RICARDO SIMIONATO BOFFA

Avaliação da microarquitetura de ossos trabeculares

São Carlos 2014

Ricardo Simionato Boffa

Avaliação da microarquitetura de ossos trabeculares

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós– Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo

São Carlos, 2014 AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Boffa, Ricardo Simionato

 Avaliação da microarquitetura de ossos trabeculares
 / Ricardo Simionato Boffa; orientador João Manuel
 Domingos de Almeida Rollo. São Carlos, 2014.

 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação

 Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
 Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
 Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
 2014.
 Estrutura cristalina. 2. Hidroxiapatita. 3. Osso
 humano. 4. Osteoporose. 5. Refinamento de Rietveld. I.
 Título.



Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia EESC / FMRP / IQSC

Ricardo Simionato Boffa

Título: "Avaliação da microarquitetura de ossos trabeculares".

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA -EESC/FMRP/IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 05 /08 / 2014

Prof. Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo (Orientador)

Universidade de São Paulo - USP

Universidade de São Paulo - USP

Assinatura:

Resultado: APROVADO

Assinatura:

Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan

Resultado:

Prof. Dr. Arlindo Neto Montagnoli

Resultado: Aprovado

gro li Assinatura:

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Homologado em:

Av. Trabalhador São-carlense, 400 - Centro - São Carlos - SP - 13566-590 Telefone/Fax: (16) 3373-9586 - E-mail: bioeng@sc.usp.br

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Capes. Gostaria de agradecer ao Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clinicas de São Paulo e a Escola de Engenharia de São Carlos pela parceria e auxilio na execução. A todos os envolvidos na coleta e ensaios das amostras nos respectivos laboratórios e universidades, ao meu orientador prof. dr. João Rollo, que esteve muito presente, auxiliando em todas as partes do trabalho e a todos os amigos e amigas, que tornaram este tempo memorável e prazeroso.

RESUMO

Boffa, R. S. **Avaliação da microarquitetura de ossos trabeculares.** 2014. 74p. Dissertação Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O termo estrutura cristalina entende-se como um conjunto de átomos periodicamente distribuídos no espaço, formando uma rede. O material composto, osso, contém uma parte orgânica formada por colágeno e uma parte inorgânica formada predominantemente por cristais de hidroxiapatita, que possui fórmula molecular Ca10(PO4)6(OH)2 em sua célula unitária. A estrutura cristalina da hidroxiapatita pode indicar a qualidade de ossos trabeculares, pela identificação do tamanho de cristalito, da microdeformação e da proporção de cálcio e fósforo nos três tipos de ossos: normal, osteopênico e osteoporótico. A osteoporose é definida pelo National Institutes of Health como uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea e aumento do risco de fratura. Objetiva-se avaliar e caracterizar a estrutura cristalina da matriz inorgânica de ossos secos trabeculares de vértebras de colunas de cadáveres humanos normais, osteopênicos e osteoporóticos por microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e espectometria de energia dispersiva e difratometria de raios-X, utilizando o método de refinamento de Rietveld, balizando os resultados com os valores de microdureza. Foram utilizados ossos secos trabeculares de vértebras L1 de colunas de nove cadáveres humanos provenientes do Serviço de Verificação de Óbito da capital. Antes da coleta do material, elas foram pré-divididas em três grupos: normal, osteopênico e osteoporótico, através de ultrassonometria de calcâneo. A caracterização dos três tipos de ossos foi feita pelas técnicas de microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura, microanálise por espectrometria de energia dispersiva, microdureza e difratometria de raios-X pelo método de pó com aplicação do método de Rietveld. Os resultados mostraram uma diminuição dos valores de tamanho do cristalito (de 670 para 213 nanômetros), microdureza (de 30,27 para 21,22 knoop), proporção de cálcio e fósforo (de 2,02 para 1,73), número de trabéculas e densidade óssea e um aumento nos valores de microdeformação (de 5,4 para 16,8), sugerindo uma maior desorganização e fragilidade na estrutura cristalina da hidroxiapatita em ossos osteopênicos e osteoporóticos em relação aos normais. A caracterização microestrutural dos cristais de hidroxiapatita em ossos secos trabeculares permitiu diferenciar os três tipos de ossos (normal, osteopênico e osteoporótico) e complementar a avaliação da osteoporose, com ênfase na qualidade óssea.

Palavras-chave: Estrutura cristalina, Hidroxiapatita, Osso humano, Osteoporose,

Refinamento de Rietveld

ABSTRACT

Boffa, R. S. **Assessment of trabecular bones microarchitectures.** 2014. 74p. Dissertação Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The term crystal structure is understood as a set of atoms periodically distributed in space, forming a lattice The composite material, bone, contains a organic part that consists of collagen and a inorganic part that consists predominantly of hydroxyapatite crystals, having molecular formula Ca10(PO4)6(OH)2 in its unit cell. The crystal structure of hydroxyapatite can indicate the trabecular bone quality, by the identification of crystallite size, microstrain and ratio of calcium and phosphorus in bones of three types: normal, osteopenic or osteoporotic. Osteoporosis is defined by the National Institutes of Health as a skeletal disorder characterized by compromised bone strength and increased risk of fracture. The objective is to evaluate and characterize the crystalline structure of the inorganic matrix of dry trabecular bones of vertebral column of normal, osteopenic and osteoporotic human cadavers by optical microscopy, scanning electron microscopy, energy dispersive spectrometry, X-ray diffraction, using the Rietveld refinement method and microhardness. Dried trabecular bone of vertebrae L1 columns of nine human cadavers from the Serviço de Verificação de Óbito of the capital were used. Before sample collection, they were pre-divided into three groups: normal, osteopenic or osteoporotic, through Quantitative ultrasound of the calcaneus. The characterization of the three types of bones were made by optical microscopy, scanning electron microscopy, microanalysis by energy dispersive spectrometry, microhardness and powder X-ray diffraction with application of the Rietveld method. The results showed a decrease of the crystallite size (from 670 to 213 nanometers), hardness (from 30,27 to 21,22 knoop), ratio of calcium and phosphorus (from 2,02 to 1,73), trabecular number and bone density and an increase in microstrain values (from 5,4 to 16,8) suggesting greater fragility and disruption in the crystalline structure of hydroxyapatite in osteopenic and osteoporotic bone compared to normal. Microstructural characterization of hydroxyapatite crystals in dry trabecular bone could differentiate the three types of bones (normal, osteopenic and osteoporotic) and supplement assessment of osteoporosis, with an emphasis on bone quality.

Palavras-chave: Crystal structure, Hydroxyapatite, Human bone, Osteoporosis, Rietveld Refinenment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reflexão de Bragg 22
Figura 2 - Representação do gráfico de Williamson-Hall
Figura 3 - Macroscopia ótica de osso trabecular (6.4x) (Cesar et al., 2013) 31
Figura 4 - Uso da função Shifted Chebyschev e refinamento da radiação de fundo
(background)
Figura 5 - Refinamento das células unitárias e dos Deslocamentos atômicos (Uisos) 44
Figura 6 - Refinamento do fator de escala
Figura 7 - Refinamento do GU, GP, LX, ptec, shft, sfec, SXXX, SYYY e SZZZ 45
Figura 8 - Uso de Marquardt Damping igual a 1 em ciclos de 10 45
Figura 9 - Correção dos efeitos causados pela orientação preferencial utilizando-se o modelo
de March-Dollase nos planos (hkl) igual à (2 1 1), (1 2 1) e (1 1 2) 46
Figura 10 - Microscopia ótica do osso trabecular de vértebra humanas fixadas em resina
epóxi e polidas: a) Normal; b) Osteopênica; c) Osteoporótica
Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura do osso trabecular de vértebras humanas
fixadas em resina epóxi e polidas: a) Normal; b) Osteopênica ; c) Osteoporótica 49
Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura do osso trabecular de vértebras humanas: a)
Normal; b) Osteopênica; c) Osteoporótica 49
Figura 13 - Proporção de cálcio e fósforo em cada grupo 50
Figura 14 - Microdureza na escala Knoop para cada grupo 52
Figura 15 - Difratometria de raios-X de um de cada tipo de osso, sendo o primeiro de cima
para baixo normal, o segundo osteopênico e o terceiro osteoporótico 53
Figura 16 - Difratograma comparativo dos três tipos de ossos
Figura 17 – Estrutura cristalina do osso, sendo: O = vermelho, Ca =azul e P = cinza; 54
Figura 18 - Tamanho do cristalito nos diferentes grupos 55
Figura 19 - Gráfico em colunas da microdeformação em cada grupo 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - As 14 redes Bravais (Pecharsky, 2005)	18
Tabela 2 - Principais fosfatos de cálcio	20
Tabela 3 - Informações possíveis de se analisar pelo difratograma gerado	por raios-X
(Pecharsky, 2005)	24
Tabela 4 - Classificação dos grupos pela análise de ultrassonometria de calcâneo	47
Tabela 5 - Proporção de cálcio e fósforo nos 3 estados do osso	50
Tabela 6 - Medidas das amostras normais	51
Tabela 7 - Medidas das amostras osteopênicas	51
Tabela 8 - Medidas das amostras osteoporóticas	51
Tabela 9 - Tamanho do Cristalito para cada grupo	55
Tabela 10 - Microdeformação em cada grupo	56

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Lei de difração Bragg	22
Equação 2 - Função pseudo-voigt	25
Equação 3 - Método dos mínimos quadrados	25
Equação 4 - Fórmula de Cagliotti	26
Equação 5 - Alargamento do pico pela microdeformação	27
Equação 6 - Fórmula de Scherrer	27
Equação 7 - Alargamento total corrigido do pico	28
Equação 8 - Largura à meia altura corrigida	28
Equação 9 - Equação para construção do gráfico de Williamson-Hall	28
Equação 10 - Tamanho do cristalito	29
Equação 11 - Microdeformações	29
Equação 12 – Fórmula matemática para determinação do T-score	35
Equação 13 – Expressão matemática para determinação da velocidade de tempo de vôo	37
Equação 14 - Cálculo da microdureza Knoop (Callister Jr, 2000)	39

LISTA DE ABRVIATURAS, SIGLAS E SÍMBILOS

kV	quilovolts
mA	miliamperes
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDS	espectrometria de energia dispersiva
XRD	Difratometria de Raios-X
mm	milimetros
ms	milisegundos
nm	nanometros
QUS	ultrassonometria quantitativa
SVO	Serviço de Verificação de Óbito
IOT	Instituto de Ostopedia e Traumatologia
HC	Hospital das Clínicas
gf	grama força
λ	Comprimento de onda
μm	micrometros
θ	graus
°C	graus Celsius
%	porcentagem
HA	hidroxiapatita
CHA	hidroxiapatita carbonatada
CDHA	hidroxiapatita deficiente em cálcio
BMD	densidade mineral óssea (Bone Mineral Density)
DEXA	dual-energy x-ray absorptiometry
SD	desvio padrão
SJ	mesmo sexo e paciente jovem
OMS	organização mundial de saúde
NOF	national osteoporosis foundation
QUS	ultrassonometria quantitativa
BUA	atenuação do ultrassom no osso
SOS	velocidade do som
TOF	tempo de vôo

HK	dureza Knoop
XRD	difratometria de raios-X
ICCD	International Centre for Diffraction Data
ICSD	Inorganic Crystal Structure Database
SEs	elétrons secundários
BSEs	elétrons de retroespalhamento
GSAS	Sistema de Análise Estruturas Geral
EXPGUI	Interface Gráfica do Utilizador para arquivos .exp

SUMÁRIO

1 Intr	odução	15
1.1.	Justificativa	15
1.2.	Objetivos	16
2 Rev	visão Bibliográfica	.17
2.1.	Estrutura Cristalina	.17
2.2.	Apatita	18
2.3.	Hidroxiapatita	.19
2.4.	Difratometria de Raios-X	20
2.5.	O método de Refinamento de Rietveld	.23
2.6.	Tamanho de cristalito e microdeformações: equação de Scherrer e gráfico	de
Willia	mson-Hall	.27
2.7.	Tecido Ósseo	30
2.8.	Remodelamento Ósseo	.33
2.9.	Osteoporose	.33
2.10.	Ultrassonometria óssea de calcâneo	36
2.11.	Microscopia ótica e eletrônica de varredura	.37
2.12.	Microidentação	.39
3 Mat	eriais e Métodos	.41
3.1 A	spectos éticos	.41
3.2 N	Iateriais	41
3.3 P	ré-seleção das amostras	41
3.4 P	reparação e caracterização das amostras	41
3.5 P	arâmetros utilizados no DRX e para o método de Rietveld	.42
4 Res	ultados e Discussões	.47
4.1.	Análises por Ultrassonometria	.47
4.2.	Microscopia Ótica	.47
4.3.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	.48
4.4.	Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)	.49
4.5.	Microdureza (HK)	51
4.6.	Difratometria de Raios-X (DRX) e o método de Rietveld	52
5 Con	nclusão	.58
6 Arti	gos publicados	.59
Referênc	cias	60
Anexo E	3	.74

1 Introdução

A osteoporose é definida pelo National Institutes of Health como uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea e aumento do risco de fratura. (N.I.H., 2013)

Profissionais têm assumido que todos os pacientes com T-score muito baixos tem osteoporose, entretanto o T-score é derivado de uma população específica, ou seja, em outras populações o T-score não é acurado. Como a densidade mineral óssea (BMD) é um indicador de risco de fratura limitado, o interesse clínico e científico tem aumentado em análises complementares que poderiam melhorar a predição do risco de fratura. (Kleerekoper e Balena, 1991; Deborah, Olof e Hans, 1996; Bouxsein, 2003; Qu *et al.*, 2005; Miller, 2006)

Entretanto, uma pessoa com BMD normal, eveltualmente sofria fraturas no cotidiano, e reciprocamente, uma pessoa com BMD na faixa osteoporótica, não tinha fraturas. Devido a estes paradoxos no tratamento, um termo se tornou popular no começo de 1990, a qualidade óssea, e desde então o conceito de resistência óssea ampliou além de somente densidade. Há várias propriedades representadas pela qualidade óssea, dentre elas temos a estrutura cristalina da parte inorgânica do osso (cristais de hidroxiapatita). (Van Der Linden *et al.*, 2001; Van Der Meulen, Jepsen e Mikić, 2001; W.H.O., 2001; Parfitt, 2002; Qiu *et al.*, 2005; Zebaze *et al.*, 2005; Genant e Jiang, 2006; Viguet-Carrin, Garnero e Delmas, 2006; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009; Licata, 2009; N.I.H., 2013; N.O.F., 2013)

Analisando a estrutura cristalina em escala atômica (tamanho do cristalito, proporção de cálcio e fósforo, microdeformação), visualmente (microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura) e mecanicamente (microdureza), espera-se encontrar relações, para ossos secos trabeculares, que nos indiquem o estado do osso, visando à qualidade óssea.

1.1. Justificativa

Mesmo não sendo satisfatória, a avaliação da osteoporose se dá apenas considerandose a quantidade óssea (BMD). Para tanto é importante avaliar a qualidade óssea através da análise da parte inorgânica do osso, pela caracterização microestrutural dos cristais de hidroxiapatita.

1.2. Objetivos

- Avaliação da estrutura cristalina da matriz inorgânica de ossos secos trabeculares de vértebras de colunas de cadáveres humanos normais, osteopênicos e osteoporóticos
- Caracterização microestrutural da hidroxiapatita pela microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e pela análise da proporção de cálcio e fósforo e utilização do método de refinamento de Rietveld (tamanho de cristalito, microdeformação, parâmetro de rede) para avaliação da estrutura cristalina dos ossos, balizando os resultados com os valores de microdureza

2 Revisão Bibliográfica

2.1. Estrutura Cristalina

O termo estrutura cristalina entende-se como um conjunto de átomos periodicamente distribuídos no espaço, formando uma rede. O paralelogramo que, por propagação (translação) em uma, duas ou três direções independentemente, é capaz de gerar todo o cristal, é chamado de célula unitária, sendo elas todas iguais em forma e conteúdo. Desta forma, um total de três vetores não coplanares são necessários para descrever uma célula unitária. Estes vetores (a, b, c), que coincidem com as três arestas independentes do paralelepípedo elementar, representam o comprimento das arestas da célula unitária e além destas distâncias são necessários mais três parâmetros, os ângulos entre eles (α , β e γ). (Cullity, 1978; Pecharsky, 2005)

Para descrever completamente a estrutura cristalina, não é suficiente apenas caracterizar a geometria da célula unitária, deve-se também estabelecer a distribuição dos átomos na célula unitária e na rede. Todo o conteúdo da célula unitária pode ser estabelecido pela sua unidade assimétrica usando uma combinação de operadores de simetria presentes na célula unitária (rotação, inversão, reflexão, deslizamento, eixo de inversão, eixo helicoidal e eixo giróide). (Cullity, 1978; Pecharsky, 2005)

O número limitado de elementos de simetria e os modos como eles interagem entre si leva a um número limitado de elementos de simetria, o conjunto destes elementos que descrevem um objeto define o denominado grupos de ponto. Como resultado, todos os grupos de ponto cristalográficos tridimensionais foram divididos num total de sete sistemas cristalinos (tricliniclo, monoclinico, ortorrômbico, trigonal, tetragonal, hexagonal e cúbico). Levando em conta que os sistemas cristalinos hexagonais e trigonais são normalmente descritos no mesmo tipo de rede, sete sistemas cristalinos podem ser agrupados em seis famílias cristalinas. (Cullity, 1978; Pecharsky, 2005)

Finalmente, tendo-se seis famílias de cristal e cinco tipos de redes usadas em cristalografia (primitiva, de base centrada, de face centrada, de corpo centrado e romboédrica), resulta os quatorze tipos de redes Bravais representados na **Tabela 1**. (Pecharsky, 2005)



Tabela 1 - As 14 redes Bravais (Pecharsky, 2005)

Há também os planos cristalográficos que são definidos como uma família de planos que interceptam todos os pontos da rede. A distância entre planos vizinhos chama-se distância interplanar. A família de planos cristalográficos é descrita utilizando-se três índices inteiros (h k l) que são chamados de índices de Miller. Os índices de Miller indicam que o plano que pertence à família (h k l) divide os vetores de rede a, b e c em h, k e l partes iguais, respectivamente. (Cullity, 1978; Pecharsky, 2005)

2.2. Apatita

Todo mineral é caracterizado por uma combinação única de parâmetros estruturais e composicionais. Entretanto, tanto a exata estrutura e/ou composição de um mineral é flexível. A apatita é mais flexível que a maioria dos outros minerais, o que significa que ela aceita diversas substituições químicas. Tais substituições mudam a estrutura do mineral e muitas

vezes têm um impacto crítico nas propriedades do mineral, como solubilidade, dureza, fragilidade, tensão, estabilidade térmica e propriedades óticas como birrefringência. (Elliott, 2002; Gross e Berndt, 2002)

O termo apatita se refere à um grupo de alguns minerais que são de interesse e aplicação de pesquisa multidisciplinar, especialmente no campo da mineralogia, geologia, biomineralização, medicina e biomateriais. A hidroxiapatita pura tem composição $Ca_5(PO_4)_3OH$, o que muitas vezes é escrito como $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ para mostrar que existem duas unidades da fórmula na célula unitária. A hidroxiapatita pode ser ocupada não só por OH, mas também pelos íons substituintes flúor (F) e/ou Cloro (Cl), como expressa pela fórmula geral $Ca_5(PO_4)_3(F,OH,Cl)$. A hidroxiapatita é a apatita mineral de maior interesse e relevância nas ciências biologia e dos materiais. Os outros dois minerais comuns do grupo apatita são cloroapatite e fluorapatita. Apatita geológica, que é o mineral fosfato mais abundante no crosta terrestre, geralmente tem várias proporções de OH, F, e Cl. (Pana e Fleet, 2002; Piccoli e Candela, 2002)

Em um sentido simplificado, pode-se dizer que existem quatro diferentes tipos de posições cristalográficas na célula unitária de apatita: sítios tetraédricos para seis íons P^{5+} , cada um em coordenação 4-fold com o oxigênio; sítios cálcio (Ca) para quatro dos íons Ca²⁺; sítios Ca para os seis outros íons Ca²⁺ (dispostas de tal maneira que eles formam um canal ao longo do eixo c, o assim chamado canal de íons); e o sítio do canal, que é normalmente ocupado por dois ânions monovalentes (mais comumente OH, F, e/ou Cl), por célula unitária. (Elliott, 2002; Gross e Berndt, 2002)

2.3. Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) biológica é considerada o modelo estrutural para a fase mineral do osso e mostra imperfeições, diferenciando-se da HA encontrada nos minerais das rochas. Os íons da superfície do cristal são hidratados, o que gera uma camada de água e íons denominada capa de hidratação, facilitando a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. Ela pode ter múltiplas substituições e deficiências em todos os sítios iônicos. Dentre as impurezas dos cristais de apatita, a mais notável é a substituições de potássio, magnésio, estrôncio e sódio no lugar dos íons cálcio e cloreto e fluoreto no lugar dos grupos hidroxila. Estas impurezas podem alterar a estrutura cristalina, reduzindo a cristalinidade, afetando a elasticidade e a resistência óssea da apatita. O tamanho do cristal e a cristalinidade

mineral óssea também podem ser alterados devido a certas doenças e terapias. (Boskey e Marks, 1985; Fratzl *et al.*, 1996; Ou-Yang *et al.*, 2001; Leventouri, 2006; Dilworth *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2009; Marcus *et al.*, 2010; Saito e Marumo, 2010; Allen e Burr, 2011; Noor *et al.*, 2011; Cundy e Reid, 2012)

Assim, a HA pode ter uma composição variada. A hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA) ou não-estequiométrica pode ser obtida a baixas temperaturas, com uma composição expressa como $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$, onde x varia de 0 a 1: 0 para HA estequiométrica e 1 para HA totalmente CDHA. (Ginebra *et al.*, 1999)

A HA pura possui razão molar igual à 1.67, como mostrado na Tabela 2:

Name	Formula	Ca/P	Mineral	Symbol
Monocalcium phosphate monohydrate	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	0.50	_	MCPM
Dicalcium phosphate	CaHPO ₄	1.00	Monetite	DCP
Dicalcium phosphate dihydrate	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	1.00	Brushite	DCPD
Octocalcium phosphate	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ ·5H ₂ O	1.33	-	OCP
Precipitated hydroxyapatite	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x}	1.50-1.67	_	PHA
Tricalcium phosphate	$Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5(OH)$	1.50	_	TCP
Amorphous calcium phosphate	$Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O^a$	1.50	_	ACP
Monocalcium phosphate	$Ca(H_2PO_4)_2$	0.50	_	MCP
α-Tricalcium phosphate	α -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.50	_	α-TCP
β-Tricalcium phosphate	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1.50	-	β-ΤСΡ
Sintered hydroxyapatite	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	1.67	Hydroxyapatite	, HA
Oxyapatite	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ O	1.67	-	OXA
Tetracalcium phosphate	$Ca_4(PO_4)_2O$	2.00	Hilgenstockite	TetCP
Carbonated apatite	Ca _{8.8} (HPO ₄) _{0.7} (PO ₄) _{4.5} (CO ₃) _{0.7} (OH) _{1.3}		Dahlite	CAP

 Tabela 2 - Principais fosfatos de cálcio

Quanto maior a razão molar Ca/P, menor a solubilidade do material, mas essa taxa também sofre influências quanto à composição química, pH local, temperatura, tamanho das partículas e cristalinidade. (Klein *et al.*, 1990; Barrere *et al.*, 2002; Raynaud *et al.*, 2002; Dekker *et al.*, 2005)

2.4. Difratometria de Raios-X

O principal método usado no estudo dos sólidos de Bravais é a difratometria de raios-X (XRD), uma técnica não destrutiva para analisar estruturas que exibem algum grau de regularidade ou cristalinidade. Estruturas cristalinas, como a hexagonal da hidroxiapatita, são formadas de diversas células unitárias. Devido à periodicidade das células unitárias, há repetidos planos compostos de átomos com diferentes espaços interplanares, cuja densidade eletrônica causa o espalhamento dos raios-X. (Woolfson, 1997; Kohli, Rithner e Dorhout, 2002; Zheng, Yang e Zhou, 2003; Zheng, Li e Zhou, 2004)

Os raios X são gerados quando uma partícula de alta energia cinética é rapidamente desacelerada. O método mais utilizado para produzir raios X é fazendo com que um elétron de alta energia colida com um alvo. Quando esse elétron atinge o alvo, um elétron é liberado na forma de fotoelétron, fazendo com que haja uma vacância nessa camada. Outro elétron ocupa o espaço deixado, liberando energia na forma de um fóton de Raio-X. A energia desse fóton corresponde à diferença de energia, e é característico de cada elemento químico. O comprimento de onda dos raios X é da ordem de grandeza das distâncias interatômicas em uma molécula e quando ele incide sobre um material, interage com os elétrons nos orbitais atômicos espalhando raios X em todas as direções. Isso dá origem à difração de raios X, a qual irá conter informações sobre as posições relativas entre os átomos e, portanto, da estrutura cristalina do material que causou a figura de difração. Dessa forma, a difração de raios X é uma excelente ferramenta de caracterização, pois, além de detalhamento da estrutura cristalina, também permite a análise quantitativa de fases, determinação de tamanho de cristalito e microdeformação, determinação da cristalinidade, etc. (Cullity, 1978; Pecharsky, 2005)

Geralmente, na interação de raios-x há dois níveis diferentes de aproximação - teorias cinemática e dinâmica de difração. Na difração cinemática, um feixe espalhado uma vez não é permitido ser espalhado uma segunda, terceira e assim por diante vezes. Assim, a teoria cinemática da difração é baseada na suposição de que a interação do feixe difratado com o cristal é insignificantemente pequena. Isto requer os seguintes pressupostos: um cristal consiste de blocos mosaicos individuais - cristalitos - que são ligeiramente desalinhados um em relação uns ao outro; o tamanho dos cristalitos é pequeno; e o desalinhamento dos cristalitos é suficientemente grande, de modo que a interação de raios-x com a matéria na escala de comprimento excedendo o tamanho dos blocos mosaicos é negligenciável. A teoria dinâmica é utilizado em difração por elétrons, onde a teoria cinemática não se aplica. (Cullity, 1978; Pecharsky, 2005)

Cristalito normalmente significa um único minúsculo cristal. Cada partícula de um material policristalino geralmente consiste de vários cristalitos que se juntam em diferentes orientações. Uma pequena partícula de pó pode ser um único cristalito. Cristalito também pode ser definido como um conjunto de células sistematicamente agrupadas para formar um domínio coerente de difração. (Pecharsky, 2005)

Os índices de Miller são formados por um conjunto de três valores (h k l) que identificam um plano que possui um vetor rede recíproca. Cada plano tem um único vetor rede recíproca, logo uma célula unitária individual pode ser determinada. (Woolfson, 1997).

Quando um feixe monocromático de raios X,com comprimento de onda λ , incidem num ângulo θ num conjunto de planos cristalinos (h k l) com espaçamento d, ocorrerá a difração se a distância extra percorrida (segmento ABC da **Figura 1**, por exemplo) por cada feixe for um múltiplo inteiro de l, seguindo a lei de Bragg (**Equação 1**). As direções nas quais ocorre a difração são determinadas pela geometria do reticulado. Os espaçamentos entre os planos estão relacionados com os parâmetros de rede e ângulos do reticulado. (Cullity, 1978)

Equação 1 – Lei de difração Bragg

Sendo n um inteiro (ordem de difração), λ o comprimento da onda de raios-X incidente, d o espaço interplanar do material, definida pelos índices de Miller (h k l) e θ o ângulo de difração Bragg, como ilustrado na **Figura 1**



Figura 1 – Reflexão de Bragg

Calcula-se o espaçamento, sendo o valor de λ conhecido, n ajustado como um e os valores de θ coletados pelo XRD, permitindo determinar os parâmetros de célula unitária, simetria, posições atômicas e volume da célula unitária.

Os dados obtidos podem ser comparados com arquivos de difratogramas armazenados em bancos de dados como o International Centre for Diffraction Data (ICCD), o que permite identificação das diferentes fases presentes no pó. Até o momento, a técnica mais importante para avaliar os parâmetros estruturais dos difratogramas gerados pelo XRD em pó é o procedimento de ajuste de intensidade do perfil do difratograma introduzido por H. M. Rietveld para dados de nêutron em 1967.

O refinamento de Rietveld utiliza o método dos mínimos quadrados e pode ser combinado com análise de diferença de Fourier para completar o modelo estrutural. O limite de complexidade para estruturas que podem ser utilizadas para o refinamento de Rietveld tem aumentado tanto metodologicamente como experimentalmente: inclusão de observações geométricas; descrições matemáticas mais elaboradas para os formatos dos picos, melhorando a resolução; inclusão das intensidades de reflexão permitidas pela simetria; uso de uma aproximação Bayesiana; dentre outros (Rietveld, 1967; 1969; Pawley, 1981; Le Bail, Duroy e Fourquet, 1988; Sivia e David, 1994; I.C.D.D., 2013)

É importante lembrar que o refinamento de Rietveld é precisamente isso, uma técnica de refinamento; o ponto inicial para determinar a célula unitária virá de outra fonte. Uma fonte muito acessada e que pode ser utilizada é a Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), que contém milhares de estruturas inorgânicas como referência. (I.C.S.D., 2013).

2.5. O método de Refinamento de Rietveld

Os métodos de caracterização fazendo uso da difração de raios-X são usados para indexação de fases cristalinas, refinamentos de cela unitária, determinação de tamanho de cristalito, microdeformação de rede, análise quantitativa de fases, etc. (Hill e Howard, 1987; Langford, Louer e Scardi, 2000)

A estrutura de um padrão típico de difração em pó pode ser descrita pelas posições, intensidades e formas das múltiplas reflexões de Bragg. Cada uma destas componentes contém informação sobre a estrutura cristalina do material, as propriedades da amostra e os parâmetros instrumentais, assim como visto na

Tabela 3. (Pecharsky, 2005)

Componente do	Estrutura	Propriedade da	Parâmetro
padrão	Cristalina	espécie	Instrumentais
Posição do pico	Parâmetros de	Absorção;	Radiação
	célula unitária	Porosidade	(comprimento de
			onda); Alinhamento
			da amostra
Intensidade do	Parâmetros	Orientação	Geometria e
pico	atômicos	preferencial;	configuração
		Absorção;	
		Porosidade	
Forma do pico	Cristalinidade;	Tamanho do	Condicionamento
	desordem; defeitos	cristalito; tensão	do raio-X

Tabela 3 - Informações possíveis de se analisar pelo difratograma gerado por raios-X
(Pecharsky, 2005)

O tamanho do cristalito e a tensão residual (microdeformações) podem então ser analisadas, pela forma do pico, mais precisamente pela sua largura, levando em consideração também a natureza instrumental e as condições específicas de cada experimento (largura da fenda do difratômetro, a banda de comprimentos de onda emitidos pela fonte, divergência angular do feixe, etc) (Pecharsky, 2005)

Uma vez que se tem uma rotina para o cálculo do perfil é necessário escolher o método de refinamento a ser adotado, a estratégia quase universalmente aceita é a técnica dos mínimos quadrados, que busca minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre o modelo teórico e os dados obtidos nas medidas, ajustando os valores de parâmetros presentes na teoria e assim encontrar os valores ótimos para estes parâmetros.

Em 1967-69, Rietveld apresentou um método de refinamento de estrutura cristalina, o método de Rietveld, uma ferramenta poderosa para análise estrutural da maioria dos materiais cristalinos na forma de pó e que hoje é usado para resolver todos os problemas citados anteriormente (refinamentos de cela unitária, determinação de tamanho de cristalito, microdeformação de rede, análise quantitativa de fases), utilizando a técnica dos mínimos quadrados. Para sua aplicação, os dados de difração são usados da maneira que saíram do difratômetro, sem sofrer qualquer tipo de alteração, o que segue o critério científico de que as observações não devem ser modificadas para serem analisados. (Rietveld, 1967; 1969)

A princípio o método era aplicado apenas em materiais analisados por difração de nêutrons, posteriormente depois de algumas adaptações, foi possível sua aplicação também em medidas obtidas por difração de raios-X. No caso de raios-X, diferente do caso de nêutrons, a radiação com a qual o método foi originalmente desenvolvido e cujos picos são bem modelados por gaussianas, não há nenhuma função simples. Os picos são mais próximos de gaussianas para pequenos ângulos de espalhamento e mais próximos de lorentzianas para grandes ângulos. Logo se utiliza a função pseudo-voigt, uma combinação linear normalizada de uma gaussiana com uma lorentziana, como mostra a **Equação 2**: (Young, Mackie e Von Dreele, 1977; Enzo *et al.*, 1988; Louer e Langford, 1988; Madsen e Hill, 1988)

Equação 2 - Função pseudo-voigt

onde η é um parâmetro refinado que determina o percentual da contribuição de cada função; L é a função lorentziana e G a função gaussiana.

O refinamento de estrutura pelo método Rietveld consiste em utilizar o método dos mínimos quadrados para encontrar os valores dos parâmetros estruturais que fazem a intensidade calculada concordar da melhor forma possível com a intensidade medida. O paradigma dos mínimos quadrados considera que o melhor ajuste entre um conjunto N de valores obtidos experimentalmente e uma função modelo , que depende de M parâmetros refináveis , é obtido quando o resíduo é minimizado, este resíduo é definido pela **Equação 3**:

Equação 3 - Método dos mínimos quadrados

onde o vetor representa os parâmetros a serem refinados, que são seus componentes. Esta função tem um significado estatístico importante. É possível mostrar que encontrar o valor mínimo de equivale a encontrar os valores dos parâmetros refinados para os quais há uma maior probabilidade da função modelo coincidir com os dados experimentais

(Press e Teukolsky, 2002)

Os parâmetros refinados pelo método dos mínimos quadrados são divididos em duas categorias: os parâmetros estruturais são aqueles que medem características da amostra, como os parâmetros de rede e os parâmetros instrumentais são aqueles que não dependem das características da amostra e sim das condições experimentais. (Teixeira, 2013)

É importante ressaltar que o refinamento precisa seguir uma sequência, onde normalmente os primeiros parâmetros a ser refinados, utilizando-se uma amostra padrão, são os instrumentais: GW, GV, etc. Logo em seguida são ajustados os parâmetros estruturais, os quais estão relacionados com a amostra: parâmetros de rede (a, b, c) e quando necessários, os ângulos da célula unitária (α , β e γ); posições atômicas (x, y, z), parâmetros térmicos (isotrópicos ou anisotrópicos) e por último GU e GP os quais juntamente com o GW e GV são parâmetros de ajustes da largura a meia-altura expressa pela fórmula de Cagliotti representada na **Equação 4**:(Caglioti, Paoletti e Ricci, 1958)

Equação 4 - Fórmula de Cagliotti

As definições dos termos do software GSAS que serão refinados são detalhadas a seguir, de acordo com o manual do GSAS, que é o programa utilizado para fazer o refinamento:

GU, GV, GW e GP são os coeficientes da fórmula de Cagliotti (modificado com o alargamento de Scherrer) do componente gaussiana da largura do pico. Onde GV e GW estão relacionados com o alargamento inerente ao equipamento e GP e GU estão relacionados com o alargamento próprio do tamanho do cristalito.

LX é o coeficiente da componente lorentziana da largura do pico pelo tamanho isotrópico do cristalito.

Sfec e ptec também são coeficientes da largura lorentziana, mas são utilizados apenas no caso de alargamento anisotrópico. Stec é associado com o componente Y e ptec com componente X.

Deslocamentos atômicos (Uisos) - Parâmetros de vibração térmica.

S/L e H/L são termos geométricos que descrevem o alargamento de picos à baixos ângulos, em geral com $2\theta < 15$ graus com radiação CuKa (e também o alargamento de picos à altos ângulos com $2\theta > 165$ graus). Esses termos podem ser calculados dividindo a largura das fendas divergentes e recepetoras pelo raio do difratômetro. Esses termos são, em geral,

iguais e devem ser fixadas para um específico (conhecido) conjunto de fendas e raios de difratômetros, ou seja, são parâmetros instrumentais.

Trns é a correção para a transparência da amostra na geometria Bragg- Brentano. É o inverso do efeito de absorção e na geometria de Bragg- Brentano é zero para amostras muito absorventes e diferente de zero para amostras pouco ou intermediariamente absorventes.

Shft é a correção na posição de pico para deslocamento vertical da amostra na geometria de Bragg- Brentano. Depende fortemente no acoplamento da amostra ao difratômetro, então um cuidado especial deve ser tomado para evitar este tipo de erro.

Eta é o fator misto Gaussiano-Lorentziano.

SXXX, SYYY e SZZZ são fatores Lorentzianos de alargamento de microtensão anisotrópica.

2.6. Tamanho de cristalito e microdeformações: equação de Scherrer e gráfico de Williamson-Hall

Na metodologia de análise do alargamento dos picos de difração, assume-se que o alargamento total possui três componentes: tamanho de cristalitos, microdeformações residuais e parâmetros instrumentais, sendo que cada uma pode ser identificada separadamente, como mostrado por Dehlinger e Kochendörfer (1939). O tamanho de partícula para cada amostra foi calculado após o refinamento dos parâmetros V e W retirados de uma amostra padrão para que fossem encontrados os parâmetros instrumentais, posteriormente cancelando a influência instrumental no cálculo da largura do pico. O alargamento do pico resultante do efeito da microdeformação residual β s, pode ser expresso pela **Equação 5**:

Equação 5 - Alargamento do pico pela microdeformação

onde ε é a microdeformação e θ é o ângulo de Bragg . A componente do alargamento originada pelos cristalitos, β_c , pode ser expressa pela **Equação 6** de Scherrer:(Azàroff, 1968)

Equação 6 - Fórmula de Scherrer

onde k' é uma constante que depende da reflexão e da forma do cristal, que geralmente assume o valor 1, λ é o comprimento de onda da radiação, D é o tamanho do cristalito e θ é o ângulo de Bragg. A largura a meia altura total β já corrigida será a soma das duas equações, representada na **Equação 7**:

Equação 7 - Alargamento total corrigido do pico

Onde o β corrigido é representado pela **Equação 8**:

Equação 8 - Largura à meia altura corrigida

E será o mesmo que o H_k da fórmula de Cagliotti. A **Equação 7** pode ser reescrita como na **Equação 9**:

Equação 9 - Equação para construção do gráfico de Williamson-Hall

_ _

que será a equação utilizada para traçar o gráfico de Williamson-Hall de uma equação de primeiro grau, como representado na **Figura 2**, onde Y = ---- e $X = sen\theta$. (Williamson e Hall, 1953)



Figura 2 - Representação do gráfico de Williamson-Hall

O coeficiente linear da reta dará o valor do tamanho do cristalito, Equação 10:

Equação 10 - Tamanho do cristalito

E o coeficiente angular dará as microdeformações, Equação 11:

Equação 11 - Microdeformações

Tensão em um material pode causar dois efeitos distintos sobre o difratograma. Devido à um esforço uniforme, compressivo ou distensivo (macrotensão), as distâncias da cela unitária dos cristais vão, respectivamente, diminuir ou aumentar, ocasionando um deslocamento na posição dos picos.

Esforços não uniformes estão relacionados a forças de distensão e compressão simultâneas, as quais resultam em alargamento dos picos difratados em sua posição original. Este fenômeno, chamado de microtensão em cristalitos ou microdeformação, pode estar relacionado a diferentes causa: deslocamentos, vacâncias, defeitos, planos de cisalhamento, expansões e contrações térmicas, etc. A microdeformação pode ser entendida então como uma variação relativa do parâmetro de rede ou distância interplanar causada pelos efeitos citados.

2.7. Tecido Ósseo

Constituinte principal do esqueleto, o tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo e realiza várias funções mecânicas e fisiológicas. A estrutura esquelética tem a função de suporte, proteção, determina forma e tamanho corporal e funciona como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, regulando-os nos líquidos corporais. É formado por matriz óssea, dividida em matriz inorgânica (60% em peso e 40% em volume), matriz orgânica (30-32% em peso e 35% em volume) e por células; osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Há também os canículos, que são responsáveis pelas trocas de moléculas e íons entre os capilares sanguíneos e os osteócitos. (Gong, Arnold e Cohn, 1964; Hamill e Knutzen, 1999; Junqueira e Carneiro, 2008)

Macroscopicamente, verifica-se que o osso é formado por partes sem cavidades visíveis, o osso compacto, cuja porosidade do volume ocupado por tecido não mineralizado é baixa (5 a 20%) e por partes com muitas cavidades intercomunicantes, o osso esponjoso, com porosidade relativamente alta (40 a 95%). Essa classificação é macroscópica e não histológica, pois o tecido compacto e as trabeculas que separam as cavidades do esponjoso têm a mesma estrutura histológica básica. Os ossos podem ser classificados de acordo com a sua forma em ossos longos, curtos, chatos, irregulares e sesamóides. (Hall, 1991; Garnet e Hiatt, 2003; Junqueira e Carneiro, 2008)

O osso compacto praticamente não apresenta espaços medulares, tendo sua porosidade devido aos canais de Harvers e Volkmann e numa menor escala aos espaços caniculares e lacunas. Sua anisotropia é controlada principalmente pelas orientações lamelar e osteonal. O osso esponjoso tem uma estrutura porosa (**Figura 3**) que protege a medula óssea, atua como material para manter a forma das finas camadas do osso compacto e auxilia na transferência de forças das cargas que as camadas de ossos compactos devem suportar. É modelado como delgadas espículas e trabéculas, dispostas de acordo com as solicitações mecânicas, tendo, as trabeculas, espessura variando entre 50 a 300 μ m e espaços entre elas variando de 100 a 500 μ m. A dureza e a rigidez podem ser determinadas pela porosidade do osso trabecular e sua anisotropia pela orientação trabecular. (Carter e Hayes, 1977; Cowin, 1986; Morgan e Keaveny, 2001; Prot *et al.*, 2012)



Figura 3 - Macroscopia ótica de osso trabecular (6.4x) (Cesar et al., 2013)

Além da porosidade, a estrutura tridimensional do osso trabecular (arquitetura trabecular) pode variar bastante entre lugares anatômicos e com a idade. O osso trabecular do corpo vertebral tende a parecer predominantemente com bastonetes, enquanto o fêmur proximal contém uma mistura mais balanceada de placas e bastões. Descritores quantitativos da arquitetura trabecular como espessura trabecular e espaçamento trabecular contribuem independente da porosidade na dureza e rigidez trabecular. Com a idade e também com doenças, o osso trabecular se torna progressivamente mais fino e pode se tornar perfurado por cavidades. No corpo vertebral e na tíbia proximal, por exemplo, mudanças relacionadas à idade na arquitetura trabecular incluem um aumento na anisotropia da estrutura trabecular. (Mosekilde, 1989; Ulrich *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2002)

Os osteoblastos pertencem à categoria geral dos fibroblastos e são células típicas de tecido conjuntivo inorgânico, sintetizam a parte orgânica da matriz óssea (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas) e participam da mineralização da matriz ao concentrar fosfato de cálcio. Formam uma estrutura parecida a um epitélio simples e uma vez aprisionada pela matriz recém-sintetizada, passam a se chamar osteócitos. Há também o chamado osteóide: matriz óssea recém-formada, ainda não calcificada, adjacente aos osteoblastos ativos. (Ravaglioli e Krajewski, 1992; Junqueira e Carneiro, 2008)

Os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea, se aderindo à chamada "zona clara", onde é secretado ácido (H⁺), colagenase e outras hidrolases, digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio. Sua atividade é coordenada por citocinas e por hormônios como calcitocina e possuem origem da fusão de células mononucleares da medula óssea. (Anselme, 2000; Junqueira e Carneiro, 2008)

A parte orgânica da matriz é formada predominantemente (98% em peso) por fibras colágenas tipo I e uma variedade de proteínas não-colágenas, e células compõem os 2% restantes dessa fase, podendo estas estruturas ter alguma participação na mineralização da matriz. Os íons mais encontrados na parte inorgânica da matriz óssea são o fosfato e o cálcio, que formam cristais impuros de HA com fórmula molecular $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Há também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. (Boskey e Marks, 1985; Fratzl *et al.*, 1996; Ou-Yang *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 2010; Saito e Marumo, 2010; Allen e Burr, 2011; Cundy e Reid, 2012)

A resistência e a rigidez óssea estão relacionadas com a associação dos cristais de hidroxiapatita com o colágeno. Para atender os vários tipos de força a que está sujeito, o material ósseo deve ser suficientemente rígido, para resistir a forças de compressão, e elástico, para suportar as forças de tração. Caso o osso for descalcificado, ele ainda mantém sua forma original, mas se torna flexível, se o componente orgânico for retirado, por incineração, por exemplo, o esqueleto mineralizado ainda mantém sua forma original, mas se torna frágil. (Capozzo, Marchetti e Tosi, 1992; Garnet e Hiatt, 2003; Junqueira e Carneiro, 2008)

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário e o maduro, secundário ou lamelar. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz. O tecido primário é o que aparece primeiro, tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação das fraturas, sendo temporário e substituído por tecido secundário. No tecido ósseo primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida e com menor quantidade de minerais, porém no tecido ósseo secundário ou lamelar essas fibras se organizam em lamelas de 3 a 7 µm de espessura, que ou ficam paralelas umas às outras, ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Havers ou ósteons. O osso maduro é uma estrutura altamente organizada, não homogênea, porosa e anisotrópica (todas as propriedades físicas dependem das direções em que são consideradas). As lacunas, contendo osteócitos, estão em geral situadas entre as lamelas ósseas, porém algumas vezes estão dentro delas. Em cada lamela, as fibras colágenas são paralelas umas às outras. Separando grupos de lamelas, ocorre freqüentemente o acúmulo de uma substância cimentante que consiste em matriz mineralizada, porém com muito pouco colágeno. Cada sistema de Havers ou ósteon é um cilindro longo, às vezes bifurcado e formado por quatro a 20 lamelas ósseas concêntricas. No centro desse cilindro ósseo existe um canal revestido de endósteo, o canal de Havers, que contém vasos e nervos. Os canais de Havers comunicam-se entre si, com a medula e com a superfície externa de osso por meio de canais transversais ou oblíquos que atravessam as

lamelas ósseas, os canais de Volkmann. Estes se distinguem dos de Havers por não apresentarem lamelas ósseas concêntricas. Todos os canais vasculares existentes no tecido ósseo aparecem quando a matriz óssea é formada ao redor dos vasos preexistentes. (Katchburian e Arana, 2004; Junqueira e Carneiro, 2008)

2.8. Remodelamento Ósseo

O remodelamento ósseo, um fenômeno superficial, acontece num equilíbrio dinâmico, ocorrendo ao longo da vida, tanto no osso cortical como no trabecular e está sujeito a fatores locais e sistêmicos, incluindo fatores de crescimento, hormônios e estresse. Em condições normais, o processo de reabsorção seguido por formação é intimamente ligado e não resulta em diferença na massa óssea. Enzimas contidas nos lisossomos originados no complexo de Golgi e íons hidrogênio produzidos pelos osteoclastos são transferidos para o microambiente fechado pela zona circunferencial clara, onde atuam confinados do restante do tecido. A acidificação facilita a dissolução dos minerais e fornece o pH ideal para a ação das enzimas hidrolíticas dos lisossomos. Assim, a matriz é removida e capturada pelo citoplasma dos osteoclastos, formando buracos que parecem cavidades em corte transversal. Seguindo atrás dos osteoclastos há uma população de células progenitoras de osteoblastos que logo começam a depositar o osteóide, preenchendo a cavidade reabsorvida. No final do processo, um ósteon estará formado (Katchburian e Arana, 2004; Junqueira e Carneiro, 2008; Hoppe, Güldal e Boccaccini, 2011; Parfitt *et al.*, 2011)

Os níveis de remodelamento são freqüentemente avaliados por marcadores bioquímicos de remodelamento ósseo, em particular em estudos clínicos, onde uma velocidade de decomposição de fibras, minerais e células muito maior que a de formação de tecido novo está associado a uma acelerada perda de osso e origem da osteoporose. Desta forma, um desbalanceamento nas taxas de formação/absorção óssea pode aumentar o risco de fratura. (Biver *et al.*, 2012; Karsdal *et al.*, 2012)

2.9. Osteoporose

A osteoporose é definida pelo National Institutes of Health como uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea e aumento do risco de fratura. No mundo, a osteoporose viabiliazou mais de 8.9 milhões de fraturas anualmente,

resultando numa fratura osteoporótica a cada 3 segundos. Estima-se que a osteoporose afeta 200 milhões de mulheres, aproximadamente um décimo das mulheres com 60, um quinto com 70, dois quintos com 80 e dois terços das mulheres com 90 anos. (Johnell e Kanis, 2006; Kanis, 2007; N.I.H., 2013)

No Brasil, 10 milhões de pessoas, aproximadamente uma a cada 17, tem osteoporose. A prevalência de fraturas na vida foi de 37.5% entre homens e 21% entre mulheres. Estas proporções entre brancos, mestiços e negros foram de 29%, 31% e 22%, respectivamente. Estima-se que 1 em 3 pacientes com fratura no quadril é diagnosticado como tendo osteoporose, os quais apenas 1 em 5 recebe qualquer tipo de tratamento. O impacto econômico da fratura osteoporótica de fêmur foi estimado em R\$ 12 milhões no período entre julho de 2003 e junho de 2004 no Brasil. (Pastore, 2000; Araújo, Oliveira e Bracco, 2005; Siqueira, Facchini e Hallal, 2005)

Fraturas vertebrais podem levar à dor nas costas, perda de altura, deformidade, imobilidade, aumento no número de dias acamado e até redução na função pulmonar. Seu impacto na qualidade de vida pode ser profundo devido à perda de auto-estima, imagem distorcida do corpo e depressão. Fraturas vertebrais também têm um impacto significante nas atividades diárias da vida. (Nevitt *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1999; Lips *et al.*, 1999; Gold, 2001; Lyles, 2001; Robbins *et al.*, 2001; Tosteson *et al.*, 2001; Adachi *et al.*, 2002; Pluijm *et al.*, 2002).

O osso trabecular é metabolicamente mais ativo e possui maior densidade celular em virtude da grande razão superfície/volume. No estudo de Rubin et. al. ratos osteopênicos tiveram normalizados a dinâmica de remodelamento ósseo em osso trabecular e não cortical devido à sinais de baixa intensidade e alta frequencia, indicando que o osso trabecular é o mais indicado para o estudo de doenças osteometabólicas, já que os efeitos são notados mais facilmente. (Rubin et al., 2002)

A coluna é um lugar anatômico que permite uma melhor predição de osteoporose, sendo que prediz tão bem ou até melhor do que utilizando, por exemplo, os ossos do quadril. Além disso, a vértebra L1 é onde ocorre o maior número de fraturas e é uma das indicadas dentre as lombares de 1 a 4 para o estudo da osteoporose. Sabe-se também que por mais que medidas de BMD possam prever risco de fratura, elas não podem identificar indivíduos que terão fratura, corroborando com nossos estudos que dizem que métodos complementares são necessários para dar suporte à análise de osteoporose. (Deborah, Olof e Hans, 1996; Hans *et al.*, 2006)

Existem diversos fatores que se relacionam com o fator de risco de fraturas osteoporóticas como idade, sexo e história de fraturas. Alguns fatores estão relacionados com a quantidade óssea, como a BMD. Para avaliar o estado de osso e diagnosticar osteoporose, a densitometria óssea por DEXA (Dual-Energy X-ray Absorptiometry) é amplamente aceita como o método referência para medir a BMD, expresso em T-scores, variável que toma como referência o valor da BMD média do pico de massa óssea em adultos jovens padrão, expressa em valor absoluto, demonstrada na **Equação 12**. (Kanis *et al.*, 1994; W.H.O., 1994; Poór *et al.*, 1995; Cummings Sr, 2002)

$$T - score(SD) = \frac{(BMD)_{patient} - (BMD)_{SJ}}{(SD)_{SJ}}$$

Equação 12 – Fórmula matemática para determinação do T-score

Sendo BMD – densidade mineral óssea; SD – desvio padrão; SJ – mesmo sexo e paciente jovem.

Estudos mostraram que o risco de fratura aumenta por um fator de 1.5-3.0 para cada diminuição unitária no desvio padrão. Para diagnosticar e padronizar esses valores, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a National Osteoporosis Foundation (NOF), desenvolveram níveis operacionais que definem a quantidade de perda de massa óssea. Considera-se T-score acima de -1,0 "normal", entre -1 a -2,5 "osteopenia", enquanto T-score abaixo de -2,5 refletiria "osteoporose". (Deborah, Olof e Hans, 1996; W.H.O., 2001; Johnell *et al.*, 2005; Hans *et al.*, 2006; N.O.F., 2013)

Profissionais têm assumido que todos os pacientes com T-score muito baixos tem osteoporose, entretanto o T-score é derivado de uma população de mulheres brancas a partir dos 60 anos, ou seja, em outras populações o T-score não é acurado. A percepção das discrepâncias entre densidade e resistência óssea começou com o uso de fluoreto de sódio para tratar osteoporose, que deveria aumentar a massa óssea (densidade), mas deixou-o mais frágil, aumentando o risco de fratura vertebral, além de outras drogas anti-reabsorção óssea que causaram o mesmo efeito. Porque a BMD é um indicador de risco de fratura limitado, o interesse clínico e científico tem aumentado em medidas complementares que poderiam melhorar a predição do risco de fratura. (Kleerekoper e Balena, 1991; Deborah, Olof e Hans, 1996; Bouxsein, 2003; Qu *et al.*, 2005; Miller, 2006)

Há um interesse crescente no uso das medidas de ultrassonometria quantitativa (QUS) para avaliação não-invasiva de risco de fratura osteoporótica, pois o ultrassom pode dar informações não só sobre a BMD, mas também sobre a arquitetura e a elasticidade. Além

disso, QUS é barato, versátil, livre de radiação ionizante e prevê fraturas osteoporóticas em senhoras tão bem quanto DEXA. (Njeh *et al.*, 1999; Khaw *et al.*, 2004; Marín *et al.*, 2006)

Ainda assim, estamos na esfera da BMD, e técnicas de absorbância têm alta especificidade, mas baixa sensibilidade. Uma pessoa com BMD normal, eveltualmente sofria fraturas no cotidiano, e reciprocamente, uma pessoa com BMD na faixa osteoporótica, não tinha fraturas. Devido a estes paradoxos no tratamento, um termo se tornou popular no começo de 1990, e desde então o conceito de resistência óssea ampliou além de somente densidade, agregando características chamadas de qualidade óssea. Dentre estas propriedades que fazem o osso resistir às fraturas temos: microarquitetura, conectividade trabecular e afinamento, porosidade, redução do número de trabéculas, transformação das trabéculas da forma de placa para haste, microfraturas, geometria óssea, tamanho e composição do cristal na matriz inorgânica, remodelamento ósseo e mineralização. (Van Der Linden *et al.*, 2001; Van Der Meulen, Jepsen e Mikić, 2001; W.H.O., 2001; Parfitt, 2002; Qiu *et al.*, 2005; Zebaze *et al.*, 2005; Genant e Jiang, 2006; Viguet-Carrin, Garnero e Delmas, 2006; Gourion-Arsiquaud *et al.*, 2009; Licata, 2009; N.I.H., 2013; N.O.F., 2013)

A combinação de informações da densidade advindas da arquitetura pode melhorar a predição para 94%. A qualidade óssea ou microarquitetura trabecular é responsável por cerca de 30 a 50% da resistência mecânica. Portanto, a densidade óssea ainda é o principal determinante da resistência mecânica do osso e do risco de fraturas, mesmo não sendo satisfatório na predição do risco da fratura osteoporótica em exames de densitometria óssea. (Kleerekoper *et al.*, 1985; Turner *et al.*, 1990; Dempster, 2003; Helgason *et al.*, 2008; Riggs *et al.*, 2008)

2.10. Ultrassonometria óssea de calcâneo

Numerosos estudos comparativos avaliam a relação entre os parâmetros de QUS e a BMD medida pelo padrão ouro (DEXA). Valores de QUS podem refletir a densidade óssea ou a arquitetura ou mesmo outras propriedades do osso além da densidade. Os trabalhos anteriores mostraram uma boa relação entre o QUS medido no calcâneo e o BMD medido também no calcâneo pelo DEXA, mas uma correlação mais pobre entre o QUS do calcâneo e medidas de BMD de outros lugares. Entretanto, apesar da baixa correlação nos outros lugares do esqueleto, QUS mostrou-se ser uma ferramenta válida para prever fraturas osteoporóticas, independentemente de associações com a densidade óssea. O calcâneo é o lugar mais popular
por diversas razões: possui 90% de osso trabecular, tendo um maior remodelamento ósseo que o osso cortical devido à razão de superfície/volume; é acessível; e as superfícies laterais são relativamente bem planas e paralelas, reduzindo erros de reposicionamento. (Waud, Lew e Baran, 1992; Faulkner *et al.*, 1994; Salamone *et al.*, 1994; Ross *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1995; Aguado *et al.*, 1996; Hans *et al.*, 1996; Yeap *et al.*, 1998; Kwok *et al.*, 2012)

A ultrassonometria óssea baseia-se na determinação de parâmetros relacionados com duas propriedades que são modificadas ao atravessar o material: a atenuação do ultrassom no osso (BUA) e a velocidade aparente da propagação da onda ou velocidade do som (SOS), que podem ser avaliados em diferentes regiões como tíbia, metacarpos, calcâneo e falanges. (Cortet *et al.*, 2004)

BUA está baseado na perda de energia para o meio e inclui diversas variáveis, como absorção, espalhamento, difração, refração e conversão. (Webb, 1988; Njeh *et al.*, 1999)

Em aparelhos comerciais, as medidas de velocidade são feitas por métodos de transmissão, no qual um transdutor age como transmissor e o segundo como receptor, sendo aplicado para medidas quantitativas de densidade óssea. Neste método a velocidade do ultrassom no meio pode ser calculada dividindo a distância de propagação pelo tempo de trânsito correspondente. No nosso caso, as medidas quantitativas foram feitas no calcâneo usando o método de transmissão e utilizando, para calcular a velocidade, o método de velocidade em tempo de vôo (TOF) com uma separação fixa dos transdutores (método axial).

Equação 13 – Expressão matemática para determinação da velocidade de tempo de vôo

x é espessura do calcâneo incluindo tecido mole, V_w é a velocidade do ultrassom na água e Δt é a diferença no tempo de trânsito com e sem a amostra.

2.11. Microscopia ótica e eletrônica de varredura

A microscopia ótica é uma técnica rotineira e de baixo custo destinada a caracterizar materiais em pequena escala, entretanto é limitada em sua resolução pelo comprimento de onda da luz. A ampliação da imagem é feita pela combinação de um conjunto de lentes (ocular e objetiva), por meio da luz refletida na superfície polida. A luz visível usada em

microscópios óticos tem comprimentos de onda variando entre 400 e 700 nanômetros. Com a presença de aberrações esféricas, estes comprimentos de onda se traduzem em resoluções de um a dois micrômetros. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) usa elétrons ao invés da luz para gerar as imagens, sendo limitada então pelo comprimento de onda dos elétrons, que na energia padrão de 5 keV é de apenas 0.55 nm. Com a presença de outros fatores limitantes, como também aberrações nas lentes, a resolução gerada fica na ordem de alguns nanômetros. As características que precisam ser vistas neste estudo são da ordem de alguns micrômetros em espessura, sendo muito pequeno para ser medido precisamente com microscopia ótica. (Brundle, 1992; Howell e Boyde, 2003; Egerton, Li e Malac, 2004; Roschger *et al.*, 2008; Roschger *et al.*, 2010)

Esta técnica permite caracterizar a morfologia e a composição da superfície de ossos, além de permitir observações de tamanhos de trincas, fraturas, diâmetro de poros e topografia de superfície. Seu funcionamento se baseia em um feixe de elétrons que passa por bobinas de varredura que é focado e escaneado através da superfície do material, fazendo os elétrons interagir com os átomos. A corrente que passa pelas bobinas de varredura sincronizada com as bobinas de deflexão de um tubo de raios catódicos produz uma imagem aumentada. Para análise da microestrutura podem ser usados três tipos de sinais gerados: elétrons secundários (SEs), elétrons de retroespalhamento (BSEs) e raios-X. As imagens de SE são geradas quando um elétron incidente transmite parte de sua energia para um átomo do material, causando a emissão de um elétron ionizado de baixa energia. O sinal surge da superfície do material e é os BSEs são geradas quando um elétron incidente colide com um átomo no material e é espalhado "de volta". A intensidade do sinal dos BSEs é proporcional ao número atômico e possui resolução espacial de aproximadamente 1 µm. (Brundle, 1992; Howell e Boyde, 2003; Egerton, Li e Malac, 2004; Roschger *et al.*, 2008; Roschger *et al.*, 2010)

Desta forma, o MEV fornece uma imagem altamente magnificada da superfície do material que é similar ao que se observaria se uma imagem ótica fosse possível em tal escala. É importante lembrar que, embora similar, as imagens por MEV possuem algumas diferenças, como por exemplo, no caso dos SEs, no qual o brilho da imagem em uma área é dependente do número de elétrons que chegam ao detector. Enquanto este é o motivo que os SEs podem gerar imagens tridimensionais precisas, pode também levar ao chamado "efeito de borda" na qual as bordas muito abruptas da amostra podem aparecer anormalmente brilhantes. (Brundle, 1992; Howell e Boyde, 2003; Egerton, Li e Malac, 2004; Roschger *et al.*, 2008; Roschger *et al.*, 2010)

A microanálise por espectrometria de energia dispersiva (EDS) envolve avaliações de raios-X com energias características dos átomos no material emitidas quando um elétron incidente atinge a superfície da amostra. Estas análises geram mapas de distribuição de elementos, como Ca, P, F e Sr dentro do material, fornecendo informação quantitativa de composição que pode ser usado em harmonia com as imagens geradas pelos SEs para relacionar a topografia lamelar, espaços de reabsorção e microfraturas, assim como foi visto em diversos estudos, principalemente para a análise das proporções de cálcio e fósforo. Observa-se que diferente da microscopia ótica, o MEV pode danificar a amostra, devido à interação do feixe de elétrons incidentes, a qual pode ser usada na aquisição de informações da natureza do material. (Brundle, 1992; Fountos *et al.*, 1998; Howell e Boyde, 2003; Egerton, Li e Malac, 2004; Roschger *et al.*, 2008; Roschger *et al.*, 2010; Kourkoumelis, Balatsoukas e Tzaphlidou, 2012)

2.12. Microidentação

Testes de identação clássicos podem ser usados para testar as propriedades materiais do tecido ósseo numa escala meso a micro. Nesses ensaios, um indentador rígido é pressionado com uma força conhecida e a área da impressão resultante é estimada oticamente. É a resistência que o material oferece à deformação plástica, de acordo com a **Equação 14** para o caso da microdureza Knoop.

Equação 14 - Cálculo da microdureza Knoop (Callister Jr, 2000)

As propriedades mecânicas dependem da microestrutura e podem ser avaliadas pelos seus valores de dureza ou microdureza. O osso pode ser visto como um material composto, possuindo cristais de hidroxiapatita e colágeno. Neste tipo de material há indicativos de que a sua resistência ao escoamento esta relacionada com seus valores de microdureza. Podemos mencionar dois tipos de microdureza: Vickers e Knoop, cada uma delas utilizando penetradores específicos e cobertos por normas. A microdureza Knoop não sofre muito o fenômeno da recuperação elástica, mas ela é muito sensível à orientação da superfície da amostra (anisotropia) por conter a diagonal maior mais alongada que a Vickers. Desta forma, ela é utilizada em vários estudos para analisar a microdureza de diversos tipos de ossos

(Souza, 1982; Ziv, Wagner e Weiner, 1996; Li e Aspden, 1997; Moran *et al.*, 2007; Boivin *et al.*, 2008; Zysset, 2009)

3 Materiais e Métodos

3.1 Aspectos éticos

A coleta das amostras seguiu procedimentos estabelecidos e aprovados pelo protocolo de pesquisa n° 408/11 do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**Anexo A**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos (**Anexo B**)

3.2 Materiais

Foram removidas cirurgicamente nove vértebras lombares (L1), três normais, três osteopênicas e três osteoporóticas de cadáveres humanos 12 horas post-mortem no Serviço de Verificação de Óbito (SVO) do Hospital das Clínicas de São Paulo - SP.

3.3 Pré-seleção das amostras

Antes da coleta do material, as amostras foram pré-divididas em três grupos: normal, osteopênico e osteoporótico, feita através de QUS, usando o equipamento Aquilles Insight (GE Medical Systems Lunar). Esta pré-seleção foi feita ao passo que os cadáveres chegavam, antes de os técnicos em necropsia começassem a autópsia. Cada pé de cada cadáver era colocado no equipamento e medidas em tríplice eram efetuadas, calculando-se a média de cada pé e a média total. Preferiou-se cadáveres mais velhos, pois tinham maior probabilidade de terem osteoporose, já não podíamos avaliar todos os cadáveres para não interferir no trabalho dos técnicos.

3.4 Preparação e caracterização das amostras

No Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do Hospital das Clínicas (HC) na cidade de São Paulo, especificamente no laboratório de biomecânica, as amostras foram extraídas axialmente de corpos vertebrais congelados por meio de uma broca trefina pós procedimento cirúrgico de dissecção e foram padronizadas em formato cilíndrico de (10x20)

mm. A medula óssea foi extraída por um processo de lavagem e a amostra foi mantida úmida com soro, congelada em -20 °C.

Para análise por microscopia de luz (Leitz modelo DM-RX – Leica) e por microdureza (VMHT-MOT – Leica), ambos no laboratório de Transformação de Fase no Departamento de Engenharia de Materiais da USP São Carlos, as amostras foram desidratadas em estufa a 37 °C em um período de 24 h, para não degradar as fibras de colágeno, fixadas em resina epóxi (Cristal T-280), lixadas e posteriormente polidas com alumina 0.05 μm. No microdurometro utilizou-se uma força de 15 gf e no microscópio de luz as imagens foram digitalizadas (Motic Image Plus 2.0).

As amostras analisadas por MEV (Zeiss Leo 440 – Cambridge, Inglaterra) no Instituto de Química de São Carlos, estavam sem medula óssea, desidratadas, secas, com formato cilíndrico de (5x10) mm e recobertas com carbono e ouro (aproximadamente 20 nm).

Para análise por EDS (EDX - Shimadzu) no Laboratório de Tribologia e Compósitos da Engenharia Mecânica da USP São Carlos e DRX (Siemens D5005 - Alemanha) no Laboratório de Caracterização Estrutural da UFSCar, as amostras foram fervidas a aproximadamente 100°C em peróxido de hidrogênio para degradar toda a parte orgânica e fragilizar a estrutura e depois descontaminadas em água Milli-Q à temperatura ambiente. Em seguida elas foram para a estufa a 100°C por 24h e por fim pulverizadas em almofariz. Foram feitas medidas em tríplice de cada amostra e calculou-se a média por amostra.

3.5 Parâmetros utilizados no DRX e para o método de Rietveld

O DRX de pó possui potência de 40 kV e 40 mA, radiação de cobre k- α e comprimento de onda λ =1.54056 Å e as amostras foram analisadas em um ângulo $\theta/2\theta$ de 20 a 70 graus, passo de 0.02° de 10 segundos cada, usando o software EVA em seguida para fazer o search match.

Os difratogramas obtidos pelo DRX foram refinados utilizando o método de Rietveld, através do software GSAS utilizando a interface do EXPGUI. Utilizou-se o programa ConvX para converter os dados para o formato aceito pelo programa GSAS e o ICSD para adquirir o arquivo .cif (difratograma padrão do banco de dados) da hidroxiapatita. Foi utilizado um padrão de quartzo para calibrar o software ao aparelho, refinando células unitárias, Deslocamentos atômicos (Uisos), fator de escala, a radiação de fundo (background), shft, GW, GV, GU, LX, S/L e H/L. Para refinar os difratogramas, utilizou-se a função Shifted Chebyschev com dez termos para considerar a anisotropia do osso (**Figura 4**) e foram

refinados a célula unitária (**Figura 5**), os Deslocamentos atômicos (Uisos) (**Figura 5**), o fator de escala (**Figura 6**), a radiação de fundo (background) (**Figura 4**), o shft (**Figura 7**), o GU (**Figura 7**), o GP (**Figura 7**), o ptec (**Figura 7**), o sfec (**Figura 7**), o LX (**Figura 7**) em ciclos de 10 (**Figura 8**) com Marquardt Damping igual a 1 (**Figura 8**) e corrigiu-se os efeitos causados pela orientação preferencial utilizando-se o modelo de March-Dollase para os planos h k l (2 1 1), (1 2 1) e (1 1 2). (**Figura 9**)

76 EXPG	UI interfa	ice to GS	AS: C:/GS/	AS/Traba	lhos/Me	strado/N	Normal/242	0/ — 🛛	×
File Op	tions Po	wder Xta	al Graphs	Results	Calc N	lacro Im	port/Export		Help
expnam	expedt	genles	powpref	powplot	Istview	liveplot			
LS Contro	LS Controls Phase Powder Scaling Profile Constraints Restraints Rigid Body MD Pref Orient SH Pref 🕑								
5	Select a his	stogram							
h# type bank ang/wave title 1 XC 1 1.54060 24200FFDA ← Function type 1 (10 terms) Edit Background Refine background ♥ Damping 0 → Differenteentee Constants									
	76			Edit Ba	ckgroun	d		×	
Y# Edit Background Setting background terms for histogram 1 Fit Background Function type 1 Number of terms 10 Graphically 10.145497E+02 2-0 50.376884E+00 6-0 90.913860E+00 100.2 5 Power series in Q**2n/n! 5 Power series in Q**2n/n! 6 Power series in Q**2n/n! and n!/Q**2n 7 Linear interpolation function 8 Reciprocal interpolation function 4 Add New Set Data Limits & Set Histogram Edit Use Flags Af and Af"									

Figura 4 - Uso da função Shifted Chebyschev e refinamento da radiação de fundo (background)

74 EXPGU	II interfa	ace to GS	AS: C:/GS	AS/Traba	lhos/Me	estrado/No	rmal/2420/ —	×
File Opt	ions Po	wder Xta	al Graphs	Results	Calc I	Macro Impo	rt/Export	Help
expnam	expedt	genles	powpref	powplot	Istview	liveplot		
LS Controls	; Phase	Powder	Scaling Pro	ofile Const	traints R	estraints Rig	id Body MD Pref Orie	ent 🗍 SH Pref 🕩
Phase: 1	Replace	e		tit	le: from C	:/GSAS/Trabal	hos/Mestrado/hydroxya	apatite.cif
Add		a 9.419	813 b	9.419813	c	6.896379	Edit Refine Cel	
Phase		α. 90.00	00 β	90.0000	γ	120.0000	Cell damping	0
* name	type	ref/damp	fraction	al coordina	ates Mu	ult Occupancy	Uiso	
1 Ca1	CA	0 U5 0	0.333300	0.666700	0.000920	4 1.0000	-0.09000	<u>^</u>
2 Ca2 3 P	P	0 US 0	0.398110	0.369520 (0.250000	6 3.0000	0.09175	
4 01	0	0 05 0	0.327110	0.484740 (0.250000	6 3.0000	0.15002	
5 02	0	0 05 0	0.586160	0.465000 (0.250000	6 3.0000	0.80000	
7 04	0	0050 0050	0.341520	0.255830 0	0.188190	4 1.5001	0.03696	
Set refinement entings: store 1.7 Add New Atoms								
Refinement Elars: E X E II E E Damping: X 0 = (II 5 = (E 0 = (Modify Atoms								
L.	104			10.0		10.100190	[1.50005	
	.006003							

Figura 5 - Refinamento das células unitárias e dos Deslocamentos atômicos (Uisos)

74 EXPGUI	interfa	ce to GS	AS: C:/GS	AS/Traba	lhos/N	1estrado	/Normal/2	420/ — 🛛	
File Optio	ons Pov	wder Xta	al Graphs	Results	Calc	Macro	Import/Expo	rt	Help
expnam	expedt	genles	powpref	powplot	Istviev	v livepl	ot		
LS Controls	Phase	Powder	Scaling Pr	ofile Cons	traints	Restraints	Rigid Body	MD Pref Orient	SH Pref ()
	Select a	histograr	n	Scale F	actor-				
h# type ban	ik ang/wav	ve ti	tle	Scale	0.49610		Refine 🔽	Damping 0	-
IAC	1 1.540	00 242002	EDATI (2420.	Phase I	Fraction	IS			
				Phase	1 1.0000)	 Refine F	Damping 0	
								<u>_</u>	
	1			-					-
				I					

Figura 6 - Refinamento do fator de escala

74 EXPGUI interface to	GSAS: C:/GSAS/Traba	lhos/Mestrado/Normal/2420/	— 🗆 🗙					
File Options Powder	Xtal Graphs Results	Calc Macro Import/Export	Help					
expnam expedt gen	es powpref powplot	Istview liveplot						
LS Controls Phase Powder Scaling Profile Constraints Restraints Rigid Body MD Pref Orient SH Pref 🕑								
Select a histogram	Hist 1 Phase 1 (t	/pe 4)	_ _					
h# type bank ang/wave	Damping 0	Peak cutoff 0.01000 Cha	nge Type					
1 XC 1 1.54060 24	201 GU 🔽 0.203898E	+04 GV 🗖 -0.910922E+01 GW 🗖	0.118600E+02					
	GP 🔽 0.685280E	+00 LX 🔽 0.285668E+02 ptec 🔽	0.858740E+00					
	trns 🗖 0.159930E	+00 shft 🔽 -0.157938E+01 sfec 🔽	0.00000E+00					
	S/L ☐ 0.189600E	-01 H/L 🗖 0.151700E-01 eta 🗖	0.750000E+00					
	\$400 🔽 0.164227E	+01 S004 🔽 0.000000E+00 S202 🔽	0.000000E+00					
	-							
	<u> </u>		<u> </u>					

Figura 7 - Refinamento do GU, GP, LX, ptec, shft, sfec, SXXX, SYYY e SZZZ

74 EXPGUI interface to G	SAS: C:/GSAS/	Fraba	lho	s/Me	strado	/Nor	mal/	2420)/	_ [×
File Options Powder)	ital Graphs Re	sults	Ca	IC N	lacro	Impor	t/Exp	ort			Help
expnam expedt genles	powpref po	wplot	Ist	view	livepl	ot					
LS Controls Phase Powder	Scaling Profile	Cons	traint	ls Re	estraints	Rigi	d Body	ME) Pret	f Orient	SH Pref ()
Select a histogram Last History: EXPGUI 1225 1227 (2 changes) 06/30/14 22:41:12											
1 XC 1 1.54060 24	Title:	2420)								
			40	-1	C	onver	gence	e Crit	erio	n	
	Number of	cycle	s 10			0.01					
	Print Op	tions	(0)			Marq	uardt	Damp	bing		
						matri	(hand	hwidt	b lo	_	
						matri	(Danc	wiat	njo		
	-Reflection Inter	nsity E	xtra	ction-							
	Extraction Method			LeBai	l dampi	ng_0		1	E	ktract F	obs 🔽
		1	2	3	4 5	6	7	8	9 (Phase #	¥)
	Rietveld	œ	C	C	0 0	С	С	С	С		
	F(calc) Weighte	dC	0	0	0 0	0	0	0	0	(Model	biased)
	Equally Weighte	d C	0	0	0 0	0	0	0	୍ୱ	Le Bail	method)
		_				_	_			_	

Figura 8 - Uso de Marquardt Damping igual a 1 em ciclos de 10

76 EX	PGL	II interfa	ce to GS	AS: (:/GS/	AS/Traba	alhos/M	lestrado/N	Normal/	/2420/	_	×
File	Opt	ions Po	wder Xta	l G	raphs	Results	Calc	Macro Im	nport/Exp	ort		Help
expna	am	expedt	genles	рои	vpref	powplot	Istview	liveplot				
LS Co	ntrols	Phase	Powder	Scalin	ig Pro	ofile Con	straints 🛛	Restraints	Rigid Bod	y MD Pref	Orient	SH Pref ()
	Se	lect a hist	togram		Marc	n-Dollase	Preferen	tial Orienta	tion ——			
h# ty	pe ba	ank ang/wa	ve ti	tl	Phase	e1_h	k I	Ratio		Fraction		Damping
1 X	C	1 1.540	60 2420 0 F1	FD. <u>^</u>	Plane	1 2.00 1	.00 1.00	1.000000		0.333333		•
					Plane	2 1.00 2	.00 1.00	1.000000		0.333333		•
					Plane	3 1.00 1	.00 2.00	1.000000		0.333333		• =
					Add p	lane						
		-		_								
-				• I.								

Figura 9 - Correção dos efeitos causados pela orientação preferencial utilizando-se o modelo de March-Dollase nos planos (hkl) igual à (2 1 1), (1 2 1) e (1 1 2).

Utilizou-se o programa Crystal Maker® (CrystalMaker Software Ltd. - Inglaterra) para construir uma representação da célula unitária hexagonal da hidroxiapatita.

4 Resultados e Discussões

4.1. Análises por Ultrassonometria

Coletou-se através do número de SVO do cadáver dados com relação à idade, altura e peso e pelo equipamento Aquilles Insight (GE Medical Systems Lunar), dados quantitativos em tríplice, onde a média dos T-score está representada de acordo com a **Tabela 4**.

Grupo	Idade	Altura	Peso	T-score
Normal 1	67	1,69	46	-0,067
Normal 2	64	1,73	72,2	0,383
Normal 3	81	1,54	45	-0,183
Osteopênico 1	68	1,63	42	-1,383
Osteopênico 2	85	1,75	56	-1,517
Osteopênico 3	82	1,78	70	-1,333
Osteoporótico 1	86	1,61	42	-2,767
Osteoporótico 2	79	1,39	25,4	-2,883
Osteoporótico 3	68	1,7	84	-2,750

Tabela 4 - Classificação dos grupos pela análise de ultrassonometria de calcâneo

Estes valores de T-score representam uma indicação do quadro clínico dos indivíduos entre 64 a 86 anos, sendo apenas uma referência para separar e correlacionar os grupos, já que o T-score se relaciona apenas o BMD. Entretanto, com o auxílio das outras análises percebeuse que a predição pela ultrassonometria se confirmou.

4.2. Microscopia Ótica

Observou-se a integridade de trabéculas, tamanho de trincas e fraturas e a organização lamelar óssea entre os três grupos, sendo selecionado um normal, um osteopênico e um osteoporótico. Na **Figura 10a**) observa-se lamelas bem organizadas, compostas por fibra de colágeno e camadas de hidroxiapatita intercaladas no formato geométrico da trabécula. Na **Figura 10b**) temos o inicio da degradação lamelar e a aparição de trincas, como a indicada, com aproximadamente 145 µm. Já na **Figura 10c**) temos o desenvolvimento das trincas em

fraturas bem aparentes e com bordas degradadas, representada pela fratura medida com abertura máxima de aproximadamente 81 μ m. As trabéculas apresentavam diâmetros que variam em torno de 50 a 200 μ m, e poros formados pelos osteóides entre 3 e 8 μ m, com canais de Harvers e Volkmans entre 10 a 25 μ m.



Figura 10 - Microscopia ótica do osso trabecular de vértebra humanas fixadas em resina epóxi e polidas: a) Normal; b) Osteopênica; c) Osteoporótica

Por ser considerado um material compósito, a componente mineral atribuiu ao material tendência à fratura frágil (**Figura 10b-c**)), no entanto, devido à organização em camadas das fibras de colágeno, a fratura se propaga paralela às suas linhas, e quanto menor sua organização, mais irregular é sua propagação de trinca, observado para o grupo osteoporótico.

4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Observou-se relações entre trincas, fraturas, densidade trabecular com ou sem formação de placas, conectividade e tamanho de poros nos três grupos, sonde selecionado um normal, um osteopênico e um osteoporótico. Para ossos normais (**Figura 11a**) e **Figura 12a**)) a microarquitetura era constituída por poros regulares arredondados, maior conectividade, número trabecular, e presença de placas espessas e bem organizadas.



Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura do osso trabecular de vértebras humanas fixadas em resina epóxi e polidas: a) Normal; b) Osteopênica ; c) Osteoporótica



Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura do osso trabecular de vértebras humanas: a)Normal; b) Osteopênica; c) Osteoporótica

Em ossos osteopênicos (Figura 11b) e Figura 12b)) foi observado a existência de inicio de fraturas frágil causadas por carregamentos axiais ou cisalhantes, afinamento das trabéculas e a inexistência de conexões do tipo placa. Por fim, em ossos considerados osteoporóticos (Figura 11c) e Figura 12c)), notou-se trincas e fraturas com maior irregularidade, pouca conectividade, afinamento das trabéculas e deterioração da microarquitetura.

4.4. Espectroscopia de energia dispersiva (EDS)

Os valores encontrados para a proporção de cálcio e fósforo estão representados na **Tabela 5** e também na **Figura 13**.

	Normal	Osteopênico	Osteoporótico
Amostra 1	1,91	1,80	1,68
Amostra 2	2,13	1,80	1,73
Amostra 3	2,03	1,82	1,78
Média	2,02	1,81	1,73
Desvio Padrão	0,11	0,01	0,05

Tabela 5 - Proporção de cálcio e fósforo nos 3 estados do osso



Figura 13 - Proporção de cálcio e fósforo em cada grupo

A proporção de Ca/P é maior para ossos normais, e quanto maior a proporção de cálcio e fósforo, até um ponto crítico, menor a tendência de acontecer a ruptura como visto por Fountos, et. al.(1998) e por Kourkoumelis, et. al (2012), devido a prováveis substituições dos íons cálcio devido ao desbalanceamento do remodelamento ósseo (Costa *et al.*, 2009), diminuindo sua a quantidade e aumentando a desorganização das células unitárias em ossos osteopênicos e osteoporóticos. Esta perda deixa o osso menos rígido (Garnet e Hiatt, 2003; Junqueira e Carneiro, 2008), o que foi confirmado com nossos ensaios de microdureza e a desorganização provavelmente causou o aumento nas microdeformações.(Fountos *et al.*, 1998; Garnet e Hiatt, 2003; Junqueira e Carneiro, 2008; Costa *et al.*, 2009; Kourkoumelis, Balatsoukas e Tzaphlidou, 2012)

4.5. Microdureza (HK)

3

28,9

Os valores avaliados para microdureza Knoop (HK) estão representados nas tabelas **Tabela 6, Tabela 7** e **Tabela 8** e também na **Figura 14**.

Amostra	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Média
1	30,7	30,7	30,6	30,67
2	28,2	28,8	32,9	29,97
3	30,1	33,9	26,5	30,17

Tabela 6 - Medidas das amostras normais

As amostras de ossos normais resultaram em uma média de 30,27 e desvio padrão de 0,36, resultando no valor de 30,27±0,36 HK

	Tabela 7 -	Medidas das amos	tras osteopênicas	
Amostra	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Média
1	26,8	27,9	24	26,23
2	27,3	26,9	23,3	25,83

26,6

As amostras osteopênicas em número de três resultaram em uma média de 26,23 e desvio padrão de 0,40, resultando no valor de 26,23±0,40 HK

24,4

Amostra	Medida 1	Medida 2	Medida 3	Média
1	22	23,2	20,4	21,87
2	23,4	22	19,4	21,6
3	20,3	20,9	19,4	20,2

Tabela 8 - Medidas das amostras osteoporóticas

As amostras de ossos osteoporóticos resultaram em uma média de 21,22 e desvio padrão de $0,89 = 21,22\pm0,89$ HK

As médias e seus respectivos desvios padrões estão representadas na Figura 14.

26,63



Figura 14 - Microdureza na escala Knoop para cada grupo

Observou-se que ossos osteoporóticos correspondem a valores menores de microdureza quando comparado aos normais corroborando com os estudos de Li, et al (1997), Moran et. al. (2007) e Boivin et. al. (2008). Quanto maior a microdureza, maior a resistência à deformação, de acordo com Ferrante (1996), o que condiz com a realidade de ossos osteoporóticos, que fraturam com maior facilidade. Além disso, como vimos no EDS, temos menos cálcio, causando uma diminuição na dureza, assim como quando colocamos um osso na coca-cola, tornando-o flexivel, ou seja, menos duro. (Ferrante, 1996; Li e Aspden, 1997; Moran *et al.*, 2007; Boivin *et al.*, 2008; N.I.H., 2013)

4.6. Difratometria de Raios-X (DRX) e o método de Rietveld

Representado na **Figura 15**, o espectro de difratometria de raios-X de ossos normal, osteopênico e osteoporótico, observando-se os picos da hidroxiapatita, sem mais nenhuma fase presente e grupo espacial hexagonal P6₃/m, próprio de cristais de hidroxiapatita.



Figura 15 - Difratometria de raios-X de um de cada tipo de osso, sendo o primeiro de cima para baixo normal, o segundo osteopênico e o terceiro osteoporótico

Embora geralmente não seja possível identificar visualmente, sabe-se que os picos normais são menos largos que os osteopênicos e os osteoporóticos, já que os tamanhos de cristalitos são maiores, decorrente das equações **Equação 4** e **Equação 9**. Na **Figura 16** temse a comparação dos três tipos de ossos. Este é um caso extremo que foi possível construir, mas como dito anteriormente, geralmente não se é possível diferenciá-los visualmente. (Williamson e Hall, 1953; Caglioti, Paoletti e Ricci, 1958)



Figura 16 - Difratograma comparativo dos três tipos de ossos

Produziu-se o sólido de Bravais da estrutura tridimensional hexagonal da hidroxiapatita através do programa Crystal Maker, como visto na **Figura 17**.

Aparentemente os grupos O-H estão localizados nas quinas da célula unitária do cristal, enquanto os átomos de Ca, P e O estão localizados dentro do volume onde a=b \neq c, com ângulos α = β =90° e γ =120°.



Figura 17 – Estrutura cristalina do osso, sendo: O = vermelho, Ca =azul e P = cinza;

-										
Grupo	Tamanho do Cristalito (Å)	Desvio Padrão								
Normal	669,34	27,70								
Osteopênico	467,38	65,99								
Osteoporótico	213,01	86,00								

Pelo método de Rietveld foi possível encontrar os tamanhos de cristalitos, como visto na **Tabela 9** e na **Figura 18** e as microdeformações, conforme **Tabela 10** e **Figura 19**.



 Tabela 9 - Tamanho do Cristalito para cada grupo

Figura 18 - Tamanho do cristalito nos diferentes grupos

Grupo	Microdeformação	Desvio Padrão
Normal	5,41	1,58
Osteopênico	11,48	1,57
Osteoporótico	16,88	1,42

 Tabela 10 - Microdeformação em cada grupo



Figura 19 - Gráfico em colunas da microdeformação em cada grupo

Encontrou-se ossos normais com tamanhos de cristalitos maiores que os osteopênicos e os osteoporóticos e a variação relativa do parâmetro de rede ou distância interplanar causada pelos defeitos (microdeformação), ao contrário do tamanho do cristalito, possuem uma média menor para os ossos normais, quando comparado aos osteopênicos e osteoporóticos. Uma possível explicação seria que o aumento da microdeformação (desordem) ocorreu porque para ossos osteoporóticos, vamos ter uma quantidade maior de trocas de íons aleatórios, pois assim como ocorre o desbalanceamento do remodelamento ósseo devido à falhas inerentes ao envelhecimento, ocorre também a adição de íons diferentes na célula unitária. Com o aumento da desordem no cristalito, e sabendo da literatura que há preferência por íons de raio atômico menor, teremos a diminuição do tamanho do cristalito. Ao diminuir, há possibilidade de tornar os cristalitos mais compactos, o que novamente irá aumentar a microdeformação, que é a mede também a tensão interna, ou tensão residual no cristalito. (Suzuki, Hatsushika e Hayakawa, 1981; Suzuki, Hatsushika e Miyake, 1982; Legeros e Legeros, 1984; Suzuki, Ishigaki e Miyake, 1984; Xu, 1994; Costa *et al.*, 2009; Noor, 2013)

5 Conclusão

A microarquitetura óssea das vértebras de ossos secos trabeculares pôde ser avaliada pelos métodos: microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, EDS, microdureza e difratometria de raios-X com refinamento de Rietveld. A caracterização microestrutural dos cristais de hidroxiapatita em ossos secos trabeculares permitiu diferenciar os três tipos de ossos (normal, osteopênico e osteporótico) e há potencial em usá-lo como um novo método de detecção de osteoporose, com ênfase na qualidade óssea.

6 Artigos publicados

- CESAR, R. ; **BOFFA, R.S.** ; FACHINE, L.T. ; LEIVAS, T.P. ; SILVA, A.M.H. ; PEREIRA, C.A.M. ; REIFF, R.B.M. ; ROLLO, J.M.D.A. . Evaluation of Trabecular Microarchitecture of Normal Osteoporotic and Osteopenic Human Vertebrae. Procedia Engineering, v. 59, p. 6-15, 2013.
- BOFFA, R. S.; SUGIMOTO, P. H. O.; CESAR, R.; ROLLO, J. M. D. A. Antibacterial Stainless Steel. In: 19^a Conferencia del Acero IAS 2013, 2013, Rosário - Santa Fé. Conferencia del Acero IAS 2013, 2013.
- CESAR, R. ; ROLLO, J. M. D. A. ; BOFFA, R. S. ; FACHINE, L. T. M. ; BELLANI, C. F. ; LEIVAS, T. P. . ANÁLISE DA MICROARQUITETURA DE OSSOS TRABECULARES POR MICROTOMOGRAFIA 3D. In: XVIII Congresso Brasileiro de Física Médica, 2013, São Pedro SP. Revista Brasileira de Física Médica, 2013.
- **BOFFA, R. S.**; ROLLO, J. M. D. A.; CESAR, R.; LEIVAS, T. P. . Lattice parameters determination of hydroxyapatite by Rietveld refinement in normal, osteopenic and osteoporotic human bones. In: XII Brazilian MRS Meeting, 2013, Campos do Jordão. XII Brazilian MRS Meeting, 2013.
- CESAR, R. ; ROLLO, J. M. D. A. ; BOFFA, R. S. MODELAMENTO DA CINÉTICA DAS TRANSFORMAÇÕES DE FASE UTILIZANDO ENSAIOS DILATOMÉTRICOS EM AÇO AO CARBONO COMUM. In: VI Conferência Brasileira Sobre Temas de Tratamento Térmico, 2012, Atibaia - SP. VI Conferência Brasileira Sobre Temas de Tratamento Térmico, 2012.

Referências¹

ADACHI, J. et al. The impact of incident vertebral and non-vertebral fractures on health related quality of life in postmenopausal women. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 3, n. 1, p. 11, 2002. ISSN 1471-2474. Disponível em: < http://www.biomedcentral.com/1471-2474/3/11 >.

AGUADO, F. et al. Behavior of bone mass measurements - Dual energy X-ray absorptiometry total body bone mineral content, ultrasound bone velocity, and computed metacarpal radiogrammetry, with age, gonadal status, and weight in healthy women. Investigative Radiology, v. 31, n. 4, p. 218-222, Apr 1996. ISSN 0020-9996. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996UE33000006 >.

ALLEN, M. R.; BURR, D. B. Bisphosphonate effects on bone turnover, microdamage, and mechanical properties: What we think we know and what we know that we don't know. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 56-65, 7// 2011. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328210018636 >.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667-681, 4// 2000. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961299002422 >.

ARAÚJO, D. V.; OLIVEIRA, J. H. A. D.; BRACCO, O. L. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no sistema suplementar de saúde brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 897-901, 2005. ISSN 0004-2730.

AZÀROFF, L. V. Elements of x-ray crystallography. New York: McGraw-Hill Book Company 1968.

BARRERE, F. et al. Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBF×5 solution. **Biomaterials,** v. 23, n. 9, p. 1921-1930, 5// 2002. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961201003180 >.

BIVER, E. et al. Bone turnover markers for osteoporotic status assessment? A systematic review of their diagnosis value at baseline in osteoporosis. **Joint Bone Spine,** v. 79, n. 1, p. 20-25, 1// 2012. ISSN 1297-319X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1297319X11001242 >.

BOIVIN, G. et al. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. **Bone**, v. 43, n. 3, p. 532-538, 9// 2008. ISSN 8756-3282. Disponível em: <

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328208002834 >.

BOSKEY, A. L.; MARKS, S. C., JR. Mineral and matrix alterations in the bones of incisorsabsent (ia/ia) osteopetrotic rats. **Calcified Tissue International**, v. 37, n. 3, p. 287-292, 1985/05/01 1985. ISSN 0171-967X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/BF02554876 >.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas e Técnicas. NBR 6023

BOUXSEIN, M. Bone quality: where do we go from here? **Osteoporosis International,** v. 14, n. 5, p. 118-127, 2003/09/01 2003. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00198-003-1489-x >.

BRUNDLE, C. R. E., C. A. WILSON, S. Encyclopedia of Materials Characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films. Greenwich: Manning Publication Company 1992.

CAGLIOTI, G.; PAOLETTI, A.; RICCI, F. P. Choice of collimators for a crystal spectrometer for neutron diffraction. **Nuclear Instruments,** v. 3, n. 4, p. 223-228, 10// 1958. ISSN 0369-643X. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0369643X5890029X >.

CALLISTER JR, W. D. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução Rio de Janeiro: 2000.

CAPOZZO, A.; MARCHETTI, M.; TOSI, V. **Biolocomotion: a century of research using moving pictures**. Roma: Promograph, 1992.

CARTER, D. R.; HAYES, W. C. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. **The Journal of Bone & Joint Surgery,** v. 59, n. 7, p. 954-962, 1977. ISSN 0021-9355. Disponível em: < http://dx.doi.org/ >.

CESAR, R. et al. Evaluation of Trabecular Microarchitecture of Normal Osteoporotic and Osteopenic Human Vertebrae. **Procedia Engineering,** v. 59, n. 0, p. 6-15, // 2013. ISSN 1877-7058. Disponível em: <

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877705813010011 >.

CORTET, B. et al. Does Quantitative Ultrasound of Bone Reflect More Bone Mineral Density Than Bone Microarchitecture? **Calcified Tissue International**, v. 74, n. 1, p. 60-67, 2004/01/01 2004. ISSN 0171-967X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00223-002-2113-3 >.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos,** v. 4, n. 3, p. 10, 2009.

COWIN, S. C. Fabric dependence of an anisotropic strength criterion. **Mechanics of Materials,** v. 5, n. 3, p. 251-260, 9// 1986. ISSN 0167-6636. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167663686900220 >.

CULLITY, B. D. Elements of X-ray diffraction. 2. Massachusetts, USA: Addison-Wesley Publishing Company, Inc., 1978.

CUMMINGS SR, B. D. B. D. M. Clinical use of bone densitometry: Scientific review. **JAMA**, v. 288, n. 15, p. 1889-1897, 2002. ISSN 0098-7484. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1001/jama.288.15.1889 >.

CUNDY, T.; REID, I. R. Paget's disease of bone. **Clinical Biochemistry,** v. 45, n. 1–2, p. 43-48, 1// 2012. ISSN 0009-9120. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912011026890 >.

DEBORAH, M.; OLOF, J.; HANS, W. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. **BMJ**, v. 312, 1996.

DEKKER, R. J. et al. Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. **Biomaterials**, v. 26, n. 25, p. 5231-5239, 9// 2005. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961205001079 >.

DEMPSTER, D. Bone microarchitecture and strength. **Osteoporosis International,** v. 14, n. 5, p. 54-56, 2003/09/01 2003. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00198-003-1474-4 >.

DILWORTH, L. et al. Bone and faecal minerals and scanning electron microscopic assessments of femur in rats fed phytic acid extract from sweet potato (Ipomoea batatas). **BioMetals,** v. 21, n. 2, p. 133-141, 2008/04/01 2008. ISSN 0966-0844. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s10534-007-9101-z >.

DING, M. et al. Age-related variations in the microstructure of human tibial cancellous bone. **Journal of Orthopaedic Research,** v. 20, n. 3, p. 615-621, 2002. ISSN 1554-527X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00132-2 >.

EGERTON, R. F.; LI, P.; MALAC, M. Radiation damage in the TEM and SEM. **Micron**, v. 35, n. 6, p. 399-409, 8// 2004. ISSN 0968-4328. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432804000381 >.

ELLIOTT, J. C. Calcium Phosphate Biominerals. In: (Ed.). **Phosphates: Geochemical, Geobiological and Material Importance, Reviews in Mineralogy and Geochemistry** Washington, DC Mineralogical Society of America, v.48, 2002. cap. 11, p.427–454.

ENZO, S. et al. A profile-fitting procedure for analysis of broadened X-ray diffraction peaks. I. Methodology. **Journal of Applied Crystallography,** v. 21, n. 5, p. 536-542, 10/01 1988. ISSN 0021-8898. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S0021889888006612 >.

FAULKNER, K. G. et al. QUANTITATIVE ULTRASOUND OF THE HEEL -CORRELATION WITH DENSITOMETRIC MEASUREMENTS AT DIFFERENT SKELETAL SITES. **Osteoporosis International,** v. 4, n. 1, p. 42-47, Jan 1994. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994MT96000008 >.

FERRANTE, M. Seleção de Materiais. São Carlos: EDUFSCar, 1996.

FOUNTOS, G. et al. The effects of inflammation-mediated osteoporosis (IMO) on the skeletal Ca/P ratio and on the structure of rabbit bone and skin collagen. **Applied Radiation and Isotopes,** v. 49, n. 5-6, p. 657-9, 1998. ISSN 0969-8043. Disponível em: < http://www.biomedsearch.com/nih/effects-inflammation-mediated-osteoporosis-IMO/9569570.html >.

FRATZL, P. et al. Effects of sodium fluoride and alendronate on the bone mineral in minipigs: A small-angle X-ray scattering and backscattered electron imaging study. **Journal**

of Bone and Mineral Research, v. 11, n. 2, p. 248-253, 1996. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.5650110214 >.

GARNET, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GENANT, H. K.; JIANG, Y. Advanced Imaging Assessment of Bone Quality. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1068, n. 1, p. 410-428, 2006. ISSN 1749-6632. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1196/annals.1346.038 >.

GINEBRA, M.-P. et al. Modeling of the Hydrolysis of α -Tricalcium Phosphate. **Journal of the American Ceramic Society,** v. 82, n. 10, p. 2808-2812, 1999. ISSN 1551-2916. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1111/j.1151-2916.1999.tb02160.x >.

GOLD, D. T. The Nonskeletal Consequences of Osteoporotic Fractures: Psychologic and Social Outcomes. **Rheumatic diseases clinics of North America,** v. 27, n. 1, p. 255-262, 2001. ISSN 0889-857X. Disponível em: < http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889857X05701976?showall=true >.

GONG, J. K.; ARNOLD, J. S.; COHN, S. H. Composition of trabecular and cortical bone. **The Anatomical Record,** v. 149, n. 3, p. 325-331, 1964. ISSN 1097-0185. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/ar.1091490303 >.

GOURION-ARSIQUAUD, S. et al. Use of FTIR Spectroscopic Imaging to Identify Parameters Associated With Fragility Fracture. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 9, p. 1565-1571, 2009. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.090414 >.

GROSS, K. A.; BERNDT, C. C. Biomedical Application of Apatites In: (Ed.). **Phosphates:** Geochemical, Geobiological and Material Importance, Reviews in Mineralogy and Geochemistry Washington, DC Mineralogical Society of America, v.48, 2002. cap. 17, p.631 - 672.

HALL, S. Biomecânica básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

HALL, S. E. et al. A Case–Control Study of Quality of Life and Functional Impairment in Women with Long–Standing Vertebral Osteoporotic Fracture. **Osteoporosis International**, v. 9, n. 6, p. 508-515, 1999/06/01 1999. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s001980050178 >.

HAMILL, J.; KNUTZEN, K. M. **Bases biomecânicas do movimento humano**. São Paulo: Manole, 1999.

HANS, D. et al. Ultrasonographic heel measurements to predict hip fracture in elderly women: The EPIDOS prospective study. **Lancet**, v. 348, n. 9026, p. 511-514, Aug 24 1996. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VD42700011 >.

_____. Skeletal Sites for Osteoporosis Diagnosis: The 2005 ISCD Official Positions. **Journal of Clinical Densitometry,** v. 9, n. 1, p. 15-21, 1// 2006. ISSN 1094-6950.

Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1094695006001855 >. Acesso em: 2006/3//.

HELGASON, B. et al. Mathematical relationships between bone density and mechanical properties: A literature review. **Clinical Biomechanics,** v. 23, n. 2, p. 135-146, 2// 2008. ISSN 0268-0033. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268003307001866 >.

HILL, R. J.; HOWARD, C. J. Quantitative phase analysis from neutron powder diffraction data using the Rietveld method. **Journal of Applied Crystallography,** v. 20, n. 6, p. 467-474, 12/01 1987. ISSN 0021-8898. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S0021889887086199 >.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p. 2757-2774, 4// 2011. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961211000056 >.

HOWELL, P. G. T.; BOYDE, A. Volumes From Which Calcium and Phosphorus X-Rays Arise in Electron Probe Emission Microanalysis of Bone: Monte Carlo Simulation. **Calcified Tissue International**, v. 72, n. 6, p. 745-749, 2003/06/01 2003. ISSN 0171-967X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00223-002-2010-9 >.

I.C.D.D. International Centre for Diffraction Data. 2013.

I.C.S.D. Inorganic Crystal Structure Database. 2013.

JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 12, p. 1726-1733, 2006/12/01 2006. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00198-006-0172-4 >.

JOHNELL, O. et al. Predictive Value of BMD for Hip and Other Fractures. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 7, p. 1185-1194, 2005. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1359/JBMR.050304 >.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008.

KANIS, J. A. WHO Technical Report. University of Sheffield 2007.

KANIS, J. A. et al. The diagnosis of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 9, n. 8, p. 1137-1141, 1994. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.5650090802 >.

KARSDAL, M. A. et al. IL-6 Receptor Inhibition Positively Modulates Bone Balance in Rheumatoid Arthritis Patients with an Inadequate Response to Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy: Biochemical Marker Analysis of Bone Metabolism in the Tocilizumab RADIATE Study (NCT00106522). **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 2, p. 131-139, 10// 2012. ISSN 0049-0172. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017212000182 >.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Panamericana, 2004.

KHAW, K.-T. et al. Prediction of total and hip fracture risk in men and women by quantitative ultrasound of the calcaneus: EPIC-Norfolk prospective population study. **The Lancet,** v. 363, n. 9404, p. 197-202, 1/17/ 2004. ISSN 0140-6736. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673603153251 >.

KLEEREKOPER, M.; BALENA, R. Fluorides and Osteoporosis. **Annual Review of Nutrition,** v. 11, n. 1, p. 309-324, 1991/07/01 1991. ISSN 0199-9885. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nu.11.070191.001521 >. Acesso em: 2013/07/16.

KLEEREKOPER, M. et al. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. **Calcified Tissue International**, v. 37, n. 6, p. 594-597, 1985. ISSN 0171-967X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/BF02554913 >.

KLEIN, C. P. A. T. et al. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. **Biomaterials,** v. 11, n. 7, p. 509-512, 9// 1990. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014296129090067Z >.

KOHLI, S.; RITHNER, C. D.; DORHOUT, P. K. X-ray characterization of annealed iridium films. **Journal of Applied Physics,** v. 91, n. 3, p. 1149-1154, 02/01/ 2002. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1063/1.1429798 >.

KOURKOUMELIS, N.; BALATSOUKAS, I.; TZAPHLIDOU, M. Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy. **Journal of Biological Physics**, v. 38, n. 2, p. 279-291, 2012. ISSN 0092-0606. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s10867-011-9247-3 >.

KWOK, T. et al. Predictive values of calcaneal quantitative ultrasound and dual energy X ray absorptiometry for non-vertebral fracture in older men: results from the MrOS study (Hong Kong). **Osteoporosis International,** v. 23, n. 3, p. 1001-1006, Mar 2012. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300251200023 >.

LANGFORD, J. I.; LOUER, D.; SCARDI, P. Effect of a crystallite size distribution on X-ray diffraction line profiles and whole-powder-pattern fitting. **Journal of Applied Crystallography,** v. 33, n. 3, p. 964-974, 06/01 2000. ISSN 0021-8898. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S002188980000460X >.

LE BAIL, A.; DUROY, H.; FOURQUET, J. L. Ab-initio structure determination of LiSbWO6 by X-ray powder diffraction. **Materials Research Bulletin,** v. 23, n. 3, p. 447-452, 3// 1988. ISSN 0025-5408. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0025540888900190 >. LEGEROS, R.; LEGEROS, J. Phosphate Minerals in Human Tissues. In: NRIAGU, J. e MOORE, P. (Ed.). **Phosphate Minerals**: Springer Berlin Heidelberg, 1984. cap. 12, p.351-385. ISBN 978-3-642-61738-6.

LEVENTOURI, T. Synthetic and biological hydroxyapatites: Crystal structure questions. **Biomaterials,** v. 27, n. 18, p. 3339-3342, 6// 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206001761 >.

LI, B.; ASPDEN, R. M. Mechanical and material properties of the subchondral bone plate from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. **Annals of the Rheumatic Diseases,** v. 56, n. 4, p. 247-254, 1997. Disponível em: < http://ard.bmj.com/content/56/4/247.abstract >.

LICATA, A. Bone density vs bone quality: What's a clinician to do? **Cleveland Clinic Journal of Medicine,** v. 76, n. 6, p. 331-336, 2009. Disponível em: < http://www.ccjm.org/content/76/6/331.abstract >.

LIPS, P. et al. Quality of Life in Patients with Vertebral Fractures: Validation of the Quality of Life Questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QUALEFFO). **Osteoporosis International,** v. 10, n. 2, p. 150-160, 1999/08/01 1999. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s001980050210 >.

LOUER, D.; LANGFORD, J. I. Peak shape and resolution in conventional diffractometry with monochromatic X-rays. **Journal of Applied Crystallography,** v. 21, n. 5, p. 430-437, 10/01 1988. ISSN 0021-8898. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S002188988800411X >.

LYLES, K. W. Osteoporosis and Depression: Shedding More Light Upon a Complex Relationship. **Journal of the American Geriatrics Society,** v. 49, n. 6, p. 827-828, 2001. ISSN 1532-5415. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1046/j.1532-5415.2001.49162.x >.

MADSEN, I. C.; HILL, R. J. Effect of divergence and receiving slit dimensions on peak profile parameters in Rietveld analysis of X-ray diffractometer data. **Journal of Applied Crystallography,** v. 21, n. 5, p. 398-405, 10/01 1988. ISSN 0021-8898. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S0021889888003474 >.

MARCUS, R. et al. Fundamentals of osteoporosis. UK: Elsevier, 2010.

MARÍN, F. et al. Relationship Between Bone Quantitative Ultrasound and Fractures: A Meta-Analysis. **Journal of Bone and Mineral Research,** v. 21, n. 7, p. 1126-1135, 2006. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.060417 >.

MILLER, P. Guidelines for the diagnosis of osteoporosis: T-scores vs fractures. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders,** v. 7, n. 1-2, p. 75-89, 2006/06/01 2006. ISSN 1389-9155. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s11154-006-9006-0 >.

MORAN, P. et al. Preliminary work on the development of a novel detection method for osteoporosis. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine,** v. 18, n. 6, p. 969-974, 2007/06/01 2007. ISSN 0957-4530. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s10856-006-0037-6 >.

MORGAN, E. F.; KEAVENY, T. M. Dependence of yield strain of human trabecular bone on anatomic site. **Journal of biomechanics,** v. 34, n. 5, p. 569-577, 2001. ISSN 0021-9290. Disponível em: <

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021929001000112?showall=true >.

MOSEKILDE, L. Sex differences in age-related loss of vertebral trabecular bone mass and structure—biomechanical consequences. **Bone**, v. 10, n. 6, p. 425-432, // 1989. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/8756328289900744 >.

N.I.H. National Institute of Arthritis and Muscoloskeletal and Skin Deseases. Consensus statement – osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy 2013.

N.O.F. National Osteoporosis Fundation - Physicians's guide to prevention and tretamente of osteoporosis 2013.

NEVITT, M. C. et al. The Association of Radiographically Detected Vertebral Fractures with Back Pain and Function: A Prospective Study. **Annals of Internal Medicine**, v. 128, n. 10, p. 793-800, 1998. ISSN 0003-4819. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-128-10-199805150-00001 >.

NJEH, C. F. et al. **Quantitative ultrasound assessment of osteoporosis and bone status** Lôndres: Martin Dunitz, 1999.

NOOR, A. et al. Assessment Of Microarchitecture And Crystal Structure Of Hydroxyapatite In Osteoporosis. **UNIVERSA MEDICINA**, v. 31, n. 1, 2011.

NOOR, Z. Nanohydroxyapatite Application to Osteoporosis Management. **Journal of Osteoporosis,** v. 2013, p. 6, 2013. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1155/2013/679025 >.

OU-YANG, H. et al. Infrared Microscopic Imaging of Bone: Spatial Distribution of CO32–. **Journal of Bone and Mineral Research,** v. 16, n. 5, p. 893-900, 2001. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.5.893 >.

PANA, Y.; FLEET, M. E. Compositions of the Apatite-Group Minerals: Substitution Mechanisms and Controlling Factors In: (Ed.). **Phosphates: Geochemical, Geobiological and Material Importance, Reviews in Mineralogy and Geochemistry**. Washington, DC, v.48, 2002. cap. 2, p.13 - 50.

PARFITT, A. M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 5-7, 1// 2002. ISSN 8756-3282. Disponível em: <

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328201006421 >.

PARFITT, M. et al. Abnormal bone remodeling in patients with spontaneous painful vertebral fracture. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 3, p. 475-485, 2011. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.239 >.

PASTORE, K. Futuro Fragil - Pesquisa internacional revela que medicos e pacientes nao sabem tratar a osteoporose: Revista Veja 2000.

PAWLEY, G. Unit-cell refinement from powder diffraction scans. **Journal of Applied Crystallography,** v. 14, n. 6, p. 357-361, 12/01 1981. ISSN 0021-8898. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S0021889881009618 >.

PECHARSKY, V. K. Fundamentals of powder diffraction and structural characterization of materials. Springer, 2005.

PICCOLI, P. M.; CANDELA, P. A. Apatite in Igneous Systems. In: (Ed.). **Phosphates: Geochemical, Geobiological and Material Importance, Reviews in Mineralogy and Geochemistry** Washington, DC, v.48, 2002. cap. 6, p.255 - 292.

PLUIJM, S. M. F. et al. Effects of Gender and Age on the Association of Apolipoprotein E ε4 with Bone Mineral Density, Bone Turnover and the Risk of Fractures in Older People*. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 9, p. 701-709, 2002/09/01 2002. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s001980200096 >.

POÓR, G. et al. Predictors of hip fractures in elderly men. **Journal of Bone and Mineral Research,** v. 10, n. 12, p. 1900-1907, 1995. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.5650101209 >.

PRESS, W. H.; TEUKOLSKY, S. A. Numerical Recipes in C++, The Art of Scientific **Programming** Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

PROT, M. et al. Links between microstructural properties of cancellous bone and its mechanical response to different strain rates. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering,** v. 15, n. sup1, p. 291-292, 2012/09/01 2012. ISSN 1025-5842. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1080/10255842.2012.713697 >. Acesso em: 2013/07/11.

QIU, S. et al. The morphological association between microcracks and osteocyte lacunae in human cortical bone. **Bone,** v. 37, n. 1, p. 10-15, 7// 2005. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328205000086 >.

QU, Y. et al. The effect of raloxifene therapy on the risk of new clinical vertebral fractures at three and six months: a secondary analysis of the MORE trial. **Current Medical Research and Opinion,** v. 21, n. 12, p. 1955-1959, 2005/12/01 2005. ISSN 0300-7995. Disponível em: < http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1185/030079905X75032 >. Acesso em: 2013/07/16.

RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. **Bioceramics: materials, properties, applications**. London: Chapman & Hall, 1992.

RAYNAUD, S. et al. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders. **Biomaterials,** v. 23, n. 4, p. 1065-1072, 2/15/ 2002. ISSN 0142-9612. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961201002186 >.

RIETVELD, H. Line profiles of neutron powder-diffraction peaks for structure refinement. Acta Crystallographica, v. 22, n. 1, p. 151-152, 01/10 1967. ISSN 0365-110X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S0365110X67000234 >.

_____. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. **Journal of Applied Crystallography,** v. 2, n. 2, p. 65-71, 06/02 1969. ISSN 0021-8898. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S0021889869006558 >.

RIGGS, B. L. et al. A Population-Based Assessment of Rates of Bone Loss at Multiple Skeletal Sites: Evidence for Substantial Trabecular Bone Loss in Young Adult Women and Men. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, n. 2, p. 205-214, 2008. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.071020 >.

ROBBINS, J. et al. The Association of Bone Mineral Density and Depression in an Older Population. **Journal of the American Geriatrics Society,** v. 49, n. 6, p. 732-736, 2001. ISSN 1532-5415. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1046/j.1532-5415.2001.49149.x >.

ROSCHGER, P. et al. Bone material quality in transiliac bone biopsies of postmenopausal osteoporotic women after 3 years of strontium ranelate treatment. **Journal of Bone and Mineral Research,** v. 25, n. 4, p. 891-900, 2010. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.091028 >.

_____. Bone mineralization density distribution in health and disease. **Bone,** v. 42, n. 3, p. 456-466, 3// 2008. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328207008162 >.

ROSS, P. et al. PREDICTING VERTEBRAL DEFORMITY USING BONE DENSITOMETRY AT VARIOUS SKELETAL SITES AND CALCANEUS ULTRASOUND. **Bone**, v. 16, n. 3, p. 325-332, Mar 1995. ISSN 8756-3282. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RB63800007 >.

RUBIN, C. et al. Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. **Bone**, v. 30, n. 3, p. 445-452, 3// 2002. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328201006895 >.

SAITO, M.; MARUMO, K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. **Osteoporosis International,** v. 21, n. 2, p. 195-214, 2010/02/01 2010. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00198-009-1066-z >.

SALAMONE, L. M. et al. COMPARISON OF BROAD-BAND ULTRASOUND ATTENUATION TO SINGLE X-RAY ABSORPTIOMETRY MEASUREMENTS AT THE CALCANEUS IN POSTMENOPAUSAL WOMEN. **Calcified Tissue International,** v. 54, n. 2, p. 87-90, Feb 1994. ISSN 0171-967X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994MT40200002 >.

SHEN, Y. et al. Postmenopausal women with osteoarthritis and osteoporosis show different ultrastructural characteristics of trabecular bone of the femoral head. **BMC Musculoskeletal**

Disorders, v. 10, n. 1, p. 35, 2009. ISSN 1471-2474. Disponível em: < http://www.biomedcentral.com/1471-2474/10/35 >.

SIQUEIRA, F. V.; FACCHINI, L. A.; HALLAL, P. C. The burden of fractures in Brazil: A population-based study. **Bone,** v. 37, n. 2, p. 261-266, 2005. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328205001456?showall=true >.

SIVIA, D. S.; DAVID, W. I. F. A Bayesian approach to extracting structure-factor amplitudes from powder diffraction data. **Acta Crystallographica Section A,** v. 50, n. 6, p. 703-714, 11/01 1994. ISSN 0108-7673. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S0108767394003235 >.

SOUZA, S. A. Ensaios mecânicos de materiais metálicos: Fundamentos teóricos e práticos. 5. São Paulo: Edgard Blücher, 1982.

SUZUKI, T.; HATSUSHIKA, T.; HAYAKAWA, Y. Synthetic hydroxyapatites employed as inorganic cation-exchangers. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, v. 77, n. 5, p. 1059-1062, 1981. ISSN 0300-9599. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/F19817701059 >.

SUZUKI, T.; HATSUSHIKA, T.; MIYAKE, M. Synthetic hydroxyapatites as inorganic cation exchangers. Part 2. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, v. 78, n. 12, p. 3605-3611, 1982. ISSN 0300-9599. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/F19827803605 >.

SUZUKI, T.; ISHIGAKI, K.; MIYAKE, M. Synthetic hydroxyapatites as inorganic cation exchangers. Part 3.-Exchange characteristics of lead ions (Pb2+). Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases, v. 80, n. 11, p. 3157-3165, 1984. ISSN 0300-9599. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1039/F19848003157 >.

TEIXEIRA, E. M. **Refinamento de tamanho de partícula e microdeformação de amostras policristalinas através de perfis de difração de raios-X utilizando as teorias cinética e dinâmica**. 2013. 46 (bacharel em física). Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

TOSTESON, A. N. A. et al. Impact of Hip and Vertebral Fractures on Quality-Adjusted Life Years. **Osteoporosis International,** v. 12, n. 12, p. 1042-1049, 2001/12/01 2001. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s001980170015 >.

TURNER, C. H. et al. The fabric dependence of the orthotropic elastic constants of cancellous bone. **Journal of Biomechanics,** v. 23, n. 6, p. 549-561, // 1990. ISSN 0021-9290. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021929090900488 >.

_____. CALCANEAL ULTRASONIC MEASUREMENTS DISCRIMINATE HIP FRACTURE INDEPENDENTLY OF BONE MASS. **Osteoporosis International,** v. 5, n. 2, p. 130-135, Mar 1995. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995QM68000010 >. ULRICH, D. et al. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. **Bone,** v. 25, n. 1, p. 55-60, 1999. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328299000988?showall=true >.

VAN DER LINDEN, J. C. et al. Mechanical Consequences of Bone Loss in Cancellous Bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 3, p. 457-465, 2001. ISSN 1523-4681. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.3.457 >.

VAN DER MEULEN, M. C. H.; JEPSEN, K. J.; MIKIĆ, B. Understanding bone strength: size isn't everything. **Bone**, v. 29, n. 2, p. 101-104, 8// 2001. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328201004914 >.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P. D. The role of collagen in bone strength. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 3, p. 319-336, 2006/03/01 2006. ISSN 0937-941X. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/s00198-005-2035-9 >.

W.H.O. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. **World Health Organ Tech Rep Ser,** v. 843, p. 1-129, 1994. ISSN 0512-3054 (Print) 0512-3054.

_____. World Health Organization Study Group 2001.

WAUD, C. E.; LEW, R.; BARAN, D. T. THE RELATIONSHIP BETWEEN ULTRASOUND AND DENSITOMETRIC MEASUREMENTS OF BONE MASS AT THE CALCANEUS IN WOMEN. **Calcified Tissue International,** v. 51, n. 6, p. 415-418, Dec 1992. ISSN 0171-967X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992JY74200004 >.

WEBB, S. The physics of medical imaging. New York: Taylor and Francis Group, 1988.

WILLIAMSON, G. K.; HALL, W. H. X-ray line broadening from filed aluminium and wolfram. **Acta Metallurgica**, v. 1, n. 1, p. 22-31, 1// 1953. ISSN 0001-6160. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0001616053900066 >.

WOOLFSON, M. M. An Introduction to X-ray Crystallography. 2. U.K.: Cambridge University Press 1997.

XU, Y. **Interactions of Heavy Metals with Minerals** 1994. (PhD). The Ohio State University

YEAP, S. S. et al. The relationship between bone mineral density and ultrasound in postmenopausal and osteoporotic women. **Osteoporosis International,** v. 8, n. 2, p. 141-146, 1998 1998. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000078768900008 >.

YOUNG, R. A.; MACKIE, P. E.; VON DREELE, R. B. Application of the pattern-fitting structure-refinement method of X-ray powder diffractometer patterns. **Journal of Applied Crystallography,** v. 10, n. 4, p. 262-269, 08/01 1977. ISSN 0021-8898. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1107/S0021889877013466 >.

ZEBAZE, R. M. D. et al. Femoral neck shape and the spatial distribution of its mineral mass varies with its size: Clinical and biomechanical implications. **Bone**, v. 37, n. 2, p. 243-252, 8// 2005. ISSN 8756-3282. Disponível em: <

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328205001006 >.

ZHENG, X.; LI, J.; ZHOU, Y. X-ray diffraction measurement of residual stress in PZT thin films prepared by pulsed laser deposition. **Acta Materialia**, v. 52, n. 11, p. 3313-3322, 6/21/2004. ISSN 1359-6454. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359645404001764 >.

ZHENG, X. J.; YANG, Z. Y.; ZHOU, Y. C. Residual stresses in Pb(Zr0.52Ti0.48)O3 thin films deposited by metal organic decomposition. **Scripta Materialia**, v. 49, n. 1, p. 71-76, 7// 2003. ISSN 1359-6462. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359646203001817 >.

ZIV, V.; WAGNER, H. D.; WEINER, S. Microstructure-microhardness relations in parallelfibered and lamellar bone. **Bone,** v. 18, n. 5, p. 417-428, 5// 1996. ISSN 8756-3282. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/875632829600049X >.

ZYSSET, P. K. Indentation of bone tissue: a short review. **Osteoporosis International,** v. 20, n. 6, p. 1049-1055, Jun 2009. ISSN 0937-941X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265941900026 >.


APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28/09/2011, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 408/11 intitulado: "ALTERAÇÕES MORFOMÉTRICAS E MECÂNICAS DA MICROESTRUTURA DO OSSO TRABECULAR HUMANO EM FUNÇÃO DA PERDA DE MASSA ÓSSEA" apresentado pelo Departamento de ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Tomaz Puga Leivas Pesquisador (a) Executante: Reinaldo César

CEP-FMUSP, 29 de Setembro de 2011.

Alloum.

Prof. Dr. Roger Chammas Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina e-mail: <u>cep.fmusp@hcnet.usp.br</u>

Anexo B





PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação dos parâmetros de rede em ossos humanos normais, osteoporóticos e osteopênicos e quantificação das porcentagens de cálcio e fósforo.

Pesquisador: Ricardo Simionato Boffa Área Temática: Versão: 3 CAAE: 08812913.5.0000.5504 Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 336.251 Data da Relatoria: 13/08/2013

Apresentação do Projeto:

O pesquisador apresentou como anexo, documento intitulado Projeto de Pesquisa. Neste documento, ele aponta que serão realizadas análises ósseas de amostras aparentemente já retiradas de 30 cadáveres provenientes do Serviço de Verificação de Óbito do Hospital das Clínicas de São Paulo, através da difratometria de Raio X. Os resultados obtidos serão correlacionados com outros resultados da ultrassonometria óssea de calcâneo realizada até 12 horas pós-morte nos mesmos sujeitos e também com dados obtidos em outro estudo, realizado anteriormente.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a existência de um padrão ósseo estrutural inerente à doença osteometabólica, gerada pela análise da razão entre cálcio e fósforo e do parâmetro de rede. Pretende, ainda, gerar um bando de dados contendo a razão entre o cálcio e fósforo em diferentes ossos, retirados de cadáveres e correlaciona-los com os resultados de ultrassonometria óssea de calcâneo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador aponta os riscos relacionados a ele próprio, no tocante ao manejo das amostras de pesquisa e que serão tomadas as medidas de biossegurança. Também relata que há a possibilidade de eventuais falhas, relacionadas com algum tipo de desordem no esqueleto, nas

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235	
Bairro: JARDIM GUANABARA	CEP: 13.565-905
UF: SP Município: SAO CARLOS	
Telefone: (16)3351-9683	E-mail: cephumanos@ufscar.br

Página 01 de 02



Continuação do Parecer: 336.251

análises clínicas do cadáver na vistoria pelo serviço de verificação de óbito do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O assunto apresentado possui relevância à área em questão.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A Folha de Rosto foi adequadamente preenchida e está assinada. Foi apresentado um parecer do CEP da FM-USP relativo a um estudo realizado previamente cujos dados serão utilizados para comparação nesta nova pesquisa e também documento de autorização por parte do executor deste referido projeto, permitindo a utilização dos dados obtidos nesta nova pesquisa. O pesquisador solicita ainda a dispensa do TCLE, com a seguinte justificativa: o banco provém de pessoas não individualizadas, sendo extraídos corpos de prova no formato cilíndrico de 10X25 mm do osso trabecular da vértebra L1.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: - As pendências foram resolvidas. Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não Considerações Finais a critério do CEP: Projeto Aprovado.

SAO CARLOS, 18 de Julho de 2013

Assinador por: Maria Isabel Ruiz Beretta (Coordenador)

Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235		
Bairro: JARDIM GUANABARA	CEP: 13.565-905	
UF: SP Município: SAO CARLOS		
Telefone: (16)3351-9683	E-mail:	cephumanos@ufscar.br

Página 02 de 02