

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA
E ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO COM
HIDROXIAPATITA PARA UTILIZAÇÃO EM ODONTOLOGIA.**

CAMPINA GRANDE-PB

2017

Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO COM
HIDROXIAPATITA PARA UTILIZAÇÃO EM ODONTOLOGIA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito final à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.**

Orientador: Prof. Dr. MARCUS VINÍCIUS LIA FOOK

Agência Financiadora: CAPES

CAMPINA GRANDE-PB

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

S725d Sousa, Wladymyr Jefferson Bacalhau de.
Desenvolvimento de membranas de Polihidroxibutirato com
Hidroxiapatita para utilização em Odontologia / Wladymyr Jefferson
Bacalhau de Sousa. – Campina Grande, 2017.
117 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, 2017.

"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".

Referências.

1. Biomateriais. 2. Hidroxiapatita. 3. Regeneração Tecidual Guiada. 4.
Membrana. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Título.

CDU 62:61(043)

VITAE DO CANDIDATO

Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa

- Químico Industrial pela Universidade Estadual de Campina Grande - UEPB (2010).
- Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande (2012).

WLADYMYR JEFFERSON BACALHAU DE SOUSA

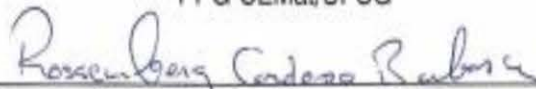
DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO COM
HIDROXIAPATITA PARA UTILIZAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Aprovado em: 16/02/2017



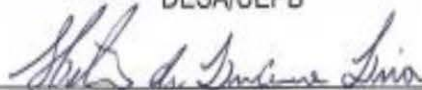
Dr. Marcus Vinícius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UFCG



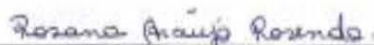
Dr. Rosenberg Cardoso Barbosa
Examinador Externo
UFCG



Dr. Fernando Fernandes Vieira
Examinador Externo
DESA/UEPB



Dr. Helio de Lucena Lira
Examinador Interno
PPG-CEMat/UAEMA/UFCG



Dr.^a Rosana Araújo Rosendo
Examinadora Externa
CSTR/UFCG

A Deus, pela sua infinita bondade e por tornar um sonho em realidade, a meus pais por todo o incentivo, **DEDICO**.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por nunca me deixar sozinho nem desamparado, concedendo força, saúde, paz de espírito e possibilitar que esse sonho de concluir o doutorado se concretizasse.

A meus pais **Lucimar Bacalhau de Sousa** e **Waldir Ferreira de Sousa** pelo amor, carinho e atenção que sempre me deram, também por todo o esforço possível e compreensão por horas longe de casa.

A meu tio **Edson** por todos os seus conselhos juntamente com minha irmã **Wanessa** e meu cunhado **Victor**.

Ao meu avô **Antônio** que infelizmente foi morar com Deus e não pode estar presente nessa fase da minha vida, estará sempre em meu coração.

A minha namorada, amiga e futura esposa **Camila Sonaly** pelo incentivo e sua paciência ímpar que sempre dizia que tudo iria dar certo assim como seus pais **Marcilio** e **Solange**.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook**, por plantar a semente do espírito científico, pela amizade, confiança e paciência depositada em mim e pela contribuição na minha vida acadêmica e pessoal.

Ao **Prof. Dr. Fernando Fernandes Vieira** por ter feito parte da minha vida, onde o mesmo me incentivou a continuar na vida acadêmica.

Aos professores **Prof. Dr. Hélio de Lucena Lira** e **Prof. Dra. Rosana Araújo Rosendo** por fazer parte minha banca e da minha trajetória de doutorado.

A **Maria do Bom Conselho Vitorino** por sua amizade e palavras de incentivo nas horas difíceis além da contribuição nesta tese.

Aos meus amigos **Raphael, Moises, Line, Luciano, Carlos Alberto, Josélia, Silvia e Charlane** pelas palavras de incentivo e orações.

A **Márcio José** meu amigo que tive o prazer de conhecer e trabalhar junto no mestrado e doutorado, que contribuiu bastante para essa tese.

Ao caro amigo **Rosemberg** pelo seu tempo disponibilizado, por sua amizade, pelas orientações e encorajamento em diversos aspectos.

À minha amiga **Alecsandra** faltam palavras para descrever nossa amizade e gratidão a Deus por sua vida.

À Professora **Dr^a. Roberta Pinto** pela sua grande colaboração desde minha graduação e também pela sua amizade.

Aos amigos **Dr. Rodrigo José, Dr. Rodrigo Rezende e Pedro Tardelly** pelas contribuições ao longo desta tese.

Aos amigos que conquistei nesse período e também me ajudaram de forma direta e indiretamente nessa tese **Klaydson, Isabel, Filipe, Thiago Caju, Amanda, Radharani, Kleilton, Rodolfo, Darlyson, André, Renato, Suyana, Tânia, Livia, Francisco Antônio, Samuel, José William, Socorro** e em memória, **Bartolomeu Jorge**.

À **CAPES**, pela bolsa cedida.

Ao grupo de Biomateriais - Certibio e aos funcionários da Engenharia de Materiais, em especial: **Sergio, Márcia e André**.

Por fim, a todos os outros que não aparecem de forma explícita, mas que sempre serão lembrados em meu coração, A MINHA ETERNA GRATIDÃO!

*“Muitos querem aquilo que você tem, mas vão desistir quando
souberem o preço que você pagou”*

Autor Desconhecido.

*“Comece fazendo o que é necessário,
Depois o que é possível,
E, de repente, você estará fazendo o impossível.”*

São Francisco de Assis

*“Eu digo sim, eu continuo
“Porque a chuva não cai
Só sobre mim”*

Dinho Ouro Preto

RESUMO

O avanço da tecnologia dos biomateriais permite desenvolver materiais que auxiliam nos processos reconstrutivos de partes do corpo e incrementam tratamentos e melhoram a qualidade de vida dos seres humanos. O Polihidroxibutirato (PHB) é um polímero biocompatível, biodegradável, muito estudado para aplicações como biomaterial devido às suas propriedades, estas ainda podem ser adequadas para diversas aplicações com a incorporação de cargas inorgânicas, a exemplo da hidroxiapatita (HA) que é biocompatível e bioativa, presente nos tecidos ósseos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo obter biocompósitos de PHB e HA para utilização na regeneração tecidual óssea guiada. As membranas foram obtidas utilizando o método de solubilização (evaporação de solvente) e por fusão (extrusão). As membranas sem cargas foram obtidas em duas concentrações de PHB (5 g/L e 10 g/L). Já os biocompósitos foram obtidos com adição de diferentes concentrações de HA na solução de 10 g/L. As membranas por extrusão foram obtidas sem e com concentrações de HA (1%, 2% e 3%) em relação ao PHB utilizando uma extrusora monorosca. Todas as membranas foram caracterizadas por Microscopia Ótica (MO), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS), Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA), Ensaio Mecânico de Tração, Molhabilidade, Biodegradação *In Vitro* e Citotoxicidade. Por meio das técnicas de MO e MEV, foi possível observar distribuição uniforme da carga com presença de aglomerados e diferença de tonalidade de cinza, indicando as regiões cristalinas e amorfas nas membranas extrudadas. A técnica de DRX mostrou que a incorporação da HA diminuiu o perfil semicristalino dos biocompósitos. Com a técnica de FTIR não foi possível verificar interação entre os constituintes, pois a análise de infravermelho por reflexão total atenuada (ATR) é um método de análise de superfície, possivelmente devido as partículas de HA terem ficado recoberta pela matriz de PHB. Os elementos químicos presentes no PHB e HA assim como nos biocompósitos foram detectados pela técnica de EDS. O ensaio mecânico de tração apresentou uma diminuição do módulo elástico e aumento na deformação com o acréscimo da HA. O TGA indicou a perda de massa em uma única etapa, aumentando a temperatura máxima de degradação com a adição de maiores quantidades de HA. A análise de Molhabilidade indicou hidrofobicidade e ocorreu diminuição quando adicionada a HA. O ensaio de biodegradação demonstrou que a presença da HA aumentou a biodegradação. O ensaio de Citotoxicidade indicou a biocompatibilidade do material. Conclui-se que é possível obter biocompósitos de PHB/HA e o mesmo apresenta potencial para ser utilizado como biomaterial. O biocompósito por evaporação de solvente WBes1HA3 é o melhor a ser utilizado em testes *in vivo* para regeneração tecidual guiada e óssea guiada, devido a sua superfície ser homogênea, apresentar flexibilidade e ser biodegradável.

Palavras - chave: Biomateriais. Hidroxiapatita. Regeneração Tecidual Guiada. Membrana.

ABSTRACT

The advancement of biomaterials technology allows to develop materials that aid in the reconstructive processes of body parts and increase treatments and improve the quality of life of human beings. Polyhydroxybutyrate (PHB) is a biocompatible, biodegradable polymer, widely studied for applications as biomaterial because of its properties, these may still be suitable for various applications with the incorporation of inorganic fillers, such as hydroxyapatite (HA) that is biocompatible and bioactive, Present in bone tissues. Thus, this work aimed to obtain PHB and HA biocomposites for use in guided bone tissue regeneration. The membranes were obtained using the solubilization method (solvent evaporation) and by melting (extrusion). Unfilled membranes were obtained in two concentrations of PHB (5 g / L and 10 g / L). The biocomposites were obtained with the addition of different concentrations of HA in the 10 g / L solution. Extrusion membranes were obtained without and at concentrations of HA (1%, 2% and 3%) relative to PHB using a monosulfate extruder. All the membranes were characterized by Optical Microscopy (OM), Scanning Electron Microscopy (SEM) / X-ray Dispersive Energy (EDS) Spectroscopy, X-ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy Thermogravimetry (TGA), Mechanical Traction Test, Wettability, In Vitro Biodegradation and Cytotoxicity. By means of the MO and MEV techniques, it was possible to observe uniform distribution of the charge with the presence of agglomerates and difference of gray shade, indicating the crystalline and amorphous regions in the extruded membranes. The XRD technique showed that the incorporation of HA decreased the semi-crystalline profile of the biocomposites. With the FTIR technique, it was not possible to verify the interaction between the constituents, since the attenuated total reflection infrared (ATR) analysis is a method of surface analysis, possibly because the HA particles have been covered by the PHB matrix. The chemical elements present in the PHB and HA as well as the biocomposites were detected by the EDS technique. The mechanical tensile test presented a decrease of the elastic modulus and increase in the deformation with the addition of HA. TGA indicated mass loss in a single step, increasing the maximum degradation temperature with the addition of higher amounts of HA. Wettability analysis indicated hydrophilicity and decreased when HA was added. The biodegradation assay demonstrated that the presence of HA increased biodegradation. The Cytotoxicity assay indicated the biocompatibility of the material. It is concluded that it is possible to obtain PHB / HA biocomposites and it has potential to be used as biomaterial. The solvent evaporation biocomposite WBes1HA3 is the best to be used in in vivo tests for guided tissue regeneration and guided bone, due to its homogeneous surface, to be flexible and to be biodegradable.

Keywords: Biomaterials. Hydroxyapatite. Guided Tissue Regeneration. Membrane.

PUBLICAÇÕES

A partir da elaboração do trabalho da **tese de doutorado** intitulada **“DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO COM HIDROXIAPATITA PARA UTILIZAÇÃO EM ODONTOLOGIA”** foi publicado e está sob avaliação as seguintes publicações:

Artigos completos submetidos:

- Amanda Thaisa dos SANTOS; Wladymyr Jefferson B. de SOUSA; Fernanda Menezes de SOUZA; Rossemberg Cardoso BARBOSA. Obtenção de hidroxiapatita (fosfato de cálcio) a partir da casca do ovo de galinha. **Revista Scire**. ISSN 2317-661X Vol. 07 – Num. 01 – Março 2015
- Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa; Rossemberg Cardoso Barbosa; Marcus Vinícius Lia Fook; Pedro Tardelly Diniz Filgueira; Alecsandra Ferreira Tomaz. Membranas de polihidroxibutirato com hidroxiapatita para utilização como biomaterial. Submetido a **Revista Matéria** em 25 de outubro de 2016.

Resumos publicados em anais de congressos:

- Sousa, W.J; Barbosa, R.C; Filgueira, P.T; Silva, B.J; Santos, A.T; Souza, F.M; Ferreira, R.M; Lia Fook, M.V. **Síntese e Caracterização de filmes de PHB pelo método de Solvente Casting**. In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Campina Grande. 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015.
- Wladymyr JBS, Rossemberg CB, Marcus VLF, Bartolomeu JS, Pedro TDF. **Membranas de polihidroxibutirato com hidroxiapatita para utilização como biomaterial**. In: 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016, Foz do Iguaçu, PR, Brasil 13º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - SLABO (9 COLAOB), 2016.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conceito de Engenharia de Tecidos.	23
Figura 2 - Sequência da técnica da engenharia de tecido.	25
Figura 3 - Tipos de células ósseas.	26
Figura 4 - Representação da estrutura interna de um osso longo.	27
Figura 5 - Seção do osso mostrando osso trabecular e cortical.	28
Figura 6 - Esquema ilustrativo da estrutura óssea.	29
Figura 7 - Principais componentes do dente.	32
Figura 8 - Componentes Anatômicos do Periodonto: Gengiva (G), Ligamento Periodontal (PL), Cimento Radicular (RC). O osso alveolar é constituído por dois componentes: Osso Alveolar Propriamente Dito (ABP) e Processo Alveolar (AP). ..	33
Figura 9 - Processo de cicatrização guiada com o uso de membrana.	36
Figura 10 - Polímeros usados como biomateriais.	40
Figura 11 - Estrutura química geral dos Polihidroxialcanoatos.	41
Figura 12 - Biociclo de Polihidroxialcanoatos	42
Figura 13 - Fórmulas estruturais do (a) ácido 3-butanoico e do (b) polímero PHB.	43
Figura 14 - Produção do PHB.	44
Figura 15 - Classificação dos biocompósitos.	52
Figura 16 - Membrana Ideal	53
Figura 17 - Fluxograma simplificado da elaboração das membranas e dos biocompósitos.	63
Figura 18 - Extrusora de membranas.	64
Figura 19 - Fluxograma simplificado da elaboração das membranas e dos biocompósitos.	64
Figura 20 - Micrografia ótica do PHB Pó (WBPó).	72
Figura 21 - Micrografia ótica das membranas WBes5 e WBes10.	73
Figura 22- Micrografia ótica dos biocompósitos feitos por evaporação de solvente. ..	73
Figura 23 - Micrografia ótica dos biocompósitos obtidas pelo método de extrusão. .	74
Figura 24 - Micrografia eletrônica de varredura do pó de Hidroxiapatita.	75
Figura 25 - Micrografia eletônica de varredura das membranas de WBes5 e WBes10.	76
Figura 26 - Micrografia eletônica de varredura dos biocompósitos WBes1.	77

Figura 27 - Micrografia eletônica de varredura das membranas de WBex, WBexHA1, WBexHA2 e WBexHA3 .	78
Figura 28 - Difratoograma de DRX da Hidroxiapatita obtida a partir da casca do ovo.	80
Figura 29 - Difratoograma do WBPó.	81
Figura 30 - Difratoograma da membrana de WBes5 e WBes10	82
Figura 31 - Difratoograma dos biocompósitos por evaporação de solvente.	83
Figura 32 - Difratoograma do WBex e dos biocompósitos	84
Figura 33 - Espectro de FTIR do pó da Hidroxiapatita.	85
Figura 34 - Espectro de FTIR do WBPó (Fonte: Própria).	86
Figura 35 - Espectro de FTIR das membranas de WBes5 e WBes10.	87
Figura 36 - Espectro de FTIR dos biocompósitos por evaporação de solvente.	87
Figura 37 - Espectro de FTIR das membranas de PHBE; PHBEHA1, PHBEHA2 e PHBEHA3.	88
Figura 38 - Resultados do ensaio de termogravimetria da Hidroxiapatita.	89
Figura 39 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBPó.	90
Figura 40- Resultados do ensaio de termogravimetria do WBes10.	90
Figura 41 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBes1HA1.	91
Figura 42 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBes1HA2.	91
Figura 43 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBes1HA3 .	91
Figura 44 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBex .	92
Figura 45 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBexHA1	93
Figura 46 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBexHA2.	93
Figura 47 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBexHA1	93
Figura 48 - Tensão Superficial por Medida de ângulo de contato para os diferentes tipos de membranas e biocompósitos	96
Figura 49 - Viabilidade celular das membranas de PHB.	98

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Algumas propriedades físico-químicas do PHB, PHB-HV, PP e PVC.....	45
Tabela 2 - Fosfatos de cálcio, fórmulas químicas e razões Ca/P [1, 3]......	49
Tabela 3 - Formas das hidroxiapatitas usadas na medicina e na odontologia.	51
Tabela 4 - Denominação das amostras.....	65
Tabela 5 - Identificação da composição química da HA, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	76
Tabela 6 - Identificação da composição química das membranas de WBes5 e WBes10, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).	77
Tabela 7- Identificação da composição química das membranas de WBes1HA1, WBes1HA2 e WBes1HA3, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).	78
Tabela 8 - Composição química das membranas de WBex, WBexHA1, WBexHA2 e WBexHA3, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).	79
Tabela 9 - Parâmetros cristalográficos da hidroxiapatita.....	81
Tabela 10 - Bandas de absorção no FTIR do pó da Hidroxiapatita.....	85
Tabela 11 - Bandas de absorção no FTIR do WBPó.	86
Tabela 12 - Resistência à tração em relação à membrana de PHBE e os biocompósitos.	95
Tabela 13 - Perda de massa percentual das membranas de PHB e dos biocompósitos submetidos a ensaios de biodegradação.	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	Osso Alveolar Propriamente Dito
AP	Processo Alveolar
ATR	Reflexão total atenuada
CCT	Centro de Ciências e Tecnologia
DEM	Departamento de Engenharia de Materiais
DRX	Difração de Raios X
EDS	Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X
FTIR	Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier
h	Hora
HA	Hidroxiapatita
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscópio Ótico
MTT	Brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
PHA	Poli (hidroxialcanoato)
PHB	Polihidroxibutirato
PHBV	Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PL	Ligamento Periodontal
PP	Poli (propileno)
PVC	Poli (cloreto de vinila)
RC	Cimento Radicular
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
SBF	Solução de Fluido Corporal
TG	Transição Vítrea
TGA	Termogravimetria
UAEMa	Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande

LISTA DE SÍMBOLOS

C	Carbono
Ca	Cálcio
C=O	Cetona
g	Gramas
g/l	Gramas por litro
H	Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
L	Litro
m/v	Massa/volume
N	Newton
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
OH	Hidroxila
°C	Graus Celsius
P	Fósforo
Rpm	Rotação por minuto
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Engenharia de Tecidos	23
2.2 Osso.....	25
2.3 Estrutura Óssea	28
2.4 Regeneração Óssea	30
2.5 Dente	31
2.5.1 Periodonto	33
2.5.1.1 Periodonto de Proteção	34
2.5.1.2 Periodonto de Sustentação	34
2.6 Regeneração Tecidual Guiada	35
2.7 Regeneração Óssea Guiada.....	36
2.8 Biomateriais	37
2.9 Biomateriais Poliméricos.....	38
2.10 Polihidroxicanoatos (PHA'S)	40
2.11 Polihidroxibutirato (PHB).....	43
2.12 Biomateriais Cerâmicos	46
2.13 Casca de Ovo	47
2.14 Fosfato de Cálcio	48
2.14.1 Hidroxiapatita.....	49
2.15 Biocompósitos.....	51
2.16 Biocompósito ideal para RTG e ROG (Membrana).....	52
2.17 Estado da Arte	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
3.1 Local da Pesquisa.....	61
3.2 Materiais	61
3.3 Métodos	61
3.3.1 Hidroxiapatita (HA) obtida através da casca do ovo, pelo método de via úmida.....	61
3.3.2 Obtenção das membranas de PHB pelo método de evaporação de solvente e dos biocompósitos.....	62

3.3.3 Obtenção das membranas de PHB pelo método de fusão e dos biocompósitos.....	63
3.4 Amostras.....	64
3.5 Caracterizações.....	65
3.5.1 Microscopia Ótica (MO).....	66
3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS).....	66
3.5.3 Difração de Raios-X (DRX).....	66
3.5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	67
3.5.5 Termogravimetria (TGA).....	67
3.5.6 Ensaio Mecânico de Tração.....	68
3.5.7 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato.....	69
3.5.8 Biodegradação <i>In Vitro</i>	70
3.6.9 Citotoxicidade.....	70
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1 Microscopia Ótica (MO).....	72
4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/ e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS).....	75
4.3 Difração de Raios X.....	79
4.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	85
4.5 Termogravimetria (TGA).....	89
4.6 Ensaio Mecânico de Tração.....	94
4.7 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato.....	96
4.8 Biodegradação <i>In Vitro</i>	97
4.9 Citotoxicidade.....	98
5 CONCLUSÕES.....	101
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Uma das áreas prioritárias da biotecnologia refere-se ao desenvolvimento de novos biomateriais. Estes materiais podem ser empregados, por um período de tempo indeterminado, como um todo, ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais (Ratner *et al.*, 2005).

Com o passar do tempo os seres vivos envelhecem, e o corpo, como um todo, começa a se desgastar. Embora muitos fatores responsáveis pelo envelhecimento não sejam compreendidos, as consequências estão bastante claras. Algumas enfermidades causam dores, as articulações tornam-se artríticas, os ossos ficam frágeis e quebram, a visão e a audição diminuem e podem ser perdidos, o sistema circulatório mostra sinais de bloqueio, e o coração perde controle do seu ritmo vital de bombeamento ou suas válvulas perdem a capacidade de vedação entre outros problemas. Uma consequência do passar do tempo é que cerca de 2 a 3 milhões de partes artificiais ou protéticas são implantadas em indivíduos nos Estados Unidos a cada ano. O uso de pinos, placas e parafusos de fixação de fraturas chega a 1,5 milhões de procedimentos anuais só nos Estados Unidos, onde se estima que sejam realizadas mais de quinhentas mil cirurgias anuais de substituição das articulações de quadril e de joelho (Hench e Wilson, 2012; Oréfice, Pereira e Mansur, 2012).

Existe uma busca por produtos para implantes com características cada vez mais variadas em termos de composição, função e estrutura. O desenvolvimento de novos materiais ou adequação dos já existentes, dentro deste contexto, é dirigido por produtos que possam não só aumentar e/ou manter a qualidade de vida, mas que também reduzam os custos do atendimento médico, seja por redução de complicações, diminuição da necessidade de revisões ou do período de estadia hospitalar, mantendo um alto desempenho (Klein, Fredel e Wendhausen, 2015).

Trauma, contaminações, anormalidades de desenvolvimento, ressecções oncológicas e perda fisiológica de massa óssea podem ocasionar falhas ósseas duradouras, as quais, eventualmente, perdem a capacidade de se regenerar. Na região bucomaxilofacial, a reabsorção severa da mandíbula e maxila associada à perda dos dentes pode levar a defeitos anatômicos, comprometendo a função e a estética e, em muitos casos inviabiliza a colocação de um implante dentário (Lindhe,

Lang e Karring, 2010). Devido à sua habilidade de decomposição e reabsorção, o polihidroxibutirato (PHB) é um candidato para a utilização de matrizes biodegradável.

O PHB, é de obtenção relativamente fácil, apresenta um conjunto de propriedades, tais como: tensão de ruptura; temperatura de transição vítrea; densidade e cristalinidade, semelhantes às características de outros termoplásticos já comercializados como o polipropileno (PP) e o poli (cloreto de vinila) (PVC) (Coutinho *et al.*, 2004). Além dessas propriedades serem semelhantes a estes polímeros de origem petroquímica, que vem contemplando atualmente as necessidades do mercado, o PHB apresenta um grande diferencial, a biodegradabilidade, que o torna ainda mais atraente, do ponto de vista tecnológico e ambiental (Steinbüchel e Fuchtenbusch, 1998). As propriedades mecânicas do PHB são mais próximas às propriedades do osso, comparadas aos metais, o que reduz o risco de falha/fratura nos pontos de concentração de tensão no tecido ósseo (Oréfice, Pereira e Mansur, 2012; Oliveira, 2013).

O PHB pode ser utilizado na regeneração tecidual guiada (RTG), que consiste na colocação de uma barreira (membrana) que separa, temporariamente, o epitélio gengival das estruturas de suporte dos dentes. Assim, a área a ser reparada é repovoada por células presentes no ligamento periodontal responsáveis pela regeneração do aparato de sustentação: osso, cimento e ligamento periodontal e na regeneração óssea guiada (ROG) quando existe a necessidade de enxerto ósseo ao redor de implantes ou rebordo desdentado. Nesta técnica, a membrana também é colocada com a intenção de excluir o tecido gengival e, ainda, estabilizar o material enxertado (Sakamoto, 2013).

As propriedades do PHB ainda podem ser melhoradas ou potencializadas com a adição de cargas inorgânicas bioativas como a hidroxiapatita (HA), que é um fosfato de cálcio semelhante ao encontrado nos ossos. Isso, além de melhorar as propriedades mecânicas do biomaterial, pode acelerar o processo de regeneração óssea e, conseqüentemente, diminuir o tempo de recuperação do paciente. Os fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos que já são utilizados como biomateriais em reposição e regeneração óssea, pelo fato de apresentarem biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade e também permitem a proliferação de células ósseas, proteínas e colágeno em suas superfícies, possibilitando desta forma a regeneração tecidual (Aparecida, 2007).

O fosfato de cálcio, na forma de hidroxiapatita, razão Ca/P igual a 1,67, é o principal componente presente na fase mineral dos ossos e é, sem dúvida, o mais estudado e o mais utilizado para finalidades clínicas (Oréfice, Pereira e Mansur, 2012).

Oliveira (2005) e Wang *et al.* (2005) demonstraram que a HA e o PHB são sinergicamente compatíveis, com grande afinidade entre as fases e boa adesão deste polímero aos grupamentos de HA, e concluíram que o PHB é eficiente como matriz para esta cerâmica.

Este trabalho teve como propósito desenvolver e caracterizar o PHB, a HA e o biocompósito obtido a partir desses dois materiais, visto que não foram observados relatos na literatura sobre a formação desse biocompósito pelos métodos de evaporação de solvente e extrusão, para aplicação em regeneração óssea guiada e tecidual guiada respectivamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos é uma especialidade da engenharia biomédica, que aplica os princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e danificados de mamíferos e o desenvolvimento de substitutos para restaurar, manter ou melhorar a função tecidual (Palsson e Bhatia, 2004). A Figura 1 ilustra o conceito de engenharia de tecidos ilustrado.

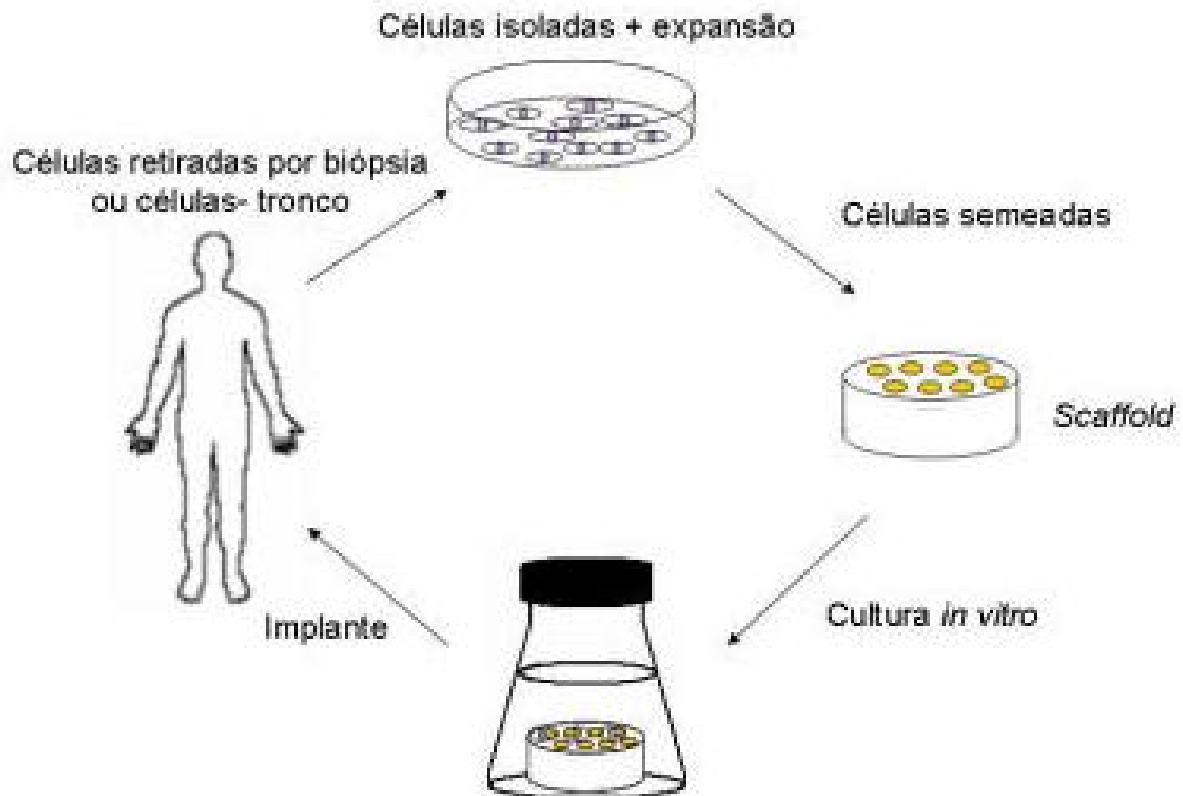


Figura 1 - Conceito de Engenharia de Tecidos (Adaptada de Stock e Vacanti, 2001).

A engenharia de tecidos consiste na utilização de biomateriais como matrizes para dar suporte a culturas de células de maneira a desenvolver tecidos vivos. Um biomaterial provê as bases para o tecido em crescimento, promovendo o reparo, a proliferação e a regeneração do tecido natural, reconstruindo e substituindo tecidos danificados. Assim, tecidos podem ser reparados a partir de culturas realizadas das

próprias células do paciente, eventualmente sem deixar resíduos do material artificial pela utilização de materiais biodegradáveis. Desta maneira, respostas celulares que normalmente só ocorrem naturalmente, podem ser induzidas, acelerando os processos de cura e/ou reabilitação (Langer e Tirreli, 2004).

A diversidade de respostas celulares a diferentes materiais evidencia a capacidade das células de discriminar quimicamente o suporte, de se adaptar a ele, e de aderir ou não à sua superfície (Anselme, 2000).

Dentre os inúmeros requisitos que devem ser satisfeitos para que os materiais sejam aplicados como matrizes na engenharia de tecidos incluem-se:

- (i) estrutura tridimensional com alta porosidade de macroporos (diâmetros da ordem de 100 μm) interconectados para que haja migração celular e nutrição em todo o material;
- (ii) composições biodegradáveis ou reabsorvíveis, com taxas de degradação e reabsorção controladas, compatíveis com o crescimento da célula/tecido *in vitro* ou *in vivo*;
- (iii) superfície bioativa para promover adesão, proliferação e diferenciação celular;
- (iv) propriedades mecânicas adequadas às condições fisiológicas e ao tecido substituído, assim como os tecidos vizinhos;
- (iv) boa distribuição espacial e uniformidade de estrutura para promover ancoramento homogêneo de células e;
- (v) ser facilmente processado em grande variedade de formas e tamanhos (Buckley e O`Kelly, 2004).

O material deve fornecer um meio para carrear células, fatores de crescimento e outras biomoléculas (Reis e Román, 2005; Gough, 2007) e a vantagem da engenharia de tecidos é o número reduzido de operações, resultando num curto período de tempo de recuperação do paciente (Langer, 1999).

A Figura 2 ilustra a técnica da engenharia de tecidos, apresentando etapas da reposição tecidual. As células são retiradas do paciente, expandidas *in vitro*, cultivadas sob um suporte polimérico e após este procedimento, o tecido é gerado e implantado no paciente.

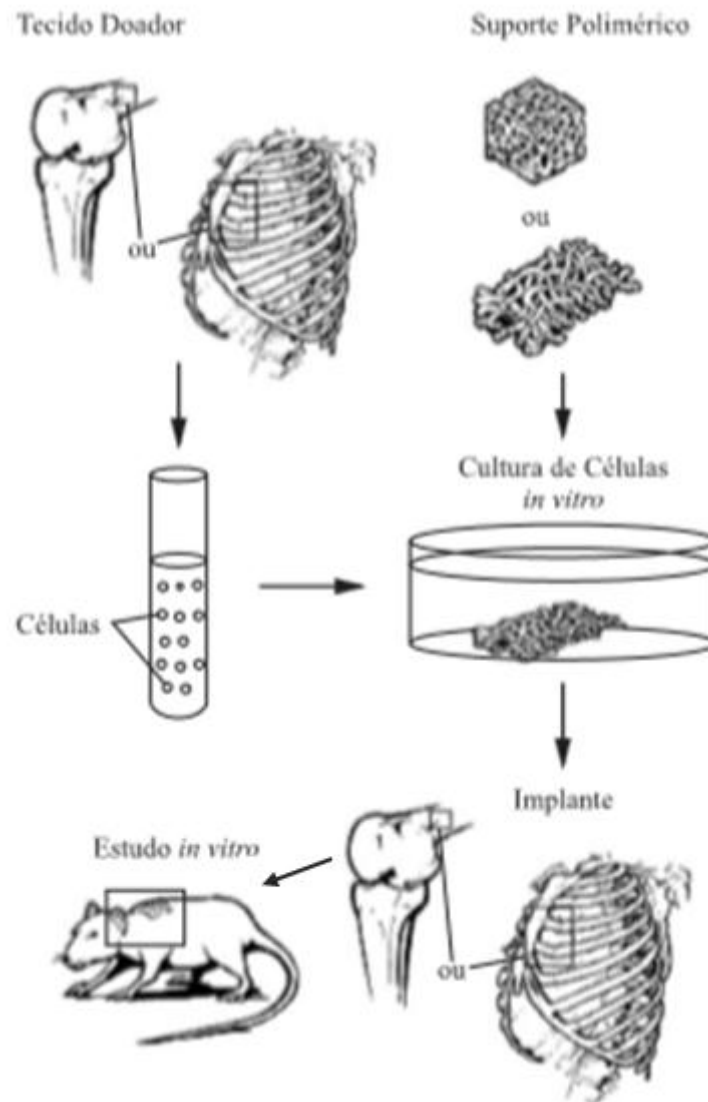


Figura 2 – Sequência da técnica da engenharia de tecido (Freed *et al.*, 1993).

2.2 Osso

O osso é um órgão dinâmico capaz de auto regeneração após lesão, e ocasionalmente, quando a lesão é grave, o osso não se recupera corretamente falhando na função mecânica (Thomson *et al.*, 1995). Ele tem uma estrutura composta por hidroxiapatita, colágeno, pequena quantidade de proteoglicanas, proteínas não colágenas e água. A matriz óssea é constituída de duas partes: a inorgânica, responsável principalmente pela resistência à compressão e rigidez; e a orgânica, que fornece resistência à tração. Essa composição varia de acordo com a espécie, a idade, o sexo, a especificidade do osso e as doenças que podem ou não a afetar (Doblaré, Garcia e Gomez, 2004).

A fração orgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Ela é formada por fibras colágenas (95%) constituídas de colágeno do tipo I e por pequena quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas. As glicoproteínas do osso podem ter alguma participação na mineralização da matriz. A fração inorgânica é constituída por vários íons, sendo o fosfato e o cálcio os mais encontrados. Há também bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades. O cálcio e o fósforo formam cristais que, por análise de difração de raios X, mostraram ter a estrutura próxima da hidroxiapatita, com a seguinte composição: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Os íons da superfície do cristal de hidroxiapatita são hidratados, existindo, portanto, uma camada de água e íons em volta do cristal. Essa camada é denominada capa de hidratação. Ela facilita a troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial. Os cristais da matriz óssea mostram imperfeições e não são exatamente iguais à hidroxiapatita que se encontra nos minerais das rochas. A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. Após a remoção do fosfato de cálcio, os ossos mantêm sua forma intacta, porém tornam-se tão flexíveis quanto os tendões. A destruição da parte orgânica, que é principalmente colágeno, pode ser realizada por incineração, e também deixa o osso com sua forma intacta, porém tão quebradiço que dificilmente pode ser manipulado sem se partir (Turek, 1991; Junqueira e Carneiro, 2004).

Analisando a composição celular dos ossos, identifica-se que há quatro tipos de células ósseas com funções distintas: os osteoblastos, os osteoclastos, as células de revestimento (ou célula osteogênica) e os osteócitos (Doblaré, Garcia e Gomez, 2004). Na Figura 3, está a representação simplificada das células ósseas.

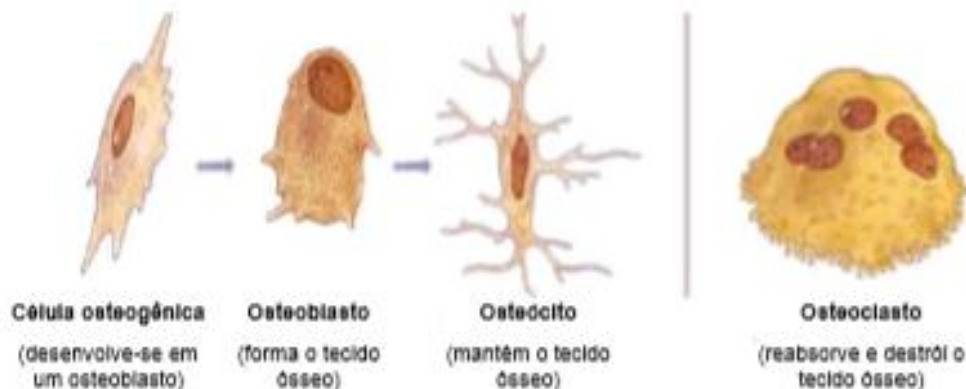


Figura 3 - Tipos de células ósseas (Simões, 2007).

- **Osteoblastos:** são células mesênquimais diferenciadas que produzem osso. São fabricadas na camada do periosteio ou no tecido estroma da medula óssea.
- **Osteoclastos:** Removem massa óssea, desmineralizando com ácido e dissolvendo colágeno com enzimas. Essas células originam-se da medula óssea.
- **Células de revestimento:** São osteoblastos inativos, que não estão alojados em ossos novos. Estas células permanecem sobre a superfície, após a cessação da formação óssea, podendo ser reativadas em resposta ao estímulo químico e / ou mecânico.
- **Osteócitos:** são osteoblastos antigos localizados nas lacunas e se comunicam com as células restantes através dos canalículos.

O esqueleto é dividido anatomicamente em dois tipos de ossos: osso cortical ou compacto e osso trabecular ou esponjoso (Life, 2015). O osso cortical é encontrado nas regiões onde as pressões são altas e o osso esponjoso, onde as pressões são menores, apresentando, todavia, alta rigidez distribuída, típica daqueles sítios onde as cargas mecânicas são mais bem distribuídas (Brown *et al.*, 1999). Na Figura 4 está a representação da estrutura interna de um osso longo.

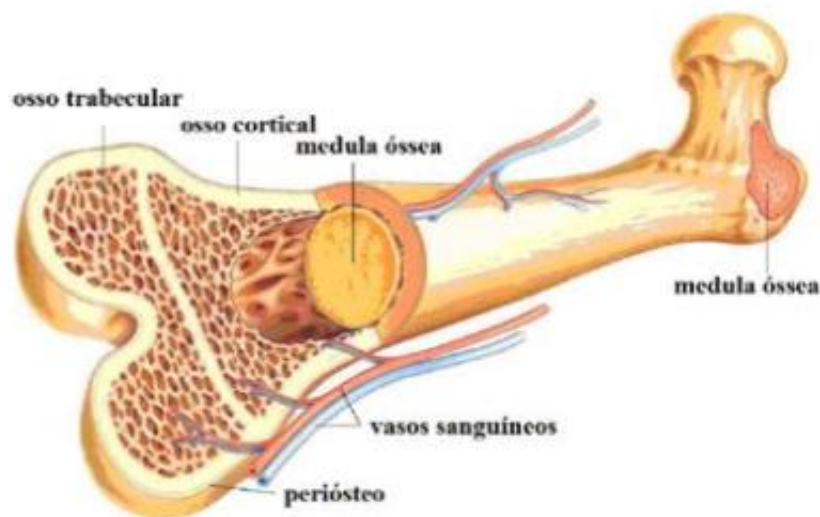


Figura 4 - Representação da estrutura interna de um osso longo (Lúcio, 2008).

Todos os ossos têm suas superfícies externas e internas revestidas por células osteogênicas do tecido conjuntivo que são o periosteio e endosteio respectivamente. Este revestimento é essencial para a manutenção do tecido, pois áreas de reabsorção óssea aparecem nos locais que perderam o revestimento conjuntivo ou a camada de osteoblastos (Dee *et al.*, 1995). A camada mais

superficial do periósteo contém principalmente fibras colágenas e fibroblastos, já a sua camada mais profunda apresenta células osteoprogenitoras, morfologicamente parecidas com os fibroblastos. O endósteo é geralmente constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais Havers e os de Volkmann (Turek, 1991; Junqueira e Carneiro, 2004).

O osso cortical apresenta uma porosidade de 5 a 10% e diferentes tipos de poros; consiste de estruturas cilíndricas conhecidas como osteons ou sistemas Harversianos (Doblaré, Garcia e Gomez, 2004). O osso cortical equivale a cerca de 85% da massa óssea e um terço do volume do esqueleto (Life, 2015). O osso trabecular equivale a cerca de 15% da massa óssea e dois terços do volume total do esqueleto; é formado por trabéculas entrecruzadas de diversas formas e espessuras, e os espaços entre elas contém medula óssea (Turek, 1991; Simões *et al.*, 1995).

A porosidade do osso trabecular é entre 50 e 90% e na Figura 5 é possível observar essa diferença de porosidade.

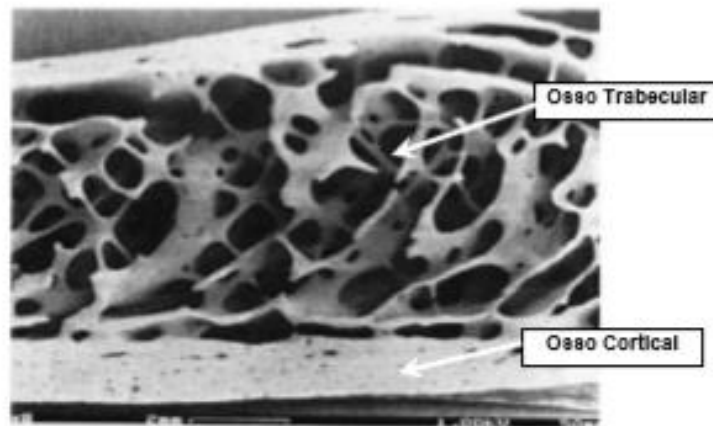


Figura 5 - Seção do osso mostrando osso trabecular e cortical (Doblaré; Garcia e Gomez, 2004).

2.3 Estrutura Óssea

O osso é considerado por si só um órgão, visto que é constituído por diversos tecidos diferentes que atuam em conjunto: tecido ósseo, cartilagem, tecido conjuntivo denso, epitélio, tecido hematopoiético, tecido adiposo e tecido nervoso. O tecido ósseo e o sistema esquelético são responsáveis por muitas funções básicas,

tais como suporte, proteção, armazenamento de minerais, produção de células sanguíneas e armazenamento de energia química. As suas características ao nível da rigidez, elasticidade (moderada), plasticidade (muito limitada) e fragilidade fazem dele um tecido apropriado, tanto para o movimento como para o suporte e para a proteção dos tecidos moles (Lúcio, 2008).

Segundo Rodrigues (2003), o sistema esquelético é constituído na sua maior parte por tecido ósseo, o mais existente tecido do corpo humano que desempenha as seguintes funções no organismo:

- Fornece uma estrutura resistente à gravidade, que atua como protetor das partes mais frágeis e dos órgãos vitais;
- Age como um reservatório extracelular para íons;
- Aloja e protege a medula óssea;
- Proporciona apoio aos músculos esqueléticos.

Assim como a maioria dos materiais biológicos, o tecido ósseo exhibe propriedades estruturais interessantes. Este tecido apresenta resistência à tração similar à do aço e, além disso, é três vezes mais leve e dez vezes mais flexível. Essas propriedades se devem principalmente a sua microestrutura heterogênea. Porém, o tecido ósseo está sob permanentes mudanças em resposta a diferentes sinais, tais como carregamentos externos, influência hormonal, entre outros (Doblaré e García, 2002). A Figura 6 ilustra a estrutura óssea.

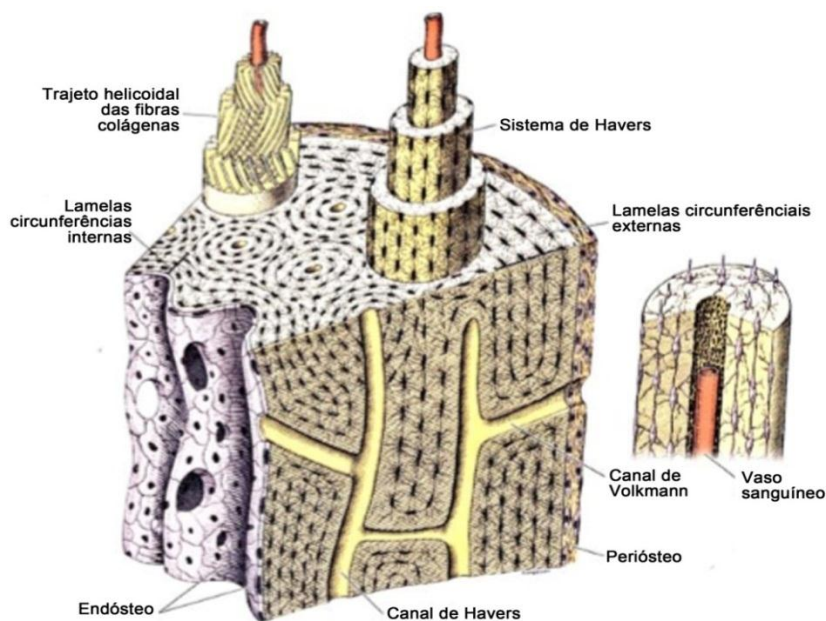


Figura 6 - Esquema ilustrativo da estrutura óssea (Junqueira e Carneiro, 2004).

A formação do tecido ósseo ocorre na forma endocondral e intramembranosa. Na ossificação endocondral ocorre um adensamento de células mesenquimais, que diferenciam-se em células cartilaginosas formando um molde de cartilagem hialina. Na ossificação intramembranosa faz-se diretamente dentro de um tecido mesenquimatoso, ou seja, células progenitoras que diferenciam-se em osteoblastos, que secretam matriz óssea formando uma malha de espículas e trabéculas ósseas (Tem Cate, 1998; Junqueira e Carneiro, 2005).

Independente da ossificação pela qual o osso é formado, o tecido resultante é sempre o mesmo, sendo que histologicamente existem dois tipos de tecidos ósseos: primário e secundário, que possuem a mesma célula apresentando apenas a diferentes orientações das fibrilas do colágeno (Buser, Dahlin e Schenk, 1994).

2.4 Regeneração Óssea

A regeneração óssea não é somente um processo biológico. Ela também depende de fatores elétricos, bioquímicos e mecânicos, que são de grande importância na regeneração e na manutenção do osso vivo (Paschoal *et al.*, 2003). O processo natural de reparo ósseo é suficiente para a consolidação de defeitos ósseos adquiridos, como por exemplo, fraturas, desde que haja os requisitos básicos para esse reparo, como a adaptação das bordas da ferida e a estabilidade do osso. Entretanto, em alguns casos, esses defeitos podem ser de tal magnitude (tumores, fraturas graves, reabsorções ósseas) que pode requerer outros elementos para possibilitar esse reparo. O reparo e a neoformação óssea promovida pelos substitutos ósseos corre de acordo com três princípios osteogênicos: a osteoindução, a osteocondução e a osteostimulação ou osteopromoção (Lind *et al.*, 2000).

A osteoindução é um processo de neoformação óssea a partir da indução por meio de fatores de crescimento, plasma rico em plaquetas entre outros agentes indutores de células osteoprogenitoras no leito receptor. Estes agentes indutores atuam na diferenciação e proliferação de osteoblastos, osteoclastos, e na angiogênese e estes são fatores de extrema importância para o reparo e a remodelação óssea (Urist, Ange e Finerman, 1983; Hisiong e Mooney, 2006). Na osteocondução, o enxerto ou o bioimplante são estruturas de suporte, arcabouço para a neoformação óssea, através dos quais o crescimento de capilares e células

osteoprogenitoras ocorre para o interior do leito ósseo, de permeio, ou através dos mesmos (Boss *et al.*, 1995; Habibovic *et al.*, 2008).

A osteopromoção ou osteostimulação ocorre quando células osteogênicas transplantadas produzem novo sítio no defeito. As células mesenquimais pluripotentes presentes no leito de defeito são estimuladas a se diferenciarem em osteoblastos e a se proliferarem, em seguida com a maturação dos osteoblastos, há formação de matriz óssea que será remineralizada e remodelada para construir o novo osso (Lind *et al.*, 2000).

Nos maxilares está inserido sobre ela os dentes que são tidos como um órgão.

2.5 Dente

O Dente é uma estrutura dura, saliente de coloração esbranquiçada, situada na cavidade bucal e colocados sobre os maxilares, onde se dispõem em fileira, sendo composto basicamente por coroa e raiz. A região de transição entre essas duas estruturas denomina-se colo. A raiz é implantada no interior da cavidade óssea alveolar, abaixo da linha da gengiva, e tem sua extremidade denominada ápice radicular. A coroa dental que se visualiza no interior da cavidade bucal, acima da linha da gengiva, é denominada “coroa clínica”. A soma da extensão da coroa clínica e da parte da coroa que fica abaixo daquela linha é denominada “coroa anatômica”. Ao redor do dente está localizado o periodonto (Pachaly, 2006).

Os dentes são composições fundamentalmente mineralizadas, posicionados na porção inicial do aparelho digestivo, tendo como origem o epitélio da mucosa bucal distribuídos na maxila e na mandíbula, onde se prendem através de articulações semimóveis, desempenhando, entre outras, funções concernentes ao crescimento craniofacial, à mastigação, deglutição, fonação, estética, sustentação e proteção aos tecidos moles (Cantisano, Palhares e Santos, 1987).

O limite nestes órgãos (dente), cuja base é a dentina, são duas porções estrutural, funcional e anatomicamente distintas. Uma, recoberta pelo esmalte, é estritamente funcional e denominada coroa anatômica; a outra, porção radicular protegida pelo cimento, é o elemento responsável pela sustentação dos dentes no osso alveolar, por meio dos ligamentos fibro-elásticos. Limitando coroa e raiz, distinguimos o colo anatômico, caracterizado por uma nítida linha de aspecto

sinuoso (Cantisano, Palhares e Santos, 1987). A Figura 7 ilustra as principais partes do dente.



Figura 7 - Principais componentes do dente (Brotski, 2010).

A origem do esmalte dentário é ectodérmica, já o cemento e dentina são originados do mesoderma. Dos componentes inorgânicos encontrados no dente humano, ganha destaque o cálcio inorgânico, o qual é depositado em forma de fosfato como apatita. Esse é a forma predominante em todo o tecido dentário. A Hidroxiapatita tem a fórmula empírica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Uma pequena proporção de outras formas cristalinas de fosfato de cálcio pode também existir no dente. Fosfato de cálcio amorfo (não cristalino) pode ser encontrado na dentina. No esmalte humano podem ser encontrados também traços de ferro, zinco, cobre e manganês (Vasudevan, Sreekumari e Vaidanathan, 2011).

O colágeno é componente orgânico predominante do dente, que ao seu redor localiza-se o periodonto. Além do colágeno, o dente possui uma matriz extracelular que contém glicoproteínas e glicosaminoglicanas. Glicoproteína é um polímero pequeno com sequência irregular. Glicosaminoglicanas são polímeros longos de proteínas e carboidratos com sequência regular (Vasudevan, Sreekumari e Vaidanathan, 2011).

2.5.1 Periodonto

O periodonto é o conjunto de tecidos integrados pela gengiva, osso alveolar, cimento e ligamento periodontal formando um complexo de desenvolvimento biológico e funcional. É passível de sofrer alterações com a idade e está sujeito a alterações morfológicas e funcionais pela interação com o meio ambiente. A Figura 8 ilustra os componentes anatômicos do periodonto.

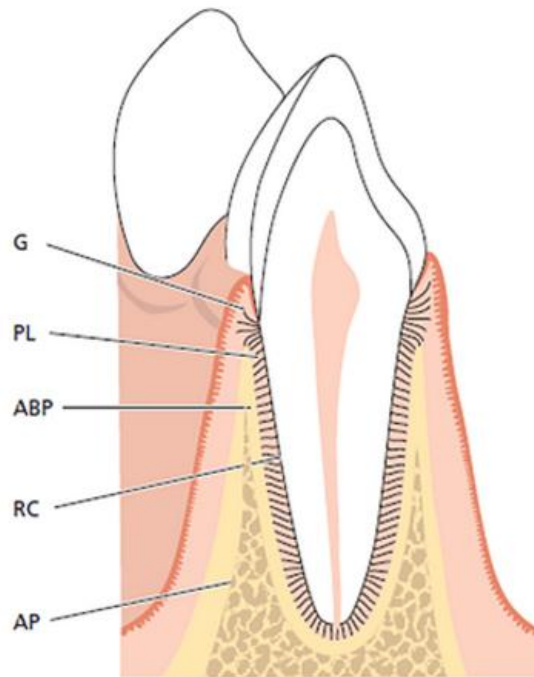


Figura 8 - Componentes Anatômicos do Periodonto: Gengiva (G), Ligamento Periodontal (PL), Cimento Radicular (RC). O osso alveolar é constituído por dois componentes: Osso Alveolar Propriamente Dito (ABP) e Processo Alveolar (AP) (Lindhe, Lang e Karring, 2010).

O periodonto normal é dividido em periodonto de proteção – constituído pela Gengiva; e periodonto de suporte ou sustentação – constituído pelo ligamento periodontal, osso alveolar e cimento radicular. O periodonto de proteção tem a importante função de promover a homeostasia, vedando o meio interno e assim permitindo que o hospedeiro mantenha a saúde periodontal frente às constantes agressões provocadas pela presença da placa bacteriana ou por estímulos físicos. Já o periodonto de suporte tem a função essencial de sustentação dos dentes, bem como uma função sensorial, formativa, nutricional e de inervação (Carranza, 1983; Lindhe, Lang e Karring, 2010).

2.5.1.1 Periodonto de Proteção

A gengiva é a parte da mucosa mastigatória que cobre o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes. Consiste de uma camada epitelial e um tecido conjuntivo subjacente chamado lâmina própria. Anatomicamente, a gengiva é dividida em marginal, inserida e interdentária ou papilar. A gengiva marginal ou gengiva livre constitui-se no bordo terminal da gengiva em torno dos dentes em forma de colar e está separada da gengiva inserida adjacente por uma depressão linear rosa, o sulco gengival livre (Lindhe, Lang e Karring, 2010).

A gengiva inserida é a gengiva localizada firmemente sobre o periósteo, abaixo da crista óssea por meio de fibras do tecido conjuntivo e, portanto, é comparativamente imóvel em relação aos tecidos subjacentes. Localiza-se entre a gengiva marginal livre e a mucosa alveolar, da qual é separada pela linha mucogengival. A gengiva interdentária ocupa a ameia gengival, espaço interproximal situado abaixo da área do contato dentário. Consiste de duas porções, uma vestibular e outra lingual ou palatina – que tem a forma piramidal nas regiões anteriores e a área ou região do col–concaidade formada nas regiões de pré-molares e molares. A sua forma é determinada pelas relações de contato entre os dentes, pela largura da superfície proximal destes e pelo contato da junção cimento-esmalte (Carranza, 1983; Lindhe, Lang e Karring, 2010).

Apesar das variações na histologia, diferenciação e espessura, o principal papel desse tecido é formar uma barreira impedindo a penetração de microrganismos e agentes nocivos em tecidos mais profundos (Fiorellini, Kim e Ishikawa, 2007).

2.5.1.2 Periodonto de Sustentação

O ligamento periodontal é um importante componente do periodonto de sustentação, formado por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado e celular, que circunda as raízes dos dentes e une o cimento radicular à lâmina dura ou ao osso alveolar propriamente dito (Lindhe, Lang e Karring, 2010). O ligamento periodontal tem uma importante função de transmissão e resistência das cargas oclusais ao osso (absorção e neutralização do choque), além das funções formadora, nutricional e sensorial (Carranza, 1983).

O processo alveolar é definido como as estruturas ósseas da maxila e mandíbula que formam e suportam os alvéolos dentários. As paredes dos alvéolos são revestidas por osso compacto (lâmina cribiforme). O osso esponjoso ocupa a maior parte dos septos interdentais e apenas uma pequena extensão nas tábuas ósseas vestibular e lingual. O osso esponjoso contém trabéculas ósseas, cuja arquitetura e tamanho são determinadas, em parte, por forças a que os dentes estão expostos durante a função. Em conjunto com o cimento radicular e o ligamento periodontal, o osso alveolar constitui o aparelho de inserção dos dentes, cuja função principal é distribuir e absorver as forças geradas pela mastigação e outros contatos dentários (Carranza, 1983; Lindhe, Lang e Karring, 2010).

O cimento radicular é um tecido mineralizado, altamente especializado, que recobre, por aposição de camadas, a dentina radicular. Presta-se ainda à inserção das fibras colágenas da inserção conjuntiva e do ligamento periodontal (Lanza, Henriques e Martins, 2003).

A doença periodontal acomete o tecido de suporte do dente e o periodonto e seu agravamento poderá acarretar em perda do elemento dental e até mesmo perda óssea. O tratamento para estas perdas pode ser a utilização de Técnicas de Regeneração Tecidual Guiada ou Regeneração Óssea Guiada (Silva, 2009).

2.6 Regeneração Tecidual Guiada

A RTG foi desenvolvida para a regeneração dos tecidos periodontais perdidos, resultante da doença periodontal inflamatória. Esse método cirúrgico para o tratamento de defeitos ósseos verticais, principalmente, baseia-se no fato de que somente as do ligamento periodontal possuem o potencial para regenerar o aparato de inserção do dente (Nyman *et al*, 1982).

A regeneração tecidual guiada (RTG) é uma técnica de grande impacto na medicina regenerativa. Ela visa ampliar a capacidade natural de regeneração de tecidos que possuem a capacidade de auto renovação limitada, que, uma vez estimulados por sinais específicos, orientam a sua diferenciação em diferentes tipos celulares com funções especializadas (Yannas, 2001).

A RTG estimula a recuperação fisiológica e funcional dos tecidos lesionados do órgão, e pode ser realizada com a aplicação de tecidos artificiais externos, juntamente com células apropriadas, matrizes celularizadas ou combinações de

fatores de crescimento, como forma de potencializar o processo regenerativo (Arruda *et al.*, 2007).

2.7 Regeneração Óssea Guiada

O conceito da Regeneração Óssea Guiada (ROG) foi estabelecido com base no princípio da Regeneração Tecidual Guiada, onde certos tecidos se regeneram quando células com esta capacidade povoam o defeito durante a cicatrização (Cortelli *et al.*, 2005). Assim, a exclusão mecânica do tecido mole permite que células osteogênicas estimulem a formação de tecido ósseo.

A reabilitação bem sucedida com implantes dentários depende de algumas características morfológicas do osso alveolar. A reabsorção óssea em altura e/ ou largura pode ser causada por periodontite, extração dentária ou trauma pelo uso prolongado de próteses removíveis. Este fato pode impedir a instalação de implantes dentários sem que se realize ROG previamente ou durante a colocação dos implantes. Malformações congênitas como a fissura palatina também podem ser tratadas por meio de ROG para posterior instalação de implantes (Le e Woo, 2009).

Na ROG, as membranas atuam como barreiras mecânicas para prevenir que o tecido epitelial migre apicalmente e para permitir que as células do ligamento periodontal formem osso, cemento e insiram fibras colágenas (Goldman, 1992).

A Figura 9 ilustra o processo de regeneração óssea guiada utilizando membranas.

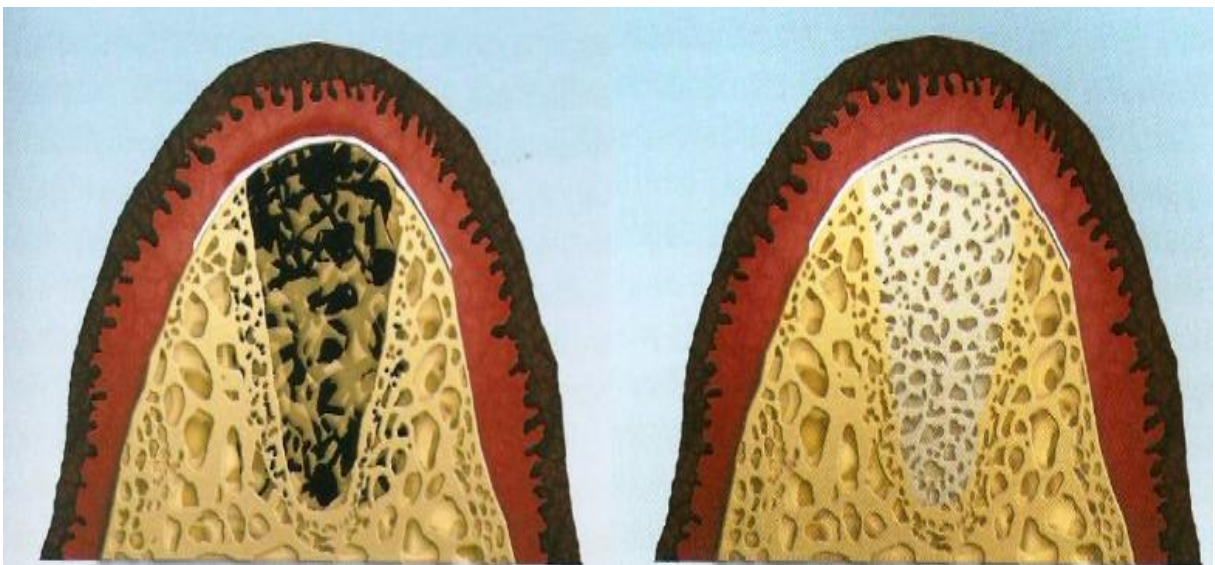


Figura 9 - Processo de cicatrização guiada com o uso de membrana (Cruz, 2006).

Muitos materiais biodegradáveis e não-biodegradáveis têm sido utilizados na confecção das membranas, as quais estão inseridas na classe dos biomateriais.

2.8 Biomateriais

Inicialmente, os biomateriais foram desenvolvidos para que permanecessem inertes no organismo. Sendo assim, os estudos se voltaram para a forma de prevenir ou minimizar as reações teciduais indesejáveis. Os novos materiais são concebidos para que haja uma efetiva interação com os tecidos, provocando respostas fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação celular no sítio de implantação (Hubbell, 1995).

Um biomaterial é uma substância que foi projetada e conformada para que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar, pelo controle das interações com os componentes dos sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, em medicina humana ou veterinária (Williams, 2009). Ele tem como objetivo fundamental melhorar a saúde humana, restaurando a função dos tecidos vivos naturais e órgãos do corpo (Park e Lakes, 2007).

Os requisitos de seleção de biomateriais são baseados principalmente na aplicação a qual se destinam. Para dispositivos de aplicações em tecidos moles, os materiais se propõem a aumentar ou redefinir o tecido, por exemplo: implantes de seios e implantes faciais. Em aplicações ortopédicas e odontológicas, os materiais são componentes de implantes estruturais (próteses de articulações e implantes de raiz de dentes) ou são usados para reparar defeitos ósseos (parafusos, placas e pinos inseridos em osso). Esta seleção do material a ser utilizado deve levar em consideração também as propriedades físicas, químicas e mecânicas do material (Park e Lakes, 2007).

Para que o biomaterial concretize, de forma devida, a sua função biológica, o mesmo deve ser utilizado em íntimo contato com os tecidos do indivíduo e possuir características como: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicabilidade clínica, ausência de riscos transoperatórios e sequelas pós-operatórias mínimas, estabilidade química e biológica, além de resistência mecânica e elástica adequada. Que não seja carcinogênico ou pirogênico (Boss *et al*, 1995; Service, 2000).

A biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial de desempenhar a sua função desejada no que diz respeito a uma terapia médica, sem desencadear quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no receptor ou beneficiário da terapia, mas gerando a mais apropriada resposta benéfica a nível celular ou tecidual em cada situação específica, otimizando o desempenho clínico relevante da terapia (Williams, 2008).

De forma didática, os biomateriais podem ser classificados em três categorias de acordo com o comportamento biológico: Bioinertes: São materiais que desenvolvem mínima resposta do tecido biológico; Bioativos: São materiais que estimulam o crescimento de tecidos a partir de sua superfície e Bioabsorvíveis: São materiais que após a degradação são absorvidos pelo organismo e que neste período induzem a formação de tecido (Park e Lakes, 2007).

A escolha de um material para ser empregado como biomaterial passa basicamente pela apreciação de um conjunto de requisitos que devem ser encontrados. Assim sendo, um material apto a ingressar na classe de biomateriais deve apresentar propriedades coerentes com a função específica do implante. Além disso, o efeito do ambiente orgânico no material (corrosão, degradação) e o efeito do material no organismo são fenômenos que devem ser estudados com extremo cuidado (Oréfice, Pereira e Mansur, 2012).

Dentre os biomateriais encontram-se os poliméricos, que são materiais de características mais próximas aos tecidos, sendo, por conseguinte, utilizados na reparação da pele, tendões, cartilagem, vasos sanguíneos e tecidos mamários bem como na produção de dispositivos implantados em locais diversos do organismo (Silva, 2007).

2.9 Biomateriais Poliméricos

Os biomateriais poliméricos são os materiais com aplicações para saúde, produzidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais (biopolímeros); biodegradáveis ou não. Os biodegradáveis são frequentemente divididos em duas categorias, tendo como base o processo de polimerização: sintéticos ou biológicos (Wessler, 2007).

Os biopolímeros são polímeros naturais tais como colágeno, elastina, celulose, hialurônico, quitina, quitosana e o PHB, que enquadra-se na classe dos

polihidroxialcanoatos. A síntese de biopolímeros envolve reações catalisadas enzimaticamente e reações de polimerização de cadeia (Amaral *et al.*, 2003). Os polímeros naturais têm sido propostos como alternativas aos biomateriais atualmente usados em aplicações biomédicas e uma das vantagens desses polímeros é geralmente o baixo custo, visto a disponibilidade de matéria prima (Dumitri, Vidal e Chornet, 1996).

Os polímeros biodegradáveis constituem uma importante fonte de materiais com grande versatilidade química e elevado potencial em diversas aplicações biomédicas. Suas propriedades podem ser facilmente alteradas por diferentes métodos físicos e químicos. Isto permite a seleção de propriedades importantes como capacidade de absorção de água, cinética de degradação, ou propriedades mecânicas com especificações apropriadas e determinadas aplicações. São muito apropriados como materiais biomédicos devido a sua semelhança estrutural com os componentes do tecido (Kaplan, 1998). Vêm sendo extensivamente pesquisados e utilizados como biomateriais, visto que não precisam ser removidos e não causam efeitos indesejáveis em longo prazo. Existem várias aplicações para estes tipos de biopolímeros, tais como: suturas, dispositivos para liberação de fármacos, fixação de dispositivos ortopédicos, vasos sanguíneos temporários e matriz para engenharia de tecidos. Eles devem ser um meio adequado para o crescimento dos tecidos, guiando a resposta tissular, favorecendo a fixação e proliferação celular e controlando a resposta inflamatória e imunológica (Darea *et al.*, 2009).

Dentre suas principais características apresentam-se as propriedades físico-químicas, sua versatilidade estrutural, que permite adequá-los a cada aplicação específica, geralmente baixo custo de fabricação de dispositivos, a diversidade de polímeros sintéticos e naturais e a relativa facilidade de obtenção. Além de serem funcionalmente ativos, ou seja, cumprirem com sucesso suas funções dentro do corpo, os polímeros usados como biomateriais devem ser biocompatíveis (Ratner *et al.*, 2005; Jalili *et al.*, 2009).

O biomaterial polimérico pode ser desenvolvido de forma a suportar fisicamente e mecanicamente as células, no organismo hospedeiro, dependendo da sua aplicação. Quando utilizado como arcabouços, sua função é proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua reabsorção completa (Barbanti, Zavaglia e Duek, 2005).

Na Figura 10 encontram-se exemplos de polímeros aplicados como biomateriais.

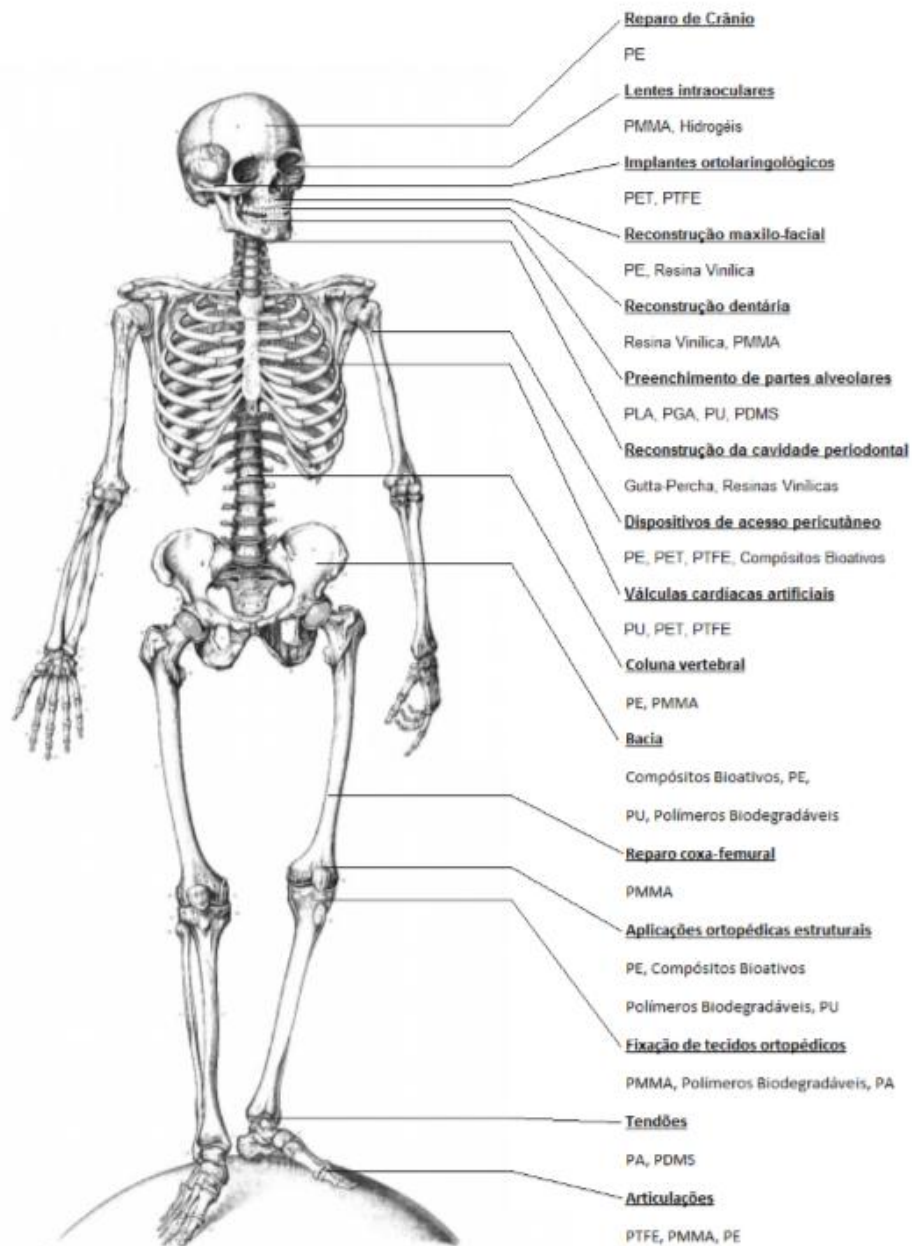


Figura 10 - Polímeros usados como biomateriais (Oréfice, Pereira e Mansur, 2012).

2.10 Polihidroxicanoatos (PHA'S)

Os polihidroxicanoatos são polímeros poliésteres alifáticos compostos por monômeros do tipo ácido (R)-3-hidroxi graxos, biodegradáveis sintetizados por microorganismos a partir de fontes de carbono renováveis (Madison e Huisman,

1999; Tada, 2009;). Os PHA's são sintetizados por vários tipos de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Doi *et al.*, 1988).

A síntese de PHA's por bactérias ocorre em um meio nutritivo quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células, como nitrogênio ou fosfato (Tokiwa e Calabia, 2004). Mais de 150 unidades monoméricas diferentes foram identificadas como constituintes do armazenamento de PHA's. Isto cria a possibilidade de obter uma extensa variedade de polímeros de diferentes propriedades (Gomes e Bueno, 1997).

Os PHAs são termoplásticos biodegradáveis, insolúveis em água, enantioméricos puros, não tóxicos, biocompatíveis, piezoelétricos e apresentam alto índice de polimerização. De acordo com essas características, esses biopolímeros podem ser aplicados em diferentes áreas (Hocking e Marchessault, 1994). A biodegradabilidade e a biocompatibilidade são as principais propriedades apresentadas pelos PHA's e que os diferencia dos demais plásticos sintéticos obtidos da indústria petroquímica. Esses polímeros podem apresentar-se desde rígidos altamente cristalinos a dúcteis (Tada, 2009). A fórmula estrutural geral dos PHA's está representada na Figura 11.

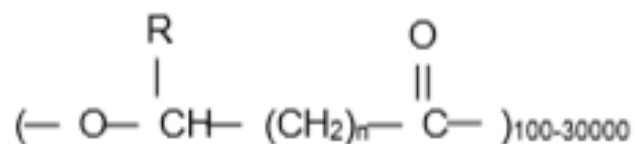


Figura 11 - Estrutura química geral dos Polihidroxicanoatos (Ojumu, Yu e Solomon, 2004).

Devido sua biodegradabilidade, os PHA's podem ser utilizados na liberação controlada de fármacos, hormônios, inseticidas e herbicidas. Em virtude de sua biocompatibilidade, podem ser empregados no desenvolvimento de materiais osteossintéticos, suturas cirúrgicas e reparos de vasos sanguíneos (Wang, Bakken, 1998).

A Figura 12 representa o biociclo completo de produção e degradação de PHA's. Neste ciclo, através da fotossíntese, as plantas fazem uso da luz solar e convertem dióxido de carbono e água em carboidratos (1-2). Estes na forma de açúcares simples fornecem matéria-prima para a produção de PHA's (3). Um microrganismo específico é utilizado no processo fermentativo para converter carboidratos em polímeros (4). Depois de acumular cerca de 80% de sua massa seca em forma de PHA's, o polímero é purificado (5) e pode ser manufaturado (6).

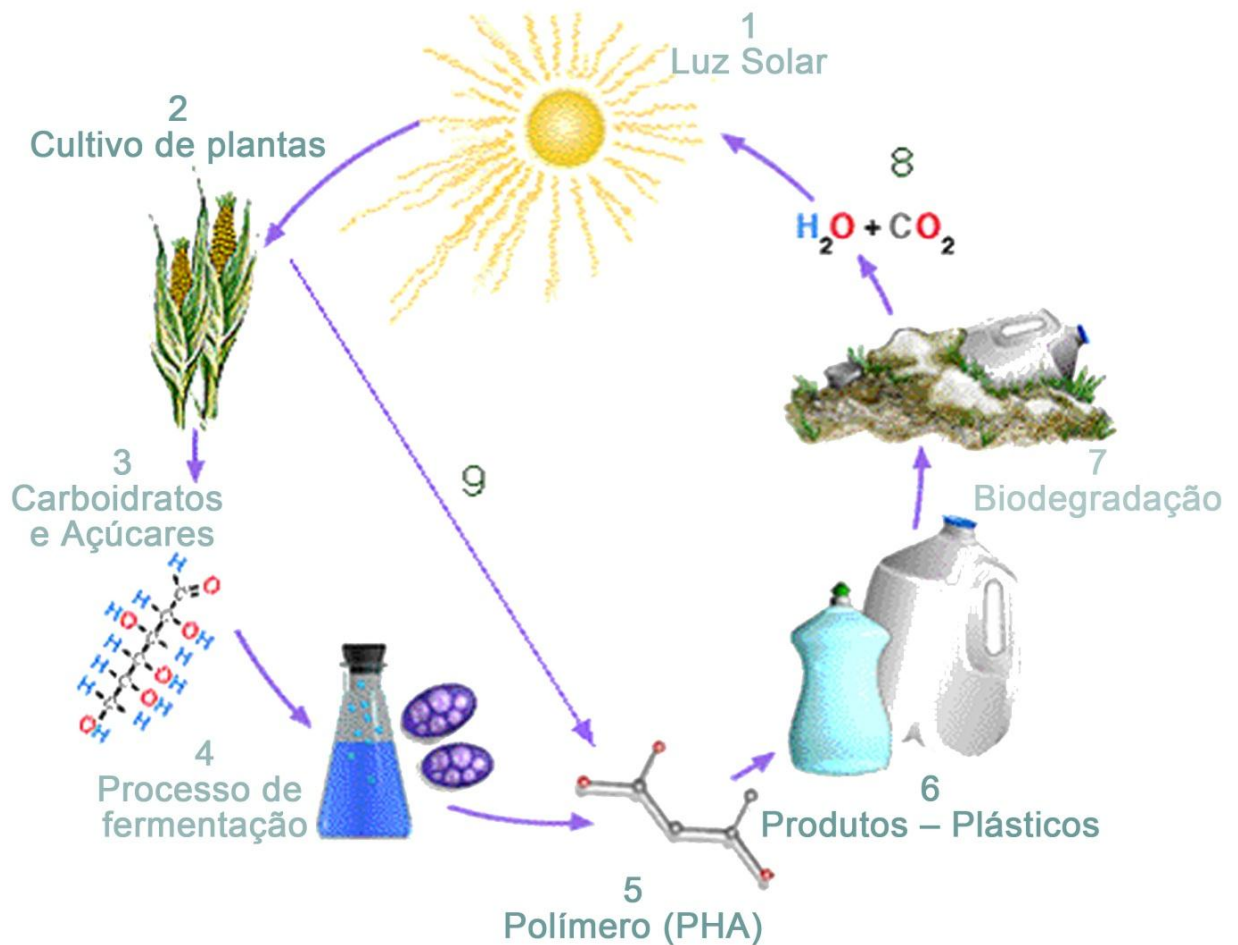


Figura 12 - Biociclo de Polihidroxicanoatos (Marangoni, 2000).

A taxa de degradação de implantes ósseos é fator de extrema importância visto que alguns polímeros podem perder sua resistência mecânica muito antes de atingida adequada consolidação, ou antes do preenchimento adequado do defeito ósseo (An, Woolf e Friedman, 2000). Os PHAs têm uma taxa de degradação mais lenta do que outros polímeros como ácido poliglicólico, por exemplo, podendo ser usados para restauração de grandes defeitos ósseos que demandam maior tempo (Shishatskaya, Khlusov e Volova, 2006).

Após seu uso, PHA's podem ser depositados em ambientes microbianos ativos (7) e a biodegradação deste polímero fornecerá água e gás carbônico (8). Por fim, uma rota direta através de plantas que produzem PHA's pode ser obtida (9). (Marangoni, 2000).

Dentre os PHA's apresentam como polímeros mais pesquisados o poli(3-hidroxiбутirato) - PHB e o copolímero poli(3-hidroxiбутirato-co-3-hidroxiуalerato) -

PHBV. Estes poliésteres de origem natural possuem características semelhantes às dos polímeros termoplásticos derivados do petróleo, o que possibilitaria a substituição desses em diversas aplicações (Duarte, 2004).

2.11 Polihidroxibutirato (PHB)

Dentro da família dos PHAs, o polihidroxibutirato poli(3-hidroxibutirato) (com o grupo alquila R=CH₃) é um poliéster termoplástico biodegradável que pertence à classe dos polihidroxialcanoatos. Este polímero é sintetizado por microorganismos a partir de materiais renováveis como açúcares ou outra fonte de carbono e apresenta propriedades similares às dos plásticos sintéticos (Casarin, 2010). As fórmulas estruturais do monômero ácido 3-butanóico e do polímero PHB estão representadas na Figura 13.

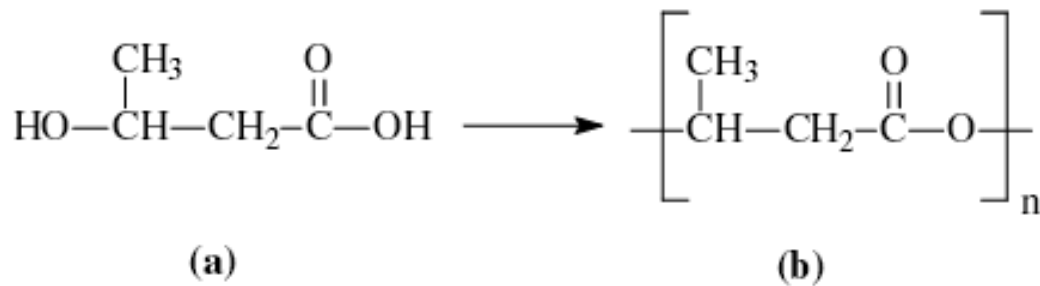


Figura 13 - Fórmulas estruturais do (a) ácido 3-butanóico e do (b) polímero PHB (Bucci, 2003).

O PHB se apresenta como um pó branco amarelado com alto grau de pureza, sendo completamente biodegradável e renovável, com decomposição final em água e dióxido de carbono pela ação de microorganismos em ambientes naturais. No estado sólido é um material semicristalino que apresenta uma fase cristalina e uma fase amorfa. O grau de cristalinidade presente em filmes de PHB cristalizados a partir do estado fundido varia entre 60 e 80% (Coutinho, 2004; Casarin, 2010).

Uma das vantagens desse polímero é a sua produção que é de origem de fontes renováveis, tal qual a cana-de-açúcar, além de ser completamente biodegradável, produzido por processos que utilizam uma tecnologia limpa (Biocycle, 2015). Na Figura 14, temos o fluxograma do processo de produção do PHB.

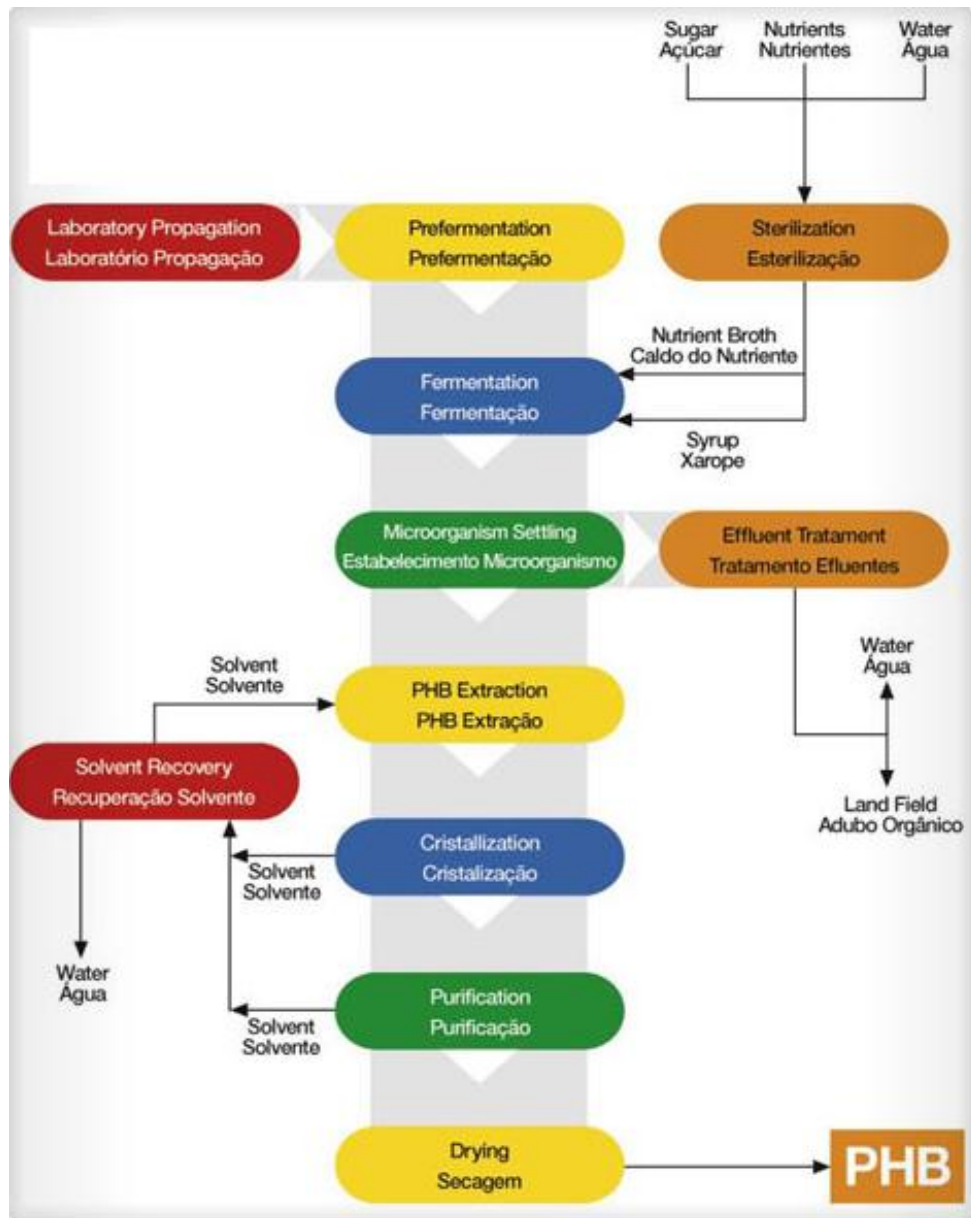


Figura 14 - Produção do PHB (Biocycle, 2015).

O PHB é um dos polímeros biodegradáveis mais pesquisados visando a substituição dos plásticos convencionais, quando descartados são insolúveis em água entretanto podem ser degradados por uma variedade de microrganismos e são solúveis em alguns solventes polares como o clorofórmico (Jendrosseck, Schirmer e Schlegel, 1996). Apresenta estrutura muito regular, é semicristalino e quebradiço. O seu grau de cristalização aumenta muito após o seu termo processamento devido à baixa temperatura de cristalização. Diante disto, torna-se imprescindível à otimização de seu processamento, que tem limitações térmicas para torná-lo competitivo, pois ele pode sofrer degradação, em temperaturas próximas ao seu ponto de fusão (Quental, 2004).

A degradação do polímero ocorre primeiramente na fase amorfa e, subsequentemente, na fase cristalina. A taxa de degradação é influenciada pelo grau de cristalinidade do material assim como sua morfologia. O tamanho dos esferulitos influencia diretamente as propriedades mecânicas do polímero, de maneira que quanto maiores essas estruturas, mais quebradiço o material; assim como influencia também a taxa de degradação do polímero. O número de esferulitos e o seu tamanho dependem da temperatura de cristalização; grandes estruturas são formadas em temperaturas próximas de sua temperatura de transição vítrea (T_g), enquanto uma grande quantidade de pequenos esferulitos é formada em temperaturas mais baixas (Almeida, 2005).

As propriedades mecânicas do PHB podem ser melhoradas, de diversas formas, entre elas adição de plastificantes, lubrificantes, agentes de nucleação, misturando o PHB com outros polímeros ou cerâmicas. Adicionando agentes de nucleação ao PHB, o número de pequenos esferulitos cresce, diminuindo a cristalização secundária, o que torna o PHB menos quebradiço. Com a adição de certos plastificantes, aumenta-se o movimento molecular, conseqüentemente, diminui-se a temperatura de transição vítrea (Almeida, 2005).

Existem várias aplicações do PHB na área médica dentre elas fios de sutura, moldes para engenharia de tecidos, próteses ósseas (Coutinho *et al.*, 2004) e matriz para liberação controlada de fármacos (Pradela, 2006).

Na Tabela 1, são listadas algumas propriedades físico-químicas e mecânicas em comparação com as propriedades do copolímero PHB-HV, do Polipropileno (PP) e do Policloreto de Vinila (PVC).

Tabela 1 - Algumas propriedades físico-químicas do PHB, PHB-HV, PP e PVC.

Propriedades	PHB	PHB-HV	PP	PVC
Temperatura de Fusão (T_m) °C	175	157-102	176	-
Cristalinidade (%)	80	69-39	70	-
Temperatura de Transição Vítrea (T_g) °C	0 a 5	2 a (-8)	(-10)	84
Densidade (g/cm³)	1,25	1,2	0,905	1,4
Tensão de ruptura (MPa)	40	36-22	38	51
Alongamento de ruptura (%)	4	-	> 250	18,2

Fonte: Almeida (2005)

Suas características mais importantes para utilização com biomaterial são a biocompatibilidade, sua lenta biodegradação e propriedades mecânicas (Knowles *et al.*, 1992; Boeree *et al.*, 1993; Galego *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que a resistência à compressão do PHB é muito semelhante à do osso humano, sugerindo estudos voltados para sua utilização em ortopedia (Duarte *et al.*, 2004).

Quando implantado num organismo, o PHB é biodegradável e pode ser absorvido (Liu e Wang, 2006). Acredita-se que o PHB degrade em estágios *in vivo* iniciando por quebra hidrolítica não específica das ligações ésteres. Isso resulta na formação de D,Lβ-hidroxiacetato (HB), normalmente presente no sangue e tecidos, convertido a acetoacetato. Este entra no ciclo do ácido tricarboxílico (Ciclo de Krebs) e é excretado na forma de CO₂ e H₂O (An, Woolf e Friedman, 2000; Weiler *et al.*, 2000; Volova *et al.*, 2003). Estudo recente, *in vitro*, relata que o PHB não interferiu na progressão do ciclo celular e mais, ainda inibiu a morte celular apoptótica e necrótica (Cheng *et al.*, 2006).

2.12 Biomateriais Cerâmicos

Biomateriais cerâmicos são compostos biocompatíveis, inorgânicos, tipicamente duros, frágeis, com altas temperaturas de fusão, baixa condutibilidade elétrica e térmica e boa estabilidade química. Estes materiais têm uma ampla faixa de aplicações. Na área médica e odontológica tem se intensificado o seu uso na reparação da perda do tecido ósseo (Oréfice, Pereira e Mansur, 2012).

A utilização de biomateriais para substituir ou reparar a perda do tecido ósseo tem sido uma prática comum há décadas. Os biomateriais cerâmicos podem ser tanto sintéticos quanto naturais e apresentam vantagens na utilização em substituição ao tecido ósseo por ser estruturalmente semelhantes ao componente inorgânico do osso, biocompatíveis, osteocondutores, não possuem proteínas em sua composição, o que proporciona ausência de resposta imunológica, diminuindo assim o risco de rejeição pelo organismo, além de possuírem um alto tempo de degradação *in vivo* (Burg, Porter e Kellam, 2000), (Abukawa *et al.*, 2006; Chow, 2009).

As biocerâmicas podem ser utilizadas nas formas densa ou porosa dependendo da aplicação (Daculsi e Passuti, 1990). No entanto, o aumento da porosidade poderá diminuir a resistência mecânica do material isoladamente e a

existência de poros com dimensões adequadas favorecem o crescimento de tecidos através deles, fazendo com que haja um forte entrelaçamento do tecido com o biomaterial (Kawashi *et al.*, 2000). Estes satisfazem necessidades tão diversas quanto: baixos coeficientes de atrito para a lubrificação de próteses articulares, superfícies de válvulas de coração que evitam coagulação do sangue, materiais que estimulem o crescimento ósseo e aqueles que podem prender espécies radioativas para tratamentos terapêuticos e podem ser encontrados na forma de microesferas, camadas ou coberturas finas em implantes metálicos, redes porosas, compostos com componentes poliméricos (compósitos). Materiais que podem ser classificados como biocerâmicas incluem alumina, zircônia, fosfatos de cálcio, vidros ou vidros cerâmicos à base de sílica e carbonos pirolíticos (Azevedo *et al.*, 2007). As biocerâmicas podem ser sintetizadas a partir de fontes naturais tais como as cascas de ovo.

2.13 Casca de Ovo

A casca de ovo é formada por carbonato de cálcio, na forma de calcita, matéria orgânica e água. O constituinte em maior proporção é o carbonato, que ocorre na forma de calcita, um cristal hexagonal com baixa solubilidade em água, com cerca de 13 mg/L cuja função é atribuir dureza e resistência às cascas, protegendo o ovo contra adversidades externas (Neves, 1998; Veiga, Mello, Beque, 2013).

Esta casca é uma rica fonte de sais minerais que serve como base para desenvolvimento de produtos na indústria cosmética, biocerâmicas, suplementos alimentares, fertilizantes, implantes ósseos e dentários e como agentes anti-tártaro em cremes dentais que, dependendo da sua aplicação, pode ser enquadrada na chamada classe de Biomateriais (Murakami, 2006). Trata-se de um composto biocerâmico, cuja função é proteger o conteúdo do ovo e garantir o cálcio necessário à formação do embrião; é composta por várias camadas porosas, permeável à água e aos gases, permitindo assim a respiração do embrião (Neves, 1998).

As cascas de ovo representam 10% da massa total deste, aproximadamente 5 g. A produção de 2,7 bilhões de dúzias de ovos, no Brasil, em 2013 gerou, cerca de 160000 toneladas de cascas (IBGE, 2016). Dessa forma, encontrar um destino adequado para o resíduo de casca de ovo pode agregar valores para os produtores

de galinhas e indústria de ovos. Este resíduo pode ser usado como nova fonte de matéria prima para várias áreas afins como agricultura (pó da casca para adubo), cálcio para alimentação e fonte de carbonato de cálcio para produção de biocimentos (Caliman, 2011).

A utilização do carbonato oriundo das cascas de ovos como fonte de íons cálcio, na síntese de fosfato de cálcio já foi relatado em diversos estudos ao longo dos últimos anos (Ahmed e Ahsan, 2008; Oliveira, Benelli e Amante, 2009; Nayar e Guha, 2009). Essas pesquisas utilizaram a casca de ovo de galinha como fonte de cálcio para síntese de HA, o que agrega valor ao resíduo, resolve o problema ambiental e proporciona a obtenção de fosfato de cálcio de qualidade por um preço mais baixo que o do mercado. Logo, a reutilização da casca de ovo é sugerida neste trabalho como um meio alternativo para a valorização deste resíduo, onde o carbonato de cálcio presente nesta casca de ovo foi convertido em fosfato de cálcio.

2.14 Fosfato de Cálcio

Os fosfatos de cálcio apresentam-se como um dos principais elementos estudados e empregados como biomateriais para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois possuem como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados, além de excelente biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade local ou sistêmica, aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro, taxas de degradação variáveis e osteocondutividade (Albrektsson e Johansson, 2001; Santos, Eneide e Mansur, 2006; Costa *et al.*, 2009; Guastaldi e Aparecida, 2010).

Ao longo dos anos, biocerâmicas de fosfato de cálcio como a hidroxiapatita, vêm sendo amplamente utilizadas em aplicações médicas, ortopédicas e odontológicas, como recobrimentos ou materiais densos para a reposição e reparação do tecido ósseo, devido à sua similaridade química e estrutural com a apatita biológica, que propicia a interação direta com este tecido (Ratner *et al.*, 2005). Uma maneira conveniente para classificar os fosfatos de cálcio é usando a razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo, como indicado na Tabela 2 (Ratner *et al.*, 2005).

Tabela 2 - Fosfatos de cálcio, fórmulas químicas e razões Ca/P [1, 3].

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico (α, α', β,g) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	CaHPO_4	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,5
Metafosfato de cálcio (α,β,g) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: Ratner *et al.* (2005)

2.14.1 Hidroxiapatita

O conhecimento da microestrutura da hidroxiapatita é importante por vários aspectos. Primeiro, porque é um dos principais componentes do tecido ósseo, sendo assim o estudo da nucleação e crescimento dos cristais sob condições próximas das condições do ambiente biológico (temperatura de aproximadamente 37 °C, pH 7,4 e concentração baixa) dá a possibilidade de modelar os processos de biomineralização e desmineralização, que é a remodelação óssea. Segundo, como a HA é um material de implante biocompatível, a determinação da correlação entre morfologia e estrutura das partículas por um lado e as condições de crescimento por outro, permitem definir quais condições de temperatura, concentração e pH seriam

fundamentais para uma síntese direta e racional que gere uma morfologia e tamanho de partícula desejado (Suvorova e Buffat, 1999).

Azevedo *et al.* (2007) relatam que, ao contrário dos outros fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita é mais resistente sob condições fisiológicas. De fato, é termodinamicamente estável em pH fisiológico e participa ativamente na regeneração óssea, formando ligações químicas fortes com o osso em volta. Esta propriedade tem sido explorada para recuperação óssea rápida após traumas mais complexos.

A forma de degradação da hidroxiapatita é mais uma de suas vantagens. Envolve um processo correspondente à degradação natural do tecido ósseo, por osteoclastos, sugerindo a possibilidade de completa degradação durante o remodelamento normal do osso, o que seria ideal (Borges *et al.*, 2000; Rumpel *et al.*, 2006). Foi observado que ocorre mais rapidamente quando em contato com osso trabecular e medula óssea do que com o osso cortical (Imaizumi *et al.*, 2006).

São dois os tipos de hidroxiapatitas mais consideradas: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e tamanho de cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e tamanho de cristais pequenos. A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos (Fulmer, Martin e Brown, 1992).

A célula unitária hexagonal da hidroxiapatita contém 10 íons cálcio localizados em sítios não equivalentes, quatro no sítio I, tetraédricos (Ca1) e seis no sítio II, octaédricos (CaII). Os átomos de cálcio e fósforo formam um arranjo hexagonal no plano perpendicular ao eixo cristalino de mais alta simetria (Almqvist, Thonson e Smith, 1999).

São muitas as técnicas para a síntese do pó da hidroxiapatita. Um dos métodos mais utilizados é a técnica de precipitação, que envolve reações via úmida entre precursores de cálcio e fósforo com controle de temperatura e pH da solução. Outro processo para a síntese de hidroxiapatita é o sol-gel, que é um método químico, via úmida que dispensa alto vácuo e temperaturas elevadas. Como material de implante, a hidroxiapatita pode ser obtida através da desproteínização do tecido ósseo, por tratamento hidrotérmico de corais ou ainda pode ser obtida também por processos sintéticos tais como, precipitação de soluções aquosas ou reações no estado sólido (Park e Lakes, 2007; Kayali, Goller e Akin, 2011).

A Tabela 3 ilustra as formas das hidroxiapatitas usadas na medicina e na odontologia.

Tabela 3 - Formas das hidroxiapatitas usadas na medicina e na odontologia.

Usos	Formas
Matriz ou suporte para crescimento ósseo	Grãos, porosa
Osso artificial	Grãos, densa, porosa
Cimento ósseo	Pó com PMMA
Articulações artificiais	Metal recoberto com Hap
Próteses vasculares	Densa
Próteses traqueais	Porosa ou densa
Terminais pericutâneos	Densa
Sistema de liberação densa	Densa ou pó

Fonte: E'Gues (2005)

A hidroxiapatita no tecido ósseo e dentes representa de 30 a 70% da massa óssea que é considerado um biocompósito (Vallet-Regi e González- Calbet, 2004; Oréfica, Pereira e Mansur, 2012).

2.15 Biocompósitos

A finalidade da junção de uma cerâmica com um polímero é vincular a excelente bioatividade da primeira, que não possui coesão e resistência adequados com as propriedades mecânicas do último, como resistência e elasticidade, muito semelhantes às do osso cortical, mas que não tem a excelente bioatividade em relação ao tecido ósseo (Galego *et al.*, 2000; Hench, 2000; Shishatskaya *et al.*, 2005).

Os materiais compósitos são definidos normalmente como materiais formados por dois ou mais componentes com distintas composições, estruturas e propriedades e que estão separadas por uma interface. No caso dessa tese, os materiais estudados serão dois biomateriais e remeteremos ao tópico como biocompósito. O conceito de compósito é amplo e pode incluir um vasto número de materiais não usualmente chamado de compósito como exemplo as ligas metálicas e blendas. O objetivo principal do compósito será combinar diferentes materiais para

produzir um único dispositivo com propriedades superiores aos dos componentes isolados. Um exemplo natural de compósito é o tecido ósseo, composto de colágeno e hidroxiapatita (Oréfica, Pereira e Mansur, 2012).

Materiais compósitos derivados de biopolímeros e fibras sintéticas, tais como a fibra de vidro e carbono também podem ser considerados biocompósitos. Entretanto, os biocompósitos produzidos a partir de fibras naturais e biopolímeros são ecologicamente mais corretos, sendo denominados de “eco-compósitos” (Mohanty *et al.*, 2005). São formados por uma fase contínua, chamada matriz, geralmente formada por um polímero natural e são reforçados por fibras de diversas fontes botânicas ou de fibras de celulose de madeiras duras e coníferas (Averous e Boquillon, 2004; Mohanty, Misra e Dzral, 2005; Satyanarayana, Arizaga e Wypych, 2009). A Figura 15 ilustra a classificação dos biocompósitos.

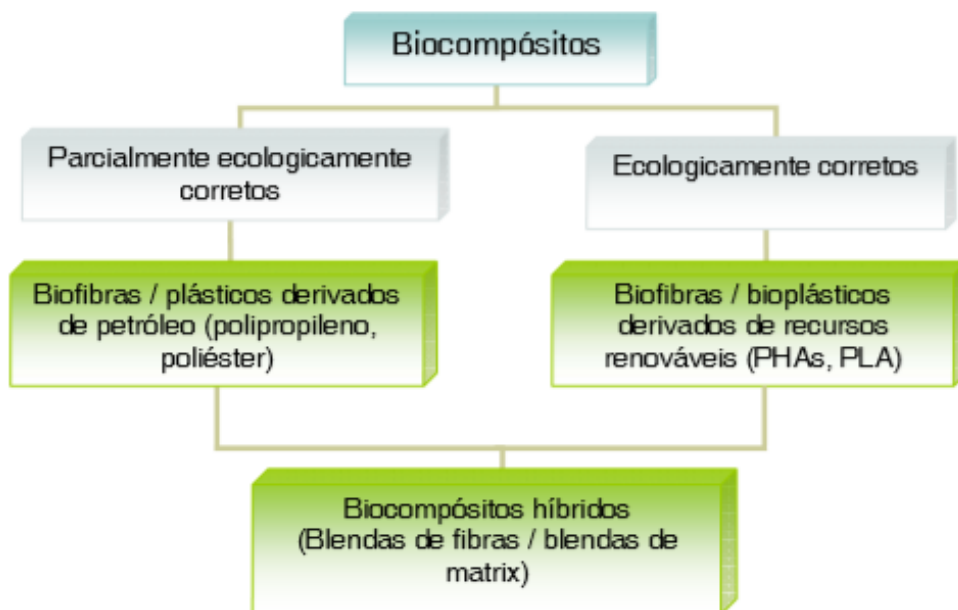


Figura 15 - Classificação dos biocompósitos (Mohanty, Misra e Henrichsen, 2000).

2.16 Biocompósito ideal para RTG e ROG (Membrana)

O princípio da exclusão mecânica do tecido mole é apenas um dentre vários fatores que uma membrana deve possuir para ser utilizada no processo da regeneração óssea e tecidual guiada. Para que a ROG e RTG seja conseguida, além da exclusão de determinados tecidos, deve haver também ausência de inflamação decorrente de infecção bacteriana, estabilidade e criação e manutenção

de um espaço preenchido por coágulo sanguíneo (Dahlin *et al.*, 1990; Schenk *et al.*, 1994).

As membranas devem possuir as seguintes características:

- Biocompatibilidade: o material não deve afetar significativamente o organismo ou vice versa;
- Propriedades oclusivas: possuir permeabilidade que permita a passagem de plasma e nutrientes, porém, não a passagem de células não osteogênicas;
- Suporte físico ao tecido mole circundante: capacidade de criação de espaço que será preenchido por um coágulo sanguíneo, necessário à formação óssea;
- Proteção do coágulo: para a formação posterior do tecido ósseo;
- Clinicamente manuseável: no intuito de facilitar a manipulação/adaptação no momento da cirurgia;
- Promover regeneração óssea e tecidual de forma previsível: sem a presença de efeitos colaterais;
- Custo acessível, caso seja possível (Hardwick, Hayes e Flynn, 1995).

Tatakis e colaboradores (1999) incluíram uma nova característica: atividade biológica que, segundo os autores, teria importância no desenvolvimento de novas membranas. De forma simplificada, a Figura 16 ilustra as características de uma membrana ideal.

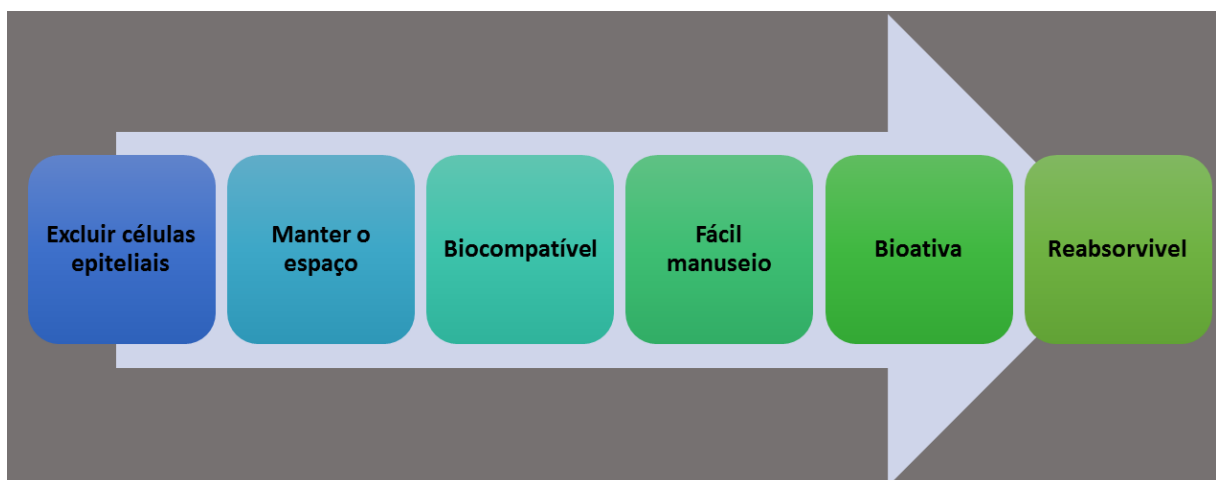


Figura 16 - Membrana Ideal (Hardwick, Hayes e Flynn, 1995; Tatakis, Promsudthi e Wikesjö, 1999).

2.17 Estado da Arte

A seguir, estão relacionados trabalhos que utilizaram PHB em regeneração de tecidos ósseos e suportes.

Liu e Wang (2007) estudaram a bioatividade e a biodegradabilidade de compósitos de HA e PHB para aplicação em reparo de tecido ósseo. O processamento dos compósitos foi realizado por meio de injeção e a carga de HA adicionada ao PHB foi de 40% em volume. A caracterização das amostras de compósito obtidas foi feita por meio de análises de DSC e MEV. Por meio dos resultados obtidos, verificou-se que o compósito obtido apresentou distribuição homogênea das partículas de HA, sendo um indicativo de que este compósito apresentará boas propriedades mecânicas e biológicas para a reparação do tecido ósseo.

Reis e colaboradores (2009) avaliaram a biocompatibilidade, a osseointegração, a osseocondução e a biodegradação de compósitos de 50% hidroxiapatita (HAP-91[®]) e 50% poli (hidroxibutirato). O compósito foi implantado em defeitos ósseos em 12 coelhos (grupo experimental), sendo comparado a defeitos não preenchidos (grupo-controle, de igual número). Os parâmetros clínicos dor, claudicação, infecção, deiscência e edema foram avaliados nos primeiros oito dias após a cirurgia e aos 45 e 90 dias. Radiografias foram realizadas aos oito, 45 e 90 dias após a cirurgia em quatro animais por grupo que, em seguida, foram submetidos à eutanásia para coleta de amostras destinadas a análises histológicas e histomorfométricas. Não ocorreram diferenças entre os grupos para todos os parâmetros clínicos. Radiografias demonstraram um compósito com radiopacidade semelhante à do osso vizinho e contato direto entre osso e compósito aos 45 e 90 dias. Uma diferença significativa foi observada entre a porcentagem dos tecidos ósseo e conjuntivo dentro do defeito nos dias oito, 45 e 90, assim como na interface aos 45 e 90 dias. Foram observadas projeções dos tecidos ósseo e conjuntivo no interior do compósito e sinais de biodegradação na ausência de infiltrado inflamatório. Com base nos resultados obtidos nas condições deste experimento, pode-se concluir que o compósito de 50% HAP-91[®] e 50% polihidroxibutirato é biocompatível, osseocondutor, integra-se ao tecido ósseo e é degradado *in vivo*.

Alves e colaboradores (2011) realizaram um estudo avaliativo da resposta biológica de um compósito em forma de placas com 70% polihidroxibutirato e 30%

hidroxiapatita, usado sob a forma de um implante ósseo em fêmures de gatos. As amostras do compósito foram implantadas por via subcutânea na região dorso-lombar do fêmur direito dos animais. O estudo utilizou 12 gatos adultos castrados de raça mista, pesando em média 3,5 kg. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: GI, GII e GIII, de acordo com a duração do período de avaliação, 15, 30 e 45 dias (GI); 30, 60 e 90 dias (GII) e grupo controle (GIII). As reações biológicas dos compósitos foram caracterizadas por inflamação granulomatosa com predominância de macrófagos e células gigantes. Os resultados mostraram que os compósitos desencadearam uma mínima reação inflamatória local, e com isso sendo um material de aceitação clínica.

Reis e colaboradores (2012) desenvolveram membranas (placas) reabsorvíveis com a associação da HA com o PHB com duas características: i) uma membrana rígida capaz de manter sua forma, assim prevenindo seu colapso para dentro do defeito e mantendo o espaço para o coágulo; ii) uma superfície interna de topografia complexa para promover maior adesão de fibrina, plaquetas e células progenitoras, favorecendo assim, respectivamente, a manutenção do volume do coágulo sanguíneo, a sinalização que direciona a migração celular e a formação de novos tecidos. Assim, com tais características, ele acredita que estas membranas poderão ser utilizadas para favorecer a regeneração de defeitos periodontais. As membranas tiveram a seguinte formulação 25% de HAP em 75% PHB (membrana 1), 35% de HAP em 65% de PHB (membrana 2) e 50% de cada biomaterial (membrana 3). Cada mistura foi separadamente inserida na máquina injetora para a fabricação das membranas pelo processo de moldagem por injeção, a pressão de 40 libras e temperatura entre 120 e 130 °C. As amostras foram divididas em 3 grupos, o primeiro da forma que foi fabricados, no segundo grupo as amostras foram fraturadas e no terceiro grupo as amostras foram desgastadas com broca odontológica diamantada. As placas foram caracterizadas por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura e energia dispersiva de raios-X. Os autores constataram que as membranas apresentaram alta cristalinidade e superfície com característica microtopográfica, onde a hidroxiapatita influenciou positivamente a complexidade topográfica das mesmas. O desgaste da superfície das membranas com broca odontológica expôs os grânulos de hidroxiapatita, contribuindo para maior complexidade topográfica.

Sakamoto (2013) produziu membranas fibrosas de PHB através da técnica de fiação por sopro em solução (*solution blow spinning*) utilizando solução PHB/clorofórmio nas concentrações: 8%, 10% e 12% (m/v). Entretanto a autora cita apenas duas técnicas para formação de membranas, a fiação por sopro em solução e Electrospinning ou eletrofiação. Verificou-se que o diâmetro das fibras aumenta na medida em que se eleva a concentração de PHB na solução, quando a taxa de injeção da solução e a pressão foram mantidas constantes. Foi observado um deslocamento para menores valores das temperaturas de fusão do PHB em função do aumento da concentração da solução.

Neste mesmo estudo, constatou-se a existência de um pequeno deslocamento dos picos referentes às temperaturas de fusão do PHB. Com o aumento da concentração, para uma dada pressão e vazão, há um aumento da porosidade e, conseqüentemente, da permeabilidade da glicose através da membrana que está relacionado ao aumento do diâmetro das fibras. A maior permeabilidade observada é de $2,65 \times 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ na membrana com concentração 10% (m/v), pressão de 140kPa e vazão de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Sadat-Shojai e colaboradores (2013) estudaram a síntese de nanocompósitos baseados em PHB e HA para aplicação na reparação e regeneração óssea. Partindo-se do pressuposto de que a propriedade mais importante de um biomaterial é a sua capacidade de interagir com as células, os referidos autores realizaram uma investigação da biocompatibilidade deste nanocompósito, em que se tentou explorar o efeito das nanopartículas de HA na resposta celular do nanocompósito PHB/HA.

Por meio dos resultados obtidos nos estudos *in vitro*, verificou-se um aumento significativo na proliferação e diferenciação de células MC3T3-E1 nos nanocompósitos em comparação com o PHB puro. As análises de microscopia de força atômica indicaram que a topografia e a composição química da superfície do nanocompósito são fatores determinantes na proliferação celular. Comparando-se a diferenciação celular ocorrida no PHB puro e no nanocompósito com 15% em peso de HA, este último exibiu uma diferenciação mais acentuada, provavelmente resultante da alta rugosidade da superfície e grande quantidade de HA exposta. Segundo os referidos autores, estes resultados sugerem que as partículas de HA têm um papel importante no desempenho biológico do PHB.

Bertochi (2013) confeccionou scaffolds de polihidroxibutirato construídos por prototipagem rápida funcionalizados com hidroxiapatita e peptídeo osteogênico, com

a finalidade de promover a regeneração óssea e além disso, avaliou a liberação prolongada do peptídeo incorporado aos scaffolds na forma livre ou incorporado a lipossomas. A apatita foi incorporada *in situ* por meio de ciclos alternados de imersão em soluções de CaCl_2 e Na_2HPO_4 , respectivamente. Os peptídeos foram incorporados ao sistema de liberação no momento de seu preparo.

O compósito foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura/espectroscopia de energia dispersiva - imagem espectral (MEV/EDS), absorção atômica, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios-X (DRX), análise termogravimétrica (TG), dicroísmo circular (*circular dichroism* - CD) e espalhamento de luz (*dynamic light scattering* - DLS). Para este autor o compósito tem um potencial promissor para engenharia tecidual óssea, o mesmo ainda sugere mais pesquisas relacionadas na área e modificar a forma de impregnação do fosfato.

Oliveira (2013) realizou um estudo investigativo do desempenho do PHB em forma de placas produzidas comercialmente, com análise de fatores como bioatividade, biodegradação, biocompatibilidade, propriedades mecânicas e térmicas. Para a avaliação da bioatividade do PHB, o material foi submetido a um ambiente que mimetiza o meio biológico, nesse caso uma solução de SBF (*Simulated Body Fluid*). Para o estudo da biodegradação, o PHB foi submetido ao contato com uma solução tampão (PBS) e lisozima. A biocompatibilidade foi determinada por meio do teste de viabilidade celular, utilizando o método do MTT e da produção de óxido nítrico (NO).

Após a avaliação dos resultados obtidos *in vitro*, concluiu-se que o PHB após o ataque com peróxido de hidrogênio, ficou mais receptivo, adquirindo um comportamento bioativo; apresentou discreta biodegradação superficial, sem comprometimento estrutural, e manteve as propriedades mecânicas próximas do PHB original ao final do período de 180 dias de exposição ao ambiente biodegradável. Por fim, comprovou-se que o PHB é um polímero biocompatível, pois através da determinação da porcentagem da viabilidade celular e a determinação da produção de óxido nítrico (NO), observou-se um resultado de 87,22% e 3,5 respectivamente, muito próximo às médias dos grupos controles realizados.

Szuberta e colaboradores (2014) modificaram a superfície do PHB com deposição de hidroxiapatita e fosfato de tricálcio- β pelo método que imita o fluido corporal simulado (SBF) (plasma humano). Esta última é uma solução tampão

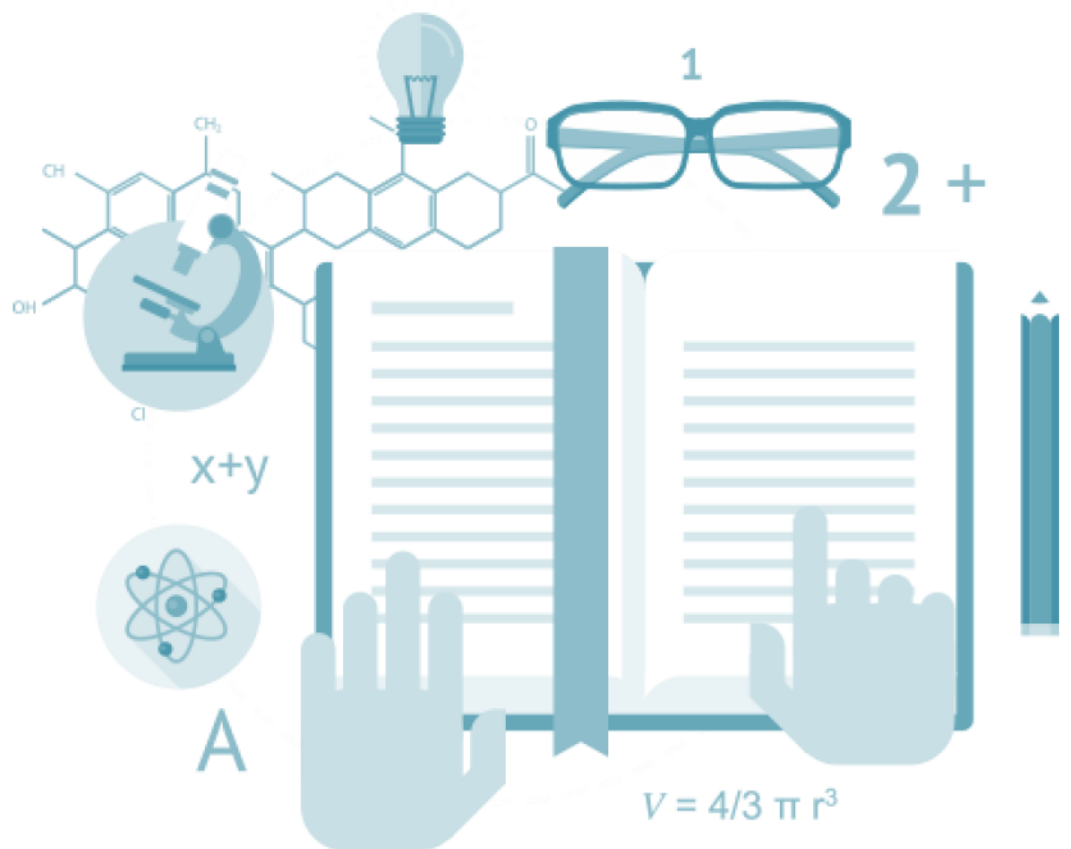
metaestável que foi preparada de acordo com o método proposto por Kokubo. Os autores constataram que a superfície foi alterada com sucesso; esta modificação da superfície tem uma influência significativa sobre a bioatividade de fosfatos de cálcio. As análises de MEV, EDS e Raman provaram a formação e o crescimento de uma camada de apatita na superfície do PHB após a sua imersão em SBF. De acordo com os autores, os novos materiais bioativos obtidos tem potencial para serem utilizados como material de substituição óssea, necessitando ainda de mais estudos.

Ramier e colaboradores (2014), através da técnica de electrospinning, produziram scaffolds de PHB e HA, para serem aplicados em regeneração óssea. Electrospinning provou ser uma técnica adequada e poderosa para a produção de suportes tridimensionais biomiméticos para engenharia de tecidos. Tais estruturas são geralmente caracterizadas por um elevado grau de porosidade, com poros interligados, o que permite uma circulação eficiente dos elementos necessários para o desenvolvimento celular. Os autores constataram que a adição da HA melhorou significativamente as propriedades mecânicas do PHB e que os scaffolds de PHB/HA possuem um elevado potencial terapêutico em processos de regeneração de tecidos ósseos.

Sadat-Shojai e colaboradores (2016) realizaram estudos com a construção de membranas tridimensionais de nano-HAp / PHB e hidrogéis (gelatina) construídos a partir da técnica de eletrofiação com tri-camadas de células carregadas para aumentar a regeneração óssea *in vivo*. Os resultados indicaram que as propriedades mecânicas da construção foram muito mais elevadas do que os hidrogéis tradicionais. Além disso, as células ósseas dentro do andaime foram altamente viáveis, e se infiltraram no centro da eletrofiação após 14 dias de encapsulamento. Devido à elevada resistência e à capacidade de encapsular células, era esperado que a nova membrana de tri-camadas de células carregadas favorecesse a regeneração óssea *in vivo*. Segundo os referidos autores, espera-se que esta abordagem e novo modelo de confecção possam proporcionar oportunidades para construir uma membrana capaz suportar mais células para aplicações *in vitro* e *in vivo* em aplicações no futuro.

Materials e Métodos

Neste tópico está descrita a metodologia adotada para o desenvolvimento desta pesquisa, a metodologia de processamento e os estudos propostos para as caracterizações físico-químicas, mecânicas e biológicas do biocompósito.



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Certificação e Desenvolvimento de Biomateriais – Certbio, que está localizado no Bloco CJ3, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

3.2 Materiais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais e reagentes:

- Ácido fosfórico P.A. fornecido pela Vetec;
- Cascas de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*);
- Clorofórmio P.A., fornecido pela Isofar;
- PHB (poli (3-hidroxibutirato)), fornecidas pela PHB Industrial S.A.

3.3 Métodos

3.3.1 Hidroxiapatita (HA) obtida através da casca do ovo, pelo método de via úmida.

As cascas de ovos foram lavadas com água corrente, secas em estufa a 40° C e submetidas à trituração em um Almofariz Pistilo. Em seguida foram passadas em peneira malha 325 mesh para obtenção do pó fino. O pó da casca do ovo foi submetido a um ciclo térmico de aquecimento a 800° C por 3 horas, com taxa de aquecimento de 10° C/min, para a obtenção do óxido de cálcio.

Para obtenção do hidróxido de cálcio utilizado nesta fase para obtenção de hidroxiapatita foram depositados 5,6 g do óxido de cálcio em 150 mL de água destilada, conforme a Equação 1.



A reação escolhida para síntese da HA foi pelo método de precipitação por via úmida, mais especificamente uma reação ácido-base, conforme a Equação 2.



Para tal, os reagentes utilizados foram o ácido fosfórico comercial (H_3PO_4) e uma suspensão de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), preparada a partir do CaO obtido da casca do ovo.

A amostra de hidroxiapatita foi obtida pelo método de precipitação por via úmida envolvendo uma reação ácido-base denominada neutralização entre as soluções de ácido fosfórico e hidróxido de cálcio. Utilizou-se 150 mL de solução de hidróxido de cálcio e 30 mL de ácido fosfórico a 2 M. O gotejamento da solução de H_3PO_4 foi realizado por meio de uma bureta controle de vazão à solução alcalina com velocidade controlada manualmente, para que fosse aproximadamente 1,0 mL/min, previamente aquecida à temperatura de $\pm 80^\circ\text{C}$, sob constante agitação magnética. Após a completa adição da solução de ácido fosfórico, o produto obtido permaneceu por um período de 50 minutos, sob agitação magnética à temperatura de 100°C , ou até que o líquido fosse totalmente evaporado formando uma pasta viscosa. Essa pasta foi levada para a estufa a 110°C por 24 horas. Em seguida, o produto final foi desaglomerado no almofariz, passado em peneira de malha 325 mesh, obtendo partículas de tamanho máximo $44\mu\text{m}$ e calcinada a 900°C por 2 horas.

3.3.2 Obtenção das membranas de PHB pelo método de evaporação de solvente e dos biocompósitos

As membranas foram obtidas em duas diferentes concentrações de PHB/clorofórmio (5g/L e 10g/L). Inicialmente foram pesados 0,25g e 0,50g de PHB depois adicionado 50mL de clorofórmio (P.A.). A solução foi agitada por 24 h sob temperatura ambiente até que ocorresse a solubilização do PHB. Posteriormente foi levadas para estufa com aproximadamente 65°C por 1 h, para total evaporação do solvente e formação da membrana.

Para formação do compósito foram inseridas nas soluções PHB/clorofórmio (5g/L e 10g/L), respectivamente, 1%, 2% e 3% de concentração HA em relação à

massa inicial do PHB e, posteriormente, foi repetida a metodologia da formação da membrana pura de PHB. A Figura 17 ilustra o fluxograma simplificado da elaboração das membranas e dos biocompósitos desde o seu processo inicial até as sua caracterização pelo método de evaporação.

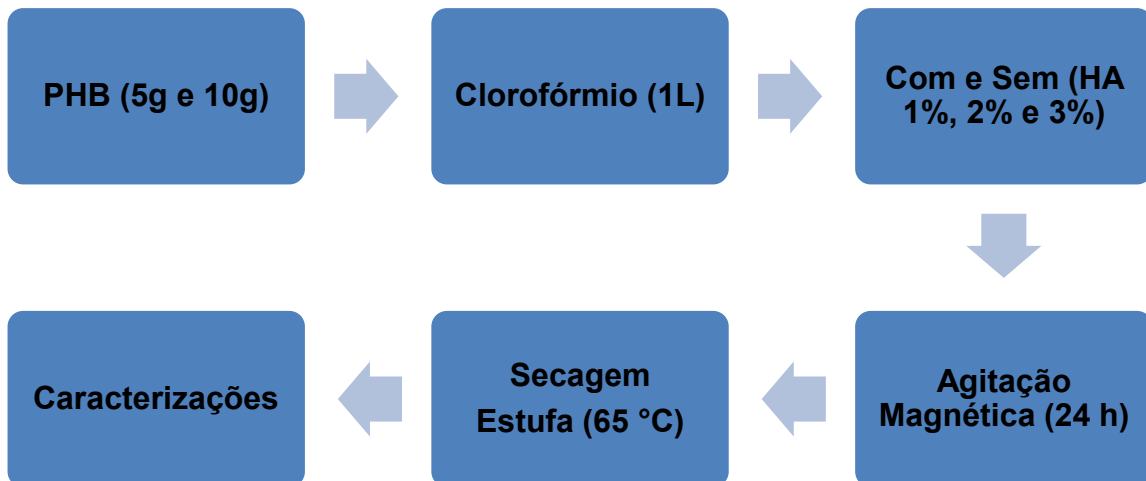


Figura 17 - Fluxograma simplificado da elaboração das membranas e dos biocompósitos (Fonte: Própria).

Para confecção dos biocompósitos foi utilizado a concentração de 10 g/L pois ao secar as membranas em becker de 500 ml com alíquota de 50ml da solução as membranas de 5g/L ficarão quebradiças quando tracionadas manualmente.

3.3.3 Obtenção das membranas de PHB pelo método de fusão e dos biocompósitos

Para obtenção das membranas, o PHB foi extrudado a 44rpm, torque de 39Nm, com um perfil de temperatura de 170/175/177°C na extrusora monorosca de bancada AX-Plásticos (16-mm), com Razão LD=26, a uma taxa de compressão de 1,5, específica para produção de filmes planos.

A Figura 18 ilustra a extrusora onde foram confeccionadas as membranas de PHB puro, e os compósitos de PHB/ HA (1%, 2% e 3% de concentração de HA em relação à massa inicial do PHB).



Figura 18 - Extrusora de membranas (Fonte: Própria).

A Figura 19 ilustra o fluxograma simplificado da elaboração das membranas e dos biocompósitos desde o seu processo inicial até as suas caracterizações pela técnica de extrusão.

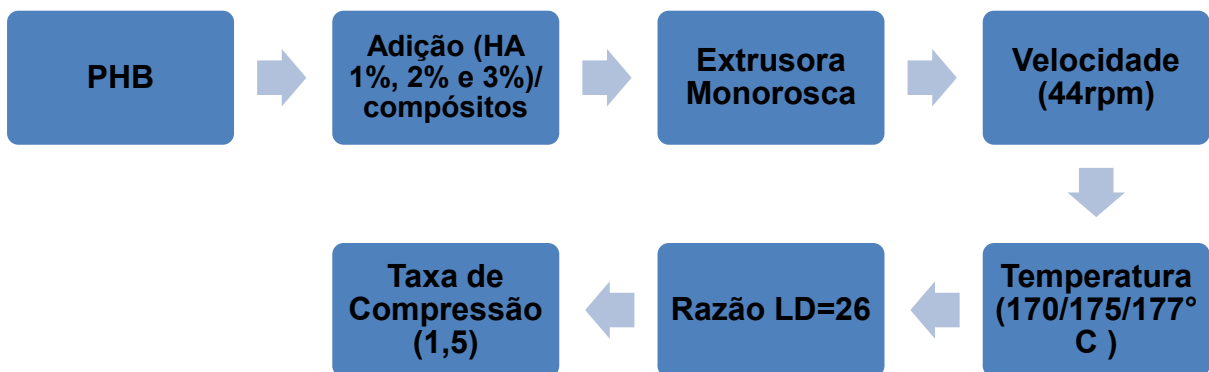


Figura 19 - Fluxograma simplificado da elaboração das membranas e dos biocompósitos (Fonte: Própria).

3.4 Amostras

As membranas e biocompósitos foram codificados inicialmente pelas letras WB, quando foram confeccionadas pela técnica de evaporação acrescentou (Es), quando forma confeccionadas pela técnica de extrusão acrescentou (Ex) e quando

adicionados Hidroxiapatita (HA) e posteriormente sua quantidade no biocompósito. A Tabela 4 ilustra as codificações das respectivas amostras.

Tabela 4 - Denominação das amostras.

CÓDIGO	AMOSTRAS
HA	Hidroxiapatita
WBPó	Polihidroxibutirato em Pó
WBes5	Polihidroxibutirato - Membrana (Evaporação de Solvente) 5g/L
WBes10	Polihidroxibutirato - Membrana (Evaporação de Solvente) 10g/L
WBes1HA1	Polihidroxibutirato_ Membrana 10g/L + 1% de HA
WBes1HA2	Polihidroxibutirato_ Membrana 10g/L + 2% de HA
WBes1HA3	Polihidroxibutirato_ Membrana 10g/L + 3% de HA
WBex	Polihidroxibutirato_ Membrana (Extrudada)
WBexHA1	Polihidroxibutirato_ Membrana (Extrudada) com 1% de HA
WBexHA2	Polihidroxibutirato_ Membrana (Extrudada) com 2% de HA
WBexHA3	Polihidroxibutirato_ Membrana (Extrudada) com 3% de HA

Fonte: Própria

3.5 Caracterizações

O pó de PHB e de HA, assim como as membranas de PHB puro, e com a HA foram caracterizados por Microscopia Óptica (MO); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS); Difração de Raios-X (DRX); Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Ensaio Mecânico de Tração; Molhabilidade; Ensaio de Citotoxicidade; Análise termogravimétrica (TGA) e Ensaio de Biodegradação *in vitro*.

3.5.1 Microscopia Ótica (MO)

Alguns materiais são opacos à luz visível, como é o caso de alguns metais, da maioria das cerâmicas e polímeros. Somente a superfície pode ser observada e deve ser criteriosamente preparada de maneira a propiciar condições de revelar a microestrutura (Fook, 2005).

Neste trabalho, a caracterização por MO foi utilizada para avaliação da morfologia das membranas e para verificar a distribuição das partículas no compósito. A análise foi realizada em um Microscópio Óptico Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 50X-400X, acoplado a uma estação de Análise de Imagens, com uma magnitude de 160x.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) através do fornecimento de informações sobre a natureza topográfica possibilita a verificação da morfologia, interconectividade, formação de poros nas membranas.

O EDS é um acessório do MEV no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitido pela amostra. O diâmetro reduzido do feixe de elétrons permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos ($< 5 \mu\text{m}$), permitindo uma análise quase que pontual. O ensaio foi realizado com magnificação de 500x, no mesmo local onde foram retiradas as micrografias (Padilha e Ambrozio, 2004).

O MEV/EDS utilizados foi de bancada fabricado pela Hitachi, modelo TM-1000, magnificação de 500x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30 nm, 15 KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

3.5.3 Difração de Raios-X (DRX)

Os ensaios de Difração de Raios-X associados ao método de refinamento Rietveld permitem identificar as fases cristalinas presentes e definir parâmetros como: parâmetros de rede, volume da célula unitária, quantificação de fases

cristalinas presentes, densidade ideal do material, reconstrução da geometria da célula unitária, a cristalinidade e determinação de tamanho do cristalito.

O método de refinamento de Rietveld é aplicado principalmente para difração de raios X em policristais e é baseado na minimização da diferença entre as intensidades do padrão de difração experimental e o calculado através do método de mínimos quadrados.

Foi utilizado o aparelho XRD-7000 Shimadzu, com radiação $K\alpha$ do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA num intervalo de 5° a 70°. O DRX teve o objetivo nesta tese de determinar a formação da HA, identificar a cristalinidade das matérias primas e dos biocompósitos, assim como confirmar a formação dos mesmos.

3.5.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR permite determinar a presença dos grupos funcionais nos materiais através do espectro vibracional e rotacional característicos dos mesmos denominados de bandas de absorção, correspondentes aos níveis de energia. A técnica permite identificar parâmetros como grupos terminais e ramificações de cadeias.

O FTIR utilizado foi o Spectrum 400 da Perkin Elmer na faixa de varredura de 4000 a 650 cm^{-1} . A técnica foi utilizada para identificar as bandas características dos grupos funcionais, presentes nas matérias-primas utilizadas nesta pesquisa assim como determinar a ocorrência da interação dos constituintes dos biocompósitos.

3.5.5 Termogravimetria (TGA)

Termogravimetria é uma técnica usada para medir a variação de massa de uma amostra em função da temperatura. A principal aplicação é para analisar a decomposição e estabilidade térmica de materiais ao monitorar a variação de massa em função da temperatura em um modo de varredura ou como função do tempo em um modo isotérmico. A curva TG pode ser utilizada para quantificar a composição de compósitos contendo componentes termicamente degradáveis.

A análise termogravimétrica (TGA) das amostras foi realizada em equipamento da marca Perkin Elmer modelo Pyris 1 TGA, com uma quantidade de material de aproximadamente 5,0 mg, as amostras foram pesadas em balança de precisão ($\pm 0,1$ mg). O material será aquecido a uma razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} , utilizando cadinho de alumínio. As curvas de TG serão registradas de 20 a 200°C , com a finalidade de verificar uma possível perda de massa em função da temperatura e verificar qual a técnica que pode ser utilizada para esterilizar o material para um possível contato com o corpo humano.

3.5.6 Ensaio Mecânico de Tração

O ensaio de tensão-deformação fornece uma indicação da resistência e também da tenacidade do material em teste. Em geral, os resultados do ensaio de tensão-deformação são apresentados como tensão *versus* deformação de engenharia. A curva típica é obtida a partir das medições de carga (F) e da alongação (ΔL). A tensão nominal ou de engenharia (σ_N) é determinada dividindo-se a carga aplicada (F) pela área da seção transversal inicial do corpo de prova (A_0). A deformação nominal ou de engenharia (ϵ) é obtida da leitura do extensômetro, ou seja, dividindo-se a variação do comprimento de referência (ΔL) pelo comprimento de referência inicial, L_0 , que representa a área útil do corpo de prova (Silva, 2012).

A tensão de engenharia é definida como a força por unidade de área da amostra não deformada enquanto que a tensão verdadeira, é a força por unidade de área mínima da amostra sob carregamento. Como a seção transversal da amostra diminui com o aumento da carga, de acordo com a razão de Poisson, a área efetiva sob a carga sempre diminui com o aumento da carga. Portanto, a tensão verdadeira (σ_V) é sempre igual ou maior que a tensão de engenharia (σ_N), podendo ser representada por $\sigma_V = \sigma_N(\epsilon_N + 1)$. Analogamente, a deformação de engenharia (ϵ_N) é dada pelo aumento do comprimento em relação ao comprimento inicial da amostra enquanto que a deformação verdadeira (ϵ_V) é a variação instantânea da deformação em um instante qualquer em relação ao comprimento inicial, e pode ser dada pelo logaritmo natural da razão do comprimento total pelo inicial da amostra, podendo ser expressa por $\epsilon_V = \ln(\epsilon_N + 1)$ (Throne *et al.*, 1993; Lotti, 2004).

O ensaio de tração foi realizado em uma Máquina Universal Instron, modelo 3366, célula de carga 500N com aplicação de uma velocidade de carregamento de 50 mm/min. Este ensaio foi realizado com base na norma ASTM D 3039/D 3039M-08 e foram ensaiados 5 corpos de prova.

O ensaio de tração submeteu os corpos de prova de geometria definida a um esforço crescente na direção axial do corpo de prova, levando-o a se romper. Com objetivo de comparar com o módulo elástico dos ossos e vislumbrar os esforços em caso de cirurgia.

3.5.7 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

A técnica consiste na medida do ângulo de contato, da membrana baseada na análise do formato da gota. O ângulo de molhabilidade entre a gota de água destilada com tensão superficial conhecida e a superfície sólida depende da relação entre as forças adesivas, que fariam a gota se espalhar sobre a superfície.

Caso o ângulo de contato estático tenha um valor acima de 90° , o líquido tem a tendência a não molhar a superfície e a fase é chamada de não-molhante. Com um valor aproximado a 0 o líquido recobre toda a superfície formando um filme fino de fluido molhante. Quando o valor do ângulo for menor ou igual a 90° , a molhabilidade é dita parcial. Logo, quanto menor for o ângulo, maior será a molhabilidade (Wisniewski e Arguelho, 2011).

As análises de ângulo de contato foram efetuadas após o gotejamento de água destilada na superfície das membranas. Foi utilizada uma câmara digital para capturar a imagem, as quais foram, posteriormente, remetidas a um computador que possui um programa específico para ser feita a conversão do ângulo da interface líquido-material. A medida do ângulo de contato, assim obtida, foi utilizada para caracterizar a molhabilidade das superfícies como propósito de que, no futuro, os biocompósitos possam ser confeccionados para entrar em contato com o corpo humano.

Foi empregado o aparelho goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG localizado no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais - Certbio. Foram utilizadas cinco amostras de cada tipo de membrana e biocompósito,

realizando cinco medições em cada uma delas e obtidas as médias dos ângulos de contatos.

3.5.8 Biodegradação *In Vitro*

Para este teste utilizou-se como base as normas ASTM F1635-04 *Standard teste Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants* (2010) e a ASTM F2103-01 *Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Products Applications* (2007).

O Ensaio de Biodegradação Enzimática tem o objetivo de verificar a degradação do biocompósito em meios biológicos pois é uma das variáveis de grande relevância para sua caracterização, já que tal propriedade está diretamente relacionada ao tempo de vida útil dos materiais após o início de sua utilização pelo paciente (Dallan, 2005).

3.6.9 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* das membranas foi realizada pelo teste de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos por MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] de acordo com a ISO 10993-5:2009. Os parâmetros de avaliação observados são a porcentagem de morte celular e a IC50 (concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular). O MTT é um ensaio colorimétrico quantitativo, sensível e de confiança que mensura a viabilidade, proliferação e atividade das células, baseando-se na capacidade da enzima desidrogenase encontrada nas mitocôndrias de células vivas converter o substrato amarelo, solúvel em água (MTT) em produto de cor púrpura, decorrente da formação de cristais de formazana, que são insolúveis em água, que poderão ser então detectados através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro. A quantidade do formazana produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Resultados e Discussão

Este tópico ilustra os resultados do ponto de vista químico, físico e biológico das membranas e biocompósitos, demonstrando que a metodologia empregada foi eficaz.



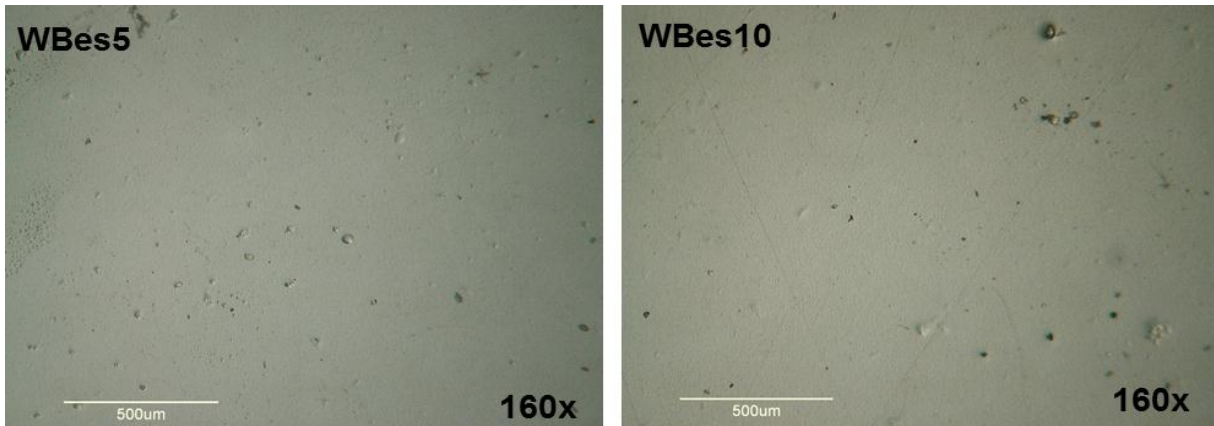


Figura 21 - Micrografia ótica das membranas WBes5 e WBes10 (Fonte: Própria).

Na micrografia dos biocompósitos por evaporação de solvente (Figura 22), verifica-se a presença de algumas partículas e aglomerados, que não foram visualizadas nas membranas WB sem Hidroxiapatita, indicando a presença da hidroxiapatita com o EDS.

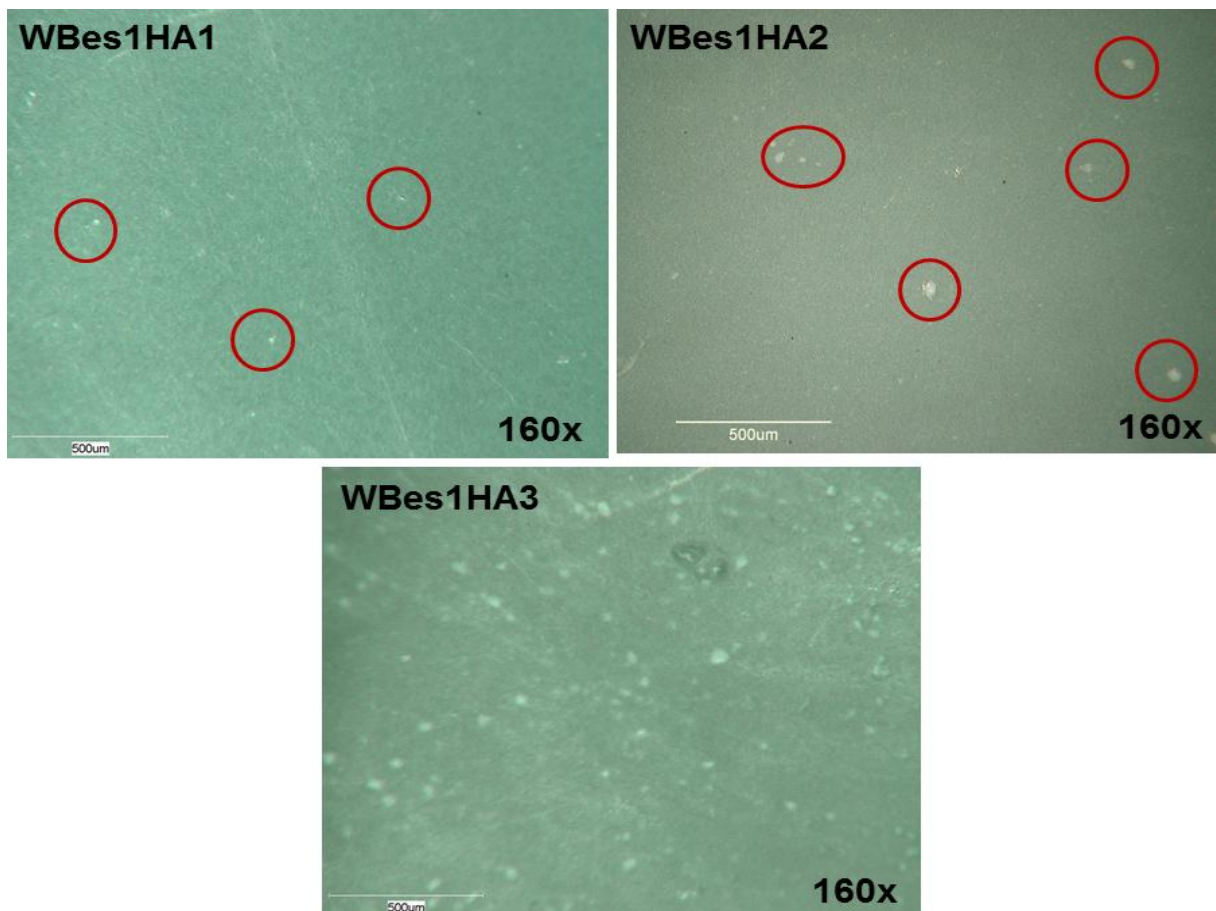


Figura 22- Micrografia ótica dos biocompósitos feitos por evaporação de solvente (Fonte: Própria).

Quando comparado os biocompósitos WBesHA(1%, 2% e 3%) entre si (Figura 22), verifica-se o aumento das partículas, fato este já esperado devido ao aumento da quantidade de Hidroxiapatita inserida. A incorporação da hidroxiapatita foi confirmada pelas caracterizações de DRX e EDS.

As partículas de HA obtidas nesta tese tiveram tamanho máximo de 44 μ m. As partículas muito finas tendem a se aglomerar em decorrência da maior intensidade das forças atrativas sobre as repulsivas, devido à distribuição de cargas nas superfícies. Normalmente, partículas de dimensões pequenas, suspensas em meio líquido, tendem a se movimentar rápido e aleatoriamente, decorrente do impacto entre as próprias partículas, ou com as moléculas do meio, ou contra a superfície do recipiente, facilitando a aglomeração. Este fenômeno apresenta uma influência marcante, pois é favorável à formação de aglomerados (Ribeiro, 2008).

Ao analisar a morfologia das membranas obtidas pelo método de extrusão - WBex (Figura 23), observa-se uma superfície rugosa, com linhas paralelas que indicam a orientação das cadeias, resultante do processo de extrusão.

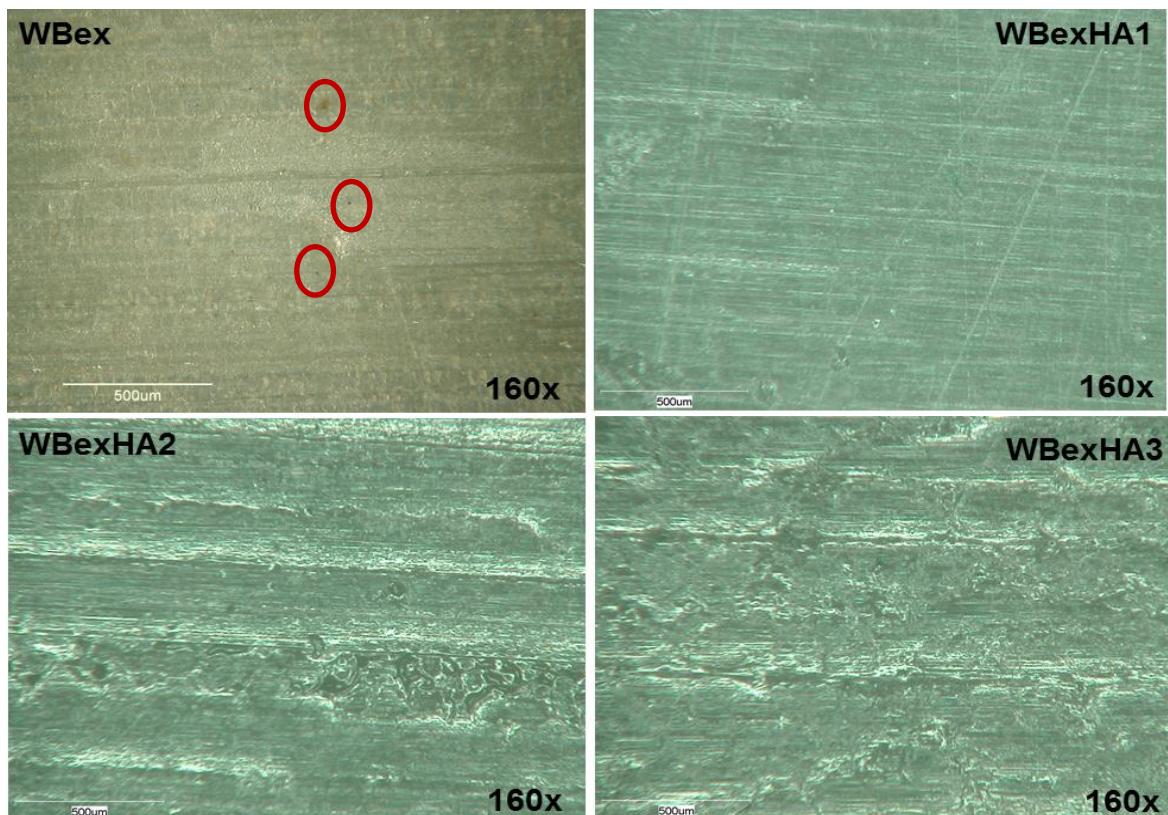


Figura 23 - Micrografia ótica dos biocompósitos obtidas pelo método de extrusão (Fonte: Própria).

Ao analisar a morfologia WBexHA1 observa-se uma superfície com linhas paralelas que indica uma orientação das cadeias resultante do processo de extrusão, semelhante a WBex. Em relação à WBexHA2, observa-se uma superfície rugosa assim como no biocompósito WBexHA3. Analisando os biocompósitos extrudados verifica-se o aumento na rugosidade que, provavelmente, foi devido a adição da hidroxiapatita que, ao sair da extrusora, ocasionou falhas, associado ao menor tempo para conformação da matriz polimérica.

Santos (2013) produziu membranas à base de polihidroxibutirato e hidroxiapatita pelo método de prensagem e relatou que seu material apresentou uma superfície irregular, com presença de partículas não fundidas e poros distribuídos em toda superfície, diferentemente dos resultados desta tese que, para as membranas produzidas por evaporação visualizou-se uma superfície plana, lisa e sem poros, já no WBex observou-se uma superfície rugosa, com orientação nas cadeias.

4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/ e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDS)

A Figura 24 ilustra a micrografia do pó da hidroxiapatita e a Tabela 5 o resultado de EDS da HA.

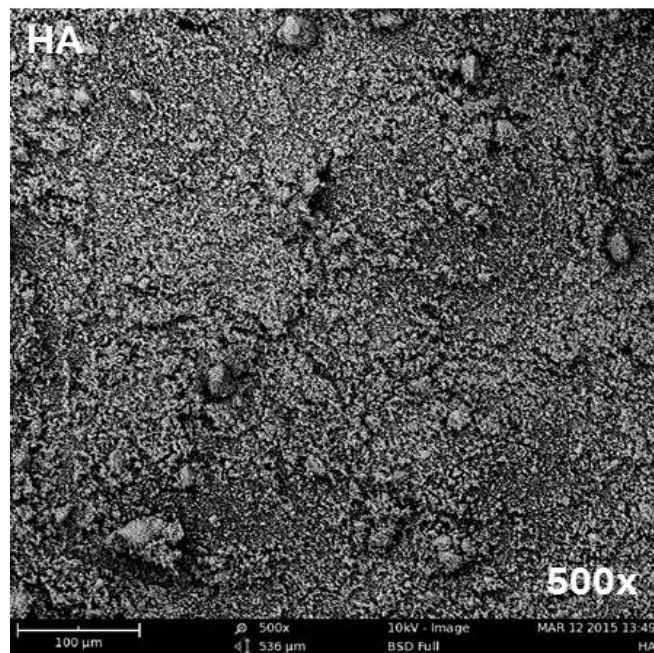


Figura 24 - Micrografia eletrônica de varredura do pó de Hidroxiapatita (Fonte: Própria).

A micrografia para a hidroxiapatita obtida a partir da casca de ovo com magnitude de 500x apresentou, aglomerados com morfologia e tamanhos variados, corroborando com Oliveira *et al.* (2009). Segundo Dalapicula e colaboradores (2006), a dimensão e a forma da partícula do biomaterial exercem influência expressiva na resposta inflamatória e na formação óssea. Boss e colaboradores (1995) mostraram que o implante de partículas de forma regular e superfície lisa geralmente induz uma resposta inflamatória de curta duração, seguida da incorporação adequada do material ao tecido hospedeiro; entretanto, partículas de forma pontiaguda provocam uma reação de inflamação crônica, acompanhada da destruição e reabsorção dos tecidos vizinhos.

Tabela 5 - Identificação da composição química da HA, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

Amostras	Oxigênio (%)	Cálcio (%)	Fósforo (%)
HA	21,11	48,80	30,09

Fonte: Própria

Ao analisar os dados da Tabela 5, constatou-se a presença dos elementos O, Ca e P característicos da hidroxiapatita corroborando com Kayali, Goller e Akin, (2011), Sousa (2012) e com o ensaio de DRX por meio do qual constatou-se essa fase.

Na Figura 25 é observada a micrografia das membranas de WBes5 e WBes10.

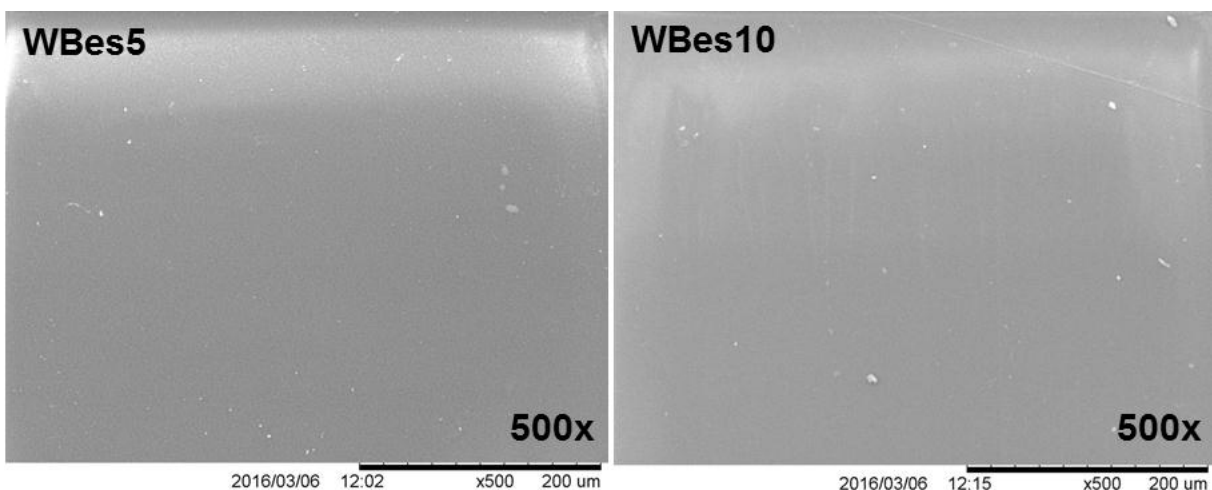


Figura 25 - Micrografia eletônica de varredura das membranas de WBes5 e WBes10 (Fonte: Própria).

Ao analisar a morfologia das membranas de WBes5 e WBes10 observa-se uma superfície plana e lisa. Não foram detectados poros, caracterizando as membranas como densas. É possível visualizar nas membranas WBEs algumas partículas dispersas que, possivelmente não foram solubilizadas. Quanto à análise de EDS (Tabela 6), constatou-se a presença dos elementos O e C característicos do PHB, corroborando com Biocycle (2015) e com os resultados de MO.

Tabela 6 - Identificação da composição química das membranas de WBes5 e WBes10, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

Amostras	Carbono (%)	Oxigênio (%)
WBes5	65,29	34,71
WBes10	72,79	27,21

Fonte: Própria

Ao analisar a morfologia dos biocompósitos por evaporação de solvente (WBes1HA1, WBes1HA2 e WBes1HA3) (Figura 26), verifica-se uma superfície semelhante as membranas de PHB. Porém, observa-se na membrana WBes1HA3 a presença de aglomerados de hidroxiapatita, confirmada pelo EDS (Tabela 7) que constatou a presença dos elementos Ca e P.

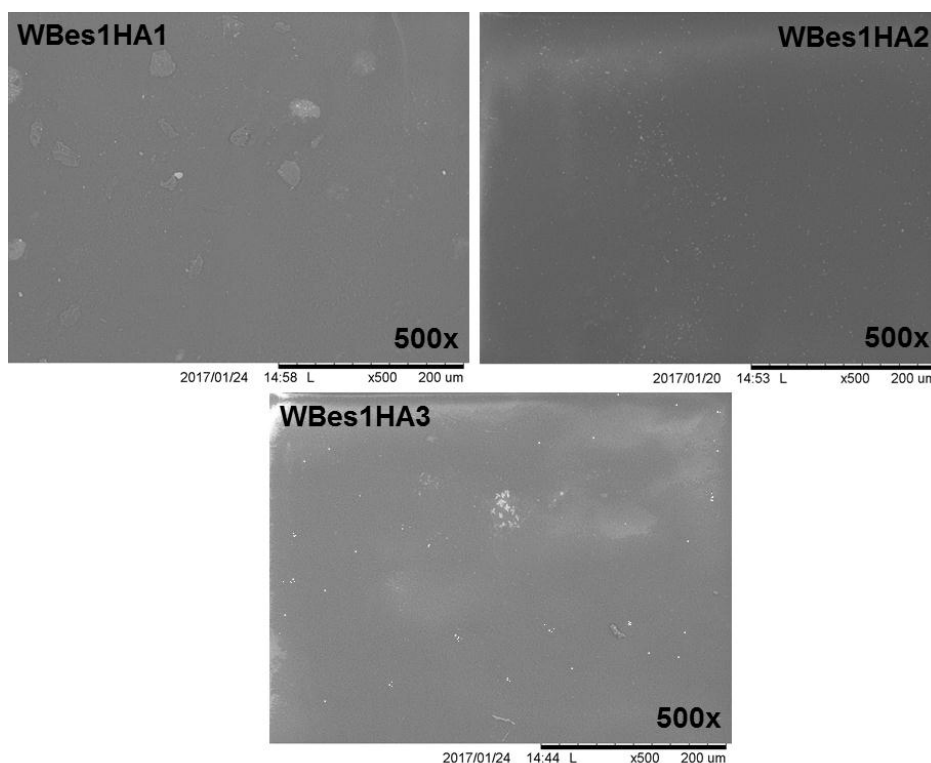


Figura 26 - Micrografia eletônica de varredura dos biocompósitos WBes1(Fonte: Própria).

Tabela 7- Identificação da composição química das membranas de WBes1HA1, WBes1HA2 e WBes1HA3, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

Amostras	Carbono (%)	Oxigênio (%)	Cálcio (%)	Fósforo (%)
WBes1HA1	77,69	21,06	0,78	0,47
WBes1HA2	63,34	34,83	1,13	0,70
WBes1HA3	59,92	35,56	2,80	1,72

Fonte: Própria

Na Tabela 7 constata-se um aumento no percentual de Cálcio (Ca) e Fósforo (P) de acordo com o aumento da porcentagem de HA nos biocompósitos.

Na Figura 27 é observada a micrografia das membranas de WBex e dos biocompósitos de WBexHA1, WBexHA2 e WBexHA3 e na Tabela 8 seus respectivos EDS.

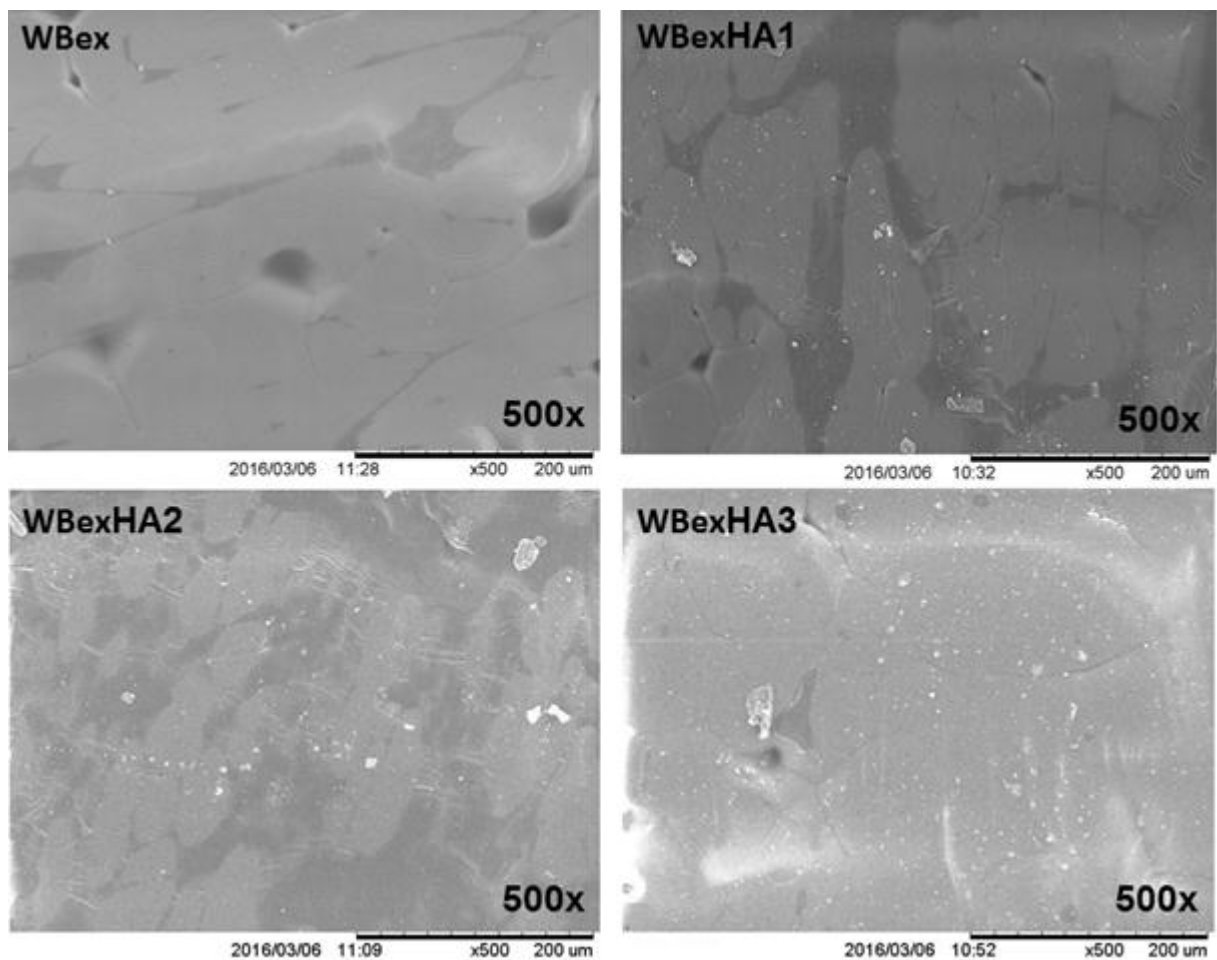


Figura 27 - Micrografia eletônica de varredura das membranas de WBex, WBexHA1, WBexHA2 e WBexHA3 (Fonte: Própria).

Ao analisar a micrografia da membrana de WBex, observa-se superfície densa, com presença de falhas ocasionadas pelo processo de extrusão. Ao analisar os resultados da Tabela 8, referentes ao EDS do WBex, constatou-se a presença dos elementos O e C característicos do PHB corroborando com Santos (2013).

Já na micrografia dos biocompósitos WBexHA (1, 2 e 3), verifica-se superfície densa. Percebe-se aumento gradativo de partículas e aglomerados devido à incorporação das diferentes concentrações de hidroxiapatita, fato confirmado pelo EDS (Tabela 8), onde há aumento no percentual de Cálcio (Ca) e Fósforo (P) de acordo com o aumento da porcentagem de HA. O ensaio de MEV/EDS corrobora com os ensaios de DRX onde foi confirmada a presença da fase HA.

Tabela 8 - Composição química das membranas de WBex, WBexHA1, WBexHA2 e WBexHA3, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

Amostras	Carbono (%)	Oxigênio (%)	Cálcio (%)	Fósforo (%)
WBex	77,57	22,43	-	-
WBexHA1	78,65	20,88	0,29	0,18
WBexHA2	77,81	18,89	2,08	1,22
WBexHA3	56,86	32,47	7,30	4,37

Fonte: Própria

No processo de fabricação das membranas e biocompósitos extrudados é possível verificar em algumas regiões com variação de tonalidade do cinza, essas regiões mais escuras significam a fase amorfa do polímero, o que corrobora com o ensaio de DRX, no qual verifica-se que a adição da HA tornou o biocompósito menos cristalino e, com o ensaio de biodegradação notou-se que a fase amorfa foi degradada mais rápida, logo o biocompósito menos cristalino se degradou mais no período estudado. A fase amorfa é identificada pelo contraste escuro, pois esta fase apresenta menor densidade eletrônica em relação à fase cristalina (David, Gomes e Machado, 2007).

4.3 Difração de Raios X

A amostra de hidroxiapatita foi analisada pelo Método de Rietveld de Refinamento utilizando o programa *General System Analyzer Structure* (GSAS II), com a ficha estrutural CIF 81442 do ICSD - *Inorganic Crystal Structure Database*. Os

parâmetros instrumentais foram previamente calculados empregando um padrão NIST 660a de LaB6. Os valores de fator de perfil ponderado (Rwp) (~10%) atingidos nos refinamentos foram aceitáveis.

De acordo com o difratograma da hidroxiapatita obtido a partir da casca do ovo (Figura 28), observou-se na amostra apenas a fase cristalina da Hidroxiapatita (Ca/P de 1,67), e está de acordo com a ficha catalográfica JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) n°: 01-074-0565, Calculated (1997) e Hughes, Cameron e Crowley (1989).

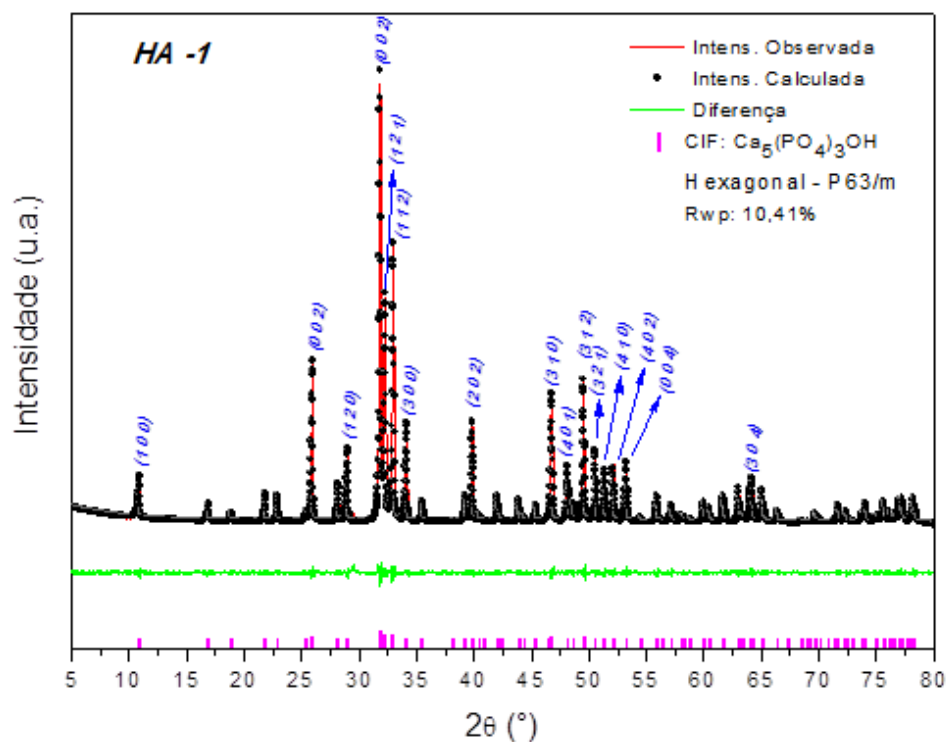
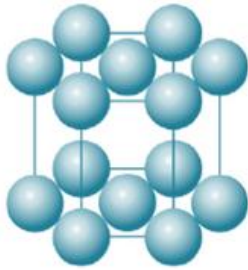


Figura 28 – Difratograma de DRX da Hidroxiapatita obtida a partir da casca do ovo (Fonte: Própria).

A Tabela 9 ilustra os resultados obtidos do refinamento de DRX da amostra (HA). O perfil de difração característico da HA mostra picos intensos e é identificado em: 25,9°, 31,6°, 32,9° e 33,9° em 2θ , correspondentes, respectivamente, às reflexões dos planos (002), (002), (121) e (112), corroborando esse resultado com os encontrados por Araújo e colaboradores (2007).

Tabela 9 - Parâmetros cristalográficos da hidroxiapatita.

Hidroxiapatita					Célula Unitária
Sistema Cristalino: Hexagonal					
Grupo Espacial: P63/m					
Parâmetros de rede				Volume da célula	
a, b, c (Å) e α, β, γ (°)				Unitária [Å³]	
a = b	c	α = β	γ		
2.95109	4.70272	90.0	120.0	35.469	
Percentual de Fase Cristalina				100 %	

Fonte: Adaptado de Calculated (1997) e Hughes, Cameron e Crowley (1989).

Kamalanathan e colaboradores (2014) sintetizaram fosfato de cálcio a partir da casca do ovo e conseguiram obter hidroxiapatita utilizando faixa de temperatura de calcinação entre 900° e 1250 °C e o pico mais intenso foi observado próximo a $2\theta = 31,7$. Tomaselli (2014) também obteve a hidroxiapatita pelo método de via úmida, utilizando temperatura de calcinação a 900°.

A Figura 29 ilustra o difratograma obtido da matéria prima.

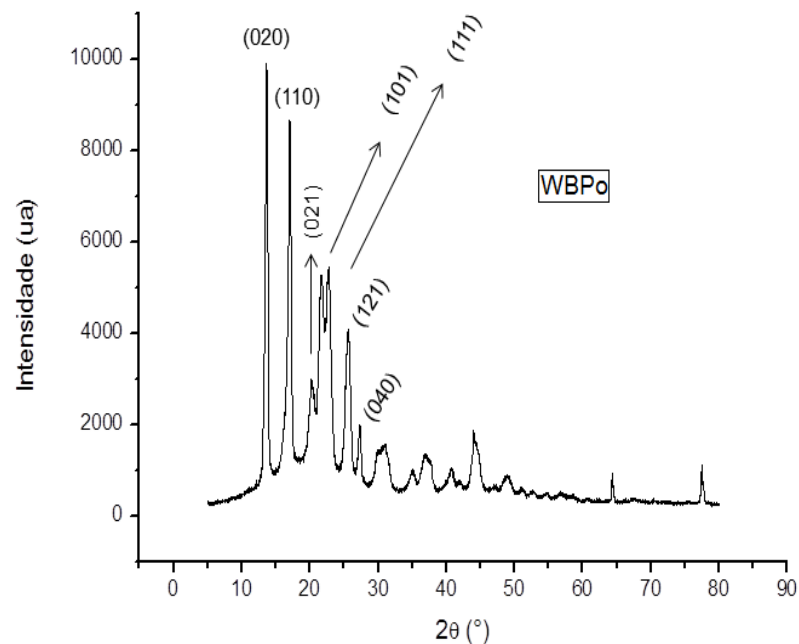


Figura 29 - Difratograma do WBPó (Fonte: Própria).

O difratograma do WB ilustra um material de perfil semi-cristalino com dois picos bem definidos de cristalinidade em $2\theta=13,66^\circ$ e $2\theta=17,11^\circ$. Outros picos característicos do PHB estão em $2\theta=21,73^\circ$, $2\theta=22,74^\circ$, $2\theta=25,74^\circ$ e $2\theta=44,03^\circ$ porém estes aparecem com menos intensidade e corrobora com Fuzari (2008) e Barud *et. al.* (2011). Comportamentos similares foram relatados por Mendes (2009) que caracterizou seu material de partida (PHB em Pó) e constatou dois picos bem definidos de cristalinidade em torno de $2\theta=13,2^\circ$ e $2\theta=16,7^\circ$. Thire, Ribeiro e Andrade (2006) obtiveram em seus resultados dois picos bem definidos de cristalinidade em torno de $2\theta=13,6^\circ$ e $2\theta=17,1^\circ$ e célula unitária tipo ortorrômbica.

A Figura 30 ilustra os difratogramas das membranas de WBes5, WBes10.

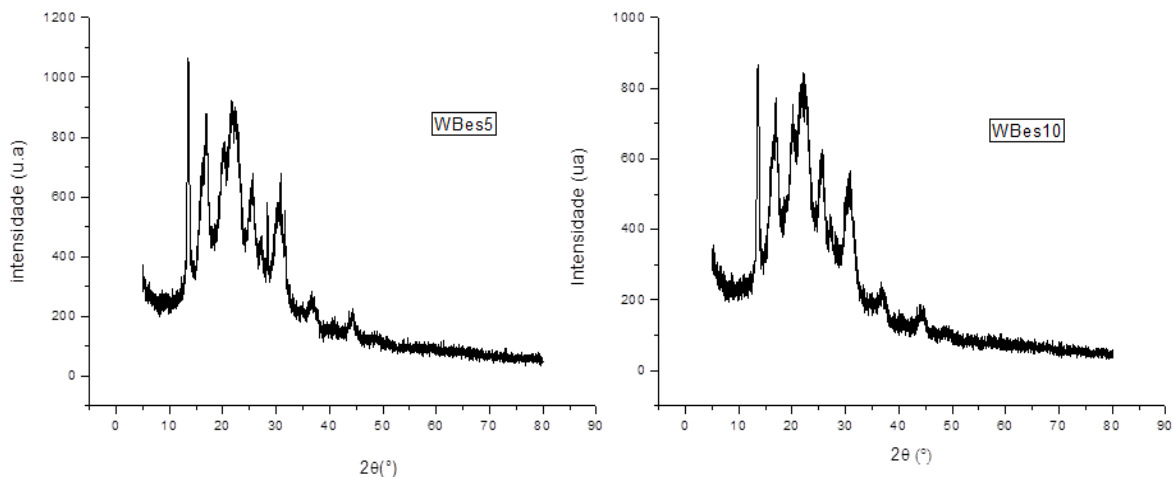


Figura 30 - Difratograma da membrana de WBes5 e WBes10 (Fonte:Própria)

Comparando os difratogramas das membranas de WBes5 e WBes10 nota-se que o maior percentual do polímero na solução promoveu a diminuição da cristalinidade do material, como pode ser observado no pico em torno de $2\theta=13,66^\circ$ onde ocorreu uma redução na intensidade. Esta também pode ser atribuída à velocidade da evaporação do solvente e, conseqüentemente, menor tempo para formação da membrana.

Analisando o difratograma do biocompósito de WBes1HA (1 %, 2% e 3%) (Figura 31), verifica-se que o mesmo possui comportamento de material semicristalino, entretanto, com adição da HA, o biocompósito se tornou ainda menos cristalino que as membranas de WBes (5 e 10) conforme constatado na redução da intensidade dos picos, demonstrando ainda que adição da mesma também

contribuiu para a diminuição da cristalinidade, estando em consonância com Almeida (2006).

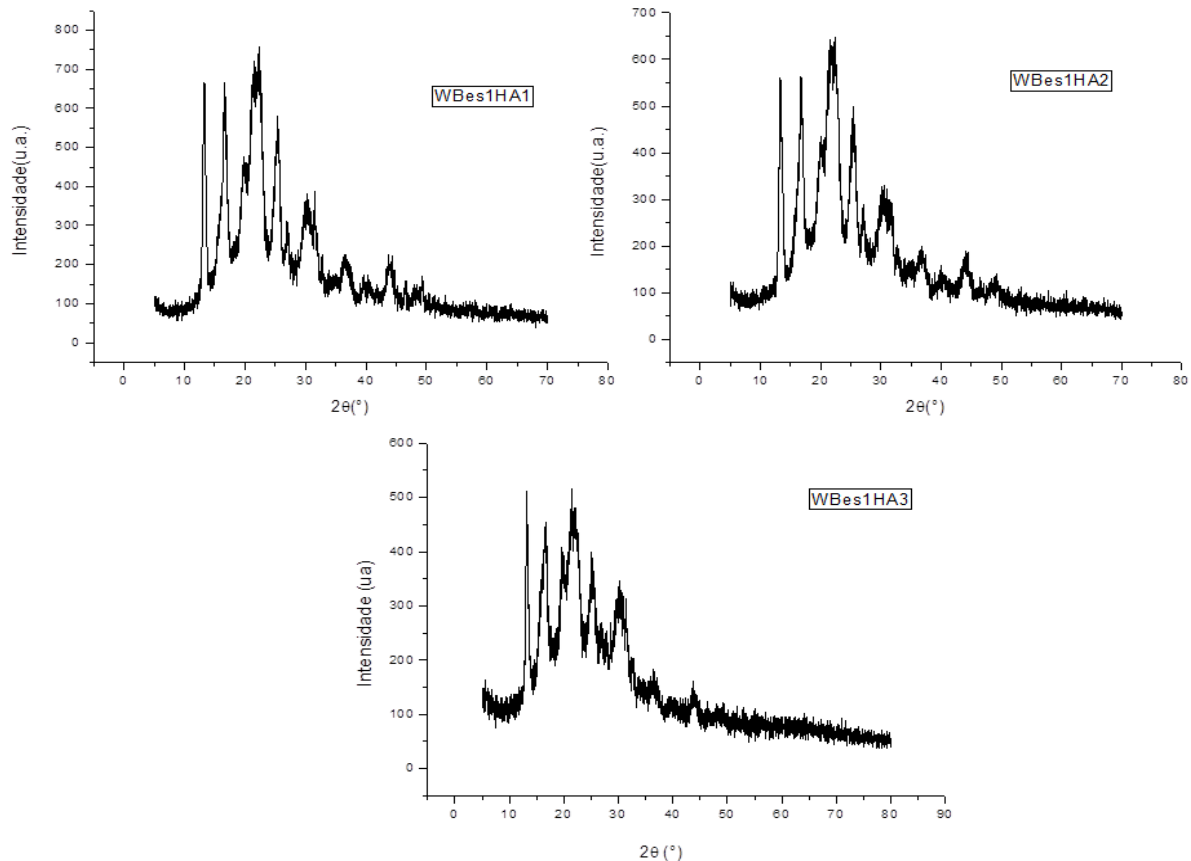


Figura 31 - Difratoograma dos biocompósitos por evaporação de solvente (Fonte:Própria).

Canevarolo (2006) relata que quando uma massa polimérica com capacidade de cristalização é rapidamente resfriada, a partir do fundido para uma dada temperatura entre temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura de fusão (T_m), sua cristalinidade diminui. Quanto mais lento o resfriamento mais cristalino se torna o material.

Siqueira (2009) confeccionou corpos de prova de PHB/HA por prensagem e constatou uma redução de aproximadamente 10% da cristalinidade para o PHB quando inserida a HA, o autor relata que esta redução, provavelmente, foi consequência da interação entre as fases presente nos compósitos.

Analisando o difratograma do WBex (Figura 32), verifica-se que o mesmo suprimiu alguns picos ($2\theta = 20,19^\circ$; $2\theta = 25,74^\circ$; $2\theta = 44,03^\circ$; $2\theta = 64,64^\circ$ e $2\theta = 77,42^\circ$), comparando-se ao difratograma do Pó de PHB e das membranas de WBes5 e WBes10. Possivelmente os picos suprimidos foram devido à orientação das cadeias

que ocorreu devido ao processamento do PHB pela técnica de extrusão. Nota-se que o pico em torno de $2\theta=13,66^\circ$ diminuiu sua intensidade quando comparado ao WBPó, o que indica que o material tornou-se menos cristalino.

Nos difratogramas dos biocompósitos extrudados observou que a HA torna o material menos cristalino, como mencionado anteriormente. A presença da HA limita o número e o crescimento de cristais de PHB. Além deste fator, pode-se inferir que o resfriamento rápido e o tempo menor de conformação do material o tornaram menos cristalino.

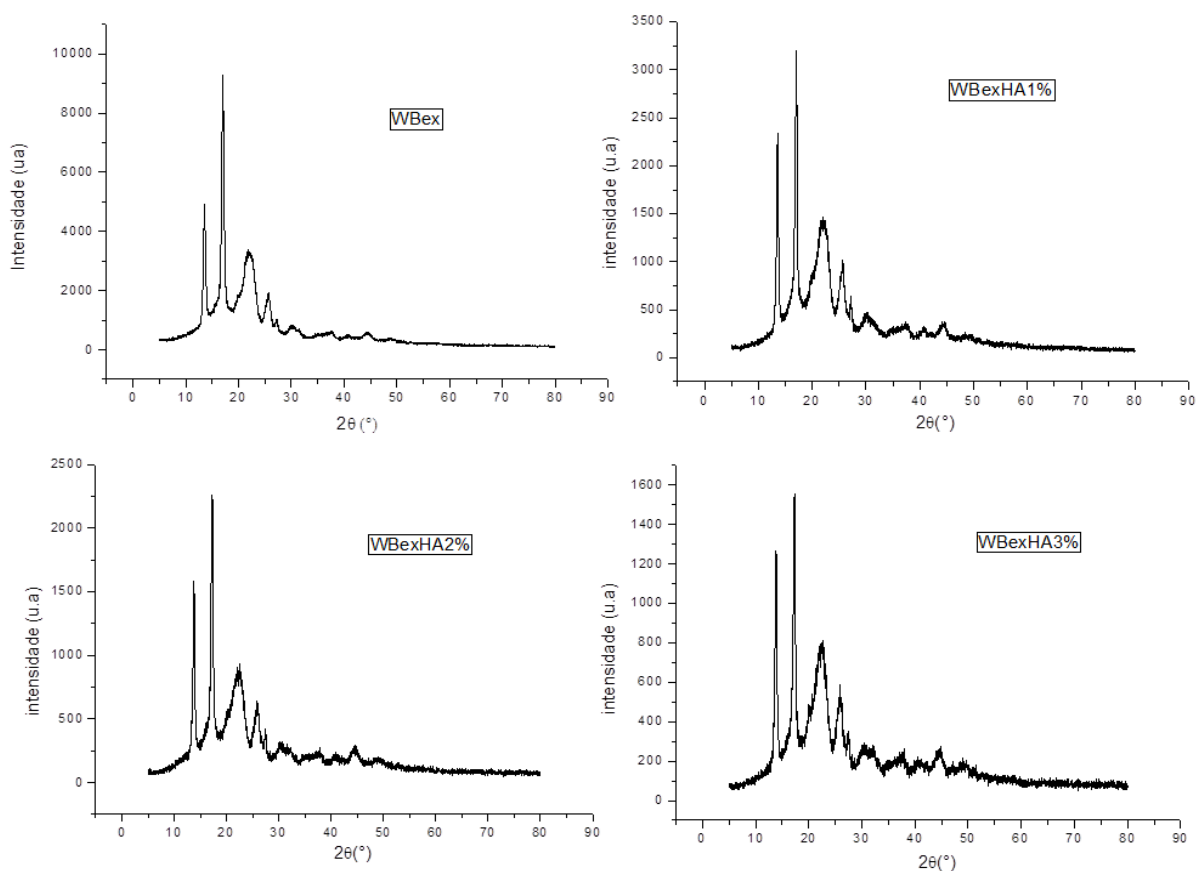


Figura 32 - Difratograma do WBex e dos biocompósitos (Fonte: Pópria)

Comparando os resultados de DRX das membranas e dos biocompósitos extrudados com os obtidos por evaporação de solvente verifica-se que as membranas e biocompósitos extrudados são mais cristalinos, pois tem intensidade de pico mais elevada, no entanto alguns picos foram suprimidos em relação ao WBPó. Em ambas, a adição de HA diminuiu a cristalinidade.

O conhecimento da cristalinidade é de suma importância para os biomateriais, pois ela influencia no desempenho *in vivo* por afetar a reabsorção e suas

propriedades mecânicas. As zonas amorfas são biodegradadas mais rapidamente e conseqüentemente reabsorvidas que as regiões cristalinas (Duarte *et al.*,2004; Conz, Granjeiro e Soares, 2005; Shishatskaya, Khlusov e Volova, 2006).

4.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR foi realizada para avaliar se ocorreu a interação entre os grupos funcionais característicos dos materiais utilizados para obtenção do biocompósito nesta pesquisa. A Figura 33 ilustra o espectro obtido da Hidroxiapatita e a Tabela 10 as bandas de absorção.

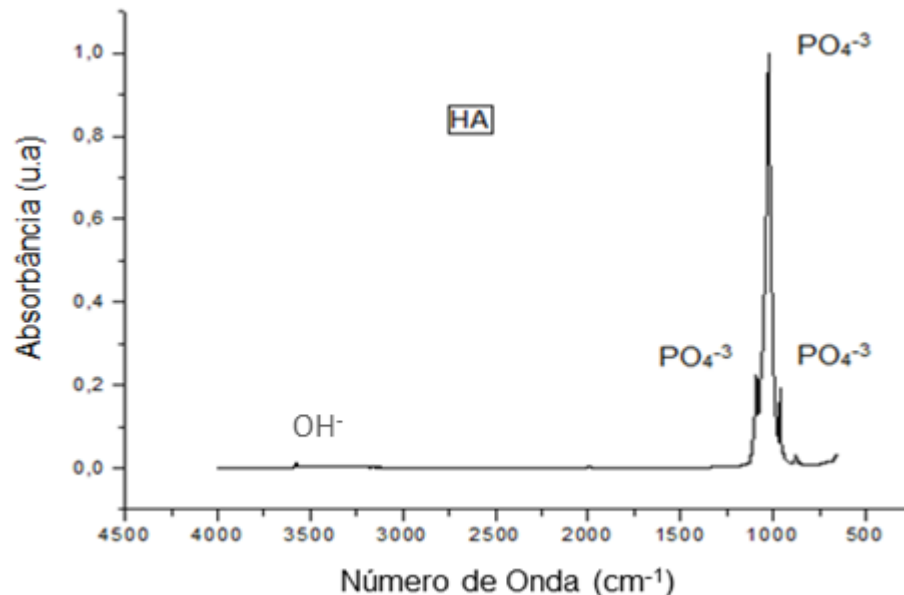


Figura 33 – Espectro de FTIR do pó da Hidroxiapatita (Fonte: Própria).

Analisando o espectro de infravermelho da hidroxiapatita constata-se que o mesmo apresentou as absorções relativas ao grupo fosfato, como o grupo característico PO_4^{3-} , corroborando com os estudos de Oliveira (2009).

Tabela 10 - Bandas de absorção no FTIR do pó da Hidroxiapatita

Região de Absorção (cm^{-1})	Atribuição
3500	Hidroxila
1088	Estiramento assimétrico de PO_4^{3-}
1022	Estiramento simétrico PO_4^{3-}
940	Deformação assimétrica PO_4^{3-} .

Fonte: Gonçalves, Takimi e Bergmann (2011).

O espectro de FTIR da hidroxiapatita sintetizada a partir da casca do ovo foi semelhante aos encontrados por Barros e colaboradores (2015). A Figura 34 ilustra o espectro de FTIR obtido do PHB em pó.

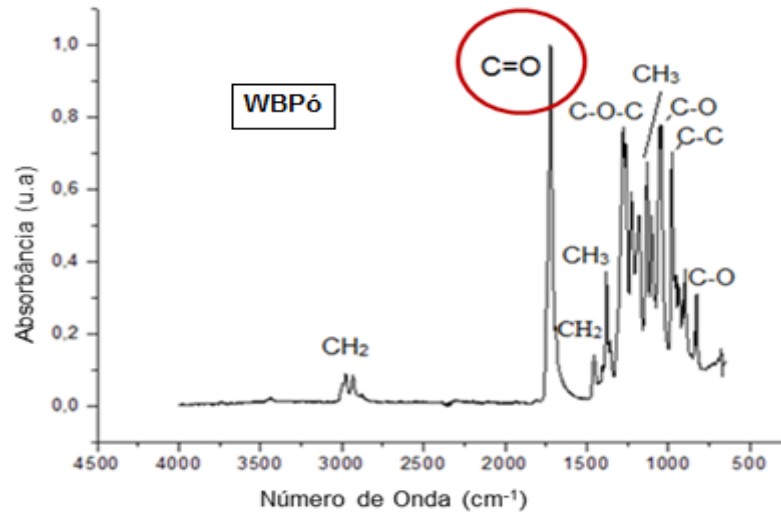


Figura 34 – Espectro de FTIR do WBPó (Fonte: Própria).

Analisando os espectros de FTIR (Figura 34), observam-se as bandas características dos grupos funcionais referentes ao PHB, para os quais são evidenciados seus grupos funcionais na Tabela 11. Tripathi e colaboradores (2013) e Oliveira (2013) obtiveram espectros de FTIR semelhantes aos obtidos nesta pesquisa.

A Tabela 11 ilustra as bandas de absorção do WBPó.

Tabela 11 - Bandas de absorção no FTIR do WBPó.

Região de Absorção (cm ⁻¹)	Atribuição
2972, 2936	Estiramento CH ₂
1714	Estiramento C=O do éster
1460	Deformação assimétrica CH
1373	Deformação assimétrica CH ₃
1264	Estiramento C-O-C
1048	Estiramento C-O
977	Estiramento C-C
824	Estiramento C-O

Fonte: Adaptado de Oliveira (2013); Tripathi, Srivastava e Singh (2013).

Observa-se na Figura 35 semelhança nos resultados das membranas por evaporação de solvente, WBes5 e WBes10, quando comparadas às bandas características encontradas no FTIR do PHB Pó. É possível inferir que a adição do PHB em diferentes proporções para confecção da membrana em clorofórmio não alterou os grupos característicos do PHB.

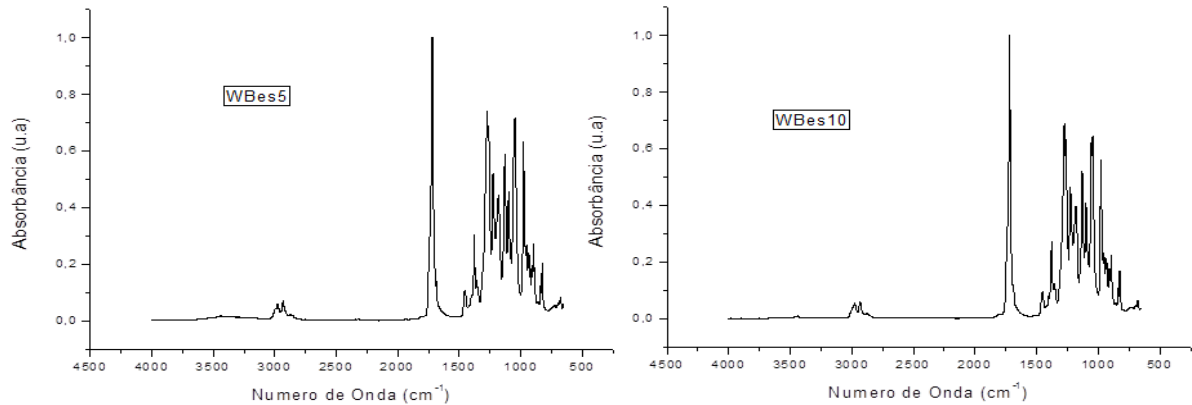


Figura 35 - Espectro de FTIR das membranas de WBes5 e WBes10 (Fonte: Própria).

De acordo com os espectros dos biocompósitos WBes1HA (1%, 2% e 3%), (Figura 36), observou-se que a adição da HA (1%, 2% e 3%) não alterou os grupos funcionais característicos do PHB. Quando comparados os espectros verifica-se um comportamento similar dos biocompósitos.

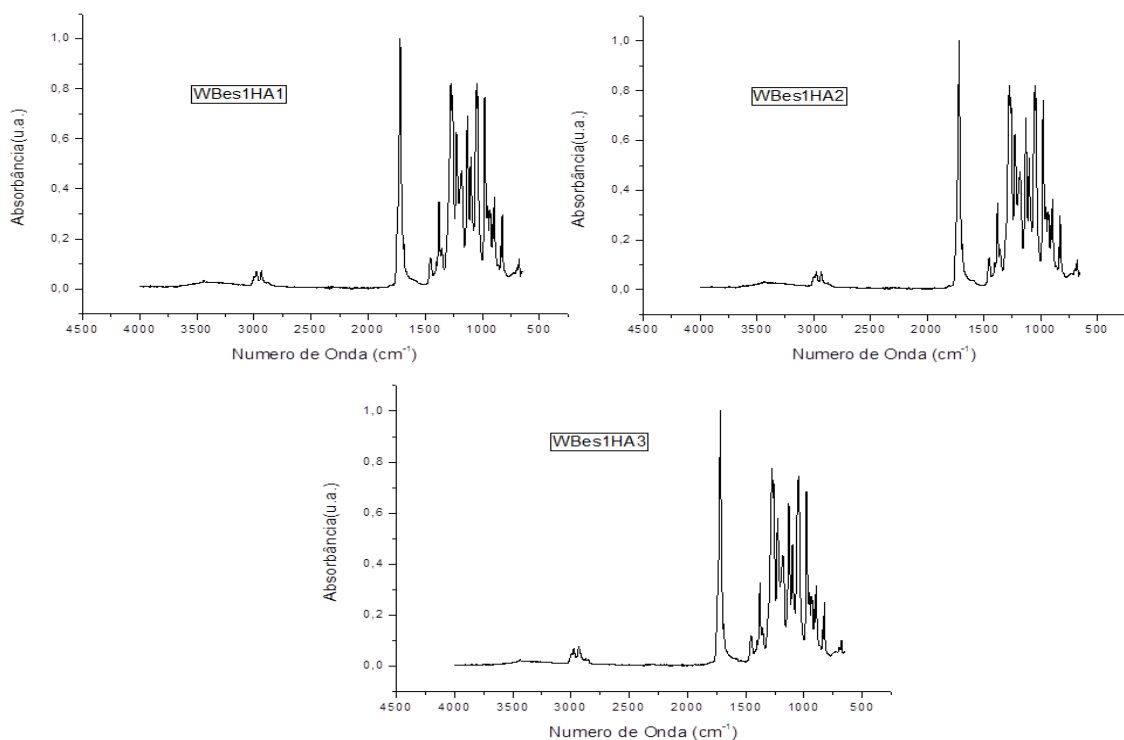


Figura 36 - Espectro de FTIR dos biocompósitos por evaporação de solvente (Fonte: Própria).

A Figura 37 ilustra o espectro da membrana de WBex e dos biocompósitos. Quando comparados os espectros de FTIR das membranas WBex com o WBPó, WBes5 e WBes10 verifica-se o aparecimento de uma banda em torno de 3500 que corresponde à Hidroxila (OH) e a intensificação em torno de 2972 cm^{-1} , banda essa relativa ao estiramento CH_2 . Isto ocorreu devido ao processo de formação das membranas que, após saírem da extrusora, foram submetidas a resfriamento da bobina. Já nos biocompósitos extrudados observou-se que a adição da HA (1%, 2% e 3%) ocasionou discreto aumento na intensidade da hidroxila, além disso a HA não alterou os grupos funcionais característicos do PHB.

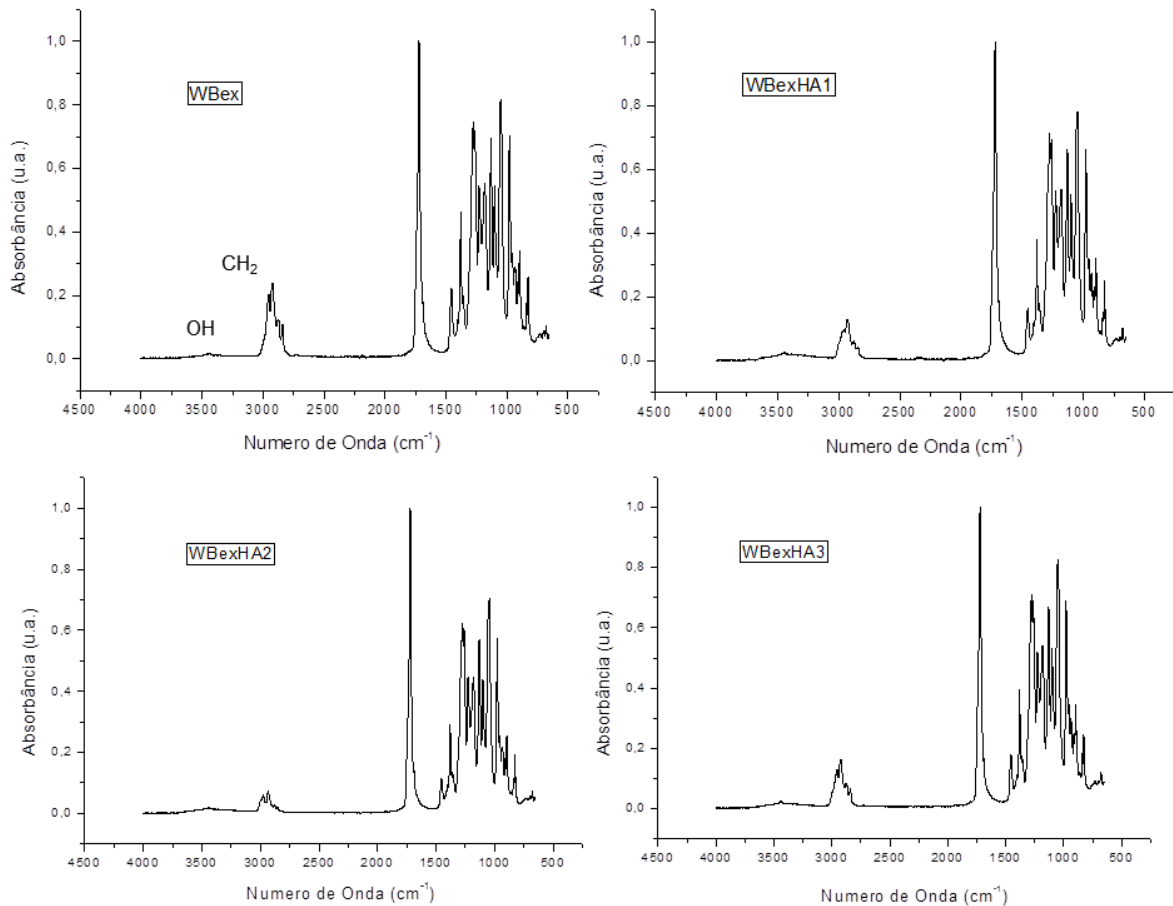


Figura 37 - Espectro de FTIR das membranas de PHBE; PHBEHA1, PHBEHA2 e PHBEHA3 (Fonte: Própria).

Não foi possível visualizar nos biocompósitos obtidos por evaporação de solvente e por extrusão a presença do pico em torno de 1040 cm^{-1} referente ao grupo fosfato (PO_4^{3-}). Este fato, entretanto, não implica dizer que não existe interação entre os constituintes, pois a análise de infravermelho por reflexão total

atenuada (ATR) é um método de análise de superfície (Aimoli, 2007) e as partículas de HA estão recobertas pela matriz de PHB. No entanto, o ensaio de DRX confirmou a formação do biocompósito ocorrida entre os constituintes com a redução da cristalinidade.

Almeida (2006) relata que a interação entre o PHB e HA ocorre pela atração entre os íons Ca^{2+} da HA e do grupo éster (COO^-) do PHB e que a interação entre o PHB e HA é física.

4.5 Termogravimetria (TGA)

A Hidroxiapatita (Figura 38) não apresentou perdas de massa, possivelmente devido à temperatura máxima utilizada neste ensaio, 500°C , e segundo Kayali, Goller, Akin (2011), a hidroxiapatita decompõe-se a temperaturas mais elevadas em relação à que foi realizado o ensaio, podendo também ser comprovado devido à síntese do material ter sido feita a uma temperatura de 900°C .

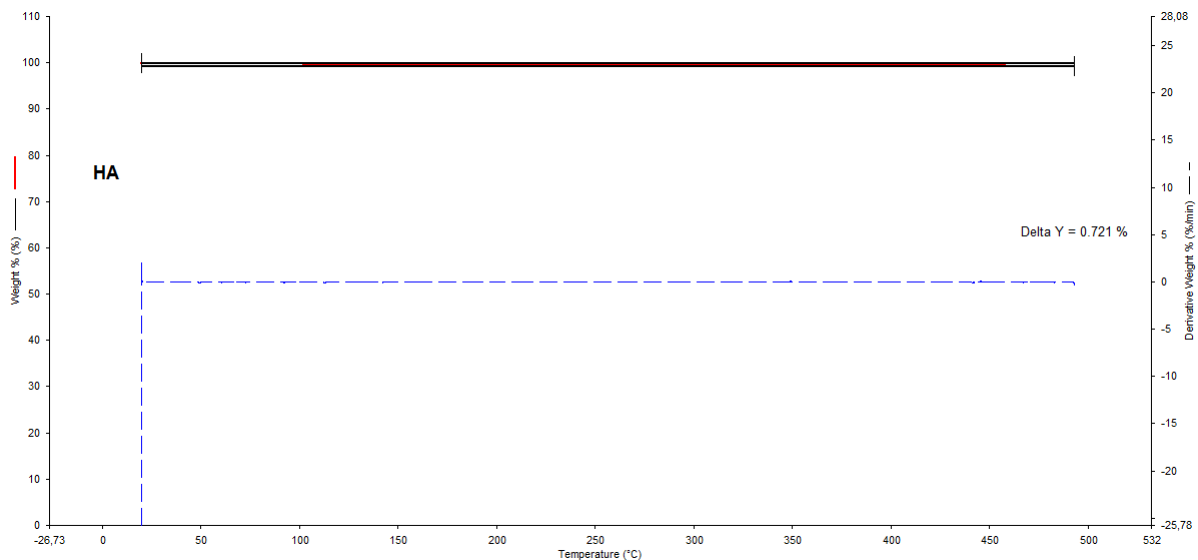


Figura 38 - Resultados do ensaio de termogravimetria da Hidroxiapatita (Fonte: Própria).

Na Figura 39 pode ser verificado o resultado da análise termogravimétrica para a amostra WBPó. As curvas de TG (em vermelho) e DTG (em azul) para esta amostra demonstram que a mesma é termicamente estável até aproximadamente 165°C , apresentando uma etapa de perda de massa a partir desta temperatura.

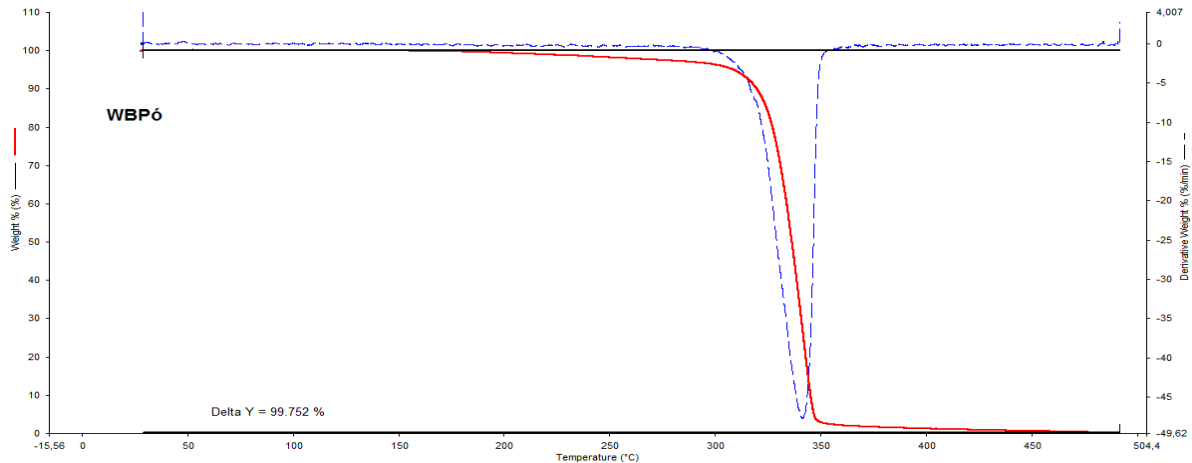


Figura 39 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBPó (Fonte: Própria).

Na curva obtida para WBPó observou-se que a degradação térmica iniciou a em aproximadamente 200 °C e foi acentuada em 300 °C, a curva fornecida pela análise contatou-se que o material degradou 99,752 % em um único passo. Através da curva de DTG verificou-se que a temperatura na qual ocorreu a maior velocidade de degradação do WBPó foi de aproximadamente 340 °C.

Machado (2008) estudou as propriedades térmicas do PHB e, segundo o mesmo, o PHB se degradou em um único intervalo de temperatura entre 245 °C e 320 °C. Quental e Felisberti (2001) estudaram o comportamento térmico do PHB em atmosfera de argônio e ar sintético; sua degradação térmica ocorreu em um único processo de perda de massa e sem diferenças no mecanismo. A perda de massa teve início em 250 °C e em 350 °C todo o material foi volatilizado sem deixar resíduos.

Nas Figuras 40 a 43 pode-se observar a perda de massa das membranas WBes.

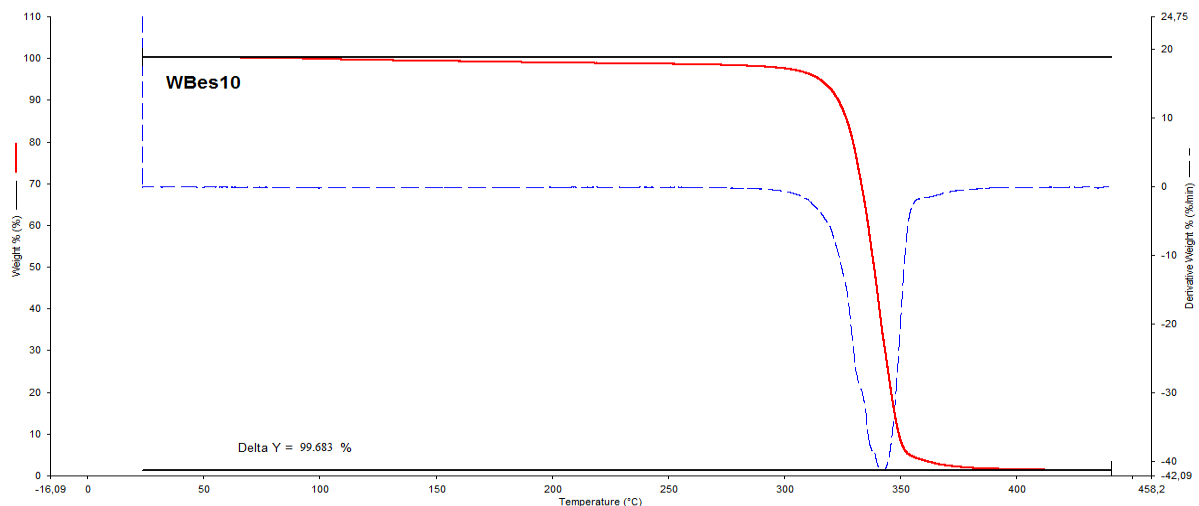


Figura 40- Resultados do ensaio de termogravimetria do WBes10 (Fonte: Própria).

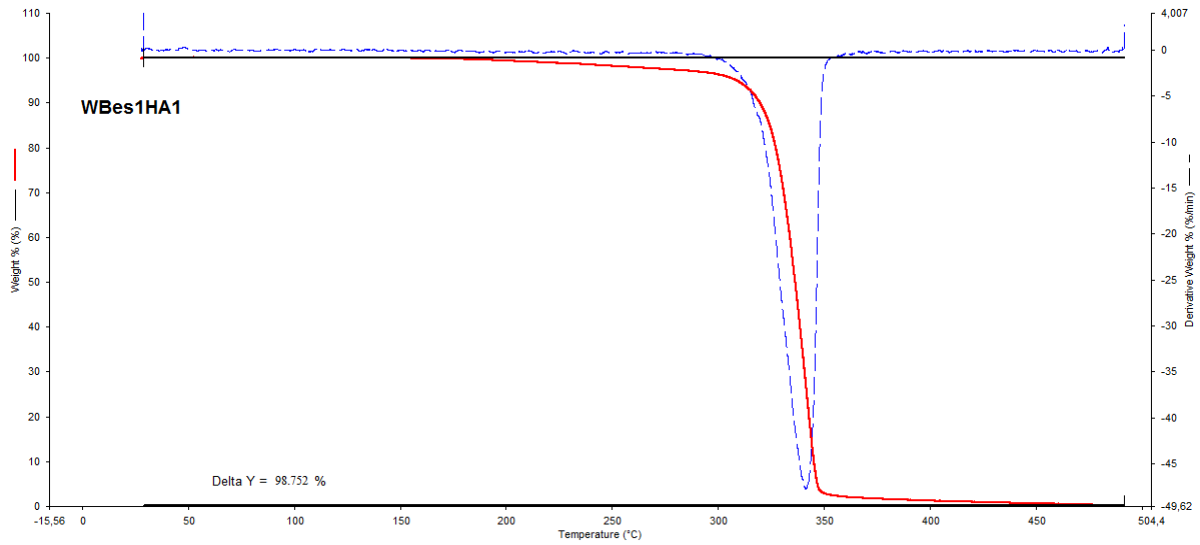


Figura 41 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBes1HA1 (Fonte: Própria).

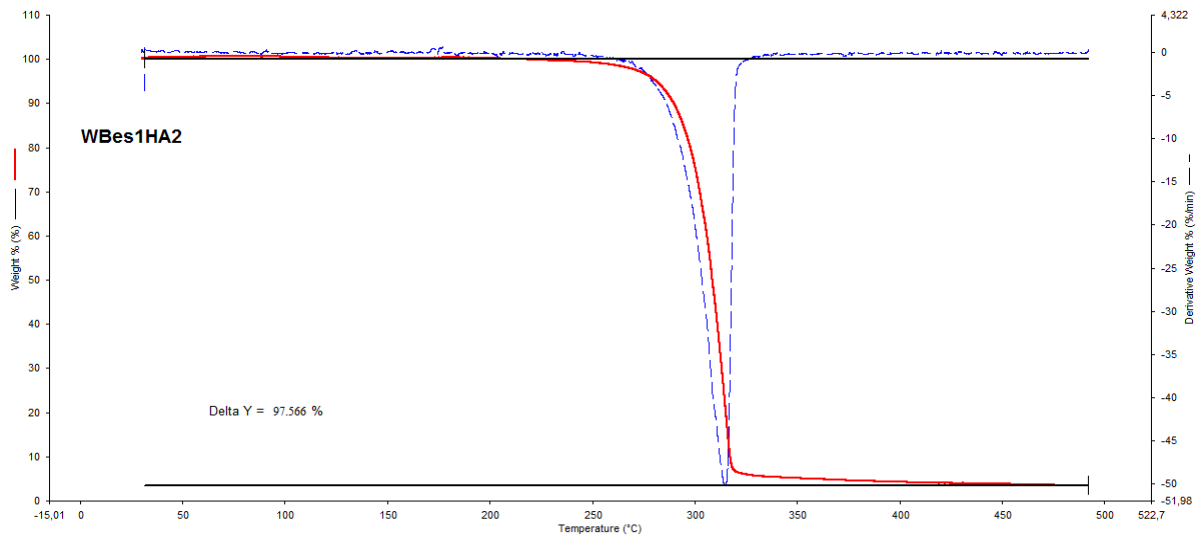


Figura 42 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBes1HA2 (Fonte: Própria).

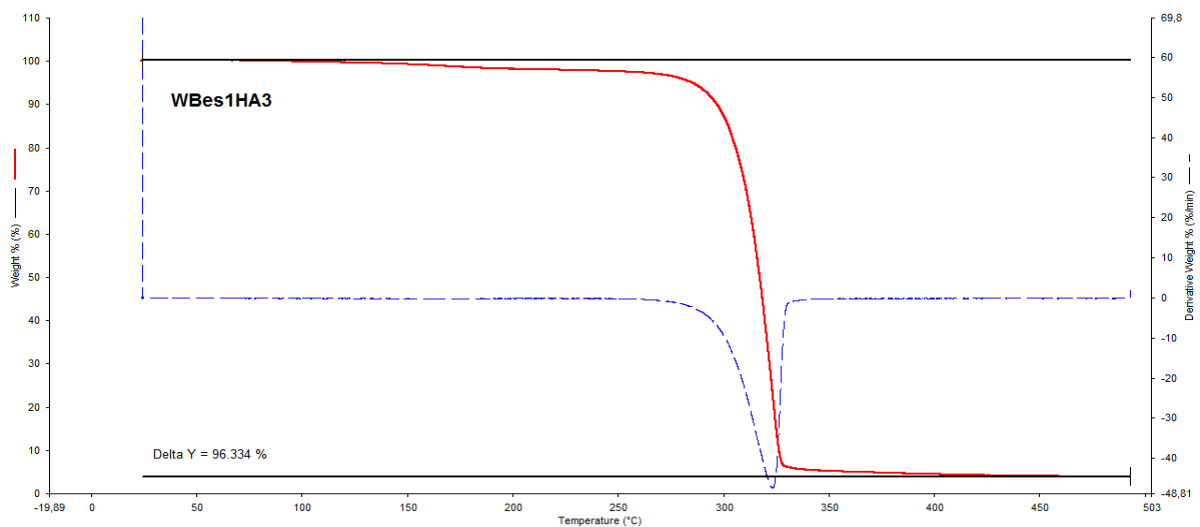


Figura 43 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBes1HA3 (Fonte: Própria).

Analisando as perdas de massa das membranas WBes e seus biocompósitos verifica-se um comportamento similar obtidos do Pó. Verifica-se uma decomposição térmica inicial em aproximadamente 180 °C e na curva fornecida pela análise constatou-se que a degradação máxima do material foi de 96,334 %, em uma única etapa. Através da curva de DTG verificou-se que a temperatura média, na qual ocorreu a maior velocidade de degradação das membranas e biocompósitos foi de aproximadamente 340 °C.

Constatou-se que as membranas tem uma estabilidade térmica em até aproximadamente 170 °C e que a adição da Hidroxiapatita aumentou a quantidade de resíduo devido as suas proporções, pois a mesma não sofre degradação na temperatura realizado no ensaio.

Chen e Wang (2002) estudaram o comportamento térmico de compósitos polihidroxibutirato-polihidroxivalerato (PHB-PHV)/HAP por TGA e observaram que a temperatura de degradação do polímero PHB-PHV diminuiu com o aumento da incorporação de partículas de HAP.

Nas Figuras 44 a 47 pode-se observar a perda de massa das membranas WBex e seus respectivos biocompósitos.

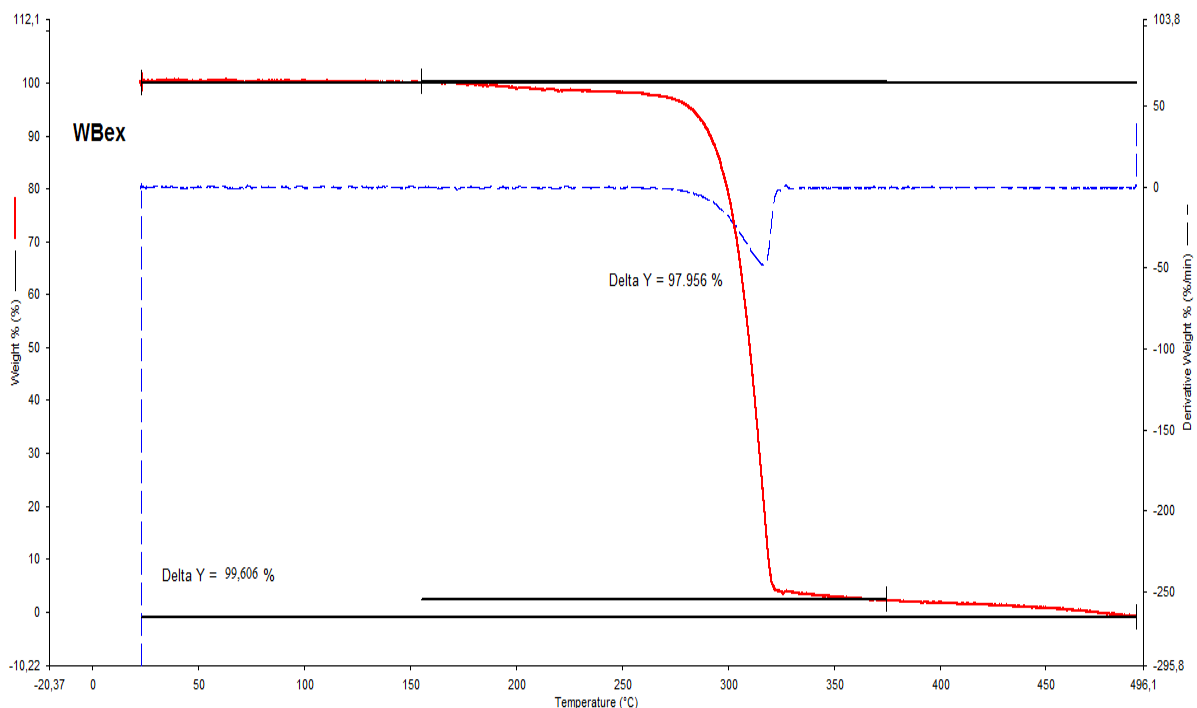


Figura 44 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBex (Fonte: Própria).

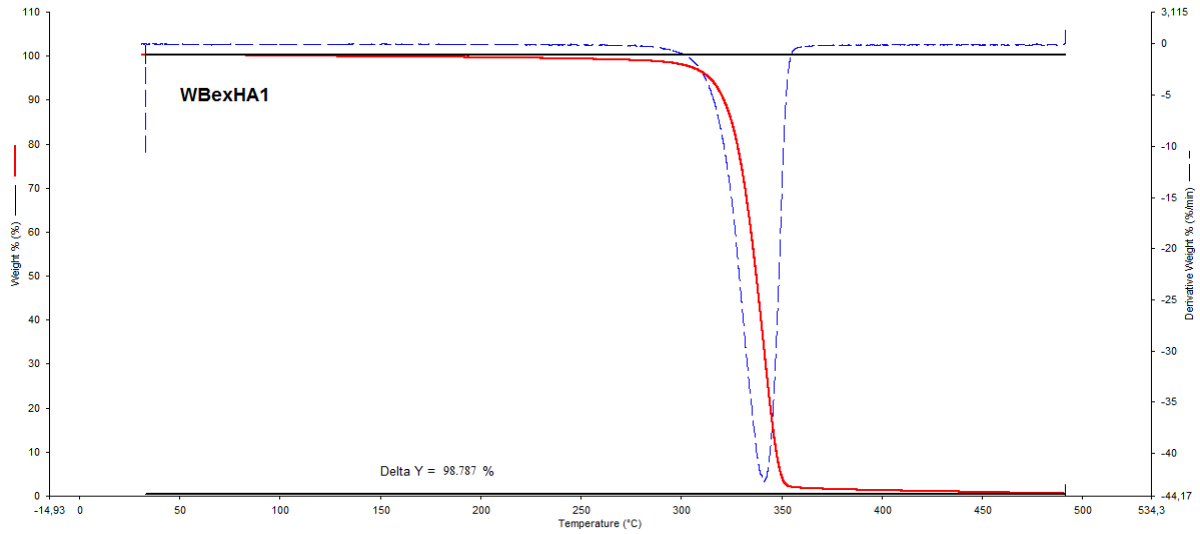


Figura 45 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBexHA1 (Fonte: Própria).

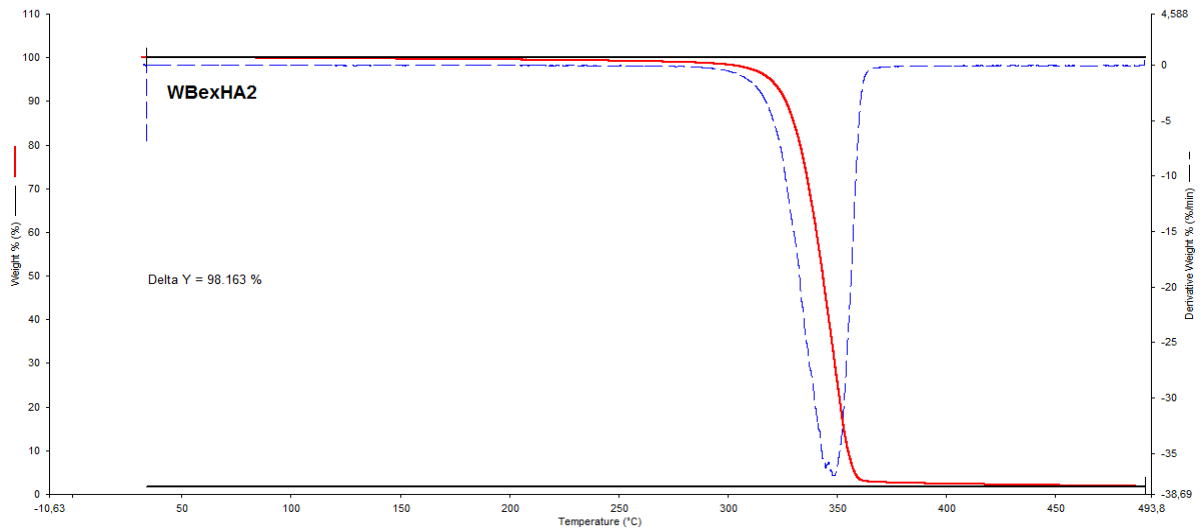


Figura 46- Resultados do ensaio de termogravimetria do WBexHA2 (Fonte: Própria).

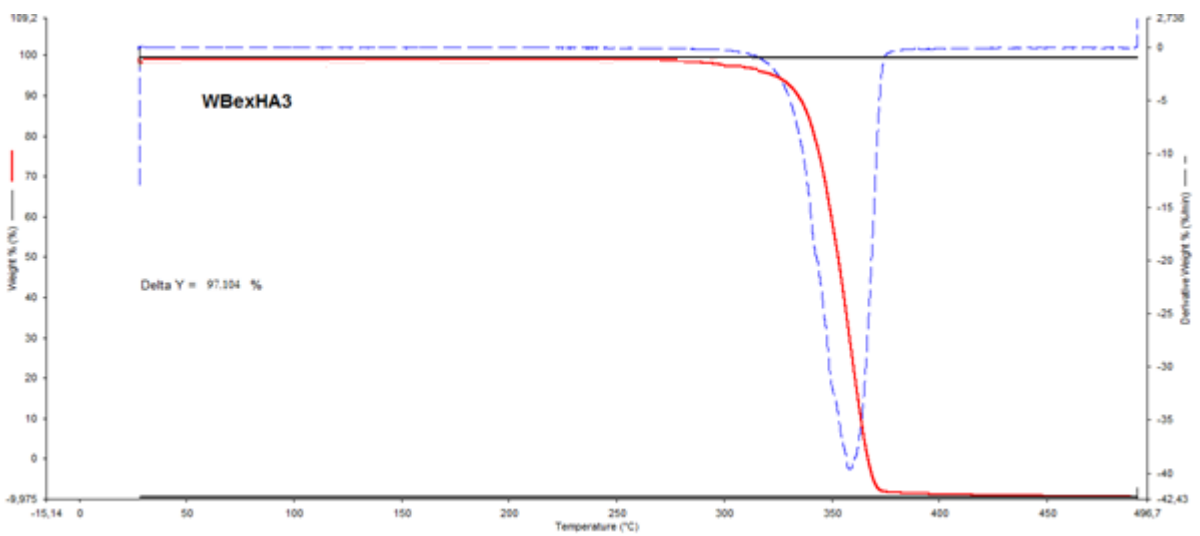


Figura 47 - Resultados do ensaio de termogravimetria do WBexHA1 (Fonte: Própria).

Analisando as perdas de massa das membranas WBex e seus biocompósitos verifica-se um comportamento similar obtidos do Pó. Observa-se uma decomposição térmica inicial em aproximadamente 180 °C e, na curva fornecida pela análise constatou-se que a degradação máxima do material foi de 97,104 %, em uma única etapa.

Nos biocompósitos extrudados foi possível inferir um pequeno aumento na temperatura final de degradação que, possivelmente, aconteceu em decorrência do acréscimo de Hidroxiapatita. Todavia, nos biocompósitos por evaporação de solvente ocorreu uma pequena variação entre eles para mais e para menos na temperatura de degradação, quando comparados com a membrana contendo apenas PHB.

Zhang *et al.* (2006) avaliaram o comportamento térmico de nano-HAP/poliamida 66 (PA66) com diferentes proporções de HAP e constataram que os compósitos degradaram a uma maior temperatura do que o PA66, ou seja, os compósitos apresentaram maior estabilidade térmica do que o PA66. Entretanto, a faixa da temperatura de degradação mostrou-se mais estreita para os compósitos à medida que se aumentou a quantidade de HAP nos mesmos, esta estabilidade ocorreu em virtude de interações entre as fases, devido à formação de pontes de hidrogênio entre o grupo amida (-NH-C=O) do PA66 e o grupo hidroxila (-OH) da nano-HAP.

4.6 Ensaio Mecânico de Tração

Os ensaios mecânicos de tração foram realizados com o propósito de avaliar o módulo elástico, deformação e tensão das membranas e dos biocompósitos.

Para tanto, em conformidade com a norma ASTM D 3039/D 3039M-08, foram preparados e ensaiados 5 corpos de prova para o WBes1 e seus biocompósitos e 10 corpos de prova para cada composição do material de WBex obtido, sendo 5 na direção longitudinal (sentido da extrusão) e 5 perpendiculares à extrusão.

Analisando-se os valores médios do módulo de elasticidade, tensão e deformação dos materiais ensaiados (Tabela 12), pode-se observar que as amostras WBes e WBex (nas duas direções estudadas), apresentaram menor tensão e deformação quando comparadas aos biocompósitos. A resistência à tração e deformação foram maiores nos biocompósitos do tipo WBex no sentido longitudinal.

Tabela 12 - Resistência à tração em relação a membrana de PHBE e os biocompósitos.

	Módulo de Elasticidade (MPa/mm)	Deformação Máxima (%)	Tensão (MPa)
WBes10	780,258	1,19	9,296
WBes1HA1	728,961	1,74	10,895
WBes1HA2	696,189	2,02	12,074
WBes1HA3	686,033	2,24	13,213
WBex (Direção Longitudinal- DL)	1034,38	1,99	20,599
WBex (Direção Perpendicular- DP)	1022,39	1,70	17,382
WBexHA1 (DL)	977,05	2,18	21,385
WBexHA1 (DP)	774,06	2,26	17,503
WBexHA2 (DL)	923,84	2,45	22,640
WBexHA2 (DP)	837,97	2,47	20,672
WBexHA3 (DL)	919,71	2,89	26,669
WBexHA3 (DP)	862,33	2,96	25,537

Fonte: Própria

Quando comprados os biocompósitos verifica-se que os de WBes apresentam menores valores de tensão e módulo elástico que os de WBex provavelmente devido ao tipo de processamento para confecção dos mesmos. De acordo com Pachekoski, Dalmolin e Agnelli (2014), o PHB tem baixa deformação e alto módulo elástico devido ao seu caráter rígido e frágil.

A tensão e deformação nos biocompósitos foram aumentando à medida que HA foi acrescentada na composição, indicando uma redução na cristalinidade como observado no DRX. O módulo elástico é uma medida de rigidez, portanto, quanto maior o módulo, mais rígido é o material. Para os polímeros, o módulo elástico aumenta com o grau de cristalinidade (Freitas, 2014).

Ao analisar o sentido da realização do ensaio de resistência à tração (WBex), verifica-se que no sentido longitudinal os biocompósitos têm uma maior deformação.

O PHB possui uma alta cristalinidade, aproximadamente 80%, que lhe atribui características mecânicas de material rígido e frágil (Koning, 1993). Entretanto,

quando adicionada à carga de HA com diferentes proporções, o material estudado se tornou menos cristalino e, conseqüentemente, mais flexível e menos frágil.

4.7 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

De acordo com os resultados (Figura 48), verifica-se que todas as membranas apresentaram as medidas de ângulo de contato menor que 90° o que indica hidrofiliicidade das mesmas.

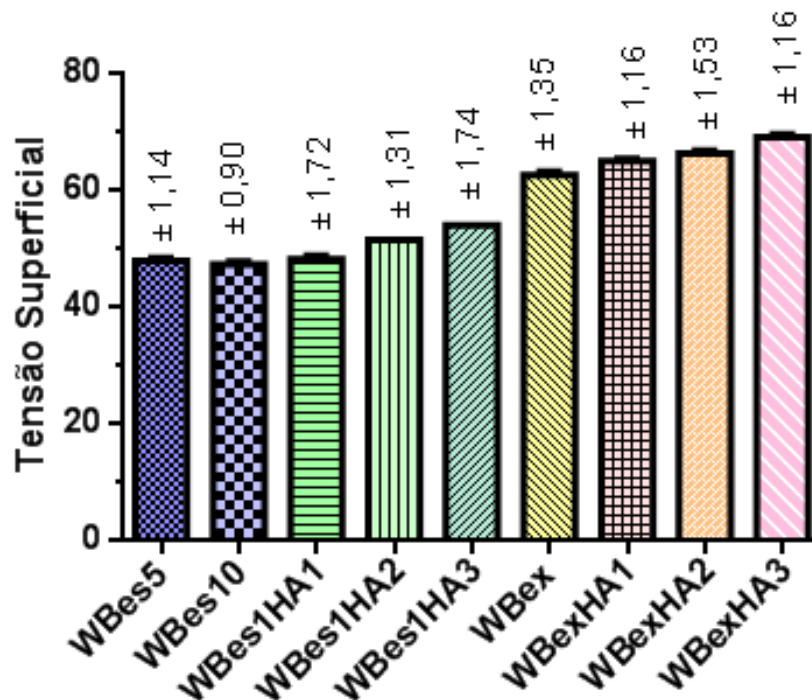


Figura 48 – Tensão Superficial por Medida de ângulo de contato para os diferentes tipos de membranas e biocompósitos (Fonte: Própria).

Comparando as membranas de WBes5 e WBes10, verifica-se que elas têm comportamento similar. Quando inserida a HA, verificou-se que foi diminuída a hidrofiliicidade. Analisando os biocompósitos, constatou-se uma tendência à diminuição da hidrofiliicidade de acordo com o aumento da carga (HA). Desta forma, infere-se que a adição da HA tornou os biocompósitos menos hidrofílicos.

A diminuição da hidrofiliicidade com a adição da HA pode ter sido ocasionada pela interação entre o PHB e HA, através da qual ocorre uma atração entre os íons Ca^{2+} da HA e do grupo éster (COO^-) do PHB.

Sousa (2012) confeccionou membranas de quitosana, vitamina E e fosfato de cálcio nas concentrações de 1%, 3% e 5% e também constatou que a adição do

fosfato tornou suas membranas menos hidrofílicas. Já Oliveira (2013) confeccionou placas de PHB e realizou recobrimento com solução SBF e modificou a superfície do PHB com o peróxido de hidrogênio. Em ambos os resultados, o PHB teve comportamento hidrofílico. Lopes (2011) fabricou filmes de PEBD, PHB e blendas, o mesmo também constatou uma superfície hidrofílica do PHB. Analisando-se esses resultados, pressupõe-se que os biocompósitos têm comportamento receptível com o meio biológico.

4.8 Biodegradação *In Vitro*

Segundo Dallan (2005), a avaliação da degradação de um biomaterial no meio biológico é de suma importância, visto que esta caracterização está diretamente relacionada ao tempo em que o material será absorvido pelo organismo após sua inserção ou utilização no corpo. Esse ensaio teve como objetivo analisar a ação da solução tampão fosfato (PBS) sem e com lisozima no processo de degradação das membranas. Os resultados para perda de massa no período máximo de 60 dias pode ser verificado na Tabela 13.

Tabela 13 - Perda de massa percentual das membranas de PHB e dos biocompósitos submetidos a ensaios de biodegradação.

Ensaio	PERDA DE MASSA DAS MEMBRANAS 15, 30 e 60 DIAS DE ENSAIO (%)					
	PBS			Lisozima/PBS		
	15 dias	30 dias	60 dias	15 dias	30 dias	60 dias
WBes10	0	0	0,05	0	0,02	8,91
WBes1HA1	0	0	0,10	0	0,11	12,13
WBes1HA2	0	0	0,16	0	0,15	15,02
WBes1HA3	0	0	0,20	0	0,19	21,18
WBex	0	0	0,14	0	0,09	7,18
WBexHA1	0	0	0,19	0	0,10	9,81
WBexHA2	0	0	0,22	0	0,12	13,87
WBexHA3	0	0	0,31	0	0,17	19,52

Fonte: Própria

Foi observado que, em todas as amostras, a degradação foi mais acentuada sob a ação da lisozima, o que demonstra a eficiência desta enzima na degradação dos biocompósitos. Comparando os valores encontrados, verifica-se que os compósitos com maior quantidade de hidroxiapatita tem uma maior degradação quando submetidos à lisozima.

A degradação pode estar relacionada a regiões amorfas e possivelmente ao desprendimento das partículas de HA. O resultado corrobora com o ensaio de Difração de Raios X e de Tração, visto que os biocompósitos menos cristalinos apresentaram maior biodegradação. As regiões amorfas dos biocompósitos WBex foram visualizadas no MEV por meio da diferença de densidade.

4.9 Citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica das membranas foi realizada pelo método do MTT e teve por objetivo avaliar a viabilidade das células em face do material produzido para uso em organismos vivos, pois todo material que tem por finalidade ser utilizado em ser vivo deve, como regra de segurança, não ser tóxico e ser biocompatível. Os resultados de citotoxicidade das membranas WB estão ilustrados na Figura 49.

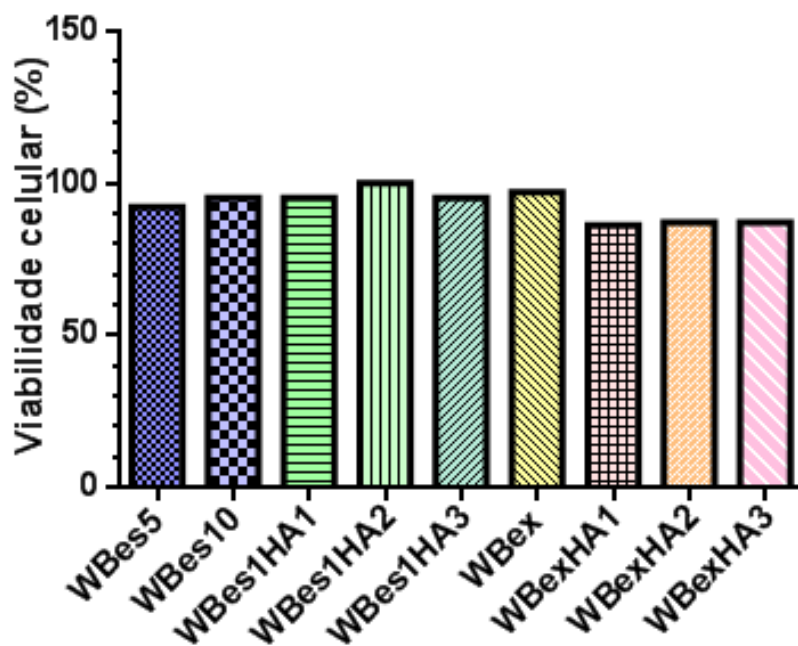


Figura 49 - Viabilidade celular das membranas de PHB (Fonte: Própria).

Quando comparado o percentual de citotoxicidade das membranas com o valor mínimo determinado por Bispo (2009), que é de 50%, e pela norma ISO 10993-5:2009 que é de 70%, pode-se afirmar que todas as membranas apresentam-se viáveis uma vez que encontraram-se com percentual de viabilidade acima de 80%.

Resultados semelhantes foram encontrados por Malmonge e colaboradores (2015), no qual o PHB não foi considerado citotóxico. Siqueira (2009) também enfoca que biocompósitos formulados, PHB/HA, nas distintas composições, não apresentaram citotoxicidade e não desenvolveram resposta inflamatória acentuada, sendo considerados biocompatíveis.

Conclusão

Neste tópico estão apresentadas as conclusões deste estudo realizado.



5 CONCLUSÕES

Todos os biocompósitos desenvolvidos indicaram ser viáveis como biomaterial, pois não apresentaram citotoxicidade, o que confirmou a sua biocompatibilidade. Os mesmos apresentaram biodegradabilidade e hidrofiliçidade indicando assim que os biocompósitos podem ser confeccionados para um posterior contato com o corpo humano, além da ação bioativa da HA que poderá favorecer o crescimento do tecido ósseo.

As propriedades mecânicas observadas no biomaterial confeccionado por evaporação de solvente apresentaram-se potencial para utilização na regeneração óssea e tecidual guiada, visto que a HA tornou o material menos frágil, o que permite seu uso, e, por conseguinte, preparando o espaço para formação do coágulo sanguíneo e formação do novo tecido.

Conclui-se que o biocompósito por evaporação de solvente WBes1HA3 é o melhor a ser utilizado em testes *in vivo* para regeneração tecidual e óssea guiada, devido a sua superfície homogênea, a sua flexibilidade e biodegradabilidade.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Filtrar e pesar a membrana para que seja obtida uma mesma sem partículas insolúveis de PHB e constatar sua concentração final;
- Iniciar a fase experimental *in vivo* e, posteriormente, percorrer todas as etapas de estudos clínicos em humanos;
- Adicionar um plastificante para melhorar as propriedades mecânicas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUKAWA, H. et al. The Engineering of Craniofacial Tissues in the Laboratory: A Review of Biomaterials for Scaffolds and Implant Coatings. **Dent. Clin. North. Am.**, v. 50, p. 205-216, 2006.

AHMED, S.; AHSAN, M.; Synthesis of Ca-hydroxyapatite bioceramic from egg shell and its characterization. Bangladesh **Journal of Scientific and Industrial Research**. No. v. 43 n. 4, pg. 501-512, 2008.

AIMOLI, C. G. **Investigação da Adequação de Membranas de Quitosana Quimicamente Modificadas para Uso como Biomaterial: Estudo da Calcificação *in vitro***. 2007. 187f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Curso de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas – Faculdade de Engenharia Química.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**, 2001. 10, S96-101.

ALMEIDA, C. M. S. **Análise por XPS e AFM da superfície de blendas de PVC/PHB**. 2005. Dissertação de Mestrado apresentada à Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Física, Departamento de Física, Rio de Janeiro. 92f.

ALMEIDA, R. S. FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPÓSITOS A PARTIR DE NANO-HIDROXIAPATITA. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais). Universidade Estadual do Norte Fluminense - RJ

ALMQVIST, N.; THONSON, N. H.; SMITH, B. L. Methods for fabricating and characterizing a new generation of biomimetic materials. **Materials Science & Engineering**. v. 7; p. 34-43, 1999.

ALVES, E. G. L.; REZENDE, C. M. F.; SERAKIDES, R.; PEREIRA, M. M.; ROSADO, I. R. Orthopedic implant of a polyhydroxybutyrate (PHB) and hydroxyapatite composite in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, p. 546-552, 2011.

AMARAL, I. F.; BARBOSA, M. A.; BARRIAS, C. C.; CAVALHEIRO, J.; FERRAZ M. P.; GRANJA, P. L.; LOPES M. A.; MARTINS M. C. L.; MONTEIRO F. J.; RIBEIRO C. C.; SANTOS, J. D.; SOUSA, S. R.; QUEIROZ, A. C. **Biomaterials**. In: Biotecnologia, Lidel, (2003) 377-397

AN, H. Y.; WOOLF, S. K.; FRIEDMAN, R. J. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2635-2652, 2000

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, V. 21, n.7, p. 667- 681, 2000.

APARECIDA, A. H.; Fook, M. V. L.; Santos, M. L.; Gustaldi, A. C. Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Química Nova**, v.30, n.4,p.892-896, 2007.

ARAÚJO, J. C.; SENA, L.; BASTOS, I. N.; SOARES, G. D. A. Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-x. **Química Nova**, Vol. 30, n. 8, 1853-1859, 2007.

ARRUDA, E. R. B., RODRIGUES, N.C., TACIRO, C., PARIZOTTO, N.A. Influência de diferentes comprimentos de onda da laser terapia de baixa intensidade na regeneração tendínea do rato após tenotomia. **Rev. Bras. Fisioterapia**, v.11, n. 4, p. 283-288, 2007

ASTM, AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **D 3039/D 3039M - 08**: Standard Test Method for Tensile Properties of Polymer Matrix Composite Materials. Pennsylvania, 2008.

ASTM International: F1635-04 Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants.

ASTM International: F2103-01 Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications, 2007.

AVEROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behavioursII. **Carbohydrate Polymers**. v. 56 n. 2. p. 111-122, 2004.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES S. A.; BEZERRA D. C.; LIA FOOK M. V.; COSTA A. C. F. M.; Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, nº 3, p.27-34, 2007.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA, C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, nº 1, p. 13-21, 2005

BARROS, E.S.A.; PEREIRA, C.L.; RODRIGUES, E.M.S.; CORRÊA, J.A.M.; DOS REIS, M. A. L. Hidrotalcita-Hidroxiapatita dopados com nanotubos de carbono: Síntese e caracterização. **14º Encontro de Profissionais da Química da Amazônia**, 2015.

BARUD, H. S.; SOUZA, J. L.; SANTOS, D. B.; CRESPI, M. S.; RIBEIRO, C. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial cellulose/poly (3-ydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1279–1284, 2011.

BERTOCHI, M. Z. Scaffolds de Polihidroxibutirato **Construído por Prototipagem Rápida Funcionalizados com Hidroxiapatita e Peptídios Osteogênicos**. 2013. 86 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia-Bioquímica). Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

BIOCYCLE, PHB INDUSTRIAL. Indústria produtora de plástico biodegradável. Disponível em: <<http://www.biocycle.com.br>>. Acesso em: 13 de Fevereiro 2015.

BISPO, V. M. **Estudo do efeito da reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA**. 2009. 140p. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Minas), Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

BOEREE, N. R.; DOVE, J.; COOPER, J. J.; KNOWLES, J.; HASTINGS, G. W. Development of a degradable composite for orthopaedic use: mechanical evaluation of an hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite material. **Biomaterials**, v.14, n.10, p.793-796, 1993.

BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. M. F.; RIBEIRO, M. F. B.; MELO, E. G.; NETO, P. I. N. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia de cão: aspectos à microscopia de transmissão. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.52, n.6, p.616-620, 2000.

BOSS J. H, SHAJRAWI I., AUNULLAH J., MENDES, D. G., The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. *Isr J Med Sci.*; V. 31, p. 203-9, 1995.

BROTSKI, R., 2015. <http://protese-dentaria.org/2010/02/21/canal-de-dente-como-tratar-e-o-que-e-isso/> . Acesso em 10 de junho 2015.

BROWN, B.H., SMALLWOOD, R. H., BARBER, D. C., LAWFORD, P.V., House DR. Medical physics and biomedical engineering. Bristol: IOP; 1999.

BUCCI, D. Z. **Avaliação de embalagens de PHB (Poli (Ácido 3 - Hidroxibutírico)) para alimentos**. 2003. 146 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

BUCKLEY, C.T.; O'KELLY, K.U.: Topics in Bio-Mechanical Engineering. Trinity Centre for Bioengineering & National Centre for Biomedical Engineering Science, Dublin, Ireland, p.147-166, 2004.

BURG, K.J.L.; PORTER, S.; KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, p. 2347-2359, 2000.

BUSER, D., DAHLIN, C., SCHENK, R. K., Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Publ.; 1994.

Calculated. Programa X'Pert HighScore Plus PCRD. From ICSD using POWD-12++, 1997.

CALIMAN, L. B. (2011) **Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida a partir da casca de ovo de avestruz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) – Vitória – ES - Instituto Federal do Espírito Santo – IFES.

CANEVAROLO Jr, S. V. Ciência dos Polímeros 2ª Edição "Sebastião V. Canevarolo Jr. Editora Artliber, 2006.

CANTISANO, W. PALHARES, W. R., SANTOS, H. J. **Anatomia dental e escultura**. 3ª Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1987.

CARRANZA, F. A. Periodontia Clínica de Glickman. 5. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1983.

CASARIN. S. A. **Blendas de PHBV e PCL para uso em dispositivo de osteossíntese**. Tese de Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de São Carlos, 2010.

CHEN, L. J., WANG, M. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB-PHV copolymer. **Biomaterials**, 23:2631-2639. 2002.

CHENG, S.; CHEN, G.Q.; LESKI, M.; ZOU, B.; WANG, Y.; WU, Q. The effect of d,β-hydroxybutyric acid on cell death and proliferation in L929 cells. **Biomaterials**, v.27, n. 20, p.3758-3765, 2006.

CHOW, L. C., Next generation calcium phosphate-based biomaterials. **Dent. Mater. J.**, v.28, n.1, p.1-10, 2009.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M. SOARES, G. A. - J. Appl. Oral Sci., 13, p.136 (2005). PMID:18509122.

CORTELLI JR, LOTUFO RFM, OPPERMANN RV, SALLUM AW. Glossário da Sociedade Brasileira de Periodontologia e Texto de posicionamento científico. São Paulo: SOBRAPE. 2005;15(4).

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G., CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, C. V.; LIRA, H. L., **Rev. Eletr. Mater. Proc.** 43 (2009) 29-38.

COUTINHO, B. C., MIRANDA, G. B. SAMPAIO, G. R. SOUZA, L. B. S. SANTANA, W. J. COUTINHO, H. D. M. A importância e as desvantagens polihidroxibutirato (plástico biodegradável), *Holos*, Dezembro 2004.

CRUZ, M. **Regeneração Guiada Tecidual**. 1 ed. Ed. Santos, cap. 3, p. 75-83, 2006.

DACULSI G, PASSUTI N. Effect of the Macroporosity for Osseous Substitution of Calcium phosphate Ceramics. **Biomaterials** v.11, p.86-7, 1990.

DAHLIN, C.; GOTTLAW, J.; LINDE, A.; NYMAN, S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. A experimental study in monkeys. **Scand J Plast Reconstructive Hand Surg.** v. 24, n.1, p.13-19, 1990.

DALAPICULA, S. S.; VIDIGAL JR., G. M.; CONZ, M. B.; CARDOSO, E. S.; Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas - Uma revisão crítica. **Implant News.** v. 3, n. 5, pg. 487-491, 2006.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele.** Universidade Estadual de Campinas, Campinas. (Tese). 2005. 194f.

DAREA, E. V.; GRIFFITHA, M.; POITRASB, P.; KAUPPC, J. A.; WALDMANC, S. D.; CARLSSOND, D. J.; DERVINE, G.; MAYOUXD, C.; HINCKEA, M. T. Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissueengineered regeneration. *Cells Tissues Organs*. v.189, p.1-13, 2009.

DAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G.; *Microscopia Eletrônica de Varredura, Aplicações e preparação de amostra, materiais poliméricos, metálicos e semicondutores [recurso eletrônico].* Edição do CEMM - Centro de Microscopia e Microanálises do IDÉIAPUCRS - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento. ISBN: 978-85-7430-70-2. Porto Alegre : EDIPUCRS, 2007.

DEE, K.C., RUEGER, D.C., ANDERSEN, T.T., BIZIOS, R., Conditions wich promote mineralition at the bone-implant interface: a model in vitro study. **Biomaterials**, v. 17. n°2, p.209-215, 1995.

DOBLARÉ, M. & GARCIA, J. M. Anisotropic bone remodeling model based on continuum damage-repair theory. **Journal of Biomechanics**, vol. 35, pp. 1 -17. 2002.

DOBLARÉ, M. & GARCIA, J.M. & GÓMEZ, M. J., Modeling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 71, p. 1809 – 1840, 2004

DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M.; SOGA, K. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl Microb. Biotechnol.* v. 28, p. 330-334, 1988

DUARTE, M.A.T. **Estudo do processamento e da biodegradação do poli(3hidroxibutirato) e de suas blendas com poli(ε-caprolactona).** Joinville. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2004

DUARTE, M.A.T.; JÚLIO, C.F.; MARTINS, E.S.; PESSIN, S.H. Estudo da compactação a frio de poli(3-Hidroxibutirato) - Morfologia e resistência à compressão. **Revista Matéria**, v.9, n.4, p. 386-391, 2004.

DUMITRI, S.; VIDAL P.; CHORNET E. Hydrogels based on polysaccharides. In: *Polysaccharides in medicinal applications.* **Wiley**. p. 125-194. 1996.

E´GUES, M. A. M. **Compósito de colágeno consilicato e hidroxiapatita como material paraendodontia.** Dissertação (Mestrado). Programade Pós-Graduação Interunidades emBioengenharia; Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de RibeirãoPreto, Instituto de Química de São Carlos,USP. São Carlos, 2005.

FIORELLINI, J.P, KIM, D.M, ISHIKAWA, S.O. A gengiva. In: NEWMAN, M.G. *et al.* Carranza, periodontia clínica. 10. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2007. p. 4649.

FOOK, M. V. L., 2005. 128 f, **Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra-peso molecular para aplicação como biomaterial**. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara,

FREED, L. E., MARQUIS, J. C.; NOHRIA, A., EMMANUAL, J., MIKOS, A. G. & LANGER, R. – **Journal Biomed. Mater. Res.**, v. 27, p.11. 1993.

FREITAS, R. L. M. Efeito da temperatura de resfriamento sobre as propriedades de polímeros amorfos e semicristalinos. 2014. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Engenharia de Materiais) Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. Formation of Calcium deficient Hydroxyapatite at near-physiological temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 3, p. 299-305, 1992.

FUZARI, J, G. C. **Obtenção e caracterização de filmes de PHB e de blendas de PHB com borracha natural**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2008.

GALEGO, N.; ROZSA, C.; SANCHE, R.; FUNGF.; VAZQUEZ, A.; TOMAS, J. S. Characterization and application of poly(b-hydroxyalkanoates) family as composite biomaterials. **Polymer Testing**, v.19, p.485–492, 2000.

GOLDMAN, M. J. Bone regeneration around a failing implant using guided tissue regeneration: a case report. **J. Periodont.** Chicago, v. 63, n. 5, p. 473- 476, May 1992.

GOMES, J.G.C.; BUENO N.C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Eng. Química**. v. 17, p. 24-29, 1997.

GONÇALVES, R.; TAKIMI, A.; BERGMANN, C. P. **Síntese e caracterização de hidroxiapatita substituída com Si produzida pelo método de neutralização**. Salão de Iniciação Científica. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2011.

GOUGH, J. E. Cartilage tissue engineering. In: Tissue engineering using ceramics and polymers. Ed. Boccaccini, A. R.; Gough, J. E. Taylor & Francis Books: B R, 2007.

GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H., Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2010. **Química Nova**. v. 33, n.6. p. 1352-1358. 2010

HABIBOVIC, P. et al., Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. **Biomaterials**, v. 29, n. 7, p. 944-943, 2008.

HARDWICK, R.; HAYES, B.K.; FLYNN, C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. **J Periodontol**, v. 66, n.6, p.495-505, 1995.

HENCH, L. L., WILSON, J., An Introduction to Bioceramics. London: World Scientific Publishing Company. 2012. 500p.

HENCH, L. L. The challenge of orthopaedic materials. *Current orthopaedics*, v. 14, p.7-15, 2000.

HISIONG, S. X., MOONEY, D. J., Regeneration of vascularized bone. *Periodonto* 2000,v.41,p.109-22, 2006.

HOCKING, J., MARCHESSAULT, R. H. Biopolyesters, In: G. F. L. Griffin (Ed.), *Chemistry and Technology of biodegradable Polymers*, Chapman and Hall, London, p. 48-96, 1994.

HUBBELL, J. A. - *Biotechnology*, v. 13, p.565.1995.

HUGHES, J. M., CAMERON, M., CROWLEY, K. D., Programa X'Pert HighScore Plus PCRD. From ICSD. *Am. Mineral.*, 74, 870, (1989)

IBGE. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/> . Acesso em 03 Março. 2016.

IMAIZUMI, H.; SAKURAI, M.; KASHIMOTO, O.; KIKAWA, T.; SUZUKI, O. Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcified Tissue International*, v. 78,p. 45-54, 2006.

ISO 10993-5, 2009, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

JALILI, K.; ABBASI, F.; OSKOEI, S. S.; ALINEJAD, Z. Relationships between The morphology, swelling and mechanical properties of poly(dimethyl siloxane)/poly (acrylic acid) interpenetrating networks. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.2, n.5, p.534-541, 2009.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H.G. Biodegradation of polyhydroxyaldanoic acids. Mini-review. *Appl Microbial Biotechnol.* v. 46, p.451-456, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004. 136 p.

JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J. *Basic histology : text & atlas*. 11th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005.

KAMALANATHAN, P. S. RAMESH, L. T. BANG, A. NIAKAN, C.Y. TAN, J. PURBOLAKSONO, HARI CHANDRAN, W. D. TENG. Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. *Elsevier Ceramics International*. v. 40. p. 16349–16359. 2014.

KAPLAN, D. L. Introduction to Biopolymers from renewable resources. In: *Biopolymers from renewable resources*, Springer-Verlag, (1998) 1-29.

KAYALI, E. S; GOLLER, G; AKIN, I. BIOCERAMICS, 23ed. Istanbul, Turkey: Trans Tech Publications 2011.

KAWASHI E. Y.; BERTRAN, C. A.; REIS, R. R.; ALVES, O. L. Biocerâmicas Tendência e Perspectiva de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova** 2000; v. 23, n.4, p.518-522., 2000.

KLEIN, A. N.; FREDEL, M. C; WENDHAUSEN, P. A. P. Novos materiais: realidade e tendências de desenvolvimento. Disponível no site:<http://www.desenvolvimento.gov.br/arquivo/secex/sti/indbrasopodesafios/nexciectecnologia/Klein.pdf> (Acesso: 04/05/2015).

KNOWLES, J. C., HASTINGS, G. W.; OHTA, H.; NIWA, S., BOEREE, N. Development of degradable composite for orthopaedic use: in vivo biomechanical of two bioactive degradable composites based on the polyhydroxybutyrate polymer. *Biomaterials*, v.13, n.8, p.-491-496, 1992.

KONING, G. J. M. - "Prospects Of Bacterial Poly[(R)-3- Hydroxyalkanoates]", Technische Universiteit Eindhoven, Holanda, 1993.

LANGER, R. "Selected advances in drug delivery and tissue engineering", **Journal of Controlled Release**; 62: 7-11, 1999.

LANGER, R., TIRRELL, D. A., "Designing Materials for Biology and Medicine", *Nature*, v. 248, 2004

LANZA, M. D.; HENRIQUES S. E. F., MARTINS F.F. Limites cervicais dos preparos de dentes com finalidade restauradora. In: HENRIQUES S. E. F. Reabilitação Oral: Filosofia, Planejamento e Oclusão. São Paulo: Santos, 2003. Cap.11, p.233-4

LE, B.T.; WOO I. Alveolar cleft repair in adults using guided bone regeneration with mineralized allograft for dental implant site development: a report of 2 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67:1716-22.

LIFE – BONE; <http://www.life.uiuc.edu/csb/213/pdf/14.pdf>; acesso em 01 de maio de 2015.

LINDHE J., LANG N. P., KARRING T. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LIND, M. et al, Stimulating Bone Healing. *Critical ReviewsTM. Phys Rehabil Med*, v.12, p.312- 343, 2000.

LIU, Y; WANG, M. Um material compósito bioactivo e biodegradável consistindo de hidroxiapatite (HA) e PHB. *Current Applied Physics*, v. 7, p. 547–554, 2007.

LIU, Y.; WANG, M. Developing a composite material for bone tissue repair. *Current Applied Physics*, 2006.

LOPES, V. C. P., 2011. 101f. **Foto e biodegradação de PEBD, PHB e suas blends**. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Ciências Biológicas, área Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” Instituto De Biociências – Rio Claro.

LOTTI, C., **Influência das condições de processamento na morfologia e nas propriedades mecânicas de sistemas poliméricos moldados por injeção e sua predição através de redes neurais artificiais**. 2004. Tese de Doutorado, UFSCAR, São Carlos.

LÚCIO, M. A. M. **Efeito da osteoporose e da osteoartrose nas propriedades mecânicas e estruturais do osso trabecular**. 89f. 2008. Dissertação apresentada à Pós-Graduação de Engenharia Biomédica do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

MACHADO, M. L. C. **Estudo das propriedades mecânicas e térmicas do polímero biodegradável poli-3 hidroxibutirato (phb) e de compósitos phb/pó de madeira**. 134 f. 2008. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic Engineering of Poly (3Hydroxyalkanoates): **From DNA to Plastic**. *Microbiol. Mol. Biol.* v.63, n.1, p. 2153, 1999.

MALMONGE, S. M.; OKAJIMA, L. H.; JUNIOR, A. R. S.; MALMONGE, L. F.; MALMONGE, J. A.; **Compósitos Pierzoelétricos de PHB – Avaliação da Citotoxicidade**. Congresso Brasileiro de Polímeros, 8, 2015, Rio Grande do Norte. Anais. Rio Grande do Norte, Natal: 2015, p.796-797.

MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha utilizando substrato de baixo custo e ácido propiônico**. **Florianópolis**. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

MENDES, F. MIRANDA., **Produção e caracterização de bioplásticos a partir de amido de batata**. 2009, 198f. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade São Paulo.2009.

MOHANTY A. K. MISRA M, HINRICHSEN G. **Biofibers, biodegradable polymers and biocomposites: an overview**. *Macromol Mater Eng.* v. 276/277, 1-24, 2000.

MOHANTY, A. K., MISRA, M., DZRAL, L. T. **Natural fibers, biopolymers and biocomposites**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2005.

MURAKAMI, F. S. **Estudo termoanalítico entre carbonato de cálcio industrial e carbonato de cálcio obtido da casca do ovo**. In. V Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria. Poços de Caldas, 2006.

NAYAR, S.; GUHA, A.; Waste utilization for the controlled synthesis of nanosized hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering*. n. C29, p. 1326–1329, 2009.

NEVES, M. A. **Alternativas para valorização da casca de ovo como complemento alimentar e em implantes ósseos**. 1998. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil. 1998.

NYMAN, S. et al. The regenerative potencial of the periodontal ligament: an experimental study in the monkey. **Journal of Clinical Periodontology**, Hoboken, v. 9, n. 3, p. 257, 1982.

OJUMU, T. V. YU, J., SOLOMON, B.O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **Afr. J. Biotechnol.** v. 3, p.18-24, 2004.

OLIVEIRA, D. A. BENELLI, P.; AMANTE, E. R. **Valorização de Resíduos Sólidos: Casca de Ovos como Matéria-Prima para a Obtenção de Novos Produtos**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2nd International Workshop | Advances in Cleaner Production. Key Elements for a Sustainable World: Energy, Water and Climate Change. São Paulo, Brazil, p. 1-11, 2009.

OLIVEIRA, F. V., **Estudo do Biopolímero poli (β -hidroxibutirato) para Aplicação na Fixação e Regeneração de Tecido Ósseo**. Tese (Doutorado). Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2013, 180 p.

OLIVEIRA, P.M. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos de matriz polimérica de PHB reforçados com HAP-91®**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro preto. 2005. 148 p.

OLIVEIRA, S. V. ; MEDEIROS, K. M.; ARAÚJO, E. P. ; BRAGA; C. R. C.; E. M. ARAÚJO; FOOK, M. V. L. Caracterização química e morfológica do pirofosfato de cálcio obtido por via úmida. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 43 p. 11-20, 2009.

ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S. *Biomateriais – fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica, 1.ed. 2012..

PACHALY, J. R. Odontostomatologia em animais selvagens. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J. C. R. & CATÃODIAS,Z.S. *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca, 2006, cap. 64.

PACHEKOSKI, W. M.; DALMOLIN, C.; AGNELLI, J. .A M.; *Blendas poliméricas iodegradáveis de PHB e PLA para fabricação de filmes*. **Polímeros**, v. 24 n. 4, 2014

PADILHA, A. F. AMBRÓZIO F. F., *Técnicas de Análise Microestrutural*, Editora Hermus, 2004.

PALSSON, B. O.; BHATIA, S. N. *Tissue Engineering*. New Jersey: Prentice Hall. P.407, 2004.

PARK, J.; LAKES, R. S. Biomaterials: an Introduction. 3th Edition. New York: Springer, 2007. 561p.

PASCHOAL, A. L.; VANANCIO, E. C.; CANALE, L. C.; DA SILVA, O. L.; HUERTA, V. D.; MOTHEO A.D.E. Journal Metallic biomaterials TiN-coated: corrosion analysis and biocompatibility. Artif Organs. v. 27, p. 461-464, 2003

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2006.

QUENTAL, A. C. **Blendas de PHB e PETG: formação de um copoliéster aromático/alifático via processamento reativo.** Tese (Doutorado em físicoQuímica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2004.

QUENTAL, A. C.; FELISBERTI, M. I. **Comportamento térmico e morfológico do poli (hidroxibutirato) – PHB.** Anais do 6o Congresso Brasileiro de Polímeros / IX International Macromolecular Colloquium. Pg. 1260 – 1263. 2001.

RAMIER, J.; BOUDERLIQUE, T.; STOILOVA, O.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I.; LANGLOIS, V.; RENARD, E.; ALBANESE, P.; GRAND, D.; **Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrospayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications.** Materials Science and Engineering C. No. 38, pg. 161 - 169, 2014.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN F. J.; LEMONS, J. E.: An introduction to materials in medicine. Academic Press, San Diego, (2005).

REIS, E. C. C.; BORGES, A. P. B.; OLIVEIRA, P. M.; BICALHO, S. M. C. M.; REIS, A. M.; SILVA, C.L. Desenvolvimento e Caracterização de Membranas Rígidas, Osteocondutoras e Reabsorvíveis de Polihidroxibutirato e Hidroxiapatita para Gereneção Periodontal. **Polímeros**, Minas Gerais. v. 22, n. 1, p. 73-79, 2012.

REIS, E. C. C.; BORGES, A. P. B.; VARGAS, M. I. V.; MARTINEZ, M. M.; ELEOTÉRIO, R. B.; DIAS, A. R.; RODRIGUES, M.C.D. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli (hidroxibutirato) para substituição óssea em coelhos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.61, n.4, p.844-852, 2009.

REIS, R.L.; ROMÁN, J.S. Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medice. Boca Raton: CRC PRESS, 2005.

RIBEIRO, C., **Obtenção e Caracterização de Biocerâmicas Porosas à Base de Fosfatos de Cálcio Processadas com a Utilização de Albumina.** 2008, 160f. Tese (Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. IPEN. 2008

RODRIGUES, M. E. S. Análise do risco de fratura óssea por ultrasonometria e ensaio mecânico de compressão [Dissertação online]. São Carlos (SP): Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo; 2003

RUMPEL, E.; WOLF, E.; KAUSCHKE, E.; BIENENGRBER, V.; BAYERLEIN, T.; GEDRANGE, T.; PROFF, P. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphologica*, v. 65, n. 1, p. 43-48, 2006.

SADAT-SHOJAIA, M.; KHORASANI, M-T.; JAMSHIDI, A.; **A new strategy for fabrication of bone scaffolds using electrospun nano-HAp/PHB fibers and protein hydrogels.** *Chemical Engineering Journal*. n. 289, p. 38 – 47, 2016.

SADAT-SHOJAI, M.; KHORASANI, M. T.; JAMSHIDI, A.; IRANI, S. Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties. **Materials Science & Engineering C**, doi: 10.1016/j.msec.2013.02.041. 2013.

SAKAMOTO, F. C. **Obtenção e caracterização de filmes de PHB utilizando a técnica de *solution blow spinning*.** Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Ciências dos Materiais. Faculdade de Engenharia– UNESP – Ilha Solteira, 2013. 70 p.

SANTOS, G. A. Produção de compósitos à base de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para a aplicação como biomateriais. 2013. 115p. Dissertação (Mestrado Engenharia de Materiais) Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF.

SANTOS, M. H.; ENEIDE, L. G. D.; MANSUR, H. S., *Anais 17° CBECIMAT*, Foz do Iguaçu, PR (2006).

SATYANARAYANA, K. G.; ARIZAGA, G. G. C., WYPYCH, F. *Biodegr. Progr. Polym. Sci.*, v.34, p.982. 2009.

SCHENK, R. K.; BUSER, D.; HARDWICK, W. R.; DAHLIN, C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v.9, n.1, p.13-29, 1994.

SERVICE R. F. Tissue engineers build new bone. *Science*. v. 289, p. 1498-500. 2000.

SHISHATSKAYA, E.I.; KHLUSOV, I.A.; VOLOVA, T.G. A hybrid PHB hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. **Journal of Biomaterial Science Polymer Edition**, v. 17, n. 5, p. 481-498, 2006.

SHISHATSKAYA, E.I.; VOLOVA, T.G.; GORDEEV, S.A.; PUZYR, A.P. Degradation of P(3HB) and P(3HB-co-3HV) in biological media. **Journal of Biomaterial Science Polymer Edition**, v.16, n. 5, p. 643-57, 2005.

SILVA, A.J.J. **Efeito do Etanol nas Propriedades Físico-mecânicas de Poli(Éter Éter Cetona) – PEEK.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais – UFRG. 2012.

SILVA, E. J. G. P. DA. Profissionais de saúde, cateteres com reservatório e seus biomateriais. [s.l.] Universidade de Aveiro, 2007.

SILVA, V. R. **Doença periodontal em cães revisão de literatura**. Monografia. Especialista em Clínica Médica em Pequenos Animais. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Porto Alegre – RS. 2009. 77p.

SIMÕES, J. A. Curso de Biomecânica do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial (CPGEI). Notas de aula, 2007.

SIMÕES, R. D; SJZENFELD, V. L.; ATRA, E.; RODRIGUES, L. G.; BARACAT, E.C., —Aspectos do Metabolismo Ósseo: Osteoporose. In: Ginecologia Endócrina, 1ª ed., São Paulo: Editora Atheneu, p. 272-282, 1995.

SIQUEIRA, L. C. B., **Formulação e Caracterização de Biomateriais Compósitos com hidroxiapatita**. 2009, 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais), Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. 2009.

SOUSA, W. J. B., **Desenvolvimento de Filmes Híbridos de Quitosana/Fosfato de Cálcio com Incorporação de Vitamina E**. 2012, 100f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG. 2012.

STEINBÜCHEL, A., FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 419-421, 1998.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: Current state and prospects. **Annual Review of Medicine**, v.52, p.443-451. 2001.

SUVOROVA, E. I.; BUFFAT, P. A. “Electron Diffraction from Micro- and Nanoparticles of Hydroxyapatite”, **Journal of Microscopy**, v.196, p. 46-58. 1999.

SZUBERTA, M.; ADAMSKA, K.; SZYBOWICZ, M.; JESIONOWSKI, T.; BUCHWALD, T.; VOELKEL, A.; **The increase of apatite layer formation by the poly(3-hydroxybutyrate) surfacemodification of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate**. Materials Science and Engineering C. n. 34, p. 236 - 244, 2014.

TADA, E. S. **Blendas com poli(3-hidroxibutirato) (phb) e copolímeros aleatórios: comportamento de fases e cinética de cristalização**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 2009.

TATAKIS, D. N.; PROMSUDTHI, A. ; WIKESJÖ, U.M.E. Devices for periodontal regeneration. **Periodontol 2000**, v.19, p.59-73, 1999.

TEN CATE, A. R. Oral histology : development, structure, and function. 5th ed. St. Louis: Mosby; 1998.

THIRE´, R.M.S.M; RIBEIRO, T. A. A.; ANDRADE, C.T. Effect of Starch Addition on Compression-Moiled Poly (3-hydroxybutyrate)/Starch Blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v.100, p. 4338-4347, 2006.

THRONE, J. L., et al., **Polymer engineering principles: properties, processes and tests for design**. New York, EditoraHanser Gardner Publications, 1993.

THOMSON, R. C.; YASZEMSKI, M. J.; POWERS, J. M.; MIKOS, A. G. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 7. p. 23-38, 1995.

TOKIWA, Y.; CALABIA, B. Degradation of microbial polyesters. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1181–1189, 2004.

TOMASELLI, M. G., **Síntese e Caracterização de Hidroxiapatita Obtida a partir da Casca de Ovo de Galinha**. 2014, 60f. Monografia (Graduação de Engenharia Química). Escola de Engenharia de Lorena. EEL/USP.

TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, R. P. “Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes sp.*” *Biomass and Bioenergy* (2013), doi: org/10.1016/j.biombioe.2013.02.17.

TUREK, S. L. *Ortopedia: Princípios e sua Aplicação 1*. São Paulo: Editora Manole, 1991.

URIST, S. W., ANGE R. J., FINERMAN, G. A., Bone cell differentiation and growth factors. **Science**, v. 220, p.680-6, 1983.

VALLET-REGI, M., GONZALEZ-CALBET, J.M. Calcium phosphates as substitution of bones tissue. *Progress in Solid State Chemistry*, v. 32, p. 1-31, 2004.

VASUDEVAN, D.M., SREEKUMARI, S., VAIDANATHAN, K., **Textbook of biochemistry for dental students**.2 ed. JaypeeBrotheres Publishers ltd. Nova Deli, Índia, 2011.

VEIGA, A.; MELLO, R.; BEQUE, T.; Determinação de cálcio em cascas de ovos. Universidade de Santa Maria - Santa Maria, Rio Grande de Sul, 2013.

VOLOVA, T.; SHISHATSKAYA, E.; SEVASTIANOV, V.; EFREMOV, S.; MOGILNAYA, O. Results of biomedical investigations of PHB and PHA/PHV fibers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 125-133, 2003.

WANG, J.G.; BAKKEN, L.R. Screening of soil bacteria for poly-beta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microb. Ecol.*, v. 35, p. 94-104, 1998.

WANG, Y.W.; QIONG, W.; JINCHUN, C., GUO-QIANG, C. Evaluation of threedimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly(3-ydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction. **Biomaterials**, v.26, p.899-904, 2005.

WEILER, A.; HOFFMAN, R. F. G.; STÄHELIN, A. C.; HELLING, A. J.; SÜDKAMP, N. S. Biodegradable implants in sports medicine: the biological base. *Arthroscopy: The journal of arthroscopic and related surgery*, v.16, n.3, p.305-321, 2000.

WESSLER, K. **Sistemas de PHB e PHBV com PCL-T: comportamento de fase, reologia, propriedades mecânicas e processabilidade**. Joinville. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2007.

WILLIAMS, D. F.; On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**. v. 29. p. 2941–2953. 2008.

WILLIAMS, D. F.; On the nature of biomaterials. **Biomaterials**. v. 30. p. 5897–5909. 2009.

WISNIEWSKI, A.; ARGUELHO, M. L. Manual de Instruções e Roteiros de Experimentos. Laboratório de Química. Universidade Federal de Sergipe, 2011. Disponível em: http://albertowj.files.wordpress.com/2011/03/106372-apostila-2011_1-t3.pdf. Acesso em 26/06/2015.

YANNAS, I. V. Tissue and organ regeneration in adults. **New York: Springer**, 2001.

ZHANG, X., et al. Thermal and crystallization studies of nanohydroxyapatite reinforced polyamide 66 biocomposites. *Polymer Degradation and Stability*, v. 91. p. 1202-1207, 2006.