

SAMA MADDALON ORTIZ

Alterações estruturais do osso humano queimado: estudo experimental da influência da temperatura na cor, massa, cristalinidade, morfologia e composição elementar visando a aplicação arqueológica

Monografia apresentada à banca examinadora do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo – IFSC/USP – como requisito para a obtenção de título de Bacharela em Física Computacional.

Orientador: Prof.^o Dr. Carlos Celestino Rios e Souza,
UFPE

Coorientador: Prof.^o Dr. Henry Sócrates Lavalle Sullasi,
UFPE

São Carlos

2021

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

Resumo

A pesquisa objetiva descrever o efeito da temperatura na queima de um osso humano (fêmur) a partir das alterações da macro e microestrutura, visando uma aplicação arqueológica. Para isso, 11 amostras de ~8g do mesmo osso foram aquecidas à 105 a 1100 °C, por 2h consecutivas em rampa de 10 °/min, e analisadas em termos cristalográficos sob viés do índice de cristalinidade (CI) obtido por difração de raio X de pó (DRX-p), associado aos dados das análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS), bem como à caracterização macroscópica referente ao encolhimento, variação da massa e da cor de cada amostra. Para testar a aplicabilidade arqueológica, três fragmentos ósseos cremados (duas ulnas e um fêmur) do sítio Alcobaça-PE foram analisados nos mesmos parâmetros. O CI falhou no cumprimento do objetivo, enquanto a relação das outras análises pôde descrever as etapas de queima em termos das faixas de temperatura de ocorrência. A estimativa da temperatura de queima de cada amostras arqueológica, no entanto, apesar de coerente com o esperado pela literatura, não foi conclusiva, requerendo novas técnicas ou maior número de amostragem, a fim de uma abordagem estatística.

Palavras-chave: Osso. Difração de Raio X de pó. CI. Queima.

1. Introdução

1.1. Motivo da pesquisa

O esqueleto humano como vestígio arqueológico tem vasto potencial informativo a respeito do homem em seu meio social e ambiental, sendo base para formular questões mais complexas sobre o modo de vida, comportamento e paleoambientes circundantes de antigas populações (Davoglio, 2021). Neste sentido, a Bioarqueologia¹ direciona esforços para a obtenção de dados básicos individuais e sociais, tais como: sexo, idade, estatura, ancestralidade, alterações dentárias, número de indivíduos e interferências antropológicas, que incluem marcas culturais ou traços tafonômicos a partir dos remanescentes biológicos humanos (Davoglio, 2021).

Uma vez que a condição de preservação do esqueleto está intimamente relacionada às práticas funerárias, surgem problemas de pesquisa que exigem abordagens e técnicas diferenciadas. É o caso dos remanescentes de processos de queima relacionados ao ciclo funerário (Thompson et al., 2016). Seja a causa accidental ou proposital, por incêndio, incineração, rituais mortuários ou práticas

¹ Bioarqueologia é o estudo científico de restos humanos de sítios arqueológicos (Buikstra, 1977).

antropofágicas, o calor afeta a estrutura óssea em escala macro e microscópica (Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014). A descrição precisa das alterações estruturais, por sua vez, são dificultadas pelo grande número de parâmetros que influenciam a queima, como a temperatura (McKinnon et al., 2020; Shipman; Foster; Schoeningers, 1984; Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014), tempo de exposição (Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014; Walker; Miller; Richman, 2008), intensidade (Davoglio, 2021), características osteológicas (Symes et al., 2015), presença de tecidos moles ou de outros compostos químicos, como água, gorduras e diferentes tipos de sedimentos que podem compor o ambiente onde o osso se insere no momento da queima (Walker; Miller; Richman, 2008).

A princípio, devido a descaracterização morfológica, atribuía-se aos ossos cremados um baixo potencial de análise pela osteologia tradicional (Thompson et al., 2016). Esse problema incentivou a busca por novas abordagens, que deram partida a uma série de estudos experimentais visando qualificar a queima através da observação da cor, das fraturas, fissuras e alterações volumétricas (Davoglio, 2021; Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014; Thompson et al., 2016). No âmbito físico-químico, alterações na microestrutura do osso foram avaliadas a partir de relações e índices obtidos com o uso de técnicas diversas de difração e espectroscopia (Beasley et al., 2014; Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014; Sullasi et al., 2018), em particular, alterações na cristalinidade², observadas sob o viés do índice de cristalinidade (CI)³.

Nesse contexto, a problemática deste trabalho deriva de uma pergunta: é possível reconstruir o processo de queima de um osso arqueológico cremado através das suas características macro e microscópicas? A resposta a este questionamento emergirá junto com a compreensão das alterações do osso humano induzidas pelo aquecimento, considerando todos os parâmetros que afetam o processo. Assim, minimizando as variáveis, esta pesquisa investigará, em particular, como a temperatura de queima em condições controladas em laboratório afeta a estrutura de um osso humano.

²A cristalinidade é um indicador da ordem atômica e estrutural de um cristal. A baixa cristalinidade está associada à presença de cristais menores - consequentemente uma maior área de superfície - além de altos níveis de tensão e irregularidades na rede (Thompson, 2015).

³O CI é um valor arbitrário que reflete a combinação entre os tamanho relativos dos cristais e a ordem atômica dentro da rede cristalina (Weiner e Bar-Yosef, 1990). No caso de ossos queimados, espera-se que o índice tenha uma relação diretamente proporcional com a temperatura de queima, fazendo dele um indicador promissor da mesma. Uma forma de calcular o CI a partir da técnica de DRX-p é proposta por Person et al. (1995).

1.2. Dos objetivos

Mediante justificativa, esta pesquisa tem por objetivo geral compreender e descrever o efeito do aquecimento de um osso humano (fêmur) a partir de alterações da estrutura cristalina sob viés do CI, aliado às análises da morfologia estrutural, composição elementar e características macroscópicas, considerando exclusivamente a variável de temperatura e mantendo constante os demais parâmetros de queima.

A realização do trabalho seguiu conforme o cumprimento dos objetivos específicos: i) entender a estrutura dos ossos humanos, com foco na sua parte inorgânica; ii) Induzir a queima de osso humano moderno controlada em laboratório em diferentes temperaturas; iii) submeter as amostras à difração de raio X para obter uma identidade cristalográfica, assim como a outras análises para investigar as características macro e microscópicas; iv) verificar aplicabilidade no campo da Arqueologia.

2. Fundamentação teórica

2.1. Composição do osso

O osso é um tecido heterogêneo, complexo, vivo e em constante mudança (Buckwalter e Cooper, 1987), composto por fosfatos de cálcio precipitados em matriz de colágeno (Santos e Sullasi, 2016). Através da rigidez associada ao fosfato de cálcio e da flexibilidade associada ao colágeno, o osso desempenha funções vitais no corpo, que incluem locomoção, estruturação, função motora, proteção de órgãos e abrigo da medula óssea (Florencio-Silva et al., 2015). Em valores aproximados, a fase mineral corresponde a 60% da massa do osso fresco, chegando a 70% no osso seco, 25% são atribuídos à fase orgânica, 9,7% à água e 5,8% a carbonatos. (Wang et al., 2010).

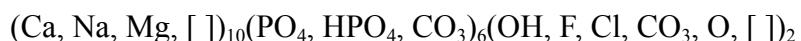
O mineral dominante do osso é um fosfato de cálcio do grupo das apatitas⁴ muito semelhante à Hidroxiapatita⁵ (HA) com grupos de carbonato (CO_3^{2-}) substituindo parcialmente os fosfatos (PO_4^{3-}), ou mais raramente as hidroxilas (HO^-) (Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014). Devido a sua forte associação com a atividade biológica, esse mineral altamente reativo é chamado de bioapatita, com fórmula aproximada por $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-y}(\text{CO}_3^{2-})_{x+y}$, e é pouco cristalino quando comparado

⁴O termo apatita designa os minerais cristalinos com composição genérica $\text{M}_{10}(\text{ZO}_4)_6\text{X}_2$ (LeGeros, 1991).

⁵A hidroxiapatita é o fosfato de cálcio sintético de ocorrência natural. Possui fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, simetria hexagonal, hábito cristalino a = 9,422 Å, grupo espacial P63/m e Ca/Pa = 1,67 (LeGeros, 1991).

a HA (Mamede et al., 2017). Sua simetria é hexagonal - característica geral das apatitas - estruturada a partir de uma base vertical de ânions tetraédricos, neste caso o grupo PO_4^{3-} (Skinner, 2005), com seus cristais em formato de placa⁶ localizados nas lacunas de ~40 nm entre as fibras de colágeno (Berna; Mathews; Weiner, 2004; Thompson, 2015).

Os carbonatos são produzidos abundantemente durante o metabolismo celular e podem ser absorvidos pela extensa superfície dos pequenos cristalitos da bioapatita (Skinner, 2005). Por ser um grupo com carga e geometria - trigonal plana - diferente dos fosfatos e ser muito maior que as hidroxilas, com 0.24 nm de diâmetro, a presença dos grupos CO_3^{2-} na rede cristalina pode desestabilizar a estrutura e comprometer a arquitetura ideal da apatita (Skinner, 2005), contribuindo com a baixa cristalinidade do mineral e facilitando a incorporação de outros elementos, como água e íons (Ca^{2+} , Na^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , K^+ , F^- , Cl^-), ao cristal (Mamede et al., 2017; Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014). Em si considerando isso, a fórmula aproximada geral da bioapatita, contendo vácuos, é descrita por Skinner (2005):



Os diferentes tipos de água presentes no tecido ósseo também contribuem para a complexidade da estrutura. *In vitam*, a interação da água com o colágeno e o mineral ósseo é essencial para o funcionamento mecânico do osso e no cenário *post mortem*, cada tipo necessita de uma quantidade de energia diferente para ser removida da estrutura, na seguinte ordem crescente: água livre; água ligada à superfície do colágeno; água presa dentro das moléculas de colágeno; água cristalina ligada à superfície da apatita óssea; água cristalina agregada à rede da apatita; e a água estrutural, que forma ligações de hidrogênio dentro da hélice tripla das moléculas de colágeno (Wang et al., 2010). Uma caracterização mais precisa da presença da água no osso é descrita a partir de técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR) por alguns autores, como Wilson et al. (2006), Q Ni et al. (2007), e Nyman et al. (2008).

A proporção exata individual dos constituintes do tecido ósseo depende da dieta, metabolismo, patologia, idade da morte do indivíduo e tafonomia (Mamede et al., 2017). Apesar da identificação

⁶A HA carbonatada sintética também tem cristais em formato de placa, ligeiramente maiores e menos alongados. Assim, a matriz de colágeno que envolve os cristais ósseos não é a única responsável pelo seu formato. Uma hipótese é que a apatita do osso não seja inicialmente a HA, mas o fosfato de octacálcio, que é muito semelhante a HA e possui naturalmente formato de placa (Beasley et al., 2014).

de cada componente, bem como do tipo de água presente na estrutura óssea não ser o foco desta pesquisa, sua influência cristalográfica deve ser levada em conta.

2.2. Diagênese e processo de queima

Em razão da alta reatividade da bioapatita, a cristalinidade do osso sofre grande influência da diagênese⁷ (Thompson, 2015). O mineral ósseo é termodinamicamente metaestável e os inibidores de crescimento do cristal regulam a estrutura óssea durante a vida (Beasley et al., 2014). Embora não seja consensual a identidade dos agentes inibidores, é verificado que na medida em que a fase orgânica é decomposta, concomitantemente com a perda de água e carbonato, ocorre a recristalização espontânea: cristais de apatita maiores e mais estáveis se formam em detrimento dos menores (Berna; Mathews; Weiner, 2004). Este processo ocorre naturalmente após a morte do indivíduo⁸, mas pode ser acelerado significativamente pela queima do material (Santos e Sullasi, 2016).

Assim como na diagênese, cada componente do osso é afetado de forma diferente durante a queima. Segundo Etok et al. (2007), a água livre e superficial evapora até 100 °C, e a água estrutural até 250 °C. Entre 225 e 500 °C, uma primeira fração dos carbonatos é perdida em decorrência da combustão de cerca de 50% da fase orgânica; ao mesmo tempo, o cristal aumenta (de 10 a 30 nm de tamanho e de 2 a 9 nm de espessura), e novos minerais se formam (NaCaPO_4 , NaCl e KCl) (Mamede et al., 2017); nessas temperaturas mais baixas de queima, os ossos apresentam cores escuras (preto, marrom escuro ou cinza escuro) indicando carbonização (Mamede et al., 2017). Acima de 500 °C, a matéria orgânica remanescente é decomposta, levando à perda dos carbonatos estruturais e secundários, e, por último, dos carbonatos substitutos que compõem a bioapatita (Etok et al., 2007; Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014). Nessas temperaturas os ossos assumem cores mais claras progressivamente (cinza claro e branco), podendo apresentar linhas ou manchas laranjas, brancas, azuis, amarelas ou cinzas, indicando a calcinação do osso. Acima de 1000 °C, o fosfato β -tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) se forma na estrutura. A estrutura cristalina só é afetada acima de 500 °C, quando o efeito de blindagem térmica é anulado pela decomposição da matriz orgânica, deixando a superfície dos cristais exposta (Mamede et al., 2017).

⁷A diagênese engloba o período que inicia quando os restos do organismo são inumados, passando a sofrer alterações microscópicas induzidas pela sua interação com águas subterrâneas, sais minerais, atividade bioquímica presentes no solo etc (Santos e Sullasi, 2016).

⁸ A diagênese é afetada por ataque microbiano, alterações de temperatura, umidade, hidrologia, pH, composição do solo e intempéries (Beasley et al., 2014).

Thompson (2004) resume o processo de queima em ossos em quatro estágios, alguns dos citados por Shepard (1956, p. 28) para minerais em cerâmicas, apresentando a faixa de temperatura e evidências correspondentes: i) desidratação (100 - 600 °C), ocorre surgimento de rachaduras e perda de massa; ii) decomposição (300 - 800 °C), acompanha mudança de cor, perda de massa, redução da resistência mecânica e aumento da porosidade; iii) inversão (500 - 1100 °C), ocorre aumento do tamanho do cristal; e iv) fusão (> 700 °C), ocorre aumento da resistência mecânica, encolhimento da estrutura, aumento do tamanho do cristal e mudanças na porosidade.

A temperatura de queima não é o único parâmetro que define a calcinação: também são relevantes o tempo, o tamanho e o tipo dos fragmentos ósseos escolhidos para as queimas experimentais. Isto justifica a falta de consenso da literatura a respeito da temperatura de ocorrência do fenômeno (que varia de 600 a 725 °C), uma vez que não há padronização na definição dos parâmetros (Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014). A concentração de carbonato no osso calcinado diminui para 0,5 a 1% em relação ao osso fresco, sendo que dos restantes, uma fração significativa não é endógena, e sim originada da atmosfera de combustão. Assim, embora o osso calcinado seja mais cristalino que o osso fresco e, portanto, mais resistente à diagênese, o impacto do ambiente de sepultamento na composição e estrutura de fragmentos ósseos cremados ainda não foi investigado (Snoeck; Lee-Thorp; Schulting, 2014).

3. Metodologia

3.1. Objetos de estudo

Da parte do central do corpo de um fêmur humano moderno fresco (Figura 1 (a)), de um indivíduo adulto do gênero masculino, foram obtidas 12 amostras a partir de cortes transversais de aproximadamente 0.9 cm de espessura, 2.8 cm de diâmetro externo e 1.3 de diâmetro interno, com peso médio de 7.8 gramas (Figura 1 (b)).

Figura 1 - a) Osso inteiro com escala; b) corte transversal em largura e em diâmetro (com valor apontado em X (menor e maior distância), desenhados na foto), com escala.



Fonte: A autora.

3.2. Procedimento experimental: simulação das queimas

Onze amostras do osso moderno foram queimadas em um forno mufla microprocessado digital EDG 3000, em etapas individuais em rampa de 10 °C/min durante 2 horas, contadas a partir da estabilização da temperatura interna. As temperaturas de queima experimentadas foram 105, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 e 1100 °C. Todas as amostras foram queimadas no ar dentro de cadinhos de porcelana e resfriadas no forno desligado até a estabilização da temperatura (~ 36 °C). Uma amostra foi mantida inalterada para referencial do osso fresco.

3.3. Avaliação dos parâmetros associados ao processo de queima

O efeito do aquecimento do fêmur humano foi analisado sobre aspectos macroscópicos: encolhimento, variação de massa, cor, presença de rachaduras e fissuras, porosidade e resistência mecânica; e microscópios: alterações na estrutura cristalina, morfologia estrutural e caracterização química semiquantitativa.

3.3.1. Avaliação macroscópica

A massa de cada amostra foi medida antes e depois das queimas, com uma balança digital de precisão 0,1 g (marca Coleman, modelo BN 1200), com o intuito de obter a variação relativa. O encolhimento considerou a variação da área de superfície do diâmetro externo de uma das faces das amostras, medido através das fotografias com escala, usando o software AutoCAD. As cores foram definidas com um colorímetro (ColourPin) na escala NCS (Natural Colour System) 1950. Além desses, a presença de rachaduras e fissuras foi averiguada por inspeção visual, e a porosidade e resistência, por teste mecânico manual (trituração).

3.3.2. Morfologia estrutural e caracterização química

Com base nos dados macroscópicos, sete dentre as doze amostras foram escolhidas para uma análise da morfologia estrutural: osso fresco, osso queimado a 300, 600, 700, 800, 900 e 1100 °C. O microscópio eletrônico de varredura MEV (Tescan Mira 3), com SEM HV: 15 kV, fotografou as amostras com aumento de 5.000 a 50.000 x, registrando imagens com campo de visão da ordem de até 1 µm. Um espectrômetro por energia dispersiva EDS (X-act, Oxford instruments) atuou acoplado ao MEV e realizou a análise semiquantitativa da composição elementar do osso⁹. A face analisada corresponde ao plano perpendicular ao corte inicial, obtida com a quebra de cada amostra.

3.3.3. Estrutura Cristalina

A técnica de difração de raio X de pó (DRX-p) foi usada para a obtenção do difratograma de raio X e posterior cálculo do CI. As amostras foram trituradas manualmente com almofariz e pistilo de cerâmica até a amostra alcançar granulação inferior a 106 µm (diâmetro da abertura da peneira) e armazenadas em frascos à temperatura ambiente até a ulterior análise. Foi utilizado o difratômetro Shimadzu (XRD-7000) com radiação CuK_α ($\lambda = 0,15418$), sob os parâmetros de 40 kV e 30 mA, de 10° a 60° em modo *scan* contínuo a velocidade de 5 °/min, passo de 0,02° e *scan axis* 2θ. A partir do difratograma, o software *Origin* foi usado para calcular o CI.

Seguindo o proposto por Person et al. (1995), o CI é medido considerando os picos entre 30 e 35° do ângulo 2θ:

$$CI = \frac{a(202) + b(300) + c(112)}{h(211)}$$

Onde *a*, *b* e *c* representam a diferença entre a intensidade máxima dos respectivos picos e o mínimo do vale do pico seguinte, e *h* a intensidade máxima do pico (211) (Person et al., 1995).

3.4. Aplicabilidade arqueológica

Para os fins da aplicabilidade foram analisados três fragmentos de ossos arqueológicos cremados do Sítio Alcobaça, no município de Buíque, localizado na microrregião do Agreste de Pernambuco (Davoglio, 2021). Dos fragmentos extraídos do enterramento 5 no sítio, correspondente a uma cova circular (Davoglio, 2021), três foram escolhidos para abranger um espectro de cor variado, e por

⁹A técnica EDS retorna apenas uma estimativa da composição elementar do material analisado. Além disso, ela não identifica elementos com baixo número atômico, como o hidrogênio.

serem ossos longos, assim como o osso moderno experimentado, sendo que as frações analisadas foram retiradas da diáfise¹⁰.

Figura 2 - Fragmentos ósseos cremados do Sítio Alcobaça, Buíque-PE. Da esquerda para direita, as amostras: A1 (ulna preta), A3 (ulna cinza) e A2 (fêmur branco)



Fonte: A autora.

As três amostras arqueológicas foram analisadas com as técnicas de DRX-p, MEV e EDS, assumindo os mesmos parâmetros experimentais usados para o osso moderno. Sem desconsiderar que o processo de queima controlado em laboratório realizado com o osso moderno é hipotético, isto é: não condiz necessariamente com o processo real, que provavelmente contou com variáveis externas além da temperatura, os dados obtidos das análises foram usados para estimar a temperatura máxima na qual cada amostra arqueológica foi submetida a partir da comparação com os resultados do osso moderno. Foi verificado se esta temperatura é condizente com a faixa de temperatura de queima estimada pela colorimetria.

4. Resultados e Discussões

4.1. Parâmetros associados ao processo de queima

A tabela 2 contém a síntese descritiva dos resultados das análises, além dos índices calculados pelo DRX. A figura 3 explicita a variação de cor e volume após a queima de cada amostra, bem como o surgimento de rachaduras.

¹⁰De acordo com Symes et al. (2015, figura 2.7, pg. 36), a diáfise da ulna e do fêmur apresentam resistência térmica semelhante considerando a presença de tecidos moles durante a queima.

Figura 3 - Amostras ósseas antes e depois da queima, respectivamente na linha superior e inferior. Da esquerda para a direita: Osso fresco, osso queimado a 105, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 e 1100 °C



Fonte: A autora.

Tabela 2 - Síntese dos resultados da colorimetria, inspeção visual, MEV e CI das amostras de osso moderno

Amostra	Cor (NCS 1950)	Cor por inspeção visual	Rachaduras e fissuras	Estrutura e morfologia dos cristalitos	CI
Fresco	S 3010-Y10R	Amarelo claro	-	Mista (parte amorfa e parte cristalina)	n.d.
105 °C	S 2010-Y40R	Amarelo mais claro	Não possui	-	-
200 °C	S 3020-Y50R	Laranja	Rachadura e quebra no diâmetro menor	-	n.d.
300 °C	S 8000-N	Preto total	Não visível	Mista. Formato de lâminas alongadas, irregulares	n.d.
400 °C	S 7005-Y80R	Cor de bronze e grafite	Não visível	-	n.d.
500 °C	S 5005-Y80R	Cinza alaranjado	Fissura no diâmetro menor	-	n.d.
600 °C	S 5005-R20B	Cinza azulado	Fissura no diâmetro menor	Mista	0.46
700 °C	S 0505-G30Y	Branco cinzento	Rachadura pequena	Cristalina. Hexagonais com fissuras	1.61
800 °C	S 0510-Y	Branco total + manchas laranja	Poucas fissuras	Cristalina. Hexagonais com fissuras	0.93
900 °C	S 0300-N	Branco total	Rachadura e quebra. Fissuras em toda a superfície	Cristalina. Hexagonais e poliédricos irregulares com fissuras	1.13
1000 °C	S 0502-Y	Branco total + riscos laranja	Rachaduras. Fissuras em toda a superfície	-	1.16
1100 °C	S 0804-Y70R	Branco avermelhado	Rachaduras pequenas. Fissuras em toda a superfície	Cristalina. Hexagonais com arestas suaves e esferoides com fissuras	1.25

4.1.1. Observações macroscópicas

O tom laranja da amostra queimada a 200 °C indica início da fase de *decomposição* da matéria orgânica. A cor preta em 300 °C indica o auge do estado de carbonização. Conforme a matéria orgânica é liberada (em forma de CO₂), a cor do osso torna-se gradualmente mais clara. A partir de

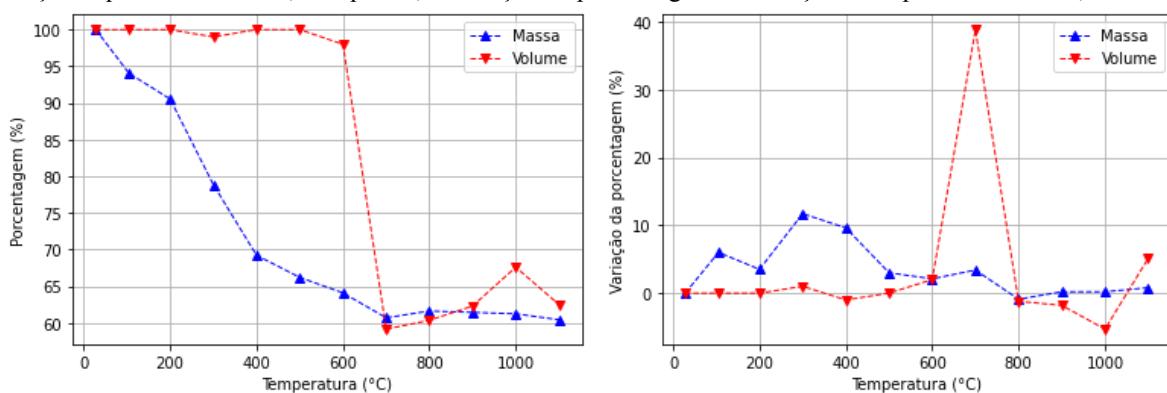
700 °C a coloração branca (com algumas manchas laranjas) indica que o osso já passou por *desidratação* e *decomposição*, e encontra-se calcinado.

A rachadura e quebra da amostra queimada a 200 °C é consequência da *desidratação*, enquanto as fissuras observadas a partir de 500 °C indicam diminuição da porosidade. Essa tendência, junto à redução de resistência mecânica dos fragmentos queimados a 300 °C em diante - notada pela significativa diminuição da quantidade de trabalho necessário para triturá-los - indicam a ocorrência da etapa de *decomposição*. A quantidade crescente de fissuras superficiais a partir de 900 °C é provavelmente devido à alteração de porosidade ocasionada durante a etapa de *fusão*.

4.1.2. Variação de massa e encolhimento

Dos gráficos da figura 4, observa-se uma perda de 9.5% da massa até 200 °C, aproximadamente a proporção de água no osso prevista por Wang et al. (2010), sendo que os 6% perdidos até 105 °C são atribuídos à água livre e superficial (além da parcela referente ao nitrogênio - ver figura 6), enquanto os outros 3.5%, de 105 a 200 °C, à uma fração da água estrutural. De 200 a 400 °C, 21.3% da massa é perdida, atribuída ao restante da água estrutural, à maior parte da fase orgânica (em CO₂), e aos carbonatos associados a ela. A curva que se sucede até 700 °C é suave, com perda de apenas 8.5% da massa, provavelmente referente à matéria orgânica remanescente e a uma parte do CO₃²⁻ estrutural. A partir de 700 °C o osso já se encontra calcinado, com uma quantidade de massa constante de aproximadamente 61% referente à inicial, coerente com o percentual estimado para a fase inorgânica.

Figura 4 - Gráfico com a variação de massa e encolhimento das amostras queimadas nas diferentes temperaturas em relação a quantidade inicial, à esquerda; e variação da porcentagem em relação a temperatura anterior, à direita.



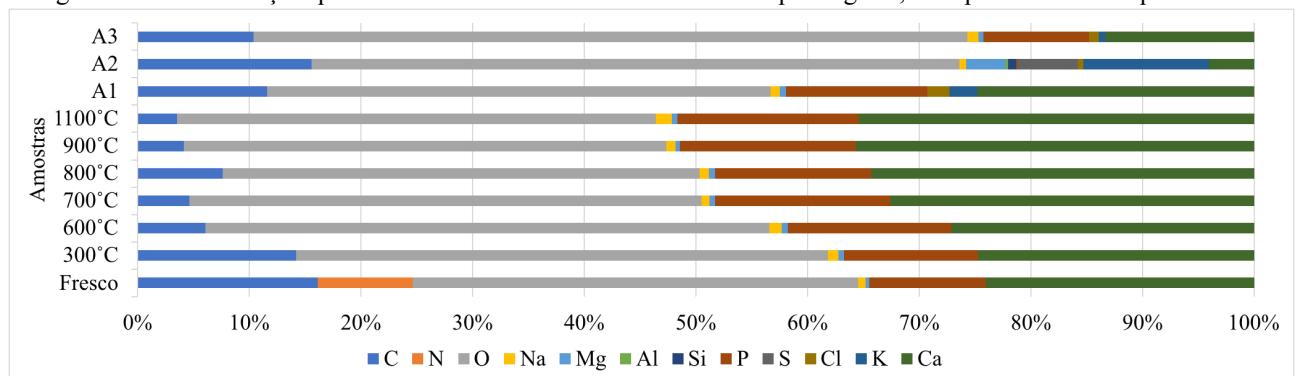
Fonte: A autora, *software jupyter notebook*.

Por outro lado, nota-se imediatamente que o encolhimento não acompanha a variação de massa. De 600 a 700 °C há um encolhimento brusco de ~40% da área superficial, indicando a etapa de *fusão* descrita por Thompson (2004). De 800 a 1000 °C, ocorre expansão relativa de aproximadamente 9%, que pode ser justificada pelo aumento dos cristalitos sem a diminuição da distância intercristalina, que indica a etapa de *inversão*. De 1000 a 1100 °C, a amostra encolhe aproximadamente 5%, o que pode indicar a diminuição da distância intercristalina, consequência da etapa de *fusão*.

4.1.3. Caracterização química semiquantitativa

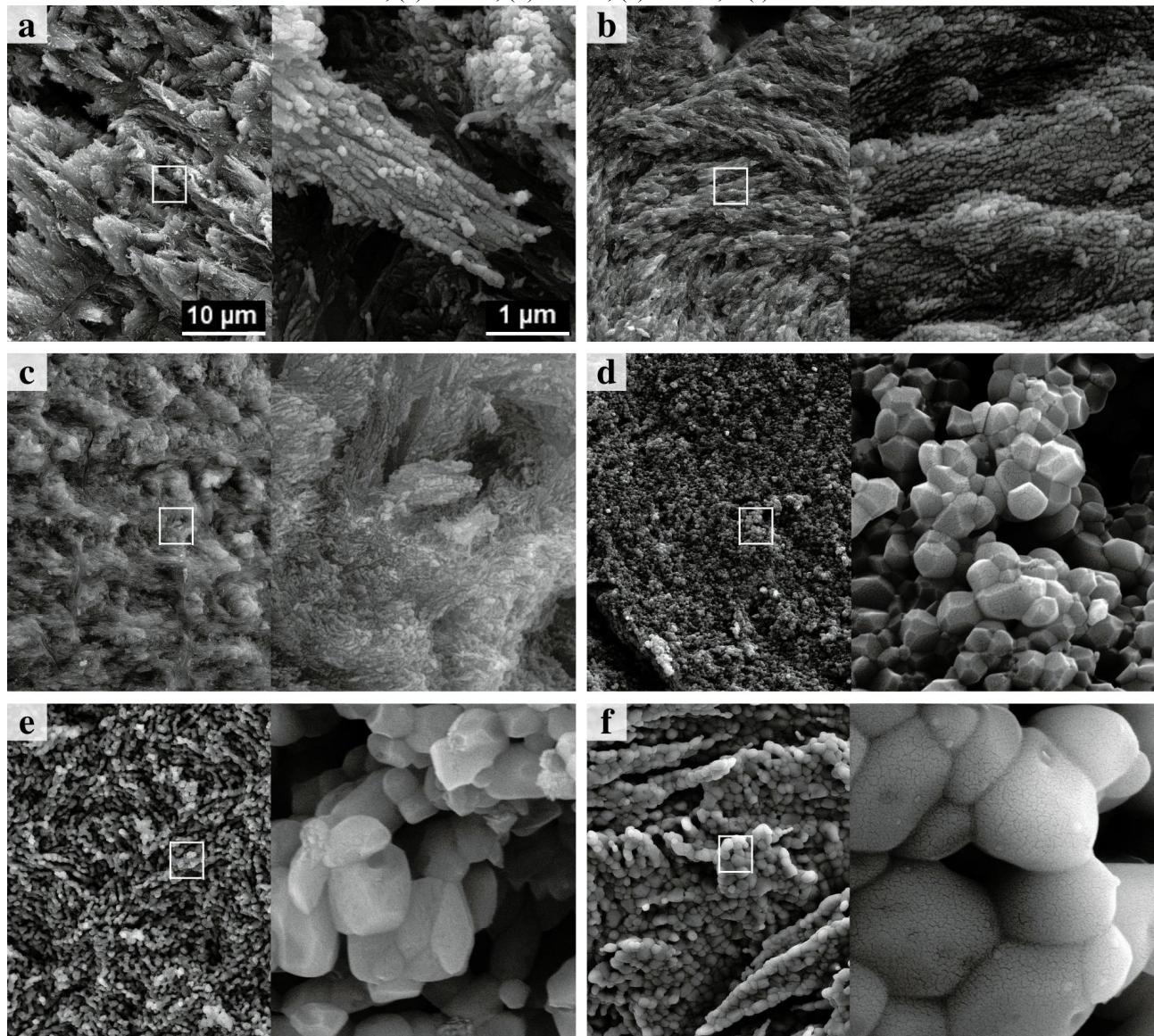
Os elementos C, O, Na, Mg, P, Ca estão presentes no osso fresco e nos ossos queimados em todas as temperaturas. Do osso fresco até a queima de 300 °C, a variação de carbono é pouca, sendo atribuída à primeira etapa de perda de matéria orgânica (em forma de CO₂), e aos carbonatos associados a ela. Ao mesmo tempo, ocorre uma variação maior de oxigênio, que além de CO₂ e CO₃²⁻, é atribuída a perda de água, corroborando com a análise de variação de massa. A variação maior de carbono que sucede de 300 até 600 °C é provavelmente devido à segunda etapa de decomposição da matéria orgânica e à parte do carbonato estrutural. De fato, é a partir de 300 °C que a coloração indica a carbonização da matéria orgânica. De 600 a 1100 °C a concentração de C diminui gradualmente, ao mesmo tempo em que o percentual de P e Ca aumentam proporcionalmente, indicando a decomposição do CO₃²⁻ das substituições da HA. Os elementos Na e Mg possuem valores diminutos em todos os casos e são identificados como os substitutos esporádicos do Ca, representando as variações da composição da apatita óssea descrita na introdução. Há nitrogênio apenas no osso fresco, provavelmente devido a presença de micro-organismos que se extinguiram com o aquecimento.

Figura 6 - Caracterização química das amostras ósseas modernas e arqueológicas, com percentual semiquantitativo



Fonte: A autora, *software Excel*.

Figura 7 - Fotografias registradas por MEV, com ampliação de 10k e 50kx das amostras: (a) Osso fresco; (b) Queimado a 300 °C; (c) 500 °C; (d) 700 °C; (e) 800 °C; e (f) 1100 °C



Fonte: Compilado pela autora, laboratórios do INTM/UFPE.

4.1.4. Morfologia estrutural

Até 600 °C o osso possui estrutura mista, com parte amorfa e parte cristalina, e não houve crescimento aparente do tamanho dos cristalitos. As figuras 7 (a), (b) e (c) mostram o material amorfo que reveste o mineral. Como já discutido, na medida em que o osso é aquecido, ocorre a liberação do material amorfo - etapa de *decomposição* - até a calcinação do osso, que de acordo com os resultados anteriores ocorreu em 700 °C. De fato, a figura 7 (d) demonstra uma estrutura cristalina, com cristalitos hexagonais característicos da apatita, explicitando uma reestruturação

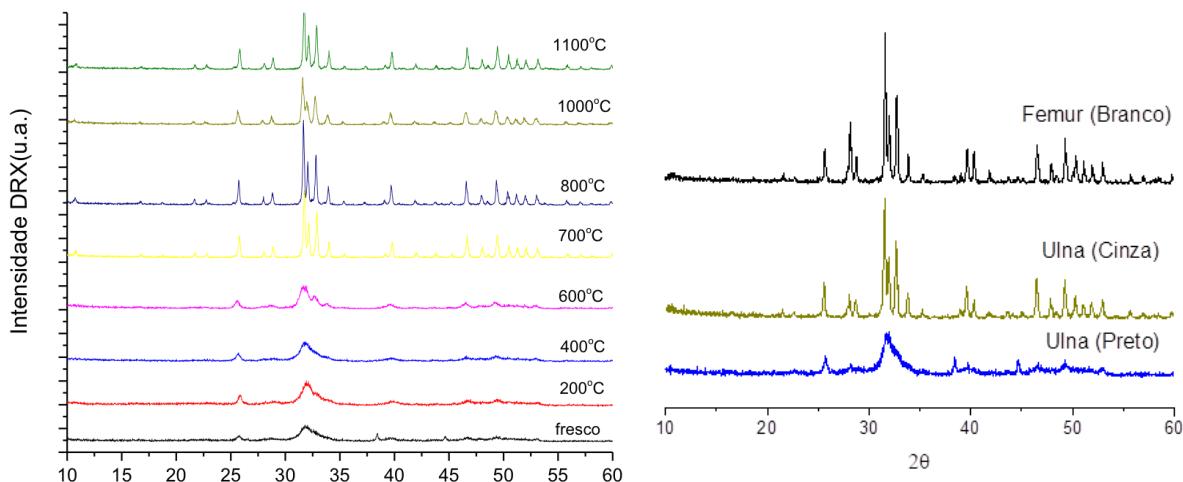
significativa do mineral. A partir daí, com a massa estabilizada, os cristalitos passam pelo processo de recristalização: se unem para formar cristais maiores, reconfigurando-se, por vezes, em formas poliédricas irregulares e apresentando fissuras (Figura 7 (e)), até chegarem a cristalitos aproximadamente 10 vezes maiores, em 1100 °C, de formato predominantemente esferóide (Figura 7 (f)). O aumento do cristal observado em temperaturas superiores a 600 °C descreve tanto a etapa de *inversão* quanto a de *fusão*, sendo que a última também inclui a redução da distância intercristalina observada a partir de 900 °C.

Estes dados agregam à discussão sobre o encolhimento brusco que ocorre de 600 a 700 °C, assim como a curva suave de expansão relativa que se sucede até 1000 °C (figura 4): Os cristais se readjustam após se verem livres da parte amorfa (*desidratação* e *decomposição*), minimizando o espaço ocupado; depois, os cristais se tornam maiores, mas sem eliminar os vazios entre eles (*inversão*). Em 1100 °C, ocorre o aumento do cristalito com redução do espaço intercristalino (*fusão*), justificando o encolhimento relativo à temperatura anterior. Dando continuidade ao processo de queima em temperaturas superiores, é esperado que o mineral sofra colapso, tornando-se amorfo.

4.1.5. Estrutura cristalina

A figura 5 explicita a qualidade amorfa da estrutura do osso fresco. A partir de 200 °C, há um sutil afinamento das curvas referente à perda de uma parcela da parte amorfa associada à *desidratação* (das outras análises sabe-se que nesta faixa houve perda de água livre e superficial). Apesar de haver *decomposição* expressiva entre 200 e 400 °C, ela não é evidenciada nos difratogramas. Os picos principais, entre 30 e 35° 2θ, começam a aparecer em 600 °C, e em 700 °C são completamente evidenciados, permanecendo presentes até 1100 °C, demonstrando novamente que a calcinação ocorre em 700 °C. Uma hipótese para justificar a suave diminuição e alargamento dos picos em 1000 °C e 1100 °C é o mineral se tornado amorfo, fase que precede o colapso da estrutura.

Figura 5 - Difratogramas (padrão da HA, de algumas temperaturas, e um deles nomeando os picos).



Fonte: A autora, *software Origin*.

Conforme apresentado na tabela 2, o CI não correspondeu à expectativa de ser proporcional à temperatura de queima, uma vez que o maior valor é observado na queima de 700 °C e a variação de valores nas temperaturas posteriores parece ser fruto de flutuação antes de qualquer outra coisa. É recomendado, neste caso, a adoção de uma abordagem estatística para considerar a tendência ao invés dos valores individuais, sendo coerente com a natureza semiquantitativa do índice.

4.2. Descrição do processo de queima

O resultado de cada análise é somado e descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Descrição do processo de queima

Etapa	Descrição
28 - 200 °C	Etapa de <i>desidratação</i> : toda água livre e superficial é perdida, assim como parte da água estrutural (~10% da massa). A coloração varia de amarelo claro do osso fresco para laranja. A estrutura é mista, e os cristalitos seguem o formato de placas alongadas. Demais características permanecem. Não é claro se a etapa de <i>desidratação</i> é concluída
200 - 400 °C	Primeira etapa de <i>decomposição</i> : maior parte da matéria orgânica (como CO ₂) e CO ₃ ²⁻ associados é decomposta (~20% da massa). O osso começa o processo de carbonização, a coloração passa de laranja, para preto, bronze e gráfico. Demais características permanecem
400 - 600 °C	Segunda etapa de <i>decomposição</i> : matéria orgânica e CO ₃ ²⁻ estrutural são decompostos (~5% da massa). A coloração varia de preto para cinza e cinza claro e branco cinzento. Demais características permanecem
600 - 700 °C	Terceira etapa de <i>decomposição</i> : matéria orgânica e CO ₃ ²⁻ estrutural são decompostos (~5% da massa). Toda a parte amorfa é liberada. Osso é calcinado. Etapas de <i>fusão</i> e <i>recristalização</i> : Estrutura encolhe ~40%; surgem cristalitos hexagonais. Difratograma assume padrão da HA. CI varia de 0.46 para 1.67
700 - 1000 °C	Etapas de <i>Inversão</i> e <i>Fusão</i> : Processo de recristalização. Aumento no tamanho dos cristais. Cristais hexagonais e poliédricos irregulares. Expansão suave da estrutura. CI na média de 1.10

1000 - 1100 °C Etapa de fusão: Processo de recristalização. Cristalitos esferoides irregulares. Diminuição da distância interplanar. Encolhimento suave da estrutura. CI varia de 1.16 para 1.25

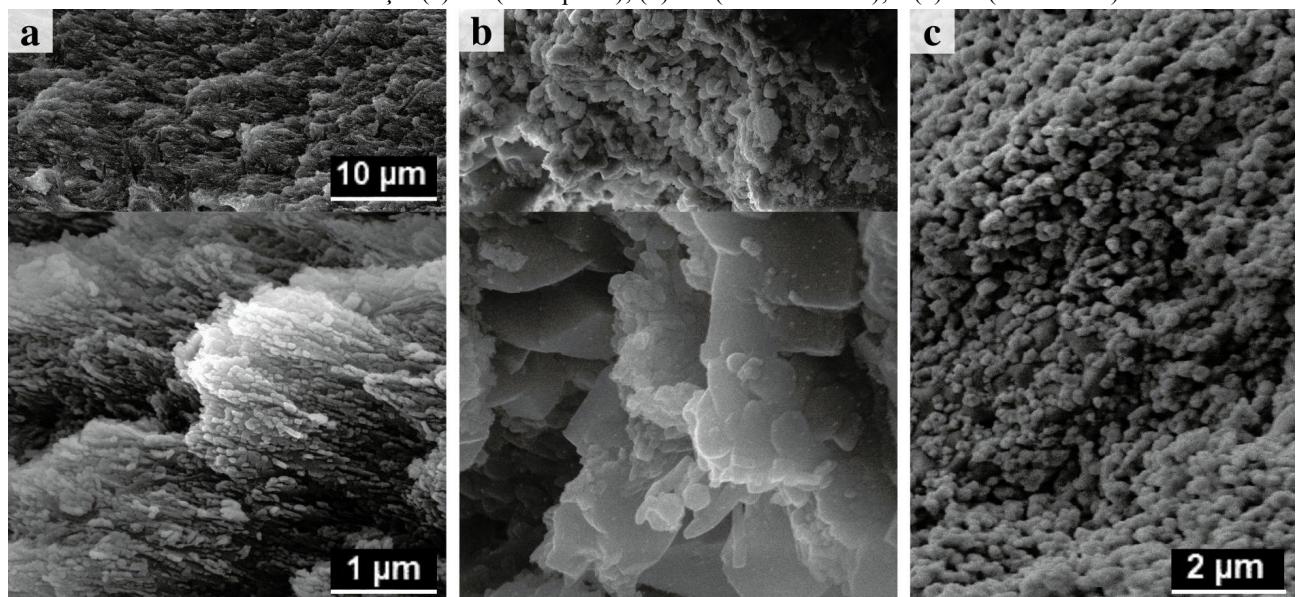
4.3. Aplicabilidade Arqueológica

A análise colorimétrica baseada no trabalho de Davoglio (2021) indica que as amostras arqueológicas A1, A2 e A3 foram queimadas, respectivamente, nas faixas (300 a 800 °C), (> 700 °C), e (500 a 900 °C). Por outro lado, comparando os resultados das análises arqueológicas (tabela 4, figura 9) com a definição das etapas de queima descritas em 4.2. estima-se que: A1 foi queimada em torno de 300 °C; A2 em temperatura superior a 700 °C; e A3, entre 600 e 700 °C.

Tabela 4 - Resultados da colorimetria, MEV, EDS e DRX-p das amostras arqueológicas

Amostras	Cor predominante	Caracterização química	Estrutura e morfologia dos cristalitos	CI
A1: Et 975 Al (Ulna)	S 7502-R: Preto na superfície e cinza no interior	C, O, Na, Mg, P, Ca, K, Cl	Mista. Formato de lâminas alongadas	n.d.
A3: Et 975 Al (Ulna)	S 3005-G80Y: Cinza	C, O, Na, Mg, O, Ca, K, Cl	Mista (mais cristalino). Aparentemente hexagonais. Amostra pulverizou.	1.55
A2: Et 975 Al (Fêmur)	S 0505-Y30R: Branco	C, O, Na, Mg, P, Ca, S, Al, Si, K, Cl	Mista (mais cristalino). Grandes placas poligonais, irregulares	1.40

Figura 9 - Fotografias registradas por MEV, com ampliação de 10k e 50k x, das amostras arqueológicas do enterramento 5 do sítio do Alcobaça: (a) A1 (Ulna preta); (b) A2 (Fêmur branco); e (c) A3 (Ulna cinza)



Fonte: Compilado pela autora, laboratórios do INTM/UFPE.

5. Considerações finais

Foi cumprido o objetivo de descrever a alteração estrutural do osso humano induzida pelo aquecimento em termos das etapas descritas na literatura (tabela 4). Entretanto, a associação delas com a temperatura de ocorrência é dúbia: o presente experimento faz essa associação considerando as condições de queima específicas descritas na metodologia; por outro lado, ao considerar diferentes condições de queima, a validade dessa associação não é garantida, o que inclui o caso dos ossos arqueológicos. Ainda assim, a estimativa da temperatura das três amostras foi coerente com a estimada pela análise colorimétrica da literatura.

O CI não apresentou o comportamento esperado pela literatura, falhando em descrever a alteração da estrutura cristalina e consequentemente em associar seu valor com a temperatura de queima. Uma solução é refazer o difratograma de raio X da região de 30 a 35° 2θ com passo de 0.2 °/min para aumentar a definição do picos. Em paralelo, outras análises podem ser realizadas para aumentar a precisão dos resultados: o refinamento de Rietveld pode ser usado para elucidar o comportamento cristalográfico a partir de 600 °C, aumentando o aproveitamento dos difratogramas; o cálculo de outros índices por Espectroscopia de infravermelho FTIR pode trazer mais dados a respeito da alteração estrutural nas temperaturas mais baixas; a abordagem estatística é recomendada para todas as análises, em particular para o CI; a termogravimétrica (ATG) pode ser usada para explicitar o caráter contínuo da curva de variação de massa, apontando precisamente os intervalos de temperatura onde ocorrem as principais alterações; o encolhimento pode ser calculado em termos volumétricos por deslocamento de líquido.

Em suma, a complexidade do osso humano e do processo de queima e diagênese exige estudos mais amplos e aprofundados, tanto em técnica quanto em quantidade da amostragem, para que seja possível caracterizar um osso cremado - mais ainda um arqueológico - em termos das alterações causadas pelo aquecimento e descrever os parâmetros de queima associados. Nesse contexto, é relevante para a resolução do problema pesquisas voltadas para a análise de como os parâmetros interagem entre si.

Referências

- BEASLEY, M. et al. **Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis.** J. Archaeol. Sci., 15, p. 16-22, 2014.
- BERNA, F.; MATHEWS, A.; WEINER, S. **Solubilities of bone mineral from archaeological sites: the recrystallisation window.** J. Archaeol. Sci. 31, p. 867-882, 2004.
- BUCKWALTER, J. A.; COOPER R. R. **Bone structure and function.** Instr Course Lect.; 36, p. 27-48, 1987. PMID: 3325555.
- ETOK, S. E. et al. **Structural and chemical changes of thermally treated bone apatite.** J. Mater. Sci. 42(23), p. 9807-9816, 2007.
- DAVOGLIO, C. R. B. S. **O corpo e o fogo: estudo dos processos de cremação em ossos humanos do sepultamento 1 no sítio arqueológico Alcobaça, Buíque – PE (2.466 ± 26 BP)** Dissertação (Mestrado em Arqueologia) - Programa de Pós-Graduação em Arqueologia, Universidade Federal de Pernambuco, 2021.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. **Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells.** BioMed Research International; vol.III, Article ID 421746, 2015.
- KRAP, T. et al. **Colourimetric analysis of thermally altered human bone samples.** Sci Rep 9, 8923, 2019.
- LEGEROS, R. Z. et al. **Two types of carbonate substitution in the apatite structure.** Experientia 25(1) p. 5–7, 1969.
- LEGEROS, R.Z. **Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine.** Karger, Paris, 1991.
- MAMEDE, P. A. et al. **Burned bones tell their own stories: A review of methodological approaches to assess heat-induced diagenesis.** Applied Spectroscopy Review, 2017.
- MCKINNON, M et al. **A comparison of crystal structure in fresh, burned and archaic bone - Implications for forensic sampling.** Forensic Sci Int, 2020.
- MIGNON, R. M. **Dictionary of concepts in archaeology.** London: Ed. Copyrightht, 1993.
- NAKANO, T.; UMAKOSHI, Y.; TOKUMURA, A. **Variation in crystallinity of hydroxyapatite and the related calcium phosphates by mechanical grinding and subsequent heat treatment.** Metall Mater Trans A 33, p. 521–528, 2002.
- NI, Q. W. et al. **Assessment of water distribution changes in human cortical bone by nuclear magnetic resonance.** Meas. Sci. Technol 18, p. 715-723, 2007.
- NYMAN, J. S. et al. **Measurements of mobile and bound water by nuclear magnetic resonance correlate with mechanical properties of bone.** Bone 42, 193-199, 2008.
- PERSON, A. et al. **Early diagenetic evolution of bone phosphate: An X-ray diffractometry analysis.** J. Archaeol. Sci. 22(2), p. 211–221, 1995.
- REYES-GASGA, J. et al. (2013) **XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite.** Mater. Sci. Eng. C 33(8): p. 456–457, 2013.

ROGER, K. D.; DANIELS, P. **An X-ray diffraction study of the effects of heat treatment on bone mineral microstructure.** Biomaterials 23, p. 2577-2585, 2002.

SANTOS, A. L. C.; SULLASI, H. S. L. **Implicações Microscópicas da Tafonomia ao Emprego de Métodos e Técnicas Forenses em Arqueologia.** Fumdhamentos, vol. XIII. p. 108-130, 2016.

SANTOS, C. P. **Aplicação de métodos bioarqueológicos em esqueletos históricos e pré-históricos: analisando ossos inumados e cremados.** Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Arqueologia do Departamento de Arqueologia da Universidade Federal de Sergipe, 2016.

SHEPARD, A. O. **Ceramics for the Archaeologist.** Washington, D.C.: Carnegie Institution of Washington, 1956. p. 27-31.

SHIPMAN, P.; FOSTER, G.; SCHOENINGERS, M. **Burnt bones and teeth: an experimental study of color, morphology, crystal structure and shrinkage.** J. Archaeol. Sci. 11(4): p. 307–325, 1984.

SKINNER, H. C. **Mineralogy of bone.** In: SELINUS, O. (Ed.), *Essentials of Medical Geology: Impacts of the Natural Environment on Public Health*. Elsevier, London, 2005. p. 667–678.

SNOECK, C.; LEE-THORP, J. A.; SCHULTING, R. J. **From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone.** Journal of Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology Elsevier B.V, 2014.

SPRAGUE, R. **Burial Terminology: a guide for researchers.** New York: AltaMira Press, 2005.

STINER, M. C. et al. **Differential burning, recrystallization, and fragmentation of archaeological bones.** Journal of Archaeological Science, 22, p. 223-237, 1995.

SULLASI, H. S. L. et al. **Bone diagenesis study of the burials from the Pedra do Alexandre archaeological site, Carnaúba dos Dantas, Rio Grande do Norte, Brazil.** In: Cadernos do Lepaarq, v. XV, n.30, p. 162-178, 2018.

SYMES S. A. et al. **Patterned Thermal Destruction in a Forensic Setting.** In: *The analysis of burned human remains*, SCHMIDT, C. W.; SYMES S. A. (Eds.). Elsevier, Oxford, UK, 2015. p. 17–59.

THOMPSON, T. J. U. **Recent advances in the study of burned bone and their implications for forensic anthropology.** Forensic Sci. Int. 146, S203–S205, 2004.

THOMPSON, T. J. U. **The analysis of heat-induced crystallinity change in bone.** In: *The analysis of burned human remains*, SCHMIDT, C. W.; SYMES, S. A. (Eds.). Elsevier, Oxford, UK, 2015. p. 323–337.

THOMPSON, T. J. U. et al. **Death on the frontier: Military cremation practices in the north of Roman Britain.** Journal of Archaeological Science: Reports. Elsevier Ltd, 2016.

WALKER, P. L.; MILLER, K. W. P.; RICHMAN, R. **Time, temperature, and oxygen availability: an experimental study of the effects of environmental conditions on the color and organic content of cremated bone.** In: SCHMIDT, C. W.; SYMES, S. (Eds.). *The Analysis of Burned Human Remains*. Elsevier Press, Amsterdam, Netherlands, 2008.

WANG, X.Y.; ZUO, Y.; HUANG, D.; HOU, X.D., LI, Y.B. **Comparative study on inorganic composition and crystallographic properties of cortical and cancellous bone.** Biomed. Environ. Sci. 23, p. 473–480, 2010.

WEINER, S.; BAR-YOSEF, O. **States of preservation of bones from prehistoric sites in the Near East: A survey**. *J. Archaeol. Sci.* 17(2), p. 187–196, 1990.

WILSON, E. E. et al. **Three Structural Roles for Water in Bone Observed by Solid-State NMR**. *Biophysical Journal* 90, p. 3722-3731, 2006