



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ANÁLISE DA MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA *IN VITRO*

Trabalho submetido por
Cláudia Carmelo Antunes
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ANÁLISE DA MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA *IN VITRO*

Trabalho submetido por
CLÁUDIA CARMELO ANTUNES
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
PROF. DOUTORA CARLA ASCENSO

e coorientado por
PROF. DOUTORA CRISTINA MANSO

setembro de 2020

DEDICATÓRIA

Às minhas estrelinhas.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Doutora Carla Ascenso e coorientadora Prof. Doutora Ana Cristina Manso por todo o apoio, palavras de motivação e total disponibilidade durante este percurso.

Aos Professores Doutores António Alves de Matos e Mário Polido por disponibilizarem os seus laboratórios para a realização deste trabalho e às funcionárias Sandra, Natacha, Susana e Mena pela sua disponibilidade.

Ao IUEM e as todos os professores com quem tive oportunidade de aprender durante estes cinco anos.

À Katerina que partilhou esta jornada comigo, e me deu força nos momentos mais difíceis, uma amiga que levo para a vida.

Aos meus pais e irmã, que me apoiam hoje e sempre na conquista dos meus objetivos.

Ao Bernardo, a minha lontra, que me apoia incondicionalmente e me deu sempre força quando eu precisava.

Aos amigos que fiz nestes cinco anos, em especial à Elisabete Vieira, a minha parceira nesta viagem desde o 1ºano.

À minha parceira de box, Teresa Mayer, por me aturar todos os dias neste último ano.

RESUMO

Objetivo: Otimizar o processo de formação *in vitro* de hidroxiapatite na presença de colagénio, a partir dos resultados anteriormente obtidos (Araújo, 2019).

Materiais e Métodos: Foram considerados os grupos de estudo de Araújo, 2019, e utilizados os materiais e métodos por este estudados e descritos. As amostras foram recobertas com ouro-paládio, observadas em SEM e sujeitas a análise EDS.

Resultados: Os valores de Ca/P encontrados foram superiores ao valor da hidroxiapatite pura, 1,67, no entanto as imagens de SEM foram consistentes com observações de hidroxiapatite realizadas por outros autores. Com base nestes resultados surgiu a hipótese de o mineral obtido não ser hidroxiapatite pura, mas um conjunto de formas de apatite. Para testar esta teoria, foi construído um modelo que procura estimar o balanço das percentagens dos compostos moleculares identificados, respeitando a composição elementar das amostras.

Conclusão: Este trabalho mostrou que é possível que o mineral formado *in vitro* não seja apenas hidroxiapatite. No entanto, tratando-se de resultados preliminares, para que esta hipótese seja cientificamente provada, é necessário analisar o mineral obtido por técnicas mais sensíveis.

Palavras Chave: Colagénio, Hidroxiapatite, Mineralização

ABSTRACT

Objectives: To optimize the *in vitro* process of hydroxyapatite formation in the presence of collagen, based on the results previously obtained (Araújo, 2019).

Materials and methods: The study groups of Araújo, 2019, were considered, as well as, the materials and methods studied and described by him. The samples were covered with gold palladium, observed in SEM and subjected to EDS analysis.

Results: The Ca/P values found were higher than the value of pure hydroxyapatite, 1.67, however the SEM images were consistent with observations of hydroxyapatite performed by other authors. Based on these results the hypothesis that the mineral obtained was not pure hydroxyapatite, but a set of forms of apatite, was studied. To test this theory, a model was constructed to estimate the balance of the percentages of the molecular compounds identified, respecting the elemental composition of the samples.

Conclusions: This work showed that it is possible that the mineral formed *in vitro* is not only hydroxyapatite. However, since these are preliminary results, for this hypothesis to be scientifically proven, it is necessary to analyse the mineral obtained by more sensitive techniques.

Keywords: Collagen, Hydroxyapatite, Mineralization

ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO	15
I.1.	O COLAGÉNIO NA MINERALIZAÇÃO	15
I.2.	AS PROTEÍNAS NÃO COLAGÉNICAS NA MINERALIZAÇÃO	19
I.3.	OS PERCUSSORES AMORFOS E A HIDROXIAPATITE.....	21
I.4.	HIDROXIAPATITE E AS APATITES BIOLÓGICAS	23
I.5.	OBJETIVO	26
II.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
II.1.	Grupos Experimentais.....	27
II.2.	Método Experimental	27
II.3.	Análise Mineral - SEM e EDS.....	29
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
III.1.	Ensaio A0.1	32
III.2.	Ensaio A0.2	35
III.3.	Ensaio A0.3	40
III.4.	Ensaio A0.4	45
III.5.	Hidroxiapatite pura ou Conjunto de Apatites – modelo	50
IV.	CONCLUSÃO	59
V.	BIBLIOGRAFIA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Representação das cadeias alfa 1 e 2, com o domínio central helicoidal e os domínios terminais não helicoidais com N e C propéptidos. Adaptado de (Henriksen & Karsdal, 2019) com permissão. Copyright (2019) Elsevier Inc.	16
Figura 2 - Representação da conversão do pro-colagénio em tropocolagénio pela remoção dos propéptidos N e C terminais e posterior agregação em fibrilhas de colagénio. Adaptado de (Henriksen & Karsdal, 2019) com permissão. Copyright (2019) Elsevier Inc.	17
Figura 3– A) Representação da nucleação nos buracos de colagénio (gaps) e zonas de sobreposição (overlap); B) Estrutura tridimensional das microfibrilhas de colagénio; C) Nucleação nos buracos de colagénio e zonas de sobreposição; D) Imagem de microscopia eletrónica de mineralização. Adaptado de (Nudelman et al., 2013) com permissão. Copyright (2013) Elsevier Inc.	18
Figura 4 – Esquema do mecanismo de dissolução/precipitação nas apatites biológicas e possíveis substituições. Adaptado de (Liu et al., 2013) com permissão. Copyright (2013)	25
Figura 5 – Esquema representativo do método experimental utilizado e descrito por Araújo, 2019.	28
Figura 6 - Microscópio eletrónico de varrimento modelo JOEL JSM-5400.	30
Figura 7- Amostras recobertas com ouro-paládio.	30
Figura 8 - Controlo de pH no minuto zero, pH ~7.	32
Figura 9 - No microtubo B é possível observar o aumento da turbidez ao fim de 30 min, quando comparado com o microtubo A antes da adição da solução salina de neutralização.	32
Figura 10 - Imagem de mineral obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, onde é possível observar a heterogeneidade do mesmo. Ampliação 25x.	33
Figura 11 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 100x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.1. É possível observar a heterogeneidade do mesmo, pelas zonas brancas e escuras observadas, e pelos valores de análise EDS em cada zona do mineral.	34
Figura 12 - Imagem de mineral obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, onde é possível observar a transparência do mesmo. Ampliação 25x.	35

Figura 13 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 50x, onde é possível observar a homogeneidade de uma amostra de mineral do ensaio A0.2.	36
Figura 14 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 200x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.2. A imagem sugere a existência de uma estrutura tridimensional, pela existência de uma leve granulação.	37
Figura 15 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 200x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.2. A imagem sugere a existência de uma estrutura tridimensional, pela existência de uma leve granulação.	37
Figura 16 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 200x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.2. A imagem sugere a existência de uma estrutura tridimensional, pela existência de uma leve granulação.	38
Figura 17 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.2.1. Relação Ca/P 2,9.....	39
Figura 18 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.2.2. Relação Ca/P 2,4.....	39
Figura 19 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.2.3. Relação Ca/P 1,7.....	40
Figura 20 – Imagem obtida durante o ensaio realizado com temperatura controlada entre 21 e 22°C.	41
Figura 21 - Controlo fotográfico onde é possível observar o aumento da turbidez e viscosidade ao longo do tempo. A) 0 h; B) 0,5 h; C) 1 h; D) 24 h; E) 48 h; F) 72 h.	41
Figura 22 - Imagem de mineral obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, onde é possível observar a opacidade homogênea do mesmo. Ampliação 25x.....	42
Figura 23 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 350x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.3. É possível observar a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas.	43
Figura 24 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 750x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.3. É possível observar a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas.	43
Figura 25 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.3.1. Relação Ca/P 2,3.....	44
Figura 26 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.3.2. Relação Ca/P 2,1.....	44
Figura 27 - Controlo fotográfico onde é possível observar o aumento da turbidez e viscosidade ao longo do tempo. A) 24h; B) 48h; C) 72h.	46
Figura 28 - Imagem de mineral obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, Ampliação 25x.	46

Figura 29 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 50x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.4. É possível observar a existência de uma estrutura tridimensional e homogeneidade.....	47
Figura 30 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 500x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.4. É possível observar a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas.....	47
Figura 31 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 50x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.4. É possível observar a existência de uma estrutura tridimensional e homogeneidade.....	48
Figura 32 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 500x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.4. É possível observar a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas.....	48
Figura 33 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.4.1. Relação Ca/P 2,4.....	49
Figura 34 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.4.2. Relação Ca/P 2,3.....	49
Figura 35 – Tabela dividida em 3 blocos onde cada um representa uma apatite e respectiva constituição em íões.	53
Figura 36 – Bloco com três colunas que representam o valor dos íões, disponível, utilizado e sobranço, e a célula função objetivo.....	53
Figura 37 – Definições introduzidas no Solver do Microsoft Excel.	54
Figura 38 - Resultados Solver amostra A0.2.1	54
Figura 39 - Resultados solver amostra A0.2.2.....	54
Figura 40 - Resultados Solver amostra A0.2.3.....	55
Figura 41 - Resultados solver amostra A0.3.1.....	55
Figura 42 - Resultados Solver amostra A0.3.2.....	55
Figura 43 - Resultados Solver amostras A0.4.1.	56
Figura 44 - Resultados Solver amostra A0.4.2.....	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Fosfatos de cálcio e as suas propriedades. Adaptado de (Okada & Matsumoto, 2015) com permissão. Copyright (2015) Elsevier Inc.	23
Tabela 2– Grupos de Estudo descritos por Araújo, 2019.....	27
Tabela 3 - Reagentes com respetiva densidade/massa molar, CAS-number e fornecedor.	28
Tabela 4 - Resumo dos ensaios com respetivas alterações referentes à temperatura e secagem.	29
Tabela 5 – Tabela resumo da relação Ca/P e composição das amostras.	51
Tabela 6 - Tabela resumo dos resultados do solver.....	56

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
BSP	Fosfoproteína óssea
DGP	Glicoproteína dentinária
DMP-1	Proteína de matriz de dentina 1
DPP	Fosfoproteína da dentina
DSP	Sialoproteína dentinária
DSPP	Sialofosfoproteína dentinária
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raio x
HA	Hidroxiapatite
HMDS	Bis (trimetilsilil) amina
MEPE	Fosfoglicoproteína da matriz extracelular
NPC	Proteínas não colagénicas
OC	Osteocalcina
OCP	Fosfato octacálcio
OPN	Osteopontina
SEM	Microscópio eletrónico de varrimento
SIBLINGs	Pequenas glicoproteínas ligadas à integrina com Nligantes
TPC	Fosfato tricálcio
WDXRF	Fluorescência de raio X por dispersão de comprimento de onda

I. INTRODUÇÃO

A mineralização é um processo que ocorre ao longo da vida. Os dentes, enquanto tecido altamente mineralizado, são constantemente sujeitos a processos de desmineralização e remineralização (He et al., 2019).

A perda de tecido mineralizado nos dentes tem implicações quer a nível estrutural, quer funcional, pelo que a remineralização da dentina constitui o maior desafio da dentisteria operatória e preventiva (Cao et al., 2015). No entanto, esta é consideravelmente mais complexa e menos efetiva do que a do esmalte, uma vez que envolve a compreensão das propriedades da matriz, da solução de remineralização e da interação entre ambas (Zhang et al., 2016).

Nos animais vertebrados, a mineralização ocorre tipicamente em espaços extracelulares, em íntima associação com os constituintes orgânicos da matriz. O colagénio tipo I é o principal constituinte orgânico da dentina e a sua organização tridimensional em fibras altamente ordenadas é considerada crítica no processo de biomineralização. Estudos *in vitro* mostraram que a formação de cristais de hidroxiapatite por associação de iões cálcio e iões fosfato não ocorre diretamente, sendo precedida por uma forma transiente cineticamente mais acessível, o fosfato de cálcio amorfo (ACP), forma esta que evolui para fosfato de octacálcio (OCP) e só então origina o cristal de hidroxiapatite (Abou Neel et al., 2016; F. Z. Cui et al., 2008).

Entender a mineralização da dentina e de outros tecidos colagénicos mineralizados, como o osso e o esmalte, é essencial para desenvolver e criar materiais capazes de reparar e regenerar estes tecidos (Deshpande & Beniash, 2008).

Num trabalho recentemente desenvolvido na Egas Moniz (Araújo, 2019), foram realizados ensaios que permitiram estabelecer algumas das condições experimentais aparentemente conducentes à formação *in vitro* de hidroxiapatite mediado pelo colagénio tipo I, como revelaram os resultados de SEM e EDS.

I.1. O COLAGÉNIO NA MINERALIZAÇÃO

Os tecidos mineralizados, enquanto estruturas complexas, são compostos por uma matriz orgânica, uma matriz inorgânica e células (Boskey, 2007), sendo a mineralização um processo dinâmico que resulta da interação entre vários componentes de ambas as matrizes da dentina (Lausch et al., 2013).

A dentina, enquanto tecido colagénio mineralizado, é constituída em peso por 70% de conteúdo mineral (matriz inorgânica), 20% de conteúdo orgânico (matriz orgânica) e 10% de água. O componente principal da matriz orgânica da dentina é o colagénio, correspondendo a mais de 85% da mesma, sendo na sua maioria do tipo I com algumas fibras do Tipo III e V (Abou Neel et al., 2016; Cao et al., 2015).

O colagénio é uma proteína complexa com uma sequência repetitiva maioritariamente de glicina, prolina e hidroxiprolina (Tomoaia & Pasca, 2015). O tipo I, o mais abundante na natureza e no corpo humano, é composto por um domínio central helicoidal e dois domínios terminais não helicoidais com N e C propéptidos (Figura 1) (Henriksen & Karsdal, 2019). O domínio central helicoidal é um heterotrímero composto por duas cadeias alfa 1 e uma cadeia alfa 2, cada uma com aproximadamente 1000 aminoácidos em sequência repetitiva de GLI-X-Y em que X é normalmente prolina e Y, hidroxiprolina (Henriksen & Karsdal, 2019). A presença de glicina a cada três péptidos é essencial e permite a formação da estrutura helicoidal com aproximadamente 1,5 nm de diâmetro e 300 nm de comprimento (Abou Neel et al., 2016; Landis et al., 2006; Martínez-Ortiz et al., 2015).

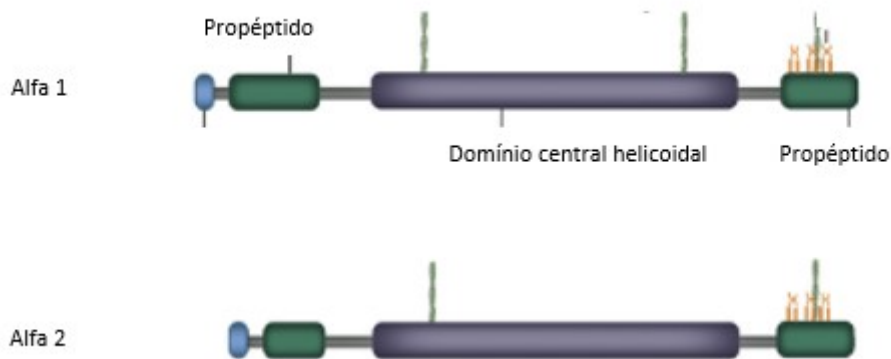


Figura 1- Representação das cadeias alfa 1 e 2, com o domínio central helicoidal e os domínios terminais não helicoidais com N e C propéptidos. Adaptado de (Henriksen & Karsdal, 2019) com permissão. Copyright (2019) Elsevier Inc.

A esta forma de colagénio composta pelos três domínios dá-se o nome de pro-colagénio que, após ser secretado pelas células para o espaço extracelular, é convertido em tropocolagénio pela ação das metaloproteinases, que removem os propéptidos N e C terminais (Figura 2) (Abou Neel et al., 2016). Após a formação do tropocolagénio, dá-se a formação da estrutura tridimensional.

A estrutura tridimensional foi primeiramente descrita num estudo realizado em microscópio eletrónico por Petruska & Hodge em 1963. Porém, só em 2006, um estudo realizado por Orgel et al. descreveu em detalhe a estrutura das microfibrilhas. No modelo presentemente aceite, a sua formação resulta de um arranjo pentamérico quase hexagonal, em que cinco unidades de tropocolagénio se agrupam longitudinalmente com uma sobreposição de um quarto do comprimento molecular (Cui et al., 2007; Orgel et al., 2006). As microfibrilhas agrupam-se depois lateral e longitudinalmente para formar as fibrilhas, adquirindo-se assim estrutura quaternária do colagénio (Cui et al., 2007). Esta estrutura é estabilizada por ligações de hidrogénio, que podem ocorrer entre a cadeia lateral da glicina e o grupo carbonilo de um péptido próximo e entre a hidroxiprolina e o grupo amida de um péptido próximo, assim como por ligações covalentes intermoleculares (Cui et al., 2007; Levin, 2011). A estrutura quaternária do colagénio é caracterizada pela existência de um buraco de cerca de 40 nm e uma sobreposição de cerca de 27 nm entre unidades adjacentes, o que resulta no padrão de bandas observado em microscopia eletrónica, que se repete a cada 67 nm e corresponde a cerca de 234 aminoácidos, mais conhecido por período D (Landis & Jacquet, 2013; Zhu et al., 2018).

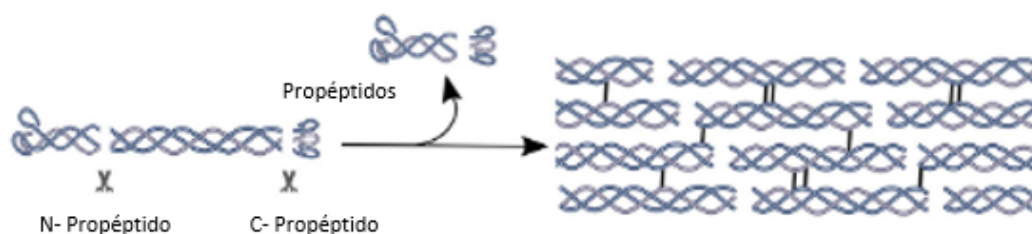


Figura 2 - Representação da conversão do pro-colagénio em tropocolagénio pela remoção dos propéptidos N e C terminais e posterior agregação em fibrilhas de colagénio. Adaptado de (Henriksen & Karsdal, 2019) com permissão. Copyright (2019) Elsevier Inc.

Vários estudos têm vindo a ser efetuados com o intuito de perceber o mecanismo de mineralização e o papel do colagénio neste processo e, mais concretamente, o período D tem sido muito estudado, uma vez que, os buracos de colagénio e zonas de sobreposição estão ativamente envolvidos no processo de mineralização (Palmer et al., 2008). Ainda assim, para além das zonas de sobreposição e buracos de colagénio também foi observada a ocorrência de mineralização na superfície das fibrilhas de colagénio (He et al., 2019).

Atualmente é aceite que a fase inicial da nucleação ocorre nos buracos de colagénio e zonas de sobreposição e que, uma vez nucleados os cristais de HA desenvolvem-se e crescem em direção ao eixo c-cristalográfico com orientação preferencial paralela ao longo eixo das fibrilhas de colagénio (Figura 3) (Landis et al., 2006; Landis & Silver, 2009).

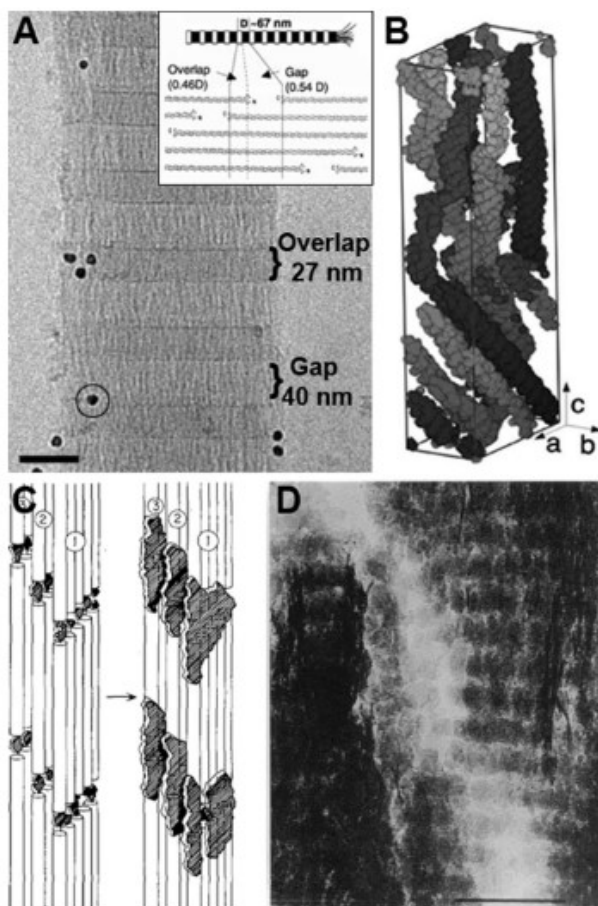


Figura 3— A) Representação da nucleação nos buracos de colagénio (*gaps*) e zonas de sobreposição (*overlap*); B) Estrutura tridimensional das microfibrilhas de colagénio; C) Nucleação nos buracos de colagénio e zonas de sobreposição; D) Imagem de microscopia eletrónica de mineralização. Adaptado de (Nudelman et al., 2013) com permissão. Copyright (2013) Elsevier Inc.

Estudos demonstraram que os grupos carboxilo de carga negativa ($-\text{COOH}$) e os grupos carbonilo ($-\text{C=O}$) presentes nestas zonas interagem com os iões de cálcio (Qiu et al., 2015), e que, a sua conformação tridimensional forma um molde que pode mediar a orientação cristalográfica dos cristais de HA (Cui et al., 2007). Outros estudos que analisaram a sequência de aminoácidos destes locais revelaram que as suas cadeias laterais podem adquirir uma conformação tridimensional capaz de coordenar os iões

cálcio e fosfato (L. He et al., 2019; Silver & Landis, 2011). A flexibilidade destas regiões foi também descrita como uma hipótese para a ocorrência de nucleação nestas zonas, uma vez que, as fibrilhas adjacentes podem criar canais e espaços que permitem que o mineral se forme (Nudelman et al., 2013). A elevada porosidade e um tamanho de poro adequado para sequestrar grandes quantidades de íons cálcio e fosfato foi ainda apontada como um fator explicativo para a nucleação nestes locais (L. He et al., 2019).

Embora o papel do colagénio no processo de mineralização ainda não esteja totalmente esclarecido, sabe-se hoje que o colagénio não é um substrato passivo uma vez que, cristais com matrizes bem orientadas e organizadas só foram observados quando o colagénio se encontrava na sua correta conformação (Nudelman et al., 2010), o que apoia a teoria de que as características estereoquímicas do mesmo são essenciais para o processo de mineralização, tendo importância na nucleação da HA, tamanho, forma e orientação dos cristais (Landis et al., 2006; Landis & Silver, 2009). Contudo, é importante referir que todos os estudos foram realizados *in vitro*, não sendo por isso possível reproduzir todos os processos celulares que ocorrem no tecido biológico, e como tal outras proteínas também poderão estar envolvidas no processo de mineralização (Cölfen, 2010; Niu et al., 2017).

1.2. AS PROTEÍNAS NÃO COLAGÉNICAS NA MINERALIZAÇÃO

As proteínas não colagénicas (NCPs), constituintes da matriz orgânica, incluem as glicoproteínas/sialoproteínas, os proteoglicanos, as fosfoproteínas e os fatores de crescimento (L. He et al., 2019). Das NCPs, as pequenas glicoproteínas ligadas à integrina com Nligantes (SIBLINGs), que incluem a osteopontina (OPN), a fosfoglicoproteína da matriz extracelular (MEPE), a sialoproteína óssea (BSP), a proteína da matriz da dentinária (DMP-1) e a sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e os seus subdomínios, sialoproteína dentinária (DSP), glicoproteína dentinária (DGP) e fosfoproteína dentinária (DPP) (George & Veis, 2008; Zhang et al., 2016), têm sido amplamente implicadas na regulação da mineralização dentinária devido à abundância de aminoácidos ácidos (Fujisawa & Tamura, 2012). Estas podem atuar como promotores, inibidores, moléculas de ancoragem, modificadores de crescimento ou substratos para a deposição mineral (E Beniash et al., 2001; Gulseren et al., 2018).

A descoberta da DPP em 1967 por Veis & Perry, foi a primeira evidência de que as fosfoproteínas estavam envolvidas na mineralização. Estes verificaram que esta era

particularmente rica em resíduos de serina, ácido aspártico e ácido glutâmico e levantaram a hipótese de que, quando ligada ao colagénio, seria capaz de nuclear HA, o que veio suportar a teoria de que o crescimento desta resulta de uma interação das NCPs com o colagénio (Veis & Perry, 1967). Tal descoberta levou a que o papel destas proteínas fosse ativamente estudado, tendo alguns dos primeiros estudos *in vitro* utilizado a precipitação em gel para analisar o efeito de proteínas específicas como a BSP. No decorrer desses estudos foi demonstrado que a concentração e a imobilização, ou não, das proteínas não colagénicas pode afetar profundamente a sua função. Contudo, embora estes estudos forneçam informações valiosas, não mimetizam a complexidade da interação entre o mineral, as proteínas e o colagénio (George & Veis, 2008; He et al., 2019; Nudelman et al., 2013). Além disso, muitas proteínas têm funções múltiplas, o que complica a interpretação da ação isolada de cada uma no fenómeno global (He et al., 2019).

Atualmente são conhecidas as funções de algumas das proteínas não colagénicas da dentina. Sabe-se que a OPN e MEPE atuam como inibidores da mineralização, enquanto a BSP, a DMP-1, a DSPP, a DSP, a DGP e a DPP estão ativamente envolvidas na mineralização (George & Veis, 2008). A DPP participa na mineralização intrafibrilar, na mineralização intertubular da dentina, na formação inicial dos cristais e na maturação dos mesmos (Gulseren et al., 2018). A DMP-1 está envolvida na regulação da nucleação e do crescimento e formação do cristal devido à sua capacidade de ligação ao cálcio e elevada afinidade com o colagénio (Beniash et al., 2012; He & George, 2004). A BSP participa também na nucleação e deposição mineral (George & Veis, 2008).

Inicialmente os estudos sugeriam que o colagénio sozinho não era capaz de induzir a formação de HA e que as NCPs eram fundamentais (George & Veis, 2008; Landis & Jacquet, 2013; Sharma et al., 2020). Mais tarde, foi observado em estudos *in vitro* que o colagénio serve como matriz para a formação de HA mesmo na ausência destas proteínas. Todavia desta observação não resultou numa conclusão linear, uma vez que, tal pode ser verdade para a formação mineral intrafibrilar mas não necessariamente para a interfibrilar, já que a nucleação e o crescimento do cristal não ocorrem exclusivamente nos buracos de colagénio, como já referido anteriormente (Landis & Jacquet, 2013). Existem, como tal, questões por clarificar sobre o papel das NCPs na mineralização (George & Veis, 2008; G. He & George, 2004; Lausch et al., 2013).

I.3. OS PERCUSSORES AMORFOS E A HIDROXIAPATITE

Os animais invertebrados, durante o processo de formação do seu esqueleto mineralizado, utilizam precursores amorfos que evoluem posteriormente para uma fase cristalina. Nos animais vertebrados, mas especificamente no Homem, este processo tem vindo a ser alvo de debate e estudo intensivo (Mahamid et al., 2008).

Inicialmente a mineralização do colagénio e de outros bio minerais cristalinos era vista como uma precipitação clássica ou mecanismo de nucleação e crescimento. Por outras palavras, assumia-se que os iões que precipitavam do fluido intersticial formavam um aglomerado de tamanho crítico que iniciava a nucleação, e que o seu crescimento se dava pela adição de iões à superfície (Gower, 2008; Wang & Nancollas, 2010).

Em 1960, as etapas da fase mineral do osso foram repensadas uma vez que, na análise de fosfatos de cálcio biológicos foram observados padrões pobres de difração de raios-X e variações nas composições químicas (Cui et al., 2008; Rey et al., 2009). Foi então sugerido que na formação da hidroxiapatite (HA) existia uma fase amorfa (Termine & Posner, 1966), teoria também apoiada pelos estudos experimentais de Eanes et al. (1965) que mostraram que em condições fisiológicas, inicialmente os precipitados são amorfos e evoluem posteriormente para fosfato de octacálcio (OCP) e só depois para hidroxiapatite. Estes resultados revelaram que o mineral não cristaliza diretamente na forma termodinâmica mais estável, pelo contrário, precipita primeiro na forma cineticamente mais acessível, o ACP (fosfato de cálcio amorfo), e só depois se transforma (Eanes et al., 1965; Wang & Nancollas, 2010). No entanto, por estes terem sido conduzidos *in vitro*, durante algum tempo não permitiram concluir se *in vivo* os precursores amorfos também se formavam.

Mais recentemente, com a evolução das técnicas laboratoriais, foi possível observar *in vivo* evidências da existência destas fases precursoras. Em 2006, Crane et al., utilizando a espectroscopia de Raman, mostraram que em osso de crânio de rato existem fases intermediárias semelhantes a OCP. Beniash et al., em 2009, identificaram a presença de ACP no esmalte de camundongo. Em 2010 e 2011, Mahamid et al., através do crescimento de ossos de peixe zebra, crânio de rato e osso longos, mostraram que o mineral é libertado em glóbulos pelas células na zona de crescimento, e que estes em contacto com as fibrilhas de colagénio se transformam em HA. Destes estudos resultou uma mudança de paradigma na visão do processo de mineralização, e os trabalhos *in vitro* passaram a ter como objetivo elucidar o papel do ACP. Uma questão importante e não

evidente que emergiu destes estudos relaciona-se com o processo de infiltração do ACP no colagénio, tendo sido levantadas duas hipóteses. A primeira propõe que uma vez depositado no meio extracelular, o ACP se dissolve e os iões se infiltram no colagénio onde ocorre a sua re-precipitação e posterior nucleação em apatite (Silver & Landis, 2011). No entanto não foram encontradas evidências que apoiem esta teoria. A segunda, que o próprio ACP existe num estado líquido e se difunde no colagénio por meio de forças capilares (Gower, 2008; Olszta et al., 2007). Contudo, estudos posteriormente realizados mostraram que a infiltração do ACP no colágeno resulta das interações de carga entre o mineral e as fibrilhas de colagénio (Nudelman et al., 2010) e que, o tamanho dos aglomerados de ACP têm influência na mineralização (L. He et al., 2019). Aglomerados menores de ACP permitem uma infiltração mais rápida nas fibrilhas e consequentemente formação mais rápida de apatite, o que é apoiado pela característica de exclusão de tamanho do colagénio, que limita a dimensão das moléculas que se podem infiltrar. (Toroian et al., 2007). Moléculas maiores que 40 kDa não se infiltram no colágeno, enquanto que menores que 6 kDa podem facilmente fazê-lo (Toroian et al., 2007). Outros estudos revelaram também que quando a velocidade de infiltração é reduzida, apenas o ACP se forma, enquanto que velocidades elevadas originam cristais de apatite corretamente orientados (Lausch et al., 2013). Estas observações sugerem que o ACP quando formado rapidamente é instável e, como tal, transforma-se rapidamente em apatite.

Atualmente, é então aceite que, tanto *in vitro* como *in vivo*, pH neutro e saturações moderadas levam inicialmente à formação ACP, com relações de Ca/P $\sim 1,5$, que posteriormente se transforma em apatite (Wang & Nancollas, 2010; Zhao et al., 2012). Estudos sugeriram, no entanto, que esta transformação não ocorre diretamente, mas sim por meio de um intermediário tipo OCP. Feenstra & Bruyn, 1979, após a análise da estrutura sólida em desenvolvimento, durante a mineralização, observaram que associados a ACP foram encontrados OCP e cristais de apatite e, mais tarde, um estudo da cinética de conversão, a pH fisiológico, revelou a existência clara de duas fases (Zhao et al., 2012): uma primeira que consome ácido e converte o ACP num intermediário tipo OCP; e uma segunda que consome base e converte intermediário tipo OCP em apatite ou, possivelmente, converte diretamente ACP em apatite (Zhao et al., 2012).

I.4. HIDROXIAPATITE E AS APATITES BIOLÓGICAS

Os fosfatos de cálcio (tabela 1) podem ser classificados em três grandes grupos de acordo com a sua estrutura, as apatites, as glaserites e compostos com camadas de CaPO_4 . As apatites, cuja fórmula química é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, incluem os derivados de hidroxiapatite ($\text{X}=\text{OH}$) e de fluorapatite ($\text{X}=\text{F}$), bem como as formas relacionadas com estruturas do tipo apatite, tais como fosfato octacálcico, o octacálcio bis-hidrogenofosfato tetrafosfato pentahidratado ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e o fosfato tetracálcico ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$). Já a glaserite inclui todos os polimorfos de fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e os compostos com camadas de CaPO_4 incluem o fosfato dicálcico di-hidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato dicálcico anidro (CaHPO_4) e os fosfatos monocálcicos ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) (Mathew & Takagi, 2001).

Tabela 1 - Fosfatos de cálcio e as suas propriedades. Adaptado de (Okada & Matsumoto, 2015) com permissão. Copyright (2015) Elsevier Inc.

Ca/P molar ratio	Chemical formula	Name	Abbr.	Water solubility at 25 °C (g/L)	pH stability range at 25 °C
0.5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Monocalcium phosphate monohydrate	MCPM	~18	0–2
0.5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Monocalcium phosphate anhydrous	MCPA	~17	^a
1.0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Dicalcium phosphate dihydrate (brushite)	DCPD	~0.088	2–6
1.0	CaHPO_4	Dicalcium phosphate anhydrous (monetite)	DCPA	~0.0048	^a
1.2–2.2	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ($n = 3–4.5$)	Amorphous calcium phosphate	ACP	^b	~5–12 ^c
1.33	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Octacalcium phosphate	OCP	~0.0081	5.5–7
1.5	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	α -Tricalcium phosphate	α -TCP	~0.0025	^d
1.5	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	β -Tricalcium phosphate	β -TCP	~0.0005	^d
1.5–1.67	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2$ ($0 < x < 1$)	Calcium-deficient hydroxyapatite	CDHA	~0.0094	6.5–9.5
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hydroxyapatite	HAp	~0.0003	9.5–12
2.0	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Tetracalcium phosphate (hilgenstockite)	TTCP	~0.0007	^d

^a Stable at above 100 °C.
^b Cannot be measured precisely.
^c Always metastable.
^d These compounds cannot be precipitated from aqueous solutions.

As apatites são definidas como um conjunto de compostos de fórmula química geral $\text{M}_{10}(\text{XO}_4)_6\text{Y}_2$, sendo capazes de acomodar um largo espectro de modificações e substituições de íons dentro da sua estrutura. Entre as várias formas de fosfatos de cálcio, estas representam a fase termodinamicamente mais estável e por isso, são consideradas

como o produto final provável em muitas reações biológicas (Liu et al., 2013; Markovic et al., 2004; Mathew & Takagi, 2001; Okada & Matsumoto, 2015; Palmer et al., 2008).

A hidroxiapatite (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, tem sido largamente estudada pelo seu papel em diversas áreas, como a química dos solos, os materiais dentários, a etiologia da cárie, a mineralização óssea, a osteoporose e a administração de medicamentos. Além disso, é considerada o maior componente inorgânico dos ossos e dentes (Liu et al., 2013; Mathew & Takagi, 2001). A HA pode apresentar duas formas de cristal, a hexagonal cujos parâmetros da rede cristalina são $a = b = 9.432 \text{ \AA}$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, e $\gamma = 120^\circ$ e a monoclinica cujos parâmetros são $a = 9.421 \text{ \AA}$, $b = 2a$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, e $\gamma = 120^\circ$. Ambas as formas partilham os mesmos elementos constituintes e apresentam uma relação estequiométrica de Ca/P igual a 1,67 (Kay et al., 1964), sendo a grande diferença a orientação dos grupos hidroxilo. Na HA hexagonal, dois grupos hidroxilo adjacentes apontam para sentidos opostos, enquanto na monoclinica, os grupos hidroxilo têm o mesmo sentido quando localizados na mesma coluna, mas sentidos opostos entre colunas (Howard, 1973; Kay et al., 1964).

A organização estrutural, anteriormente descrita, e característica da HA, permite um vasto conjunto de variações, face à capacidade de retenção de diferentes iões. Como resultado, as apatites, tal como ocorrem nos tecidos biológicos, formações minerais e produtos de laboratório raramente são encontradas na forma estequiométrica pura (Markovic et al., 2004).

Em ambiente fisiológico, a dissolução parcial dos CaP, que ocorre num microambiente ácido resultante da atividade celular, leva a uma supersaturação do fluido biológico, após a qual ocorre a precipitação de diversos iões (Figura 4). As apatites biológicas são por isso, usualmente deficientes em cálcio e detentoras de uma grande variedade de pequenas quantidades de átomos e grupos substitutos, principalmente nas posições ocupadas pelos os iões Ca^{2+} , PO_4^{3-} e OH^- , o que resulta em cristais com propriedades distintas proporcionais ao número de substituições (Mathew & Takagi, 2001). O Ca^{2+} pode ser ocupado por catiões bivalentes ou monovalentes como o Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , H^+ , Na^+ , K^+ ou ter lugares livres, sendo os mais frequentes nas o Mg^{2+} , Na^+ e K^+ (Liu et al., 2013; Okada & Matsumoto, 2015). Por sua vez, o PO_4^{3-} , pode ser substituído por AsO_4^{3-} , VO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SiO_4^{4-} , sendo o mais comum o CO_3^{2-} , que origina a carboapatite (Elliott et al., 1985; Liu et al., 2013). O OH^- por outro lado, é frequentemente substituído por F^- , Cl^- , mas também pode ser por Br^- , O^{2-} , CO_3^{2-} , ter lugares livres ou uma combinação de ambos. Neste local, X da fórmula

geral, quando a apatite é pura cada íon ocupa um local específico, mas quando dois ou mais íons destes estão presentes, interagem entre si e causam alterações estruturais. A fluoroapatite, resultante da substituição do íon OH^- por F^- , é frequentemente encontrada nas estruturas dentárias face à disponibilidade deste íon na cavidade oral (Sudarsanan & Young, 1978). O íon carbono pode então substituir íons em duas localizações distintas, sendo identificadas por substituições do tipo A quando ocorrem no local do íon OH^- e substituições do tipo B quando ocorrem no local do íon PO_4^{3-} . As substituições do tipo B são frequentemente encontradas nas apatites biológicas e por isso o estudo das formas carbonatadas tem especial interesse clínico, visto que altera as propriedades do mineral (Abou Neel et al., 2016; Elliott et al., 1985; Mathew & Takagi, 2001).

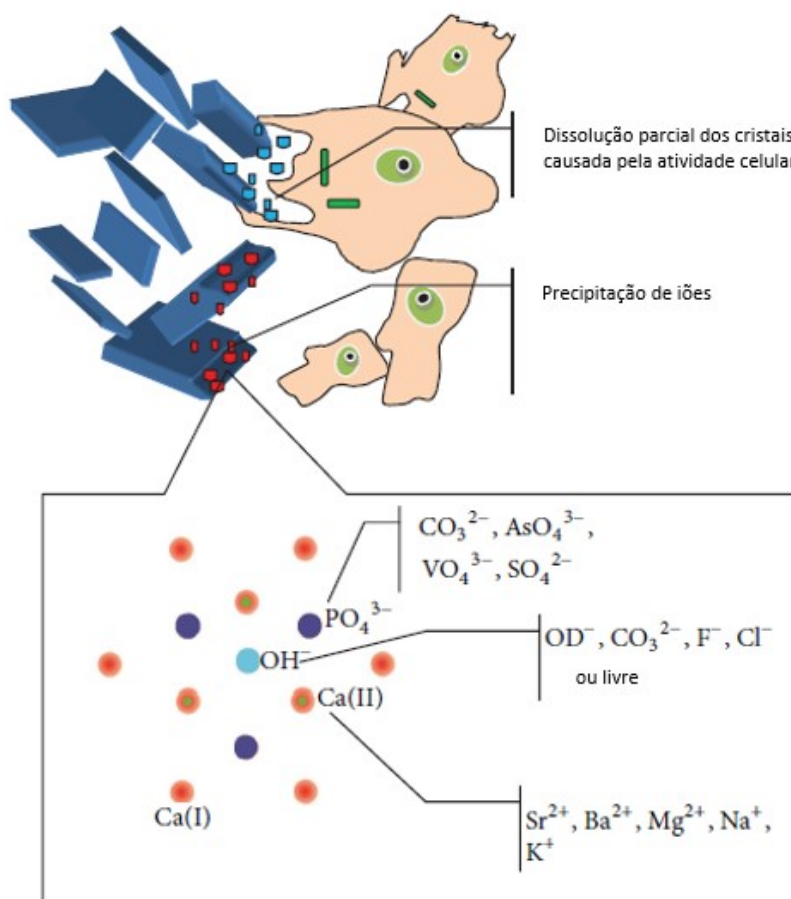


Figura 4 – Esquema do mecanismo de dissolução/precipitação nas apatites biológicas e possíveis substituições. Adaptado de (Liu et al., 2013) com permissão. Copyright (2013)

A apatite biológica pode ser como tal definida como um fosfato de cálcio incorporado por vários tipos de iões, em que o cálcio, o fósforo e o oxigénio são os três elementos principais que a compõem. Como consequência, a relação Ca/P é quase sempre distinta do valor conhecido para a HA estequiométrica, 1,67, podendo apresentar quer valores inferiores quer superiores, mas também valores semelhantes (Liu et al., 2013; Mathew & Takagi, 2001; Okada & Matsumoto, 2015; Palmer et al., 2008).

I.5. OBJETIVO

Neste trabalho pretendeu-se otimizar o processo de formação *in vitro* de hidroxiapatite na presença de colagénio, a partir dos resultados anteriormente obtidos (Araújo, 2019). Para tal, foram considerados os grupos A-C anteriores, com as alterações entretanto introduzidas e avançar em cada passo de acordo com os resultados obtidos da análise elementar.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Grupos Experimentais

Neste trabalho experimental pretendia-se otimizar o processo de formação *in vitro* de hidroxiapatite na presença de colagénio, a partir dos resultados anteriormente obtidos por Araújo, 2019. Para tal foram inicialmente considerados os grupos de estudo de Araújo, 2019, identificados na tabela 2. Contudo, face aos resultados discrepantes obtidos no primeiro ensaio, e ao tempo experimental limitado pela Covid-19, procedeu-se apenas à produção e otimização do grupo A.

Tabela 2– Grupos de Estudo descritos por Araújo, 2019.

Grupo A	Amostra preparada por adição de cloreto de cálcio 0,1 M a uma solução ácida de colagénio (colagénio tipo I de cauda de rato, Sigma-Aldrich), seguida de adição da solução de neutralização a pH 7,4. Evolução do processo de mineralização durante 72 horas a 25°C. Recuperação do mineral para análise;
Grupo B	Amostra preparada como descrito para o grupo A, mas utilizando Recaldent™ CPP-ACP como agente mineralizante;
Grupo C	Amostra preparada como descrito para o grupo A, mas utilizando ProRoot® MTA como agente mineralizante.

II.2. Método Experimental

O método experimental inicialmente utilizado foi o descrito por Araújo, 2019, esquematizado na figura 5, tendo-se procedido, ao longo dos 4 ensaios realizados, à sua otimização e consequente alteração face aos resultados obtidos em cada um.

As soluções de ácido clorídrico 10 mM (HCl), cloreto de cálcio 0,1 M (CaCl₂), cloreto de sódio 0,5 M (NaCl), tampão de fosfatos de sódio 0,1 M, pH 7,4 e de tampão Tris-HCl (hidroximetilaminometano) 0,2 M, pH 7,4 foram produzidas uma única vez, a partir dos reagentes identificados na tabela 3. Os reagentes colagénio tipo I de cauda de rato (CAS 9007-34-5), Recaldent™ CPP-ACP e ProRoot® MTA foram adquiridos dos fornecedores Sigma-Aldrich, GC e Dentsply respetivamente.

Tabela 3 - Reagentes com respetiva densidade/massa molar, CAS-number e fornecedor.

Reagente	Fornecedor	CAS-number	MM/Densidade
Cloreto de cálcio - CaCl_2	Sigma-Aldrich	10043-52-4	110.98 g/mol
Cloreto de sódio - NaCl	Sigma-Aldrich	7647-14-5	58.44 g/mol
Ácido clorídrico - HCl	Sigma-Aldrich	7647-01-0	36,46 g/mol 1.18 g/mL
Tris hidroximetilaminometano	Sigma-Aldrich	77-86-1	121.14 g/mol
Hidrogenofosfato de sódio - Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich	7558-79-4	141.96 g/mol
Di-hidrogenofosfato de sódio - NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich	7558-80-7	137.99 g/mol

A partir das soluções iniciais e reagentes adquiridos, foi preparada uma solução ácida de colagénio de concentração 2 mg/ml por adição de HCl e, uma solução salina de neutralização por adição das soluções tampão Tris- HCl , cloreto de sódio e tampão fosfato de sódio (figura 5).

Os microtubos dos 4 ensaios realizados, foram preparados por adição de 400 μL da solução ácida de colagénio, 150 μL de cloreto de cálcio e 800 μL de solução salina de neutralização (figura 5), tendo-se homogeneizado a solução após cada adição.

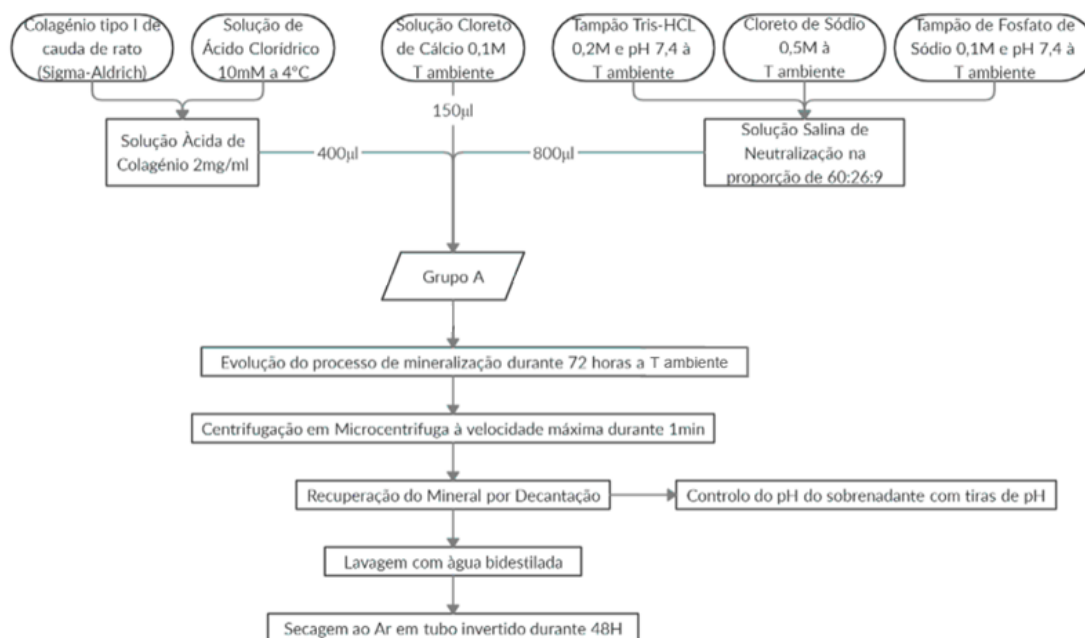


Figura 5 – Esquema representativo do método experimental utilizado e descrito por Araújo, 2019.

No ensaio A0.1 seguiu-se o procedimento da figura 5, tendo-se realizado o processo de mineralização à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ$) não controlada, no ensaio A0.2 a temperatura foi mantida a $\sim 25^\circ$ com controlo e nos ensaios A0.3 e A0.4 a temperatura foi mantida constante a $\sim 21^\circ\text{C}$.

O processo de secagem foi otimizado para a observação em SEM. Para tal, entre a lavagem com água bidestilada e a secagem em tubo invertido durante 48 horas, (Tabela 4), foi realizada a desidratação das amostras com imersão em etanol a percentagens crescentes: álcool a 70% durante 5 min 1 vez, álcool a 96% durante 5 min 2 vezes, álcool a 100% durante 5 min 3 vezes, e em hexametildisilazano (HMDS) durante 15 min 1 vez (Perdigao et al., 1995).

Depois de secas, as amostras dos 4 ensaios foram pesadas em balança analítica e observadas em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, onde foram fotografadas com uma ampliação de 25x.

Tabela 4 - Resumo dos ensaios com respetivas alterações referentes à temperatura e secagem.

Ensaio A0.1	Ensaio A0.2	Ensaio A0.3	Ensaio A0.4
30 microtubos	30 microtubos	4 microtubos	4 microtubos
T ambiente	T $\sim 25^\circ$	T $\sim 21^\circ$	T $\sim 21^\circ$ em ambiente controlado
		Secagem otimizada	Secagem otimizada

II.3. Análise Mineral - SEM e EDS

No Centro de Microscopia Eletrónica (Cmicros) da Egas Moniz, CRL, as amostras foram observadas em microscópio eletrónico de varrimento (SEM), modelo JOEL JSM-5400 (Figura 6), e sujeitas à análise EDS (espectroscopia de energia dispersiva de raios X). Para tal, foram fixadas em cola de carbono num suporte de alumínio e recobertas com ouro-paládio (Figura 7), ~ 20 nm, por *sputtering*, com recurso a um revestidor de bombardeamento iónico.



Figura 6 - Microscópio eletrônico de varrimento modelo JOEL JSM-5400.



Figura 7- Amostras recobertas com ouro-paládio.

As ampliações e tensões de aceleração utilizadas encontram-se identificadas nas figuras presentes nos resultados e discussão.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Num trabalho realizado recentemente na Egas Moniz por Araújo (2019), foram realizados ensaios que permitiram estabelecer algumas das condições experimentais aparentemente conducentes à formação *in vitro* de hidroxiapatite, tal como revelaram os resultados de SEM e EDS. Este trabalho foi baseado no método descrito por Cui et al., (2008), que promove simultaneamente o *self-assembly* do colagénio e o início do processo de mineralização *in vitro*, através da adição de uma solução de cloreto de cálcio e uma solução salina de neutralização a uma solução ácida de colagénio.

A acidificação do colagénio provoca um desarranjo conformacional reversível e um aumento de energia, que desfavorece as interações entre moléculas de colagénio, colocando-as num estado tenso. A rápida reposição do pH a valores fisiológicos favorece a recuperação da estrutura quaternária (*self-assembly*). Assim, o efeito da acidificação prévia do meio no colagénio pode ser revertido adicionando uma solução salina de neutralização. Uma vez que a solução de cloreto de cálcio é adicionada antes da neutralização, é esperado que a formação de fibrilhas de colagénio e a mineralização tenham início simultaneamente.

Em concordância com outros estudos publicados, Araújo, (2019) concluiu, no seu trabalho experimental, que valores de proporção Ca/P próximos a 1,67 (valor teórico) eram obtidos à temperatura ambiente (~25°C). Valores baixos de temperatura estabilizam a fase amorfa, não promovendo a consequente formação de HA, valores entre os 20-25° destabilizam a fase amorfa, favorecendo a formação de HA, enquanto valores superiores à temperatura ambiente afetam a organização tridimensional do colagénio, o que terá implicações no mineral obtido (Lausch et al., 2013; Nudelman et al., 2011; Toroian et al., 2007).

No trabalho anterior realizado por Araújo, 2019, à temperatura ideal (~25°) foram obtidos valores médios de massa mineral de 54,8 mg e proporções de Ca/P médias de 1,72. O objetivo inicial deste trabalho experimental era otimizar o processo de formação *in vitro* de hidroxiapatite, com base nestes resultados, considerando os mesmos grupos A-C, com as alterações entretanto introduzidas, e avançar em cada passo de acordo com os resultados obtidos da análise elementar por espectroscopia de WDXRF. No entanto, face aos resultados obtidos no ensaio A0.1, apenas o grupo A foi otimizado e, perante a

impossibilidade de realização da análise proposta, foi realizada a análise EDS e observação SEM.

III.1. Ensaio A0.1

Inicialmente foram preparados 30 microtubos do Grupo A seguindo o procedimento de Araújo (2019), e colocados à temperatura ambiente. Este primeiro ensaio teve como objetivo testar a reprodutibilidade do trabalho efetuado e avaliar a eventual necessidade de otimização deste grupo.

Após a adição da solução salina de neutralização e homogeneização do microtubo foi controlado o pH do primeiro tubo com recurso a tiras de pH, tendo-se obtido um pH de ~7 (Figura 8). Após 30 min, foi possível observar uma alteração da turbidez (Figura 9), como reportada noutros trabalhos (Araújo, 2019 e Cui et al., 2008), e atribuído por diversos autores ao *self-assembly* do colagénio. As observações feitas às 24 h, 48 h e 72 h seguintes foram também consistentes com os resultados dos trabalhos anteriores, tendo-se verificado um aumento da turbidez, mas também um aumento da viscosidade do meio, característica da formação das fibrilhas de colagénio.



Figura 8 - Controlo de pH no minuto zero, pH ~7.

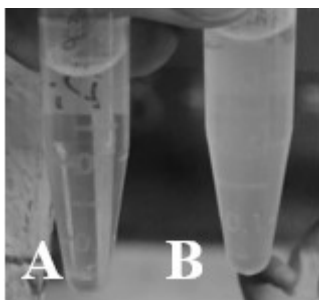


Figura 9 - No microtubo B é possível observar o aumento da turbidez ao fim de 30 min, quando comparado com o microtubo A antes da adição da solução salina de neutralização.

Findas as 72 horas, os microtubos foram centrifugados e descartado o sobrenadante, a partir do qual se fez o controlo de pH, tendo-se registado em todos um pH neutro, ~7. As amostras foram então lavadas com água destilada, secas em tubo invertido durante 48 horas e pesadas em balança analítica. A massa média calculada foi de 2,1 mg, um resultado substancialmente inferior ao obtido por Araújo, (2019) nas mesmas condições, 54,8 mg.

Tendo em conta estes resultados, as amostras foram observadas em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, a uma ampliação de 25x, (Figura 10), onde foi possível verificar que o mineral obtido não era uniforme. Este apresentava zonas de maior translucidez e zonas de maior opacidade, sugerindo uma constituição heterogénea. A fim de confirmar estas observações, as amostras foram sujeitas às análises SEM e EDS, uma vez que a análise elementar por espectroscopia de WDXRF requer o mínimo de 1gr de amostra mineral.



Figura 10 - Imagem de mineral obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, onde é possível observar a heterogeneidade do mesmo. Ampliação 25x.

Nas imagens de SEM (figura 11), comprovou-se a heterogeneidade do mineral obtido, pois são observadas zonas de cor branca, correspondentes às zonas mais opacas nas imagens de estereomicroscópio, e zonas escuras, correspondentes às zonas mais translúcidas. A análise EDS revelou também uma heterogeneidade na constituição do mineral (figura 11), tendo sido detetado nas zonas claras carbono, oxigénio, sódio, fósforo, cloro e cálcio, enquanto nas zonas escuras se detetou apenas O, P, Cl e Ca, com Ca/P de 18 e 9,75 respetivamente.

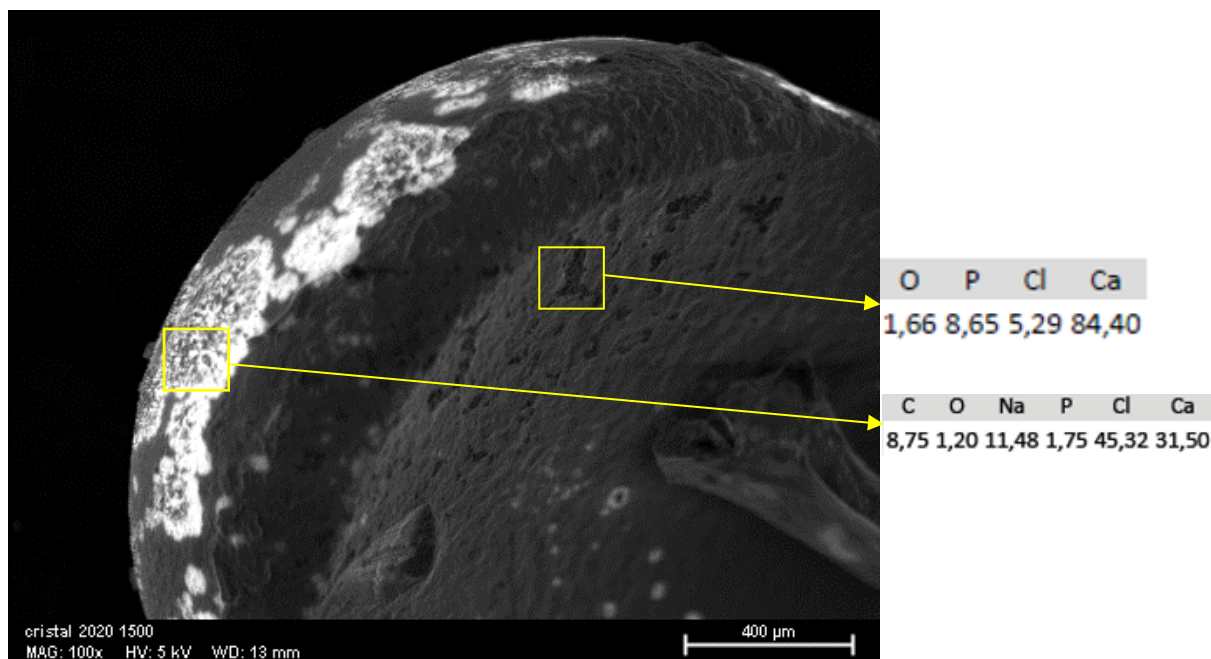


Figura 11 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 100x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.1. É possível observar a heterogeneidade do mesmo, pelas zonas brancas e escuras observadas, e pelos valores de análise EDS em cada zona do mineral.

Os resultados foram, portanto, significativamente distintos dos obtidos no trabalho anterior, não só a nível de massa - 2,1 mg neste ensaio e 54,8 mg no trabalho anterior - mas também da constituição do próprio mineral – 18 e 9,75 relação Ca/P neste ensaio e 1,72 no trabalho anterior. A disparidade de resultados pode ser atribuída à realização de ambos os ensaios sem controlo da temperatura, sendo que, durante o aqui descrito, se registaram valores máximos superiores a 30°C. De facto, e como já referido, temperaturas acima de ~25° podem gerar alterações da conformação do colagénio e consequentemente no mineral obtido. Tendo em conta este fator houve necessidade, não só de efetuar um segundo ensaio em ambiente com temperatura controlada, mas de focar o presente trabalho apenas na otimização do grupo A, tendo-se adiado a realização dos ensaios relativos aos grupos B e C. A decisão de otimização resultou do facto de este ser um estudo promissor, com etapas seguintes já idealizadas, que requerem que o método seja altamente reprodutível.

III.2. Ensaio A0.2

Numa primeira fase do processo de otimização do Grupo A, foi realizado o ensaio A0.2, em que foram preparados 30 microtubos e colocados numa estufa a 25°.

Durante o ensaio, uma vez que a temperatura exterior permanecia excecionalmente quente, o termómetro da estufa foi controlado diariamente, tendo-se registado oscilações de temperatura entre os 25-32°. Não obstante, o ensaio não foi interrompido e, após as 72 horas, procedeu-se à secagem do mineral obtido como descrito anteriormente. O pH dos sobrenadantes apresentou valores neutros, ~7, e na pesagem obteve-se uma massa média de 3,3 mg. Um valor novamente inferior aos resultados de Araújo, 2019, mas concordante com os valores obtidos no ensaio A0.1.

Dos 30 microtubos preparados, foram selecionados 3 aleatoriamente para serem observados em estereomicroscópio/SEM e sujeitos à análise EDS. Na figura 12, imagem de uma das amostras selecionadas, é possível observar que, ao contrário do mineral do ensaio A0.1, este apresenta uma translucidez uniforme e homogeneidade de composição aparente.



Figura 12 - Imagem de mineral obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, onde é possível observar a transparência do mesmo. Ampliação 25x.

A observação em SEM veio confirmar a homogeneidade do mineral, visto que, em baixa ampliação, como se pode verificar na figura 13, não é possível identificar diferentes zonas como na figura 11.

Quando analisadas em pormenor, na ampliação de 200x, as amostras sugerem a existência de uma estrutura tridimensional (figuras 14, 15 e 16). No entanto, é difícil de

caracterizar pela falta de detalhe na superfície. Esta pode ser resultado do processo de secagem utilizado não ser adequado para a preservação da estrutura tridimensional do material orgânico. A secagem diretamente ao ar pode levar a uma distorção da estrutura tridimensional devido à tensão de superfície exercida pela água. Adicionalmente, as amostras quando submetidas ao SEM, por serem analisadas sob vácuo, necessitam de ser sujeitas a um processo de secagem completa (D. Bray, 2000).

Vários procedimentos de secagem têm sido testados em espécimes biológicos e com arranjos tridimensionais, como é o caso da amostra em questão (Braet et al., 1997; Bray et al., 1993; Jusman et al., 2014; Lee & Chow, 2012). De entre as várias técnicas existentes e regularmente utilizadas, a desidratação com percentagens de álcool crescentes e posterior imersão em HMDS é a que, em espécimes animais e com arranjos tridimensionais, mostrou melhores resultados em termos de preservação dos tecidos aquando da observação em SEM (Braet et al., 1997; D. Bray, 2000; D. F. Bray et al., 1993; Jusman et al., 2014; Lee & Chow, 2012).

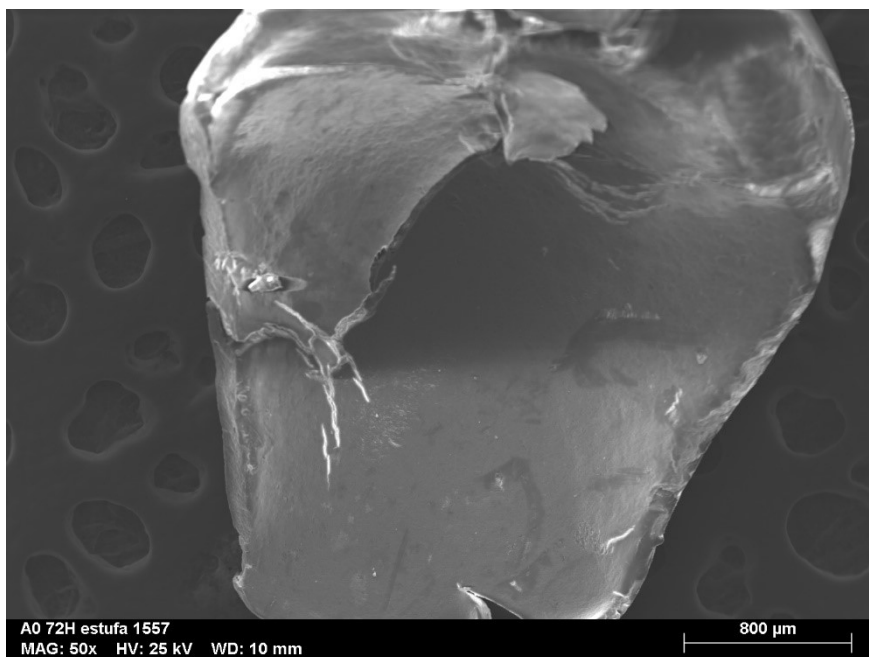


Figura 13 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 50x, onde é possível observar a homogeneidade de uma amostra de mineral do ensaio A0.2.



Figura 14 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 200x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.2. A imagem sugere a existência de uma estrutura tridimensional, pela existência de uma leve granulação.

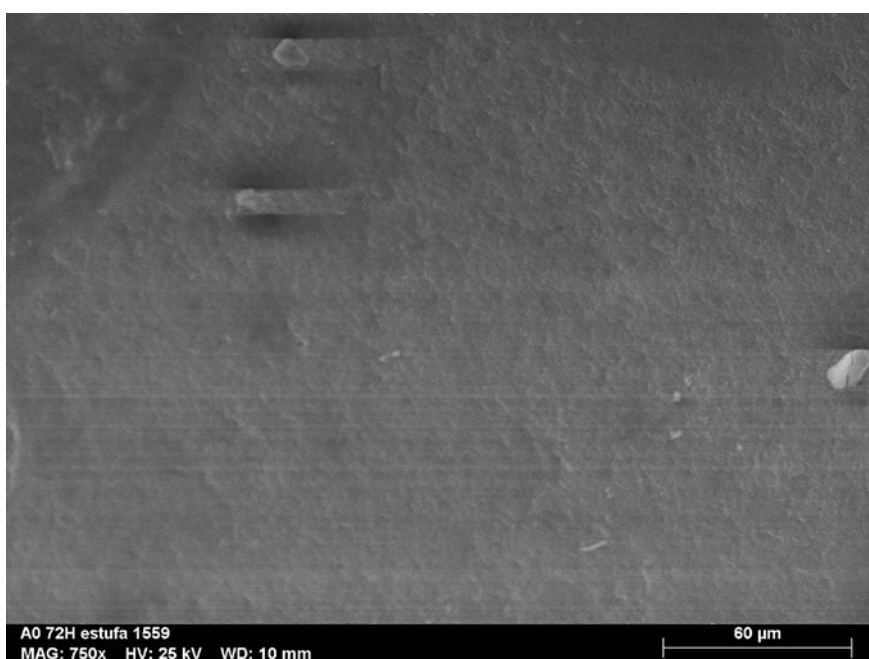


Figura 15 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 200x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.2. A imagem sugere a existência de uma estrutura tridimensional, pela existência de uma leve granulação.



Figura 16 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 200x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.2. A imagem sugere a existência de uma estrutura tridimensional, pela existência de uma leve granulação.

Relativamente à análise EDS, as 3 amostras tiveram resultados semelhantes nos elementos identificados como constituintes (Figura 17, 18 e 19). Elementos como o alumínio, cobre e ouro são resultado da liga de ouro-paládio com que as amostras foram recobertas, enquanto o C, O, Ca, Cl, sódio e P são constituintes do mineral. Apesar de apresentarem os mesmos elementos, a percentagem deles em cada uma é variável, e os valores da relação de Ca/P são discrepantes, com resultados de 2,9, 2,4 e 1,7 respetivamente.

A amostra A0.2.1, quando comparada com as restantes, apresenta uma elevada percentagem de C, 47,41 e de O, 26,19 e reduzida de Ca, 14,85 e P, 5,04. Quando observados os picos do gráfico da Figura 17, verifica-se que os picos de Ca e P são menores ou ao mesmo nível que os de Au (resultantes do recobrimento), o que indica a perda destes iões, ou seja, os iões disponíveis não foram totalmente incorporados no mineral analisado.

A amostra A0.2.2 apresenta picos de Ca e P evidentes (Figura 18), no entanto quando comparada com a amostra A0.2.3, que apresenta o melhor valor de relação Ca/P, observa-se que o valor de C corresponde a menos de 50% do valor desta, o valor de Ca é aproximadamente o dobro e os valores de P são semelhantes.

A amostra A0.2.3, cujo valor da relação é 1,7, é concordante com a média de valores obtida por Araújo, 2019, no entanto as imagens obtidas em SEM quando comparadas, são significativamente distintas.

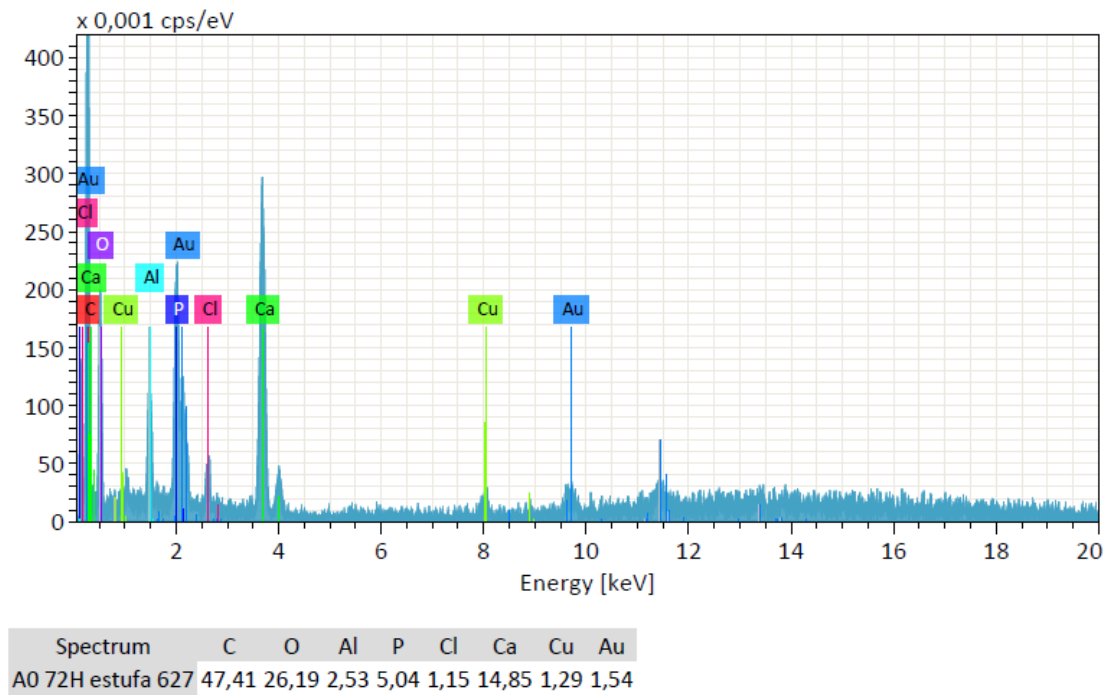


Figura 17 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.2.1. Relação Ca/P 2,9.

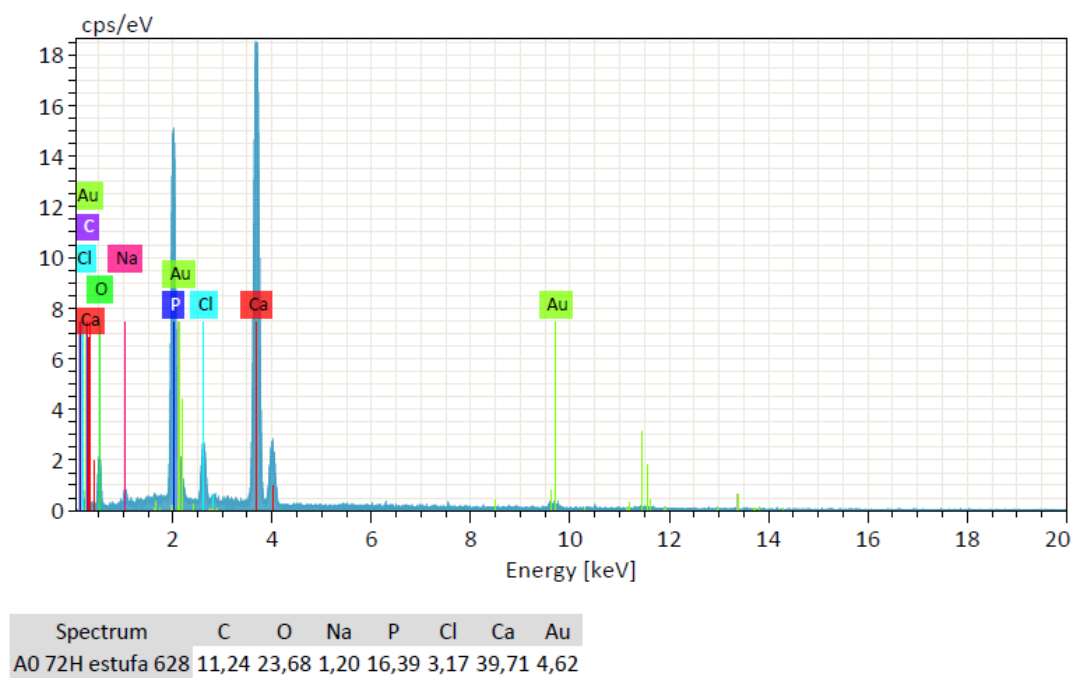


Figura 18 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.2.2. Relação Ca/P 2,4.

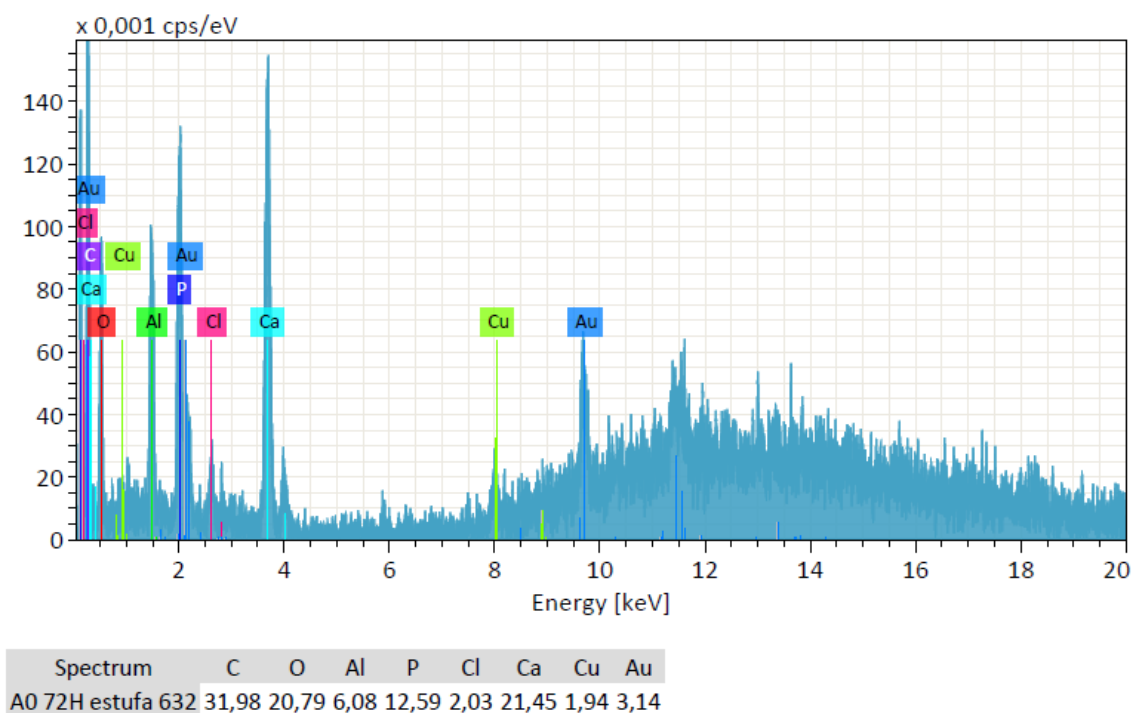


Figura 19 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.2.3. Relação Ca/P 1,7.

Uma tal variação na relação e percentagem dos elementos constituintes, pode ser resultado da oscilação da temperatura. Como já referido, temperaturas acima da ambiente podem influenciar a estrutura do colagénio que por sua vez pode interferir na estrutura do mineral. Por outro lado, a diferença nas imagens obtidas em SEM pode estar relacionada com o processo de secagem e consequente perda de estrutura.

Considerando estes resultados optou-se por realizar um terceiro ensaio em que o objetivo seria avaliar o efeito de um processo de secagem aquando da visualização da estrutura do mineral e o efeito da estabilidade da temperatura no intervalo de 20-25° durante as 72h.

III.3. Ensaio A0.3

No ensaio A0.3 foram preparados 4 microtubos e colocados em ambiente de temperatura controlada e mantida a 21-22°C. Embora se tenha utilizado um método pouco sofisticado (figura 20), conseguiu-se controlar a temperatura durante todo o ensaio, registando-se valores entre 21 e 22°C nas horas de temperatura atmosférica mais elevada.

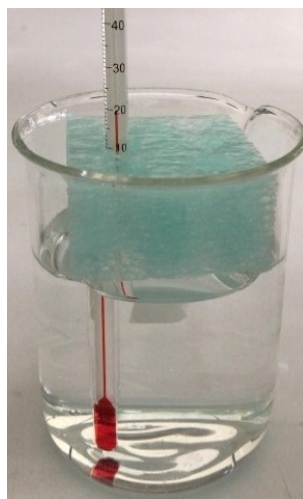


Figura 20 – Imagem obtida durante o ensaio realizado com temperatura controlada entre 21 e 22°C.

Foram também realizados controlos fotográficos dos microtubos aos tempos $t=0$, $t=0,5$, $t=1$, $t=24$, $t=48$ e $t=72$ horas (figura 21), onde se pode observar uma evolução favorável (aumento) da turbidez e viscosidade, consistente com os resultados descritos por Araújo, 2019, e na literatura.

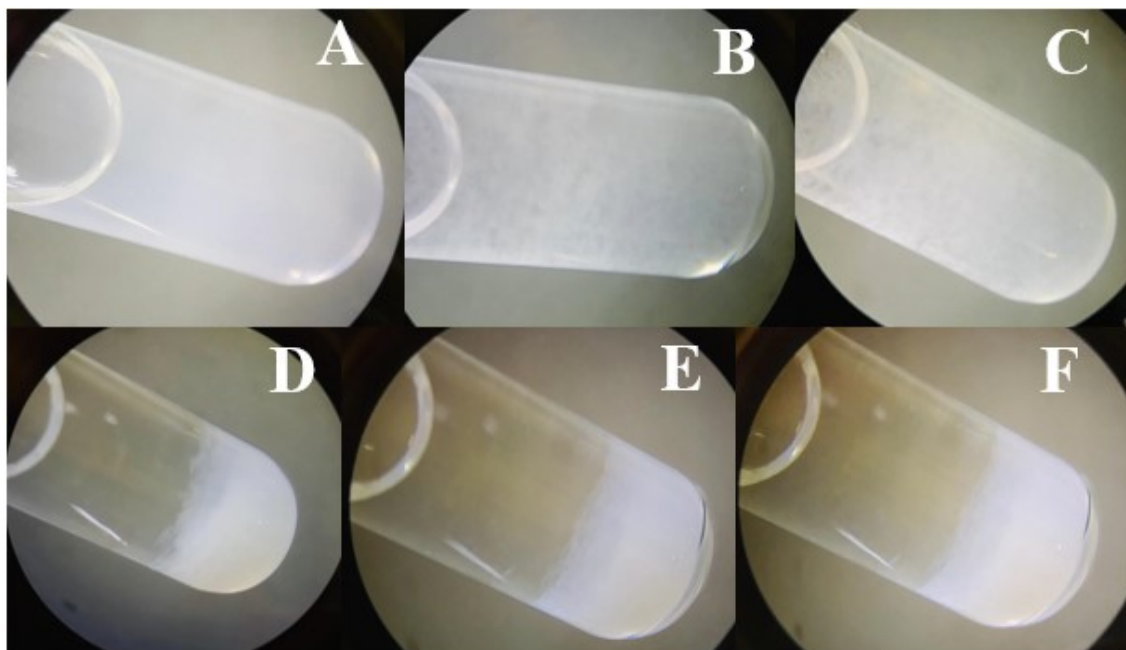


Figura 21 - Controlo fotográfico onde é possível observar o aumento da turbidez e viscosidade ao longo do tempo. A) 0 h; B) 0,5 h; C) 1 h; D) 24 h; E) 48 h; F) 72 h.

Após as 72 horas, os microtubos foram centrifugados e confirmado o pH ~ 7 dos vários sobrenadantes. Os *pellets* obtidos foram então sujeitos a uma desidratação com recurso a percentagens crescentes de álcool e posteriormente imersos em HMDS, antes de se proceder à secagem ao ar em tubo invertido durante 48 horas. A massa média de mineral obtida neste ensaio foi de 1,8 mg, um resultado novamente inferior ao de Araújo (2019).

Dos 4 microtubos foram selecionados 2 aleatoriamente para serem observados em estereomicroscópio/SEM e sujeitos à análise EDS. As imagens obtidas em estereomicroscópio revelaram um mineral opaco, de cor branca e de aparência homogênea (figura 22), substancialmente diferente dos obtidos nos ensaios A0.1 e A0.2.



Figura 22 - Imagem de mineral obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, onde é possível observar a opacidade homogênea do mesmo. Ampliação 25x.

Quando observadas em SEM, as amostras evidenciaram a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas como é possível observar nas figuras 23 e 24. Adicionalmente, a composição revelou-se aparentemente uniforme, visto que não se visualizaram zonas distintas. As imagens obtidas, apesar de distintas das publicadas no trabalho de Araújo, 2019, que se pressupunha serem de ACP, são similares às observações de hidroxiapatite feitas por alguns autores em SEM (Geng et al., 2017; Panggabean, 2018).

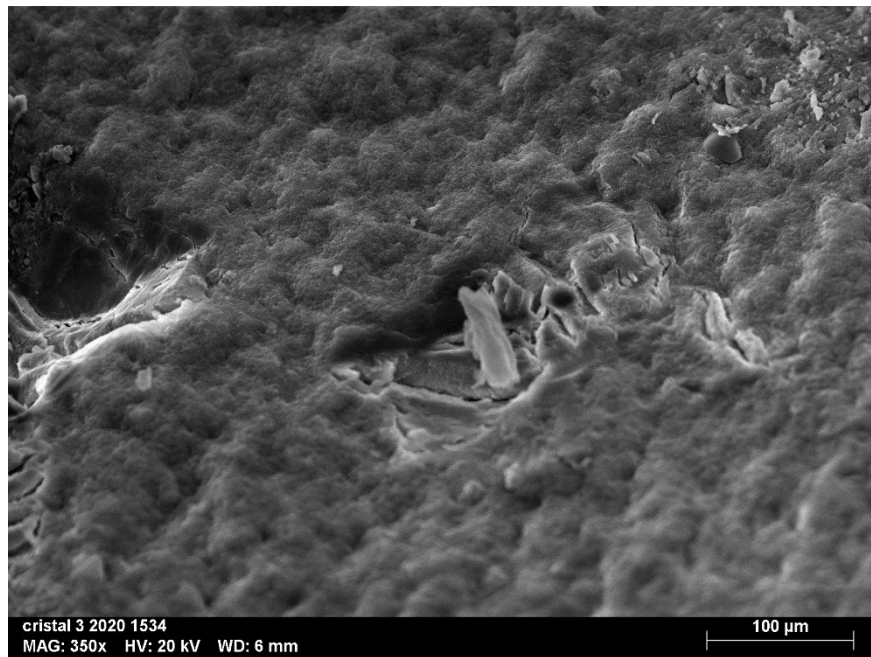


Figura 23 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 350x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.3. É possível observar a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas.

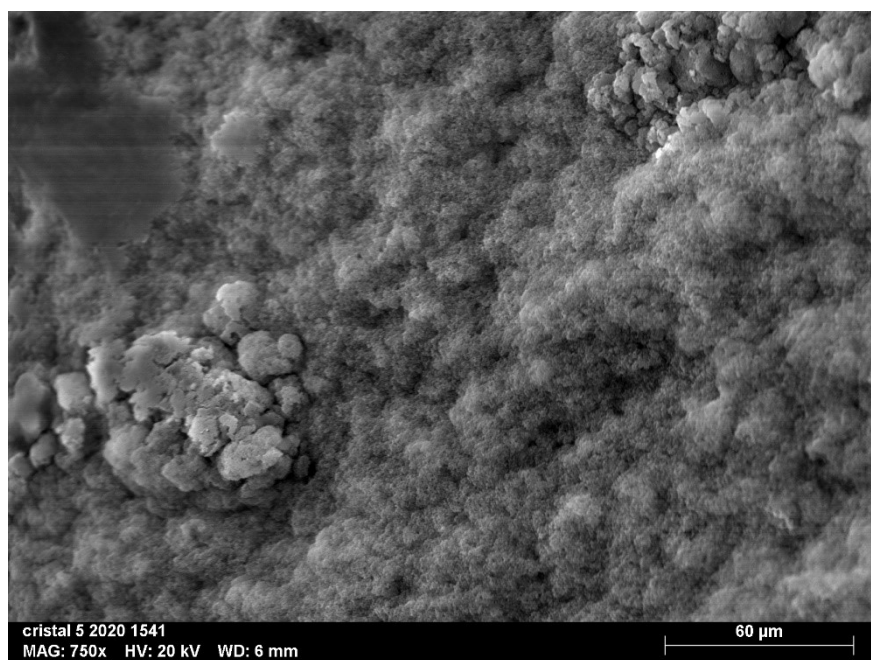


Figura 24 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 750x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.3. É possível observar a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas.

A análise EDS das duas amostras mostrou resultados semelhantes de composição. Em ambas foram identificados os elementos C, O, Na, P, Cl, Ca e Au em percentagens similares (figuras 25 e 26). Como já mencionado, o Au resulta do recobrimento com ouro-paládio e os restantes elementos são com os reais constituintes da amostra.

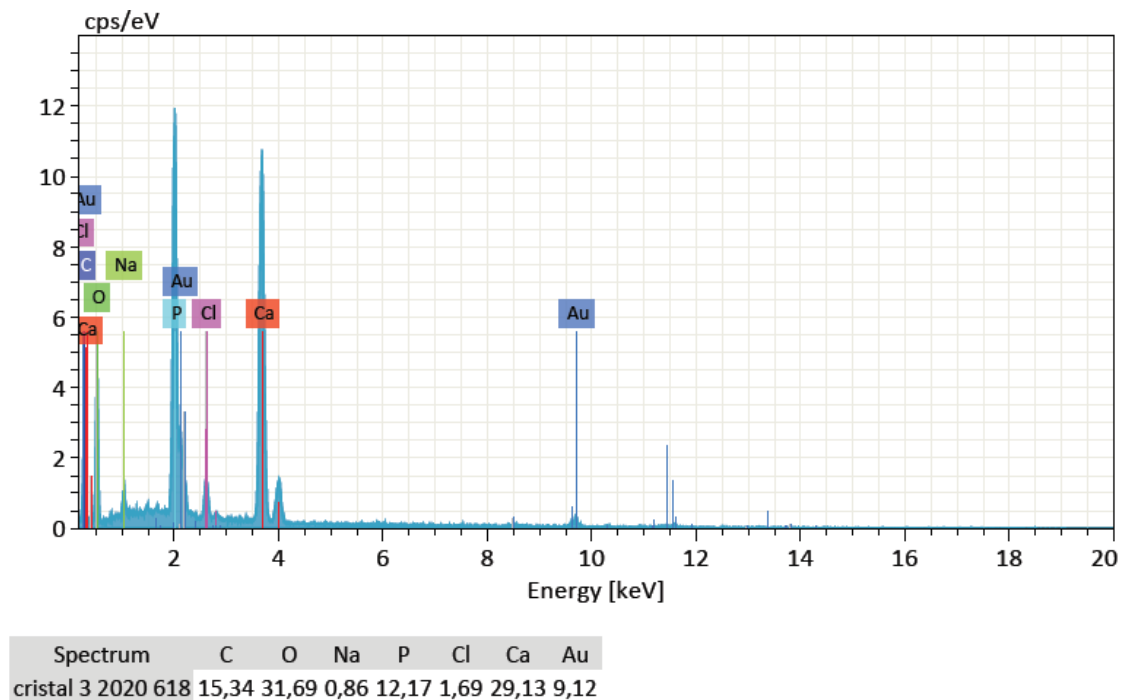


Figura 25 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.3.1. Relação Ca/P 2,3.

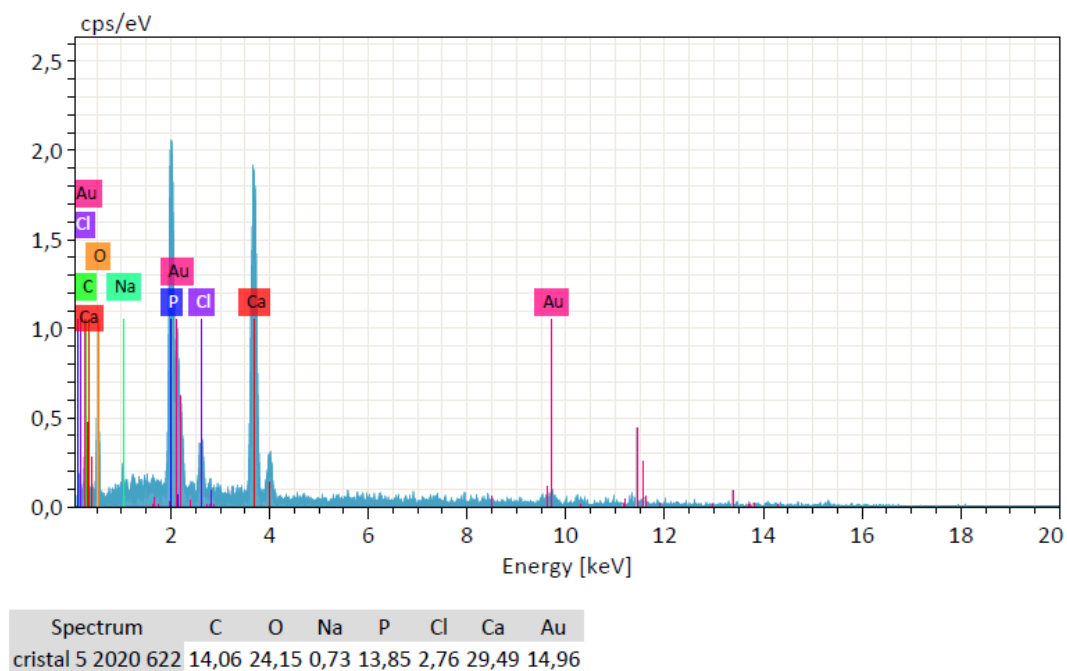


Figura 26 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.3.2. Relação Ca/P 2,1.

Embora os resultados elementares sejam equivalentes aos registados por Araújo, 2019, a relação Ca/P é superior, tendo-se estimado valores de 2,3 e 2,1 para a amostra A0.3.1 e A0.3.2, respetivamente. Os valores obtidos são, contudo, semelhantes a alguns do ensaio A0.2, realizado na estufa a 25°, ainda que a aparência do mineral e os valores de percentagem de cada elemento sejam distintos.

O presente ensaio levantou então duas hipóteses explicativas dos resultados obtidos:

1ª O procedimento poderá requerer otimização adicional da temperatura de mineralização, caso exista uma condutora a uma razão Ca/P de 1,67 pelo método usado;

2ª O mineral embora aparente ser homogéneo ao nível microscópico (por SEM), poderá apresentar heterogeneidade ao nível atómico, ou seja, poderá não ser uma hidroxiapatite pura e apresentar algumas substituições iónicas.

Para estudar estas hipóteses realizou-se um novo ensaio, com o objetivo de aceitar/rejeitar a 1ª hipótese (secção III.4). Com o intuito de avaliar a 2ª hipótese, desenvolveu-se um modelo teórico com base nos conhecimentos descritos na literatura sobre as apatites biológicas (secção III.5).

III.4. Ensaio A0.4

O ensaio A0.4 teve o objetivo de otimizar as condições de temperatura de modo a verificar se a relação de Ca/P poderia ser aproximada do valor teórico, 1,67. Foram preparados 4 microtubos e colocados num microambiente que garantiu que durante as 72 horas estes se encontravam a temperatura uniforme e sem possibilidade da existência de variações nas suas superfícies.

A figura 27 apresenta os controlos fotográficos efetuados às 24, 48 e 72 horas, onde é visível um aumento da turbidez e viscosidade do meio mais evidente do que os registados no ensaio anterior (figura 20).

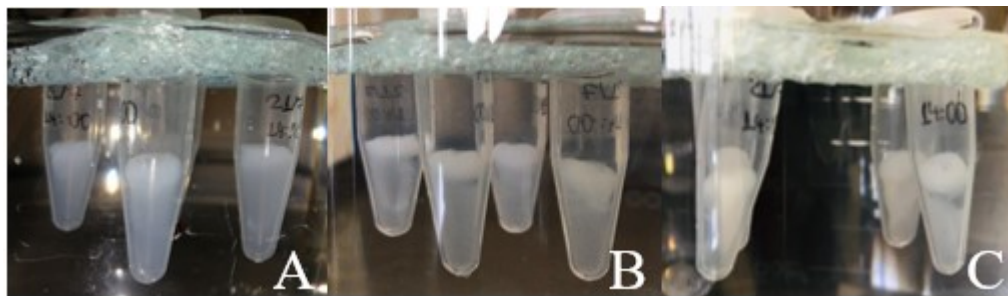


Figura 27 - Controlo fotográfico onde é possível observar o aumento da turbidez e viscosidade ao longo do tempo. A) 24h; B) 48h; C) 72h.

Após 72 horas, seguiu-se o mesmo procedimento de secagem utilizado no ensaio A0.3. Obteve-se um pH dos sobrenadantes ~ 7 e uma massa média de 2,1mg. Tal como anteriormente, a massa foi inferior aos resultados de Araújo, 2019, no entanto, semelhante aos ensaios anteriores.

Dois dos microtubos foram selecionados aleatoriamente para serem observados por estereomicroscópio/SEM e sujeitos a análise EDS.

A observação em estereomicroscópio revelou amostras de aparência similar às do ensaio anterior, opacas, de cor esbranquiçada e aparentemente homogêneas (Figura 28).



Figura 28 - Imagem de mineral obtida em estereomicroscópio didático Leica EZ4D, Ampliação 25x.

As imagens de SEM revelaram, tanto em baixa ampliação (Figuras 29 e 31) como numa ampliação mais elevada (figuras 30 e 32), a existência de uma estrutura tridimensional e homogeneidade. Nas imagens de baixa ampliação é possível identificar um padrão na superfície do mineral que, quando ampliando à semelhança do ensaio anterior, corresponde a aglomerados de mineral e pequenas esferas.

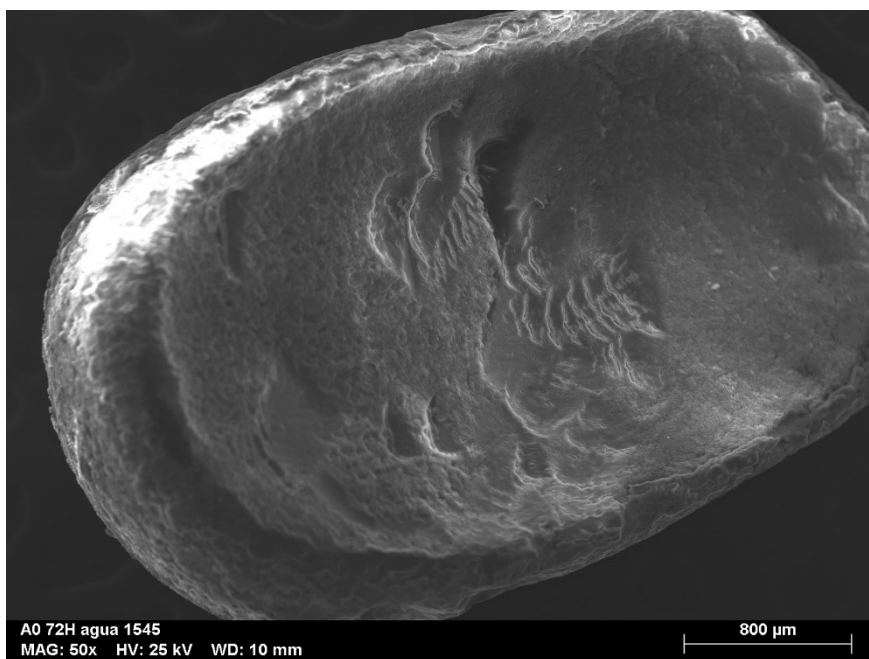


Figura 29 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 50x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.4. É possível observar a existência de uma estrutura tridimensional e homogeneidade.

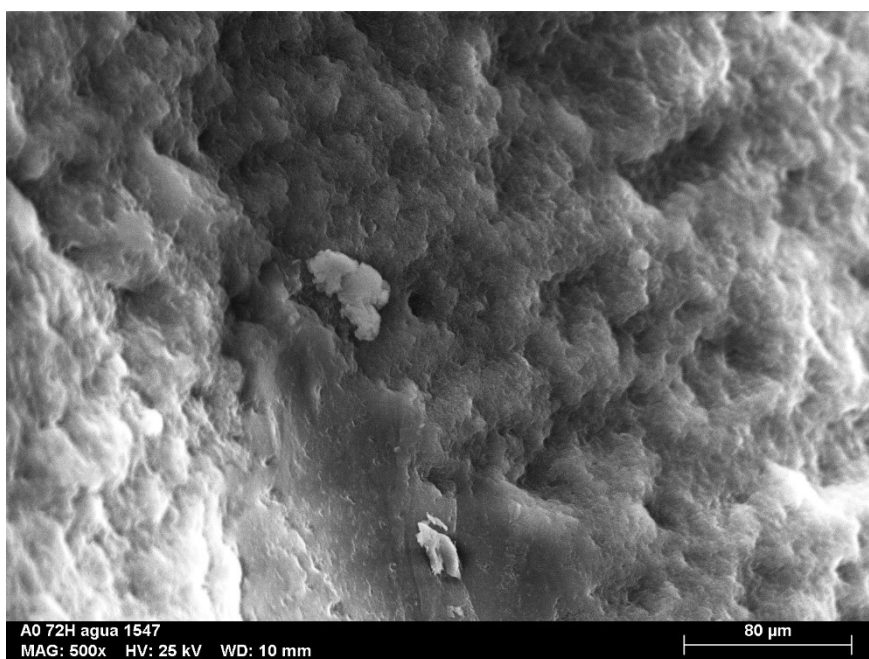


Figura 30 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 500x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.4. É possível observar a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas.

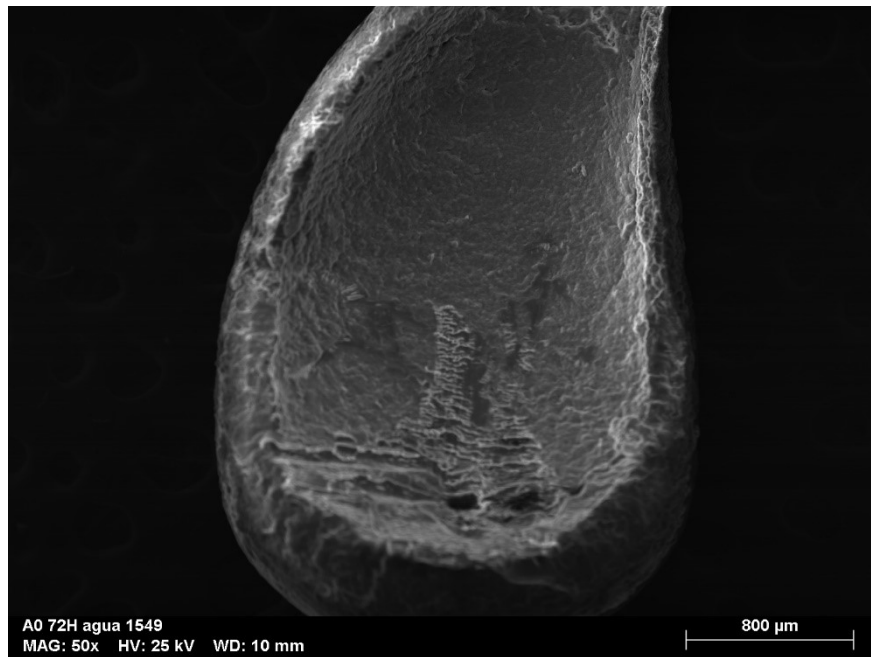


Figura 31 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 50x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.4. É possível observar a existência de uma estrutura tridimensional e homogeneidade.

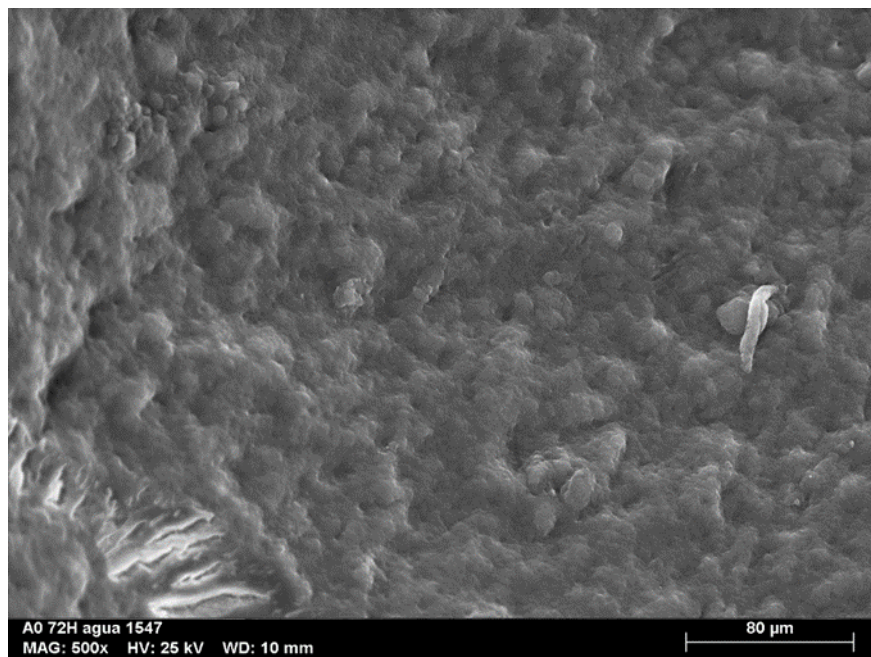


Figura 32 - Imagem obtida em SEM, a uma ampliação de 500x, de uma amostra do mineral do ensaio A0.4. É possível observar a existência de uma conformação tridimensional, com aglomerados de mineral e pequenas esferas.

A análise EDS das amostras identificou constituições semelhantes entre ambas, tanto na presença dos elementos, C, O, Na, P, Cl, Ca e Au, como nas percentagens dos mesmos (figura 33 e 34). Por sua vez, a relação Ca/P foi idêntica à obtida no ensaio anterior, com valores de 2,4 e 2,3 para as amostras A0.4.1 e A0.4.2 respetivamente.

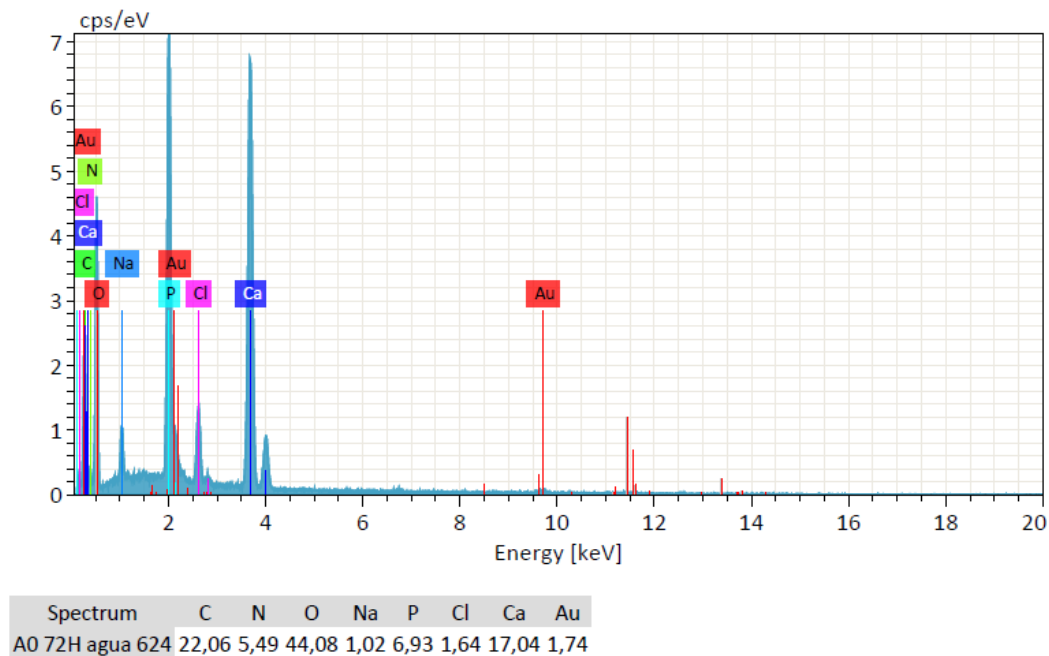


Figura 33 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.4.1. Relação Ca/P 2,4.

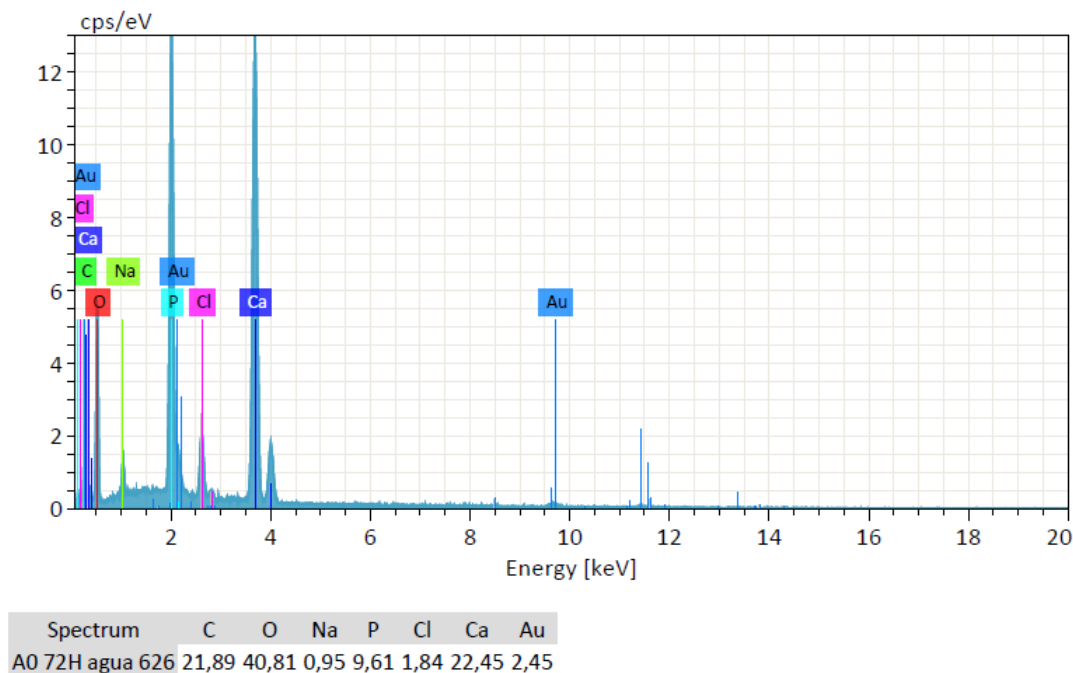
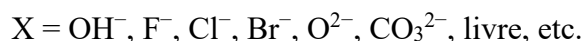
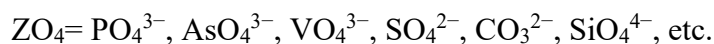
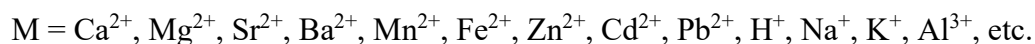


Figura 34 - Gráfico da análise EDS da amostra A0.4.2. Relação Ca/P 2,3.

Tendo em conta os resultados deste ensaio, em que todos os passos desestabilizadores foram otimizados (secagem e temperatura), e que as observações em SEM são consistentes nos últimos dois ensaios e idênticas a observações descritas na literatura, foi dado como otimizado o processo de mineralização e procedeu-se ao estudo da 2ª hipótese proposta.

III.5. Hidroxiapatite pura ou Conjunto de Apatites – modelo

Apatite é um termo geral utilizado para minerais cristalinos que podem ser representados pela fórmula $M_{10}(ZO_4)_6X_2$, em que M, ZO_4 e X podem ser substituídos por uma variedade de iões:



As apatites mais comuns na natureza são as com cálcio e fosfato, ou seja, $M = Ca^{2+}$ e $ZO_4 = PO_4^{3-}$. A Hidroxiapatite pura, cuja fórmula química é, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, acontece quando $X = OH^-$ e apresenta uma relação de Ca/P igual a 1,67. No entanto, as apatites, tal como ocorrem nos tecidos biológicos, formações minerais e produtos de laboratório, podem incorporar uma grande variedade de impurezas e raramente são encontradas na forma estequiométrica pura, ou seja, com relação $Ca/P = 1,67$. Normalmente, estas são deficientes em cálcio e incorporam iões com carga positiva como o Mg^{2+} , Na^+ e K^+ e iões com carga negativa como o CO_3^{2-} , F^- e Cl^- , sendo mais frequente o CO_3^{2-} que pode substituir o PO_4^{3-} e o OH^- (Liu et al., 2013; Mathew & Takagi, 2001; Okada & Matsumoto, 2015).

As apatites biológicas, não estequiométricas, podem então ser resumidas numa forma generalista em que são consideradas as substituições mais comuns:



Em que M representa os iões Mg^{2+} , Na^+ e K^+ e X o número de substituições de Ca, Y o número de substituições de PO_4 por CO_3 e Z o número de substituições de OH por

F/Cl (Abou Neel et al., 2016; Liu et al., 2013; Mathew & Takagi, 2001; Okada & Matsumoto, 2015).

Com base nestes fundamentos teóricos, os valores de Ca/P obtidos nos ensaios A0.2, A0.3 e A0.4 não indicam necessariamente que o objetivo de promover a mineralização *in vitro* na presença de colagénio não foi atingido. Uma vez que, tal como explicado anteriormente, raramente se encontram apatites biológicas puras, pelo que os valores de Ca/P podem ser superiores ou inferiores ao valor estequiométrico, 1,67.

Na tabela 5, tabela resumo da relação Ca/P e respetiva composição elementar das amostras, estimada por EDS, é possível constatar que apenas uma, a A0.2.3, apresenta um valor próximo da estequiometria pura, 1,67. No entanto, estão presentes no mineral iões C, O e Cl, o que nos indica que, embora haja um resultado desejável, não significa necessariamente que seja pura. Nas restantes amostras os valores de Ca/P são superiores a 2, e, portanto, não compatíveis com nenhum valor de relação Ca/P presentes na tabela 1, o que apoia a teoria de que provavelmente estaremos perante apatites impuras ou não estequiométricas.

Tabela 5 – Tabela resumo da relação Ca/P e composição das amostras.

Amostra	Ca/P	%C	%O	%Ca	%P	%Cl	%Na
A0.2.1	2,9	47,41	26,19	14,85	5,04	1,15	0
A0.2.2	2,4	11,24	23,68	39,71	16,39	3,17	1,2
A0.2.3	1,7	31,98	20,79	21,45	12,59	2,03	0
A0.3.1	2,3	15,34	31,69	29,13	12,17	1,69	0,86
A0.3.2	2,1	14,06	24,15	29,49	13,85	2,76	0,73
A0.4.1	2,4	22,06	44,08	17,04	6,93	1,64	1,02
A0.4.2	2,3	21,89	40,81	22,45	9,61	1,84	0,95

Tendo em conta os elementos identificados na análise EDS e as substituições descritas na literatura, gerou-se a hipótese de que o mineral obtido poderá ser um misto de hidroxiapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, cloroapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{Cl})_2$ e carboapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$, com défice de iões OH/Cl, uma vez que X na equação anteriormente referida pode estar livre. Assim, a diferença dos valores encontrados de proporção Ca/P para o valor teórico 1,67, será resultado do cálcio presente na carboapatite.

Para testar esta hipótese foi necessário desenvolver um modelo que procura estimar o balanço das percentagens dos compostos moleculares identificados, respeitando a

composição elementar das amostras. O modelo em questão foi desenvolvido utilizando o *Simplex Method* associado ao *Solver* do Microsoft Excel.

A teoria e validação do *Simplex Method*, encontra-se descrita na literatura, tendo este já sido utilizado em problemas no âmbito da parametrização molecular e otimização de variáveis químicas (Bezerra et al., 2016; Santos et al., 2010; Krause & Lott, 1974; Pasamontes & Callao, 2006). O *simplex* é uma figura geométrica cujo número de vértices é mais um do que o número de dimensões do espaço que ocupa, sendo cada dimensão uma variável experimental. Quando duas variáveis estão a ser analisadas simultaneamente, o *simplex* é um triângulo; com três variáveis, é um tetraedro e com mais de três variáveis, não é possível visualizar, porque terá quatro ou mais dimensões. O primeiro passo deste método consiste em definir a resposta a ser otimizada – função objetivo - e, o segundo passo consiste em identificar as variáveis que a afetam e os limites das mesmas. O modelo irá assumir, num sistema hipotético, que o máximo de resposta X é o ideal desejado e, desta forma, o *simplex* será alterado através da rejeição das respostas não ideais, até atingir o ponto ideal, sendo que o tamanho inicial da figura geométrica irá determinar o quão precisa é a localização deste (Krause & Lott, 1974).

A fim de comprovar a hipótese descrita, definiu-se então como função objetivo minimizar o valor de iões sobrantes. Isto é, com os valores disponíveis dados pela análise EDS pretende-se estimar qual o máximo de hidroxiapatite, cloroapatite e carboapatite que podem estar presentes nas amostras, e se alguma destas pode não estar presente. Neste contexto, as variáveis que afetam a função objetivo são, por isso, a quantidade disponível de cada ião e a quantidade necessária para formar cada uma das apatites.

Com recurso ao *Solver do Microsoft Excel*, foi construída uma tabela seccionada em três blocos (figura 35), cada um com a respetiva fórmula química de apatite e número de iões, e um quarto bloco com três colunas (Figura 36). A primeira coluna onde se colocam as quantidades de cada ião resultantes da análise EDS, a segunda que estima a quantidade utilizada no total das apatites, e a terceira que calcula o valor sobran-te de cada elemento.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
3									
4		Qty 1	0		Qty 2	0		Qty 3	0
5		Ca10(PO4)6(OH)2			Ca10(PO4)6(Cl)2			Ca10(CO3)6(OH)2	
6	C	0	0		0	0		6	0
7	O	26	0		24	0		20	0
8	Ca	10	0		10	0		10	0
9	P	6	0		6	0		0	0
10	Cl	0	0		2	0		0	0
11									
12									
13									

Figura 35 – Tabela dividida em 3 blocos onde cada um representa uma apatite e respetiva constituição em iões.

J	K	L	M	N
		Disponível	Utilizado	Sobrante
	C	0	0	0
	O	0	0	0
	Ca	0	0	0
	P	0	0	0
	Cl	0	0	0
	Função Objetivo	0		

Figura 36 – Bloco com três colunas que representam o valor dos iões, disponível, utilizado e sobrante, e a célula função objetivo.

Nas definições do *Solver* foi definido como objetivo a célula da função objetivo que calcula o valor de iões sobrantes e com a função de o minimizar. As células a alterar foram definidas como a quantidade de cada apatite, identificadas com as cores amarelo, azul e verde. Foram ainda inseridas as restrições, isto é, os limites das variáveis envolvidas, mais especificamente, o valor de iões utilizado não pode exceder o disponível, excepto o O, uma vez que pode haver défice de OH e que a quantidade de cada apatite não pode ser negativa (figura 37).

Definir Objetivo:

Para: ☐ Máximo ☒ Mínimo ☐ Valor de:

Alterando as Células de Variável:

Sujeito às Restrições:

\$O\$8 <= \$N\$8
 \$C\$8 >= 0
 \$F\$8 >= 0
 \$I\$8 >= 0
 \$O\$10 <= \$N\$10
 \$O\$6 <= \$N\$6
 \$O\$9 <= \$N\$9

☐ Tornar Não Negativas Variáveis Não Constrangidas

Selec. Método Resolução:

Figura 37 – Definições introduzidas no Solver do Microsoft Excel.

As amostras foram individualmente submetidas, tendo-se obtido os resultados presentes nas figuras 38 a 44.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1														
2														
3														
4		Qty 1	0,265		Qty 2	0,575		Qty 3	0,645			Disponível	Utilizado	Sobrança
5		Ca10(PO4)6(OH)2			Ca10(PO4)6(Cl)2			Ca10(CO3)6(OH)2						
6	C	0	0		0	0		6	3,87		C	47,41	3,87	43,54
7	O	26	6,89		24	13,8		20	12,9		O	26,19	33,59	-7,4
8	Ca	10	2,65		10	5,75		10	6,45		Ca	14,85	14,85	0
9	P	6	1,59		6	3,45		0	0		P	5,04	5,04	0
10	Cl	0	0		2	1,15		0	0		Cl	1,15	1,15	0
11														
12														
13											Função Objetivo	0		

Figura 38 - Resultados Solver amostra A0.2.1

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1														
2														
3														
4		Qty 1	1,14667		Qty 2	1,585		Qty 3	1,23933			Disponível	Utilizado	Sobrança
5		Ca10(PO4)6(OH)2			Ca10(PO4)6(Cl)2			Ca10(CO3)6(OH)2						
6	C	0	0		0	0		6	7,436		C	11,24	7,436	3,804
7	O	26	29,8133		24	38,04		20	24,7867		O	23,68	92,64	-68,96
8	Ca	10	11,4667		10	15,85		10	12,3933		Ca	39,71	39,71	0
9	P	6	6,88		6	9,51		0	0		P	16,39	16,39	0
10	Cl	0	0		2	3,17		0	0		Cl	3,17	3,17	0
11														
12														
13											Função Objetivo	0		

Figura 39 - Resultados solver amostra A0.2.2

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1														
2														
3														
4		Qty 1	1,08333		Qty 2	1,015		Qty 3	0,04667			Disponível	Utilizado	Sobrança
5		Ca10(PO4)6(OH)2			Ca10(PO4)6(Cl)2			Ca10(CO3)6(OH)2						
6	C	0	0		0	0		6	0,28		C	31,98	0,28	31,7
7	O	26	28,1667		24	24,36		20	0,93333		O	20,79	53,46	-32,67
8	Ca	10	10,8333		10	10,15		10	0,46667		Ca	21,45	21,45	0
9	P	6	6,5		6	6,09		0	0		P	12,59	12,59	0
10	Cl	0	0		2	2,03		0	0		Cl	2,03	2,03	0
11														
12														
13											Função Objetivo	0		

Figura 40 - Resultados Solver amostra A0.2.3.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1														
2														
3														
4		Qty 1	1,18333		Qty 2	0,845		Qty 3	0,88467			Disponível	Utilizado	Sobrança
5		Ca10(PO4)6(OH)2			Ca10(PO4)6(Cl)2			Ca10(CO3)6(OH)2						
6	C	0	0		0	0		6	5,308		C	15,34	5,308	10,032
7	O	26	30,7667		24	20,28		20	17,6933		O	31,69	68,74	-37,05
8	Ca	10	11,8333		10	8,45		10	8,84667		Ca	29,13	29,13	0
9	P	6	7,1		6	5,07		0	0		P	12,17	12,17	0
10	Cl	0	0		2	1,69		0	0		Cl	1,69	1,69	0
11														
12														
13											Função Objetivo	0		

Figura 41 - Resultados solver amostra A0.3.1

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1														
2														
3														
4		Qty 1	0,92833		Qty 2	1,38		Qty 3	0,64067			Disponível	Utilizado	Sobrança
5		Ca10(PO4)6(OH)2			Ca10(PO4)6(Cl)2			Ca10(CO3)6(OH)2						
6	C	0	0		0	0		6	3,844		C	14,06	3,844	10,216
7	O	26	24,1367		24	33,12		20	12,8133		O	24,15	70,07	-45,92
8	Ca	10	9,28333		10	13,8		10	6,40667		Ca	29,49	29,49	0
9	P	6	5,57		6	8,28		0	0		P	13,85	13,85	0
10	Cl	0	0		2	2,76		0	0		Cl	2,76	2,76	0
11														
12														
13											Função Objetivo	0		

Figura 42 - Resultados Solver amostra A0.3.2

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1														
2														
3														
4		Qty 1	0,335		Qty 2	0,82		Qty 3	0,549			Disponível	Utilizado	Sobrante
5		Ca10(PO4)6(OH)2			Ca10(PO4)6(Cl)2			Ca10(CO3)6(OH)2						
6	C	0	0		0	0		6	3,294		C	22,06	3,294	18,766
7	O	26	8,71		24	19,68		20	10,98		O	44,08	39,37	4,71
8	Ca	10	3,35		10	8,2		10	5,49		Ca	17,04	17,04	0
9	P	6	2,01		6	4,92		0	0		P	6,93	6,93	0
10	Cl	0	0		2	1,64		0	0		Cl	1,64	1,64	0
11														
12														
13											Função Objetivo	0		

Figura 43 - Resultados Solver amostras A0.4.1.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1														
2														
3														
4		Qty 1	0,68167		Qty 2	0,92		Qty 3	0,64333			Disponível	Utilizado	Sobrante
5		Ca10(PO4)6(OH)2			Ca10(PO4)6(Cl)2			Ca10(CO3)6(OH)2						
6	C	0	0		0	0		6	3,86		C	21,89	3,86	18,03
7	O	26	17,7233		24	22,08		20	12,8667		O	40,81	52,67	-11,86
8	Ca	10	6,81667		10	9,2		10	6,43333		Ca	22,45	22,45	0
9	P	6	4,09		6	5,52		0	0		P	9,61	9,61	0
10	Cl	0	0		2	1,84		0	0		Cl	1,84	1,84	0
11														
12														
13											Função Objetivo	0		

Figura 44 - Resultados Solver amostra A0.4.2.

Os resultados obtidos encontram-se compilados na tabela 6. Para todas as amostras foram encontrados resultados para as três formas de apatite e apenas os iões C e O apresentaram valores diferentes de zero na coluna sobrança.

Tabela 6 - Tabela resumo dos resultados do solver.

	A0.2.1	A0.2.2	A0.2.3	A0.3.1	A0.3.2	A0.4.1	A0.4.2
Hidroxiapatite	0,265	1,14667	1,0833	1,18333	0,92833	0,335	0,68167
Cloroapatite	0,575	1,585	1,015	0,845	1,38	0,82	0,92
Carboapatite	0,645	1,23933	0,04667	0,88467	0,64067	0,549	0,64333
Sobrante de C	43,54	3,804	31,7	10,032	10,216	18,766	18,03
Sobrante de O	-7,4	-68,96	-32,77	-37,05	-45,92	4,71	-11,86

Quando comparados os resultados obtidos podemos constatar que, dentro do grupo A0.3 e A0.4, os resultados nos vários parâmetros foram semelhantes. Pelo contrário, no grupo A0.2 houve resultados substancialmente distintos, que podem ser explicados pelas variações existentes na temperatura da estufa como já mencionado anteriormente.

Podemos também observar que em todas as amostras o C aparece como ião sobranante. O carbono é constituinte principal do material orgânico, como tal, o excesso uniforme deste elemento pode ser explicado pela presença do colagénio.

Tendo em conta que os resultados do grupo A0.2 são inconsistentes, como era de esperar face à situação já descrita, devemos examinar em detalhe apenas os resultados dos grupos A0.3 e A0.4. Analisando os resultados destes dois grupos em pormenor, verifica-se que no grupo A0.3 foram registados valores superiores de cada forma de apatite, mas com valores bastante negativos de O, enquanto que no grupo A0.4, os valores de cada forma de apatite foram menores, mas os de O foram positivos ou ligeiramente negativos, o que permite retirar algumas conclusões.

Por um lado, o impacto da temperatura que aqui pode estar refletido, dado que o valor de O encontrado para o grupo A0.4, pode ser resultado do microambiente permitir uma maior estabilidade e, consequentemente, a formação de apatites com um menor número de locais livres, ainda que com substituições. Por outro lado, quantidades superiores de hidroxiapatite foram obtidas em ambientes de maior instabilidade, grupo A0.3, enquanto a cloroapatite e a carbopatite apresentaram apenas ligeiras discrepâncias. Ou seja, a instabilidade parece favorecer o aumento de locais livres, mas também a formação de hidroxiapatite.

Os resultados do modelo, em conjunto com as observações em SEM e análise EDS, bem como a literatura existente sobre as apatites biológicas, permitem-nos aceitar a 2^a hipótese proposta. Ou seja, o mineral obtido pode não ser hidroxiapatite, mas um conjunto de formas de apatite, como constatado pelos valores do modelo.

IV. CONCLUSÃO

Perceber o processo de mineralização é essencial para desenvolver materiais capazes de regenerar os tecidos colagénios mineralizados. Por isso, o papel do colagénio neste processo tem vindo a ser largamente estudado. Neste sentido, surgiu o presente estudo que pretendeu estudar as condições *in vitro* conducentes à formação de hidroxiapatite na presença de colagénio.

Na mineralização *in vitro*, os resultados obtidos sugerem que a temperatura acima da ambiente tem impacto na formação mineral devido às alterações provocadas na estrutura do colagénio. Por sua vez, quando formado em condições ótimas e em observações microscópicas, o mineral aparenta ser hidroxiapatite, mas a sua constituição elementar revela-se incoerente com esta hipótese.

Fundamentado pelos dados existentes na literatura e pelos valores obtidos no modelo desenvolvido, este trabalho sugere que o mineral formado *in vitro* nas condições experimentais utilizadas não é apenas hidroxiapatite, mas uma mistura de formas de apatite, nomeadamente hidroxiapatite, cloroapatite e carboapatite. Embora a análise EDS possa apresentar erro, por ser realizada à superfície e em zonas aleatórias, as amostras, que foram selecionadas aleatoriamente, apresentaram resultados consistentes, que corroboram a hipótese proposta. Contudo, tratando-se de resultados preliminares para que esta hipótese seja cientificamente provada, é necessário realizar novos ensaios.

Assim, os próximos trabalhos devem ter como objetivos não só recorrer a métodos mais fidedignos para a análise elementar, mas também testar em massa a sensibilidade e eficácia do modelo desenvolvido.

V. BIBLIOGRAFIA

- Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Araújo, G. S. (2019). *Mineralização dentinária in vitro* [IUEM]. <http://hdl.handle.net/10400.26/29757>
- Beniash, E, Traub, W., Veis, A., & Weiner, S. (2001). *A Transmission Electron Microscope Study Using Vitrified Ice Sections of Predentin : Structural Changes in the Dentin Collagenous Matrix prior to Mineralization*. 225(2000), 212–225. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4320>
- Beniash, Elia, Deshpande, A. S., Fang, P. A., Lieb, N. S., Zhang, X., & Sfeir, C. S. (2012). Possible role of DMP1 in dentin mineralization. *Journal of Structural Biology*, 174(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.013>.Possible
- Bezerra, M. A., dos Santos, Q. O., Santos, A. G., Novaes, C. G., Ferreira, S. L. C., & de Souza, V. S. (2016). Simplex optimization: A tutorial approach and recent applications in analytical chemistry. *Microchemical Journal*, 124, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.07.023>
- Boskey, A. L. (2007). Mineralization of Bones and Teeth. *Elements*, 3, 387–393.
- Braet, F., Zanger, R. De, & Wisse, E. (1997). *Drying cells for SEM , AFM and TEM by hexamethyldisilazane : a study on hepatic endothelial cells*. 186(July 1996), 84–87.
- Bray, D. (2000). Critical Point Drying of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy. *J. Nat. Prod*, 63(12), 235–243. <https://doi.org/10.1021/np0007426>
- Bray, D. F., Bagu, J., & Koegler, P. (1993). Comparison of Hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri 11 , and Critical-Point Drying Methods for Scanning Electron Microscopy of Biological Specimens. *Microscopy Research and Technique*, 26, 489–495.
- Cao, C. Y., Mei, M. L., Li, Q. L., Lo, E. C. M., & Chu, C. H. (2015). Methods for biomimetic remineralization of human dentine: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 4615–4627. <https://doi.org/10.3390/ijms16034615>

- Cölfen, H. (2010). BIOMINERALIZATION A crystal-clear view. *Nature Publishing Group*, 9(12), 960–961. <https://doi.org/10.1038/nmat2911>
- Crane, N. J., Popescu, V., Morris, M. D., Steenhuis, P., & Ignelzi, M. A. (2006). *Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization*. 39, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.059>
- Cui, F. Z., Wang, Y., Cai, Q., & Zhang, W. (2008). Conformation change of collagen during the initial stage of biomineralization of calcium phosphate. *Journal of Materials Chemistry*, 18(32), 3835–3840. <https://doi.org/10.1039/b805467c>
- Cui, Fu Zhai, Li, Y., & Ge, J. (2007). Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 57(1–6), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.04.001>
- Deshpande, A. S., & Beniash, E. (2008). Bioinspired Synthesis of Mineralized Collagen Fibrils. *Crystal Growth & Design*, 8(8), 3084–3090. <https://doi.org/10.1021/cg800252f>
- Dos Santos, Q. O., Novaes, C. G., Bezerra, M. A., Lemos, V. A., Moreno, I., Da Silva, D. G., & Dos Santos, L. (2010). Application of simplex optimization in the development of an automated online preconcentration system for manganese determination. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(12), 2340–2346. <https://doi.org/10.1590/s0103-50532010001200022>
- Eanes, E. D., Gillessen, I. H., & Posner, A. S. (1965). Intermediate States in the Precipitation of Hydroxyapatite. *Nature Publishing Group*, 5008, 365–367.
- Elliott, J. C., Holcomb, D. W., & Young, R. A. (1985). *Infrared Determination of the Degree of Substitution of Hydroxyl by Carbonate Ions in Human Dental Enamel*. 372–375.
- Feenstra, A. M., & Bruyn, P. L. De. (1979). Formation of Calcium Phosphates in Moderately Supersaturated Solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, 83(4), 0–4.
- Fujisawa, R., & Tamura, M. (2012). Acidic bone matrix and their roles in calcification. *Frontiers in Bioscience*, 17, 1891–1903.
- Geng, Z., Yuan, Q., Zhuo, X., Li, Z., Cui, Z., & Zhu, S. (2017). Synthesis ,

- Characterization , and Biological Evaluation of Nanostructured Hydroxyapatite with Different Dimensions. *Nanomaterials*, 7(38), 1–13. <https://doi.org/10.3390/nano7020038>
- George, A., & Veis, A. (2008). *Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation , Crystal Growth , and Inhibition*. 4670–4693.
- Gower, L. B. (2008). Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization. *Chemical Reviews*, 108(11), 4551–4627.
- Gulseren, G., Tansik, G., Garifullin, R., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2018). *Dentin Phosphoprotein Mimetic Peptide Nanofibers Promote Biomineralization*. 1800080, 1–10. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800080>
- He, G., & George, A. (2004). Dentin Matrix Protein 1 Immobilized on Type I Collagen Fibrils Facilitates Apatite Deposition in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), 11649–11656. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309296200>
- He, L., Hao, Y., Zhen, L., Liu, H., Shao, M., Xu, X., Liang, K., Gao, Y., Yuan, H., Li, J., Li, J., Cheng, L., & van Loveren, C. (2019). Biomineralization of dentin. *Journal of Structural Biology*, 207(2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.05.010>
- Henriksen, K., & Karsdal, M. A. (2019). Type I collagen. In *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: Structure, Function and Biomarkers* (Second Edi, Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817068-7.00001-X>
- Howard, K. A. (1973). *Monoclinic Hydroxyapatite*. 12, 1055–1057.
- Jusman, Y., Ng, S. C., & Azuan, N. (2014). Investigation of CPD and HMDS Sample Preparation Techniques for Cervical Cells in Developing Computer-Aided Screening System Based on FE-SEM / EDX. *The Scientific World Journal*.
- Kay, M. I., Young, R. A., & Posner, A. S. (1964). Crystal Structure of Hydroxyapatite. *Nature Publishing Group*, 204, 1050–1052.
- Krause, R. D., & Lott, J. A. (1974). *Use of the Simplex Method to Optimize Analytical Conditions in Clinical Chemistry*. 20(7), 775–782.
- Landis, W. J., & Jacquet, R. (2013). *Association of Calcium and Phosphate Ions with Collagen in the Mineralization of Vertebrate Tissues*. 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9725-7>

- Landis, W. J., Silver, F. H., & Freeman, J. W. (2006). Collagen as a scaffold for biomimetic mineralization of vertebrate tissues. *Journal of Materials Chemistry*, 16(16), 1495–1503. <https://doi.org/10.1039/b505706j>
- Landis, W. J., & Silver, H. (2009). *Mineral Deposition in the Extracellular Matrices of Vertebrate Tissues : Identification of Possible Apatite Nucleation Sites on Type I Collagen*. 44272, 20–24. <https://doi.org/10.1159/000151454>
- Lausch, A. J., Quan, B. D., Miklas, J. W., & Sone, E. D. (2013). Extracellular Matrix Control of Collagen Mineralization In Vitro. *Advanced Functional Materials Journal*, 4906–4912. <https://doi.org/10.1002/adfm.201203760>
- Lee, J. T. Y., & Chow, K. L. (2012). *SEM Sample Preparation for Cells on 3D Scaffolds by Freeze-Drying and HMDS*. 34, 12–25. <https://doi.org/10.1002/sca.20271>
- Levin, M. (2011). *Topics in Dental Biochemistry* (Springer (ed.)).
- Liu, Q., Huang, S., Matinlinna, J. P., Chen, Z., & Pan, H. (2013). *Insight into Biological Apatite : Physiochemical Properties and Preparation Approaches*. 2013.
- Mahamid, J., Aichmayer, B., Shimoni, E., Ziblat, R., Li, C., Siegel, S., & Paris, O. (2010). *Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays*. 107(14). <https://doi.org/10.1073/pnas.0914218107>
- Mahamid, J., Sharir, A., Addadi, L., & Weiner, S. (2008). *Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish : Indications for an amorphous precursor phase*. May 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803354105>
- Mahamid, J., Sharir, A., Gur, D., Zelzer, E., Addadi, L., & Weiner, S. (2011). Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles : A cryo-electron microscopy study. *Journal of Structural Biology*, 174(3), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.03.014>
- Markovic, M., Fowler, B. O., & Tung, M. S. (2004). Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, 109(6), 553–568.
- Martínez-Ortiz, M. A., Hernández-Fuentes, A. D., Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Vargas-Torres, A., & Aguirre-Álvarez, G. (2015). Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: PArTial characterization. *CYTA -*

- Journal of Food*, 13(2), 253–258. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.946451>
- Mathew, M., & Takagi, S. (2001). *Structures of Biological Minerals in Dental Research*. 106(6), 1035–1044.
- Niu, X., Fan, R., Tian, F., Guo, X., Li, P., Feng, Q., & Fan, Y. (2017). Calcium concentration dependent collagen mineralization. *Materials Science & Engineering C*, 73, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.079>
- Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A., With, G., & Sommerdijk, N. A. (2010). The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nature Materials*, 9(12), 1004–1009. <https://doi.org/10.1038/nmat2875>.The
- Nudelman, Fabio, Lausch, A. J., Sommerdijk, N. A. J. M., & Sone, E. D. (2013). In vitro models of collagen biomineralization. *Journal of Structural Biology*, 183(2), 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2013.04.003>
- Nudelman, Fabio, With, G. De, & Sommerdijk, N. A. J. M. (2011). *Cryo-electron tomography : 3-dimensional imaging of soft matter*. m, 17–24. <https://doi.org/10.1039/c0sm00441c>
- Okada, M., & Matsumoto, T. (2015). Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications. *Japanese Dental Science Review*, 51(4), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2015.03.004>
- Olszta, M. J., Cheng, X., Soo, S., Kumar, R., Kim, Y., Kaufman, M. J., Douglas, E. P., & Gower, L. B. (2007). *Bone structure and formation : A new perspective*. 58, 77–116. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>
- Orgel, J. P. R. O., Irving, T. C., Miller, A., & Wess, T. J. (2006). *Microfibrillar structure of type I collagen in situ*. 103(24), 9001–9005.
- Palmer, L. C., Newcomb, C. J., Kaltz, S. R., Spoerke, E. D., & Stupp, S. I. (2008). Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel. *Chemical Reviews*, 108(11), 4754–4783. <https://doi.org/10.1021/cr8004422>
- Panggabean, R. D. (2018). Preparation and Characterization of Hydroxyapatite Based on Human teeth with Various of Calcination. *2018 1st International Conference on Bioinformatics, Biotechnology, and Biomedical Engineering - Bioinformatics and*

Biomedical Engineering, 1, 1–4.

- Pasamontes, A., & Callao, P. (2006). Fractional factorial design and simplex algorithm for optimizing sequential injection analysis (SIA) and second order calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 83(2), 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.10.007>
- Perdigao, J., Lambrechts, P., Meerbeek, B. Van, Vanherle, G., & Lopes, A. L. B. (1995). *Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin*. 29, 1111–1120.
- Petruska, J. A., & Hodge, A. J. (1964). *A SUBUNIT MODEL FOR THE TROPOCOLLAGEN MACROMOLECULE* (Vol. 51).
- Qiu, Z., Cui, Y., Tao, C., Zhang, Z., Tang, P., Mao, K., Wang, X., & Cui, F. (2015). *Mineralized Collagen: Rationale, Current Status, and Clinical Applications*. 4733–4750. <https://doi.org/10.3390/ma8084733>
- Rey, C., Combes, C., Drouet, C., & Glimcher, M. J. (2009). Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int.*, 20(6), 1013–1021. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-0860-y>.Bone
- Sharma, V., Srinivasan, A., Nikolajeff, F., & Kumar, S. (2020). Biomineralization Process in Hard Tissues : The Interaction Complexity within Protein and Inorganic Counterparts. *Acta BioMaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.049>
- Silver, F. H., & Landis, W. J. (2011). *Deposition of apatite in mineralizing vertebrate extracellular matrices : A model of possible nucleation sites on type I collagen*. 52(September 2009), 242–254. <https://doi.org/10.3109/03008207.2010.551567>
- Sudarsanan, K., & Young, R. A. (1978). *Structural Interactions of F, Cl and OH in Apatites*. 1401–1407.
- Termine, J. D., & Posner, A. S. (1966). Infrared Analysis of Rat Bone : Age Dependency of Amorphous and Crystalline Mineral Fractions. *Science*, 153, 1523–1525.
- Tomoaia, G., & Pasca, R. D. (2015). On the collagen mineralization. A review. *Chujul Medical*, 88(1), 15–22. <https://doi.org/10.15386/cjmed-359>
- Toroian, D., Lim, J. E., & Price, P. A. (2007). The Size Exclusion Characteristics of Type I Collagen IMPLICATIONS FOR THE ROLE OF NONCOLLAGENOUS BONE CONSTITUENTS. *The Journal OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 282(31), 22437–

22447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700591200>
- Veis, A., & Perry, A. (1967). *The Phosphoprotein of the Dentin Matrix*. 6(8).
- Wang, L., & Nancollas, G. H. (2010). Dynamics of Biomineralization and Biodemineralization. *Met Ions Life Sci.*, 413–456.
- Zhang, X., Xiao, Z., Wang, H., & Kishen, A. (2016). Biomineralization and Biomaterial Considerations in Dentin Remineralization. *Journal of Operative Dentistry & Endodontics*, 1(1), 7–12. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10047-0004>
- Zhao, J., Liu, Y., Sun, W., & Yang, X. (2012). First detection , characterization , and application of amorphous calcium phosphate in dentistry. *Journal of Dental Sciences*, 7(4), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2012.09.001>
- Zhu, S., Yuan, Q., Yin, T., You, J., & Gu, Z. (2018). Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 6, 2650–2676. <https://doi.org/10.1039/C7TB02999C>

ANEXOS

Anexo 1- Permissão para utilização das figuras 1 e 2 concedida pela ELSEVIER.

This Agreement between Mrs. Cláudia Antunes ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4893211039873
License date	Aug 20, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin
Licensed Content Author	K. Henriksen,M.A. Karsdal
Licensed Content Date	Jan 1, 2019
Licensed Content Pages	12
Start Page	1
End Page	12
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	3
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	ANÁLISE DA MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA IN VITRO
Institution name	Instituto Universitário Egas Moniz
Expected presentation date	Sep 2020
Portions	fig. 1.1; 1.2; 1.3
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	Mrs. Cláudia Antunes Rua do Parque Nº19 Loures, 2670-536 Portugal Attn: Mrs. Cláudia Antunes
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Anexo 2 - Permissão para utilização da Figura 3 concedida pela ELSEVIER.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS		Number of figures/tables/illustrations	2
Aug 23, 2020		Format	both print and electronic
This Agreement between Mrs. Cláudia Antunes ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.		Are you the author of this Elsevier article?	No
License Number	4894710638648	Will you be translating?	Yes, without English rights
License date	Aug 23, 2020	Number of languages	1
Licensed Content Publisher	Elsevier	Title	ANÁLISE DA MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA IN VITRO
Licensed Content Publication	Journal of Structural Biology	Institution name	Instituto Universitário Egas Moniz
Licensed Content Title	In vitro models of collagen biomineralization	Expected presentation date	Sep 2020
Licensed Content Author	Fabio Nudelman,Alexander J. Lausch,Nico A.J.M. Sommerdijk,Eli D. Sone	Portions	fig.1
Licensed Content Date	Aug 1, 2013	Specific Languages	portuguese
Licensed Content Volume	183	Requestor Location	Mrs. Cláudia Antunes Rua do Parque Nº19
Licensed Content Issue	2		Loures, 2670-536 Portugal Attn: Mrs. Cláudia Antunes
Licensed Content Pages	12		
Start Page	258	Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
End Page	269	Total	0.00 EUR
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation		
Portion	figures/tables/illustrations		

Anexo 3 - Permissão para utilização da Tabela 1 concedida pela ELSEVIER.

License Number	4898820984150		
License date	Aug 30, 2020		
 Licensed Content		 Order Details	
Licensed Content Publisher	Elsevier	Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Licensed Content Publication	International Japanese Dental Science Review Gerontology/Technology	Portion	figures/tables/illustrations
Licensed Content Title	Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications	Number of figures/tables/illustrations	1
Licensed Content Author	Masahiro Okada,Takuya Matsumoto	Format	both print and electronic
Licensed Content Date	Nov 1, 2015	Are you the author of this Elsevier article?	No
Licensed Content Volume	51	Will you be translating?	Yes, without English rights
Licensed Content Issue	4	Number of languages	1
Licensed Content Pages	11		
Journal Type	HS		
 About Your Work		 Additional Data	
Title	ANÁLISE DA MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA IN VITRO	Portions	table 2
Institution name	Instituto Universitário Egas Moniz	Specific Languages	Portuguese
Expected presentation date	Sep 2020		
 Requestor Location		 Tax Details	
	Mrs. Cláudia Antunes Rua do Parque Nº19	Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Requestor Location	Loures, 2670-536 Portugal Attn: Mrs. Cláudia Antunes		
 Price			
Total	0.00 EUR		