AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM TECIDO ÓSSEO
BOVINO POR ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR E ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA.**

MARCELO NORONHA VELOSO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

**São Paulo
2013**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM TECIDO ÓSSEO
BOVINO POR ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR E ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA.**

MARCELO NORONHA VELOSO

**Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Materiais**

**Orientadora:
Profa. Dra. Denise Maria Zezell**

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José Roberto** e **Rita de Cássia**, pelo amor incondicional, dedicação, paciência e compreensão que tiveram comigo nesta jornada e por serem meu porto seguro.

À minha avó **Gení** e minha madrinha **Rosangela**, que sempre oraram por mim.

À minha irmã **Giovanna**, aos meus tios e tias, primos e primas, por serem uma família fantástica da qual só tenho orgulho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Denise Maria Zezell** por me oferecer a oportunidade e a honra de ser seu orientado. Pela dedicação, amizade, carinho e compreensão nesses dois anos e por ter acreditado e confiado em mim.

AGRADECIMENTOS

À **Renata**, minha namorada e parceira, pela paciência, por não desistir durante esse um ano que estivemos longe, pelas alegrias, risadas e aprendizados. Sem duvida amadureci muito nestes três anos e muito disso devo a você

À **Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor**, pelas idéias que colaboraram com a realização do projeto e por ceder o laboratório para a limpeza dos ossos.

Ao **Prof. Dr. Rodolfo Politano**, pelas idéias, pela amizade, pelos conselhos e pela ajuda na utilização do Dynamic Mechanical Analyzer.

Aos meus amigos: **Claudia Zamataro, Paulo Correa, Carolina Benetti, Jose Quinto, Moisés Oliveira, Thiago Pereira, Viviane Goulart, Maira Andrade, Patrícia da Ana e Claudia Strefezza** pela amizade, companheirismo e pela ajuda na realização deste trabalho. Minha admiração por vocês é imensa. Muito obrigado por fazerem os dias de laboratório mais divertidos.

À **Stefany Plumeri Santin**, por ter tido importante participação no desenvolvimento deste trabalho, por ter me aconselhado quanto à limpeza e o processamento dos ossos, pelas idéias e pela amizade.

Ao **Valdir**, pelos serviços prestados ao laboratório e pela amizade.

Ao Dr. **Pablo Antonio Vasquez**, ao **Paulo de Souza Santos**, à **Elizabeth Somessari** e ao **Carlos Gaia da Silveira** do Centro de Tecnologia das Radiações por realizarem as irradiações em minhas amostras;

Aos funcionários da Comissão de Pós Graduação do IPEN pelos serviços e auxílio prestados.

Aos funcionários e técnicos do CLA por realizarem seu serviço com excelência e principalmente bom humor;

Ao **IPEN** por fornecer toda infraestrutura necessária para minha formação e realização dos meus experimentos

À **CNEN** pela bolsa de mestrado concedida;

A **CEPOF-FAPESP (Proc.05/51689-2)**, **INCT/CNPq INFO (Proc. 573.916/2008-0)** por financiarem os projetos de pesquisa associados a esse trabalho

“O conhecimento, assim como o ar, é essencial à vida. Como o ar, não deveria ser negado à ninguém.”

— *Alan Moore*

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM TECIDO ÓSSEO BOVINO POR ESPECTROSCOPIA FTIR E POR ANÁLISE DINÂMICA MECÂNICA.

MARCELO NORONHA VELOSO

RESUMO

A radiação ionizante de fontes de radiação gama ou geradores de raios-x é frequentemente utilizada na ciência médica, como em exames de radiodiagnóstico, radioterapia e esterilização de aloenxertos. A radiação ionizante é capaz de quebrar cadeias polipeptídicas e provocar a liberação de radicais livres, pela radiólise de moléculas de água. A radiação ionizante interage também com o material orgânico a nível molecular, podendo alterar as suas propriedades mecânicas. No caso específico do tecido ósseo, estudos reportam que a radiação ionizante induz alterações nas moléculas de colágeno e reduzem a densidade de ligações cruzadas intermoleculares. O objetivo deste estudo foi verificar as alterações promovidas por diferentes doses de radiação ionizante no tecido ósseo utilizando a técnica de Espectroscopia Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR), e também a análise dinâmico-mecânica. Amostras de osso bovino foram irradiadas usando irradiador de Cobalto-60, com cinco doses diferentes: 0,01 kGy, 0,1 kGy, 1 kGy, 15 kGy e 75 kGy. Para estudar os efeitos da radiação ionizante sobre a estrutura química do osso foram avaliadas a relação material orgânico por material inorgânico, a relação de sub-bandas de amida I e o índice de cristalinidade. As alterações mecânicas foram determinadas por meio do módulo de elasticidade e do valor do amortecimento. Para verificar se as mudanças químicas e as características mecânicas de osso possuem alguma relação, realizou-se um estudo sobre a correlação entre as análises feitas com os dados espectroscópicos e as análises mecânicas. Foi possível avaliar os efeitos de diferentes doses de radiação ionizante no tecido ósseo. Com a análise por espectroscopia ATR-FTIR, foi possível observar as modificações dos componentes orgânicos e na organização cristais de hidroxiapatita. Também foram observadas alterações no módulo elástico e na tangente de delta (dissipação de energia mecânica). Foram encontradas altas correlações com significância estatística entre a relação das bandas (amida III + colágeno)/ $\nu_{1,\nu 3}$ PO_4^{3-} com a tangente de delta, e entre a relação $1/\text{FHMW}$ e o módulo elástico.

**IN VITRO EVALUATION OF IONIZING RADIATION EFFECTS IN BONE
TISSUE BY FTIR SPECTROSCOPY AND DYNAMIC MECHANICAL
ANALYSIS**

MARCELO NORONHA VELOSO

ABSTRACT

Ionizing radiation from gamma radiation sources or X-ray generators is frequently used in Medical Science, such as radiodiagnostic exams, radiotherapy, and sterilization of haloenxerts. Ionizing radiation is capable of breaking polypeptidic chains and causing the release of free radicals by radiolysis of water. It interacts also with organic material at the molecular level, and it may change its mechanical properties. In the specific case of bone tissue, studies report that ionizing radiation induces changes in collagen molecules and reduces the density of intermolecular crosslinks. The aim of this study was to verify the changes promoted by different doses of ionizing radiation in bone tissue using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and dynamic mechanical analysis (DMA). Samples of bovine bone were irradiated using Cobalt-60 with five different doses: 0.01 kGy, 0.1 kGy, 1 kGy, 15 kGy and 75 kGy. To study the effects of ionizing irradiation on the chemical structure of the bone, the sub-bands of amide I, the crystallinity index and relation of organic and inorganic materials, were studied. The mechanical changes were evaluated using the elastic modulus and the damping value. To verify whether the chemical changes and the mechanical characteristics of the bone were correlated, the relation between the analysis made with spectroscopic data and the mechanical analysis data was studied. It was possible to evaluate the effects of different doses of ionizing radiation in bone tissue. With ATR-FTIR spectroscopy, it was possible to observe changes in the organic components and in the hidroxyapatite crystals organization. Changes were also observed in the elastic modulus and in the damping value. High correlation with statistical significance was observed among $(\text{amide III} + \text{collagen})_{\nu_1, \nu_3} / \text{PO}_4^{3-}$ and the delta tangent, and among $1/\text{FWHM}$ and the elastic modulus.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1. Tecido ósseo	4
3.1.1. Matriz Orgânica e Ligações Cruzadas de Colágeno.....	5
3.1.2. Propriedades mecânicas do osso.....	7
3.2. Interação da Radiação Eletromagnética Ionizante com a Matéria.....	11
3.2.1. Radiações Eletromagnéticas.....	11
3.2.2. Radiações Eletromagnéticas Ionizantes e sua Interação com a Matéria 15	
3.2.3. Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante	19
Espectroscopia ATR-FTIR na análise de tecido ósseo	20
3.2.4. Espectroscopia	20
3.2.5. Fundamentos da espectroscopia no infravermelho	21
3.2.6. Espectrômetro por infravermelho.....	27
3.2.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.....	27
3.2.8. Reflexão total atenuada (ATR).....	29
3.2.9. Bandas de Absorção de Infravermelho no osso.....	31
3.2.10. Utilização do FTIR na biologia e áreas correlatas.....	32
3.3. Análise Dinâmico-Mecânica (DMA).....	33
4. METODOLOGIA.....	36
4.1. Preparação das amostras	36
4.2. Irradiação das amostras.....	38
4.3. Análise por DMA	38
4.4. Análise por espectroscopia ATR-FTIR	40
4.5. Análise dos espectros FTIR.....	42
4.5.1. Normalização.....	42
4.5.2. Segunda derivada	44
4.5.3. Ajuste de sub-bandas de amida I	45
4.5.4. Análise de Cristalinidade	46
4.5.5. Razão das áreas de bandas de material orgânico e fosfato	47
4.6. Estatística	48
4.7. Correlação entre os dados espectroscópicos e as medidas de DMA.....	48
5. RESULTADOS	49

5.1.	Ajuste de sub-bandas de amida I	49
5.2.	Análise de cristalinidade.....	51
5.3.	Razão das áreas das bandas de material orgânico e fosfato.....	53
5.4.	DMA	55
5.5.	Correlação entre os dados espectroscópicos e as medidas de DMA.....	57
6.	DISCUSSÃO	61
6.1.	Ajuste de sub-bandas de amida I	61
6.2.	Análise de cristalinidade.....	62
6.3.	Razão das áreas das bandas material orgânico e fosfato	63
6.4.	DMA	64
6.5.	Correlação dos dados espectroscópicos com as medidas de DMA	64
6.6.	Considerações gerais.....	65
7.	CONCLUSÕES.....	67
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

A grande maioria das práticas com radiação ionizante envolve fótons provenientes de fontes de radiação gama ou geradores de raios X, como o radiodiagnóstico, radioterapia, braquiterapia, radiografia industrial, esterilização de aloenxertos. Sabe-se que a radiação ionizante é capaz de ionizar o material, romper cadeias polipeptídicas e causar a liberação de radicais livres (espécies altamente reativas) via radiólise de moléculas de água [1].

Estudos relatam que a radiação ionizante interage com o material ósseo a nível molecular alterando suas propriedades químicas e consequentemente mecânicas de uma forma dose-dependente, pela degradação do colágeno e pela redução da densidade de ligações cruzadas intermoleculares [2]–[5]. [6]–[10].

Estas ligações são responsáveis por propriedades mecânicas como, resistência a tração, elasticidade e ductilidade. Alterações nestas ligações são responsáveis por mudanças nas propriedades mecânicas do tecido ósseo [11], [12].

A caracterização do tecido ósseo irradiado pode ser uma importante ferramenta na compreensão de quais componentes são afetados e o quanto certas doses de radiação ionizante alteram sua estrutura molecular e propriedades mecânicas. Essas informações podem ser úteis em estudos *in vitro* e *ex vivo* onde há necessidade de esterilização do material ósseo; e útil também na compreensão dos efeitos de curto prazo no tecido ósseo de pacientes submetidos a tratamentos de radioterapia.

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de caracterização que utiliza a interação da radiação eletromagnética com a matéria para obter informações físicas e químicas sobre o material analisado. Esta técnica é capaz de fornecer informações quantitativas sobre a maturidade de colágeno nos ossos, especificamente a relação entre duas das principais ligações cruzadas enzimáticas: A piridinolina (Pir) que fazem parte do grupo de ligações cruzadas de colágeno maduras e a

dihidroxinorleucina (DHLNL), parte do grupo de ligações cruzadas de colágeno imaturas. Estas ligações possuem absorção em 1660 cm^{-1} e 1690 cm^{-1} (Pir e DHLNL, respectivamente). A razão relativa porcentual da área das duas sub-bandas fornece uma medida semi-quantitativa do perfil das ligações cruzadas na matriz de colágeno e está relacionada com a abundância destas ligações cruzadas de colágeno no tecido mineralizado [11].

Foi utilizada também a análise dinâmico-mecânica (DMA) para identificar a magnitude da degradação induzida por diferentes doses de irradiação na viscoelasticidade do osso cortical humano. A partir de informações do módulo elástico e do amortecimento do material, foi possível estabelecer uma relação entre os dados obtidos pela espectroscopia FTIR.

Este projeto visa complementar resultados anteriores obtidos pelo grupo de Biofotônica do Centro de *Laser* e Aplicações, na análise espectroscópica dos efeitos resultantes da irradiação *laser* em tecidos biológicos com a finalidade de complementar as informações sobre a interação da radiação eletromagnética com tecidos ósseos e dentais, e identificar o método mais adequado para analisar ossos irradiados com radiação- γ .

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar alterações moleculares e mecânicas na matriz óssea causadas pela radiação ionizante utilizando técnicas de análise por espectroscopia no infravermelho e testes mecânicos e assim estabelecer uma correlação entre os resultados encontrados.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo, além de responsável por fornecer sustentação e estrutura ao corpo, serve de alavanca para a função motora dos músculos esqueléticos, protege os órgãos internos e tem papel fundamental na fisiologia. É um tipo especializado de tecido conjuntivo que é composto por matriz orgânica, matriz inorgânica e por água. A matriz inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio, que formam cristais com estrutura semelhante a da hidroxiapatita, além de íons de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio, e nitrato em pouca quantidade.

A parte orgânica da matriz óssea é formada 85-90% por fibras colágenas, constituídas principalmente por colágeno tipo I, além de pequenas quantidades de outras proteínas [13].

A parte mineral de ossos e dentes é composta pela forma cristalina do fosfato de cálcio similar à hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. A família mineral das apatitas $[\text{A}_{10}(\text{BO}_4)_6\text{X}_2]$ é cristalizada em prismas hexagonais, onde A é usualmente Ca_2^+ ou Pb_2^+ , B é P_5^+ ou As_5^+ e X é F^- , Cl^- ou $(\text{OH})^-$ [14], [15]. Este material possui estrutura frágil e sua resistência mecânica é pobre, mas sua associação com fibras colágenas confere ao tecido ósseo alto grau de rigidez e resistência à tensão mecânica [16].

As células que compõem o tecido ósseo são: os osteoclastos, osteoblastos e os osteócitos. Os osteoclastos são células que reabsorvem o tecido ósseo liberando íons, como o cálcio, na corrente sanguínea. Têm papel fundamental no processo de remodelação dos ossos e na fisiologia do corpo humano. Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz, além de participarem da sua mineralização. Os osteócitos secretam substâncias essenciais para manutenção da matriz óssea e nutrição do tecido, pois trocam íons, nutrientes e fluido extracelular, entre si.

Como não existe difusão de substâncias através da matriz calcificada do osso, a troca de moléculas e íons entre os capilares e os osteócitos depende

dos canais de Havers e canais de Volkmann (Figura 1). Canais de Havers são uma série de tubos em torno de estreitos canais formados por lamelas concêntricas de fibras colágenas. Estes tubos se comunicam entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio dos canais de Volkmann. Os canais de Havers são encontrados principalmente na diáfise dos ossos longos [13], [17].

Figura 1: Esquema representativo de um corte de osso longo com identificação de suas estruturas [13].

3.1.1. Matriz Orgânica e Ligações Cruzadas de Colágeno

O colágeno é a proteína fibrosa mais abundante no corpo humano, representando aproximadamente 30% das proteínas do corpo. Tem a função de manter a integridade estrutural do tecido e conferir ductilidade a diversos tecidos e órgãos [13], [16].

O colágeno tipo I, predominante nos tecidos ósseos, organiza-se em estruturas fibrilares que tem origem na microfibrila (Figura 2). Através das interações das moléculas de tropocolágeno, tem-se a formação das microfibrilas, menor unidade estrutural do tecido conjuntivo.

Figura 2: Fibra de Colágeno tipo I e sua organização e diversas escalas. Fonte: <<http://www.hidrobem.com.br>>.

Formadas as microfibrilas, inicia-se o processo de agregação denominado de fibrilogênese, para formar fibrilas insolúveis, as quais são mantidas por ligações cruzadas intramoleculares (entre a mesma unidade de tropocolágeno) e intermoleculares (entre as unidades de tropocolágeno) e também por ligações eletrostáticas que lhes conferem estabilidade (Figura 3) [16], [18].

Figura 3: Desenho representativo dos componentes, em diversos níveis da estrutura hierárquica do colágeno, mostrando os polipeptídeos, alfa-hélice da molécula de tropocolágeno, fibrilas de colágeno e fibras de colágeno [19].

A extensão e o tipo da ligação cruzada variam com a idade do tecido e sua função. Durante o desenvolvimento do indivíduo, o aumento da tensão nas fibras de colágeno provoca um aumento do número de ligações cruzadas com o objetivo de produzir as propriedades mecânicas ideais para dada função no organismo. Estas ligações são responsáveis pelas propriedades viscoelásticas no tecido ósseo [11], [12].

Três tipos principais de ligações cruzadas de colágeno são encontrados no osso cortical humano: ligações cruzadas enzimáticas imaturas (redutíveis), ligações cruzadas maduras (não redutíveis) que ligam microfibrilas vizinhas, e ligações cruzadas induzidas por glicação não enzimática (AGEs), que formam tanto ligações cruzadas de colágeno intermoleculares e interfibrilares [11].

A capacidade de resistir à tensão do colágeno depende da formação de ligações cruzadas covalentes intermoleculares, entre as subunidades de proteína individuais, pois fornecem resistência ao cisalhamento destas proteínas [20].

3.1.2. Propriedades mecânicas do osso

Quando um material sólido é submetido a forças de tração, por exemplo, a tendência é que ele se alongue na direção das forças aplicadas. A tensão aplicada é calculada pela carga dividida pela área da amostra sendo que a carga é dada em Newtons (N), a área em m^2 e a tensão em Pascal (N/m^2).

O alongamento relativo é chamado de deformação, representado por ϵ . A relação entre a tensão e deformação (σ), para pequenas deformações, é chamada de módulo de Young ou módulo elástico (E) e pode ser descrito pela seguinte equação:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad (1)$$

Este parâmetro descreve capacidade que determinado material possui de resistir à deformação, quando sujeita a uma determinada tensão. A propriedade de acumular energia quando submetidos a estresse sem ocorrer ruptura é chamada de resiliência.

O comportamento elástico é o caso especial em que a curva σ/ϵ é linear. A deformação aumenta de forma linear, com o aumento da tensão, recuperando sua forma original quando a tensão é retirada. Na maioria dos casos os materiais apresentam este tipo de comportamento em pequenas deformações, mas quando a tensão excede um valor crítico (mais conhecido

como tensão de escoamento), o material não retorna à sua forma original. Tal fenômeno é conhecido como comportamento plástico e esta elongação permanente é conhecida como deformação plástica [21], [22].

Figura 4: Curvas de tensão/deformação. As linhas contínuas correspondem a resposta à tensão crescente, já as linhas pontilhadas correspondem à tensão decrescente. Adaptado de [23].

Muitos tecidos biológicos, incluindo o colágeno, são viscoelásticos. Estes materiais apresentam simultaneamente comportamento viscoso e elástico. A viscosidade é resistência que um material oferece ao escoamento. Este efeito é mais evidente nos fluidos, que são substâncias que se deformam continuamente sob a ação de qualquer força tangencial.

O modelo mais simples para descrever o comportamento viscoelástico é o modelo de Kelvin-Voigt, onde um amortecedor (fornecendo resistência viscosa) atua em paralelo com uma mola elástica (fornecendo força restauradora) [23], [24].

Figura 5: Representação do Modelo de Kelvin Voigt.

A equação 2 descreve a evolução de um sistema submetido a uma tensão constante sofrendo deformação num intervalo de tempo. Esta equação depende tanto da deformação ε como de sua derivada com relação ao tempo $\dot{\varepsilon}$ [25].

$$\sigma = E \cdot \varepsilon + \eta \cdot \dot{\varepsilon} \quad (2)$$

Neste modelo, o tempo de retardo τ' é o tempo após aplicação da tensão para a deformação atingir $\left(1 - \frac{1}{\text{Exp}(1)}\right)$ da deformação máxima. Após a remoção da tensão a deformação decai $\left(\frac{1}{\text{Exp}(1)}\right)$ no tempo τ' . Sendo assim a deformação e relaxação podem ser descritos pelas seguintes equações.

$$e(t) = e_0 \cdot \left(1 - \frac{1}{\text{Exp}(1)}\right) \text{ na deformação} \quad (3)$$

$$e(t) = e_0 \cdot \left(\frac{1}{\text{Exp}(1)}\right) \text{ na relaxação} \quad (4)$$

À característica de se deformar progressivamente é dado o nome de fluência – em inglês mais conhecido como *creep*. Este fenômeno está relacionado à tendência das partículas dos materiais se moverem lentamente, ou deformarem permanentemente, quando submetidos à tensão. Ela ocorre como um resultado da exposição a certos níveis de tensão que se encontram abaixo do limite de ruptura do material.

Uma maneira de discutir as propriedades mecânicas do osso compacto é estudando sua curva de tensão-deformação apresentada na Figura 6. Esta curva pode ser dividida em duas regiões principais: a primeira é a região de deformação elástica, onde a curva de tensão-deformação é quase reta. A partir deste gráfico é possível calcular a resiliência e o módulo de Young do material. Nesta situação, se a tensão for retirada o material voltará à sua forma inicial. A segunda região descreve a deformação plástica. É identificado no gráfico, pela curva com inclinação variável e menor que a da região elástica. Este comportamento ocorre quando a tensão aplicada alcança níveis maiores que a tensão de escoamento do material e este começa a sofrer deformação

irreversível. No gráfico é possível observar este comportamento quando a curva começa a ficar mais inclinada, Nesta fase são formadas microfraturas que eventualmente resultarão na quebra do material [23], [26].

Figura 6: Curva de tensão/deformação característica do osso. Adaptado de [23].

A matriz orgânica por si só não é suficiente para proporcionar a rigidez necessária para que o tecido ósseo suporte cargas compressivas consideráveis. Esta propriedade só é possível pela associação da matriz mineral com a matriz orgânica em diferentes escalas.

A matriz mineral ocupa grande parte do volume de osso compacto e é responsável por oferecer resistência à compressão e resistência elástica ao tecido. A descalcificação progressiva do osso é responsável por alterações no módulo elástico e no limite de escoamento. No caso de ocorrer perda de cálcio, o tecido torna-se mais maleável [23].

Figura 7: Representação da fibrila com moléculas de colágeno (canalículos brancos) e nanopartículas minerais (estruturas mais escuras) [23].

As fibrilas desta fibra estão precisamente organizadas, sobrepostas e em sentidos opostos entre camadas, mantendo o espaço constante entre as fibrilas adjacentes proporcionando ao tecido resistência e capacidade de dissipação

de energia mecânica (Figura 8) [27]. A destruição da parte orgânica da matriz óssea do tecido mantém sua forma intacta, mas torna-se quebradiço.

Figura 8: Representação da resposta à tensão do colágeno ósseo mineralizado em diferentes escalas [23].

3.2. Interação da Radiação Eletromagnética Ionizante com a Matéria

3.2.1. Radiações Eletromagnéticas

A radiação de uma forma geral é energia emitida por uma fonte, transitando no vácuo ou em meios materiais, e pode ser classificada como corpuscular e eletromagnética.

A radiação corpuscular possui massa e é constituída de partículas elementares como: partículas beta (elétrons e pósitrons), nêutrons, prótons e partículas alfa. A radiação eletromagnética é constituída por campo magnético e campo elétrico que se propagam simultaneamente, oscilando de forma perpendicular um ao outro e perpendicular à direção de propagação.

Figura 9: Representação da onda eletromagnética.

Fonte: <<http://www.brasilecola.com/quimica/espectro-eletromagnetico-dos-elementos-quimicos.htm>>

Sua emissão e absorção pela matéria se dá de forma discreta, em forma de pacotes de energia mais conhecidos como quanta. A teoria dos quanta foi primeiramente proposta por Max Karl Ernst Ludwig Plank no estudo da radiação de corpo negro e posteriormente adotada por Einstein no estudo do efeito fotoelétrico. Segundo esta teoria a radiação eletromagnética é emitida e propaga-se no vácuo com velocidade $c=3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ em pequenos pacotes de energia chamados de fótons, que são partículas sem carga com massa de repouso nula. A energia contida num fóton é calculada pela equação 5, proposta por Albert Einstein

$$E = h \nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (5)$$

onde h é a constante de Plank ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J.s}$), ν é a frequência da radiação em Hertz, c é a velocidade da luz no vácuo ($3 \times 10^8 \text{ m/s}$) e λ é o comprimento de onda. A partir da equação 3 de Plank – Einstein, considerando a radiação se propagando em um só meio (velocidade constante), é possível concluir que

quanto maior a frequência ou quanto menor o comprimento de onda, maior será a energia de um fóton (Figura 10) [28], [29].

Os diferentes tipos de ondas e raios eletromagnéticos (ondas de radio, micro-ondas, luz visível, raio-x, raios gama), são classificações de faixas de energia específicas do espectro eletromagnético .

Figura 10: Espectro eletromagnético. Fonte: <<http://labcisico.blogspot.com.br/2013/03/o-espectro-eletromagnetico-na-natureza.html>>

A intensidade da radiação eletromagnética (I) pode ser definida como o numero de fótons (N), multiplicado pela energia de cada fóton ($h\nu$) , dividido por unidade de tempo (t) e unidade de área (A) como observado na equação 6.

$$I = \frac{N \cdot h\nu}{A \cdot t} \quad (6)$$

A radiação eletromagnética se propaga tanto no vácuo como em alguns meios materiais (transparentes ou translúcidos). É importante ressaltar a interferência causada pela matéria na propagação da radiação. Na Figura 11 podemos observar a situação onde um feixe de radiação incide na superfície de um material. O feixe tem sua intensidade atenuada e propagação alterada pelos fenômenos de refração e reflexão - que são correlacionados pela Lei de Fresnell - por espalhamento e por absorção do material [30].

Figura 11: Representação da interferência da matéria no feixe de luz.[30]

A penetração da radiação eletromagnética em um meio não é necessariamente dependente de forma crescente ou decrescente da energia do fóton. Átomos, moléculas, tipos de ligação e organização cristalina (se o material for sólido) são fatores determinantes na absorção (Figura 12).

Figura 12: Coeficientes de absorção de diferentes compostos presentes no tecido biológico. Adaptado de (Zezell, D.M., Simões M.R., Maldonado IPEN/CNEN-SP – FOUSP)

Como exemplo temos o vidro que é transparente à ondas de rádio, mas absorve razoavelmente radiações na faixa do Infravermelho e do ultravioleta. Considerando radiação eletromagnética monoenergética em um meio, sua

absorção em relação à espessura do material pode ser descrita em termos gerais pela equação de Beer-Lambert:

$$N(z) = N_0 \cdot e^{-z \cdot \mu(\lambda)} \quad (7)$$

sendo que z é a espessura da camada atenuadora, N_0 é o número de fótons incidente, $N(z)$ o número de fótons transmitidos e μ o coeficiente linear total de atenuação do material (soma dos coeficientes de absorção e espalhamento) que depende da composição, concentração, opacidade do material e do comprimento de onda do feixe [31].

3.2.2. Radiações Eletromagnéticas Ionizantes e sua Interação com a Matéria

A radiação considerada ionizante é aquela capaz de causar a ejeção de elétrons dos orbitais de átomos ou moléculas. O termo radiação ionizante refere-se a toda radiação capaz de gerar íons pelo deslocamento de elétrons de moléculas e átomos de forma direta ou indireta. Os íons e elétrons formados são capazes de gerar radicais livres altamente reativos, que podem desencadear reações químicas com outros compostos ou mesmo entre si. Tais interações podem levar a alterações nas propriedades físicas e químicas dos materiais [32],[33]. A radiação ionizante pode ser classificada em dois grupos: aquela que tem carga elétrica e a neutra. Radiações corpusculares como elétrons, pósitrons, prótons, partículas α , possuem carga e interagem diretamente com a matéria, produzindo ionizações diretas. O nêutron, é uma radiação corpuscular sem carga e o fóton (radiação ultravioleta, raios X e radiação gama) é onda eletromagnética e não possui carga ou massa. Estes dois últimos interagem com a matéria de forma indireta, provocando ionização indireta.

Raios X e raios gama (γ) são radiações eletromagnéticas ionizantes de alta frequência. A diferença entre os dois está basicamente na sua origem, sendo que a produção de raios X é resultado de processos extranucleares, normalmente nos orbitais eletrônicos dos átomos, enquanto que os raios γ são emitidos resultantes de um processo de instabilidade nuclear.

As radiações eletromagnéticas ionizantes, devido a ausência de carga e massa de repouso, são mais penetrantes percorrendo grandes espessuras antes de sofrer a primeira interação. A penetração do feixe depende da probabilidade ou seção de choque de interação para cada tipo de evento. O mecanismo pelo qual a radiação eletromagnética ionizante interage com a matéria é uma função complexa da energia da radiação, do número atômico do material e da densidade do meio [34].

A interação ocorre por meio de três mecanismos principais de ionização e deposição de energia: efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de par elétron-positron (Figura 13) [29]. Vale lembrar que este tipo de radiação percorre distâncias consideráveis antes transferir parte ou toda sua energia para a matéria, interagindo esporadicamente se comparada com radiações diretamente ionizantes.

Figura 13: a) Representação do efeito fotoelétrico. b) Representação do efeito Compton. c) Representação da produção de pares. Adaptado de <<http://www.oocities.org/tomografiademadeira/interacao.html>>.

O efeito fotoelétrico ocorre quando partículas de radiação eletromagnética incidem sobre átomos, havendo absorção destes fótons e ejeção de elétrons dos orbitais atômicos, principalmente das camadas K e L. Para o efeito fotoelétrico ocorrer, a energia do fóton deve ser igual ou maior que a energia de ligação dos elétrons ao núcleo. Cada elétron absorve um fóton e terá energia

cinética correspondente a subtração da energia do fóton pela energia de ligação do elétron.

O efeito Compton ocorre quando na interação de um fóton com um elétron parte da energia deste fóton é absorvida pelo elétron e transformada em energia cinética; e a outra parte dá origem a um fóton espalhado de menor energia e direção de propagação diferente da direção do fóton incidente.

A produção de par pósitron-eletron, ou produção de pares, ocorre quando um fóton de alta energia interage com o átomo, transformando toda sua energia em massa de repouso e energia cinética de um par eletron-positron, de acordo com a equação proposta por Einstein: $E=h\nu=2mc^2+K_1+K_2$. A partir desta equação é possível concluir que para ocorrer a produção de pares o fóton incidente deve possuir, no mínimo, a mesma energia que duas massas de repouso do elétron (1,022 MeV).

O Cobalto-60 é um material amplamente utilizado para irradiação, seja para radioterapia, esterilização de aloenxertos, tratamento de fios metálicos, entre outros. Este é obtido a partir do bombardeamento por nêutrons do Cobalto-59, e apresenta como características meia vida de 5,24 anos, e energia de fóton na faixa de 1,17 MeV e 1,33 MeV.

Na Figura 14 é possível observar as faixas de predominância dos três efeitos, dependendo do numero atômico do elemento absorvedor e da energia do fóton. As linhas mostram valores de numero atômico e energia onde os efeitos possuem igual probabilidade de ocorrência.

Vale lembrar que o material biológico é composto principalmente por C, H,O,N, cujos números atômicos são, $Z_C=12$, $Z_H=1$, $Z_O=16$, $Z_N=14$. Se levarmos em conta a irradiação de material biológico por fótons gama emitidos por Co-60 é possível observar na figura 14 que há a predominância do efeito Compton.

Figura 14: Importância relativa dos três principais tipos de interação da radiação gama, com destaque para o material biológico irradiado por radiação gama emitida de fonte de Co-60. Nessa situação há predominância do efeito Compton. Adaptado de [35].

A deposição de energia de radiação ionizante no meio, mais conhecida como dose absorvida (D), corresponde à energia depositada por unidade de massa. Este parâmetro é calculado pela energia absorvida pelo meio (dE), por unidade de massa (dm) como apresentado na equação

$$D = \frac{dE}{dm} \quad (8)$$

No sistema internacional SI, D é representado pela grandeza física Gray (Gy) que corresponde a Joules por kilograma. Muitos dos efeitos desencadeados pela radiação, nocivos ou não, têm característica dose-dependente.

A quantidade de energia depositada na matéria depende da transferência linear de energia da radiação, mais conhecido como LET - do inglês *Linear energy transfer* - que corresponde a taxa com que uma partícula carregada ou onda eletromagnética perde energia quando interage com a

matéria. Considerando uma mesma faixa de energia, radiações com massa possuem LET maior do que fótons. Por isso partículas carregadas, de uma forma geral, possuem penetração menor que radiações eletromagnéticas [1], [29], [34], [36].

3.2.3. Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante

Ao interagir com o tecido biológico, a radiação causa excitação e ionização dos átomos que constituem as moléculas. As excitações causam pouco efeito no material, enquanto que a ionização causa um desequilíbrio eletroestático nas moléculas ejetando íons negativos e ocasionando a quebra da estrutura molecular.

O íon arrancado desloca-se no meio, impulsionado pela energia cinética adquirida neste processo. Esta energia é dissipada através da interação do íon com outros átomos eventualmente encontrados em sua trajetória, podendo assim, produzir novas ionizações no meio. O processo é interrompido quando a energia é totalmente dissipada, devido a consecutivas interações. Após a introdução de cargas livres no meio, segue-se um rearranjo eletrônico das moléculas ionizadas, que acabam sendo absorvidas por íons livres do meio ou capturadas por outras moléculas. Este rearranjo tem como consequência o restabelecimento do equilíbrio perdido [1].

O mecanismo de ação das radiações no tecido biológico pode ser classificado como direto ou indireto:

Colisões diretas da radiação ionizante com as moléculas do tecido podem gerar danos irreversíveis ao DNA e a proteínas estruturais como o colágeno. A este fenômeno se dá o nome de mecanismo direto.

O mecanismo indireto ocorre quando a radiação interage com a molécula de água, quebrando-a e produzindo íons e radicais livres. Os íons são espécies químicas que possuem carga e número par de elétrons. Os radicais livres são entidades neutras, altamente reativas em decorrência da presença de átomos cuja última camada possui elétrons desemparelhados (número ímpar de elétrons).

Os radicais podem reagir com o oxigênio presente na água e com várias moléculas orgânicas e inorgânicas, desencadeando uma série de ionizações ou excitações no meio [29], [34]. O corpo humano é composto principalmente por água, e em caso de exposição à radiação ionizante uma quantidade de radicais livres será introduzida no meio, podendo danificar importantes estrutura, rompendo ligações de moléculas importantes para o metabolismo [1].

Considerando que as moléculas biológicas são constituídas, por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, os elétrons que provavelmente serão arrancados de um átomo, no caso de exposição à radiação, serão de átomos destes elementos. A radiação ionizante pode provocar desestabilização eletrônica em proteínas ocasionando a quebra das moléculas, quebras de pontes de hidrogênio e consequente desnaturação [37].

Para que ocorra ionização em um material biológico a energia da radiação deve ser superior ao valor da energia de ligação dos elétrons ligados aos átomos destes elementos [1]. Os efeitos da radiação no tecido biológico dependem também da dose, taxa de dose, do fracionamento, do tipo de radiação (corpúscular ou eletromagnética) e da composição do tecido. [34].

Espectroscopia ATR-FTIR na análise de tecido ósseo

3.2.4. Espectroscopia

A espectroscopia é um conjunto de métodos analíticos que estudam a interação de diferentes tipos de radiação eletromagnética com a matéria. Sua principal função é determinar níveis energéticos de átomos ou moléculas e as diferenças entre os níveis (transições), possibilitando a identificação da posição relativa dos níveis energéticos. A escolha da região espectral depende dos tipos de transições energéticas envolvidas a serem estudadas: eletrônicas, vibracionais ou rotacionais [38], [39].

As transições eletrônicas são desencadeadas por fótons na região do ultravioleta e do visível, as transições vibracionais por fótons na região do infravermelho e as transições rotacionais por fótons na região do infravermelho longo (para gases) e micro-ondas. Diferentes regiões espectrais demandam

diferentes técnicas espectroscópicas com tecnologia apropriada a cada uma [38]. A partir das informações espectroscópicas é possível caracterizar moléculas, identificando grupos funcionais e a estrutura molecular.

As técnicas de espectroscopia óptica mais comumente usadas são a espectroscopia de emissão e a de absorção. Na espectroscopia de absorção, a substância analisada é posicionada entre o detector e uma fonte de radiação eletromagnética, com uma faixa de comprimento de onda desejado. Ocorre a excitação dos átomos do material, que decaem ao estado fundamental, emitindo a energia absorvida em forma de ondas eletromagnéticas,. A análise é feita comparando-se a radiação transmitida ou refletida pela amostra, com a radiação da fonte.

Na espectroscopia de emissão, ocorre a excitação dos átomos do alvo do material estudado por meios térmicos e eletrônicos. Quando os átomos decaem de volta ao estado estável, emitem a energia que haviam absorvido em forma de ondas eletromagnéticas, sendo a energia emitida utilizada para a análise do material [39], [40].

A intensidade do espectro é proporcional à quantidade de moléculas presentes na amostra. No modo absorção quanto mais fótons forem absorvidos, maior será a intensidade do espectro [39].

3.2.5. Fundamentos da espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (IV) é utilizada para investigar transições vibracionais (e rotacionais no caso de líquidos e gases) a fim de obter informações sobre a natureza das ligações presentes em uma determinada molécula (valores das frequências vibracionais/rotacionais) e também de sua geometria molecular [41]. Estas informações são obtidas a partir da interação de uma amostra com a radiação na região do infravermelho. Quase todos os compostos que tenham ligações covalentes, sejam orgânicos ou inorgânicos, absorvem várias frequências na região do IV [42].

A princípio, as vibrações moleculares devem ser tratadas quanticamente. No entanto, sempre podemos aproximar o ponto de equilíbrio de um potencial qualquer, $V(x)$, pelo potencial parabólico do oscilador harmônico. Isso significa, encontrar a parábola que melhor se ajusta ao potencial em torno do mínimo [38], [43].

O modelo mais simples para se entender o conceito de espectroscopia vibracional é o de moléculas diatômicas (compostas por dois átomos). Os átomos são representados por duas massas ligadas por uma mola com massa desprezível (representando a ligação química) [44].

Figura 15: Molécula diatômica representada por um sistema de duas massas ligadas por uma mola.

Para um deslocamento dx do ponto de equilíbrio, haverá uma força restauradora que obedece a lei de Hooke, $F=-k.dx$, onde F é a força de restauração causada pela constante de resistência ao movimento k , atuando contra o deslocamento. A energia potencial V desse sistema é descrito por $V=\frac{1}{2}k.x^2$.

A partir da solução da equação do oscilador harmônico para uma molécula diatômica [38], obtém-se a seguinte equação:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (9)$$

que relaciona a frequência do oscilador (ν) com a constante de força clássica (k) e com a massa reduzida, $\mu = (m1.m2)/(m1+m2)$, relativa às massas dos átomos $m1$ e $m2$. De acordo com a equação 7 é possível observar que quanto maior a constante de força da ligação, maior a frequência da vibração. Uma

ligação C=O terá frequência vibracional maior que uma ligação C-O, e quanto maior a massa dos átomos envolvidos, menor será a frequência [45].

A partir da resolução da equação de Schroedinger para o oscilador harmônico é possível observar que os movimentos vibracionais respeitam regras de seleção pois apresentam níveis discretos de energia (E_n):

$$E_n = (n + \frac{1}{2}) h \nu \quad (10)$$

onde a diferença entre os níveis de energia é igual a $\Delta n = \pm 1$, ou seja, $n = 0, 1, 2, 3, \text{etc}$, e ν é dado pela equação 9. A equação de Schrodinger descreve a energia potencial do sistema e não descreve a força agindo sobre a partícula, portanto k pode ser interpretado como uma constante que descreve o quanto a energia potencial de um sistema aumenta se deslocado seu valor de referência $V=0$. No caso clássico, a energia pode ter qualquer valor, sendo determinada pelas condições iniciais do problema (velocidade e posição iniciais da massa). Já no caso quântico, o espectro de energias consiste em um número infinito de níveis discretos, como mostrado na Figura 16 [41], [46]–[48].

Entretanto nenhuma molécula descreve perfeitamente o comportamento harmônico. O modelo que melhor representa a vibração molecular é o oscilador anarmônico.

O modelo harmônico não prevê a existência de uma energia de dissociação, pois não há limite para o valor de ν . É possível observar em alguns espectros a existência de bandas vibracionais com, aproximadamente, o dobro da frequência da banda fundamental, com intensidade menor que a do modelo harmônico, violando a regra $\Delta n = \pm 1$. Para este caso, as regras de seleção permitem o aparecimento de transições onde $\Delta n = \pm 1, 2, 3, \dots$. Transições com $\Delta n > 2$ são chamadas de sobretons (overtones), que são bandas com valores de frequência correspondentes a múltiplos inteiros das vibrações fundamentais. [38], [45], [47].

Figura 16: Modelo de oscilador harmônico (A) e oscilador anarmônico (B).

Como mostrado na Figura 16 (B), conforme a distância interatômica aumenta, a energia chega a um máximo, quando então a ligação se rompe. Esta energia é chamada de a energia de dissociação (D_e), e inexistente no oscilador harmônico [38], [45].

O Infravermelho localiza-se na faixa do espectro entre a luz visível e as micro-ondas, e pode ser dividido em três regiões: o infravermelho próximo $12800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ ($0.78\text{--}2.5\text{ }\mu\text{m}$); infravermelho médio de $4000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ ($2.5\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$); e o Infravermelho distante $200\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ ($50\text{--}1000\text{ }\mu\text{m}$) [39]. A Figura 17 mostra algumas faixas de frequências usualmente observadas em algumas moléculas orgânicas.

A unidade utilizada para classificar as ondas eletromagnéticas na espectroscopia de infravermelho, é o número de onda $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$, pois este é diretamente proporcional à energia e frequência, além de possuir ordens de grandeza de fácil representação.

Figura 17: Esquema das faixas de frequências usualmente observadas para vibrações de diferentes ligações químicas numa molécula orgânica [49].

O espectro infravermelho é obtido a partir da absorção da radiação IV pela amostra. Esta região possui algumas frequências que correspondem às frequências de diversos modos vibracionais de moléculas orgânicas. A absorção ocorre, pois o fóton, em ressonância com a vibração, é absorvido, alterando a energia e consequentemente amplitude das vibrações [42]. Mas nem todos os modos normais de vibração darão origem a transições vibracionais no infravermelho. Isto porque somente ligações que possuam modos de vibrações com variação de momento de dipolo elétrico são observadas na espectroscopia de infravermelho convencional, pois a radiação eletromagnética interage com campo elétrico alternado produzido pela mudança de distribuição de cargas que acompanha a vibração [41][50]. O vetor $\vec{p}$ representa o momento dipolar na Figura 18.

Figura 18: Momento de dipolo molecular resultante, de duas moléculas com diferentes estruturas. A molécula CO_2 possui momento de dipolo nulo. A molécula de H_2O possui momento de dipolo diferente de zero. Adaptado de: <http://2012books.lardbucket.org/books/general-chemistry-principles-patterns-and-applications-v1.0/section_13_01.html>.

Os principais tipos de vibração molecular são estiramento e deformação angular. O estiramento é um movimento ritmado ao longo do eixo da ligação molecular, como por exemplo, o aumento e a diminuição da distância. O movimento relativo de estiramento pode estar em fase (simétrico) ou fora de fase (assimétrico) (Figura 19).

Figura 19: Representação dos tipos de vibração de estiramento [51].

Se a molécula possuir diferentes átomos terminais, como o HCN, ClCN ou o ONCl por exemplo, então os modos de estiramento não serão mais simétricos ou assimétricos, mas haverá porções variáveis de movimento vibracional em cada grupo. A deformação angular corresponde a uma mudança no ângulo da ligação. Considerando uma molécula orgânica sendo cortada por um plano que contenha os átomos de hidrogênio e carbono, os hidrogênios podem se mover na mesma direção (*Rocking*) ou em direções opostas (*Scissoring*) dentro desse plano, assim como podem se mover, em fase (*Wagging*) ou fora de fase (*Twisting*), para fora do plano (Figura 20) [52].

Figura 20: Representação dos tipos de vibração de deformação angular [51].

3.2.6. Espectrômetro por infravermelho

Os primeiros equipamentos de espectroscopia no infravermelho eram do tipo dispersivo. Estes equipamentos obtêm espectros a partir da separação das frequências individuais da radiação policromática emitida pela fonte de infravermelho. A separação é feita por um prisma ou por uma grade de difração que é rotacionada de modo que as diversas frequências do infravermelho incidam, uma por vez, na amostra. O detector é posicionado posteriormente à amostra, com o intuito de detectar a intensidade transmitida de cada frequência. A partir destas informações, é produzido um gráfico de intensidade por frequência, mais conhecido como espectro de infravermelho da amostra. Não existem estruturas moleculares diferentes que produzam o mesmo espectro infravermelho. Cada molécula possui um espectro característico, uma “impressão digital”.

Atualmente todos os espectrômetros no infravermelho são baseados em medições interferométricas, sendo por isso, classificados como espectrômetros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) [53].

3.2.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

Na espectroscopia FTIR, a radiação infravermelha (policromática) antes de interagir com a amostra, passa por um interferômetro de Michelson, ou por variações do modelo de Michelson. O interferômetro é composto por um espelho móvel e um fixo, posicionados de forma perpendicular entre eles, e um espelho semireflexivo à radiação IV, mais conhecido como divisor de feixe, posicionado na bissetriz dos espelhos. Ao passar pelo divisor, o feixe tem parte (50%) de seus fótons refletidos e a outra parte (50%) transmitida. Os feixes parciais serão então refletidos pelos espelhos perpendiculares de volta ao divisor de feixes. O deslocamento oscilatório constante do espelho móvel faz com que o caminho óptico seja variável, ocasionando uma diferença de fase entre os feixes parciais e variação na amplitude por interferência.

O feixe resultante interagirá com a amostra, e parte de sua intensidade será transmitida, absorvida ou refletida. O feixe refletido ou transmitido, dependendo do método escolhido, será adquirido pelo detector e dará origem a um interferograma, que posteriormente será transformado em espectro IV. O interferograma é um gráfico que relaciona a intensidade do feixe (diversos comprimentos de onda) que chega ao detector à posição do espelho móvel. A intensidade, $I(\delta)$, varia como uma função cosseno do retardo óptico δ [54]:

$$I(\delta) = \int_0^{\infty} B(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu} \delta) \quad (11)$$

Figura 21: Esquema representativo da montagem de um espectrômetro FTIR.

Adaptado de: <<http://www.sp.phy.cam.ac.uk/~SiGe/FTIR.html>>.

O sinal resultante é amplificado, convertido em sinal analógico e é enviado para um computador, onde a transformada de Fourier é aplicada convertendo o interferograma em espectro IV. Os espectrômetros com transformada de Fourier apresentam uma série de vantagens, quando comparados com espectrômetros dispersivos: melhor relação sinal-ruído, maior velocidade de coleta dos dados, e maior resolução [52].

3.2.8. Reflexão total atenuada (ATR)

A técnica de reflexão total atenuada, mais conhecido por ATR – do inglês *attenuated total reflection* - é uma técnica que possibilita a obtenção de espectros qualitativos e quantitativos de amostras sólidas com pouco ou nenhum preparo prévio da amostra [42], [55].

A maioria dos espectrômetros de infravermelho modernos pode ser convertida para caracterizar amostras através do acessório ATR, por simples montagem do acessório no compartimento da amostra do espectrômetro. No caso de análises de materiais sólidos, a amostra é pressionada contra com o cristal por um pistão de pressão. A projeção da onda evanescente na amostra é melhor quanto maior for o contato, pois isto diminui a quantidade de ar retido na interface amostra/cristal reduzindo o ruído e a distorção do espectro.

O acessório ATR, acoplado ao espectrômetro FTIR, é composto por um cristal de alto índice de refração, no qual a amostra é posicionada em contato (Figura 22).

Figura 22: Esquema representativo do funcionamento do ATR [55].

Os materiais mais tipicamente usados para os cristais ATR incluem o diamante, germânio, KRS-5 (Thallium Bromo-Iodide), seleneto de zinco e silício. As excelentes propriedades mecânicas do diamante tornam um material ideal para a técnica ATR, particularmente quando se estuda sólidos muito duros.

O feixe infravermelho proveniente do espectrômetro adentra o cristal de tal forma que reflete pelo menos uma vez na superfície interna. A reflexão interna total dará origem à onda evanescente, que se projeta perpendicularmente na amostra em contato com o cristal. Uma parte da energia da onda evanescente é absorvida pela amostra e a radiação refletida (parte dela já absorvida pela amostra) é direcionada ao detector [39], [42].

Para a reflexão interna total ocorrer, o feixe de radiação infravermelha deve incidir na interface do cristal com a amostra, com ângulo maior ou igual ao ângulo crítico θ_c , descrito pela seguinte equação:

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right) \quad (12)$$

onde n_1 é o índice de refração da amostra, n_2 é o índice de refração do cristal, tal que para ocorrer o fenômeno da onda evanescente, o cristal deve ser composto de um material óptico com um índice de refração (n_2) mais elevado do que o índice de refração da amostra em estudo (n_1). Caso contrário, a luz é perdida na amostra [48], [52].

Um fator a ser levado em conta é a distância de penetração (d_p) da onda evanescente, que é tecnicamente definida como sendo a distância necessária para a amplitude do campo elétrico decair e^{-1} do seu valor na superfície; e é definida pela equação 13:

$$d_p = \frac{\lambda / n_1}{2\pi [\sin^2 \theta - (n_1 / n_2)^2]^{1/2}} \quad (13)$$

onde λ é o comprimento de onda da luz e θ é o ângulo de incidência do feixe de luz infravermelha na superfície do cristal [48], [52].

A profundidade de penetração varia linearmente com o comprimento de onda do feixe infravermelho, portanto considerando as equações $v=c/\lambda$ e $\bar{\nu} = 1/\lambda$, na região de 1000 cm^{-1} a d_p é 4 vezes maior que na região de 4000 cm^{-1} . Isto implica numa maior intensidade no espectro de absorção da região de 1000 cm^{-1} quando comparado com a região de 4000 cm^{-1} .

3.2.9. Bandas de Absorção de Infravermelho no osso

As principais bandas de absorção presentes no espectro infravermelho do osso podem ser atribuídos a componentes de colágeno (Amidas I, II e III), ao fosfato (PO_4^{3-}), ao carbonato (CO_3^{2-}), ao OH^- e à água (H_2O).

Figura 23: Acima: Fórmula estrutural com os modos vibracionais da amida I, amida II, amida III [56]. Abaixo: Fórmula estrutural do fosfato e do carbonato.

É possível observar na Figura 24 o espectro infravermelho (ATR) do osso com as bandas dos principais componentes identificados.

Figura 24: espectro ATR-FTIR característico de tecido ósseo (posição das bandas de acordo com a tabela I).

A seguir na,

Tabela 1, estão apresentados os principais componentes encontrados num espectro FTIR de tecido ósseo.

Tabela 1: Bandas de absorção associadas ao tecido ósseo [40], [57]–[60].

Numero de onda (cm ⁻¹)	Componente
3570	OH ⁻
3550-2900	H ₂ O
3083	Amida B
2950, 2853	C-H
1690	Amida I; Crosslinks de colágeno DHLNL
1660	Amida I; Crosslinks de colágeno piridinolina
1642	Amida I + H ₂ O
1595-1720	Amida I: Alfa hélice
1634,1625	Amida I: Folhas Beta
1480-1553	Amida II + $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ + N-H + C-N
1447-1452	CH ₂
1445,1409	CO ₃ ²⁻
1200 - 1340	Amida III + Estrutura do Colágeno
1123,1143	$\nu_3 \text{H PO}_4^{2-}$
1006-1055	$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$
1003-1005	$\nu_3 \text{H PO}_4^{2-}$
957-962	$\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$
860-890	$\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$
560-617	$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$
472	$\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$

3.2.10. Utilização do FTIR na biologia e áreas correlatas.

As possibilidades de uso da espectroscopia FTIR na biologia, medicina, medicina veterinária e áreas afins, são diversas. Esta técnica pode ser utilizada no estudo de neoplasias [47], no estudo de bactérias [61], [62] na análise de e DNA [65], [66] e de proteínas como o colágeno [63], [64], além de fornecer informações relevantes sobre diversos tipos de tecidos biológicos [60].

As primeiras utilizações da espectroscopia FTIR em análises de tecido ósseo, foram feitas para confirmar os resultados obtidos por difração de raios x, que relatavam que o componente mineral do osso era análogo ao mineral hidroxiapatita [67], [68].

Recentemente esta técnica tem sido utilizada, entre outras, no estudo das alterações químicas e estruturais que o aumento de temperatura provoca em hidroxiapatita e no esmalte dental [14], [69], [70]; na avaliação dos efeitos de doenças associadas à alteração da matriz mineral [71]–[75]; no estudo do efeito da irradiação *laser* de esmalte dental e dentina com diferentes densidades de energia [40], [57], [76] visando a utilização do *laser* na prevenção à carie; e na caracterização dos efeitos provocados pela radiação gama [11].

Acompanhando novos desafios surgiram novas técnicas de análise como o ATR-FTIR e a microscopia-FTIR (que permitiu a técnica de imagem por espectroscopia FTIR) e também um grande desenvolvimento na área de processamento dos dados espectroscópicos, com a utilização de técnicas como análise de principais componentes (PCA) e as análise por redes neurais.

3.3. Análise Dinâmico-Mecânica (DMA)

A análise dinâmico-mecânica, mais conhecida como DMA – do inglês Dynamic mechanical analysis - é uma técnica utilizada para caracterização mecânica de materiais. É empregada no estudo da viscoelasticidade de materiais como metais, polímeros e compósitos. Esta técnica permite a determinação quantitativa das propriedades mecânicas ao causar uma pequena deformação de maneira cíclica em uma amostra. A aplicação da carga tem por objetivo gerar uma deformação pré-determinada na amostra e estudar o comportamento da amostra ante a carga e a relaxação. A relação entre a força exercida para atingir tal deformação, o tempo de relaxação e as dimensões da amostra, permitem obter características biomecânicas como o módulo elástico e o amortecimento [8], [77]. As análises podem ser realizadas, sob a influência de variação de temperatura, de frequência e outros parâmetros que se desejam ser estudados.

O módulo de Young ou módulo de elasticidade é um parâmetro mecânico intrínseca dos materiais que fornece a medida do grau de rigidez de um material sólido e tem origem na energia de ligação entre os átomos do

material. A rigidez diz respeito ao quanto um material se deforma com o aumento da tensão aplicada. Esta propriedade é dependente da composição química, microestrutura e defeitos (poros e trincas). O valor medido do módulo de Young, não depende somente dos fatores intrínsecos da matéria, mas também de como são as solicitações mecânicas sobre ele: tensão de tração, compressão, dobramento, etc.; da forma e do tamanho do componente [78].

A tensão corresponde à força ou carga, por unidade de área, aplicada sobre um material. A partir da equação 1 é possível obter o módulo de Young em função das dimensões da amostra e da amplitude de deformação [78]:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (14)$$

$$\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0} \quad (15)$$

$$E = \frac{F \cdot l_0}{A \cdot \Delta l} \quad (16)$$

Onde E é módulo de Young, F é a força em Newtons, A é a área da seção onde é exercida a tensão, Δl é a variação do comprimento, l_0 é o comprimento inicial. Considerando que ε é adimensional, E é medido em unidades de Newton por área, ou Pascal. A seguir são apresentados os módulos elásticos de alguns compostos:

Tabela 2: Valor de módulo elástico de alguns materiais [78].

Material	Módulo de Young [GPa]
Diamante	1 000
Carbeto de silício (SiC)	450
Tungstênio	406
Ferro	196
Aços de baixa liga	200 - 207
Ferros-fundidos	170 – 190
Osso	20-32

O DMA também mede o amortecimento do material. O amortecimento é a capacidade do material de dissipar energia mecânica sob carga cíclica. No caso do equipamento utilizado o amortecimento é apresentado como tangente de δ , que é a fase entre as senóides de tensão e deformação de um material durante uma carga oscilatória. Esse parâmetro varia de acordo com o estado do material, sua temperatura e com a frequência aplicada [79].

4. METODOLOGIA

Neste trabalho amostras de fêmur bovino irradiadas com raios gama foram analisadas por espectroscopia no infravermelho e por ensaios mecânicos. As análises espectroscópicas foram realizadas num equipamento de espectroscopia FTIR. Os ensaios mecânicos foram realizados com um equipamento de Análise Dinâmico-Mecânica. As amostras foram irradiadas em irradiador Gammacel de ^{60}Co e em irradiador multipropósito de ^{60}Co , de acordo com a dose.

4.1. Preparação das amostras

Considerando que os substratos de tecidos duros humano e bovino são muito semelhantes do ponto de vista estrutural [80], [81], decidiu-se utilizar, neste experimento, fêmures bovinos obtidos em Frigorífico certificado, para obtenção das amostras. Este projeto está isento de necessidade de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (parecer CEUA 120/2013 IPEN/SP). Para obtenção das amostras somente as diáfises dos fêmures foram utilizadas no experimento; as epífises foram descartadas (Figura 25). Cada diáfise foi cortada em dois cilindros com altura maior que 7,5 cm e cada cilindro foi cortado em dois semicilindros.

Figura 25: Representação do local onde foram feitos os cortes.

Adaptado de:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/01/Anatomy_and_physiology_of_animals_Femur.jpg>.

Os semicilindros foram submetidos ao processo de retirada do periósteo e de medula, com espátula e bisturi cirúrgico; em seguida foram lavados em água destilada e deionizada. Este procedimento foi realizado até que houvesse praticamente nenhum indício de tecido mole associado. Os ossos foram então embalados em sacos plásticos vedados (Figura 26) e conservados em congelador à temperatura de -20°C no período em que não estavam sendo processados.

Figura 26: Embalagem utilizada para armazenar os semicilindros de osso bovino.

Neste experimento não foi empregado o uso de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como é usual na limpeza de ossos [82], pois a intenção do experimento é avaliar a influência da radiação ionizante no osso sem a presença de substâncias químicas e processos físicos que possam interferir ou modificar a estrutura do tecido.

Os cortes foram realizados com auxílio de uma cortadeira (Accuton-5, Struers s/a, Ballerup, Dinamarca), com serra circular diamantada e espessura de 0,3mm em baixa rotação, sob água corrente.

4.2. Irradiação das amostras

As amostras ósseas foram analisadas com doses fracionadas de à radiação gama de 0,01kGy, 0,1kGy, 1 kGy, 15kGy e 75kGy, ou seja, foram submetidas à irradiações com doses sucessivas de 0,01 kGy, 0,09 kGy e 0,9 kGy 14 kGy e 60 kGy. As irradiações de 0,01 kGy, 0,09 kGy e 0,9 kGy foram realizadas em irradiador de Cobalto-60 tipo Gammacell com 1,43 kGy/h e as irradiações com doses de 14 kGy e 60 kGy foram realizadas em irradiador multipropósito de Cobalto-60, com taxa de dose de 6 kGy/h. Todas as irradiações foram realizadas no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do IPEN.

Figura 27: Irradiador de Co^{60} do tipo GammaCell (esquerda). Irradiador Multipropósito de Co^{60} (direita).

Como grupo controle foram utilizadas amostras não irradiadas, mas submetidas às mesmas condições de processamento, embalagem e estocagem das amostras submetidas à radiação. Todas as amostras foram irradiadas em ambiente refrigerado com o intuito de mantê-las o mais próximo das condições de estocagem e evitar assim quaisquer interferências decorrentes da variação de temperatura.

4.3. Análise por DMA

As medidas de módulo elástico foram feitas em um equipamento de ensaios mecânicos (Netzsch DMA 242) localizado no Centro de Ciência e

Tecnologia dos Materiais (CCTM) do IPEN. Foi utilizada a técnica de flexão em três pontos (three point bending), como exemplificado na Figura 28.

Figura 28: Suporte de amostra da técnica de flexão em três pontos.

As amostras de osso destinadas a análise dinâmico-mecânica foram cortadas com dimensões de aproximadamente 50mm x 7mm x 1mm. O armazenamento das foi feito em ambiente úmido e refrigerado a 4°C. Cada amostra foi identificada a lápis com números.

Figura 29: Representação do cilindro retirado da diáfise amostra óssea retirada de cada semicilindro (Esquerda). Imagem da amostra óssea utilizada no DMA. cortada e numerada (Direita).

Foram selecionadas aleatoriamente cinco amostras para análise de DMA. Estas foram submetidas ao mesmo procedimento de análise e irradiação, ou seja, todas as amostras foram analisadas antes das irradiações (grupo controle) e após receberem cada dose.

Como condição de análise foi estabelecida uma deformação de 60 μm , com frequência de 1Hz. Cada análise foi feita em um intervalo de 10 minutos. A temperatura estabelecida foi de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Todas as amostras foram analisadas com os suportes de distância de 40mm. Cada amostra foi medida quatro vezes, sendo reposicionadas a cada medida. Esse procedimento foi realizado para as cinco amostras a cada fase do experimento.

4.4. Análise por espectroscopia ATR-FTIR

As amostras destinadas à análise espectroscópica pela técnica de reflexão total atenuada (ATR) foram cortadas com dimensões de aproximadamente 7mm x 7mm x 1mm (com área próxima à área do cristal do ATR) e posteriormente lixadas com lixas MicroCut TM S Abrasive Discs (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) de granulação 2500 e 4000, sucessivamente.

Figura 30: Imagem de uma das amostras utilizadas para análise de espectroscopia ATR-FTIR

O processo de lixamento reduz a quantidade de riscos causados pelo corte com serra diamantada. Este procedimento melhora o contato da amostra com o cristal reduzindo o espalhamento decorrente dos riscos e contribuindo para obtenção de um espectro menos ruidoso.

O armazenamento das amostras foi feito em ambiente úmido e refrigerado a 4°C e previamente às análises foram mantidas em dessecador por 24 horas. Cinco fragmentos foram selecionados para análise por ATR-FTIR. Todos foram submetidos ao mesmo procedimento de análise e

irradiação: análise antes das irradiações (grupo controle) e após serem submetidas a cada dose. As amostras foram reposicionadas a cada aquisição de espectro e o background foi medido antes de cada medida. Dez espectros de cada uma das cinco amostras foram coletados a cada fase.

O equipamento utilizado para análise foi um espectrômetro FTIR (Nicolet 6700, Thermo Scientific®, Madison, WI, EUA), com um detector DTGS-TEC e um acessório de Reflexão Total Atenuada - ATR (Smart Orbit, Thermo Scientific®, Madison, WI, EUA) acoplado (Figura 31), para as análises de ATR-FTIR. O equipamento trabalha em ambiente de temperatura e umidade controladas em 23°C e 40%, respectivamente, com intuito de evitar que os fatores ambientais influenciem na obtenção dos espectros. O software utilizado na aquisição dos espectros foi o software OMNIC (Thermo Scientific®, Madison, WI, EUA), fornecido pelo fabricante do equipamento.

Figura 31: Esquerda: Espectrofotômetro FTIR com o acessório ATR acoplado.

Os parâmetros de análise espectroscópica estão expressos na Tabela 3:

Tabela 3: Parâmetros utilizados para análise dos espectros.

Parâmetros	Valôres
Intervalo de Aquisição (cm^{-1})	4000 – 400
Intervalo de dados (cm^{-1})	2
Velocidade de aquisição (cm^{-1}/s)	0,6329
Scans	32
Scans Background	32

4.5. Análise dos espectros FTIR

Foram realizados cinco tipos de análise no espectro: Ajuste de sub-bandas de amida I; análise de cristalinidade pela análise do índice cristalino e análise de 1/FWHM da banda $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, análise de material orgânico em relação ao material inorgânico pela divisão da banda amida I + Amida II pela banda de $\nu_{1,\nu_3}\text{PO}_4^{3-}$ e divisão da banda amida III + colágeno pela banda de $\nu_{1,\nu_3}\text{PO}_4^{3-}$.

Os dados obtidos foram processados nos programas Origin Pro 8.0 (Origin®, Northampton, MA, EUA) e Matlab 2009a (MathWorks®, Natick, MA, EUA). Os testes estatísticos foram estabelecidos de acordo com a normalidade dos dados.

4.5.1. Normalização

Para realização das análises, foi necessária a normalização dos espectros, isto porque as amostras não são idênticas. Deve-se contar também variações experimentais que podem ocorrer durante as análises.

No caso da análise por ATR-FTIR o equipamento de reflexão total atenuada possui um parafuso de pressão, para manter a amostra em contato com o cristal. Este dispositivo mantém a amostra imóvel e aumentar o contato do cristal com a amostra, diminuindo a quantidade de ar entre a interface amostra cristal. Infelizmente o parafuso de pressão utilizado não possui controlador de torque, portanto não é possível saber a pressão exata aplicada sobre a amostra em cada uma das medidas, podendo ser esse um dos fatores para as diferentes intensidades observadas. Procurou-se posicionar a amostra aproximadamente da mesma forma em cada medida, com aproximadamente a mesma pressão.

Entretanto, outros fatores podem ser levar a diferenças nas intensidades como: imperfeições presentes na amostra, e a própria heterogeneidade do tecido, que como a maioria dos tecidos biológicos, pode apresentar significativas variações estruturais de uma região para outra.

Na simples apresentação dos espectros médios, foi utilizada a normalização vetorial. Esta técnica é calculada de acordo com as equações abaixo:

$$a_{média} = \frac{\sum_k a(k)}{k} \quad (17)$$

$$a'(k) = a(k) - a_{média} \quad (18)$$

$$a''(k) = \frac{a'(k)}{\sqrt{\sum_k (a'(k))^2}} \quad (19)$$

$$\sum_k (a''(k))^2 = 1 \quad (20)$$

onde $a_{média}$ é a intensidade média dos pontos do espectro. O parâmetro $a(k)$ é a intensidade do espectro no ponto k , $a'(k)$ é o espectro subtraído pela média do espectro, e $a''(k)$ é o espectro normalizado.

Na normalização vetorial calcula-se primeiro o valor médio do espectro (equação 17). Este valor médio é então subtraído do espectro (equação 18) tal que o meio do espectro passa a ser zero. A soma dos quadrados de todos os valores é calculada e o espectro subtraído é então dividido pela raiz quadrada desta soma (equação 19), sendo que a soma do quadrado dos valores do espectro resultantes é igual a um (equação 20) [83], [84].

Todas as análises semi-quantitativas foram tratadas de forma relativa, tendo seus resultados normalizados pelo valor do grupo controle. As irradiações foram realizados na mesma amostra e esta foi analisada após cada etapa. Esta metodologia foi adotada no experimento com a intenção de identificar o quanto os grupos submetidos à radiação se diferiam do grupo controle.

4.5.2. Segunda derivada

Para análise de sub-bandas de amida I e análise do FWHM da banda $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ foi utilizado o método de segunda derivada. No caso da análise de sub-bandas esta técnica foi utilizado para identificar o ponto de máximo dos principais componentes da amida I. Para a análise da banda de fosfato a segunda derivada foi utilizada na obtenção do FWHM da segunda derivada da banda $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$. Contudo este método, sem nenhum tratamento é muito ruidoso e de difícil análise.

Figura 32: Segunda derivada de um espectro de absorvância ATR-FTIR

Para tornar as segundas derivadas menos ruidosas foi utilizado um método matemático de suavização por mínimos quadrados e diferenciação pelo método de convolução (Savitzky-Golay) [85], com janela de 15 pontos, que foi bastante eficaz na suavização da segunda derivada.

Figura 33: Segunda derivada de um espectro de absorvância ATR-FTIR pelo método de suavização.

4.5.3. Ajuste de sub-bandas de amida I

Uma forma de identificar mudanças no colágeno é utilizar a razão das áreas das sub-bandas de amida I localizadas em 1660cm^{-1} e 1690cm^{-1} . Esta proporção foi relatada na literatura por corresponder à relação de ligações cruzadas de colágeno maduras e imaturas no osso. Nestas posições estão localizadas as ligações cruzadas de colágeno piridinolina (ligações cruzadas imaturas) e dihidroxinorleucina (ligações cruzadas maduras), cujas fórmulas estão representadas na Figura 34 [11], [12], [86], [87].

Figura 34: Estrutura molecular das ligações cruzadas piridinolina (a) e dihidroxinorleucina (b)[88].

Os ajustes das sub-bandas foram feitos no programa Origin Pro 8.0 (Origin®, Northampton, MA, EUA), com base nas informações de posição fornecidas pela segunda derivada da banda de amida I.

4.5.4. Análise de Cristalinidade

4.5.4.1. Índice de Cristalinidade

Um método que tem sido usado para avaliar mudanças na microestrutura do osso é o índice de cristalinidade. Este índice é uma medida da ordem, organização e tensão dos cristais de hidroxiapatita.

O índice de cristalinidade (IC) é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$IC = \frac{(I_{551 \text{ cm}^{-1}} + I_{597 \text{ cm}^{-1}})}{I_{588 \text{ cm}^{-1}}} \quad (21)$$

onde I é a intensidade de absorbância em determinado comprimento de onda.

Para realizar este procedimento é necessário desenhar uma linha base no espectro de 400 cm^{-1} a 635 cm^{-1} (Figura 35). Quanto menor for a largura de banda dos dois modos vibracionais do $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ - localizados em 550 cm^{-1} (A) e 600 cm^{-1} (B) - menor será a intensidade $I_{588 \text{ cm}^{-1}}$ (C), maior será o índice de cristalinidade [65], [68], [69], [89], [90].

Figura 35: Espectro Infravermelho de tecido ósseo entre os comprimentos de onda de 1800 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . Na figura estão representados pontos utilizados para cálculo do IC.

4.5.4.2. Análise de FWHM da banda $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$

Uma alternativa para calcular a cristalinidade, utilizada normalmente na espectroscopia RAMAN, é análise de largura à meia altura da banda de fosfato $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$. Este parâmetro avalia de forma aproximada o tamanho e perfeição dos cristais de hidroxiapatita. A relação que se utilizada para a análise é cristalinidade = $1 / (\text{FWHM})$ [91], [92], indicando que a largura da banda é inversamente proporcional à organização e integridade dos cristais. Porém, no espectro FTIR do osso, a banda de $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ se encontra sobreposta à banda de $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$. Optou-se então por utilizar a largura à meia altura da segunda derivada da banda de $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$. De acordo com o relatado na literatura [93], [94], a largura a meia altura da banda (Y) pode ser relacionado com a largura a meia altura da segunda derivada (Y'') dessa banda pela seguinte equação:

$$Y'' = \frac{Y}{2,7} \quad (22)$$

4.5.5. Razão das áreas de bandas de material orgânico e fosfato

O Calculo da razão da área das bandas de composto orgânico e fosfato na matriz óssea pode ser um bom indicativo da proporção de material orgânico

em relação ao material inorgânico. Este método de análise foi dividido em duas partes:

4.5.5.1. Razão das áreas das bandas Amida I + II / fosfato

A razão das áreas das bandas de amida I+II e Fosfato é calculada pela razão da área integrada da banda de amida I + amida II ($1520-1720\text{ cm}^{-1}$) pela área integrada da banda de fosfato ($916-1180\text{ cm}^{-1}$).

4.5.5.2. Razão das áreas das bandas Amida III + colágeno / fosfato

A razão das áreas das bandas de amida III + colágeno e fosfato, é calculada pela razão da área integrada da banda de amida III ($1270-1210\text{ cm}^{-1}$) somada das duas bandas correspondentes à estruturas de colágeno ($1296-1269\text{ cm}^{-1}$) e ($1213-1180\text{ cm}^{-1}$) pela área integrada da banda de fosfato ($1180-916\text{ cm}^{-1}$).

4.6. Estatística

As análises foram realizadas utilizando os *software* Origin 8.0. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Após esta análise optou-se pela utilização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com significância de 5%.

4.7. Correlação entre os dados espectroscópicos e as medidas de DMA

Depois de obtidos os dados, foi realizada a correlação dos dados da análises espectroscópica de análise mecânica. Para avaliar a relação dos parâmetros analisados foi feita a matriz de correlação de Pearson com significância de 5% entre as seguintes análises: Índice de cristalinidade x Módulo elástico, $1/\text{FWHM}$ x Módulo elástico, Ajuste de sub-bandas de Amida I x Módulo elástico, Amida I+II/ Fosfato x Módulo Elástico, Índice de Cristalinidade x Tangente de delta, $1/\text{FWHM}$ x Tangente de delta, Ajuste de sub-bandas de Amida I x Tangente de delta, Amida I+II/ Fosfato x Tangente de delta.

5. RESULTADOS

Na Figura 36 são apresentados os espectros médios para cada dose, obtidos a partir da média das medidas em cada fase do experimento. Para comparação, os espectros médios foram sobrepostos no mesmo gráfico. Todos os espectros foram normalizados vetorialmente.

Figura 36: Espectros médios normalizados vetorialmente, do tecido ósseo submetido às doses.

Visualmente não foi encontrada nenhuma nova banda além das bandas reportadas na literatura [40], [58]. Foi possível identificar todas as bandas pretendidas em todos os grupos, o que indica que não houve a formação de compostos ou mudanças bruscas nos modos de vibração.

5.1. Ajuste de sub-bandas de amida I

Mesmo a segunda derivada sendo uma importante ferramenta para identificação de sub-bandas, o filtro de suavização aplicado (Savitzky-Golay) aplicada pode desprezar bandas de menor intensidade. Optou-se então por

utilizar as bandas de maior contribuição na segunda derivada realizada pelo método descrito na metodologia, que foram as bandas 1696 cm^{-1} , 1660 cm^{-1} , 1633 cm^{-1} .

Figura 37: Sub-bandas de amida I ajustadas, com destaque para as bandas de piridinolina e DHLNL.

A Figura 38 apresenta o gráfico da média da razão normalizada das áreas das sub-bandas de amida I, das 5 amostras.

Figura 38: Gráfico da evolução da razão normalizada das sub-bandas de amida I, piridinolina e DHLNL, em resposta às diferentes doses.

É possível observar um aumento da razão das sub-bandas nos três primeiros grupos em relação ao grupo controle. O gráfico apresenta um

aumento mais acentuado em 1 kGy onde a razão tem seu valor máximo. A curva começa a decrescer em 15 kGy e em 75 kGy atinge valor próximo ao inicial.

Foram realizados testes estatísticos não paramétricos de Kruskal-Wallis com significância de 5%. Na Tabela 4 é possível observar que existem diferenças estatisticamente significantes nos grupos de 1 kGy e 15 kGy, em relação aos demais e não há diferença estatística entre estes dois grupos.

Tabela 4: Kruskal-Wallis dos dados da razão das sub-bandas de amida I.

	0 kGy	0,01 kGy	0,1 kGy	1 kGy	15 kGy	75 kGy
0 kGy	-	NS	NS	*	*	NS
0,01 kGy	NS	-	NS	*	*	NS
0,1 kGy	NS	NS	-	*	*	NS
1 kGy	*	*	*	-	*	*
15 kGy	*	*	*	*	-	*
75 kGy	NS	NS	NS	*	*	-

NS = Não significativo *Significativo (0,05)

5.2. Análise de cristalinidade

Na Figura 39 é possível observar a comparação dos dados normalizados de IC e 1/FWHM da banda $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$.

Figura 39: Comparação dos dados normalizados de Índice cristalino e 1/FWHM da banda $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$.

Na figura 39, na análise de 1/FWHM, o grupo de 0,01 kGy apresenta um decréscimo em relação ao grupo controle. A partir deste grupo os valores continuam abaixo do grupo controle, mas apresentam um aumento gradual. Em 75 kGy o valor ultrapassa o grupo controle.

Os valores de IC decaem gradativamente em relação ao grupo controle até o nível mais baixo em 0,1 kGy. A partir deste grupo, o IC apresenta um aumento até 15 kGy, alcançando seu valor máximo em 75 kGy, cujos valores relativos próximos são da técnica de 1/FWHM.

As tabelas a seguir apresentam os testes estatísticos realizados nos dados de índice cristalino e FWHM de $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$.

Tabela 5: Kruskal Wallis dos dados de índice de cristalinidade.

	0 kGy	0,01 kGy	0,1 kGy	1 kGy	15 kGy	75 kGy
0 kGy	-	NS	*	NS	NS	NS
0,01 kGy	NS	-	NS	NS	NS	*
0,1 kGy	*	NS	-	NS	NS	*
1 kGy	NS	NS	NS	-	NS	*
15 kGy	NS	NS	NS	NS	-	*
75 kGy	NS	*	*	*	*	-

NS = Não significativo *Significativo (0,05)

Tabela 6: Kruskal Wallis dos dados de 1/FWHM.

	0 kGy	0,01 kGy	0,1 kGy	1 kGy	15 kGy	75 kGy
0 kGy	-	*	NS	NS	NS	NS
0,01 kGy	*	-	NS	NS	*	*
0,1 kGy	NS	NS	-	NS	NS	*
1 kGy	NS	NS	NS	-	NS	*
15 kGy	NS	*	NS	NS	-	*
75 kGy	NS	*	*	*	*	-

NS = Não significativo *Significativo (0,05)

Na Tabela 5 é possível observar que o grupo de 75 kGy se diferencia estatisticamente dos grupos 0,01 kGy, 0,1 kGy, 1 kGy, 15 kGy e o grupo 0,1 kGy possui diferença estatisticamente significantes do grupo 0 kGy.

Na Tabela 6 a análise estatística mostra que somente o grupo 0,01 kGy apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. O grupo 15

kGy apresentou diferenças estatísticas em relação ao grupo 0,01 kGy, e o grupo 75 kGy apresentou diferença estatística em relação a todos os grupos irradiados.

Foi realizado então um teste de correlação entre as duas análises. O coeficiente de correlação de pearson (r) foi 0,30 com $p < 0,05$, indicando um baixo grau de correlação positiva entre as duas análises. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,09 indicando que cerca de 9% da variabilidade da análise de IC pode sofrer alguma influência ou ter alguma relação com a largura da banda de $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$.

5.3. Razão das áreas das bandas de material orgânico e fosfato

As regiões escolhidas para análise de material orgânico estão apresentadas a seguir, na Figura 40.

Figura 40: Dados dos principais componentes do material orgânico ósseo em relação ao fosfato. Em azul é representado a soma das bandas de amida I e amida II e em vermelho a soma da banda de amida III e das bandas correspondentes à estrutura do colágeno. Ambas as somas foram divididas pela principal banda de fosfato do espectro.

É possível observar que a relação amida I + II/ $\nu_1, \nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ cresce progressivamente até 1 kGy. Em 15 kGy esta relação cai levemente, tornando

a crescer em 75 kGy, onde atinge seu maior valor. Este parâmetro apresentou comportamento muito próximo ao exponencial podendo ser ajustado por uma regressão exponencial, cuja equação é expressa na Tabela 7. O Valor R^2 é chamado de coeficiente de determinação o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Este valor varia de zero a um.

Tabela 7: Equação do ajuste dos dados de amida I+II / $_{v1,v3}PO_4^{3-}$, em relação à dose.

Equação R^2 ajustado	$y = a+x*b$ 0,89	
	Valor	Erro Padrão
A	1,10129	0,0176
B	0,02917	0,00453

Ajustou-se uma reta aos dados experimentais, pois o eixo x está em escala logarítmica, sendo que $x = \log_{10}(\text{dose})$. Reformulando a equação de ajuste temos que $y=a+b*\log_{10}(\text{dose})$, ou seja, em escala linear o comportamento deste parâmetro é uma função logarítmica.

Já a relação amida III + colágeno / $_{v1,v3}PO_4^{3-}$ apresenta crescimento progressivo até 0,1 kGy onde atinge seu maior valor, caindo levemente em 1 kGy, crescendo novamente em 15 kGy, mas a um patamar menor que 0,1 kGy. Em seguida a relação sofre uma queda mais acentuada em 75 kGy onde atinge seu menor nível.

Na Tabela 8 observou-se que, com excessão do grupo 0,01 kGy todos os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle. O grupo 75 kGy apresentou diferenças estatisticamente significantes com todos os grupos, a exceção do grupo 1 kGy.

Tabela 8: Teste estatístico de Kruskal-Wallis de amida I+II / $_{v1,v3}PO_4^{3-}$ com $p<0,05$.

	0 kGy	0,01 kGy	0,1 kGy	1 kGy	15 kGy	75 kGy
0 kGy	-	NS	*	*	*	*
0,01 kGy	NS	-	NS	*	*	*
0,1 kGy	*	NS	-	*	NS	*
1 kGy	*	*	*	-	NS	NS
15 kGy	*	*	NS	NS	-	*
75 kGy	*	*	*	NS	*	-

NS = Não significativo * = $p<0,05$

Apesar de todas as variações observadas no gráfico da relação Amida III + colágeno / $v_{1,v3}PO_4^{3-}$, na Tabela 9 é possível constatar que somente o grupo 75 kGy apresentou alterações estatisticamente significantes com relação aos demais grupos.

Tabela 9: Teste estatístico de Kruskal-Wallis de amida III+colágeno/ $v_{1,v3}PO_4^{3-}$ com $p < 0,05$.

	0 kGy	0,01 kGy	0,1 kGY	1 kGy	15 kGy	75 kGy
0 kGy	-	NS	NS	NS	NS	*
0,01 kGy	NS	-	NS	NS	NS	*
0,1 kGY	NS	NS	-	NS	NS	*
1 kGy	NS	NS	NS	-	NS	*
15 kGy	NS	NS	NS	NS	-	*
75 kGy	*	*	*	*	*	-

NS = Não significativo * = $p < 0,05$

5.4. DMA

A Figura 41 apresenta os valores normalizados de módulo elástico e tangente de delta.

Figura 41: Valores normalizados de modulo elástico e tangente de delta.

Apesar das oscilações, observadas no gráfico de módulo elástico, há no geral, uma leve tendência de decréscimo até o grupo de 15 kGy. Já em 75 kGy, o módulo elástico apresentou seu menor valor.

É possível observar na mesma figura, o gráfico dos valores de tangente de delta em relação às diversas doses. Há uma leve tendência de aumento dos valores até 15 kGy. No grupo de 75 kGy a média do valor de tangente de delta cai para seu menor valor.

Na Tabela 10 é possível observar que o ajuste linear apresentou R^2 alto. Isto indica que equação apresentada na tabela é um bom ajuste para o comportamento do módulo elástico em relação às doses de radiação.

Tabela 10: Equação de ajuste dos dados de módulo elástico em relação à dose.

Equação R^2 ajustado	$y = 1/(a+b*x)$ 0,96583	
	Valor	Erro Padrão
A	1,00088	0,00225
B	8,58912E-7	7,46049E-8

Neste caso a curva ajustada apresentou um comportamento semelhante a curvas $f(x) = 1/(a+x)$, mas isto pois o o eixo x está em escala logarítmica, sendo que $x = \log_{10}(\text{dose})$. Reformulando a equação de ajuste temos que $y = 1/(a + b * \log_{10}(\text{dose}))$.

De acordo com a Tabela 11 os grupos 0 kGy e 0,01 kGy não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si, assim como os grupos 1 kGy e 15 kGy. Nas demais situações os grupos apresentam diferenças estatísticas entre si.

Tabela 11: Kruskal Wallis dos dados normalizados de módulo elástico.

	0 kGy	0,01 kGy	0,1 kGY	1 kGy	15 kGy	75 kGy
0 kGy	-	NS	*	*	*	*
0,01 kGy	NS	-	*	*	*	*
0,1 kGY	*	*	-	*	*	*
1 kGy	*	*	*	-	NS	*
15 kGy	*	*	*	NS	-	*
75 kGy	*	*	*	*	*	-

NS = Não significativo * = $p < 0,05$

A análise estatística dos dados de tangente de delta é apresentada na Tabela 12. É possível constatar que apesar das variações e possíveis tendências observadas nos valores relativos de tangente de delta, somente o grupo 75 kGy apresentou diferenças mais expressivas. Com exceção do grupo de 15 kGy, o grupo de 75 kGy apresentou diferenças estatisticamente significantes em relação a todos os demais grupos.

Tabela 12: Kruskal-Wallis dos dados normalizados de tangente de delta.

	0 kGy	0,01 kGy	0,1 kGY	1 kGy	15 kGy	75 kGy
0 kGy	-	NS	NS	NS	NS	*
0,01 kGy	NS	-	NS	NS	NS	*
0,1 kGY	NS	NS	-	NS	NS	*
1 kGy	NS	NS	NS	-	NS	*
15 kGy	NS	NS	NS	NS	-	NS
75 kGy	*	*	*	*	NS	-

NS = Não significativo * = $p < 0,05$

5.5. Correlação entre os dados espectroscópicos e as medidas de DMA

Na Tabela 13 são apresentados os resultados de coeficiente de correlação de Pearson da comparação das análises mecânicas e espectroscópicas.

As correlações que apresentaram resultados significantes ($p < 0,05$) foram a correlação da análise de amida III + colágeno / $\nu_{1,\nu 3} \text{ PO}_4^{3-}$ com tangente de delta e a correlação do 1/FWHM com o módulo elástico. A análise de amida III + colágeno / $\nu_{1,\nu 3} \text{ PO}_4^{3-}$ apresentou correlação fortemente positiva com a tangente de delta, com significância de 0,05. Já a análise de cristalinidade (1/FWHM) apresentou correlação fortemente negativa com o módulo elástico, com significância de 0,05.

Tabela 13: Coeficientes de correlação de Pearson ($p < 0,05$).

	Sub-bandas de Amida I	Amida I+II / $\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$	Amida III+colágeno / $\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$	Índice de Cristalinidade	1/FWHM
Módulo de elasticidade	0,15373*	-0,66212*	<u>0,80911⁺</u>	-0,67627*	-0,866256
Tangente de delta	0,58877*	-0,72282*	0,89753	-0,27778*	<u>-0,80206⁺</u>

* ($p > 0,06$) ⁺ ($p > 0,05$ e $p < 0,06$)

Apesar de apresentarem valor de p acima do estabelecido como estatisticamente significativo, as correlações Amida III + colágeno / $\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$ x Módulo elástico e 1/FWHM x Tangente de delta apresentaram valor de $p < 0,06$. As figuras abaixo apresentam os gráficos das correlações que exibiram valor de p menor que 0,1. Também estão expressos os valores de correlação de Pearson (r), coeficiente de determinação (R^2), e valor de significância (p) de cada correlação.

Figura 42: Correlação da análises 1/FWHM com o módulo elástico, apresentando os valores de correlação de Pearson (r), coeficiente de determinação (R^2), e valor de significância (p).

Figura 43: Correlação da análises $1/\text{FWHM}$ com a tangente de delta, apresentando os valores de correlação de Pearson (r), coeficiente de determinação (R^2), e valor de significância (p).

Figura 44: Correlação da análises amida III + Colágeno / $\nu_{1\nu 3}\text{PO}_4^{3-}$ com módulo elástico, apresentando os valores de correlação de Pearson (r), coeficiente de determinação (R^2), e valor de significância (p).

Figura 45: Correlação da análises amida III + Colágeno / $_{v1v3}PO_4^{3-}$ com a tangente de delta, apresentando os valores de correlação de Pearson (r), coeficiente de determinação (R^2), e valor de significância (p).

6. DISCUSSÃO

A espectroscopia FTIR já provou ser uma ferramenta muito útil na análise de alterações químicas nos componentes do tecido mineralizado [11], [12], [73], [90]. Em alguns destes estudos é possível encontrar diversas formas de análise dos vários compostos do tecido ósseo, principalmente os compostos amida I, carbonato e fosfato.

O DMA é uma técnica de análises estabelecidas para detectar alterações mecânicas no tecido mineralizado [8], [33], [95]. Neste estudo, foram avaliados o módulo de elasticidade e o valor de amortecimento do osso. Eles foram escolhidos por causa de sua relação com a matriz orgânica e inorgânica do osso [23], [26]. A partir destas informações correlacionou-se os resultados dos espectros de FTIR e de DMA.

A principal motivação deste estudo foi avaliar quais componentes do tecido ósseo são afetados pela radiação com intuito de fornecer informações para pesquisas envolvendo esterilização de tecido ósseo. Considerando o amplo uso da irradiação do gama na esterilização de tecidos duros, é importante conhecer as possíveis alterações químicas que ocorrem no tecido irradiado.

6.1. Ajuste de sub-bandas de amida I

A razão de sub-bandas de amida I (1660cm^{-1} : 1690cm^{-1}), de acordo com a literatura [11], [96], corresponde à relação de ligações cruzadas de colágeno maduras e imaturas no osso.

Como esperado, os resultados mostram que a radiação ionizante foi capaz de afetar os componentes orgânicos dos ossos [11], uma vez que houve diferença estatisticamente significativa do grupo controle em comparação com os grupos irradiados com 1 kGy e 15 kGy. Porém não foi possível estabelecer um ajuste para descrever matematicamente o comportamento deste parâmetro.

Considerando que a dose de 75 kGy, é a mais elevada utilizada neste estudo, esperava-se que, se uma dose mais baixa promovesse qualquer

alteração dos componentes orgânicos do tecido ósseo, mudanças semelhantes, com magnitude superior, também seriam detectadas no grupo irradiado com 75 kGy. No entanto, as análises ATR-FTIR mostram mudanças na matriz orgânica do osso promovido pelas doses 1 kGy e 10 kGy, e nenhuma mudança significativa em amostras irradiadas com 75 kGy foi observada.

6.2. Análise de cristalinidade

O índice de cristalinidade é calculado utilizando modos vibracionais específicos de fosfato e carbonato. Este parâmetro está relacionado com a organização da matriz de hidroxiapatita, como comentado anteriormente.

O resultado sugere que há uma diminuição do índice cristalino, até 0,1 kGy. No entanto, os valores retornam a um patamar próximo ao inicial para valores de dose maiores.

O método de $1/\text{FWHM}$ da banda de $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ utilizado neste estudo foi adaptado da técnica utilizada em espectroscopia Raman [91], [92]. No caso do espectro Raman a banda de $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ não está sobreposta com nenhuma outra banda, facilitando a medição de sua largura. No entanto, no espectro de infravermelho do osso, a bandas de $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ está sobreposta com a banda de $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$.

Observou-se que no gráfico deste método, a cristalinidade atinge seu menor valor em 0,01 kGy, a partir desta dose o valor retorna gradativamente a um valor estatisticamente semelhante ao grupo controle.

Assim como apresentado na análise de razão de sub-bandas de amida I, os dados obtidos de índice cristalino e $1/\text{FWHM}$ apresentaram um comportamento não linear e não exponencial. Os valores extremos (positivos ou negativos) nestes casos foram encontrados em valores de dose intermediários, diminuindo sua amplitude com o aumento da dose, às vezes a níveis próximos ao do grupo controle.

É interessante observar que em 75 kGy tanto a análise de índice cristalino como a análise de $1/\text{FWHM}$ apresentam aproximadamente os mesmo

valores relativos, indicando que houve alterações com aproximadamente a mesma magnitude.

Nesta região não há influência de bandas de água, o que descarta a influência da umidade sobre o comportamento observado nestas análises.

O teste de correlação entre o índice cristalino e a análise de $1/(\text{FWHM de } \nu_1\text{PO}_4^{3-})$ apontou uma correlação fraca entre as análises. O coeficiente de determinação foi de 9%.

6.3. Razão das áreas das bandas material orgânico e fosfato

Os dados apresentados na Figura 40 mostram que houve alterações na razão da área das bandas de amida e colágeno pelo fosfato, causadas pela radiação ionizante.

Há, de uma forma geral, um aumento da proporção amida I + amida II / $\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$ até 1 kGy. Em 15 kGy a relação se mantém relativamente estável, mas volta a crescer em 75 kGy, onde atinge seu maior valor. Apesar do gráfico da relação amida III + colágeno / $\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$ sugerir uma tendência crescente até 15 kGy, os dados de 0 kGy, 0,01 kGy, 0,1 kGy, 1 kGy e 15 kGy não apresentaram diferença estatística entre si. Somente o grupo de 15 kGy apresentou diferenças estatísticas em relação aos outros grupos.

Este tipo de análise é relevante, pois ambos os componentes representam os principais constituintes orgânicos do osso. Contudo esta técnica não pode ser interpretada de forma isolada, por se tratar de uma razão, por exemplo, uma taxa inalterada pode ser o resultado do fato de que não existe qualquer alteração em qualquer um dos componentes ou que há uma alteração proporcional em ambas.

O ajuste dos dados da razão da área sob as bandas de (amida I + II) e a área sob as bandas ($\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$) com a dose de radiação gama a qual foram submetidas as amostras, mostrou que a equação da Tabela 7 foi um bom meio de tentar reproduzir os resultados encontrados por esta análise

De acordo com a literatura a razão da banda de amida I pelo fosfato, é inversamente proporcional à densidade mineral óssea. O aumento nesta razão pode ser atribuído à um aumento nas chances de fratura óssea [59], [91].

Esta análise permitiu também verificar uma relação dose-efeito quando comparado com o grupo não irradiado, conforme mostra tabela 7. No melhor de nosso conhecimentos este é um resultado inédito na literatura e auxiliará futuros trabalhos relacionados à a compreensão dos efeitos da irradiação ionizante em tecidos ósseos.

6.4. DMA

Os dados mostram que tanto no módulo elástico como na tangente de delta, ocorreram mudanças causadas pela radiação ionizante. Observou-se também que estes dois parâmetros apresentaram padrão parecido, pois os gráficos normalizados das médias dos valores de cada parâmetro descrevem um formato semelhante. Apesar disto, os valores de tangente de delta revelam uma magnitude maior de alteração, indicando que as alterações químicas causadas pela radiação ionizante afetam, de forma mais expressiva, a capacidade de dissipação de energia mecânica. Em ambos os parâmetros fica evidente que a dose de 75 kGy causa maiores alterações ao tecido.

O ajuste dos dados apresentados na Tabela 10 mostrou que a equação encontrada teve boa correlação com os dados. O ajuste apresentou R^2 maior que 0,95, indicando que esta equação reproduz satisfatoriamente o comportamento do módulo elástico.

6.5. Correlação dos dados espectroscópicos com as medidas de DMA

As correlações que apresentaram melhores resultados foram a correlação da análise de amida III + colágeno / $\nu_{1,v3} \text{ PO}_4^{3-}$ com a tangente de delta e a correlação do 1/FWHM com o módulo elástico. Estas correlações

apresentaram valor absoluto de coeficiente (r) maior que 0,7, indicando forte correlação, e apresentaram significância de 5% ($p < 0,05$).

A análise de amida III + colágeno / $\nu_{1,\nu 3} \text{PO}_4^{3-}$ apresentou correlação fortemente positiva com tangente de delta com valor de p igual a 0,0152. Esta correlação corrobora a ideia de que as amidas desempenham importante papel na dissipação de energia mecânica.

Já análise de cristalinidade (1/FWHM) apresentou correlação fortemente negativa com o módulo elástico com valor de p igual ao 0,0256. Este dado sugere que a largura da banda $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$ possui uma relação proporcional ao módulo elástico do material.

Os parâmetros correlacionados amida III + colágeno / $\nu_{1,\nu 3} \text{PO}_4^{3-}$ x módulo elástico e 1/FWHM x tangente de delta, apresentaram forte correlação. Apesar de estarem fora da significância estabelecida, seus valores de p foram muito próximos dos aceitáveis (0,51 e 0,549) e não foram portanto descartados.

Estes dados indicam que os parâmetros, amida III + colágeno / $\nu_{1,\nu 3} \text{PO}_4^{3-}$ e 1/FWHM podem ser bons indicadores para alterações nas propriedades mecânicas do tecido ósseo

As correlações de amida I+II / $\nu_{1,\nu 3} \text{PO}_4^{3-}$ x tangente de delta, índice de cristalinidade x módulo elástico, 1 e sub-bandas de amida I x tangente de delta, apresentaram resultados interessantes, contudo estas correlações exibiram significância de menor que 6% e não devem ser descartadas.

6.6. Considerações gerais

A partir dos dados obtidos neste trabalho, foi possível observar que as técnicas de espectroscopia e análise mecânica, foram capazes de detectar alterações no tecido ósseo, causadas pelas doses de radiação ionizante propostas. Os dados indicam também que em ambas as técnicas, a radiação

ionizante afetou a estrutura tanto o material orgânico como o material inorgânico do osso.

Amida I+II / $\nu_{1,\nu 3} \text{PO}_4^{3-}$ e módulo elástico foram as análises que melhor tiveram seu comportamento em função da dose, descritos por equações.

As correlações entre as análises amida III + colágeno / $\nu_{1,\nu 3} \text{PO}_4^{3-}$ e 1/FWHM e módulo elástico, foram as análises espectroscópicas que apresentaram melhores resultados, com significância estatística de 5%, com relação à tangente de delta e ao módulo elástico. Se mostrando como possíveis indicadores de alterações nas propriedades mecânicas do osso.

Mais estudos poderão determinar a precisa relação dose-efeito, utilizando o osso como um marcador de dose e possivelmente processamentos como a Análise de Principais Componentes e análise de posição de bandas por segunda derivada serão úteis futuramente para complementar a informações adquiridas neste trabalho.

7. CONCLUSÕES

As técnicas de espectroscopia ATR-FTIR e análise dinâmico- mecânica mostraram ser ferramentas capazes de caracterizar as alterações do tecido ósseo irradiado. Com estas técnicas foi possível avaliar os efeitos de diferentes doses de radiação ionizante no osso. Na análise por espectroscopia ATR-FTIR, foram observadas mudanças nos componentes orgânicos, água e na organização cristalina do material inorgânico. Por meio da análise dinâmico-mecânica, foram observadas alterações no módulo elástico e no amortecimento da amostra.

As análises das áreas sob as bandas de (amida I + II) / $\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$ e de módulo elástico apresentaram comportamentos que melhor puderam ser ajustados por equações, sendo possível correlacioná-los com a dose utilizada para irradiar o tecido ósseo. As análises de áreas sob as bandas de (amida III + colágeno) / $\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$ e 1/FWHM da banda $\nu_{1,\nu_3} \text{PO}_4^{3-}$, apresentaram alto grau de correlação com o módulo elástico e com a tangente de delta respectivamente.

Os resultados deste trabalho permitem inferir que há relação dose-efeito no tecido ósseo detectável pelos métodos empregados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y. Nouailhetas, “Radiações Ionizantes e a Vida,” 2005. [Online]. Disponível em: http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad_ion.pdf.
- [2] O. Akkus, R. M. Belaney, and P. Das, “Free radical scavenging alleviates the biomechanical impairment of gamma radiation sterilized bone tissue.,” *J. Orthop. Res.*, vol. 23, no. 4, pp. 838–45, Jul. 2005.
- [3] A. Colwell, A. Hamer, A. Blumsohn, and R. Eastell, “To determine the effects of ultraviolet light, natural light and ionizing radiation on pyridinium cross-links in bone and urine using high-performance liquid chromatography,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 26, no. 12, pp. 1107–1114, Dec. 1996.
- [4] H. D. Barth, M. E. Launey, A. a Macdowell, J. W. Ager, and R. O. Ritchie, “On the effect of X-ray irradiation on the deformation and fracture behavior of human cortical bone.,” *Bone*, vol. 46, no. 6, pp. 1475–85, Jun. 2010.
- [5] D. T. Cheung, N. Perelman, D. Tong, and M. E. Nimni, “The effect of gamma-irradiation on collagen molecules, isolated alpha-chains, and crosslinked native fibers.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, no. 5, pp. 581–9, May 1990.
- [6] M. Anderson and J. Keyak, “Compressive mechanical properties of human cancellous bone after gamma irradiation,” *J. bone Jt. surgery.*, vol. 74, no. 5, pp. 747–752, Jun. 1992.
- [7] J. D. Currey, J. Foreman, I. Laketić, J. Mitchell, D. E. Pegg, and G. C. Reilly, “Effects of ionizing radiation on the mechanical properties of human bone.,” *J. Orthop. Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 111–7, Jan. 1997.
- [8] L. O. C. Kosmiskas, “Análise mecânica de réguas ósseas esterilizadas por radiação gama para uso em bancos de tecidos,” Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2007.
- [9] a Singhal, A. C. Deymier-Black, J. D. Almer, and D. C. Dunand, “Effect of high-energy X-ray doses on bone elastic properties and residual strains.,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 4, no. 8, pp. 1774–86, Nov. 2011.
- [10] A. C. Deymier-Black, A. Singhal, J. D. Almer, and D. C. Dunand, “Effect of X-ray irradiation on the elastic strain evolution in the mineral phase of bovine bone under creep and load-free conditions.,” *Acta Biomater.*, Aug. 2012.
- [11] H. D. Barth, E. a Zimmermann, E. Schaible, S. Y. Tang, T. Alliston, and R. O. Ritchie, “Characterization of the effects of x-ray irradiation on the hierarchical structure and mechanical properties of human cortical bone.,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 34, pp. 8892–904, Dec. 2011.
- [12] E. P. Paschalis, K. Verdelis, S. B. Doty, a L. Boskey, R. Mendelsohn, and M. Yamauchi, “Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone.,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 16, no. 10, pp. 1821–8, Oct. 2001.

- [13] L. C. U. Junqueira and J. Carneiro, *Histologia básica*, 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 540.
- [14] J. D. S. R. Neto, "Hidroxiapatita Sintética Nanoestruturada E Esmalte Dental Aquecidos E Irradiados Por Laser De Er,Cr:Ysgg. Caracterização Por Ftir E Por Drx.," Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.
- [15] T. White, "Apatite - An Adaptive Framework Structure," *Rev. Mineral. Geochemistry*, vol. 57, no. 1, pp. 307–401, Jan. 2005.
- [16] T. Batista, "Mineralização in vitro de matrizes de colágeno aniônico derivadas de tecidos biológicos," 2011.
- [17] L. Kubisz and M. Połomska, "FT NIR Raman studies on gamma-irradiated bone.," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 66, no. 3, pp. 616–25, Mar. 2007.
- [18] A. J. Bailey, R. G. Paul, and L. Knott, "Mechanisms of maturation and ageing of collagen," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 106, no. 1–2, pp. 1–56, Dec. 1998.
- [19] M. J. Buehler, "Molecular architecture of collagen fibrils: A critical length scale for tough fibrils," *Curr. Appl. Phys.*, vol. 8, no. 3–4, pp. 440–442, May 2008.
- [20] D. Eyre and J. Wu, "Collagen cross-links," in *Collagen*, 2005, pp. 207–229.
- [21] M. P. Barbosa, "UFMG - Principios de Bioengenharia - biomecânica," 2007. [Online]. Disponível em: <http://www.demec.ufmg.br/Grupos/Labbio/Biomecanica.pdf>.
- [22] J. Diniz and V. Dionísio, "Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica," in *V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação*, 2005.
- [23] P. Fratz, "Collagen Structure and Mechanics." 2008.
- [24] J. P. L. Santos, "Análise De Modelos Reológicos Viscoelásticos Através De Formulações Mistas Em Elementos Finitos," 2008.
- [25] R. Puxkandl, I. Zizak, O. Paris, J. Keckes, W. Tesch, S. Bernstorff, P. Purslow, and P. Fratzl, "Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation investigations and structural model.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 357, no. 1418, pp. 191–7, Feb. 2002.
- [26] P. Roschger, E. P. Paschalis, P. Fratzl, and K. Klaushofer, "Bone mineralization density distribution in health and disease.," *Bone*, vol. 42, no. 3, pp. 456–66, Mar. 2008.
- [27] P. Downey and M. Siegel, "Bone biology and the clinical implications for osteoporosis," *Phys. Ther.*, 2006.
- [28] S. Gasiorowicz, *Quantum Physics*, 3rd ed. 2003.
- [29] E. Okuno and E. Yoshimura, "Física das radiações," *Ed. Of. Textos, São Paulo*, 2010.

- [30] M. H. Niemz, *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*, Third. Springer, 2007.
- [31] R. K. Hobbie and B. J. Roth, *Intermediate Physics for Medicine and Biology*. 2007.
- [32] H. E. Johns and J. R. Cunningham, *The physics of radiology*, 4th ed. Springfield: Charles C. Thomas Springfield, IL, 1983, pp. 77–85.
- [33] A. L. Oliveira, J. F. Mano, J. S. Román, and R. L. Reis, “Study of the influence of beta-radiation on the properties and mineralization of different starch-based biomaterials,” *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 74, no. 1, pp. 560–9, Jul. 2005.
- [34] L. Tauhata, P. Salati, R. Di Prinzio, and A. Di Prinzio, “Radioproteção e dosimetria: fundamentos,” 2003.
- [35] G. Knoll, *Radiation detection and measurement*. 2010.
- [36] PUC-SP, “Interação da radiação com a matéria no radiodiagnóstico– Parte 2,” 2010. [Online]. Disponível em: <http://ensinodefisicamedica.blogspot.com.br/2010/12/compreendendo-os-tipos-de-interacoes-da.html>. [Accessed: 05-Feb-2013].
- [37] PUC-SP, “IRM: Radiações ionizantes e não ionizantes.” 2012. [Online]. Disponível em: <http://sobreafisicamedica.blogspot.com.br/2012/05/irm-radiacoes-ionizantes-e-nao.html>. [Accessed: 04-May-2013].
- [38] O. Sala, *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*, 2 ed. São Paulo: Unesp, 2008, pp. 10–34.
- [39] D. A. Skoog, F. J. Holler, and T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*. 1998.
- [40] C. Benetti, “Estudo in-vitro dos efeitos do laser de Er , Cr : YSGG em tecido ósseo por espectroscopia ATR-FTIR.” *pelicano.ipen.br*, 2010.
- [41] R. Ando, “Espectroscopia vibracional, Raman ressonante e eletrônica de nitroderivados em sistemas conjugados,” Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- [42] R. Silverstein and F. Webster, *Spectrometric identification of organic compounds*. John Wiley & Sons, 2006.
- [43] CEDERJ, “Aula 15 - O oscilador harmonico.” [Online]. Disponível em: <http://www.fing.edu.uy/if/cursos/fismod/cederj/aula15.pdf>. [Accessed: 20-Apr-2013].
- [44] O. Sala, “I2: uma molécula didática,” *Quim. Nova*, vol. 31, no. 4, pp. 914–920, 2008.
- [45] M. C. Amendola, “Algoritmo Genético E Espectroscopia No Infravermelho – Algumas Aplicações Na Indústria Cosmética,” Universidade de São Paulo, 2007.

- [46] “Aula 10 - Ensinoadistancia.pro.br - O oscilador harmônico.” [Online]. Disponível em: <http://ensinoadistancia.pro.br/EaD/QQ/aula-10/aula-10.htm>.
- [47] L. B. M. Guidolin, “Caracterização bioquímica de células sadias e neoplásicas através de espectroscopia vibracional,” 2009.
- [48] L. Carolei, “Determinação de surfactantes e água em formulações de sabonetes líquidos e shampoos por infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR).,” Universidade De São Paulo, 2005.
- [49] UFES - CEUNES, “Introdução à espectroscopia no infravermelho.” [Online]. Disponível em: [http://www.ceunes.ufes.br/downloads/2/acotta-AULA 4 Introdu%C3%A7%C3%A3o %C3%A0 Espectrometria no Infravermelho.pdf](http://www.ceunes.ufes.br/downloads/2/acotta-AULA%204%20Introdu%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A0%20Espectrometria%20no%20Infravermelho.pdf). [Accessed: 12-Nov-2012].
- [50] K. Z. Leal, “Introdução a Espectroscopia Vibracional,” 2009. [Online]. Disponível em: <http://www.uff.br/fisicoquimica/docentes/katialeal/didatico/Capitulo4.pdf>. [Accessed: 06-Jun-2013].
- [51] D. L. Pavia, G. N. Lampman, G. S. Kriz, and J. R. Vyvyan, *Introdução à espectroscopia*. Bellingham, Washington, 2010.
- [52] B. Stuart, *Biological applications of infrared spectroscopy*. Chichester, England: John Wiley & Sons, 1997.
- [53] Thermo Scientific, “Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry,” 2001.
- [54] O. L. Alves, “Espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier: Feliz combinação de velhos conhecimentos de óptica, matemática e informática.” Unicamp, Campinas, 2009.
- [55] PIKE Technologies, “ATR – Theory and Applications,” 2011. [Online]. Disponível em: <http://www.piketech.com/files/pdfs/ATRAN611.pdf>.
- [56] K. K. Jena, D. K. Chattopadhyay, and K. V. S. N. Raju, “Synthesis and characterization of hyperbranched polyurethane–urea coatings,” *Eur. Polym. J.*, vol. 43, no. 5, pp. 1825–1837, 2007.
- [57] L. Bachmann, R. Diebold, R. Hibst, and D. M. Zezell, “Infrared Absorption Bands of Enamel and Dentin Tissues from Human and Bovine Teeth,” *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 38, no. 1, pp. 1–14, Mar. 2003.
- [58] C. Chadeaux and A. Le Hô, “Curve-fitting micro-atr-ftir studies of the amide i and ii bands of type i collagen in archaeological bone materials,” *e-PRESERVATION ...*, 2009.
- [59] E. P. Paschalis, R. Mendelsohn, and A. L. Boskey, “Infrared assessment of bone quality: a review.” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 469, no. 8, pp. 2170–8, Aug. 2011.

- [60] Z. Movasaghi, S. Rehman, and D. I. ur Rehman, "Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 43, no. 2, pp. 134–179, Feb. 2008.
- [61] A. Alvarez-Ordóñez, D. J. M. Mouwen, M. López, and M. Prieto, "Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to characterize molecular composition and stress response in foodborne pathogenic bacteria," *J. Microbiol. Methods*, vol. 84, no. 3, pp. 369–78, Mar. 2011.
- [62] D. Helm, "Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 126, no. 1, pp. 75–79, Feb. 1995.
- [63] E. P. Paschalis, R. Recker, E. DiCarlo, S. B. Doty, E. Atti, and A. L. Boskey, "Distribution of collagen cross-links in normal human trabecular bone," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 18, no. 11, pp. 1942–6, Nov. 2003.
- [64] E. P. Paschalis, "Fourier transform infrared analysis and bone," *Osteoporos. Int.*, vol. 20, no. 6, pp. 1043–7, Jun. 2009.
- [65] J. D. Fredericks, P. Bennett, A. Williams, and K. D. Rogers, "FTIR spectroscopy: A new diagnostic tool to aid DNA analysis from heated bone," *Forensic Sci. Int. Genet.*, vol. 6, no. 3, pp. 375–80, May 2012.
- [66] W. Liao, F. Wei, D. Liu, M. X. Qian, G. Yuan, and X. S. Zhao, "FTIR-ATR detection of proteins and small molecules through DNA conjugation," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 114, no. 1, pp. 445–450, Mar. 2006.
- [67] A. Boskey and R. Mendelsohn, "Infrared analysis of bone in health and disease," *J. Biomed. Opt.*, vol. 10, no. 3, p. 031102, 2005.
- [68] J. D. Termine and A. S. Posner, "Infrared Analysis of Rat Bone: Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions," *Science (80-.)*, vol. 153, no. 3743, pp. 1523–1525, Sep. 1966.
- [69] T. J. U. Thompson, M. Islam, and M. Bonniere, "A new statistical approach for determining the crystallinity of heat-altered bone mineral from FTIR spectra," *J. Archaeol. Sci.*, vol. 40, no. 1, pp. 416–422, Jan. 2013.
- [70] L. Bachmann and D. M. Zezell, *Estrutura e Composição do Esmalte e da Dentina - Tratamento Térmico e Irradiação Laser*. São Paulo, SP: Livraria da Física, 2005.
- [71] A. L. Boskey, L. Spevak, E. Paschalis, S. B. Doty, and M. D. McKee, "Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 71, no. 2, pp. 145–54, Aug. 2002.
- [72] D. Faibish, A. Gomes, G. Boivin, I. Binderman, and A. Boskey, "Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia," *Bone*, vol. 36, no. 1, pp. 6–12, Jan. 2005.
- [73] A. L. Boskey, E. DiCarlo, E. Paschalis, P. West, and R. Mendelsohn, "Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high- and

low-turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation.," *Osteoporos. Int.*, vol. 16, no. 12, pp. 2031–8, Dec. 2005.

- [74] A. L. Boskey and R. Mendelsohn, "Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues.," *Vib. Spectrosc.*, vol. 38, no. 1–2, pp. 107–114, Jul. 2005.
- [75] S. Gourion-Arsiquaud, L. Lukashova, J. Power, N. Loveridge, J. Reeve, and A. L. Boskey, "Fourier transformed infra-red imaging of femoral neck bone: Reduced heterogeneity of mineral-to-matrix and carbonate-to-phosphate and more variable crystallinity in treatment-naïve fracture cases compared to fracture-free controls.," *J. Bone Miner. Res.*, Aug. 2012.
- [76] L. Bachmann, A. S. L. Gomes, and D. M. Zezell, "Collagen absorption bands in heated and rehydrated dentine.," *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 62, no. 4–5, pp. 1045–9, Dec. 2005.
- [77] K. Menard and B. Bilyeu, "Dynamic Mechanical Analysis of Polymers and Rubbers," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2008.
- [78] UFRGS – DEMET, "4-3 Módulo de elasticidade ou de Young." [Online]. Disponível em: <http://www.ct.ufrgs.br/ntcm/graduacao/ENG06638/IEM-Texto-4.pdf>.
- [79] E. Garner, R. Lakes, T. Lee, C. Swan, and R. Brand, "Viscoelastic Dissipation in Compact Bone: Implications for Stress-Induced Fluid Flow in Bone," *J. Biomech. Eng.*, vol. 122, no. 2, p. 166, 2000.
- [80] G. Poumarat and P. Squire, "Comparison of mechanical properties of human, bovine bone and a new processed bone xenograft," *Biomaterials*, vol. 14, no. 5, pp. 337–340, Apr. 1993.
- [81] J. R. Mellberg, "Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ.," *J. Dent. Res.*, vol. 71 Spec No, pp. 913–9, Apr. 1992.
- [82] C. A. DePaula, K. G. Truncale, A. A. Gertzman, M. H. Sunwoo, and M. G. Dunn, "Effects of hydrogen peroxide cleaning procedures on bone graft osteoinductivity and mechanical properties.," *Cell Tissue Bank.*, vol. 6, no. 4, pp. 287–98, Jan. 2005.
- [83] L. S. Mendes, F. C. C. Oliveira, P. A. Z. Suarez, and J. C. Rubim, "Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-near infrared and FT-Raman spectrometries," *Anal. Chim. Acta*, vol. 493, no. 2, pp. 219–231, Oct. 2003.
- [84] N. Tarcea and J. Popp, "Raman Data Analysis," 2012.
- [85] P. A. Gorry, "General Least-Squares Smoothing and Differentiation by the Convolution (Savitzky-Golay) Method," *Anal. Chem.*, vol. 62, pp. 570–573, 1989.
- [86] S. Aparicio, S. B. Doty, N. P. Camacho, E. P. Paschalis, L. Spevak, R. Mendelsohn, and A. L. Boskey, "Optimal methods for processing mineralized tissues for Fourier transform infrared microspectroscopy.," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 70, no. 5, pp. 422–9, May 2002.

- [87] B. de C. Vidal and M. L. S. Mello, "Collagen type I amide I band infrared spectroscopy," *Micron*, vol. 42, no. 3, pp. 283–9, Apr. 2011.
- [88] A. Bailey, D. Rhodes, and C. Cater, "Irradiation-induced crosslinking of collagen," *Radiat. Res.*, vol. 22, no. 4, pp. 606–621, 1964.
- [89] S. Weiner and O. Bar-Yosef, "States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey," *J. Archaeol. Sci.*, vol. 17, no. 2, pp. 187–196, Mar. 1990.
- [90] T. A. Surovell and M. C. Stiner, "Standardizing Infrared Measures of Bone Mineral Crystallinity: an Experimental Approach," *J. Archaeol. Sci.*, vol. 28, no. 6, pp. 633–642, Jun. 2001.
- [91] S. Gourion-Arsiquaud, J. C. Burket, L. M. Havill, E. DiCarlo, S. B. Doty, R. Mendelsohn, M. C. H. van der Meulen, and A. L. Boskey, "Spatial variation in osteonal bone properties relative to tissue and animal age.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 24, no. 7, pp. 1271–81, Jul. 2009.
- [92] J. J. Freeman, B. Wopenka, M. J. Silva, and J. D. Pasteris, "Raman spectroscopic detection of changes in bioapatite in mouse femora as a function of age and in vitro fluoride treatment.," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 68, no. 3, pp. 156–62, Mar. 2001.
- [93] H. Susi and M. Byler, "Protein Structure By Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Second Derivative Spectra," pp. 391–397, 1983.
- [94] L. Forato, R. B. Filho, and L. Colnago, "Estudo de métodos de aumento de resolução de espectros de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas," *Quim. Nova*, 1997.
- [95] A. A. Abdel-Wahab, K. Alam, and V. V Silberschmidt, "Analysis of anisotropic viscoelastoplastic properties of cortical bone tissues.," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 4, no. 5, pp. 807–20, Jul. 2011.
- [96] E. Paschalis and E. Shane, "Bone Fragility and Collagen CrossLinks," *J. Bone* , 2004.