59	0,620	5,95	9,63	0,377	3,63
Diferença relativa (%)	-12,98	-16,59	-25,73	-21,17	-3,54	26,99	20,45	21,24	20,03	46,99	10,53	0,39	-9,98	-5,35	43,33	-9,19	17,87	7,21	-9,83	11,87	0,83

Indivíduo 274																					
Temperatura: 800°C, M																					
	Fémur															Patela			MT1		
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward						
Antes	5,55	12,66	17,99	36,20	1,04	0,459	0,444	0,670	0,558	0,295	2,55	5,62	12,05	20,21	0,31	13,32	0,345*	4,59	11,62	0,263	3,06
Depois	5,14	9,23	21,20	35,57	1,07	0,421	0,469	0,668	0,581	0,341	2,16	4,33	14,16	20,65	0,37	13,33	0,337	4,49	10,98	0,308	3,38
Diferença relativa (%)	-7,39	-27,09	17,84	-1,74	2,88	-8,28	5,63	-0,30	4,12	15,59	-15,29	-22,95	17,51	2,18	19,35	0,08	-2,32	-2,18	-5,51	17,11	10,46

More than meets the eye

Indivíduo 167																				Temperatura: 900°C, F		
	Fémur															Patela			MT1			
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO	
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward							
Antes	5,47	11,28	23,87	40,62	1,07	0,426	0,462	0,627	0,554	0,257	2,33	5,21	14,96	22,50	0,28	11,89	0,474	5,64	11,81	0,333	3,93	
Depois	4,75	8,48	16,55	29,78	1,25	0,547	0,588	0,786	0,691	0,417	2,60	4,99	13,01	20,59	0,52	10,62	0,535	5,68	8,99	0,410	3,69	
Diferença relativa (%)	-13,16	-24,82	-30,67	-26,69	16,82	28,40	27,27	25,36	24,73	62,26	11,59	-4,22	-13,03	-8,49	85,71	-10,68	12,87	0,71	-23,88	23,12	-6,11	

Indivíduo 63																				Temperatura: 900°C, M		
	Fémur															Patela			MT1			
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO	
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward							
Antes	5,41	13,81	23,15	42,37	1,07	0,773	0,874	1,145	1,009	0,516	4,18	12,07*	26,51	42,77	0,55	14,19	0,647	9,19*	11,62	0,367	4,27	
Depois	4,82	11,70	18,35	34,87	1,07	0,905	0,974	1,344	1,159	0,654	4,36	11,39	24,67	40,42	0,70	10,68	0,869	9,28	8,74	0,580	5,06	
Diferença relativa (%)	-10,91	-15,28	-20,73	-17,70	0,00	17,08	11,44	17,38	14,87	26,74	4,31	-5,63	-6,94	-5,49	27,27	-24,74	34,31	0,98	-24,78	58,04	18,50	

Indivíduo 13																				Temperatura: 1000°C, F		
	Fémur															Patela			MT1			
	Área					DMO					CMO					Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO	
	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward							
Antes	4,30	8,87	16,99	30,16	1,09	0,580	0,553	0,825	0,710	0,418	2,49	4,91	14,02	21,42	0,46	8,73*	0,509	4,44	8,50	0,339	2,88	
Depois	4,13	7,53	13,39	25,05	1,11	0,732	0,676	1,029	0,874	0,540	3,02	5,09	13,78	21,89	0,60	7,28	0,620	4,51	7,17	0,498	3,57	
Diferença relativa (%)	-3,95	-15,11	-21,19	-16,94	1,83	26,21	22,24	24,73	23,10	29,19	21,29	3,67	-1,71	2,19	30,43	-16,61	21,81	1,58	-15,65	46,90	23,96	

Indivíduo 11																						
																		Temperatura: 1000°C, M				
		Fémur					CMO					Patela			MT1							
		Área					DMO					Área			DMO			CMO				
Antes		Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Neck	Troch	Inter	Total	Ward	Área	DMO	CMO	Área	DMO	CMO
		5,35	13,22	22,27	40,84	1,11	0,848	0,601	0,985	0,843	0,448	4,54	7,95	21,93	34,41	0,50	10,90	0,485	5,29	9,30	0,395	3,67
Depois		4,80	9,87	19,14	33,81	1,11	1,099	0,745	1,166	1,034	0,613	5,27	7,35	22,33	34,95	0,68	9,54	0,598	5,71	8,99	0,414	3,72
Diferença relativa (%)		-10,28	-25,34	-14,05	-17,21	0,00	29,60	23,96	18,38	22,66	36,83	16,08	-7,55	1,82	1,57	36,00	-12,48	23,30	7,94	-3,33	4,81	1,36

* indica *outlier*.

