



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA IN VITRO PROMOVIDA POR
DIFERENTES AGENTES DE LIGAÇÃO**

Trabalho submetido por
Aikaterini Kakavas
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**MINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA IN VITRO PROMOVIDA POR
DIFERENTES AGENTES DE LIGAÇÃO**

Trabalho submetido por
Aikaterini Kakavas
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

*Εμαθα να σε αγαπώ και να σου ζητώ δύναμη να συνεχίζω, Κύριε,
δώσε μου να αγαπώ μόνον Εσένα. Δώσε μου τη δύναμη να μένω
πάντα κοντά σου. Κύριε, δώσε μου τη μετάνοια του.*

*Στους γονείς μου, Ιωάννη και Ελπιδα, που
χωρίς τους ιδιους τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.
Η δύναμη, το κουραγιο και το παραδειγμα
σας με εκανε δυνατη και εναν
ολοκληρωμενο ανθρωπο.
Σας αγαπω πολυ.*

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais estarei eternamente grata.

À Prof. Doutora Carla Ascenso, pela sua orientação, total apoio, disponibilidade, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas construtivas, total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo.

À Prof. Doutora Ana Cristina Manso, pela sua constante disponibilidade, apoio e confiança depositada em mim.

Aos Prof. Doutor António Pedro Alves de Matos e Prof. Doutor Mário Pulido, por me permitirem e facilitarem o acesso aos seus laboratórios e se terem disponibilizado.

Não poderia também deixar de agradecer aos funcionários do UIEM e especialmente a Susana, Natacha e Mena que sempre alegraram as horas de laboratório.

À minha Cláudia que me acompanhou e me aturou durante este trabalho todo e ainda mais. Obrigada por teres estado perto de mim nesta altura tão importante para o meu percurso e por seres uma amiga de coração.

Aos meus pais que mesmo de muito longe tiveram sempre perto de mim com as suas palavras motivantes e apoio emocional. Obrigada por tudo que me terem transmitido até agora e por terem acreditado em mim.

RESUMO

Nos animais vertebrados, a mineralização dos tecidos conjuntivos, como nomeadamente osso, dentina e cimento ocorre tipicamente em espaços extracelulares, em íntima associação com constituintes orgânicos de uma matriz extracelular, constituída maioritariamente por o colagénio tipo I. A compreensão do processo de deposição de mineral no colagénio é imprescindível para o desenvolvimento de terapias e estratégias de autorreparação ou autorregeneração de tecidos humanos mineralizados.

O presente trabalho teve como objetivo a otimização do processo de obtenção de mineral na presença de diferentes agentes de ligação com potencial mineralizante na formação *in vitro* de hidroxiapatite na presença de colagénio por SEM e EDS. Baseando-se num trabalho já iniciado anteriormente neste laboratório, pretendeu-se explorar a via da presença de agentes mineralizantes usando como referência o grupo mais promissor que no presente trabalho vai ser identificado por grupo A0.

Foram preparados três grupos experimentais de estudo. O grupo A0 consistiu em uma solução ácida de colagénio a 2 mg/ml em HCl contendo cálcio, a qual foi adicionado uma mistura de tampão a pH 7,4. Os grupos A1 e A2 foram preparadas como descrito para o grupo A0, mas na presença de 5% de glutaraldeído e 0,5% de genipina respetivamente. Aos demais grupos foram feitos ajustes de pH e tempos de contacto, entre outros, a partir do estabelecido anteriormente para o grupo A0. Os valores de pH das soluções foram avaliados e as amostras tratadas para visualização em microscópio eletrónico, pela técnica SEM e análise elementar por EDS.

O presente trabalho baseia-se num papel ativo do colagénio na regulação da mineralização *in vitro*, assim como o potencial de formação de ligações cruzadas na molécula de colagénio dos agentes estudados.

Palavras-Chave: Mineralização, Hidroxiapatite, Glutaraldeído, Genipina

ABSTRACT

In vertebrate animals, the mineralization of connective tissues, such as bone, dentin and cementum typically occurs in extracellular spaces, in close association with organic constituents of an extracellular matrix, consisting mostly of type I collagen. The understanding of the mineral deposition process in collagen is essential for the development of therapies and strategies of self-separation or self-regeneration of mineralized human tissues.

Therefore the present work aims to optimize the process of obtaining mineral in the presence of different binding agents with mineralizing potential in the *in vitro* formation of hydroxyapatite, in the presence of collagen, by means of SEM and EDS. Based on a work already initiated previously in this laboratory, it intends to explore the route of the presence of mineralizing agents using as reference the most promising group, that in the present work will be identified by group A0.

Three experimental study groups were prepared. Group A0 consisted of a 2 mg/ml acid collagen solution in HCL containing calcium, to which a buffer mixture at pH 7.4 was added. Group A1 and A2 consisted of solutions prepared as described for group A0, but in the presence of 5% glutaraldehyde and 0.5% genipin respectively. The other groups were made adjustments of pH and contact times, among others, from the previously established for group A0. The pH values of the solutions were evaluated and the samples were treated for visualization in an electronic microscope by the SEM technique and elemental analysis by EDS.

The present work is based on an active role of collagen in the regulation of *in vitro* mineralization, as well as, the potential formation of cross-links in the collagen molecule of the agents studied.

Keywords: Mineralization, Hydroxyapatite, Glutaraldehyde, Genipin

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα σπονδυλωτά ζώα, η ανοργανοποίηση των συνδετικών ιστών, όπως το οστό, η οδοντίνη και το τσιμέντο τυπικά συμβαίνει σε εξωκυτταρικούς χώρους, σε στενή συσχέτιση με οργανικά συστατικά μιας εξωκυτταρικής μήτρας, που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου I. Η κατανόηση της διαδικασίας εναπόθεσης ορυκτών στο κολλαγόνο είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη θεραπειών και στρατηγικών αυτο-διαχωρισμού ή αυτο-αναγέννησης μεταλλοποιημένων ανθρώπινων ιστών.

Ως εκ τούτου, η παρούσα εργασία στοχεύει στη βελτιστοποίηση της διαδικασίας απόκτησης ορυκτών παρουσία διαφορετικών συνδετικών παραγόντων με δυνατότητα ανοργανοποίησης στον *in vitro* σχηματισμό υδροξυαπατίτη, παρουσία κολλαγόνου, μέσω SEM και EDS. Με βάση ένα έργο που έχει ήδη ξεκινήσει προηγουμένως σε αυτό το εργαστήριο, σκοπεύει να διερευνήσει την οδό της παρουσίας παραγόντων ανοργανοποίησης χρησιμοποιώντας ως αναφορά την πιο ελπιδοφόρα ομάδα, η οποία στην παρούσα εργασία θα αναγνωριστεί από την ομάδα A0.

Παρασκευάστηκαν τρεις πειραματικές ομάδες μελέτης. Η ομάδα A0 συνίστατο σε διάλυμα όξινου κολλαγόνου 2 mg / ml σε HCl που περιείχε ασβέστιο, στο οποίο προστέθηκε ρυθμιστικό μίγμα σε pH 7.4. Οι ομάδες A1 και A2 αποτελούνταν από διαλύματα που παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται για την ομάδα A 0, αλλά παρουσία 5% γλουταραλδεΰδης και 0, 5% γενιπίνης αντίστοιχα. Οι άλλες ομάδες έγιναν προσαρμογές του pH και των χρόνων επαφής, μεταξύ άλλων, από τις προηγουμένως καθιερωμένες για την ομάδα A0. Οι τιμές pH των διαλυμάτων αξιολογήθηκαν και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία για απεικόνιση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο με την τεχνική SEM και στοιχειακή ανάλυση με EDS.

Η παρούσα εργασία βασίζεται στον ενεργό ρόλο του κολλαγόνου στη ρύθμιση της *in vitro* ανοργανοποίησης, καθώς και στον πιθανό σχηματισμό εγκάρσιων δεσμών στο μόριο κολλαγόνου των παραγόντων που μελετήθηκαν.

Λέξεις Κλειδιά: Ορυκτοποίηση, Υδροξυαπατίτης, Γλουταραλδεΰδη, Γενιπίνη

ÍNDICE GERAL

RESUMO	1
ABSTRACT	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABELA	13
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	15
INTRODUÇÃO.....	17
Organização estrutural do colagénio.....	17
Iniciação da mineralização e formação da fase mineral	20
Nucleação nos buracos de colagénio	22
Métodos de caracterização do colagénio mineralizado	25
Interação da concentração de cálcio na mineralização do colagénio.....	26
Ligações cruzadas: o papel do glutaraldeído (GTA) e da genipina (GEN)	28
Objetivo do trabalho	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
Grupos de estudo	35
Reagentes e soluções	37
Procedimento experimental	37
GRUPO A0.....	38
GRUPO A1	38
GRUPO A2	39
Preparação do mineral para análise	40
Análise do mineral por sem e eds	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
Mineralização <i>in vitro</i>	43
GRUPO A1	49
Análise SEM e análise EDS: GRUPO A1	58
GRUPO A2	62
Análise SEM e análise EDS: GRUPO A1: GRUPO A2	66
CONCLUSÃO.....	71
BIBLIOGRAFIA	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Micro e ultraestrutura do colagénio. (A) Conversão do procolagénio em tropocolagénio por clivagem dos N e C propeptídeos. (B) Tripla hélice de colagénio. (C) imagem de AFM de fibrilhas de colagénio alinhadas in situ de um tendão. Adaptado por (Abou et al., 2012) © 2012 Published by Elsevier B.V com permissão de reprodução (anexo).....	19
Figura 2- Ilustração esquemática do mecanismo de automontagem do colagénio dependente da concentração de íons de cálcio. A molécula de colagénio, o grupo fosfato e a baixa concentração de íões de cálcio combinam-se regularmente através da ligação de hidrogénio e o efeito de carga. A alta concentração de íões de cálcio leva a combinação irregular devido à combinação superabundante de cálcio nos locais de ligação e ACP coletivo. Adaptado de (Niu et al., 2017), com permissão de utilização da Elsevier B.V e do autor (anexo).....	28
Figura 3- Estruturas químicas de GTA e GEN - adaptado de (Hsing-Wen Sung et al., 1999), com permissão de utilização da Elsevier Science Ltd e do autor (anexo). 31	
Figura 4- Ilustrações esquemáticas das presumíveis estruturas de reticulação intramolecular e intermolecular de (a) tecido fixado com glutaraldeído, (b) tecido fixado por genipina- adaptado de (Hsing-Wen Sung et al., 1999), com permissão de utilização da Elsevier Science Ltd e do autor (anexo)	32
Figura 5- Reações principais de reticulação da genipina adaptado de (Butler et al., 2003) com permissão de autorização de Wiley Periodicals e to autor (anexo).....	34
Figura 6 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado e respetivos ensaios efetuado com cada grupo. Na designação dos ensaios usou-se o grupo a que pertencem, seguido da numeração do ensaio pela ordem de realização.	36
Figura 7 - Microscópio Eletrónico de Varrimento (Cmicros) da Egas Moniz, CRL, no equipamento JEOL LSM 5400.....	41
Figura 8- Amostras colocadas em fita adesiva de carbono em base metálica.	41
Figura 9- Instrumento de evaporação a vácuo JEOL 400, Cmicros Egas Moniz CRL..	42
Figura 10 - Amostras do Grupo A0 (72 h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais com diferente densidade de luminosidade. Amostras com estrutura tridimensional e homogénia com alta opacidade	44

Figura 11 - Microfotografia de SEM do grupo A0 a 50x (sem agente ligante 72h), estrutura tridimensional com forma e margens regulares	45
Figura 12 - Microfotografia de SEM do grupo A0 a 500x (sem agente ligante 72h), imagem com padrão homogêneo, zonas de aglomerações de mineral	45
Figura 13 - Amostras do Grupo A0.1 (24h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x. Imagens iguais de diferentes faces das amostras. Observem-se amostras transparentes com padrão homogêneo	46
Figura 14 - Microfotografia de SEM do grupo A0.1 a 50x (sem agente ligante 24h), estrutura tridimensional com forma regular e padrão homogêneo	47
Figura 15 - Microfotografia de SEM do grupo A0.1 a 350x (sem agente ligante 24h), imagem com padrão homogêneo	47
Figura 16 - Ensaio A1.1 (A) amostra A1.1 1h de tratamento com GTA (B) após 72h de mineralização (C) amostra A1.1 24 horas de tratamento com GTA (D) após 72h de mineralização	49
Figura 17 - Controlo de pH do ensaio A1.1, valores obtidos entre 3-4.....	49
Figura 18 - (a)Valores de pH das amostras A1.2(NaOH)0 e (b) das amostras A1.2(NaOH)20, A1.2(NaOH)40, A1.2(NaOH)60.....	51
Figura 19- Amostras do ensaio A1.3 1 hora após o tratamento com GTA e no t0 da mineralização, aumento da turbidez e viscosidade do meio de solução	51
Figura 20– (a) Amostra A1.3 no fim das 72 horas antes da centrifugação (b)Valores de pH das amostras A1.3, (c) Amostra A1.3 obtida após a centrifugação.	52
Figura 21– Controlo de pH do ensaio A1.4.....	54
Figura 22 – Ensaio A1.4 (a) amostras após 1h de tratamento com GTA e t0 de mineralização (b) t72 de mineralização	54
Figura 23– Controlo do pH das amostras A1.5, estimado no sobrenadante obtido após centrifugação do produto da mineralização. O esquema de cores indica ~7-8 para ambos as amostras escolhidas aleatoriamente entre as 10 ensaiadas.	55
Figura 24 - Eppendorfs do ensaio A1.5 (GTA 72h) nos tempos t0, t24, t48, t72,	55
Figura 25- Fotografia das amostras A1.5 (GTA 72h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais com diferente densidade de luminosidade. Amostras com estrutura tridimensional, com coloração amarelada e forma irregular	56

Figura 26– Amostras do Grupo A1.6 (GTA 24h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais com diferente densidade de luminosidade. Amostras de coloração amarelada zonas de diferentes opacidades e asperto irregular	57
Figura 27– Fotomicrografia de SEM da amostra A1.5 a 35x (GTA 72h), estrutura tridimensional com zonas irregulares e padrão heterogêneo	60
Figura 28- Fotomicrografia de SEM da amostra A1.5 a 750 x (GTA 72h), padrão heterogêneo com diferentes zonas de aglomerações de mineral	60
Figura 29- Fotomicrografia de SEM da amostra A1.6 a 35x (GTA 24h), amostra com forma irregular e zonas de opacidade distinta.....	61
Figura 30- Fotomicrografia de SEM da amostra A1.6 a 150x (GTA 24h), imagem com padrão heterogêneo e organização irregular	61
Figura 31- Controlo de pH do ensaio A2.1	63
Figura 32 - Ensaio A2.1 t0, t24, t72	63
Figura 33 - Amostras do Grupo A2.1 em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x	64
Figura 34- Controlo de pH do ensaio A2.2	64
Figura 35 - Amostras do Grupo A2.2 (GEN 72h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais das mesmas amostras com diferentes densidades de luminosidade e de faces diferentes das amostras, coloração azulada com forma e margens regulares e aspeto uniforme	65
Figura 36 - Amostras do Grupo A2.3 (GEN 24h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais das mesmas amostras com diferentes densidades de luminosidade e de faces diferentes das amostras, zonas de coloração azulada distinta com forma e margens regulares.....	66
Figura 37 – Fotomicrografia de SEM da amostra A2.2 a 35x (GEN 72h), estrutura tridimensional com uma forma irregular.....	68
Figura 38– Fotomicrografia de SEM da amostra A2.2 a 1000x (GEN 72h), imagem com padrão homogêneo, zonas de aglomerações de mineral.....	68
Figura 39– Fotomicrografia de SEM da amostra A2.2 a 100x (GEN 24h), estrutura tridimensional com uma zona central regular e lisa e com uma periferia e margens irregulares.....	69
Figura 40– Fotomicrografia de SEM da amostra A2.3 a 500x (GEN 24h), imagem com padrão homogêneo, zonas de aglomerações de mineral não bem definidos	69

ÍNDICE DE TABELA

Tabla 1- Métodos de caracterização do colagénio mineralizado.....	26
Tabela 2 - Grupos de estudo do presente trabalho e respetivas soluções usadas na obtenção do mineral em cada caso.	35
Tabela 3 - Soluções preparadas neste trabalho	37
Tabela 4- Gráficos e constituição elementar obtidos por EDS dos grupos A0 e A0.1...	48
Tabela 5 – Composição das amostras preparadas no ensaio A1.2	50
Tabela 6 - Valores de pH obtidos nos respetivos tempos após o início de mineralização	53
Tabela 7 - Gráficos e constituição elementar obtidos por EDS dos grupos A1 (GTA) .	59
Tabela 8- Gráficos e constituição elementar obtidos por EDS dos grupos A2 (GEN) ..	67

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
AFM	Microscopia de força atômica
BSP	Sialoproteína óssea
CD	Dicroísmo circular
DMP1	Proteína de matriz de dentina 1
DPP	Fosforina da dentina
DSC	Calorímetro diferencial de varrimento
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EDX	Microscopia de energia dispersiva
ESEM	Microscopia eletrônica de varrimento de ambiente
FTIR	Espectroscopia infravermelha transformadora de Fourier
GTA	Glutaraldeído
GEN	Genipina
HAP	Hidroxiapatite
HMDS	Hexametildisilano
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NCPs	Proteínas não colagénicas
OC	Osteocalcina
OCP	Fosfato octacálcio
ON	Osteonectina
OP	Osteopontina
SEM	Microscópio eletrônico de varrimento
SBF	Fluido corporal simulado
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Termogavimetria
XRD	Difração de Raios X

INTRODUÇÃO

A natureza é rica por diferentes exemplos de materiais sofisticados com propriedades notavelmente importantes que emergem da sua estrutura hierárquica específica. Materiais como nácar, osso e dentes possuem organização estrutural distinta em diferentes escalas de comprimento, o que aumenta as suas propriedades e funcionalidades de material. A capacidade de criar materiais sintéticos que emulem essas arquiteturas engenhosas representa um objetivo principal na ciência dos biomateriais e uma oportunidade de ajustar e melhorar profundamente a funcionalidade dos sistemas biológicos. Em particular, o campo dos biomateriais beneficia-se muito das funcionalidades que podem surgir das organizações hierárquicas bem definidas. O estudo do osso e dos dentes num contexto de biomimética da biomineralização é particularmente interessante pelo grande impacto que pode apresentar na terapias de reparação e regeneração dos tecidos humanos (Elsharkawy et al., 2018; Tomoaia & Pasca, 2015; Zhu et al., 2018).

ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO COLAGÉNIO

O colagénio é um polímero natural que representa uma família importante de proteínas fibrosas no corpo humano e em outros vertebrados. É o componente predominante das matrizes orgânicas extracelulares do osso, dentina, cemento e tendões (Abou Neel et al., 2016). Foram identificados pelo menos 20 tipos de colagénios humanos distintos. O colagénio tipo I, além de proporcionar suporte estrutural aos tecidos e órgãos, também desempenha um papel importante na formação destes, uma vez que participa na orientação das moléculas e está envolvido em diversas expressões celulares funcionais. Sendo assim, torna-se um excelente material amplamente utilizado na preparação de biomateriais desenvolvidos para diversas aplicações clínicas (Cui et al., 2007; William J. Landis & Jacquet, 2013; Nudelman, Pieterse, George, Bomans, Friedrich, Brylka, Hilbers, De With, et al., 2010a; Qiu et al., 2015; Tomoaia & Pasca, 2015).

As fibras de colagénio tipo I, são constituídas por fibrilhas formadas por moléculas de tropocolagénio. Estas últimas, unidades estruturais básicas desta proteína, são compostas por três cadeias polipeptídicas, duas idênticas, denominadas α -1, e mais uma α -2, associadas umas às outras em uma configuração helicoidal, exceto nas extremidades carboxilo e amina-terminal, onde há regiões com aminoácidos que não são agrupados à

estrutura da tripla hélice. Estas regiões são os denominados telopeptídeos que são responsáveis pela antigenicidade da proteína de colagénio (Cui et al., 2007; Elsharkawy et al., 2018; William J. Landis & Silver, 2002).

Cada cadeia polipeptídica contém, aproximadamente, 1000 resíduos de aminoácidos, sequenciados em unidades repetitivas que contém glicina (Gly), denominadas tripletes do tipo (Gly-X-Y)_n, onde os resíduos X e Y, frequentemente, são prolina e hidroxiprolina, respetivamente. A localização do resíduo de Gly nesta posição, ao longo da cadeia polipeptídica, é um pré-requisito para a formação da tripla hélice (Levine, 2011; Neel et al., 2016; Silver & Landis, 2011; Zhu et al., 2018).

As cadeias polipeptídicas do colagénio são estabilizadas por meio de ligações de hidrogénio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, intra- e intermoleculares que proporcionam estabilidade e resistência à degradação proteolítica.

Em análise ultraestrutural, as moléculas de colagénio medem, aproximadamente, 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Para formar as fibrilhas, estas moléculas organizam-se longitudinalmente, com intervalos de 40 nm entre o final de uma molécula e o início de outra, denominados *gaps* (zonas de buracos de colagénio), e dispõem-se bilateralmente com uma diferença de um quarto em relação às moléculas adjacentes, o que forma regiões de sobreposição conhecidas como *overlaps*, medindo 27 nm. Este espaçamento pode ser observado por microscopia eletrónica e corresponde a aproximadamente em 234 resíduos de aminoácidos. Esta distribuição molecular é repetitiva e ordenada ao longo da estrutura da fibrilha, o que caracteriza os períodos D (=67 nm) desta proteína. Nestes períodos, os aminoácidos estão distribuídos em grupos, de acordo com o seu carácter ácido ou básico, que caracterizam os subperíodos, também conhecidos como bandas (Figura 1). Os buracos de colagénio são críticos para a mineralização biológica, já que parecem ser o local de eleição para a nucleação dos minerais. Os cristais aparentemente crescem e proliferam a partir deste núcleo de cristal. Além disto, o próprio tamanho disponível nestas estruturas parece restringir o crescimento mineral (Abou et al., 2012; Crane et al., 2006; William J. Landis & Jacquet, 2013; Nudelman, Pieterse, George, Bomans, Friedrich, Brylka, Hilbers, De With, et al., 2010a; Silver & Landis, 2011).

A conformação assumida pela molécula do colagénio tipo I, tanto nas zonas dos buracos como nas zonas de sobreposição, admite uma especificidade de aminoácidos que possuem a capacidade de serem transladados tridimensionalmente (Landis et al., 1992). Assim, as moléculas de colagénio adjacentes encontram-se organizadas em matrizes

microfibrilares (seis moléculas em um modelo quasi-hexagonal de montagem microfibrilar e molecular) que são escalonadas por um múltiplo de 2 a 5 de 234 aminoácidos. Os polipéptidos constituintes de cada molécula foram previamente definidos pela análise sequencial das cadeias humanas α (alfa), α -1 e α -2, as quais podem ser obtidas através da página do Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH), que fornecem informações sobre as relações intra-fibrilares entre os aminoácidos (William J. Landis & Jacquet, 2013; Orgel et al., 2006; Palmer et al., 2008).

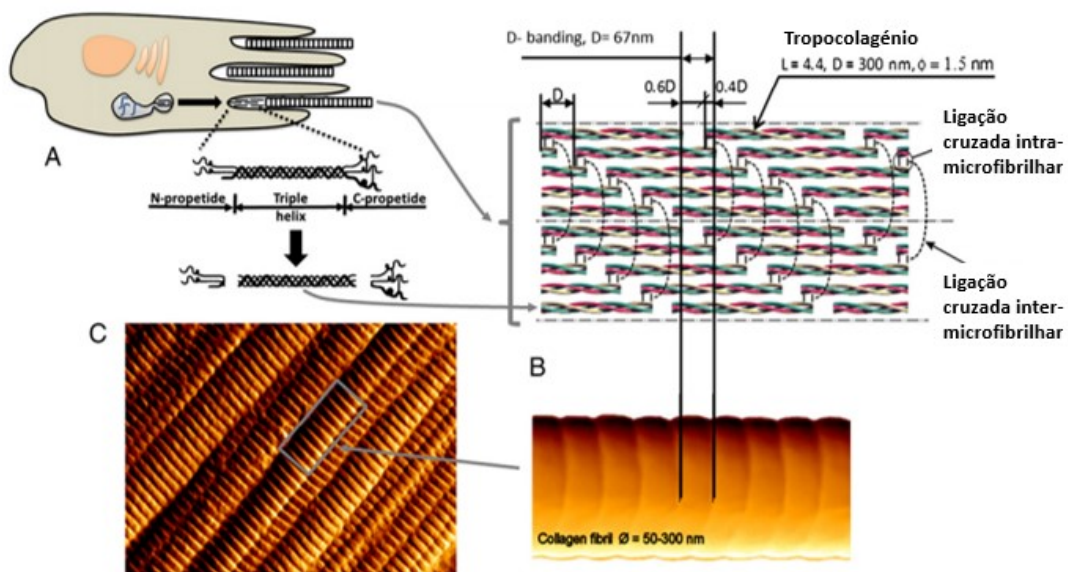


Figura 1 - Micro e ultraestrutura do colágeno. (A) Conversão do procólágeno em tropocolágeno por clivagem dos N e C propeptídeos. (B) Tripla hélice de colágeno. (C) imagem de AFM de fibrilas de colágeno alinhadas in situ de um tendão. Adaptado por (Abou et al., 2012) © 2012 Published by Elsevier B.V com permissão de reprodução (anexo)

Segundo o trabalho de Silver & Landis, 2011, para cada molécula de colágeno tipo I, a identidade e posição dos aminoácidos carregados exibem diversas características interessantes. Entre eles, o mesmo aminoácido carregado pode ser frequentemente encontrado adjacente em cada uma das três cadeias polipeptídicas de colágeno, ou caso os aminoácidos não sejam idênticos, eles possuem a mesma carga positiva ou negativa nas três cadeias. Em cada molécula de colágeno do tipo I, os mesmos dois ou três aminoácidos adjacentes de carga semelhante (ácido glutâmico/ aspártico ou lisina/ arginina) estão localizados próximos dos dois ou três aminoácidos adjacentes da mesma carga (ácido aspártico/ glutâmico ou arginina/ lisina). Finalmente, um dos três aminoácidos de lisina ou arginina encontrados nas cadeias polipeptídicas adjacentes pode ser substituído por um aminoácido de hidroxilisina da mesma carga positiva (William J. Landis & Jacquet, 2013; Silver & Landis, 2011). Assim, criam-se aglomerados de

aminoácidos carregados em cada molécula de colagénio, um resultado que leva a altas densidades de carga em sítios intrafibrilares discretos dentro das moléculas. Estes sítios correspondem em 12 bandas diferentes ou regiões sequencialmente designadas diferentes, que se coram com sais de metálicos pesados nos buracos de colagénio ou nas zonas de sobreposição no colagénio tipo I (Chapman & Hardcastle, 1974; Crane et al., 2006; William J. Landis et al., 2006; William J. Landis & Jacquet, 2013; Silver & Landis, 2011)

INICIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO E FORMAÇÃO DA FASE MINERAL

A mineralização é um processo natural que acontece durante toda a vida, em que uma substância inorgânica precipita em uma matriz orgânica. Os processos biológicos normais incluem a formação de tecidos conjuntivos duros, como osso, dentina e cimento, em que as fibrilhas de colagénio formam uma estrutura para um arranjo altamente organizado de cristais de fosfato de cálcio dispostos num eixo único (Nudelman, Pieterse, George, Bomans, Friedrich, Brylka, Hilbers, De With, et al., 2010b). O componente inorgânico desses tecidos duros consiste em apatite biológica, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. A célula unitária da apatite biológica tem forma hexagonal e as repetições das células unitárias produzem cristais de vários tamanhos. Na dentina, os cristais são dispostos em placas de 50 nm de comprimento, 20 nm de largura e 2–5 nm de espessura (Abou Neel et al., 2016). Devido à possibilidade dos íons da apatite poderem ser substituídos por outros equivalentes ou de se perderem para o meio, a relação de cálcio/fosforo é normalmente diferente da hidroxiapatite pura, também designada por hidroxiapatite estequiométrica (HAP, $\text{Ca/P}=1,67$). A apatite do esmalte, semelhante à HA estequiométrico, tem menos substituições do que o mineral ósseo e dentinário (Boskey, 2007).

Na dentina, o colagénio tipo I acomoda ~ 56% do mineral nas zonas de buracos e poros das fibrilhas. As proteínas não colagénicas atuam como inibidores, promotores e/ou estabilizadores de deposição mineral. A proteína da matriz da dentina-1, uma fosfoproteína ácida, desempenha um importante papel na iniciação da nucleação e modulação da morfologia da fase mineral (Abou Neel et al., 2016).

Inicialmente, a mineralização do colagénio foi considerada como uma precipitação inorgânica tradicional, tendo um crescimento cristalino originado diretamente do fluido intersticial, supersaturado com fases de fosfato de cálcio (Petruska & Hodge, 1964; Robinson & Watson, 1952). Recentemente, foi demonstrado que a deposição de apatite, no osso e nos dentes, não ocorre diretamente por associação de íons da solução mas é

precedida por uma fase precursora de fosfato de cálcio amorfo (ACP) que mais tarde pode transformar-se em fosfato octacálcio (OCP) antes de se tornar HAP (Elia Beniash et al., 2009), no entanto este mecanismo está ainda sobre debate (Rey et al., 2009). Foi sugerido que a formação de fosfato de cálcio *in vitro* é conduzida cineticamente, o que significa que o mineral não cristaliza diretamente no produto termodinamicamente mais estável, mas, em vez disso, precipita inicialmente na forma cineticamente mais acessível, ACP, que é subsequentemente transformada na fase termodinamicamente mais estável. Acredita-se que a formação de ACP se prossegue por meio de aglomerados pré-nucleados, denominados *clusters*, de tamanho de um subnanômetro com uma composição química $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, que são aglomerados estáveis presentes em solução antes da nucleação, como foi recentemente demonstrado para CaCO_3 (Pouget et al., 2009). No entanto, o papel desses aglomerados como unidades estruturais para a formação de ACP tem sido debatido há já alguns anos. A origem do mineral e como o mesmo infiltra as partículas de colagénio ainda são desconhecidos.

O mecanismo de iniciação do processo de mineralização biológica permanece um tema controverso. A teoria do precursor transitório do início da mineralização da apatite é uma opinião bastante considerável na comunidade da biomineralização (Mahamid et al., 2011; Weiner., 2006). Dados obtidos por espectroscopia de Raman de um modelo de mineralização intramembranosa murina confirma a existência de OCP, e possivelmente o precursor ACP (Crane et al., 2006; Steve Weiner, 2006). O OCP, que é menos estável termodinamicamente do que a apatite, em condições fisiológicas e compartilha planos cristalográficos semelhantes com a hidroxiapatite, foi relatado como um intermediário transitório para a nucleação homogênea de HAP *in vitro* (Betts et al., 1981; Brown, 1966; Grynpas & Omelon, 2007).

Estudos mais recentes, com a aplicação de técnicas mais sensíveis, confirmaram a presença *in vivo* de fases intermediárias similares a OCP, primeiro em tecidos de crânio de rato (Crane et al., 2006) e posteriormente no esmalte de ratos (Beniash et al., 2009), em ossos finos de peixe-zebra (Mahamid et al., 2010, 2008) e no crânio e ossos longos de ratos (Mahamid et al., 2010, 2011). Permitiram ainda confirmar que o mineral é depositado em *clusters* (presumivelmente ACP) pelas células presentes nas zonas de crescimento, fundindo-se com a malha de colagénio e transformando-se em apatite. Estas observações geraram uma alteração na forma como a formação mineral nos tecidos conjuntivos acontece.

NUCLEAÇÃO NOS BURACOS DE COLAGÉNIO

Vários estudos mostraram que o processo da nucleação da fase mineral ocorre preferencialmente dentro das regiões dos buracos das fibrilhas de colagénio (E. Beniash et al., 2000; Robinson & Watson, 1952), nos quais a maioria dos cristais encontram-se bem organizados em arranjos paralelos, em bandas negras praticamente contínuas (Traub et al., 1989). No entanto os fatores que direcionam a nucleação na zona de buraco de colagénio permanecem ainda um tema controverso. Diversas investigações *in vitro* têm sido efetuadas com objetivo analisar os mecanismos relacionados com a especificidade espacial da formação de apatite no colagénio. Análises da sequência de aminoácidos e da estrutura primária, secundária e terciária da proteína demonstraram que o local específico na região do buraco de colagénio no qual os cristais são nucleados (Weiner et al., 1992) contêm *clusters* de aminoácidos carregados (Chapman & Hardcastle, 1974; Dahl et al., 1998).

Num modelo tridimensional de microfibrilhas de colagénio, proposto por Hodge e Petruska. (1964), foi altamente notável a repetição de seis resíduos de aminoácidos carregados específicos. Neste caso, muitos dos locais desses aminoácidos carregados particulares ocupam locais conhecidos dentro das zonas dos buracos ou das zonas de sobreposição de colagénio. As cadeias laterais destes aminoácidos podem tomar uma conformação tridimensional capaz de coordenar iões de cálcio e fosfato, providenciando assim, centros de nucleação de apatite (Dahl et al., 1998; William J. Landis & Silver, 2002; Petruska & Hodge, 1964; Silver & Landis, 2011). Adicionalmente, Landis & Silver, (2002), sugeriram que a ligação preferencial dos iões de cálcio e fosfato na zona de buraco de colagénio poderia ser uma consequência de flexibilidade presente nesta região. Entretanto, a maioria dos estudos *in vitro* reportam cristais de apatite sendo nucleados uniformemente nos buracos de colagénio e nas zonas de sobreposição, sugerindo a existência de um mecanismo adicional com o intuito de direcionar a formação de apatite em locais específicos (Elia Beniash et al., 2009; Nudelman, Pieterse, George, Bomans, Friedrich, Brylka, Hilbers, De With, et al., 2010a; Olszta et al., 2007).

Os eventos de nucleação parecem ser independentes uns dos outros (Kevin Range, 2012), sugerindo que núcleos de apatites individuais possam ser formados em diferentes momentos e em locais distintos em um ou mais canais de zona de buraco, bem como em zonas de sobreposição (Landis et al., 2006; Landis & Silver, 2002). Com o crescimento da apatite formem-se cristais em plaquetas muito pequenas nos vários locais de buracos

e sobreposição das fibrilhas de colagénio. É importante notar que, enquanto o mineral precipita preferencialmente nas zonas dos buracos de colagénio, os cristais têm mostrado crescer em dimensão e eventualmente excedem o tamanho da zona de buraco de colagénio (W.J Landis et al., 1992).

Uma outra hipótese considera que as regiões de buraco de colagénio das fibrilhas adjacentes criam canais para providenciar espaço, permitindo assim a formação mineral (W.J Landis et al., 1992; Yamauchi et al., 1989). Embora a constrição do espaço possa realmente exercer um papel importante, o fato é que a nucleação *in vitro* no colagénio foi observada tanto no buraco de colagénio como na zona de interposição, sugerindo que a disponibilidade espacial não limitaria o crescimento dos cristais (Elia Beniash et al., 2009; Nudelman, Pieterse, George, Bomans, Friedrich, Brylka, Hilbers, De With, et al., 2010a; Olszta et al., 2007). Na realidade, os cristais são capazes de empurrar as fibrilhas de colagénio enquanto crescem, permitindo assim a formação mineral na zona de sobreposição.

Pouco se sabe a respeito dos detalhes de como as moléculas orgânicas por si só mudam no estágio inicial de mineralização. A razão para isto é que a mineralização no seu estágio inicial é relativamente rápida e as reações relativas de interface são difíceis de serem observadas. Investigações *in situ* da maneira com a qual o processo de mineralização biológica evolui na interface orgânica/mineral, a partir do seu estágio inicial, revelam alguns dos mecanismos de reação à nível molecular (F. Z. Cui et al., 2008). Enquanto esta matriz estruturada descrita acima providencia a base para uma associação do mineral com o colagénio tipo I, há relatos na literatura de que a mineralização ocorre tanto internamente (deposição intrafibrilar) como externamente (deposição interfibrilar) às moléculas de colagénio tipo I, por processos aparentemente distintos um do outro. Adicionalmente, foi demonstrado que este mineral é composto de cristais de apatite carbonados e finos, em forma de *platelets* alinhados, geralmente paralelos uns aos outros dentro da estrutura de colagénio tipo I com os seus eixos c orientados paralelamente ao longo eixo do colagénio com o qual se associam (Landis et al., 2006; Landis & Jacquet, 2013; Weiner & Traub, 1992).

Como já foi descrito, enquanto a associação entre iões de cálcio e fosfato ao colagénio foi relatada com bastante detalhe durante o processo da nucleação heterogênea intrafibrilar, pouco se sabe no que diz respeito à superfície de colagénio e entre microfibrilhas, fibrilhas e fibras. Tanto os iões quanto as diferentes espécies moleculares, como alguns dos membros da proteína da família SIBLING (*small integrin-binding*

ligand, N-linked glycoprotein), são sugeridos como mediadores da nucleação da superfície do colagénio e da nucleação heterogênea interfibrilar (William J. Landis & Jacquet, 2013; Olszta et al., 2007). Numerosos estudos demonstraram que os membros da família SIBLING são proteínas ácidas com cadeias de peptídeos estruturalmente flexíveis e pedido limitado de longo alcance (Elia Beniash et al., 2011; George & Veis, 2008). Algumas destas proteínas, nomeadamente a sialoproteína óssea (BSP), a osteopontina (OP), a fosfoforina de dentina (DPP) e a proteína da matriz de dentina 1 (DMP1), contêm regiões que reconhecem o colagénio, bem como domínios caracterizados por aminoácidos carregados e locais de glicosilação, sulfatação e fosforilação capazes de interagir com os iões do mineral (He & George, 2004; William J. Landis & Jacquet, 2013). Certas evidências de microscopia eletrónica, identificaram a fosfoforina da dentina e sialoproteína óssea ligadas nas zonas superficiais de colagénio onde as conformações carregadas ou fosforiladas podem possivelmente estender-se para espaços interfibrilares, atraindo iões de fosfato e cálcio e originando assim a nucleação. Esta interação pode contribuir na deposição de mineral entre as fibrilhas de colagénio e nas fibras dos espaços extracelulares (Fujisawa & Tamura, 2012; Stephen Weiner & Traub, 1992). A DPP, em particular, liga-se preferencialmente ao local no qual a nucleação dos cristais de apatite pode ser observada (Dahl et al., 1998; Traub et al., 1989; Stephen Weiner & Traub, 1992). No entanto, estudos de mineralização *in vitro* realizados por Beniash et al. (2011), sugerem que a DPP não induz preferencialmente a formação de apatite nos buracos de colagénio. Sendo assim, as proteínas não colagénicas podem atuar tanto como inibidores, quanto como promotores e/ou estabilizadores de deposição de mineral. A extensão da inibição pode ser tal que a deposição de mineral é altamente controlada e restrita apenas ao colagénio e não a outros constituintes do tecido (Toroian et al., 2007).

Estudos mais recentes afirmam que a estequiometria polipeptídica do colagénio tipo I é fundamental para os eventos iniciais da deposição mineral nos espaços intrafibrilares da molécula. Neste sentido, as cadeias de aminoácidos laterais carregados do polipéptido nos arredores dos buracos de colagénio tipo I e zonas de interposição são consideradas como zonas de ligação adjuvantes para os iões de cálcio e fosfato encontrados nos fluidos supersaturados teciduais circundantes (Silver & Landis, 2011; Y. Wang et al., 2012).

A combinação de iões de cálcio e fosfato encontra-se em íntima associação, constituindo um centro para a nucleação de cristais minerais nos buracos de colagénio zonas de sobreposição intrafibrilares. O colagénio tipo I parece então atuar como uma

matriz para a nucleação dos cristais independentemente das outras moléculas (não colagénicas) presentes nos tecidos. Porém, embora esta última conclusão possa ser válida para a mineralização intrafibrilar, não é necessariamente aplicável à formação de mineral entre as fibras de colagénio (mineralização interfibrilar), nem às demais formações hierárquicas estruturais da proteína. Nestes casos, os meios de deposição mineral que circundam o colagénio são ainda incertos e requerem uma maior clarificação, possivelmente com o envolvimento das proteínas não colagénicas (NCPs) e demais moléculas acessórias presentes no meio (William J. Landis & Jacquet, 2013; Silver & Landis, 2011).

Enquanto a regulação e controlo da mineralização interfibrilar do colagénio é conjectural nos espaços extracelulares dos vertebrados, outros aspetos da interação colagénio-mineral carecem de um maior conhecimento e entendimento. Por exemplo, existe pouca informação relativa à ocorrência do alinhamento paralelo dos cristais recém-formados e à orientação estrita dos seus eixos c-cristalinos ao longo do eixo principal do colagénio. Há também evidência incompleta em relação da progressão do crescimento e do desenvolvimento destes cristais após a sua nucleação com o colagénio tipo I e há poucos dados relevantes relativos à deposição mineral intrafibrilar no espaço longitudinal estreito existente entre as moléculas de colagénio tipo I (William J. Landis & Jacquet, 2013).

MÉTODOS DE CARATERIZAÇÃO DO COLAGÉNIO MINERALIZADO

Os principais métodos utilizados para caraterização do colagénio mineralizado apresentam-se na tabela 1. As diferentes técnicas oferecem aspetos importantes sobre o comportamento do colagénio durante o processo de biomineralização e novas perspetivas sobre o mecanismo envolvido.

Como é sabido, uma variedade de mudanças na morfologia e na mecânica, associadas ao processo de mineralização do colagénio podem ser observadas por meio de variadas técnicas. Com base nisso um grande número de estudos utiliza métodos correspondentes a microscopia (SEM, TEM, AFM e fluorescência) para visualizar a fibra de colagénio mineralizada ou espectroscopia (Raio-X, FTIR, Raman, Imagem de Ultrassom de Espectro de Alta Resolução) para determinar o conteúdo químico das amostras e testes *in vitro* em culturas celulares para verificar a interação do novo material com o meio biológico, e mais alguns outros como: determinar as propriedades mecânicas,

comportamento térmico (DSC, TGA), capacidade de absorção e algumas simulações moleculares das interações que podem ocorrer entre o colagénio e os outros componentes, nomeadamente a hidroxiapatite (Niu et al., 2017a; Tomoia & Pasca, 2015).

Tabla 1- Métodos de caracterização do colagénio mineralizado

Caraterização Morfológica	Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM) Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM) Microscopia de Força Atómica (AFM) Microscopia de Fluorescência
Análise do Conteúdo Mineral	Difração de RaiosX Espectroscopia Infravermelha transformadora de Fourier (FTIR) Espectroscopia Raman Imagem de ultrassom espectral de alta resolução
Propriedades Mecânicas	Módulo de elasticidade
Biocompatibilidade	Culturas celulares
Análise térmica	Calorimetria de varredura diferencial (DSC) Análise Termogravimétrica (TGA)

INTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO NA MINERALIZAÇÃO DO COLAGÉNIO

Existem vários estudos com objetivo de explorar os diferentes fatores que influenciam o *self-assembly* do colagénio, o crescimento dos cristais de fosfato de cálcio e a suas interações. O cálcio ionizado livre aparenta ser um fator extracelular crucial para o processo de mineralização e tem sido amplamente investigado. Alguns investigadores usaram concentrações baixas de iões de cálcio nos seus estudos experimentais. Por exemplo, Liu et al. utilizou redes revestidas com carbono flutuantes, contendo colagénio reticulado sobre ácido poliacrílico simulando o fluido corporal (SBF) com uma concentração de Ca^{2+} 2,5 mM. Deshpande et al. também colocou fibrilhas de colagénio em solução de mineralização com Ca^{2+} 1,67 mM. No entanto, outros autores usaram concentrações altas nos seus estudos. Por exemplo, Zhang et al. preparou uma solução de mineralização com mais de 10 mM Ca^{2+} (Deshpande et al., 2010; Liu et al., 2011; Zhang et al., 2010).

A fibrilogénese ocorre previamente à mineralização no tecido ósseo natural, sendo que a sequência correta entre o *self-assembly* do colagénio e a nucleação dos cristais

minerais continua um tema de debate. A fibrilogénese pode ser realizada em 2 ou 3 etapas *in vivo*. O processo foi proposto inicialmente pela síntese da cadeia polipeptídica alfa em ambiente intracelular, com posterior conversão em procolagénio (depois de clivagem enzima-específica ao nível do seu peptídeo terminal), transferindo para o meio extracelular, rico em iões de Ca^{2+} e PO_4^{3-} dentro da faixa de concentração fisiológica (Niu et al., 2017b).

Em todos os tecidos osteoides, encontra-se a mesma estrutura básica: fibrilhas de colagénio, cristais de HAP (*platelets*), com eixos c (0 0 1) alinhados paralelamente ao longo eixo das fibrilhas, estruturadas previamente por *self-assembly* em uma matriz apresentando uma sequência periódica de buracos e zonas de sobreposição. Os cristais de HAP são nucleados nos buracos de colagénio, mas crescem além deles e são armazenados no espaço existente entre as moléculas de tropocolagénio, originando os nanocompósitos orgânicos-inorgânicos (Elia Beniash et al., 2009; Tomoaia & Pasca, 2015).

Apesar de todos esses avanços, o efeito das várias concentrações de cálcio na estrutura hierárquica mineralizada do colagénio ainda não foi estabelecido. Num estudo recente, os resultados obtidos por DSC sugeriram que o aumento da concentração de iões de cálcio provoque uma diminuição no grau de *self-assembly* do colagénio, podendo mesmo inibi-lo. Os autores apontam duas possíveis razões para explicar esse fenómeno: a combinação do cálcio em excesso nos locais de ligação pode influenciar a estabilização da carga do colagénio durante o processo de automontagem; a estrutura espacial do conjunto ACP-colagénio e dos cristais afeta a estabilidade do colagénio fibrilhar (Niu et al., 2017; Qiu et al., 2015). Posto isto, a pesquisa da influência das concentrações na mineralização do colagénio é beneficiada não apenas para obter um conhecimento aprofundado da interação entre os cristais de fosfato de cálcio e colagénio, mas também para desenvolver o substituto ósseo artificial com propriedades ideais.

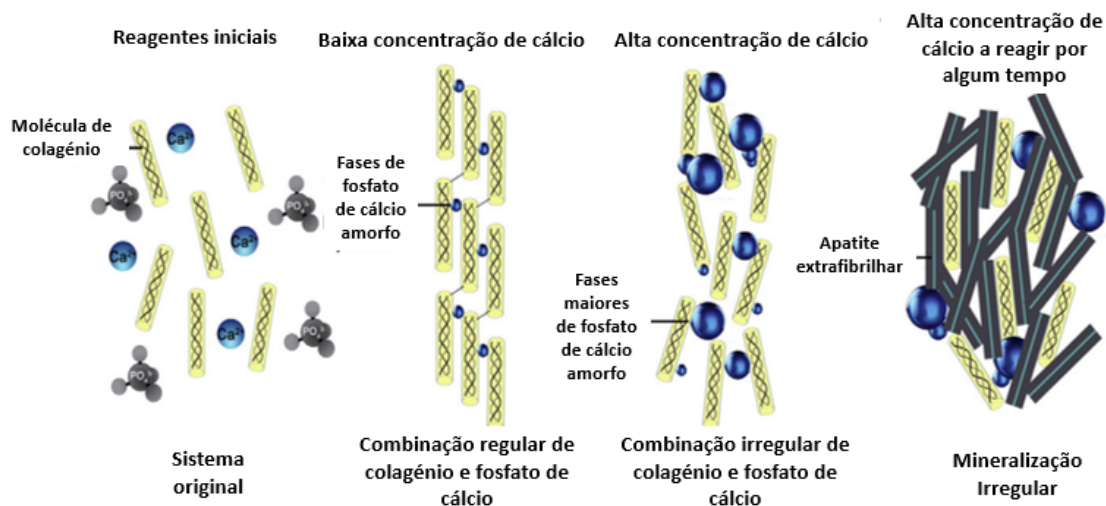


Figura 2- Ilustração esquemática do mecanismo de automontagem do colágeno dependente da concentração de íons de cálcio. A molécula de colágeno, o grupo fosfato e a baixa concentração de íons de cálcio combinam-se regularmente através da ligação de hidrogênio e o efeito de carga. A alta concentração de íons de cálcio leva a combinação irregular devido à combinação superabundante de cálcio nos locais de ligação e ACP coletivo. Adaptado de (Niu et al., 2017), com permissão de utilização da Elsevier B.V e do autor (anexo)

LIGAÇÕES CRUZADAS: O PAPEL DO GLUTARALDEÍDO (GTA) E DA GENIPINA (GEN)

Nos sistemas biológicos, a organização do colágeno tipo I em fibrilhas é acompanhada pela formação de ligações cruzadas covalentes inter e intramoleculares entre as cadeias alfa, que conferem alta resistência à tração, integridade mecânica necessária para os tecidos e resistência fibrillar contra as degradações enzimáticas (Han et al., 2003; Sung, Chang, et al., 1999a). As moléculas de colágeno tipo I têm quatro tipos de ligações cruzadas, um em cada telopeptídeo e dois outros no domínio da tripla hélice. Considerava-se que a estabilização inicial da fibrilha de colágeno era por meio da ação da enzima lisil-oxidase que catalisa os grupos aldeídos dos resíduos de lisina e hidroxilisina nos N- e C- telopeptídeos (figura 1). Esta ação é responsável por quase todas as ligações cruzadas em tecidos jovens. Os aldeídos catalisados são altamente reativos e, portanto, reagem quimicamente e espontaneamente com outros resíduos de lisina modificados ou não modificados de outra cadeia dentro da mesma molécula ou de moléculas adjacentes, ligando duas moléculas da cabeça à cauda ao longo da fibrilha por meio de ligações cruzadas intra-microfibrilares imaturas (Abou et al., 2012; Di Foggia et al., 2019; Knott & Bailey, 1998). Outro tipo de reticulação que é baseado na reação com glicose ou os seus metabolitos é conhecido como glicação. Este processo ocorre de forma

não enzimática e origina ligações cruzadas intermoleculares (Li et al., 2012; Yamauchi et al., 2018).

No contexto da bioengenharia tecidual, a regulação da biodegradação do colagénio é essencial para a regeneração dos tecidos biológicos. Biomateriais a base de colagénio em diferentes formas físicas (fibras, filmes, esponjas, hidrogéis e pó) são amplamente usados para aplicações de engenharia de tecidos. Tais estruturas auto-organizadas de colagénio ou poliméricas revestidas com proteínas da matriz extracelular, são consideradas biologicamente ativas e, conseqüentemente, devem facilitar a regeneração dos órgãos. É, no entanto, essencial que as propriedades físicas das fibras correspondem às do tecido a substituir. A reticulação natural, a formação de ligações covalentes inter- e intramoleculares entre proteínas, é utilizada pela natureza para gerar novas entidades com propriedades completamente diferentes da forma monomérica original. A principal função da reticulação natural é transmitir a mecânica desejada e a resistência proteolítica nas fibras de colagénio no tecido conjuntivo.

As ligações cruzadas, responsáveis pela conformação tridimensional da molécula de colagénio (Orgel et al., 2006), encontram-se em abundância nos tecidos vivos. A extração de colagénio a partir de tecidos de vivos envolve a quebra das ligações cruzadas e a conseqüente perda da sua integridade e estabilidade mecânica. A reticulação mediada pela lisil-oxidase não ocorre *in vitro* e, conseqüentemente, as formas reconstituídas de colagénio podem não ter resistência suficiente e podem desintegrar-se durante a sua aplicação sobre o tecido circundante *in vivo*. Assim, as formas reconstruídas de colagénio precisam de ser reforçadas por mecanismos exógenos, por meio de métodos químicos, físicos e/ou biológicos (Charulatha & Rajaram, 2003; Zeugolis et al., 2009).

Há vários agentes químicos sintéticos e naturais que podem aumentar o número das ligações cruzadas do colagénio tanto a nível inter como intramolecular (Abou et al., 2012; Delgado et al., 2017; Han et al., 2003; Sung, Chang, et al., 1999a; Sung, Huang, et al., 1999). As ligações cruzadas podem ainda ser formadas entre duas microfibrilas adjacentes (ligações cruzadas intermicrofibrilares) quando a distância entre as duas microfibrilas (1,3-1,7nm) é menor do que o comprimento do agente de reticulação introduzido. Uma série de abordagens de reticulação foram investigadas ao longo dos anos, tendo-se verificado produzirem matrizes com diferentes propriedades físicas, dependendo do método de reticulação adotado. Entre os vários métodos, mais efetivos são os químicos com preferência na ligação cruzada química através do terminal amina ou carboxilo (Sallent et al., 2019; Zeugolis et al., 2009).

A reticulação química do colagénio envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos de amina ou carboxilo do colagénio com o agente de reticulação. A redução das aminas ou dos carboxilos livres pode ser usada como um indicador de eficiência de reticulação (Delgado et al., 2017). O tratamento das fibrilhas de colagénio com agentes de ligação com o objetivo aumentar as propriedades mecânicas e diminuir a degradação enzimática pode ser uma aplicação importante na área da dentisteria operatória. Foi demonstrado que agentes de reticulação seletivos aumentam a resistência à tração final e o módulo de elasticidade da dentina desmineralizada (Bedran-Russo et al., 2006, 2008).

A reticulação química do colagénio está associada a uma resposta predominante de macrófagos pró-inflamatórios, inibição da polarização de macrófagos, redução da infiltração celular, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e retardamento na cicatrização tecidular resultando em citotoxicidade e biocompatibilidade reduzida. O mecanismo relacionado com a resposta inflamatória e com a cicatrização retardada ainda não está bem definido. Os macrófagos já foram descritos como um tipo de célula de resposta rápida, com papel crucial na coordenação da resposta inflamatória e das fases de regeneração tecidular (Delgado et al., 2015, 2017).

Cada agente ligante tem um modo de ação único que é consequentemente responsável pelas propriedades do composto resultante. O glutaraldeído (GTA, figura 3) é o reagente mais amplamente utilizado para reticulação de colagénio sendo considerado um dos mais potentes agentes de ligação. Contudo, o GTA está associado a citotoxicidade (Gough et al., 2001; Hass et al., 2016; Sung et al., 2003), a calcificação (Mcgregor et al., 2016) e que desencadeia respostas do organismo a corpo estranho (Delgado et al., 2015). A genipina (GEN, figura 3) é um agente de reticulação de ocorrência natural que apresenta estabilidade mecânica enquanto reduz a citotoxicidade, tendo vindo a ser usado na fixação de tecidos biológicos (Delgado et al., 2017).

Quimicamente, a ação do GTA sobre as matrizes colagénicas está relacionada com a sua capacidade de reagir com os grupos ϵ -amina de resíduos dos aminoácidos lisina e hidroxilisina para formar ligações cruzadas do tipo base de Shiff entre estes aminoácidos ($-\text{CH}=\text{N}-$) (Abou et al., 2012). A reticulação com o GTA forma ligações intra e intermoleculares, envolvendo o grupo ϵ -amino não protonado da lisina, que então forma uma imina (Gough et al., 2001). Além de introduzir mais ligações do que os outros tipos de aldeídos, com o uso do GTA, estas ligações são mais estáveis (Charulatha & Rajaram, 2003). As ligações cruzadas entre os resíduos de lisina e hidroxilisina elevam o peso

molecular, reduzem a solubilidade, conservam a configuração molecular, aumentam as cargas negativas e a resistência à degradação e por fim diminuem a antigenicidade. A reação do GTA com o grupo amino do colagénio depende da espessura do biomaterial, da concentração do aldeído, do tempo de tratamento, da temperatura e do pH (Bowes & Cater, 1966).

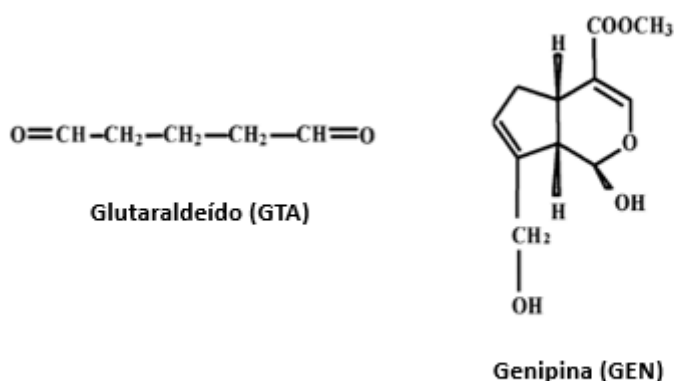


Figura 3- Estruturas químicas de GTA e GEN - adaptado de (Hsing-Wen Sung et al., 1999), com permissão de utilização da Elsevier Science Ltd e do autor (anexo)

A reticulação com o GTA envolve uma distribuição heterogênea de ligações que ocorre maioritariamente na superfície das fibrilhas e fibras, que leva predominantemente a reticulações intermoleculares conectando moléculas de colagénio distantes. Já foi observada a polimerização de moléculas de GTA em solução aquosa com redução dos aldeídos livres. Na polimerização, os grupos funcionais de aldeído das duas moléculas de GTA podem sofrer uma condensação aldólica. Com a polimerização do GTA, após a fixação, uma estrutura de reticulação em rede pode ser criada intramolecularmente e intermolecularmente dentro das fibras de colagénio (figura 4a) (Sung, Chang, et al., 1999b). A capacidade do GTA em se autopolimerizar é provavelmente responsável pela sua eficácia como um agente de reticulação, enquanto a eficácia do formaldeído como agente de reticulação depende de sua abundância (Delgado et al., 2015).

A GEN pode ser obtida a partir do seu composto original, o geniposídeo, que é isolado dos frutos de *Gardenia jasminoides* Ellis (Fujikawa et al., 1987; Tsai et al., 2002; Winotapun et al., 2013). A GEN e os seus compostos iridoides relacionados têm sido amplamente utilizados como antipiréticos e colagogos na medicina tradicional chinesa e fitoterapia. Entre as suas funções biológicas, como metabólito secundário, a GEN pode

atuar como fonte de nutriente, armazenamento e fonte de energia. Foram já descritos algumas ações associadas à GEN, como a anti-inflamatória (Wishart et al., 2018), a analgésica, a antioxidante, a fibrolítica (Muzzarelli et al., 2015) e a anticarcinogénica (X. S. Wang et al., 2012). Adicionalmente, a reticulação da GEN (com quitosano, proteínas e aminas em geral) apresenta propriedades surfactantes, emulsionantes (Wishart et al., 2018), colorimétricas (Lee et al., 2003), biocompatibilidade, sendo um composto biodegradável e de baixa citotoxicidade (Muzzarelli, 2009). A GEN reticulada tem encontrado aplicação em diferentes áreas terapêuticas, nomeadamente na veiculação de fármacos e como constituinte de stents cardíacos (Muzzarelli et al., 2015), bem como em ciências da nutrição reticulante químico e corante natural azul (Bentes et al., 2015).

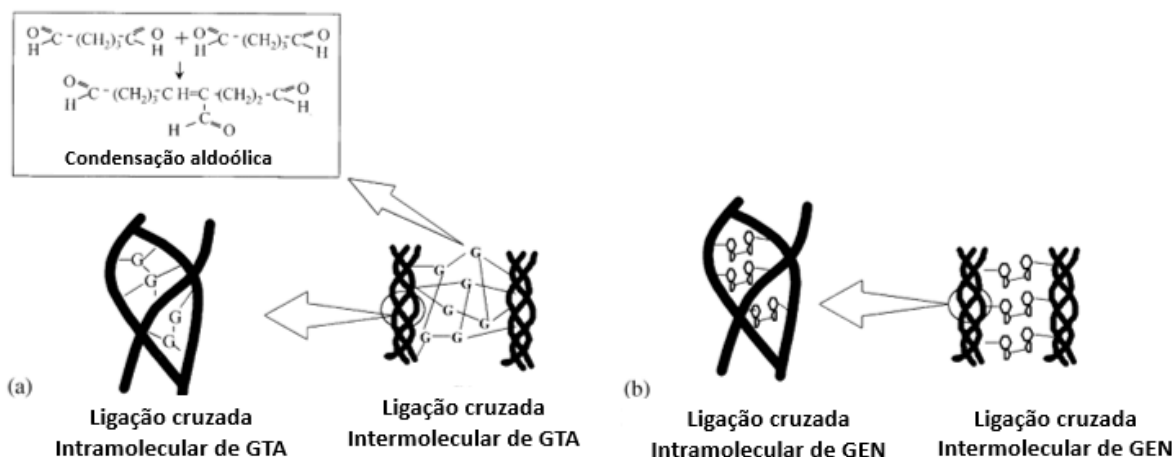


Figura 4- Ilustrações esquemáticas das presumíveis estruturas de reticulação intramolecular e intermolecular de (a) tecido fixado com glutaraldeído, (b) tecido fixado por genipina- adaptado de (Hsing-Wen Sung et al., 1999), com permissão de utilização da Elsevier Science Ltd e do autor (anexo)

Sabe-se que a GEN reage espontaneamente com aminoácidos ou proteínas para formar pigmentos de azul escuro (Bentes et al., 2015; Fujikawa et al., 1987). Esses pigmentos azuis escuros têm sido usados na fabricação de corantes alimentares. Além disso, tem sido utilizado na imobilização de enzimas e na preparação de microcápsulas de gelatina (Sung et al., 2000). Essas aplicações da GEN levaram ao seu uso com agente de reticulação natural para fixar tecidos biológicos. Fujikawa et al., (1987) afirmam que a GEN reage com aminoácidos para formar um nitrogeniridóide espontaneamente, que então sofre desidratação para formar um monómero aromático. Pode reagir com os grupos de amina livres de lisina, hidroxilisina ou arginina para formar ligações cruzadas intra- ou intermoleculares com estrutura cíclica (figura 4b) dentro de uma molécula de

colagénio ou entre moléculas de colagénio adjacentes. O pigmento azul produzido é uma mistura de polímeros com aproximadamente 40-44 unidades monoméricas (Sung et al., 2003; Sung, Chang, et al., 1999a).

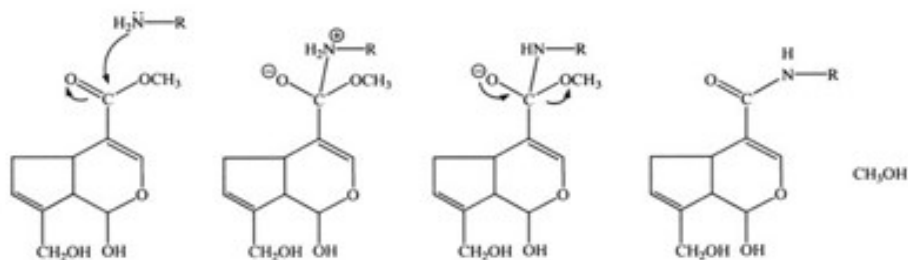
Verificou-se que o tecido fixado com GEN tem uma resistência à degradação enzimática comparável ao tecido fixado com GTA (Sung et al., 2003). Tal sugere que a GEN pode formar produtos reticulados estáveis. Além disso, a biocompatibilidade do tecido fixado com GEN foi estudada em um modelo de rato em crescimento por via subcutânea (Huang et al., 1998), tendo sido observado que a reação inflamatória do tecido fixado com GEN foi significativamente menor do que em tecido fixado com GTA. Adicionalmente, o conteúdo de cálcio do tecido fixado com GEN, medido durante todo o curso do estudo, foi mínimo, sugerindo que a genipina pode formar produtos reticulados biocompatíveis (Sung et al., 2000; Tsai et al., 2002).

A reticulação com GEN é influenciada pelo pH do meio reacional, sendo que, de modo geral, em pH mais neutro, a GEN reage com materiais que contém grupos amina, acontecendo duas reações principais: na primeira (figura 5), ocorre um ataque nucleofílico à GEN que leva à alteração do grupo éster da GEN por uma amida secundária; na segunda (figura 5), dá-se novo ataque nucleofílico, desta vez no carbono C3, formando-se um grupo aldeído intermediário, seguido da abertura do anel diidropirano, resultando em um novo ataque ao grupo aldeído pela amina formada no primeiro passo da reação (Butler et al., 2003).

A extensão da reticulação pode ser avaliada pela temperatura de desnaturação, quantificação de grupos amina livres, inchaço, propriedades mecânicas e / ou resistência à degradação enzimática. No entanto, a temperatura de desnaturação é normalmente usada para avaliar a densidade de reticulação devido à simplicidade e precisão da técnica. Assim, os materiais de colagénio são definidos como ligeiramente reticulados, moderadamente reticulados, e fortemente reticulados como quando exibem temperaturas de desnaturação de $<65^{\circ}\text{C}$, $65\text{-}70^{\circ}\text{C}$, e $>70^{\circ}\text{C}$, respetivamente (Delgado et al., 2015).

Um método adicional de avaliação de reticulação dos diferentes agentes pode ser o índice de fixação. O índice de fixação, determinado pelo ensaio da ninidrina, é definido como a percentagem de grupos amina livres no tecido que reagiram com um agente de reticulação de teste subsequente à fixação (Sung et al., 2000).

Esquema de reação química 1 de GEN



Esquema de reação química 2 de GEN

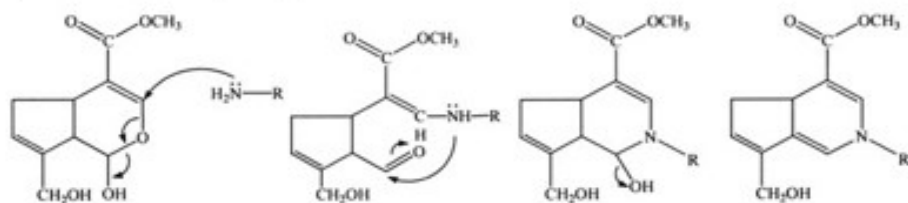


Figura 5- Reações principais de reticulação da genipina adaptado de (Butler et al., 2003) com permissão de autorização de Wiley Periodicals e to autor (anexo)

OBJETIVO DO TRABALHO

O presente trabalho teve como objetivo comparar quantitativa e qualitativamente os minerais obtidos por adição de íons cálcio e íons fosfato a uma solução de colagénio, na ausência e na presença de agentes de reticulação ou de cross-link. De acordo com a literatura, era espectável que estes agentes favorecessem o processo *self-assembly* do colagénio, acelerando a formação da matriz proteica e, logo, a formação de hidroxiapatite: com um agente de reticulação eficaz esperava obter-se maior quantidade de um mineral com características de hidroxiapatite. Contudo, e devido às adversidades encontradas durante a execução experimental neste início de ano 2020 marcado pela pandemia COVID-19, optou-se por convertê-lo num projeto menos ambicioso, num ensaio piloto dedicado à otimização das condições de obtenção de mineral na presença de glutaraldeído (GTA) ou de genipina (GEN), por avaliação preliminar do cristal obtido em cada caso pelas técnicas de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e de espectroscopia de raios X com dispersão de energia (EDS).

MATERIAIS E MÉTODOS

GRUPOS DE ESTUDO

O presente trabalho continua um estudo anteriormente desenvolvido neste laboratório (Araújo, 2019), dedicado à otimização da produção *in vitro* de hidroxiapatite na presença de colagénio, sendo que neste caso se pretendeu estudar o efeito da adição de agentes de reticulação (agentes de ligação cruzada ou, simplesmente, de ligação, também conhecidos por agentes de crosslink) na obtenção de mineral. Assim, os grupos de estudo considerados foram (tabela 2): Grupo A0, controlo, mineralização *in vitro* sem qualquer agente de reticulação (grupo A do trabalho de Araújo, 2019); Grupo A1, mineralização *in vitro* na presença de glutaraldeído (GTA) como agente de reticulação; Grupo A2, mineralização *in vitro* na presença de genipina (GEN) como agente de reticulação.

O trabalho experimental consistiu primeiramente na otimização dos passos de reticulação dos grupos A1 e A2, seguindo-se a aplicação do protocolo de mineralização desenvolvido anteriormente (Araújo, 2019) e finalmente a comparação dos cristais obtidos por análise das imagens de SEM e EDS. Realizou-se um total de dois ensaios para o grupo A0, seis para o grupo A1 e três para o grupo A2, os quais se encontram descritos mais à frente. A figura 6 mostra o esquema do procedimento experimental realizado, com identificação dos três diferentes grupos e dos ensaios efetuados em cada um.

Tabela 2 - Grupos de estudo do presente trabalho e respetivas soluções usadas na obtenção do mineral em cada caso.

Grupo A0	Solução ácida de colagénio + solução de cálcio + tampão salino de neutralização pH 7.4
Grupo A1	Solução de colagénio+ glutaraldeído 5% + solução de cálcio de + tampão salino de neutralização pH 7.4
Grupo A2	Solução ácida de colagénio + genipina 0,17% + solução de cálcio de + tampão salino de neutralização pH 7.4

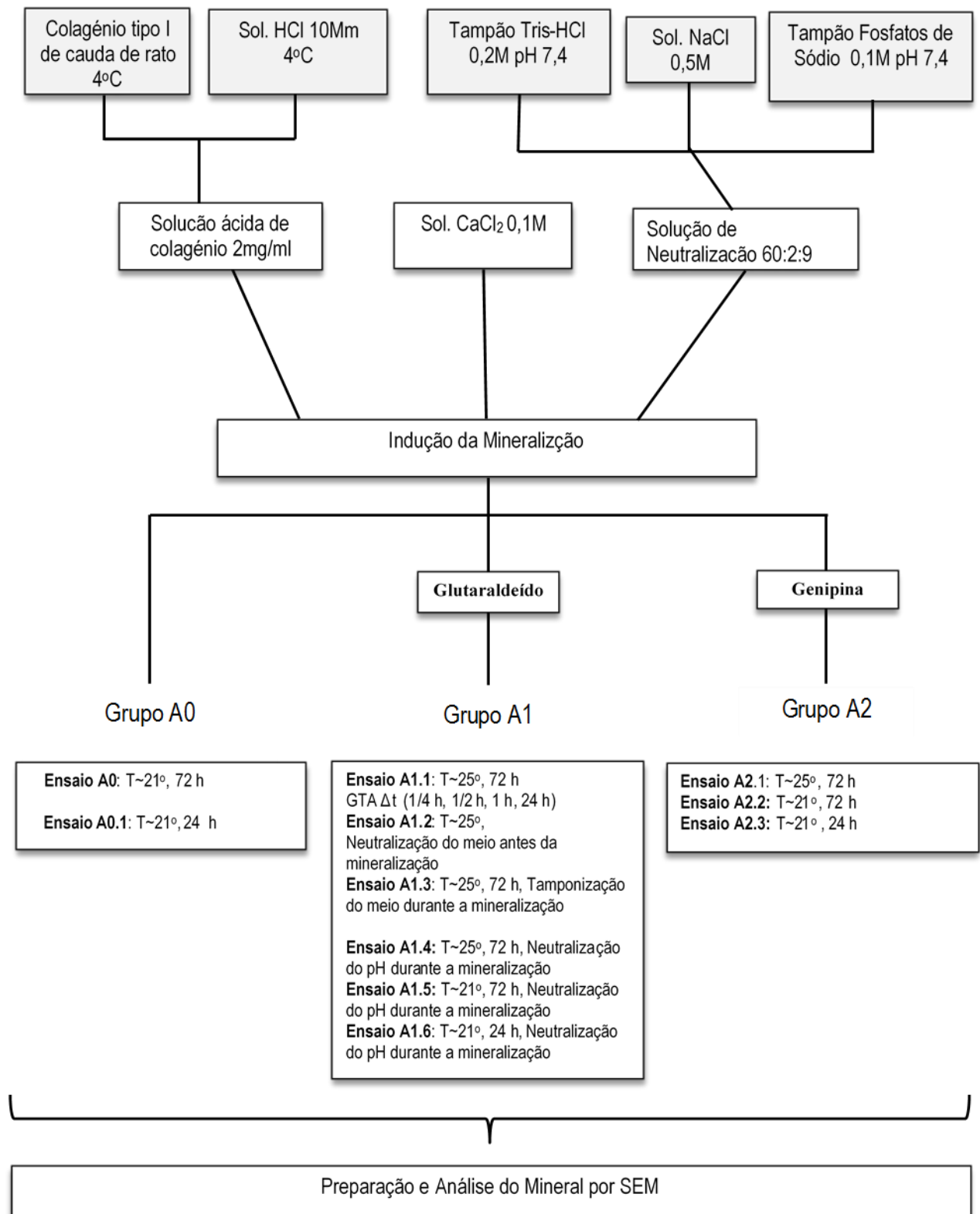


Figura 6 - Representação esquemática do procedimento experimental realizado e respetivos ensaios efetuado com cada grupo. Na designação dos ensaios usou-se o grupo a que pertencem, seguido da numeração do ensaio pela ordem de realização.

REAGENTES E SOLUÇÕES

As soluções usadas neste trabalho, identificadas na tabela 3, foram preparadas uma única vez, em quantidades suficientes para a totalidade dos ensaios realizados. À exceção das soluções de colagénio tipo I de cauda de rato (Sigma-Aldrich, CAS-number 9007-34-5) e do ácido clorídrico 10 mM preparado, que foram mantidas a 4°C, todas as restantes foram armazenadas à temperatura ambiente entre utilizações (Araújo, 2019; Cui et al., 2008).

Tabela 3 - Soluções preparadas neste trabalho

Solução de Ácido Clorídrico 1 M (HCl)
Solução de Ácido Clorídrico 10 mM (HCl)
Solução de Cloreto de Cálcio 0,1 M (CaCl ₂)
Solução Tampão Tris-HCl 0,2 M pH 7,4
Solução de Cloreto de Sódio 0,5 M (NaCl)
Solução Tampão de Fosfatos de Sódio 0,1 M, pH 7,4
Solução Salina de Neutralização (mistura 60:2:9 das três soluções anteriores)
Solução de Glutaraldeído (<i>Sigma-Aldrich</i> , CAS-number 111-30-8) 5% em Tampão de Fosfatos de Sódio 0,1 M pH 7,4
Solução aquosa de Genipina (<i>FUJIFILM</i> , CAS-number 6902-77-8) 0,17% pH 7,4
Solução de Genipina 0,17% em Tampão Tris pH 7,4

O glutaraldeído (GTA, CAS-number 111-30-8) utilizado neste trabalho foi fornecido pela *Sigma-Aldrich* e a genipina (GEN, CAS-number 6902-77-8) pela *FUJIFILM*

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Num estudo prévio neste laboratório (Araújo, 2019), onde se analisou o efeito da temperatura na quantidade e qualidade de mineral formado, verificou-se que a temperatura ambiente (~25°C) favoreceu a formação de cristais com características de hidroxiapatite, enquanto a 4°C observou-se uma reduzida formação de mineral e a 37°C o mineral formado apresentou-se irregular e heterogéneo. Atendendo a estes resultados, os primeiros ensaios realizados no presente estudo (ensaios A1.1 a A1.4 e A2.1) foram conduzidos a 25°C, em ambiente de temperatura controlada. Porém, um estudo paralelo com o grupo A0 (Antunes, 2020) revelou que a diminuição da temperatura para 21°C

resulta na obtenção de maior quantidade de cristais de estrutura ordenada. Por esta razão, as temperaturas da indução da mineralização dos últimos ensaios de cada grupo (ensaios A0, A0.1, A1.5, A1.6, A2.2 e A2.3) foram realizados a 21°C, em ambiente termicamente controlado.

A metodologia utilizada para obter os grupos A1 e A2 foi idêntica à do grupo A0, sendo as concentrações de agente de ligação cruzada baseada no trabalho Al-Ammar et al. (2009).

GRUPO A0

Cada amostra do grupo A0 foi preparada por adição de HCl 10 mM a 4°C ao colagénio de modo a originar uma solução 2 mg/ml em proteína. A 400 µL desta solução adicionaram-se 150 µL de CaCl₂ e, posteriormente, 800 µL da solução de neutralização. Todas as amostras dos 2 ensaios A0 e A0.1 foram igualmente preparadas, mas em condições de temperatura e tempo de mineralização diferentes. Então após a adição da solução de neutralização, as amostras dos ensaios A0 e A0.1 foram incubadas a temperatura ambiente durante 72 horas e 24 horas respetivamente.

GRUPO A1

O ensaio A1.2 teve como objetivo o controlo do pH na presença de tampão durante a atuação do GTA, ou seja, antes do início da mineralização. Então foram preparadas quatro diferentes amostras e os respetivos ensaios:

- ensaio A1.2(NaOH)0: 200µL colagénio a 4 °C, 75,8µL de solução de GTA 5% a 4 °C e 200µL de solução de tampão de fosfatos 0,1M pH 7.4 a 4°C
- ensaio A1.2(NaOH)20: 200µL colagénio a 4 °C, 75,8µL de sol. GA 5% a 4°C, 180µL de tampão de fosfatos 0,1M pH 7.4 a 4°C e 20µL NaOH 1M
- ensaio A1.2(NaOH)40: 200µL colagénio a 4 °C, de 75,8µL de sol. GA 5% a 4°C, de 160µL de tampão de fosfatos 0,1M pH 7.4 a 4°C e 40µL NaOH 1M
- ensaio A1.2(NaOH)60: 200µL colagénio a 4 °C, 75,8µL de sol. GA 5% a 4°C, 140µL de tampão de fosfatos 0,1M pH 7.4 a 4°C e 60µL NaOH.

Foram feitas medições de pH durante a primeira hora com a utilização de tiras de papel indicador de pH.

Tendo em consideração os resultados do ensaio A1.2, foram preparadas as amostras do ensaio A1.3 por adição de 200µL colagénio a 4 °C, de 75,8µL de sol. GTA 5% a 4 °C e mais de 200 µL de tampão de fosfatos 0,1M pH 7.4 a 4°C. Após a adição da solução de GTA, as amostras foram incubadas a 37oC durante 1 hora e em seguida adicionaram-se 724,2 µL de tampão de neutralização e 150 µL de CaCl₂. O processo de mineralização evoluiu durante 72 horas a temperatura ambiente ~25oC.

As amostras do ensaio A1.4 foram igualmente preparadas pela adição das soluções do ensaio anterior (A1.3) com única diferença a adição de diferentes quantidades de NaOH 1 M, neste caso já durante o processo de mineralização. Foram feitas medições de pH em 12 e 12 horas uma vez que o processo de mineralização, em condições normais ocorre durante 72 h. Foram preparadas dez amostras t0, t0.5, t1, t2, t12, t24, t36, t48, t60, t72. O tempo de atuação da solução de GTA (1 hora a 37oC) e tempo de indução de mineralização (72 horas a ~25oC) mantiveram-se estáveis.

No ensaio A1.5, com o controlo do pH durante a fase de mineralização, foram igualmente preparadas às anteriores três amostras. Após o tempo de atuação da solução de GTA (1 hora a 37oC) e a adição da solução de neutralização, as amostras do ensaio A1.5 foram incubadas a temperatura ~21oC em ambiente controlado durante 72 horas. Foram feitas as seguintes adições de NaOH 1M, no t0 50µL de NaOH 1M, no t12: 30 µL de NaOH 1 M, t36: 20 µL NaOH 1 M e no t60: 15 µL NaOH 1 M.

As amostras do ensaio A1.6 foram preparadas por adição de 200µL colagénio a 4 °C, de 75,8µL de sol, GTA 5% a 4 °C e mais de 200µL de tampão de fosfatos 0,1M pH 7.4 a 4°C. Após a adição da solução de GTA, as amostras foram incubadas a 37oC durante 1 hora e em seguida adicionaram-se 724,2µL de tampão de neutralização, 150µL de CaCl₂ e mais 50µL de NaOH 1M. O processo de mineralização evoluiu apenas durante 24 horas a temperatura ~21oC num ambiente controlado.

GRUPO A2

No ensaio A2.1 foram preparadas quatro amostras, duas dessas por adição de 200µL de colagénio a 4 °C, 124,2µL de HCl 10mM a 4oC e 75,8µL de Genipina 0.17% em 5ml H₂O a 4°C. Esta solução teve um tempo de tratamento durante 1 hora a 37oC, após a qual foram adicionados 150µL de CaCl₂ 0,1M e mais 800µL da solução de neutralização

previamente preparada. As outras duas amostras foram preparadas de modo igual, com única diferença a solução da genipina a qual foi em tampão Tris-HCl a 4°C em vez de H₂O. Todas as amostras deste ensaio foram incubadas durante 72 horas a temperatura ambiente ~25°C.

As amostras dos ensaios A2.2 e A2.3 foram preparadas de modo igual, mas em diferentes tempos de incubação da mineralização. Sendo assim foram adicionados 200µl de colagénio a 4 °C, 124,2µL de HCl 10mM a 4°C e 75,8µL de genipina 0.17% em 5ml H₂O a 4°C. Esta solução teve um tempo de tratamento durante 1 hora a 37° C, depois da qual foram adicionados 150µL de CaCl₂ 0,1M e mais 800µL da solução de neutralização. Após a adição da solução de neutralização as amostras do ensaio A2.2 foram incubadas a ~21°C num ambiente controlado durante 72 horas, enquanto as amostras do ensaio A2.3 foram incubadas a ~21°C num ambiente controlado durante apenas 24 horas.

PREPARAÇÃO DO MINERAL PARA ANÁLISE

Imediatamente após o final do passo de indução da mineralização, as amostras foram centrifugadas numa microcentífuga, à velocidade máxima durante 5 minutos, com o objetivo de separar o mineral da fase líquida. O mineral foi recolhido por decantação e posteriormente lavado com água bidestilada para reduzir a presença de sais solúveis, como por exemplo NaCl. A técnica de secagem descrita em Araújo, 2019, foi aplicada apenas nos ensaios A1.1-A1.4 e A2.1. Nos restantes ensaios usou-se um método de secagem mais adequado à análise por SEM de amostras contendo material biológico. Este método consiste numa primeira lavagem do mineral com água bidestilada, seguida de uma lavagem de 5 minutos com álcool a 70%, duas lavagens de 5 minutos cada com álcool a 96%, três lavagens de 5 minutos cada com álcool a 100% durante 5 minutos, concluindo-se com uma lavagem de 15 minutos com hexametildisilano (HMDS). No final desta última lavagem é exetável que a fase aquosa tenha sido totalmente removida, mas para prevenir vestígios de água, os eppendorfs devem ser mantidos invertidos numa atmosfera seca durante 48 horas.

O sobrenadante obtido por centrifugação foi usado para controlar o pH durante a mineralização, tendo-se usado para o efeito tiras de papel indicador de pH face às reduzidas quantidades de solução.

No final das 48 horas de secagem ao ar seco, estimou-se a massa de mineral obtida em cada ensaio por pesagem na balança analítica.

ANÁLISE DO MINERAL POR SEM E EDS

As análises por microscopia electrónica de varrimento (SEM) foram realizadas no Centro de Microscopia Electrónica e Histopatologia (Cmicros) da Egas Moniz, CRL, no equipamento JEOL LSM 5400 (figura 7). As amostras a serem analisadas foram colocadas sobre fita adesiva de dupla face, num suporte próprio com capacidade para quatro amostras diferentes (figura 8). Inicialmente, as amostras recebem um tratamento de paládio no evaporador a vácuo JEOL 400 (figura 9), por pulverização do metal em alto vácuo durante 15 minutos.



Figura 7- Microscópio Electrónico de Varrimento (Cmicros) da Egas Moniz, CRL, no equipamento JEOL LSM 5400.



Figura 8 - Amostras colocadas em fita adesiva de carbono em base metálica.



Figura 9- Instrumento de evaporação a vácuo JEOL 400, Cmicros Egas Moniz CRL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a otimização do processo de obtenção de mineral na presença de diferentes agentes de ligação com potencial mineralizante, nomeadamente glutaraldeído (GTA) e genipina (GEN), na formação *in vitro* de hidroxiapatite, na presença de colagénio. Pretendia-se comparar o mineral obtido usando cada um destes agentes com o mineral obtido em condições idênticas, mas sem qualquer agente, recorrendo a análises por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e por espectroscopia de raios X com dispersão de energia (EDS).

Diversos estudos abordam a importância da interação entre o fosfato de cálcio e o colagénio, visto este último ser fundamental para a formação mineral ao fornecer locais para a nucleação (Cui et al., 2008). Na literatura existem estudos de indução da reticulação de nanocompósitos hidroxiapatite/colagénio com glutaraldeído (GTA) (Kikuchi et al., 2004), onde este agente tem como objetivo aumentar as ligações cruzadas inter e intra-fibrilares do colagénio nos compósitos e controlar as propriedades mecânicas e a taxa de reabsorção sem reduzir a alta biocompatibilidade dos mesmos (Panda et al., 2013). No entanto, não se encontram estudos onde a reação de reticulação é induzida com o objetivo de favorecer e/ou acelerar a reorganização molecular do colagénio após a desnaturação reversível do mesmo (*self-assembly*). Neste trabalho, em que o método usado se baseia na aparente sinergia entre os fenómenos de *self-assembly* do colagénio e de formação de hidroxiapatite, o estabelecimento de ligações cruzadas inter e intrafibrilares esperava-se favorecer a reorganização estrutural do colagénio, logo, a formação de hidroxiapatite.

MINERALIZAÇÃO *IN VITRO*

Grupo A0

O grupo A0, grupo A do trabalho de Araújo, 2019, foi produzido e usado como referência para o estudo dos grupos A1 e A2.

Foram preparadas 3 amostras de acordo com o método descrito por Araújo, 2019, com a alteração já descrita nos materiais e métodos no processo de secagem.

O pH do sobrenadante foi controlado com tiras de papel indicador de pH de modo a verificar que a reação de mineralização se ocorria num valor neutro (pH~7). As amostras

depois de secas foram pesadas em balança analítica tendo-se obtido uma massa média de 2,4 g e observadas em estereomicroscópio didático Leica EZ4D (figura 10), a fim de se poder comparar as diferenças macroscópicas dos vários grupos estudados.

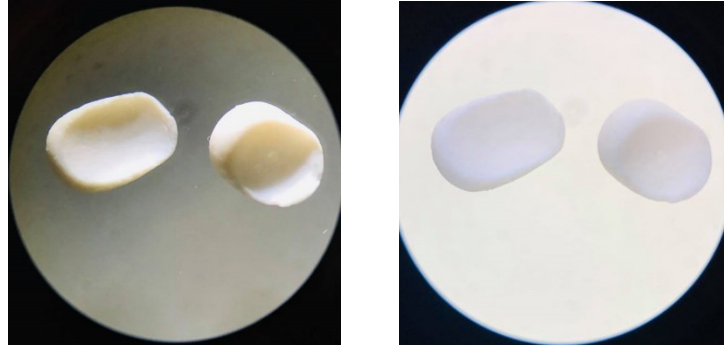


Figura 10 - Amostras do Grupo A0 (72 h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais com diferente densidade de luminosidade. Amostras com estrutura tridimensional e homogênia com alta opacidade

Procedeu-se ainda à observação em SEM onde foi realizada também análise EDS com o intuito de comparar o aspeto microscópico e constituição dos minerais obtidos nos diferentes estudos. Os resultados desta análise podem ser observados na figura 11 e 12 e tabela 4.

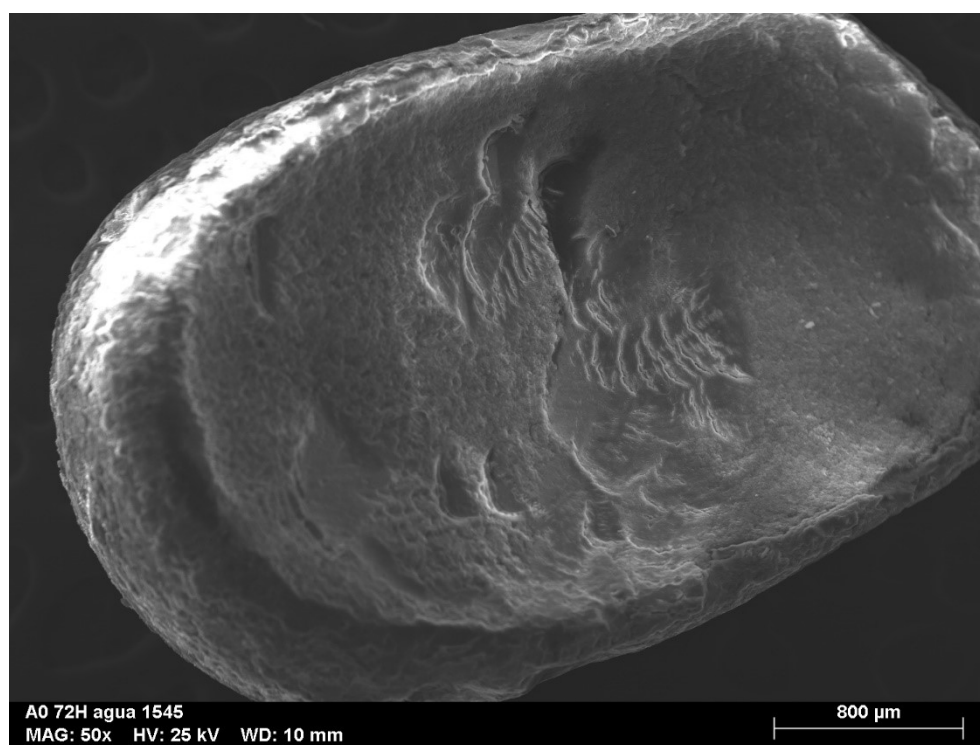


Figura 11 - Microfotografia de SEM do grupo A0 a 50x (sem agente ligante 72h), estrutura tridimensional com forma e margens regulares

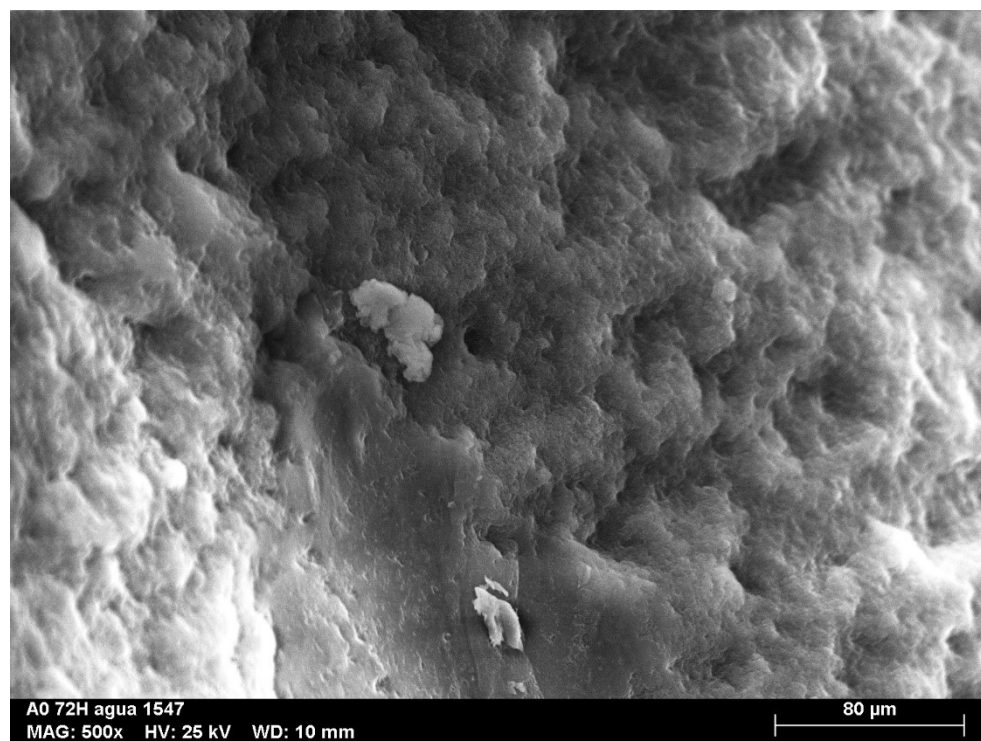


Figura 12 - Microfotografia de SEM do grupo A0 a 500x (sem agente ligante 72h), imagem com padrão homogêneo, zonas de aglomerações de mineral

Durante os ensaios dos grupos A1 e A2, verificou-se, nos controlos realizados a cada 24 h que a turbidez a este tempo parecia por vezes ser superior à das 48 h. Como tal, foi realizado um ensaio com o grupo A0 que seguiu o método experimental do ensaio de 72 horas apenas com a diferença do tempo de mineralização, tendo esta sido interrompida ao fim de 24 horas. Procedeu-se depois ao controlo do pH, pesagem, observação, SEM e análise EDS tal como nos restantes ensaios. O intuito deste ensaio foi verificar se para além da turbidez existiam diferenças entre os grupos nos restantes parâmetros analisados que nos possam ajudar a propor teorias para as observações feitas às 48h.

Este ensaio, denominado A0.1, originou uma massa média de 2,6 mg, e pode ser observado na figura 13 de estereomicroscópio e 14 e 15 de SEM. A sua análise EDS encontra-se na tabela 4.

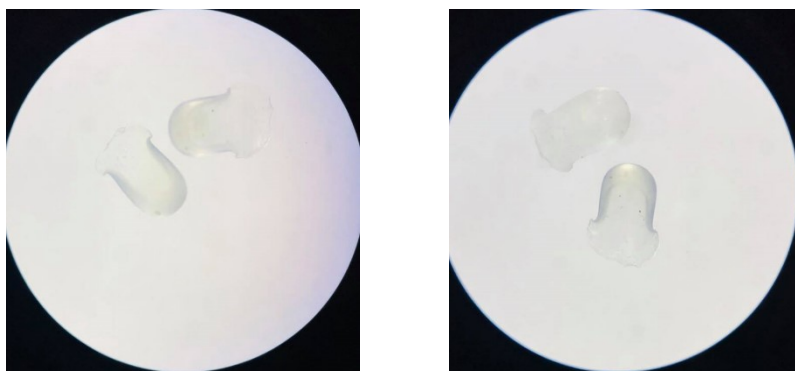


Figura 13 - Amostras do Grupo A0.1 (24h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x. Imagens iguais de diferentes faces das amostras. Observem-se amostras transparentes com padrão homogénio

É notável a diferença entre a opacidade e a estrutura das amostras dos diferentes ensaios. As amostras A0 têm uma estrutura mais uniforme. Os valores médios das massas obtidas de mineral das amostras A0 foram 2,3 mg. A diferença das massas obtidas entre os dois grupos pode se justificar pela maior massa dos precursores amorfos antes da formação de mineral.

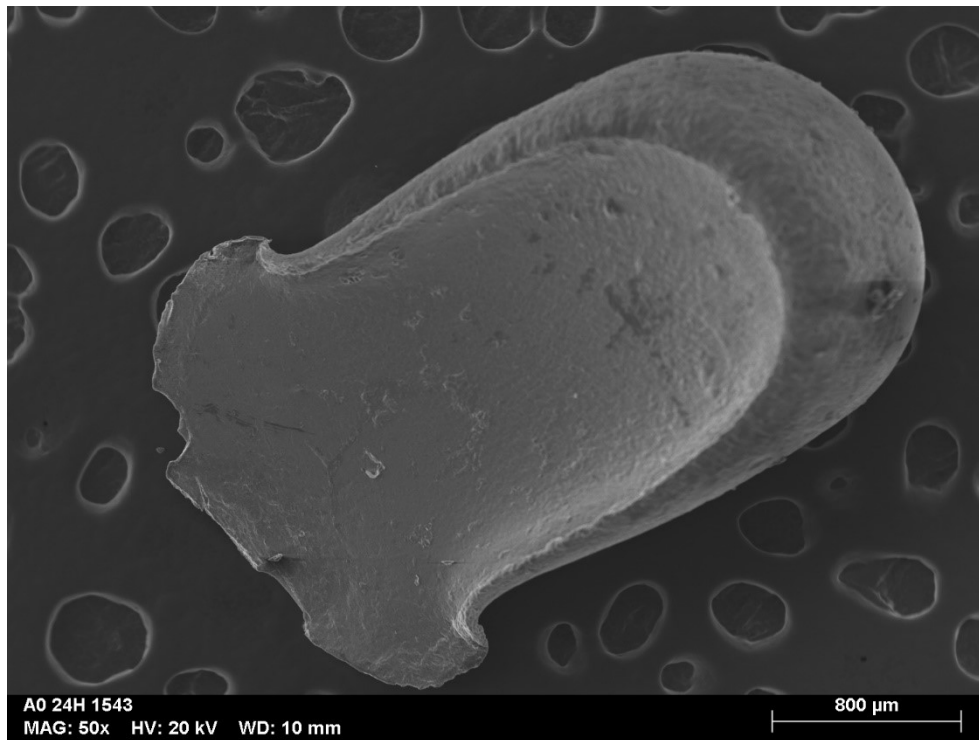


Figura 14 - Microfotografia de SEM do grupo A0.1 a 50x (sem agente ligante 24h), estrutura tridimensional com forma regular e padrão homogêneo

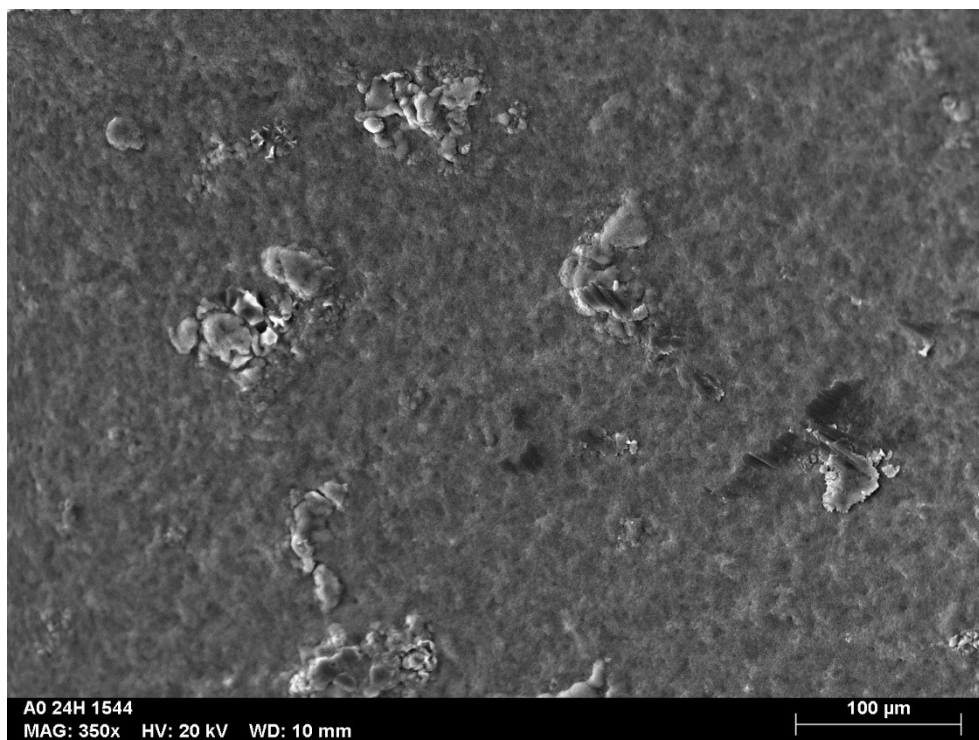


Figura 15 - Microfotografia de SEM do grupo A0.1 a 350x (sem agente ligante 24h), imagem com padrão homogêneo

Tabela 4- Gráficos e constituição elemental obtidos por EDS dos grupos A0 e A0.1

Grupo A0 (72h)	Spectrum C N O Na P Cl Ca Au A0 72H agua 624 22,06 5,49 44,08 1,02 6,93 1,64 17,04 1,74
Grupo A0.1 (24h)	Spectrum C O P Cl Ca Au A0 24H 623 42,19 15,44 8,29 2,76 25,04 6,27

GRUPO A1

O grupo A1 corresponde às amostras preparadas pela mesma solução do grupo A0, mas na presença do agente de ligação, GTA. Dos seis ensaios experimentais que se realizaram dentro do grupo A1, os quatro iniciais tiveram como objetivo a otimização das condições de atuação do agente e os dois últimos tiveram como objetivo a formação *in vitro* de hidroxiapatite na presença de colagénio com o tratamento do agente de ligação.

No ensaio A1.1 foi estudado o tempo de incubação/tratamento das amostras com o GTA com objetivo otimizar a variante do tempo e controlar a temperatura de tratamento. Nas amostras A1.1 o colagénio foi tratado com o GTA durante vários tempos de incubação, numa temperatura controlada a 37° C sendo 1 hora o tempo indicado na literatura (Abou et al., 2012; Al-Ammar et al., 2009). No fim de cada tempo, foram adicionadas as soluções de cloreto de cálcio e tampão de neutralização para se continuar o processo de mineralização. As amostras tiveram uma evolução de mineralização durante 72 horas em temperatura ambiente (~25° C), tempo ao fim do qual se observou não ter havido formação de mineral, mas sim de um composto amarelado (figura 16). Adicionalmente, o pH do meio medido no final da mineralização a pH ~3-4 (figura 17), não compatíveis a mineralização (Tomoaia & Pasca, 2015).

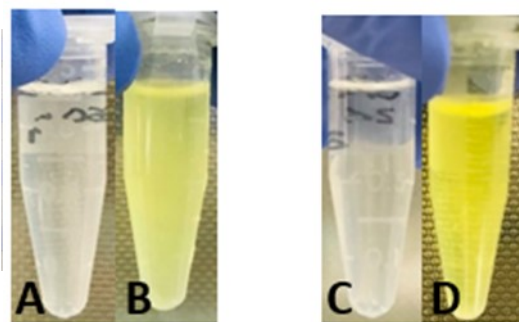


Figura 16 - Ensaio A1.1 (A) amostra A1.1 1h de tratamento com GTA (B) após 72h de mineralização (C) amostra A1.1 24 horas de tratamento com GTA (D) após 72h de mineralização



Figura 17 - Controlo de pH do ensaio A1.1, valores obtidos entre 3-4

A ausência de formação de mineral no ensaio A1.1 foi por nós interpretada como sendo devida à acidificação do meio, pelo que o tampão de neutralização não foi suficientemente forte na presença do GTA. O ensaio A1.2 foi então realizado com objetivo de controlar do pH após a adição do GTA e antes da mineralização. Para tal, o passo de adição da solução de HCl ao colagénio foi suprimida e o volume correspondente foi substituído por solução de tampão de fosfatos 0,1 M contendo NaOH. De forma a não alterar as concentrações finais de fosfato e cálcio durante o ensaio, o passo de mineralização foi igualmente adaptado. A tabela 5 descreve a constituição das amostras preparadas.

Tabela 5 – Composição das amostras preparadas no ensaio A1.2

Amostras	Sol. colagénio 4 mg/ml	Solução GTA 5%	Tampão de fosfatos 0,1 M	NaOH 1 M
A1.2 (NaOH) ₀ :	200 µL	75,8 µL	200 µL	0 µL
A1.2 (NaOH) ₂₀ :	200 µL	75,8 µL	180 µL	20 µL
A1.2 (NaOH) ₄₀ :	200 µL	75,8 µL	160 µL	40 µL
A1.2 (NaOH) ₆₀ :	200 µL	75,8 µL	140 µL	60 µL

O volume adicionado da junção de tampão fosfatos/NaOH manteve-se sempre igual (200µL) para não se alterar o volume final da solução e consequentemente as concentrações em solução dos restantes reagentes.

As amostras foram preparadas em triplicado.

Era esperado que a acidificação do meio se desse no tempo de atuação do GTA e como tal foram feitas medições de pH durante a primeira hora do tratamento com o GTA com a utilização de tiras de papel indicador de pH para perceber se a adição do tampão de fosfatos foi suficiente ou havia necessidade de adicionar NaOH (figura 18a e 18b).

As amostras A1.2(NaOH)₀ nas quais foi adicionado apenas o tampão de fosfatos tiveram valor de pH ~7,4-8 (figura 18a) enquanto que as amostras A1.2(NaOH)₂₀, A1.2(NaOH)₄₀, A1.2(NaOH)₆₀ nas quais foram adicionados os diferentes volumes de NaOH obtiveram valores de pH ~11-12, ~11-12 e ≥ 14 respetivamente (figura 18b).

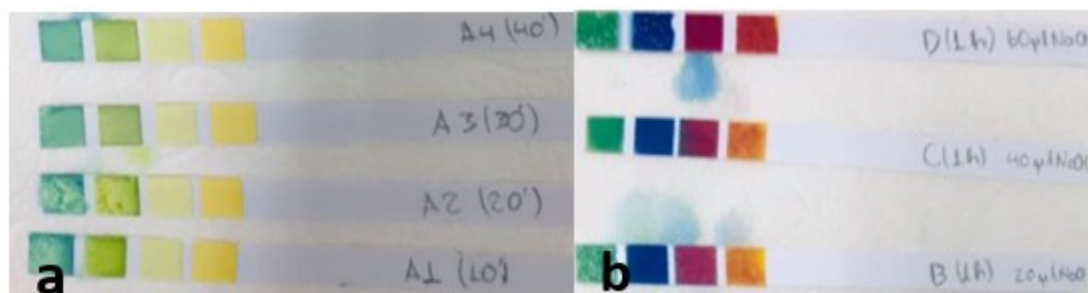


Figura 18 - (a) Valores de pH das amostras A1.2(NaOH)0 e (b) das amostras A1.2(NaOH)20, A1.2(NaOH)40, A1.2(NaOH)60

Concluiu-se por isso neste ensaio que a adição de NaOH durante a atuação do GTA basicifica demasiado o meio de solução, que se pretende ser mantida sempre a um pH neutro. No entanto, a substituição apenas do HCl pelo tampão fosfatos mostrou resultados favoráveis no controlo do pH durante o tempo de atuação do GTA. Como tal, foi efetuado o ensaio A1.3 em que se induziu a mineralização com esta substituição.

No ensaio A1.3 foi induzido o processo de mineralização, prosseguindo o ensaio A1.2(NaOH) (grupo sem adição de NaOH), único grupo que se manteve em pH 7. Os microtubos deste ensaio, ao fim de 1 hora e logo após a adição de CaCl_2 e do tampão de neutralização tiveram imediatamente uma formação de mineral observando um aumento significativo da turbidez dos microtubos superior ao observado no grupo A0 (figura 19). Esta observação leva-nos a pensar que o GTA influencia, como previsto, a velocidade da ocorrência da mineralização.

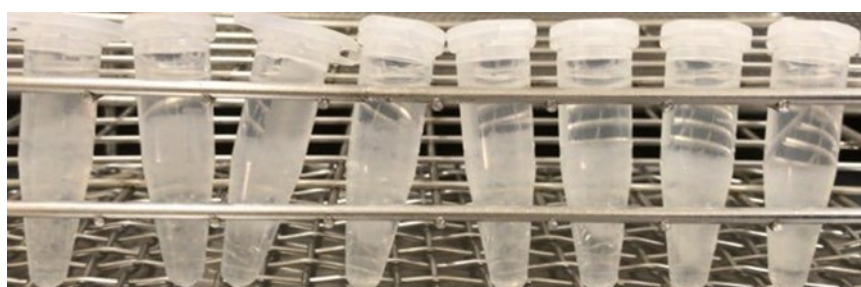


Figura 19- Amostras do ensaio A1.3 1 hora após o tratamento com GTA e no t0 da mineralização, aumento da turbidez e viscosidade do meio de solução

Após as 72 horas, os microtubos apresentavam uma alteração na sua coloração, para amarelo como pode ser observado na figura 20a, e aquando do controlo de pH com tiras de papel indicador, foi observada a acidificação do meio com valores de pH~3 (figura 20b). Os *pellets* de mineral obtidos após a centrifugação, apresentaram-se com uma forma gelatinosa e amarela distinta do grupo A0 (figura 20c). Com a acidificação do meio é provável que tenha ocorrido a dissolução do mineral e que o composto gelatinoso obtido seja a precipitação do material orgânico resultante da centrifugação. Este ensaio mostrou que a acidificação do meio ocorre não durante o período de ação do GTA, mas sim após a indução da mineralização. Assim, projetou-se um novo ensaio, onde se controlou o pH do meio não no passo do tratamento com GTA, mas durante a mineralização: ensaio A1.4.

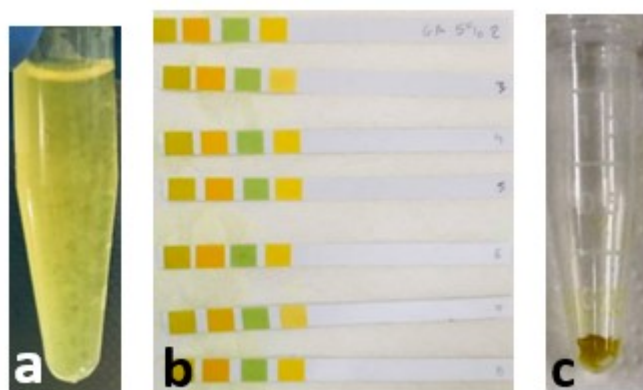


Figura 20– (a) Amostra A1.3 no fim das 72 horas antes da centrifugação (b)Valores de pH das amostras A1.3, (c) Amostra A1.3 obtida após a centrifugação.

O ensaio A1.4 teve como objetivo o controlo do pH durante a fase de mineralização com adição de NaOH para manter o pH do meio numa gama de valores compatível com a mineralização pretendida.

Nas amostras A1.4, inicialmente tratadas com GTA 5%, foram adicionados volumes uniformes de NaOH 30 min após o início da mineralização. Como o processo de mineralização nas condições de controlo (Grupo A0) decorre durante 72 horas, estipulou-se um controlo do pH em períodos de 12 horas, sendo a adição de NaOH 1 M apenas efetuada caso se observasse acidificação do meio. Na tabela 6 apresentam-se os resultados obtidos no controlo do pH do meio, assim como os momentos em que houve a necessidade de neutralizar o meio com NaOH.

Prepararam-se 10 amostras equivalentes no ensaio A1.4, de forma a poderem fazer-se os controlos de pH programados, descartar o microtubo analisado, neutralizar o meio

das amostras ainda em estudo no caso de ser necessário e prosseguir com a mineralização até às 72 horas.

Tabela 6 - Valores de pH obtidos nos respetivos tempos após o início de mineralização

eppendorf	t0	t0,5(30)	t1 (60)	t2	t12	t24	t36	t48	t60	t72
pH	4	7	7	7	7	4-5	7	4-5	6	7-8
NaOH 1M		+50µl	+50µl	+50µl	+50µl	+50µl	+50µl	+50µl	+50µl	+50µl
							+25µl	+25µl	+25µl	+25µl
									+25µl	+25µl
										+15µl

Imediatamente após a adição de glutaraldeído à solução de colagénio (t=0) registou-se uma acidificação, o que se revela positivo na medida em que, como referido, o passo de adição de ácido clorídrico para induzir uma desnaturação reversível e controlada foi suprimido dos ensaios do grupo A1 pelo facto do próprio GTA desempenhar essa função. Ocorrendo acidificação do meio imediatamente após a adição de GTA e não sendo esta muito acentuada, é possível que seja suficiente para destabilizar o colagénio e assim não comprometer o passo de reorganização estrutural que o método requer.

A observação da acidificação do meio em t=0 exigiu a sua neutralização, tendo-se adicionado 50 µl de NaOH 1 M aos restantes tubos ainda em estudo e descartado o usado para analisar o pH. Os valores de pH registados aos tempos t=0,5, t=1, t=2 e t=12 horas foram aproximadamente neutros, pelo que a estes tempos não houve qualquer adição de NaOH. Contudo, os tubos onde se realizaram as medições foram descartados. 24 horas após o início da mineralização o pH do meio voltou a baixar, tendo resultado numa nova adição de NaOH aos tubos em estudo. O ensaio prosseguiu com a lógica descrita até às 72 horas, tendo-se adicionado um total de 115 µl de NaOH 1 M para neutralizar completamente a solução durante o período de mineralização, tendo-se no final (t=72) registado um valor de pH ~7-8. É de referir que alguns estudos *ex vivo* com fragmentos de dentina humana fazem referência à necessidade de neutralizar o meio com NaOH 1 M quando se adiciona GTA ao colagénio (Al-Ammar et al., 2009).

A figura 21 mostra as tiras de papel indicador de pH obtidas nos diferentes tempos.

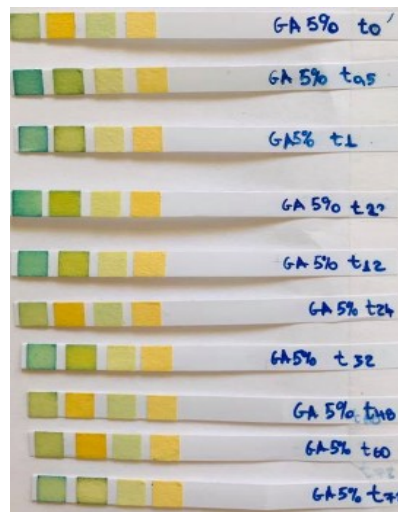


Figura 21– Controlo de pH do ensaio A1.4

Como pode ser observado na figura 22a, logo após a indução da mineralização e na presença do GTA houve um aumento da turbidez das amostras e a formação de um precipitado denso. Constatou-se então, que apesar de se ter observado novamente a coloração amarela ao fim de 24 horas de mineralização (figura 22.b) é possível neutralizar o meio da solução e estabelecer as condições para a evolução da mineralização. A alteração da coloração do meio de solução deve-se à reação do GTA com os aminoácidos de lisina e hidroxilisina, que resulta num produto de coloração amarela.

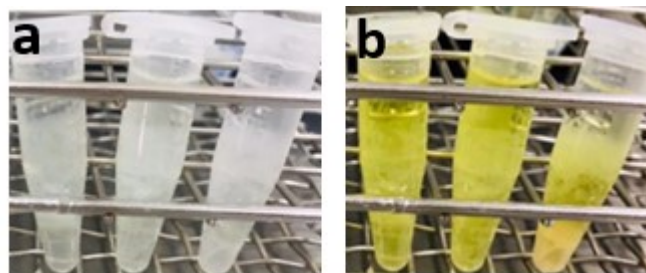


Figura 22 – Ensaio A1.4 (a) amostras após 1h de tratamento com GTA e t0 de mineralização (b) t72 de mineralização

Estabelecida a quantidade de NaOH necessária para controlo do pH, realizou-se o ensaio A1.5, idêntico ao ensaio A1.4, mas onde as amostras foram mantidas a uma temperatura controlada a 21°C durante a mineralização. Neste ensaio prepararam-se 10 amostras iguais (decuplicados), tendo-se adicionado o GTA 5% à solução de colagénio, incubado durante uma hora e iniciado a mineralização com a adição de solução de cálcio e solução de neutralização. Adicionou-se um total de 115 μL de NaOH 1M durante a fase de mineralização, a tempos ajustados do seguinte modo: 50 μL ($t=0$), 30 μL ($t=24$), 35 μL ($t=48$). A medição do pH do sobrenadante após as 72 horas e a centrifugação confirmou valores de pH $\sim 7-8$ (figura 23), compatível com a mineralização.

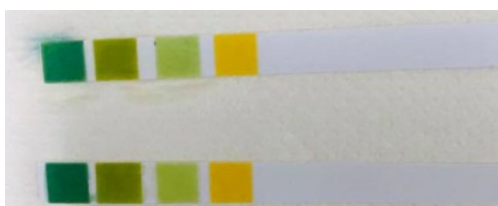


Figura 23– Controlo do pH das amostras A1.5, estimado no sobrenadante obtido após centrifugação do produto da mineralização. O esquema de cores indica $\sim 7-8$ para ambas as amostras escolhidas aleatoriamente entre as 10 ensaiadas.

Durante o processo de mineralização do ensaio A1.5, as amostras revelaram um aumento de turbidez, da viscosidade e a já reportada alteração da coloração (figura 24), indicadoras da reação do GTA com o colagénio. Estas observações podem ser justificadas pela ação do GTA sobre as matrizes colagénicas e sua capacidade de reagir com os aminoácidos já mencionados anteriormente (Abou et al., 2012; Gough et al., 2001). Está

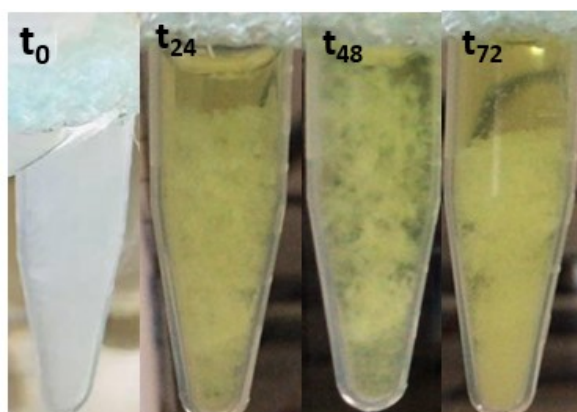


Figura 24 - Eppendorfs do ensaio A1.5 (GTA 72h) nos tempos t_0 , t_{24} , t_{48} , t_{72} ,

descrito na literatura que existe uma polimerização das moléculas de GTA em solução aquosa com redução dos aldeídos livres e formação de uma estrutura de reticulação em rede dentro das fibras de colagénio justificando assim o aumento da viscosidade e densidade do meio na presença de GTA em comparação com o grupo A0 (Delgado et al., 2017; Sung, Chang, et al., 1999b). As amostras depois de secas foram pesadas em balança analítica tendo-se obtido uma massa média de 4,65mg e observadas/ fotografadas em estereomicroscópio didático Leica EZ4D com uma ampliação a 25x (figuras 25). Foi observada uma estrutura granulosa não uniforme, opaca e com uma coloração amarelada extremamente distinta das amostras do grupo A0.

Como pode ser observado na figura 24, entre os diferentes tempos de evolução de mineralização foi observada uma diferença considerável da uniformidade e turbidez do eppendorf entre as 24 e 48 horas. Esta observação significativa induziu a necessidade de fazer uma comparação adicional dentro deste grupo. Sendo assim foi realizado o ensaio A1.6 no qual as amostras preparadas pelo mesmo procedimento do ensaio A1.5 tiveram tempo de mineralização apenas 24 horas com objetivo investigar se os cristais de apatite na presença de GTA se formam dentro da fibrilha de colagénio. Este ensaio diferencial e desviado do tempo de mineralização completo indicado pelo trabalho de Araújo, (2019) foi baseado em estudos realizados do grupo A (controlo) que comprovaram após 24 horas de mineralização a formação de partículas de ACP observadas na superfície e no interior da fibrilha de colagénio (Nudelman, Pieterse, George, Bomans, Friedrich, Brylka, Hilbers, With, et al., 2010)

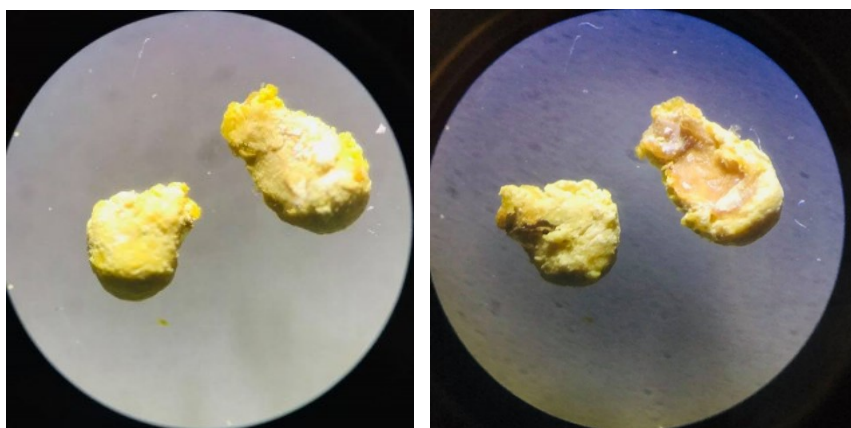


Figura 25- Fotografia das amostras A1.5 (GTA 72h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais com diferente densidade de luminosidade. Amostras com estrutura tridimensional, com coloração amarelada e forma irregular

Durante a execução dos ensaios do grupo A1 verificou-se, por diversas vezes, que a quantidade de mineral visível ao fim de 24 horas de mineralização parecia ser maior do que a que de facto se obtinha ao fim das 72 horas. De forma a perceber se, numa fase posterior de produção em grande quantidade de mineral formado na presença de colagénio e GTA para análise, a fase de mineralização poderia ser encurtada, decidi realizar-se um ensaio idêntico ao anteriormente descrito, mas permitindo que a mineralização evoluísse apenas até às 24 horas: ensaio A1.6

Uma vez terminada a mineralização ($t=24$), procedeu-se à secagem das amostras como descrito na secção Materias e métodos e os cristais foram pesadas em balança analítica tendo-se obtido uma massa não significativa. A observação em estereomicroscópio didático Leica EZ4D com uma ampliação a 25x revelou amostras muito finas, de aspeto irregular e coloração amarela translúcida (figura 26), bastante distinta da observada nas amostras A1.5 (figura 25). Estes resultados sugerem que, na presença de GTA como agente de ligação do colagénio, um tempo de evolução de mineralização de 24 horas é insuficiente para se obter um produto com aspeto cristalino, como o obtido quando a mineralização evolui por 72 horas.



Figura 26– Amostras do Grupo A1.6 (GTA 24h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais com diferente densidade de luminosidade. Amostras de coloração amarelada zonas de diferentes opacidades e aspeto irregular

ANÁLISE SEM E ANÁLISE EDS: GRUPO A1

Com o propósito de comparar a superfície das amostras do grupo A1 e sua composição, foram observadas as amostras dos grupos A1.5 e A1.6 por SEM e EDS.

Nas figuras 27 e 28 apresentam-se duas microfotografias do grupo A1.5 a 35x e 750x respectivamente. Observa-se claramente que, a amostra A1.5 que teve uma evolução de mineralização de 72 horas visto que, apresenta uma forma mais parecida com o grupo A0, contudo com uma superfície mais irregular e granulada e com zonas de diferente opacidade.

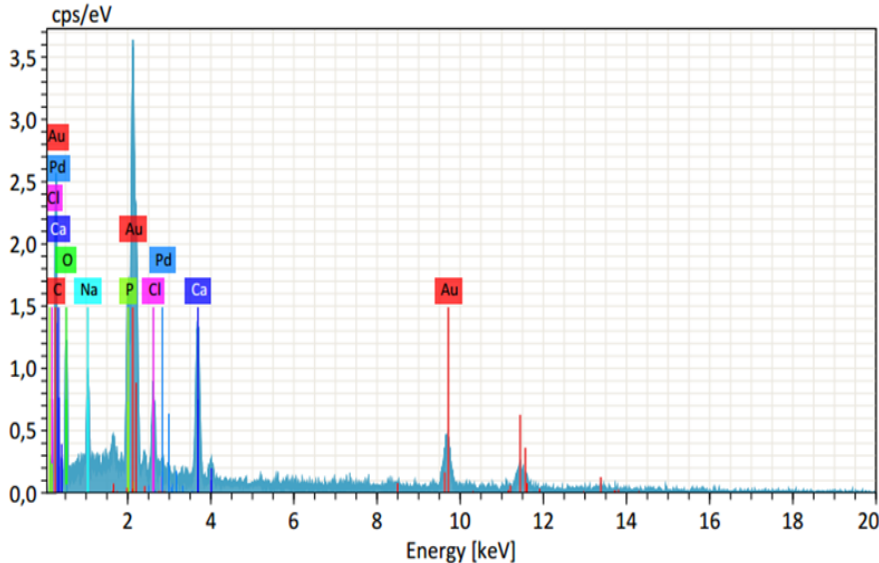
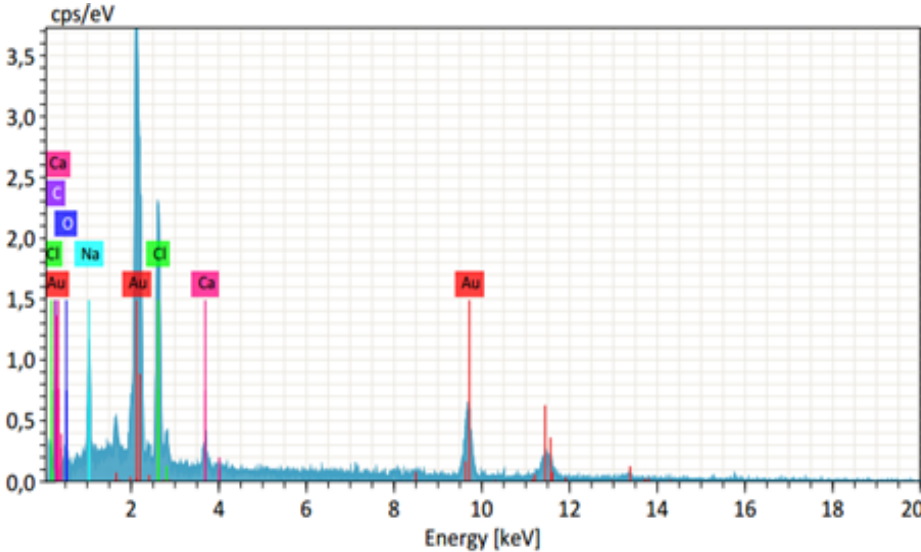
Na tabela 7 apresentam-se os resultados de EDS deste grupo. É importante referir nesta fase que todas as amostras dos grupos A1 e A2, foram sujeitas a um duplo tratamento de paládio antes da observação e por isso foram obtidos valores de Au mais elevados do que no grupo A0 foram registados.

No grupo A1.5 registaram-se valores reduzidos de cálcio e fosfato, enquanto os valores de sódio e cloro foram superiores aos do grupo controlo A0. Tendo sido obtida uma proporção de Ca/P 2,30, idêntica à do grupo A0, 2,4.

As figuras 29 e 30, microfotografias da amostra A1.6, grupo no qual a mineralização foi interrompida as 24 horas, apresentam um aspeto muito distinto tanto do grupo A1.5 como do grupo A0. Observa-se uma forma irregular e espessura fina com uma superfície completamente plana.

No caso da EDS deste grupo, os valores de cálcio foram especialmente reduzidos e registou-se a ausência de fosfato, o que pode indicar que estes iões não foram incorporados no mineral obtido, devido à interrupção da mineralização às 24h.

Tabela 7 - Gráficos e constituição elementar obtidos por EDS dos grupos A1 (GTA)

Grupo A1.5 (72h)	 <table data-bbox="462 873 925 934"><tr><th>Spectrum</th><th>C</th><th>O</th><th>Na</th><th>P</th><th>Cl</th><th>Ca</th><th>Pd</th><th>Au</th></tr><tr><td>A1 72H 643</td><td>33,17</td><td>21,09</td><td>2,04</td><td>3,42</td><td>2,84</td><td>7,82</td><td>0,76</td><td>28,85</td></tr></table>	Spectrum	C	O	Na	P	Cl	Ca	Pd	Au	A1 72H 643	33,17	21,09	2,04	3,42	2,84	7,82	0,76	28,85
Spectrum	C	O	Na	P	Cl	Ca	Pd	Au											
A1 72H 643	33,17	21,09	2,04	3,42	2,84	7,82	0,76	28,85											
Grupo A1.6 (24h)	 <table data-bbox="462 1608 861 1668"><tr><th>Spectrum</th><th>C</th><th>O</th><th>Na</th><th>Cl</th><th>Ca</th><th>Au</th></tr><tr><td>A1 24H 649</td><td>21,68</td><td>6,55</td><td>3,51</td><td>10,82</td><td>1,92</td><td>55,52</td></tr></table>	Spectrum	C	O	Na	Cl	Ca	Au	A1 24H 649	21,68	6,55	3,51	10,82	1,92	55,52				
Spectrum	C	O	Na	Cl	Ca	Au													
A1 24H 649	21,68	6,55	3,51	10,82	1,92	55,52													

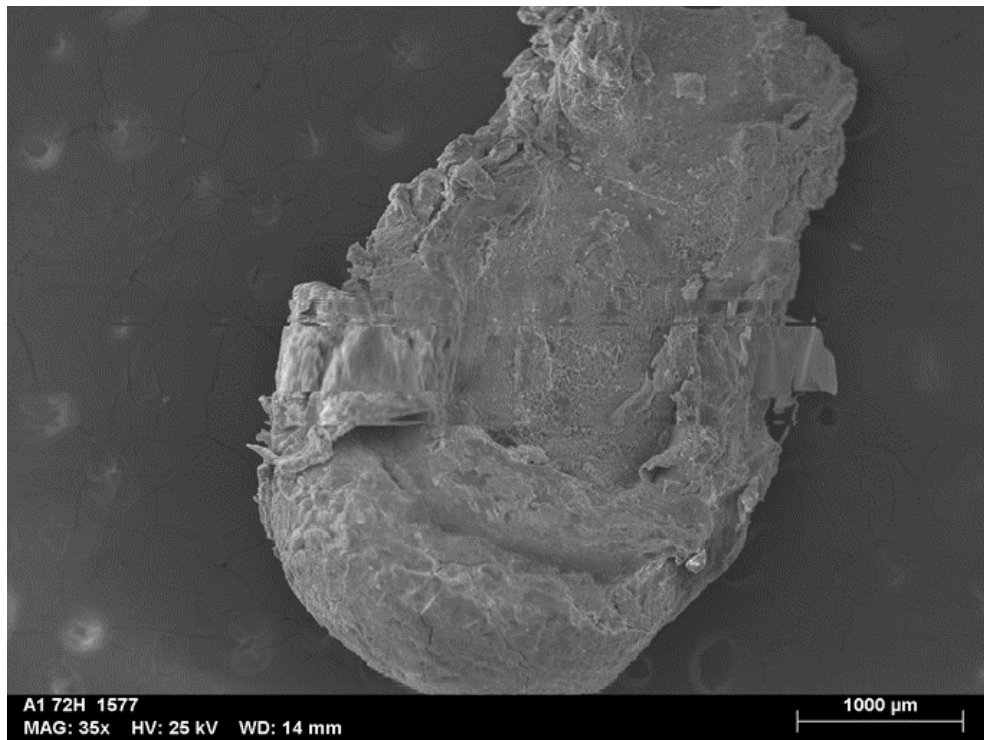


Figura 27– Fotomicrografia de SEM da amostra A1.5 a 35x (GTA 72h), estrutura tridimensional com zonas irregulares e padrão heterogêneo

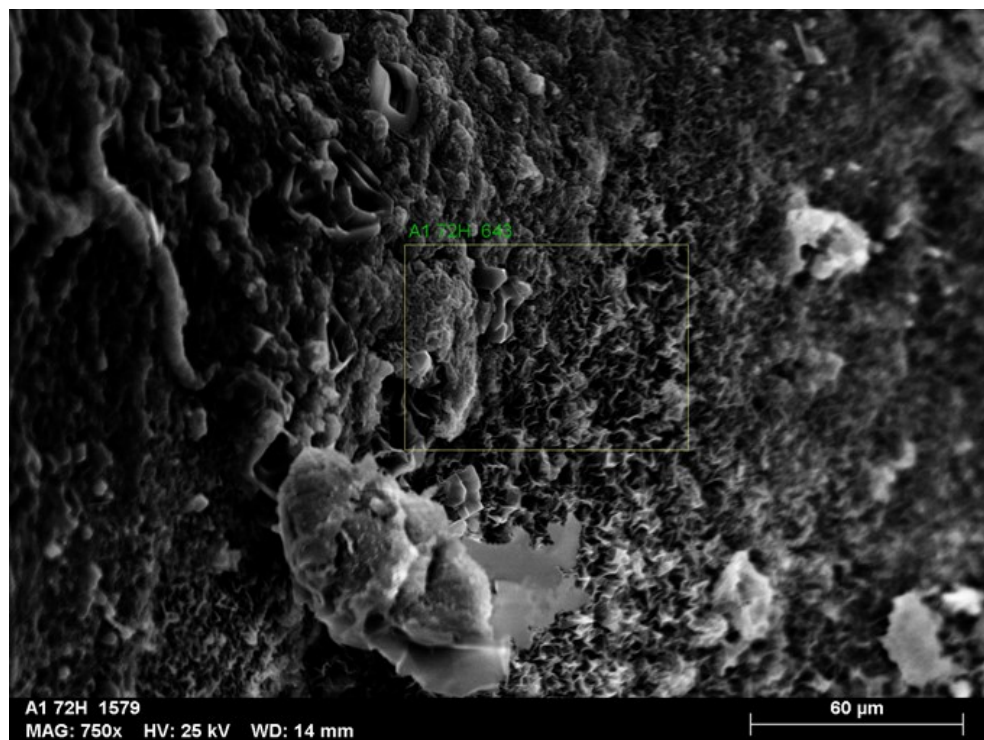


Figura 28- Fotomicrografia de SEM da amostra A1.5 a 750 x (GTA 72h), padrão heterogêneo com diferentes zonas de aglomerações de mineral

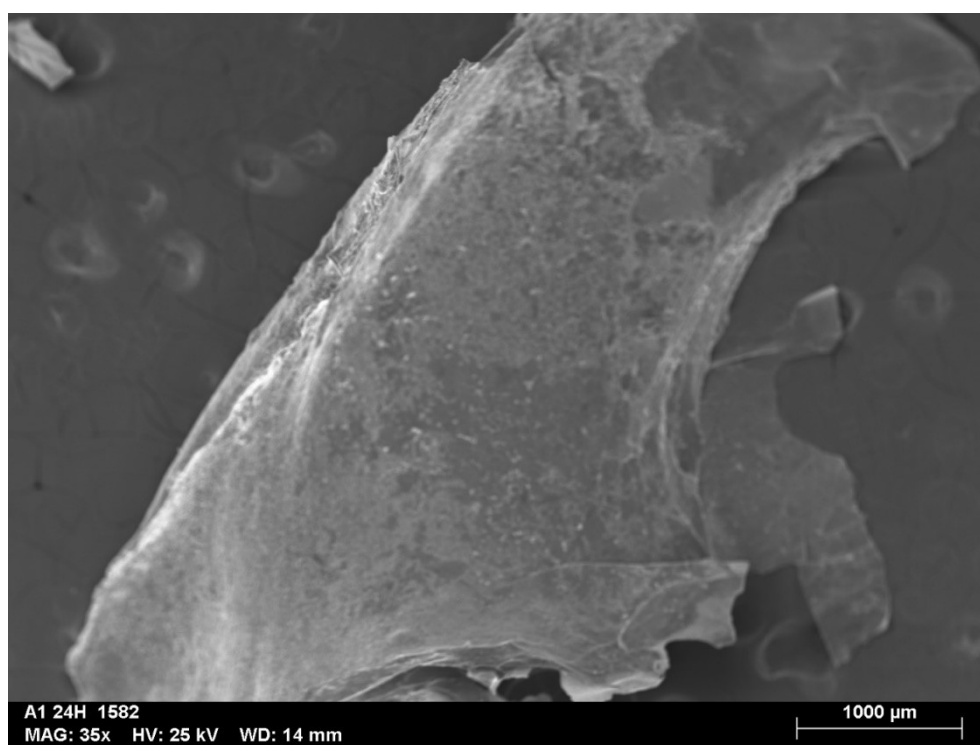


Figura 29- Fotomicrografia de SEM da amostra A1.6 a 35x (GTA 24h), amostra com forma irregular e zonas de opacidade distinta

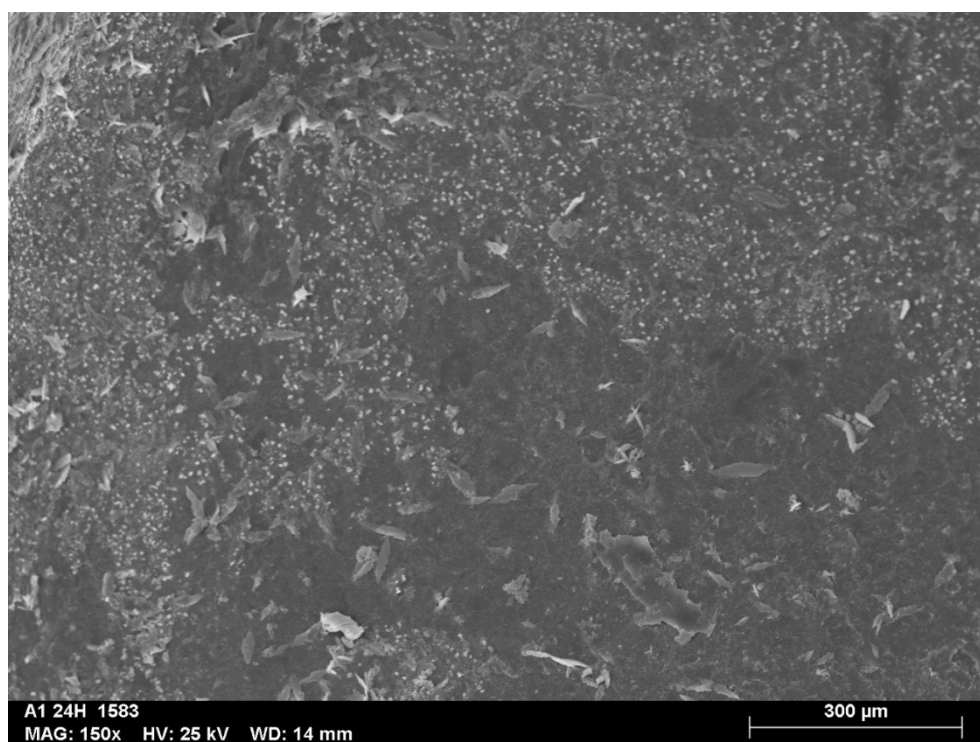


Figura 30- Fotomicrografia de SEM da amostra A1.6 a 150x (GTA 24h), imagem com padrão heterôgeno e organização irregular

GRUPO A2

O grupo A2 representa as amostras preparadas pelo mesmo método do grupo A0, mas na presença do agente natural de ligação genipina (GEN). Foi inicialmente realizado um ensaio piloto com objetivo otimizar as condições de reação da genipina e a formação da solução. Mais dois ensaios foram conduzidos, em condições estáveis para a atuação da GEN, com objetivo a formação *in vitro* de hidroxiapatite na presença de colagénio com o tratamento deste agente natural de ligação.

O ensaio A2.1 foi realizado com o objetivo de criar uma solução de genipina adequado ao nosso trabalho experimental, visto ser um reagente sólido. Com base no protocolo de Al-Ammar et al. (2009) em que a genipina é dissolvida numa solução 0,5% de tampão de fosfato e na tentativa de criar esta solução foi observado que a GEN se degradava e formava um precipitado acastanhado com o aumento da temperatura e não sendo possível a sua dissolução. Sendo assim houve a necessidade de desviar do protocolo principal e criar uma solução com genipina. Não tendo sido possível encontrar muita do comportamento laboratorial da GEN, decidiu-se preparar duas soluções com a mesma concentração: uma solução aquosa de GEN 0,17%; uma solução de GEN 0,17% em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 7,4. Com o recurso as estas duas soluções foram preparadas as amostras do ensaio A2.1 de acordo com o descrito na secção Materiais e Métodos.

Logo no início da indução da mineralização observou-se o aumento da turbidez do meio, embora menos evidente do que a observada com o GTA. Esta análise, embora totalmente empírica, não é surpreendente se considerarmos que a reação da GEN com o colagénio foi caracterizada como mais lenta do que a reação do GTA (Sung et al., 2003) e se se comprovar que a ligação dos agentes de *crosslink* ao colagénio favorecem a formação de mineral. Após 24 horas, as amostras mostraram-se mais turvas do que inicialmente (t=0), aparentaram estar a formar mineral em toda a extensão do microtubo e apresentaram alteração da color para azul. Essa alteração de coloração está reportada como sendo correspondente ao produto da reação espontânea da GEN com os grupos amina livres dos resíduos de aminoácido lisina, hidroxilisina e arginina, da qual resultam ligações cruzadas com a mesma molécula de colagénio (intramoleculares) ou com moléculas de colagénio adjacentes (intramoleculares) (Bentes et al., 2015; Fujikawa et al., 1987; Sung et al., 2000). O processo de mineralização ocorreu durante 72 horas, tempo ao fim do qual o mineral foi separado da fase aquosa por centrifugação seguida de secagem completa. O pH durante o passo de mineralização, controlado por medição direta

do pH da fase aquosa em tiras de papel indicador de pH, como anteriormente descrito, mostrou-se próximo do neutro (figura 31 e 32). As amostras depois de secas foram pesadas em balança analítica tendo-se obtido uma massa média de 2,6 mg, no caso das amostras preparadas com a solução aquosa de GEN, e 2,2 mg, no caso das amostras preparadas com a solução de GEN tamponizada a pH 7.4. Não se tendo verificado diferenças no pH após a mineralização do meio entre as amostras tratadas com uma ou outra solução de GEN, a diferença observada nas massas médias presume-se ser devida a erros aleatórios.

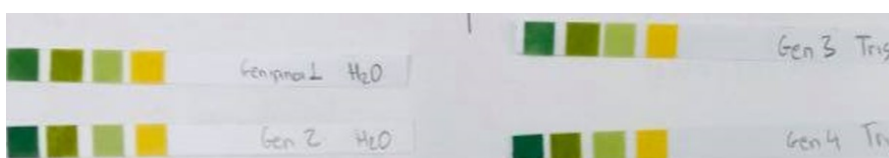


Figura 31- Controle de pH do ensaio A2.1

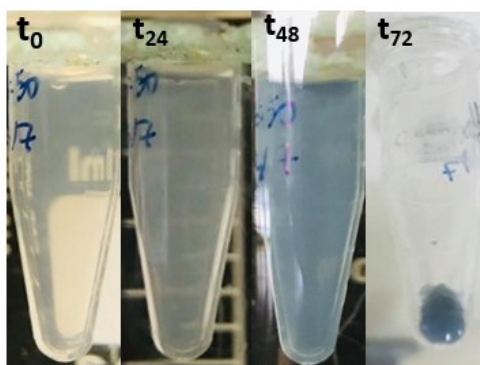


Figura 32 - Ensaio A2.1 t0, t24, t72

Ambas as amostras foram observadas em estereomicroscópio didático Leica EZ4D. Na figura 33 observamos que as duas amostras não apresentam diferenças significativas uma vez que ambas apresentam uma estrutura uniforme de cor azul escura e com irregularidades nas suas superfícies.

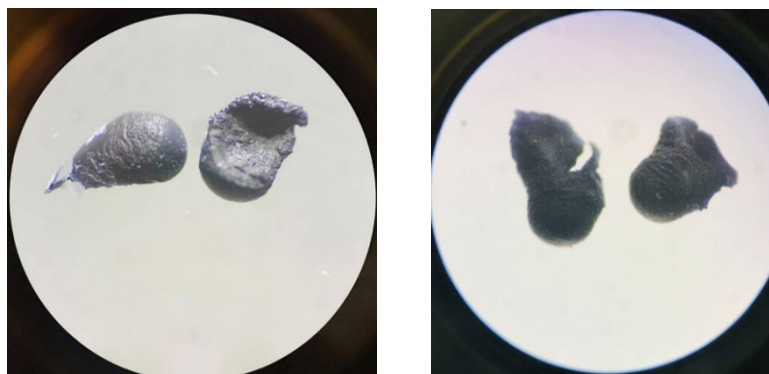


Figura 33 - Amostras do Grupo A2.1 em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x

Após o ensaio A2.1, a solução de GEN 0,17% em tampão Tris-HCl 0,2 M pH 7,4 assumiu uma coloração azul, característica da presença de produto da reação da GEN com grupos amina a pH ácido e neutro, enquanto a solução aquosa se manteve incolor. Não tendo havido diferenças evidentes entre os resultados obtidos com as duas soluções, optou-se por prosseguir os ensaios usando apenas a solução aquosa.

No ensaio A2.2 foram preparadas três amostras com o mesmo procedimento do ensaio anterior, mas desta vez utilizando apenas a solução de GEN em H₂O. Tendo em conta os resultados obtidos com os grupos A0 e A1, optou-se por realizar este ensaio num microambiente controlado de temperatura ~21° C. Foram obtidos resultados semelhantes ao ensaio anterior, nomeadamente, alteração da coloração, aumento de viscosidade e densidade do meio de solução. Após a centrifugação foi também obtido um sedimento azul, mas desta vez mais claro (figura 32). A evolução de mineralização durou um tempo total de 72h horas no fim das quais controlou-se o pH do sobrenadante com tiras de papel indicador de pH de modo a verificar que a reação de mineralização se ocorria num valor neutro (pH~7), compatível com a mineralização (figura 34).



Figura 34- Controlo de pH do ensaio A2.2

As amostras A2.2 depois de secas foram pesadas em balança analítica tendo-se obtido uma massa média de 2,8 mg e observadas/ fotografadas em estereomicroscópio didático Leica EZ4D (figura 35). As amostras deste ensaio mostram diferenças notáveis em relação ao ensaio A2.1. Neste ensaio foram obtidas amostras muito mais uniformes, com superfície lisa e regular, e com uma coloração muito mais clara. À parte da cor muito semelhantes às amostras do grupo A0. Estas diferenças podem ser justificadas pela alteração de temperatura e microambiente controlado da realização do ensaio.

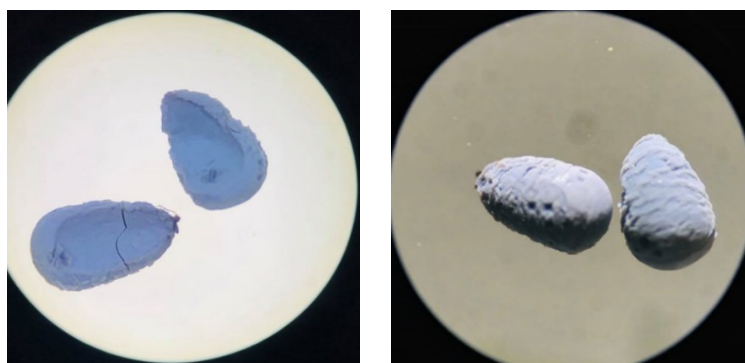


Figura 35 - Amostras do Grupo A2.2 (GEN 72h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais das mesmas amostras com diferentes densidades de luminosidade e de faces diferentes das amostras, coloração azulada com forma e margens regulares e aspeto uniforme

À semelhança do realizado para os outros dois grupos A0 e A1, também o grupo A2 foi submetido a um ensaio em que apenas se variou o tempo de mineralização, que foi concluído ao fim de 24 horas: ensaio A2.3.

A mineralização foi interrompida às 24 horas e as amostras foram secas e pesadas em balança analítica tendo-se obtido uma massa média de 1,7 mg. A obtenção de uma massa média inferior quando se reduz o tempo de mineralização pode ser justificada com a interrupção do processo, que originaria mais mineral caso continuasse até às 72 horas, como observado no ensaio A2.

Posteriormente, as amostras foram. Na figura 36 encontram-se imagens das amostras A2.3 observadas em estereomicroscópio didático Leica EZ4D. Quando comparadas com as imagens do ensaio anterior, estas apresentam um aspeto diferente, quer a nível de formato, quer a nível de cor, sendo visível uma coloração irregular, com

zonas de azul mais escuro e zonas de azul mais claro. Estas diferenças podem ser resultado do tempo reduzido de mineralização, visto que a reação da GEN é mais lenta.

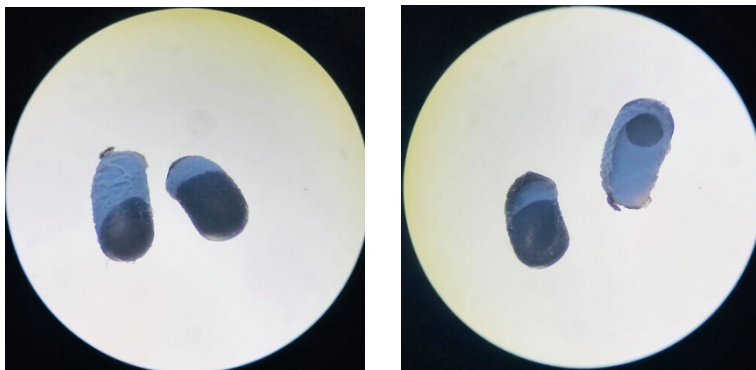


Figura 36 - Amostras do Grupo A2.3 (GEN 24h) em estereomicroscópio didático Leica EZ4D a 25x, imagens iguais das mesmas amostras com diferentes densidades de luminosidade e de faces diferentes das amostras, zonas de coloração azulada distinta com forma e margens regulares

ANÁLISE SEM E ANÁLISE EDS: GRUPO A1: GRUPO A2

Com o propósito de observar as alterações na topografia da superfície das amostras do grupo A2, foram observadas as amostras dos grupos A2.2 e A2.3 por microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e analisadas por espectroscopia de raios X com dispersão de energia (EDS) para obter informações sobre a sua composição.

Nas figuras 37 e 38 apresentam-se duas microfotografias do grupo A2.2 a 35x e 1000x respetivamente. Podemos claramente observar que a amostra A2.2, que teve uma evolução de mineralização de 72 horas num microambiente controlado, apresenta uma forma muito mais parecida com o grupo A0 do que a do grupo A1. No entanto, enquanto que no grupo A0 pode ser observada uma uniformidade da superfície, no grupo A2.2 existem zonas com aspeto distinto.

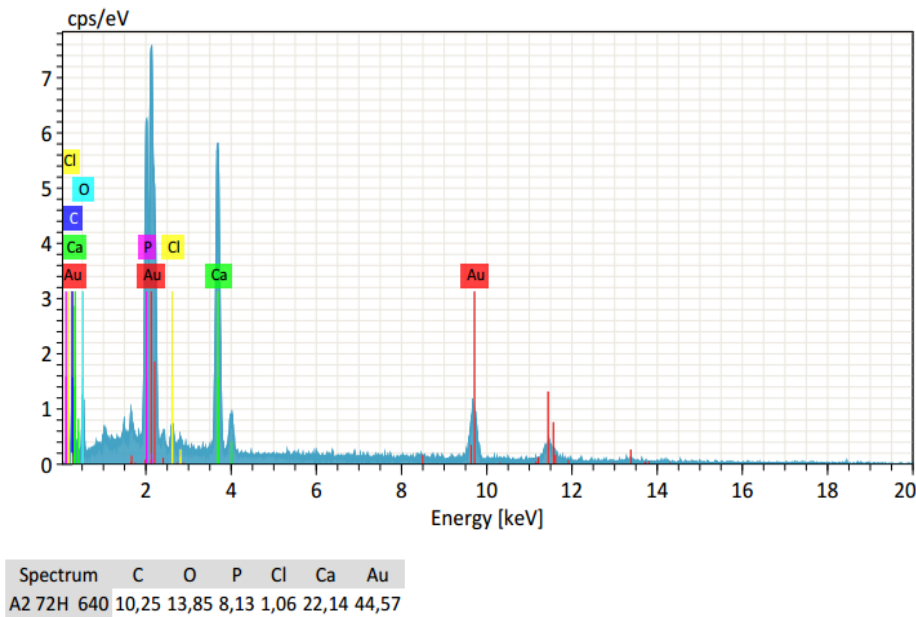
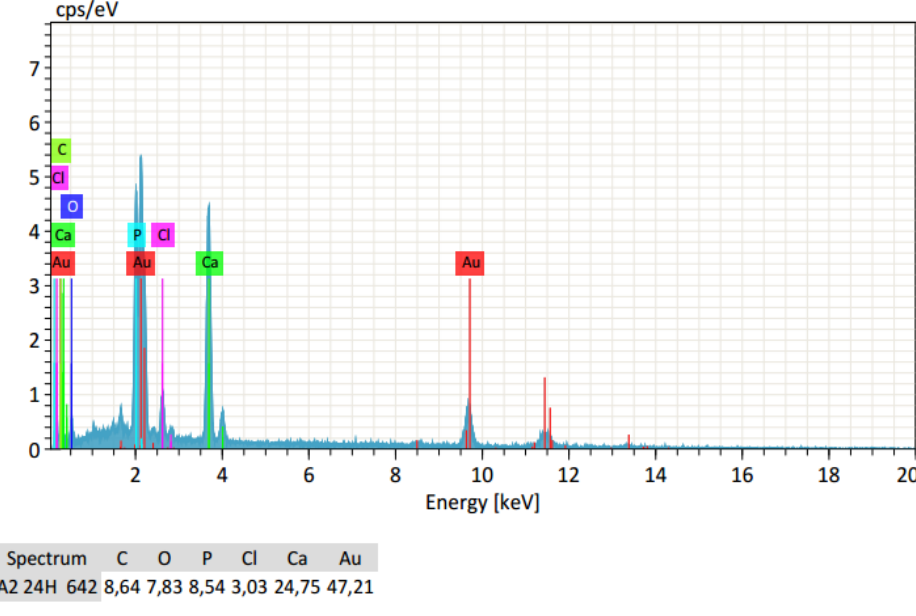
Na tabela 8 apresentam-se os resultados de EDS deste grupo. No grupo A2.2 observaram-se valores mais altos de cálcio e fósforo do que no grupo de controlo A0. Tendo-se obtido uma proporção de Ca/P 2,72.

As figuras 39 e 40 são microfotografias de SEM da amostra A2.3, grupo no qual a mineralização foi interrompida as 24 horas. As imagens obtidas por SEM deste grupo apresentam um aspeto também parecido como grupo A0 embora com um tamanho menor. Observa-se uma amostra com irregularidades na sua periferia, mas com uma superfície

mais uniforme e espessa no centro. Nas figuras 38 e 40, microfotografias com maior ampliação, pode ser observado um padrão muito parecido com o grupo A0.

No caso da EDS do grupo A2.3 foram obtidos valores parecidos com o ensaio A2.2 e uma proporção de Ca/P 2,89.

Tabela 8- Gráficos e constituição elementar obtidos por EDS dos grupos A2 (GEN)

Grupo A2.2 (72h)	 <table><tr><th>Spectrum</th><th>C</th><th>O</th><th>P</th><th>Cl</th><th>Ca</th><th>Au</th></tr><tr><td>A2 72H 640</td><td>10,25</td><td>13,85</td><td>8,13</td><td>1,06</td><td>22,14</td><td>44,57</td></tr></table>	Spectrum	C	O	P	Cl	Ca	Au	A2 72H 640	10,25	13,85	8,13	1,06	22,14	44,57
Spectrum	C	O	P	Cl	Ca	Au									
A2 72H 640	10,25	13,85	8,13	1,06	22,14	44,57									
Grupo A2.3 (24h)	 <table><tr><th>Spectrum</th><th>C</th><th>O</th><th>P</th><th>Cl</th><th>Ca</th><th>Au</th></tr><tr><td>A2 24H 642</td><td>8,64</td><td>7,83</td><td>8,54</td><td>3,03</td><td>24,75</td><td>47,21</td></tr></table>	Spectrum	C	O	P	Cl	Ca	Au	A2 24H 642	8,64	7,83	8,54	3,03	24,75	47,21
Spectrum	C	O	P	Cl	Ca	Au									
A2 24H 642	8,64	7,83	8,54	3,03	24,75	47,21									

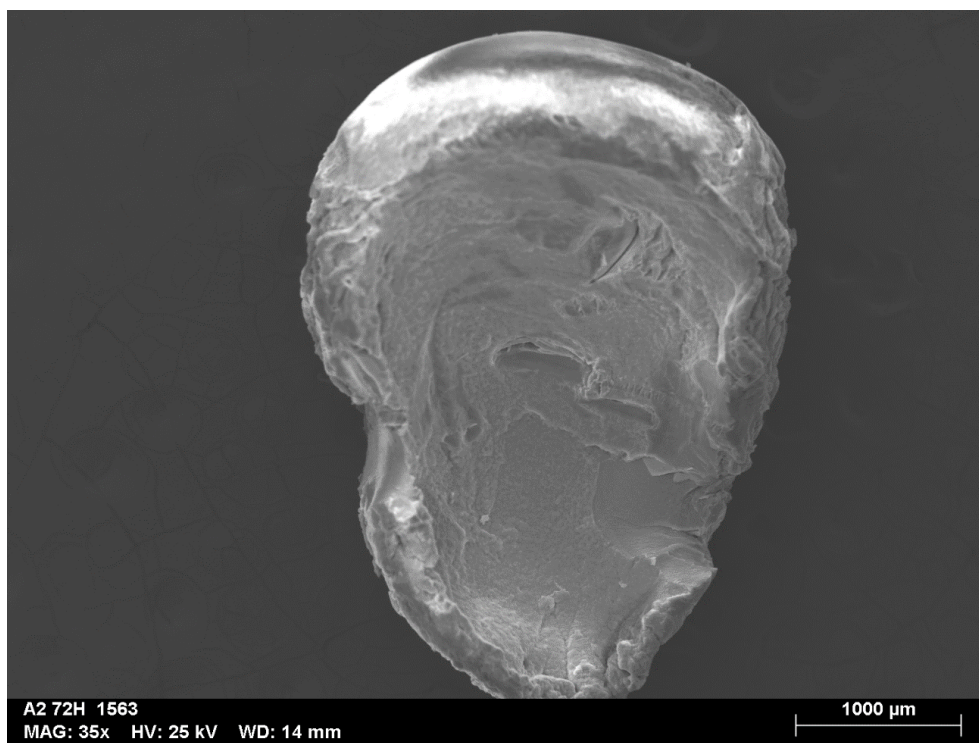


Figura 37 – Fotomicrografia de SEM da amostra A2.2 a 35x (GEN 72h), estrutura tridimensional com uma forma irregular

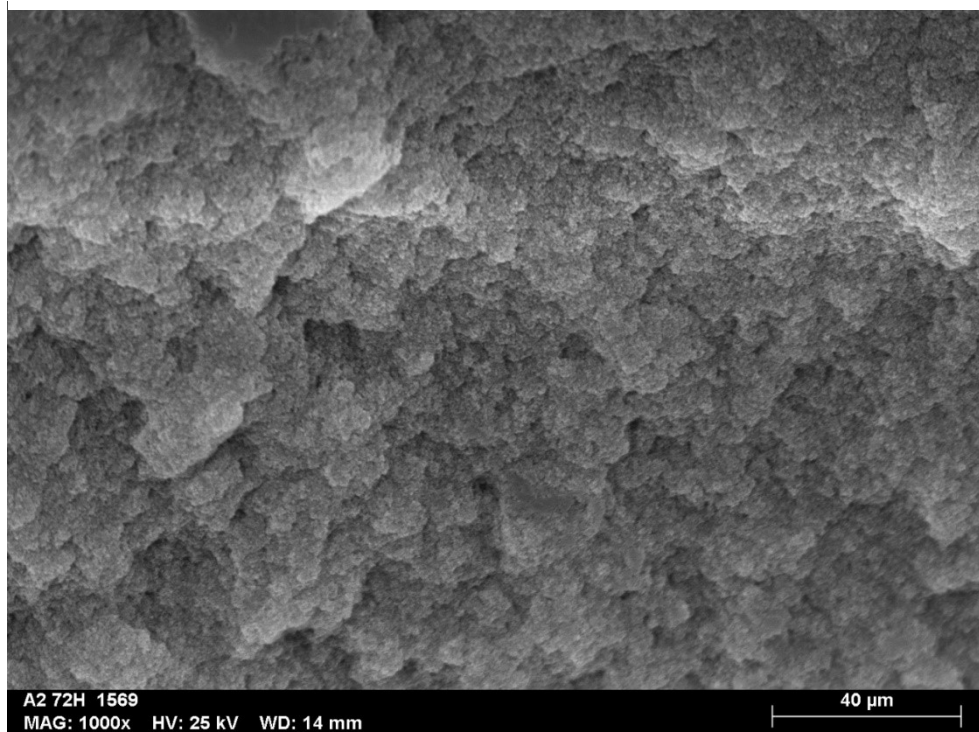


Figura 38– Fotomicrografia de SEM da amostra A2.2 a 1000x (GEN 72h), imagem com padrão homogêneo, zonas de aglomerações de mineral

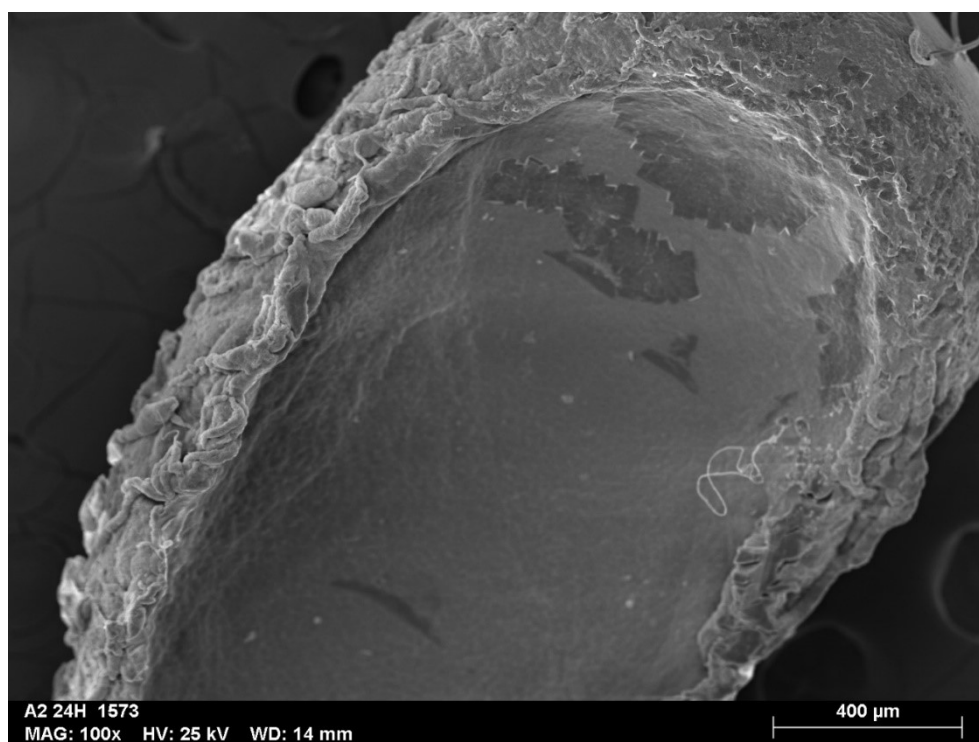


Figura 39– Fotomicrografia de SEM da amostra A2.2 a 100x (GEN 24h), estrutura tridimensional com uma zona central regular e lisa e com uma periferia e margens irregulares

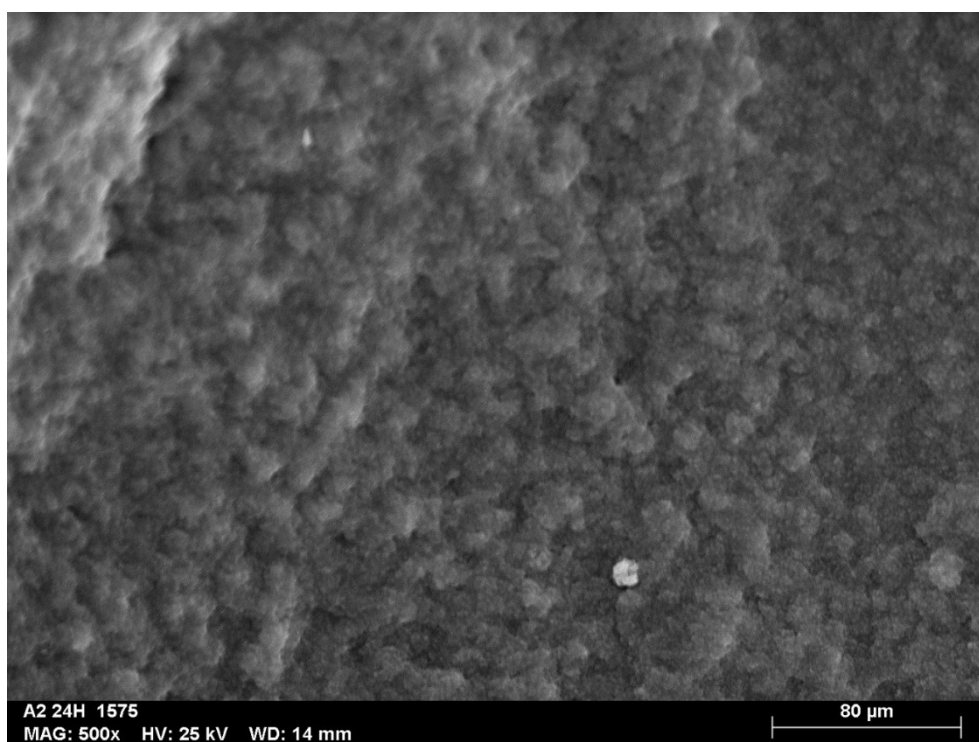


Figura 40– Fotomicrografia de SEM da amostra A2.3 a 500x (GEN 24h), imagem com padrão homogêneo, zonas de aglomerações de mineral não bem definidos

CONCLUSÃO

Através da análise qualitativa, com recurso a SEM, e análise quantitativa, com recurso a EDS, pode-se afirmar que em todos os grupos de 24 h não existiu formação mineral, uma vez que a massa e características destes foram muito distintas dos respetivos grupos de 72h.

Os resultados da análise quantitativa do grupo A1 sugerem que o GTA pode desempenhar um papel favorável na formação de mineral, sendo que originou uma massa média duas vezes superior à do grupo A0. No entanto, a análise qualitativa e as imagens de MEV revelaram um cristal com características distintas da do grupo de controlo. Deste modo, é necessário realizarem-se estudos experimentais adicionais a fim de esclarecer estes resultados controversos.

O segundo agente de ligação cruzada estudado, a GEN, revelou nas imagens SEM e análises EDS, um padrão extremamente idêntico do grupo A0, tanto de aspeto como também de proporção Ca/P, o que pode indicar uma formação mineral idêntica ao grupo A0. Contudo, a massa média estimada obtida foi muito semelhante à deste grupo, o que pode indicar que não existe um aumento da formação mineral. Posto isto, são necessários estudos adicionais especialmente da variante do pH da solução de GEN com objetivo de estabelecer as condições ideais da aplicação deste agente ligante.

Atualmente na literatura, não foram encontrados estudos realizados em condições idênticas, tratando-se por isso este trabalho de um estudo piloto. As conclusões retiradas carecem por isso, como já referido, de novas investigações para poderem ser mais detalhadas e fundamentadas.

BIBLIOGRAFIA

- Abou, E. A., Bozec, L., Knowles, J. C., Syed, O., Mudera, V., Day, R., & Keun, J. (2012). Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient ☆. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.010>
- Abou Neel, E. A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- Al-Ammar, A., Drummond, J. L., & Bedran-Russo, A. K. (2009). The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 91(1), 419–424. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31417>
- Antunes, C. C. (2020). *Análise da mineralização dentinária in vitro* [IUEM].
- Araújo, G. S. (2019). *Mineralização dentinária in vitro* [IUEM]. <http://hdl.handle.net/10400.26/29757>
- Bedran-Russo, A. K. B., Pashley, D. H., Agee, K., Drummond, J. L., & Miescke, K. J. (2008). Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 86(2), 330–334. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31022>
- Bedran-Russo, A. K. B., Pereira, P., Duarte, W., & Drummond, J. (2006). Application of Crosslinkers to Dentin Collagen Enhances the Ultimate Tensile StrengthNo Title. *Wiley InterScience*.
- Beniash, E., Traub, W., Veis, A., & Weiner, S. (2000). A transmission electron microscope study using vitrified ice sections of predentin: Structural changes in the dentin collagenous matrix prior to mineralization. *Journal of Structural Biology*, 132(3), 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. (2011). 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>
- Beniash, Elia, Metzler, R. A., Lam, R. S. K., & Gilbert, P. U. P. A. (2009). Transient amorphous calcium phosphate in forming enamel. *Journal of Structural Biology*, 166(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.02.001>
- Bentes, A. de S., de Souza, H. A. L., Amaya-Farfan, J., Lopes, A. S., & de Faria, L. J. G. (2015). Influence of the composition of unripe genipap (*Genipa americana* L.) fruit on the formation of blue pigment. *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3919–3924. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1651-9>
- Betts, F., Blumenthaland, N. C., & Posner, A. S. (1981). *Growth 53 (1981) 63—73 North-Holland Publishing Company*. 53, 63–73.
- Boskey, A. L. (2007). Mineralization of bones and teeth. *Elements*, 3(6), 385–391. <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.3.6.385>
- Bowes, J. H., & Cater, C. W. (1966). The reaction of glutaraldehyde with proteins and other biological materials. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 85(2), 193–200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1966.tb02180.x>
- Brown, W. (1966). *Crystal growth of bone mineral*.
- Butler, M. F., Ng, Y. F., & Pudney, P. D. A. (2003). Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 41(24), 3941–3953. <https://doi.org/10.1002/pola.10960>
- Chapman, J. A., & Hardcastle, R. A. (1974). The staining pattern of collagen fibrils: Ii. A comparison with patterns computer-generated from the amino acid sequence. *Connective Tissue Research*, 2(2), 151–159. <https://doi.org/10.3109/03008207409152100>
- Charulatha, V., & Rajaram, A. (2003). Influence of different crosslinking treatments on the physical properties of collagen membranes. *Biomaterials*, 24(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00412-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00412-X)
- 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. *Bone*, 39(3), 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.059>
- Cui, F. Z., 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>
- 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>
- Dahl, T., Sabsay, B., & Veis, A. (1998). Type I collagen-phosphoryn interactions: Specificity of the monomer- monomer binding. *Journal of Structural Biology*, 123(2), 162–168. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4025>
- Delgado, L. M., Bayon, Y., Pandit, A., & Zeugolis, D. I. (2015). To Cross-Link or Not to Cross-Link? Cross-Linking Associated Foreign Body Response of Collagen-Based Devices. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0290>
- Delgado, L. M., Fuller, K., & Zeugolis, D. I. (2017). Collagen Cross-Linking: Biophysical, Biochemical, and Biological Response Analysis. *Tissue Engineering - Part A*, 23(19–20), 1064–1077. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0415>
- Deshpande, A. S., Fang, P. A., Simmer, J. P., Margolis, H. C., & Beniash, E. (2010). Amelogenin-collagen interactions regulate calcium phosphate mineralization in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19277–19287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079939>
- Di Foggia, M., Prati, C., Gandolfi, M. G., & Taddei, P. (2019). An in vitro study on dentin demineralization and remineralization: Collagen rearrangements and influence on the enucleated phase. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 193, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.004>
- Elsharkawy, S., Al-Jawad, M., Pantano, M. F., Tejeda-Montes, E., Mehta, K., Jamal, H., Agarwal, S., Shuturminska, K., Rice, A., Tarakina, N. V., Wilson, R. M., Bushby,

- A. J., Alonso, M., Rodriguez-Cabello, J. C., Barbieri, E., Del Río Hernández, A., Stevens, M. M., Pugno, N. M., Anderson, P., & Mata, A. (2018). Protein disorder-order interplay to guide the growth of hierarchical mineralized structures. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04319-0>
- Fujikawa, S., Yokota, T., Koga, K., & Kumada, J. ichi. (1987). The continuous hydrolysis of geniposide to genipin using immobilized β -glucosidase on calcium alginate gel. *Biotechnology Letters*, 9(10), 697–702. <https://doi.org/10.1007/BF01024600>
- Fujisawa, R., & Tamura, M. (2012). *Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification*. 1891–1903.
- George, A., & Veis, A. (2008). Phosphorylated proteins and control over apatite nucleation, crystal growth, and inhibition. *Chemical Reviews*, 108(11), 4670–4693. <https://doi.org/10.1021/cr0782729>
- Gough, J. E., Scotchford, C. A., & Downes, S. (2001). *Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen / poly (vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis*.
- Grynblas, M. D., & Omelon, S. (2007). Transient precursor strategy or very small biological apatite crystals? *Bone*, 41(2), 162–164. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.04.176>
- Han, B., Jaurequi, J., Tang, B. W., & Nimni, M. E. (2003). Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 65(1), 118–124. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10460>
- Hass, V., Luque-martinez, I. V., Felipe, M., Guimarães, C., Bisinoto, V., Pinheiro, V., Koller, G., Fleith, M., Loguercio, A. D., & Reis, A. (2016). Collagen cross-linkers on dentin bonding : Stability of the adhesive interfaces , degree of conversion of the adhesive , cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dental Materials*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.03.008>
- 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>

- Huang, L. L. H., Sung, H. W., Tsai, C. C., & Huang, D. M. (1998). Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42(4), 568–576. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19981215\)42:4<568::AID-JBM13>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19981215)42:4<568::AID-JBM13>3.0.CO;2-7)
- Kevin Range, and D. M. Y. A. M. (2012). 基因的改变 NIH Public Access. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Kikuchi, M., Matsumoto, H. N., Yamada, T., Koyama, Y., Takakuda, K., & Tanaka, J. (2004). Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites. *Biomaterials*, 25(1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00472-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00472-1)
- Knott, L., & Bailey, A. J. (1998). Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*, 22(3), 181–187. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(97\)00279-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00279-2)
- Landis, W.J, Song, M, J., & Leith, A. (1992). *Mineral and Organic Matrix Interaction in Normally Calcifying Tendon Visualized in Three Dimensions by High-Voltage Electron Microscopic Tomography and Graphic Image Reconstruction*.
- Landis, William J., & Jacquet, R. (2013). Association of calcium and phosphate ions with collagen in the mineralization of vertebrate tissues. *Calcified Tissue International*, 93(4), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9725-7>
- Landis, William J., & Silver, F. H. (2002). The structure and function of normally mineralizing avian tendons. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 133(4), 1135–1157. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00248-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00248-9)
- Landis, William 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>
- Lee, S. W., Lim, J. M., Bhoo, S. H., Paik, Y. S., & Hahn, T. R. (2003). Colorimetric determination of amino acids using genipin from *Gardenia jasminoides*. *Analytica*

- Chimica Acta*, 480(2), 267–274. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00023-0)
- Levine, M. (2011). Topics in Dental Biochemistry. In *Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011* (Vol. 52, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Li, Y., Thula, T. T., Jee, S., Perkins, S. L., Aparicio, C., Douglas, E. P., & Gower, L. B. (2012). Biomimetic mineralization of woven bone-like nanocomposites: Role of collagen cross-links. *Biomacromolecules*, 13(1), 49–59. <https://doi.org/10.1021/bm201070g>
- Liu, Y., Kim, Y. K., Dai, L., Li, N., Khan, S. O., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2011). Hierarchical and non-hierarchical mineralisation of collagen. *Biomaterials*, 32(5), 1291–1300. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.10.018>
- 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>
- Mcgregor, C., Byrne, G., Rahmani, B., & Chisari, E. (2016). Physical equivalency of wild type and Galactose α 1, 3 Galactose free porcine pericardium ; a new source material for bioprosthetic heart valves . *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.06.007>
- Muzzarelli, R. A. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>
- Muzzarelli, R. A. A., El Mehtedi, M., Bottegoni, C., Aquili, A., & Gigante, A. (2015). Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. *Marine Drugs*, 13(12), 7314–7338. <https://doi.org/10.3390/md13127068>
- Neel, E. A. A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4743–4763. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>

- Niu, X., Fan, R., Tian, F., Guo, X., Li, P., Feng, Q., & Fan, Y. (2017a). Calcium concentration dependent collagen mineralization. *Materials Science and Engineering C*, 73, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.079>
- Niu, X., Fan, R., Tian, F., Guo, X., Li, P., Feng, Q., & Fan, Y. (2017b). Calcium concentration dependent collagen mineralization. *Materials Science and Engineering C*, 73, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.079>
- Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A. J., De With, G., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2010a). 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>
- Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A. J., De With, G., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2010b). 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>
- Nudelman, F., Pieterse, K., George, A., Bomans, P. H. H., Friedrich, H., Brylka, L. J., Hilbers, P. A. J., With, G. De, & Sommerdijk, N. A. J. M. (2010). *The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors*. 9(December), 9–14. <https://doi.org/10.1038/NMAT2875>
- Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S., Kumar, R., Kim, Y. Y., Kaufman, M. J., Douglas, E. P., & Gower, L. B. (2007). Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 58(3–5), 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9001–9005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502718103>
- 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>

- Panda, N. N., Jonnalagadda, S., & Pramanik, K. (2013). Development and evaluation of cross-linked collagen-hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24(18), 2031–2044. <https://doi.org/10.1080/09205063.2013.822247>
- Petruska, J. A., & Hodge, A. J. (1964). A SUBUNIT MODEL FOR THE TROPOCOLLAGEN MACROMOLECULE. *National Academy of Sciences*, 51(5), 871–876.
- Pouget, E. M., With, G. De, & Sommerdijk, N. A. J. M. (2009). *CaCO₃ Formation Revealed by Cryo-TEM*. 587(March), 2007–2010.
- Qiu, Z. Y., Cui, Y., Tao, C. S., Zhang, Z. Q., Tang, P. F., Mao, K. Y., Wang, X. M., & Cui, F. Z. (2015). Mineralized collagen: Rationale, current status, and clinical applications. *Materials*, 8(8), 4733–4750. <https://doi.org/10.3390/ma8084733>
- Rey, C., Combes, C., Drouet, C., & Glimcher, M. J. (2009). Erratum: Bone mineral: Update on chemical composition and structure (Osteoporosis International (DOI 10.1007/s00198-009-0860-y)). *Osteoporosis International*, 20(12), 2155. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1063-2>
- Robinson, R. A., & Watson, M. L. (1952). *COLLAGEN-CRYSTAL RELATIONSHIPS IN BONE AS SEEN IN THE ELECTRON MICROSCOPE*. 114(3).
- Sallent, I., Capella-Monsoni's, H., & Zeugolis, D. I. (2019). *Chapter 3. 1944*.
- 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. *Connective Tissue Research*, 52(3), 242–254. <https://doi.org/10.3109/03008207.2010.551567>
- Sung, H. W., Chang, W. H., Ma, C. Y., & Lee, M. H. (2003). Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 64(3), 427–438. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10346>
- Sung, H. W., Chang, Y., Chiu, C. T., Chen, C. N., & Liang, H. C. (1999a). Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a

- naturally occurring crosslinking agent. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(2), 116–126. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199911\)47:2<116::AID-JBM2>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199911)47:2<116::AID-JBM2>3.0.CO;2-J)
- Sung, H. W., Chang, Y., Chiu, C. T., Chen, C. N., & Liang, H. C. (1999b). Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Biomaterials*, 20(19), 1759–1772. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00069-1)
- Sung, H. W., Chang, Y., Liang, I. L., Chang, W. H., & Chen, Y. C. (2000). Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: Fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(1), 77–87. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200010\)52:1<77::AID-JBM10>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200010)52:1<77::AID-JBM10>3.0.CO;2-6)
- Sung, H. W., Huang, D. M., Chang, W. H., Huang, R. N., & Hsu, J. C. (1999). Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. *Journal of Biomedical Materials Research*, 46(4), 520–530. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19990915\)46:4<520::AID-JBM10>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19990915)46:4<520::AID-JBM10>3.0.CO;2-9)
- 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., Joo, E. L., & Price, P. A. (2007). The size exclusion characteristics of type I collagen: Implications for the role of noncollagenous bone constituents in mineralization. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22437–22447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700591200>
- Traub, W., Arad, T., & Weiner, S. (1989). Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), 9822–9826. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.24.9822>
- Tsai, T. R., Tseng, T. Y., Chen, C. F., & Tsai, T. H. (2002). Identification and determination of geniposide contained in *Gardenia jasminoides* and in two preparations of mixed traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A*,

- 961(1), 83–88. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00365-5)
- Wang, X. S., Wu, Y. F., Dai, S. L., Chen, R., & Shao, Y. (2012). Ultrasound-assisted extraction of geniposide from *Gardenia jasminoides*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(6), 1155–1159. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.03.012>
- Wang, Y., Azaïs, T., Robin, M., Vallée, A., Catania, C., Legriel, P., Pehau-Arnaudet, G., Babonneau, F., Giraud-Guille, M. M., & Nassif, N. (2012). The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. *Nature Materials*, 11(8), 724–733. <https://doi.org/10.1038/nmat3362>
- Weiner, Stephen, & Traub, W. (1992). *Bone structure: from angstroms to microns*. 879–885.
- Weiner, Steve. (2006). Transient precursor strategy in mineral formation of bone. *Bone*, 39(3), 431–433. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2006.02.058>
- Winotapun, W., Opanasopit, P., Ngawhirunpat, T., & Rojanarata, T. (2013). One-enzyme catalyzed simultaneous plant cell disruption and conversion of released glycoside to aglycone combined with in situ product separation as green one-pot production of genipin from gardenia fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, 53(2), 92–96. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.05.001>
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vázquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., ... Scalbert, A. (2018). HMDB 4.0: The human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Yamauchi, M., Katz, E. P., Otsubo, K., Teraoka, K., & Mechanic, G. L. (1989). Cross-linking and stereospecific structure of collagen in mineralized and nonmineralized skeletal tissues. *Connective Tissue Research*, 21(1–4), 159–169. <https://doi.org/10.3109/03008208909050006>
- Yamauchi, M., Taga, Y., Hattori, S., Shiiba, M., & Terajima, M. (2018). Analysis of collagen and elastin cross-links. In *Methods in Extracellular Matrix Biology* (1st ed., Vol. 143). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.08.006>

- Zeugolis, D. I., Paul, G. R., & Attenburrow, G. (2009). Cross-linking of extruded collagen fibers-A biomimetic three-dimensional scaffold for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 89(4), 895–908. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32031>
- Zhang, L., Tang, P., Xu, M., Zhang, W., Chai, W., & Wang, Y. (2010). Effects of crystalline phase on the biological properties of collagen-hydroxyapatite composites. *Acta Biomaterialia*, 6(6), 2189–2199. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.042>
- Zhu, S., Yuan, Q., Yin, T., You, J., Gu, Z., Xiong, S., & Hu, Y. (2018). Self-assembly of collagen-based biomaterials: Preparation, characterizations and biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(18), 2650–2676. <https://doi.org/10.1039/c7tb02999c>

ANEXOS

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 20, 2020

This Agreement between 283959355 -- Aikaterini Kakavas ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4893160473017
License date	Aug 20, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Materials Science and Engineering: C
Licensed Content Title	Calcium concentration dependent collagen mineralization
Licensed Content Author	Xufeng Niu,Rui Fan,Feng Tian,Xiaolin Guo,Ping Li,Qingling Feng,Yubo Fan
Licensed Content Date	Apr 1, 2017
Licensed Content Volume	73
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	7
Start Page	137
End Page	143
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	In vitro dentin mineralization promoted by different binding ligands
Institution name	Egas Moniz University
Expected presentation date	Sep 2020
Order reference number	1
Portions	7
Specific Languages	portuguese
	283959355
	Rua António de Jesus André
Requestor Location	

CAPARICA, 2825-146

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Aug 20, 2020

This Agreement between 283959355 -- Aikaterini Kakavas ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4893141236579
License date	Aug 20, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Advanced Drug Delivery Reviews
Licensed Content Title	Collagen — Emerging collagen based therapies hit the patient
Licensed Content Author	Ensanya A. Abou Neel, Laurent Bozec, Jonathan C. Knowles, Omaer Syed, Vivek Mudera, Richard Day, Jun Keun Hyun
Licensed Content Date	Apr 1, 2013
Licensed Content Volume	65
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	28
Start Page	429
End Page	456
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	In vitro dentin mineralization promoted by different binding ligands
Institution name	Egas Moniz University
Expected presentation date	Sep 2020
Order reference number	1
Portions	Figure 1
Specific Languages	portuguese
	283959355
Requestor Location	Rua António de Jesus André

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Aug 21, 2020

This Agreement between 283959355 -- Aikaterini Kakavas ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4893590548754
License date	Aug 21, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Biomaterials
Licensed Content Title	Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent
Licensed Content Author	Hsing-Wen Sung, Yen Chang, Chi-Tung Chiu, Chiun-Chen, Huang-Chien Liang
Licensed Content Date	Oct 1, 1999
Licensed Content Volume	20
Licensed Content Issue	19
Licensed Content Pages	14
Start Page	1759
End Page	1772
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	In vitro dentin mineralization promoted by different binding ligands
Institution name	Egas Moniz University
Expected presentation date	Sep 2020
Order reference number	3
Portions	figure1 and figure 15
Specific Languages	portuguese
	283959355
	Rua António de Jesus André
Requestor Location	

CAPARICA, 2825-146

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Aug 21, 2020

This Agreement between 283959355 -- Aikaterini Kakavas ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4893751425754
License date	Aug 21, 2020
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry
Licensed Content Title	Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin
Licensed Content Author	Paul D. A. Pudney, Yiu-Fai Ng, Michael F. Butler
Licensed Content Date	Nov 3, 2003
Licensed Content Volume	41
Licensed Content Issue	24
Licensed Content Pages	13
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Title	In vitro dentin mineralization promoted by different binding ligands
Institution name	Egas Moniz University
Expected presentation date	Sep 2020
Order reference number	5
Portions	Figure 18
Specific Languages	portuguese