

# Colágeno Aniônico como Matriz para Deposição Orientada de Minerais de Fosfato de Cálcio

Virginia C. A. Martins e Gilberto Goissis

**Resumo:** Este trabalho descreve o uso de colágeno aniônico como matriz suporte para a deposição orientada de sais de fosfato de cálcio. O material foi caracterizado pela presença de duas fases, uma amorfa e outra formada por colágeno microfibrilar com depósitos minerais na forma de cintas. Uma delas, na forma de uma espiral contínua, com 130 Å e uma periodicidade de 560 Å; a outra com um diâmetro médio de cerca de 170 Å e uma periodicidade de 880 Å, intercalados por um espaço de cerca de 240 Å. Estas estruturas evoluem para outras formas ordenadas de depósitos minerais. A relação Ca/P determinada para a fase majoritária foi de 1,48 (pró-hidroxiapatita), enquanto que para os depósitos sobre as fibras, esta relação foi de 1,36, indicando a presença de octafosfato de cálcio. Os resultados mostraram que o colágeno aniônico é capaz de induzir a deposição orientada de sais de fosfato de acordo com a sua estrutura microfibrilar, e que do ponto de vista da topografia a deposição da fase mineral é similar àquela observada para a deposição de sais de fosfato de cálcio nos estágios iniciais da formação do tecido ósseo.

**Palavras-chave:** *Colágeno aniônico, matriz, mineralização, orientação.*

## Introdução

A natureza desenvolveu, ao longo do seu processo evolutivo, materiais com propriedades especiais ainda longe de serem alcançadas por um "design" macromolecular sintético. Suas funções na natureza vão desde estruturas-suporte, carapaças protetoras, elementos de defesa, dispositivos gravitacionais ou magnéticos até materiais capazes de responder com variações estruturais seletivas a estímulos externos, como no caso do tecido ósseo. Muitos destes correspondem a materiais compósitos formados pela deposição de uma fase mineral sobre uma matriz orgânica polimérica de polissacarídeos, proteínas ou uma mistura destes dois polímeros, resultantes de uma complexa atividade celular. A

matriz orgânica, comumente dispersa no meio celular, tem papel importante no processo e pode controlar a deposição da fase mineral em<sup>1,2</sup>: a - matrizes relativamente inertes, isto é aquelas onde existe pouco ou nenhum controle da deposição da fase mineral, e têm como única função a delimitação física do crescimento da fase inorgânica; b - matrizes que facilitam o processo de nucleação pela existência na sua estrutura de sítios, onde a mineralização se inicia; c - matrizes que inibem ou delimitam o crescimento da fase inorgânica, impondo restrições ao grau de ordem da estrutura da deposição da fase mineral, por meio de fatores puramente estéricos; d - matrizes que controlam a cristalização, o crescimento e a orientação da fase mineral, processo este que via de regra é mediado por moléculas

*Virginia C.A. Martins e Gilberto Goissis, Departamento de Química e Física Molecular - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, Av. Dr. Carlos Botelho, 1465, CEP 13560-250, São Carlos, SP*

nucleadoras, caracterizadas pela presença de sítios ácidos ordenados, responsáveis pelo início da nucleação primária por interação com espécies catiônicas<sup>3</sup>. Nestes processos de mineralização, um maior ou menor controle exercido pela matriz está relacionado com um conjunto de propriedades envolvendo a sua topografia, geometria da rede, potenciais eletrostáticos, efeitos polares, esteoquímica e simetria espacial da fase cristalina, que provavelmente agem de modo cooperativo em função das modificações impostas pelo desenvolvimento da fase mineral<sup>4</sup>.

Dentre os tipos de materiais, os biomiméticos com propriedades similares ao tecido ósseo apresentam grande interesse, não apenas em função de suas propriedades mecânicas e elásticas, mas também devido à ampla utilização que poderiam ter como biomateriais, introduzindo dentro da área uma nova conceituação para a utilização de materiais cerâmicos em medicina e odontologia. A expectativa é que estes materiais tenham performances superiores, principalmente em trabalhos de reconstrução, em comparação com biocerâmicas convencionais existentes, cuja única semelhança com a matriz mineral que compõe este tecido é sua composição química<sup>5</sup>.

O tecido ósseo, além dos seus componentes celulares, é formado por uma matriz extracelular composta essencialmente de uma fase inorgânica de sais de fosfato de cálcio, principalmente a hidroxiapatita (HA) depositada sobre uma matriz protéica constituída pelo colágeno. Esta fase mineral encontra-se, na sua maioria, dentro da estrutura da microfibrila na matriz colagênica<sup>6</sup>, e provavelmente é a responsável pelo controle não apenas da cristalização da fase inorgânica, mas também seu crescimento e orientação. Deste conjunto, surge uma das mais interessantes propriedades deste tecido que é a sua capacidade de remodelação induzida por correntes elétricas resultantes da variação de potências de correntes e da piezoelectricidade, geradas por diferenças na pressões externas exercidas sobre o tecido ósseo<sup>7,8</sup>. Portanto, o conceito de biomimetismo relativo ao tecido ósseo aplicado ao desenvolvimento de materiais osso-miméticos não está restrito à obtenção de materiais com propriedades mecânicas e elásticas, mas estende-se também à obtenção de materiais capazes de gerar, *in vivo*, correntes elétricas que por meio de estímulos externos

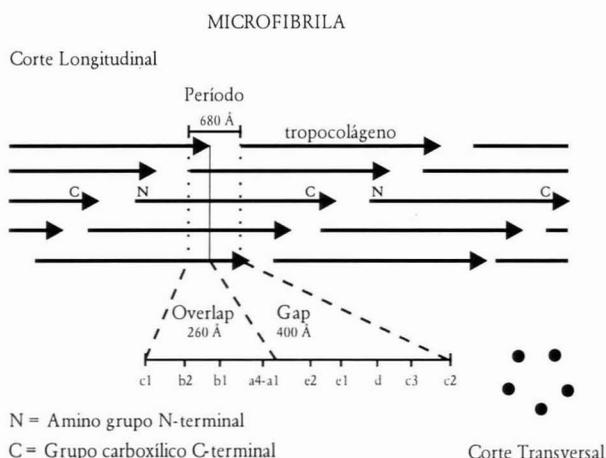
induzam a alterações programadas dos contornos do tecido natural (correções plásticas induzidas), ou também, a obtenção de materiais similares ao osso nos seus estágios iniciais de desenvolvimento e que sejam capazes de estimular os sistemas celulares e bioquímicos, propiciando um desenvolvimento mais eficiente do tecido ósseo nos casos de sua reconstrução.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi estudar *in vitro* a mineralização orientada de sais de fosfato de cálcio por matrizes de colágeno quimicamente modificado, obtido por hidrólise seletiva dos grupos carboxamida de resíduos de Asn e Gln<sup>9</sup> como suporte para deposição seletiva.

Do ponto de vista da aproximação sintética, dois fatores principais devem ser levados em consideração para estudo da mineralização orientada de sais de fosfato de cálcio sobre matrizes colagênicas, obtendo-se assim materiais osso-miméticos: o primeiro está associado ao fato de que na sua fase inicial de biomineralização *in vivo*, os depósitos da fase mineral que dão início à formação do tecido ósseo não correspondem à HA e sim ao que se denomina de pró-HA, onde a relação Ca/P é de 1,50 e não 1,67<sup>10</sup>; o segundo está associado a prováveis alterações na matriz colagênica, principalmente na topografia da distribuição de carga da sua estrutura periódica em função das condições de obtenção *in vitro* da HA, que é favorecida não apenas pela estequiometria da reação, mas também pelo pH, normalmente por volta de 12<sup>11</sup>.

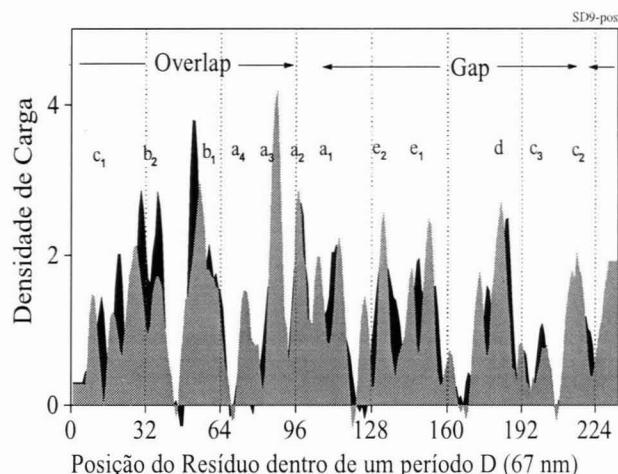
O colágeno tipo I, matéria-prima para produção de gelatina, é uma proteína estrutural largamente encontrada no reino animal, que está diretamente envolvida no processo de biomineralização e que dá origem ao tecido ósseo e à dentina<sup>12</sup>. Tem como unidade básica o tropocolágeno, uma proteína de peso molecular de 300.000D, formada por 3 cadeias polipeptídicas, duas iguais e denominadas de  $\alpha_1$  e uma diferenciada denominada de  $\alpha_2$ , com pesos moleculares aproximados de 100.000D, que se organizam na forma de uma hélice tripla para fornecer uma molécula na forma de um bastão com cerca de 2500 Å de comprimento por 15 Å de diâmetro<sup>13</sup>. Nos tecidos, organizam-se pela justaposição de cinco moléculas dispostas concêntricamente e alternadas umas em relação às outras de 1/4 de seu comprimento (Esquema I), para dar origem à microfibrila<sup>13</sup>.

Esta organização dá origem a zonas periódicas denominadas de períodos D, com cerca de 680 Å de largura que compreendem duas zonas distintas, o “Gap”, com cerca de 400 Å e o “Overlap”, com cerca de 280 Å. Dentro da periodicidade D existe ainda um padrão sub-periódico, caracterizado pela presença de zonas denominadas de c<sub>2</sub>, c<sub>3</sub>, d, e<sub>1</sub>, e<sub>2</sub>, a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>, a<sub>4</sub>, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub>, que correspondem a uma disposição transversal ordenada de aminoácidos básicos e ácidos ao longo da microfibrila mostrada por análise densitométrica de filmes obtidos de microfibrilas após serem coradas positivamente com sais de uranila e fosfotungstato, seguido da detecção por microscopia eletrônica de varredura<sup>14</sup>.



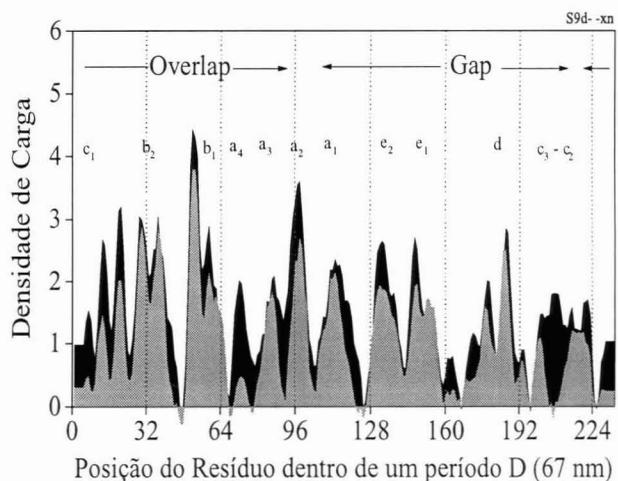
**Esquema I.** Diagrama para a estrutura microfibrilar de matrizes colagênicas e suas características estruturais

Uma previsão de prováveis alterações na topografia da distribuição periódica de cargas na estrutura microfibrilar de matrizes colagênicas pode ser obtida pela comparação da distribuição de cargas positivas e negativas dentro de um período D, com aquela que seria obtida assumindo a hidrólise completa dos grupos carboxamida dos resíduos de asparagina (Asn) e glutamina (Gln) dentro do mesmo período D da matriz. Estes grupos, exceto pela ligação peptídica, são os únicos susceptíveis de alteração química, nas condições para a formação dos sais de fosfato de cálcio. A resultante desta hidrólise é um aumento significativo da densidade de carga dentro do período. Como pode ser observado na Figura 1, a distribuição das cargas totais para um período D da microfibrila de colágeno tem como características básicas a superposição topográfica de resíduos com cargas negativas e positivas, bem como uma igualdade no número destes resíduos<sup>13</sup>.



**Figura 1.** Distribuição de cargas positivas (cinza) e negativas (preto) em um período D da microfibrila de colágeno.

Entretanto, considerando a hidrólise completa dos grupos carboxamida dos resíduos de Asn e Gln dentro de um período D, que pode ocorrer nas condições *in vitro* para obtenção de HA; o que se observa é que apesar do aumento significativo na densidade de carga dentro do período D, a topografia da distribuição é praticamente mantida (Figura 2), quando comparada com a distribuição na microfibrila nativa. Este aumento é de cerca de 120 unidades de cargas negativas, visto que, enquanto o colágeno nativo apresenta cerca de 231 cargas, a hidrólise dos grupos carboxamida de Asn e Gln eleva este número para 351 unidades de carga dentro de um período D.



**Figura 2.** Distribuição total de cargas negativas em um período D (67 nm) de colágeno nativo (cinza) e tratado em meio alcalino (preto), assumindo hidrólise completa dos resíduos de asparagina e glutamina.

Do ponto de vista da formação do tecido ósseo, apesar do seu mecanismo não ser conhecido, sabe-se que o colágeno tem uma participação ativa apontando na direção de que os primeiros depósitos cristalinos de sais de fosfato de cálcio ocorrem na zona chamada

“Gap”, espalhando-se progressivamente para a zona do “Overlap” por um processo mediado por moléculas nucleadoras<sup>3</sup>.

Como a estrutura macromolecular na microfibrila é topograficamente muito organizada, principalmente em relação a sua distribuição de cargas (Figura 1), uma pergunta pode ser feita. Não seria esta estrutura a única responsável pela cristalização, orientação e limitação das dimensões da fase cristalina?

Condições ideais de fornecimento dos componentes da fase inorgânica seriam de responsabilidade do sistema bioquímico envolvido, principalmente levando-se em consideração os altos valores de  $K_{ps}$ <sup>3</sup> que caracterizam estas fases minerais. Em suporte a esta afirmação, está o fato de que cerca de 80% da fase inorgânica encontrada no tecido ósseo está distribuída dentro dos espaços internos da organização microfibrilar e não nos espaços intercelulares<sup>6</sup>. Por outro lado, a idéia de utilizar-se o colágeno aniônico provém do fato de que as formas cristalinas de HA com dimensões similares àquelas observadas *in vitro* requerem valores de pH superiores a 9, condições estas que ocorrendo nos estágios iniciais de calcificação, podem modificar significativamente a resultante de cargas da matriz colagênica, principalmente em função da hidrólise dos grupos carboxamida de Asn e Gln.

## Materiais e Métodos

### Preparação dos Materiais

- *Colágeno Aniônico*: Colágeno aniônico solúvel foi preparado por hidrólise seletiva de resíduos de Asn e Gln por tratamento de serosa bovina com uma solução aquosa de dimetilsulfóxido a 6%, na presença dos sais:  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , NaCl, KCl,  $\text{CaSO}_4$  em meio alcalino, por um período de 48 h<sup>9</sup>. A concentração final da preparação de colágeno solubilizado foi de 0,7%, determinada via hidroxiprolina<sup>15</sup>. A caracterização da preparação foi feita por eletroforese em gel de poli(acrilamida), análise de aminoácido, espectroscopia de infravermelho, estabilidade térmica (DSC e temperatura de encolhimento) e microscopias eletrônicas de varredura e transmissão:

- *Mineralização*: gel de colágeno a 0,75% em solução de HAc a pH 3,5 foi dialisado contra uma solução de EDTA  $10^{-3}$  Mol L<sup>-1</sup>, pH 11,0, até que o pH do dialisado permanecesse constante, seguido de diálise contra água deionizada, também até pH constante. Obteve-se um gel que foi isolado por centrifugação na

temperatura de 10 °C por 10 min a 5000 RPM em uma centrífuga Hitachi Modelo CR20B2 (rotor RPR20-2). O gel foi suspenso em 10,0 mL de uma solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  a 0,23 Mol L<sup>-1</sup> e o pH da solução resultante ajustado a 11,0 por adição de solução concentrada de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A seguir, à solução resultante foi adicionado lentamente, 6,24 mL de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ <sup>16</sup> (tempo de adição, 1 h) e a mistura, de aspecto leitoso, foi agitada por um período de 2 h, seguido de centrifugação nas mesmas condições acima (etapas realizadas sob atmosfera de nitrogênio). O precipitado amorfo foi recolhido, colocado em saco de diálise juntamente com água deionizada e o material dialisado contra solução de tampão fosfato 0,13 Mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, por um período de 15 dias, com trocas diárias do tampão. O precipitado branco foi filtrado e seco ao ar, e depois em dessecador sem vácuo, na presença de hidróxido de potássio sólido.

### Caracterização dos Materiais

- *Determinação da Relação Ca/P*: Por via úmida.

a) *Determinação de Fósforo (P)*: o conteúdo de P foi determinado pelo método do molibdato<sup>16</sup>, utilizando-se uma curva de calibração preparada com auxílio de soluções  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , com concentrações variáveis de P entre: 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00 e 2,50  $\mu\text{gP/mL}$ , e a intensidade da cor azul do complexo formado foi determinada em um espectrofotômetro uv-visível da HITACHI, modelo U-1100 em 660 nm. A amostra para o composto foi preparada por diluição em 2,0 mL de HCl 3,0 Mol L<sup>-1</sup>, de uma massa para obter-se uma concentração de P em solução entre 0,25 e 1,25  $\mu\text{gP/mL}$ , admitindo-se a formação da HA com uma relação Ca/P de 1,67, e num volume final de 250 mL. Os resultados obtidos correspondem à média de três determinações.

b) *Determinação de Cálcio*: Cálcio foi determinado por titulação complexométrica com EDTA<sup>17</sup>, utilizando-se como indicador o Negro Eriocromo-T 1% de complexo de magnésio-EDTA. Amostra do composto foi preparada por dissolução de 0,1 g do material em 10,0 mL de uma solução de HCl 2,0 Mol L<sup>-1</sup>, seguida de diluição para 100,0 mL. Os resultados obtidos são médias de três determinações independentes.

- *Espectrometria de Dispersão de Energia de Raios-X (EDX)*: os espectros de EDX foram obtidos utilizando-se um EDX LINK ANALYTICAL, modelo QX 2000, acoplado a um Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS, modelo DSM 960. A

amostra foi preparada como descrita para MEV, não sendo porém recoberta com o metal ouro e sim com carbono (30 nm), utilizando-se um feixe de elétrons de 20 keV e uma distância de 20 mm do canhão até a amostra.

- *Análise Calorimétrica Diferencial de Varredura:* compósito e HA foram utilizados na forma de pó, com tamanho de partícula menor que 100 mesh, e as análises realizadas em amostras de cerca de 10,0 mg e colocadas em suportes de alumínio em um equipamento DSC 910 da Du Pont acoplado a um termo analisador Du Pont modelo TA 9900. As medidas foram efetuadas numa razão de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera de ar com um fluxo de 60,0 mL/min, sendo a padronização de temperatura e fluxo de calor feita previamente com índio (In).

- *Difração de Raios-X:* as amostras utilizadas também foram na forma de pó, obtidas pela liofilização do compósito, seguindo-se de trituração em almofariz. Os difratogramas foram obtidos em um difratômetro automático de ângulo rotatório da RIGAKU ROTAFLEX modelo RU-200B, e comparados com aqueles de HA e colágeno.

- *Espectroscopia de Infravermelho:* os espectros de HA e do compósito foram obtidos com o material particulado de tamanho entre 60 e 100 mesh, em pastilhas de KBr, enquanto o de colágeno foi obtido em membranas. O equipamento utilizado foi da Bomem MB-120, a 20 °C, no intervalo entre 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ , (resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ ).

- *Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV):* as análises por MEV foram feitas com HA e o compósito na forma particulada (60 a 100 mesh), recobertas com carbono ou ouro em um microscópio eletrônico de varredura da ZEISS, modelo DSM 960.

## Resultados e Discussão

O espectro de IV para a preparação de uma HA obtida em condições similares àquela do compósito (Figura 3c) mostrou bandas características em 3566  $\text{cm}^{-1}$  (OH estrutural), 3435  $\text{cm}^{-1}$  (água), 1100, 1039, 967,607, 569 e 479  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{PO}_4$ ) e 833  $\text{cm}^{-1}$  (P-OH), que são típicas àquelas descritas para a HA<sup>18</sup>. O espectro obtido para o compósito (Figura 3b), não foi significativamente diferente ao da HA, principalmente porque as bandas que correspondem às bandas de amida I e II<sup>19</sup> (Figura 3a) não foram observadas, sugerindo pelo menos pela técnica de IV, a ausência de colágeno na preparação.

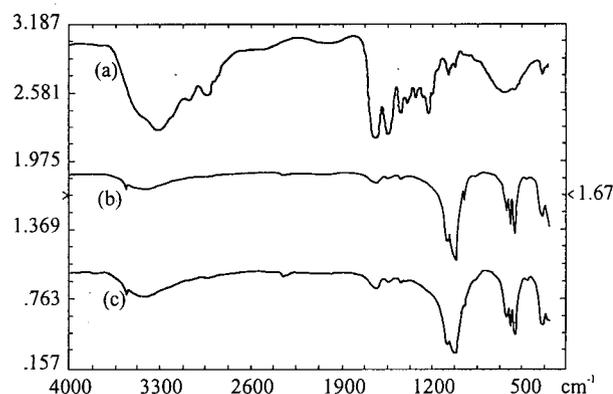


Figura 3. Comparação entre os espectros de IV obtidos para: (a) membrana de colágeno pH 3,5; (b) compósito HA/colágeno (relação 20:1); (c) HA

Resultados de calorimetria diferencial de varredura para o compósito (Figura 4a) e HA (Figura 4b) mostraram no primeiro caso transições em 50,4; 74,6; 96,7; 237,0; 312,0 e 380,0 °C, enquanto que para o segundo transições em 111,2; 224,5 e 286,1 °C. As transições observadas em 50,4 e 74,6 °C estão de acordo com aquelas observadas para matrizes colagênicas<sup>20,21</sup>, caracterizando no compósito não apenas a sua presença, mas o mais importante é que sua estrutura secundária foi mantida ao longo do processo de preparação. Ainda para o compósito, as transições em 96,1 e 111,0 e 117,4 °C foram atribuídas a perdas de água associadas ao colágeno e HA respectivamente.

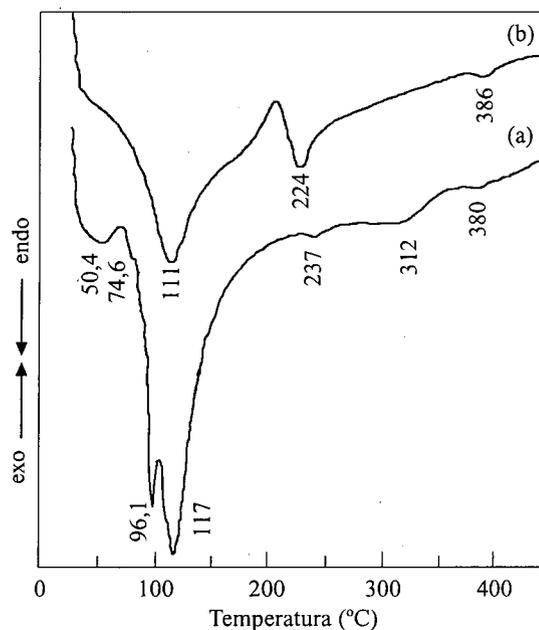
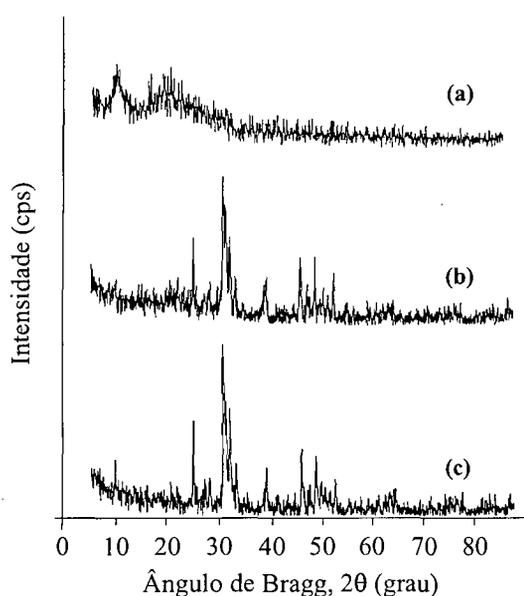


Figura 4. Análise exploratória diferencial para: (a) compósito colágeno:hidroxiapatita; (b) HA.

A Figura 5c mostra os difratogramas do sal de fosfato de cálcio obtido nas mesmas condições que aquelas descritas para a preparação do compósito

(Figura 5b). Os picos mais intensos foram observados nos valores de  $d$ : 2,82; 2,79; 2,73 e 3,45 Å e são aqueles característicos para a HA de acordo com a comparação de difratogramas com padrões da JCPDS<sup>22</sup>. Entretanto, outros picos de menor intensidade foram observados em 2,88; 5,20 e 3,23 Å que, por comparação com espectros padrão da JCPDS, sugerem a presença também do  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP, JCPDS). O difratograma para o compósito (Figura 5b) foi similar, indicando que do ponto de vista da fase mineral a preparação é estruturalmente semelhante àquela do material obtido na ausência de colágeno e, da mesma forma que para o espectro de IV não foi possível detectar um padrão de difração da presença do colágeno (Figura 5a).



**Figura 5:** Comparação entre os difratogramas: (a) membrana de colágeno manufacturada a pH 3,5; (b) compósito HA/colágeno; (c) HA

As relações Ca/P determinadas por via úmida para a HA e para o compósito mostraram valores de respectivamente 1,47 e 1,54, resultado este que está de acordo com a similaridade apresentada pelos dois materiais tanto por IV (Figura 3) e difração de raios-X (Figura 5). Apesar dessa relação ser significativamente diferente daquela para HA 1,67, e portanto, sugerir que tanto no compósito quanto no sal de fosfato de cálcio, a fase predominante seria o  $\beta$ -TCP, onde a relação Ca/P é de 1,50<sup>23</sup>, os difratogramas mostram de modo claro que esta fase é minoritária e que provavelmente a fase predominante seja uma pró-HA<sup>10</sup> cuja relação Ca/P pode variar entre 1,49 e 1,65<sup>3</sup>.

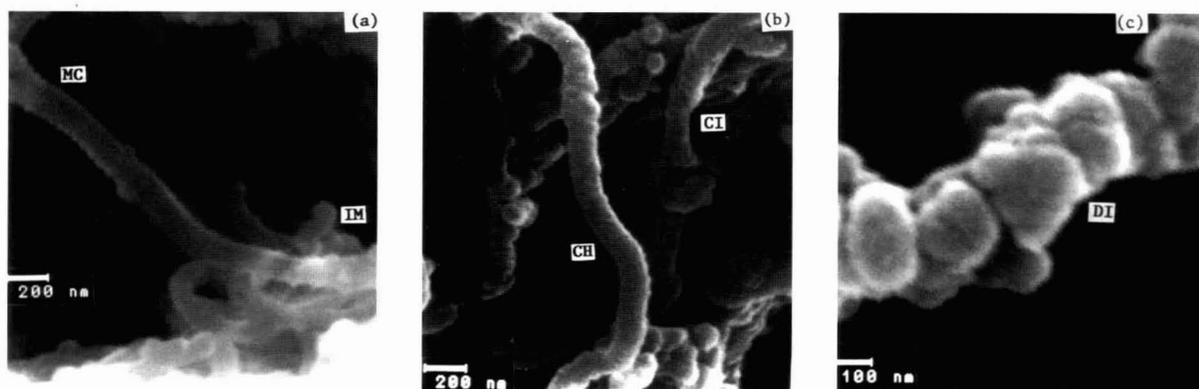
Entretanto, a técnica de EDX mostrou que o compósito, do ponto de vista da relação Ca/P é

formado por duas fases distintas: uma fase majoritária, caracterizada pela ausência de microfibrilas, com uma relação Ca/P de 1,48, próxima àquela determinada para a HA por via úmida; a outra caracterizada por regiões com alta densidade de microfibrilas que tipicamente mostram sobre elas um depósito de fase mineral (Figura 6). Nestas regiões, a relação Ca/P determinada por EDX foi de 1,36, que é uma relação típica para o octa-fosfato de cálcio<sup>3</sup>, uma fase mineral que ocorre em alguns processos de remineralização de estruturas ósseas *in vivo*<sup>24</sup>. A técnica de EDX mostrou também que a fase mineral nos dois casos é formada exclusivamente por íons Ca e P, acompanhada por traços de Na.

Micrografias de MEV em ampliação de 1000 vezes mostraram que o compósito, além de uma parte amorfa, apresenta estruturas aciculares formadas por filamentos que podem ser observados despreendendo-se dessas estruturas. Aumentos maiores (50.000 e 100.000) mostraram que estas regiões são formadas de estruturas microfibrilares de colágeno nativas (Figura 6a, à esquerda e acima) e por microfibrilas atípicas, cuja característica mais importante é a de estarem recobertas com uma camada de depósito mineral (Figuras 6b e c).

Para o caso das microfibrilas nativas, o valor determinado para o período D (distância entre duas cristas da microfibrila) foi de cerca de 500 Å, estando de acordo com aquele valor de 467 Å determinado por microscopia eletrônica de transmissão em matrizes colagênicas submetidas ao mesmo processo de hidrólise seletiva de grupos carboxamida de Asn e Gln. A largura média determinada para a microfibrila foi de cerca de 100 Å e o início de deposição de fase mineral já pode ser observado numa das extremidades deste conjunto de microfibrilas nativas (Figura 6a, à direita e abaixo).

As microfibrilas mineralizadas são caracterizadas pela presença de depósitos minerais na forma de cintas e de dois tipos distintos (Figura 6b). O primeiro tipo apresenta um diâmetro médio de cerca de 130 Å, com a fase mineral distribuída sobre a microfibrila em forma de uma cinta em espiral, aparentemente contínua, e com regularidade no seu comprimento de 560 Å, valor próximo àquela determinado para o período D da microfibrila<sup>14</sup> (Figura 6a), mostrando que o colágeno aniônico estruturado na sua forma microfibrilar é capaz de orientar a deposição de fase mineral, no caso sais de fosfato de cálcio, dentro de um padrão periódico similar àquela da microfibrila



**Figura 6.** Micrografias de depósitos minerais de fosfato de cálcio sobre uma matriz de colágeno aniônico. (a) MC, microfibrila de colágeno; IM, início de mineralização (50.000x). (b) CH, deposição da fase mineral em forma de cintos helicoidais; CI, depósitos em forma de cintos intercalados (50.000x). (c) DI, depósitos irregulares (100.000x)

nativa. A similaridade entre estes resultados e aqueles observados para a mineralização *in vivo*, é que nos seus estágios iniciais a mineralização também ocorre na forma de cintas, aparentemente restritas ao período D, cujo comprimento de 670 Å é ligeiramente maior quando comparado com aquele da microfibrila nativa, que é de 640 Å<sup>25,14</sup>.

O segundo tipo de depósito na forma de cinta é na realidade uma continuação da deposição de fase mineral sobre aquela já descrita, apresentando um diâmetro médio de cerca de 170 Å (Figura 6b), exceto que, diferentemente da estrutura helicoidal contínua observada para o primeiro tipo, os depósitos em forma de cintas que apresentam um comprimento médio de 880 Å (cerca de 2D), são intercalados com espaços em baixo relevo com cerca de 240 Å (aproximadamente o valor de um “Overlap”). Resultados de EDX para esta região (Figura 6b) mostram uma relação Ca/P de 1,36, sugerindo que os depósitos minerais nas fibras estão na forma de octafosfato de cálcio.

Estas estruturas, num estágio posterior de mineralização são caracterizadas pela presença de formações esféricas com diâmetros variáveis entre 870 e 1200 Å (Figura 6b), que evoluem para uma forma mineralizada mais complexa (Figura 6c), caracterizada pela presença de depósitos minerais de forma irregular, mas que ainda guardam algum tipo de padrão estrutural.

## Conclusão

Apesar da heterogeneidade apresentada pela preparação como um todo, os resultados acima mostraram que o colágeno aniônico, apenas por si e na sua forma de estrutura microfibrilar e na ausência de qualquer componente biológico, é capaz não apenas de servir como matriz suporte para a deposição de sais

de fosfato, mas também de orientar esta deposição numa forma diretamente relacionada com a sua estrutura periódica, fato este que potencialmente poderia ser, em princípio, utilizada para a deposição de outras fases minerais para obtenção de novos materiais. Apesar de existirem similaridades químicas e morfológicas entre o material descrito neste trabalho com aquele dos estágios iniciais da formação do tecido ósseo<sup>25-28</sup>, no processo de calcificação *in vivo*, esses resultados são ainda preliminares e trabalhos na direção da obtenção de compósitos mais puros estão em andamento, para que o mesmo possa ser submetido a outros tipos de técnicas principalmente difração de raios-X e microscopia de transmissão eletrônica.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Ezer Biazin e Glauco D. Broch pela assistência técnica prestada a este trabalho. Este trabalho foi financiado pela PADCT/CNPq, contrato nº 620.228/91 e 620.001-96.8/FNM e dentro do projeto CYTED “OBTENCION Y CARACTERIZACION DE BIOMATERIALES DE COMPUESTOS COM CARGA DE HIDROXIA-PATITO”, desenvolvido em colaboração com Instituto de Ciência de Materiales de Barcelona, dentro do programa “Programa Ibero Americano de Ciência e Tecnologia para el Desarrollo”.

## Referências Bibliográficas

1. Mark, J. E.; Calvert, P. D. - Mater. Sci. Engineering, CI, p.159-174 (1994).
2. Calvert, P. - Mater. Sci. Engineering, CI, p.69-74 (1994).

3. Glimcher, M.J., *Biomaterials*, v. 11, p.7-10 (1990).
4. Mann, S., Webb, J. e Willians, R.J.P. - "Biom mineralization: Chemical and Biochemical Perspective" 1º ed., VCH Publishers, New York (1989).
5. Hench, L.L. - *Amer. Cer. Soc. Bull.*, v.72, nº 4, p.93-97 (1993).
6. Katz, E.P., Watchel, E., Yamauchi, M.; Mechanic, G.L. - *Connect. Tiss. Res.*, v. 21, p. 149-158 (1989).
7. Sissen, B.F.; Walker, J.; Orgel, M. - *J. of Cell. Biochem.* v.52, p.404-409 (1993) .
8. McDonald, F. - *Eur. J.of Orthod.*, v.15, p.175-183 (1993).
9. Goissis, G.; Moriwaki, C.M.E.Y. - "Processo de solubilização de tecido conjuntivo na presença de dimetilsulfóxido e concentração salina variável," BR 9000972 (1990) .
10. Heughbaert, J.C. e Nancollas, G.H. J. - *Phys. Chem.*, v. 88, p. 2478-2485 (1984).
11. Jarcho, M.; Bolen, C.H.; Thomas, M.B.; Bobick, J.; Kay, J.F. e Doremus, R.H. - *J. Mat. Sci.*, p.2027-2035 (1976).
12. Arseanult, A.L. - *Bone Miner.*, v. 6, p. 165-177 (1989).
13. Ramachandran, G. - N. "Treatise on collagen", v.1, London, Academic Press, 1967, p.337-353.
14. Chapman, J.A., Tzaphlidou, M., Meek, K.M., e Kadler, K.E. - *Electron Microsc. Rev.*, v. 3, p.141-182 (1990).
15. Stegemann, H. H. ; Stalder, K. - *Clin. Chim. Acta*, v.18, p.267 (1967).
16. Murphy, J. ; Riley, J. P. - *Anal. Chim. Acta.* v.27 p.31-36 (1962).
17. Vogel, A., I. "Análise Inorgânica Quantitativa", 4.ed., Guanabara Dois, Rio de Janeiro (1982).
18. Fowler, B. O. - *Inorg. Chem.*, v.13, n.1, p.194-207 (1974).
19. Bandekar, J. - *Biochim. Bioph. Acta.* v.1120, p.123-143 (1992).
20. Flandin, F.; Buffevant, C.; Herbage, D. - *Biophys. Acta*, v. 791, p.205-212 (1984).
21. Silvester, M. F.; Yannas, I. V.; Forbes, M. J. - *Tromb. Res.*,v.55, p.135-147 (1989).
22. Ibers, J. A.; Hapmilton, W. C. - eds. "International Tables for X-ray Crystallography", v.1 The Kynoch Press.
23. Driessens, F. C. M.; Boltong, M.G.; Bernuúdez, O.; Planell, J.A.; Ginebra, M.P. e Fernandez, E. - *J. Mat. Sci. Mat. Medic.* v.5, p.164-170 (1994).
24. Rooji, F.J. e Nancollas, G.H. J. - *Dent. Res.*, v. 63, p. 864-893 (1984).
25. White, S.W., David J.S., Miller, A. e Timmins, P.A. - *Nature*,v.299, p. 421 - 425 (1977).
26. Hohling, H.J. Ashton, B.A. - *Cell Tis. Res.*, v. 148, p.11-26 (1970).
27. Maitland, M.E.; Arseanult, A.L. - *Calcif. Tiss. Int.*,v. 48, p. 341-352 (1991).
28. Traub, W., Arad, T. e Weiner, S. - *Connect. tiss. Res.*, v. 28, 99-111 (1992).