

INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
PIAUI



PPGEM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS**

FRANCISCO MAYRON DE SOUSA E SILVA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE
PHB/BIXINA/HIDROXIAPATITA: *PERSPECTIVAS DE USO COMO BIOMATERIAL
PARA A REPARAÇÃO ÓSSEA***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TERESINA-PI

2019

FRANCISCO MAYRON DE SOUSA E SILVA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE
PHB/BIXINA/HIDROXIAPATITA: *PERSPECTIVAS DE USO COMO BIOMATERIAL
PARA A REPARAÇÃO ÓSSEA***

Defesa de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Materiais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI, Campus Teresina Central, como requisito para obtenção do título de mestre em Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Processamento e caracterização de biomateriais

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Meneses Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana

TERESINA-PI

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Francisco Mayron de Sousa E

S586o Obtenção e caracterização de membranas de phb/bixina/hidroxiapatita :
perspectivas de uso como biomaterial para a reparação óssea / Francisco
Mayron de Sousa E Silva. - 2019.
83 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Instituto Federal do
Piauí, Campus Teresina Central, 2019.

Orientador : Prof Dr. Luiz Fernando Meneses Carvalho.

1. Membranas. 2. Controle microbiológico. 3. Bixina. 4. Hidroxiapatita. 5.
Reparação óssea. I. Título.

CDD - 620.1

Elaborado por Tanize Maria Sales CRB 3/1024

FRANCISCO MAYRON DE SOUSA E SILVA

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MEMBRANAS DE
PHB/BIXINA/HIDROXIAPATITA: *PERSPECTIVAS DE USO COMO BIOMATERIAL*
*PARA A REPARAÇÃO ÓSSEA***

Defesa de Mestrado apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI, como requisito para obtenção do título de mestre em Engenharia de Materiais.

Aprovado em: _____ de _____ de _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. **Luiz Fernando Meneses Carvalho**
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI
Orientador

Prof. Dr. **Vicente Galber Freitas Viana**
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI
Coorientador
Avaliador interno

Profa. Dra. **Marina de Oliveira Cardoso Macêdo**
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI
Avaliador interno

Profa. Dra. **Janaina de Moraes Silva**
Universidade Estadual do Piauí – UESPI
Avaliador externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Autor e Consumador da nossa fé, fonte de toda inspiração, confiança, determinação e perseverança por ter concedido força e saúde para enfrentar todas as adversidades ao longo desse período de luta.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Fernando Meneses Carvalho pela disponibilidade, confiança, paciência, apoio e pelo direcionamento dado em todos os momentos e ao Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana pela coorientação e estar sempre disponível para o esclarecimento de dúvidas e sugestões de trabalhos.

Aos demais professores do programa, pelo estímulo a pesquisas, pelo esclarecimento de dúvidas.

Ao Prof. Dr. André Luís Menezes Carvalho (UFPI) e a Profa. Ma. Iluska Martins Pinheiro (LACEN-PI) por todo auxílio, imensa colaboração, e pela disposição na realização das análises.

Aos Técnicos dos Laboratórios de Química, Cadu Nunes, Douglas Sousa e Renata e o do LABMAT-IFPI André Felipe pela disponibilização para realizar as caracterizações dos materiais e todo apoio. Vocês foram indispensáveis na realização deste estudo.

Aos meus Pais Francisca Regislene de Sousa e Silva e Francisco de Assis Vieira da Silva por me proporcionado a oportunidade de estudar e por sempre acreditarem que poderia alcançar todos os meus sonhos nunca desistindo de lutar ao meu lado. Agradeço por todo amor, carinho e dedicação em todas as situações. Amo vocês!

As minhas irmãs Karolayne Nayane e Mayane de Sousa pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos de ausência. Um agradecimento especial a todos os meus familiares pelo apoio e incentivo. Vocês são minha inspiração.

Ao meu sobrinho Arthur de Sousa sou feliz por ter você na minha vida, por receber seu amor e carinho, e torço para que mais tarde você seja um grande homem repleto de felicidades.

Aos amigos de Mestrado em especial Ana Larisse, Ingrid Elen, Ivanez Piauilino, Morgana Calixto e Rodrigo Galvão companheiros de laboratório e de luta. Meus sinceros agradecimentos.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que
ninguém ainda pensou sobre aquilo
que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética capazes de interagir com o sistema biológico. A eficiência desses biomateriais depende de suas propriedades físico-químicas, morfológicas, mecânicas e da capacidade de adesão com as células do tecido que visa a cicatrização. Estes biomateriais podem ser incorporados a biocerâmicos como a HAp, favorecendo a neoformação óssea, e ainda a compostos naturais como a bixina um carotenoide encontrado no pericarpo das sementes de urucum. Objetivou-se preparar e caracterizar membrana de PHB/Bixina/HAp, para possíveis aplicações na reparação óssea. As membranas de PHB/Bixina/HAp foram sintetizadas pelo método de evaporação de solvente (*solution casting*) e caracterizadas quanto a morfologia, características físico-químicas e propriedades biológicas. Foram obtidas membranas de PHB, Bixina e HAp com características homogênea, não porosa e estruturas semicristalinas com a morfologia revelando superfícies irregulares, com presença de aglomerados, característica favoráveis para a aplicação como biomaterial por favorecer o processo de adesão e proliferação celular. A análise química mostrou que a membrana P50/B30/H20 apresentou melhor proporção Ca/P (1,40) e que a membrana P70/B15/H15 apresentou menor índice de cristalinidade, em comparação as demais proporções, o que sugere melhor interação com a matriz. As propriedades biológicas indicam que as proporções P70/B15/H15 e P60/B20/H20 são mais adequadas para aplicações que requeiram estabilidade do biomaterial enquanto a proporção P50/B20/H30 apresentaram melhores aplicações como possível dispensador de fármacos visto a degradação quando em contato com fluidos fisiológicos. Foi observado que as membranas apresentaram comportamento bacteriostático o que dificulta a formação de microrganismos. O teste de toxicidade com *Artemia salina* não é indicado para esse biomaterial pela necessidade de exposição das lavas e do extrato a luz e consequente degradação do material.

Palavras-chave: Membranas. Controle Microbiológico. Bixina. Hidroxiapatita. Reparação Óssea.

ABSTRACT

Biomaterials are substances of natural or synthetic origin capable of interacting with the biological system. The efficiency of these biomaterials depends on their physical-chemical, morphological, and mechanical properties and the ability of adhesion with tissue cells for healing. These biomaterials can be incorporated into bioceramics such as HAp, favoring bone neoformation, and also to natural compounds such as bixin, a carotenoid found in the pericarp of urucum seeds. The objective was to prepare and characterize PHB / Bixin / HAp membrane for possible applications in bone repair. The PHB / Bixin / HAp membranes were synthesized by the solvent casting method and characterized as morphology, physicochemical characteristics and biological properties. PHB, Bixin and HAp membranes were obtained with homogeneous, nonporous and semicrystalline structures with morphology revealing irregular surfaces, with the presence of clusters, favorable characteristics for the application as biomaterial to favor the process of cell adhesion and proliferation. The chemical analysis showed that the P50 / B30 / H20 membrane presented a better Ca / P ratio (1.40) and that the P70 / B15 / H15 membrane had a lower crystallinity index, compared to the other proportions, suggesting a better interaction with the matrix. Biological properties indicate that the proportions P70 / B15 / H15 and P60 / B20 / H20 are more suitable for applications requiring biomaterial stability while the P50 / B20 / H30 ratio presented better applications as a possible drug dispenser since degradation when in contact with physiological fluids. It was observed that the membranes presented bacteriostatic behavior which hinders the formation of microorganisms. The toxicity test with *Artemia salina* is not indicated for this biomaterial due to the need to expose the lavas and extract to light and consequent degradation of the material.

Keywords: Membranes. Microbiological control. Bixina. Hydroxyapatite. Bone Repair.

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 -	Fotos de urucum (<i>Bixa Orellana</i> L): A) árvore com cachos (frutos maduros); B) fruto aberto com sementes exposta.....	16
Figura 3.2 –	Fórmula estrutural da Bixina evidenciando um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades.....	17
Figura 3.3-	Estrutura cristalina da HAp.....	21
Figura 3.4 -	Fluxograma que ilustra o desenvolvimento de osteoblastos e osteoclastos provenientes de células da medula óssea.....	25
Figura 3.5 -	Etapas reparação óssea.....	26
Figura 3.6 -	Dedo artificial encontrado em uma múmia egípcia, na cidade de Tebas, mais antiga prótese conhecida.....	27
Figura 3.7 -	Evolução cronológica do desenvolvimento dos biomateriais utilizados na reparação e regeneração óssea.....	28
Figura 4.1 -	Bixina em pó.....	31
Figura 4.2 -	Fluxograma da síntese da Bixina.....	32
Figura 4.3 -	Fluxograma da síntese da HAp.....	33
Figura 4.4 -	Fluxograma da preparação da proporção P100.....	35
Figura 4.5 -	Fluxograma da preparação da proporção P50/H50.....	35
Figura 4.6 -	Fluxograma da preparação das demais proporções de membranas.....	36
Figura 4.7 –	Fluxograma do ensaio de toxicidade aguda evidenciado Ovos de <i>Artemia salina</i> em solução salina para eclosão.....	39
Figura 4.8 -	Fluxograma de preparação dos extratos da membrana.....	40
Figura 5.1	Membranas de PHB/Bixina/HAp nas proporções: A) P50/H50; B) P50/B50; C) P70/B15/H15; D) P60/B20/H20 e E) P50/B30/H20.....	42
Figura 5.2 –	Microscopia óptica com aumento de 10X das membranas de PHB/Bixina/HAp: A) P100; B) P50/H50; C) P50/B50; D) P70/B15/H15; E) P60/B20/H20 e F) P50/B30/H20.....	44
Figura 5.3 -	Micrografia das amostras: (A) PHB puro, (B) Bixina e (C) HAp....	45
Figura 5.4 -	Micrografias das membranas de PHB/Bixina/HAp: A) P100; B) P70/B15/H15; C) P60/B20/H20 e D) P50/B30/H20.....	46
Figura 5.5-	Micrografia da membrana P50/B30/H20 com magnificação de 2000x evidenciando os aglomerados de HAp em sua superfície..	47
Figura 5.6 -	Cromatograma, obtido por CLAE, do padrão de bixina. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetonitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 L/min. Detecção a 460 nm.....	48
Figura 5.7–	Espectro UV-vis da Bixina diluída em CHCl ₃ (P.A).....	49
Figura 5.8 -	Espectro de difração de raios X (DRX) da Bixina e HAp.....	52

Figura 5.9 -	Espectro de difração das membranas de PHB/Bixina/HAp com duas filtragens.....	53
Figura 5.10 -	Termogravimetria da amostra de bixina.....	54
Figura 5.11 -	Curvas DSC para amostra de Bixina.....	55
Figura 5.12-	Absorção de saliva nas proporções A) PHB 100, PHB/HAp 20% e PHB/Bix 20% e B) P70/B15/H15, P60/B20/H20 e P50/B20/H30.....	57
Figura 5.13 -	Absorção de água deionizada nas proporções A) PHB 100, PHB/HAp 20% e PHB/Bix 20% e B) P70/B15/H15, P60/B20/H20 e P50/B20/H30.....	58
Figura 5.14 -	Absorção de SF 0,9% nas proporções A) PHB 100, PHB/HAp 20% e PHB/Bix 20% e B) P70/B15/H15, P60/B20/H20 e P50/B20/H30.....	59
Figura 5.15-	Ensaio da atividade antimicrobiana com <i>Staphylococcus aureus</i> (CGP)A) após preparação dos meios de cultura; B) placas após 24 h de incubação à 37°C.....	62
Figura 5.16 -	Ensaio da atividade antimicrobiana com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> A) após preparação dos meios de cultura; B) placas após 24 h de incubação à 37°C.....	63
Figura 5.17 -	Ensaio da atividade antimicrobiana com <i>Candida albicans</i> A) após preparação dos meios de cultura; B) placas após 24 h de incubação à 37°C.....	64
Figura 5.18 -	Ensaio da atividade antimicrobiana com <i>Escherichia coli</i> (BGN) A) após preparação dos meios de cultura; B) placas após 24 h de incubação à 37°C.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1-Valores de solubilidade da bixina em diferentes solventes a 25°C	18
Tabela 3.2 -Fosfatos de cálcio, fórmulas químicas e razões Ca/P	20
Tabela 3.3 - Propriedades mecânicas da HAp sintetizada e tecido ósseo	22
Tabela 4.1 - Propriedades do PHB BIOCYCLE 1000.....	33
Tabela 4.2 – Composição das membranas: PHB, Bixina e HAp	33
Tabela 5.1 - Composição Química da bixina pela Espectrometria de Fluorescência de Raios-X - FRX	52
Tabela 5.2- Composição Química das membranas de PHB/Bixina/HAp em três diferentes proporções.....	53
Tabela 5.3- Média e porcentagem da quantidade de <i>Artemias salinas</i> mortas.....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 GERAL	14
2.2 ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 BIOMATERIAIS	15
3.2 POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)	15
3.3 URUCUM (<i>Bixa Orellana</i> L.)	16
3.3.1 Bixina	17
3.4 HIDROXIAPATITA (HAp)	20
3.5 FORMAÇÃO E REPARAÇÃO ÓSSEA	23
3.6 APLICAÇÃO DE BIOMATERIAIS PARA REPARAÇÃO ÓSSEA	26
4 4 METODOLOGIA	30
4.1 EXTRAÇÃO DA BIXINA	30
4.2 SÍNTESE DA HAp	31
4.3 OBTENÇÃO DO POLIHIDROXIBUTIRATO - PHB	32
4.4 PROCESSAMENTO DAS MEMBRANAS	33
4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	35
4.5.1 Microscopia Ótica (MO)	35
4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura - MEV	35
4.5.3 Fluorescência de raios-X - FRX	36
4.5.4 Difração de raio-X - DRX	36
4.5.5 Espectroscopia de infravermelho - FTIR	36
4.5.6 Análise termogravimétrica - TGA	36
4.5.7 Calorimetria exploratória diferencial - DSC	36
4.5.8 Capacidade de Absorção das Membranas	37

4.5.9 Ensaio de toxicidade aguda	38
4.5.10 Esterilização das membranas de PHB/Bixina/HAp.....	39
4.5.11 Controle microbiológico	39
4.5.12 Dados estatísticos.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS	41
5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	42
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	47
5.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	47
5.3.2 - Análise por Espectrofotometria UV/Visível.....	50
5.3.3 - Espectrometria de Fluorescência de Raios-X - FRX	52
5.3.4 - Difração de Raio-X -DRX.....	53
5.4 CARACTERIZAÇÃO TERMOGRAVIMÉTRICA	55
5.4.1 - Análise Termogravimétrica - TG	55
5.4.2 - Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC	56
5.5 - CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	57
5.5.1 – Capacidade de absorção	57
5.5.2 - Toxicidade Aguda com <i>Artemia Salina</i>	62
5.5.3 - Teste antimicrobiano	63
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	69
REFERENCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

Biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética destinados a interagir com o sistema biológico. Esses materiais têm aplicações na área médica, odontológica, engenharia de tecidos e fármacos, devido à biocompatibilidade e a capacidade de dissolução no interior do organismo. As propriedades físico-químicas, morfológicas, químicas e mecânicas interferem na capacidade de interação do biomaterial com um tecido de origem biológica. Estas propriedades podem melhorar o processo de regeneração (SILVA et al., 2005a; DALAPICULA; CONZ, 2008; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Quando aplicados no tecido ósseo, os biomateriais podem atuar na substituição e/ou estimulação de tecidos que perderam funções devido a perda da continuidade óssea, proporcionando a condução de osteoblastos ou de células precursoras de osteoclastos para local da lesão e de fatores regulatórios que promovam o recrutamento destas células para o osso. Estes fatores regulatórios estão presentes em tecidos hematopoiéticos, como na medula óssea. Além disso, precisam proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de suporte para a neoformação óssea (AMADEI et al., 2006; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; MATURANA et al., 2014).

Os implantes biodegradáveis são uma ferramenta capaz de participar do processo dinâmico de cicatrização óssea, contribuindo na diminuição do peso do material suporte, degradação do material após um determinado período e dispensa de cirurgias secundárias para sua remoção (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

Neste trabalho, utilizou-se como biomaterial o polihidroxibutirato (PHB), um polímero natural com característica de termoplástico biodegradável, produzido por bactérias a partir de fontes de carbono renováveis, como a cana-de-açúcar. Este polímero tem sido usado no processamento de fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas que liberam fármacos gradualmente na corrente sanguínea, por ser biocompatível e facilmente absorvido pelo sistema biológico. Além disso, esse polímero apresenta propriedades importantes como à cicatrização tecidual e reparação óssea (AVELLA; MARTUSCELLI; RAIMO, 2000; BOHMERT et al., 2002).

O PHB, pode ainda, ser utilizado para a produção de membranas biológicas (REIS et al., 2012; SAKAMOTO, 2013) associado à HAp (ESPOSITO et al., 2010) e outros materiais naturais como a bixina (ALMEIDA et al., 2016).

A bixina um carotenoide encontrado no pericarpo das sementes de urucum. (COSTA; CHAVES, 2005) apresentando ação antioxidante, antimicrobiana, antitumoral e capacidade de reagir contra radicais livres. (YUSÁ-MARCO et al., 2008; ZHANG; ZHONG, 2013; MUTHUKUMAR et al., 2014; SANTOS et al., 2014). Já a HAp, um biocerâmico de fosfato de cálcio, constituinte mineral natural encontrado no osso, aproximadamente 30 a 70% da massa dos ossos e dentes e, pode ser aderida ao tecido ósseo como uma estrutura para neoformação óssea sendo utilizada como enxertos sintéticos em grandes defeitos ósseos (CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2005; CHANDRASHEKAR; SAXENA, 2009; COSTA et al., 2009).

1.1 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas houve um crescimento significativo no uso dos biomateriais, graças às evoluções nas áreas da Engenharia e da Saúde. Este avanço surge devido aumento de lesões graves causadas por acidentes, aumento da expectativa de vida e consequentemente doenças relacionadas à velhice que requerem utilização de biomateriais visando à cura e regeneração dos tecidos biológicos, além da produção de tecidos artificiais com alta biocompatibilidade (CORRER-SOBRINHO, 2000).

Para que novos biomateriais possam ser aplicados com sucesso, há a necessidade de estudos das suas propriedades morfológicas, físico-químicas e mecânicas, assim como da sua resposta ao interagir com os tecidos biológicos colaborando de forma efetiva para regeneração do tecido lesionado com altos índices de biocompatibilidade.

Atrelado a isso, os implantes biodegradáveis se apresentam como uma ferramenta capaz de participar do processo dinâmico de cicatrização óssea, contribuindo na diminuindo o peso do material suporte, degradação do material após um determinado período e dispensa de cirurgias secundárias para sua remoção (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

Portanto, a importância deste trabalho está na obtenção e investigação das propriedades de um biomaterial composto de PHB/Bixina/HAp, para possível uso na reparação do tecido ósseo. e assim proporcionar um suporte para neoformação óssea e subsídios para que seu uso possibilite menor tempo de recuperação do tecido lesionado. Com base nisso, esse estudo possui caráter

inédito e pode contribuir de forma satisfatória para o conhecimento técnico-científico, além de fortalecer futuras pesquisas longitudinais no campo dos biomateriais atrelados à reparação óssea.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Preparar e caracterizar membrana de PHB/Bixina/HAp, para aplicações na reparação óssea.

2.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar as propriedades morfológicas, físico-químicas e mecânicas da membrana de PHB/Bixina/HAp;
- Avaliar o crescimento microbiológico na membrana de PHB/Bixina/HAp;
- Estudar a toxicidade aguda da membrana de PHB/Bixina/HAp utilizando o teste de letalidade para larvas de *Artemia salina*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMATERIAIS

Os biomateriais compreendem uma gama de produtos utilizados na área da saúde sendo definidos como qualquer substância ou combinação de substâncias de fontes naturais ou sintéticas, que podem substituir ou reparar tecidos sendo capazes de interagir com os sistemas biológicos como os dispositivos biomédicos, os curativos, os materiais implantáveis, os órgãos artificiais e os dispositivos para a liberação de medicamentos (WRIGHT, 1989; OLIVEIRA et al., 2010; PIRES et al., 2015).

Esses materiais diferem-se por apresentarem propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas viáveis a sua utilização nos sistemas biológicos. Para a escolha de um biomaterial devem-se levar em conta algumas propriedades como biocompatibilidade (compatibilidade do material com organismo), biodegradabilidade (fenômeno em que o material é degradado ou solubilizado em fluidos tissulares, desaparecendo do sítio de implantação), bem como a velocidade de degradação do material (TABATA, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; RODRIGUES, 2013a).

Quando em meios biológicos precisam evitar a formação de trombos como resultado do contato entre o sangue e o biomaterial, não induzir resposta imunológica adversa, possuir caráter atóxico, não carcinogênico e não perturbar o fluxo sanguíneo, e ainda não produzir resposta inflamatória aguda ou crônica que impeça a diferenciação própria dos tecidos adjacentes (CARVALHO et al., 2010).

3.2 POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB)

O PHB é um homopolímero composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono, originado de fontes naturais e sintetizado por uma grande variedade de microrganismos como as *Alcaligenes eutrophus*, *Azotobactervinelandii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonasputida*, *Ralstoniaeutropha*. Esse polímero pertence à família dos Polihidroxicanoatos (PHA) (SILVA et al., 2007).

Este polímero comporta-se como um termoplástico totalmente biodegradável que ao interagir com sistemas biológicos não gera respostas inflamatórias severas, sendo biocompatível com uma grande variedade de células animais. Contudo, poliésteres alifáticos, como o PHB, apresentam fracas interações célula-matriz, apesar de sua biocompatibilidade degradando-se *in vivo* ao ácido 3-hidroxibutírico,

um metabolito comum em todos os seres vivos (HASIRCI et al., 2003; KUNZE et al., 2006; COUTINHO et al., 2007; GREDES et al., 2015).

Por estas propriedades, o PHB tem sido estudado em diversos dispositivos biomédicos como implantes, membranas, placas, grânulos e materiais para engenharia de tecidos, para o desenvolvimento ativo de novas formas farmacológicas por meio do encapsulamento de fármacos (BONARTSEV et al., 2006).

Esposito *et al.* (2010) estudaram a influência de blendas de poli (p-dioxanona (PPD)/ Polihidroxibutirato (PHB) na adesão celular e crescimento de fibrocondrócitos isolados de meniscos de joelhos de coelhos albinos, observando que os fibrocondrócitos podem responder a alterações no substrato, modificando o perfil fenotípico, além de, não apresentarem citotoxicidade e permitirem a adesão e proliferação dos fibrocondrócitos.

Gredes *et al.* (2015) investigaram a reparação óssea após o preenchimento de defeitos ósseos, induzidos em crânios artificiais, com remendos de PHB não modificados, a fim de determinar à medida que esses remendos são capazes de afetar a regeneração óssea, observando que após oito semanas de inserção a regeneração óssea foi incrementada em 50% dos animais tratados, enquanto que todas as cavidades tratadas com PHB mostraram formação óssea e incorporação dos remendos no osso 12 semanas após a cirurgia, além de apresentar angiogênese, biocompatibilidade e um caráter osteocondutivo.

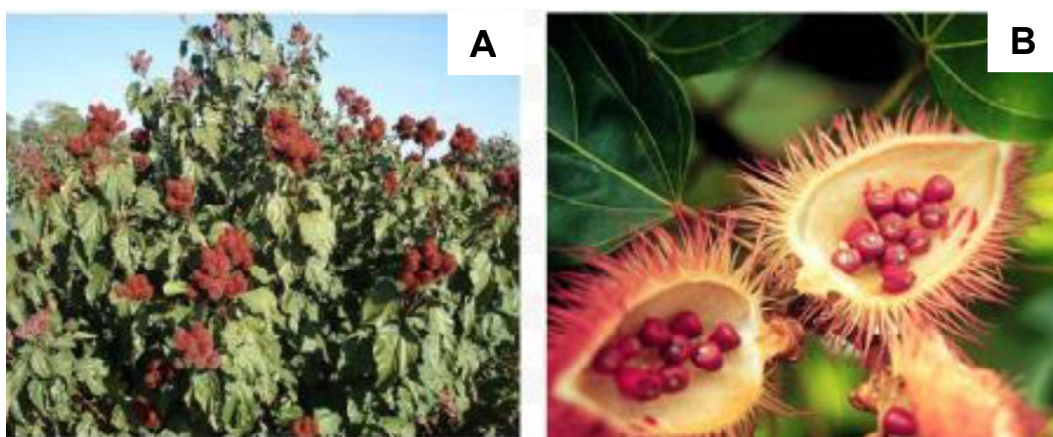
Sousa *et al.* (2016) estudou os efeitos genotóxicos de membranas de PHB / norbixina / etilenoglicol por meio do teste do micronúcleo e ensaio cometa em 15 animais da raça *Rattus norvegicus* demonstrando que o biomaterial não apresenta efeitos genotóxicos.

3.3 URUCUM (*Bixa Orellana* L.)

A planta urucum, *Bixa orellana* L., pertence à família das *Bixáceas* de seu fruto é extraído um corante natural mais utilizado no mundo. Desse material pode-se obter extratos hidrossolúveis ou lipossolúveis, por essa razão, o urucum é um dos principais produtos naturais para alimentos, além de aplicações farmacológicas, cosméticas e tecnológicas (SCOTTER, 1995; OZAKI; DUARTE, 2006; PARIMALAN et al., 2007; ZARRINGHALAMI; SAHARI; HAMIDI-ESFEHANI, 2009)

As sementes podem ser numerosas por fruto apresentando aspectos angulares, com 3 a 4 mm de comprimento, cobertos com uma substância resinosa de coloração vermelho alaranjada, a qual torna-se seca, dura e de coloração escura com o amadurecimento (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) (GARCIA *et al.*, 2012).

Figura 2.1-Fotos de urucum (*Bixa Orellana* L): A) árvore com cachos (frutos maduros); B) fruto aberto com sementes exposta.

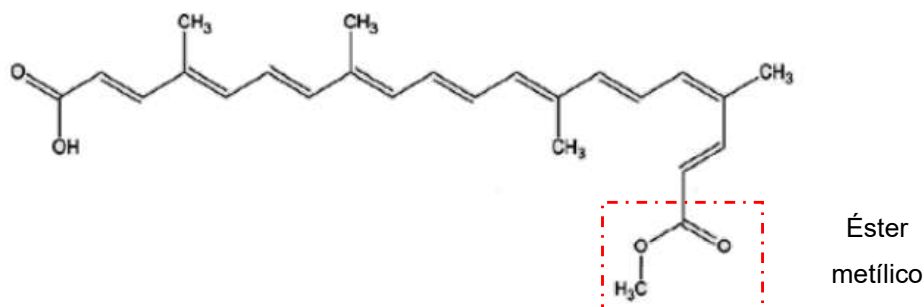


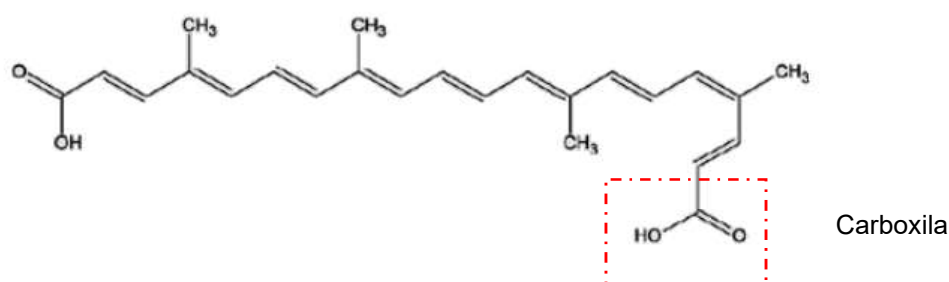
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.1 Bixina

A bixina (metil hidrogênio 9'- cis - 6,6'- diapocaroteno - 6,6'- dioato), um carotenoide com configuração cis,1,8 (RIOS; MERCADANTE, 2004) encontrada no pericarpo das sementes de urucum. Possui uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) (COSTA; CHAVES, 2005).

Figura 2.2 – Fórmula estrutural da Bixina evidenciando um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades





Fonte: Adaptado de Rodrigues (2013c)

A conformação estrutural da bixina confere características lipossolúveis, devido à presença do éster metílico na molécula (LIMA *et al.*, 2001). A bixina apresenta tonalidade variando entre o amarelo e o vermelho. A vantagem desse pigmento em relação aos corantes sintéticos do tipo azo (grupo funcional) utilizados na indústria alimentícia é a sua estabilidade em alimentos processados na presença de agentes redutores (dióxido de enxofre, ácidos ascórbicos, cítricos e alguns flavorizantes) e oxidantes (cloro e hipoclorito) (COSTA; CHAVES, 2005). Os carotenoides originados do urucum podem sofrer degradação quando expostos à luz, submetidos a elevadas temperaturas ou na presença de dióxido de enxofre (SATYANARAYANA; PRABHAKARA RAO; RAO, 2003).

Quanto à solubilidade, a bixina é solúvel em solventes orgânicos (RIOS; MERCADANTE, 2004) e apresenta solubilidade relativamente baixa em etanol anidro em comparação com outros solventes orgânicos (Erro! Fonte de referência não encontrada.) (LOSS *et al.*, 2016).

Tabela 2.1-Valores de solubilidade da bixina em diferentes solventes a 25°C

Solvente	Solubilidade (mg mL ⁻¹)
Clorofórmio	3,75
Acetona	1,50
Diclorometano	1,10
Acetato de etila	0,89
Éter etílico	0,37
Etanol anidro	0,18
n-hexano	*
Éter de petróleo	*

Fonte: Adaptado de Suo *et al.* (2005); Silva(2014); Loss *et al.* (2016)

Com relação a suas propriedades físicas apresenta ponto de fusão 198°C; máxima absorbância em clorofórmio 503nm, 469,5nm, 439nm. O extrato possui boa estabilidade em relação à oxidação, variação de pH e ataque microbiológico. É moderadamente estável em relação à luz. A bixina é muito estável a temperaturas abaixo de 100°C, moderadamente estável entre 100-125°C e instável acima de 125°C (SILVA, 2014). Contudo, em temperaturas elevadas (> 120°C), as reações de degradação levam à formação de vários produtos, incluindo um composto de carbono-17 conhecido como pigmento amarelo.

Existem alguns relatos a respeito da atividade biológica da bixina apresentando ação antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. Outra característica desse composto ativo é a capacidade de reagir contra radicais livres (YUSÁ-MARCO *et al.*, 2008; ZHANG; ZHONG, 2013; MUTHUKUMAR *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014). Na literatura, estão relatados diversos estudos sobre os efeitos genotóxicos, teratogênicos ou mutagênicos desses materiais, que objetivam avaliar as propriedades de interações com meio biológico em animais.

Dunham e Allard(1960) observaram princípios farmacologicamente ativos nas raízes de *Bixaorellana*. O extrato aquoso apresentou efeito na atividade motora espontânea em camundongos e inibiu o volume da secreção gástrica, sem influenciar a produção de ácidos. Parece possuir também propriedades antiespasmódicas e hipotensivas.

Lima, Oliveira e Nagem (2003) avaliaram a ação terapêutica da quercetina, bixina e norbixina em coelhos hiperlipidêmicos mostraram que os teores de colesterol foram menores para os animais tratados com bixina.

Rodrigues (2003) relaciona efeitos antioxidantes dos carotenoides ricos em duplas ligações conjugadas, como a bixina. Kohlmeier e Hastings(1995) relataram que vários estudos epidemiológicos evidenciaram que a ingestão de β -caroteno promove um efeito preventivo na incidência da doença cardiovascular.

Pinzón-García *et al.* (2016) em estudo realizado demonstrou uma eficiente cicatrização de feridas cutâneas utilizando nanofibras de policaprolactona (PCL) carregadas com Bixina em camundongos diabéticos onde os ensaios de proliferação celular e o estudo *in vivo* indicam que o biomaterial carregado com bixina diminui o tempo de fechamento da ferida em comparação com as nanofibras de PCL virgens.

Pinzón-García *et al.* (2018) investigaram os efeitos da administração oral de Bixina e Bixina com β -ciclodextrina em camundongos obesos observando melhoras

nos parâmetros metabólicos avaliados evidenciando, assim, os efeitos hipoglicêmicos, hipolipemiantes e hepatoprotetores do composto de bixina.

Xue *et al.* (2018) e Zhang *et al.* (2018) demonstraram que a administração de bixina apresenta efeitos na diminuição da inflamação na lesão pulmonar aguda induzida por ventilação, bem como nos danos causados na pele pela exposição aos raios UV.

3.4 HIDROXIAPATITA (HAp)

A HAp é um dos tipos de fosfatos de cálcio. Estes são compostos cerâmicos formados por diferentes razões Ca/P (Tabela 3.2), sendo bastante utilizados como biomateriais para aplicações de reposição e regeneração do tecido ósseo, devido excelente biocompatibilidade, bioatividade, osteocondução e não produzem reações tóxicas e alérgicas (DALAPICULA; CONZ, 2008; GOMES *et al.*, 2012; ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012; COSTA *et al.*, 2015).

Tabela 2.2 - Fosfatos de cálcio, fórmulas químicas e razões Ca/P

Fosfato de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcio (TeCP)	$Ca_4(PO_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$Ca_3(PO_4)_2 \cdot nH_2O$	1,5
Fosfato tricálcio (α , α' , β , γ) (TCP)	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado (DCPC)	$CaH_2PO_4 \cdot 5H_2O$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$CaHPO_4$	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$Ca_2P_2O_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio di-hidratado (CPPD)	$Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$Ca_7(P_5O_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$Ca_4H_2P_6O_{20}$	0,67
Fosfato monocálcicomono-hidratado (MCPM)	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,5
Metafosfatos de cálcio (α , β , γ) (CMP)	$Ca(PO_3)_2$	0,5

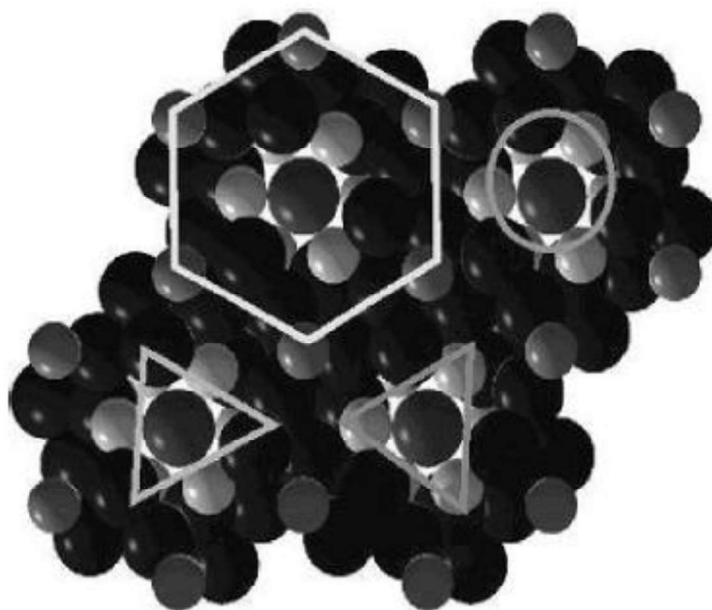
Fonte: Adaptada de Costa et al.(2009); Guastaldi; Aparecida (2010); Gomes et al. (2012)

A HAp está presente em ossos e dentes de todos os vertebrados, representando 5% do peso total de um indivíduo adulto. Apresenta grande afinidade

por proteínas devido a capacidade de adsorção de proteínas em sua superfície. Matrizes sintéticas HAp vêm sendo estudadas devido sua potencialidade para aplicações como biomaterial para implantes (LINDEN *et al.*, 1996; PURICELLI, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2011), sistemas para liberação de drogas (SCOTCHFORD *et al.*, 1998), fontes radioativas para braquiterapia e engenharia de tecidos (NATH *et al.*, 1997; LACERDA; LAMEIRAS; SILVA, 2006), suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos (COSTA *et al.*, 2009) e adicionada creme dental como método adicional à escovação diária em casos de lesões iniciais de cárie radicular (GIÁCOMO *et al.*, 2014).

Na sua estrutura química, a HAp, é constituída de três elementos, cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O) (CAVALCANTE; LAGE; FABRIS, 2008) que se encontra organizada em uma estrutura cristalina hexagonal ($a_1=a_2=a_3 \neq c$ e $\alpha=\beta=90^\circ$ e $\gamma=120^\circ$) (TERRA *et al.*, 2009; GUASTALDI; APARECIDA, 2010), com uma célula unitária formada por 10 íons de cálcio (Figura 3.3) (TERRA *et al.*, 2009).

Figura 2.3- Estrutura cristalina da HAp



Fonte: Adaptado de Lacerda; Lameiras; Silva (2009).

A estrutura cristalina da HAp permite substituições catiônicas e aniônicas, o que possibilita incorporar metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura, onde os Íons Ca^{2+} podem ser substituídos por um grande número de cátions metálicos mono (especialmente Na^+), divalentes e íons trivalentes de

elementos terra rara (metais de transição denominados lantanídeo) (REY *et al.*, 2007; GUASTALDI; APARECIDA, 2010). No entanto, tais possibilidades parecem ter uma influência menor sobre as apatitas depositadas no tecido biológico devido às baixas quantidades desses íons ativadores (REY *et al.*, 2007).

Todas as substituições podem ocasionar uma desorganização estrutural da HAp, ocasionando alterações em suas propriedades físico-químicas e inibindo suas funções normais. Essas variações podem ocorrer na cristalinidade, parâmetros de rede, dimensões do cristal, textura superficial, estabilidade do material e sua solubilidade (fatores que alteram a degradação e o comportamento *in vivo*). Contudo, nos organismos vivos, as substituições catiônicas e aniônicas fazem com que a HAp atue como reserva de Ca e P em sistema regulador de diferentes íons nos líquidos corporais, por meio de sua liberação ou armazenamento, isto demonstra aumentar a sobreposição de osso em implantes ortopédicos (REY *et al.*, 2007; TERRA *et al.*, 2009; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Em implantes, a HAp começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 a 5 anos (KAWACHI *et al.*, 2000; RODRIGUES, 2013a), facilita a adaptação ao contorno dos defeitos ósseos, é quimicamente estável, não tem restrição quanto à quantidade a ser utilizada e não está sujeita à rejeição imunológica (OKAZAKI *et al.*, 2000; PINHEIRO *et al.*, 2008).

Apesar das relevantes respostas biológicas proporcionadas pela HAp suas propriedades mecânicas inerentes determinam e limitam as suas aplicações. Na tabela 3.3, observa-se uma comparação entre as propriedades mecânicas da HAp sintetizada (> 99,2%) e o tecido ósseo.

Tabela 2.3 - Propriedades mecânicas da HAp sintetizada e tecido ósseo

Propriedade	Osso cortical	Osso esponjoso	HAp Sintetizada (>99,2%)
Densidade (g/cm ³)	1,6-2,1	-	3,16
Dureza de Vickers (HV)	-	-	600
Resistência à compressão (Mpa)	100-230	2—12	500-1.000
Resistência à flexão (Mpa)	50-150	-	115-200
Modulo de Young (GPa)	7-30	0,05-0,5	80-110
Tenacidade à fratura KIC ($MPa.m^{\frac{1}{2}}$)	2-12	-	1,0

Fonte: Adaptado de Oréfice; Pereira; Mansur (2012).

De forma geral, devido a sua rigidez (elevado módulo de elasticidade) a HAp pode ser utilizada como substituto dos tecidos duros. Entretanto, seu módulo de elasticidade é maior que o do tecido ósseo, o que compromete a distribuição de esforços entre o implante e o tecido-hospedeiro, impedindo este tecido de sofrer um carregamento normal e apropriado. Além disso, a baixa tenacidade da HAp tem limitado seu uso a aplicações em que a solicitação mecânica não é muito elevada ou é essencialmente de compressão (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

A literatura mostra que diversos estudos experimentais que foram desenvolvidos para avaliar a resposta da HAp na reparação do tecido ósseo.

Cullum *et al.* (1988), utilizaram hidroxiapatita natural em alvéolo dentário de cães e observaram, com uma e duas semanas de pós-operatório, proliferação de tecido conjuntivo imaturo e altamente celular, preenchendo todo o defeito, e, nas margens do osso original, atividades, osteoclástica e osteoblástica, incipientes na fase inicial do processo de reparação. Não foi observada reação do tipo corpo estranho ou resposta inflamatória. Com quatro, oito e 20 semanas, o tecido conjuntivo tornou-se denso e menos celular, estimulando a formação de osteóide. Com 30 semanas, todo o tecido conjuntivo foi substituído por tecido ósseo bem delimitado entre o osso e a hidroxiapatita.

Franco (2000), utilizando hidroxiapatita sintética pura, associada a colágeno e lipossomo, em defeito provocado experimentalmente na tíbia de cães, constatou hemorragia abundante durante a cirurgia em todos os animais que receberam hidroxiapatita, exceto naquela associada ao colágeno.

Ma *et al.* (2018) desenvolveram nanopartículas de HAp e incorporaram-as a filmes de poliláctico (PLA) pelo método de evaporação do solvente. Os experimentos de reparo osseo *in vivo*, em um modelo de defeito da mandíbula de rato, provam que o filme de HAp / PLA apresentam amplas aplicações como um biomaterial para o reparo ósseo devido a osteoindução, biocompatibilidade, baixo custo e sua capacidade de produção em massa.

3.5 FORMAÇÃO E REPARAÇÃO ÓSSEA

O osso é um tecido dinâmico remodelado continuamente ao longo da vida (VALSAMIS *et al.*, 2006). É constituído de um tipo especializado de tecido conjuntivo com propriedades mecânicas (oferecendo suporte para inserção de músculos), propriedades protetoras para órgãos vitais (coração, cérebro, medula óssea, etc.),

função metabólica, propriedades elásticas, resistência (DUPLOMB *et al.*, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013), além de importante papel na homeostase mineral e armazenamento dos elementos hematopoiéticos (COTRAN *et al.*, 2010).

Este tecido é caracterizado como um tecido multifuncional, metabolicamente muito ativo, constituído de uma população heterogênea de células, em diferentes estágios de diferenciação, que, por meio de uma sequência coordenada de eventos, regula a mobilização e a deposição mineral durante a vida do indivíduo (DUPLOMB *et al.*, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

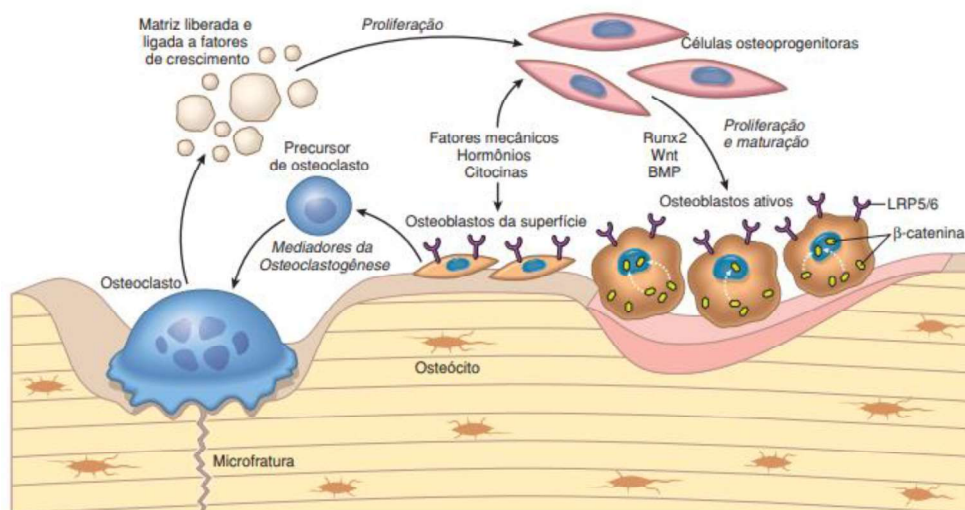
O tecido ósseo é composto de linhagens de osteoblastos e osteoclastos com funções específicas (DUPLOMB *et al.*, 2006). Os osteoclastos são células gigantes especializadas na reabsorção óssea (MIKAN V; OLIVEROS A, 2007). A formação de osteoclastos é controlada pelo hormônio paratireoide (PTH) que possui receptores de membrana que respondem à atividade do cálcio ionizado (BLAIR; ZAIDI; SCHLESINGER, 2002). Deste modo, quando Ca^{2+} declina, o PTH é secretado e formam osteoclastos, que dissolvem o mineral ósseo, restaurando assim a atividade do cálcio (BLAIR; ZAIDI; SCHLESINGER, 2002).

Por outro lado, os osteoblastos são células funcionais fundamentais para a formação e renovação contínua do osso, sendo responsáveis pelo desenvolvimento ósseo e regulação da atividade dos osteoclastos (SONG *et al.*, 2017). Representam 4-6% das células residentes totais no osso, sendo capazes de liberar fatores de regulação de longo alcance (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014).

Os osteoblastos apresentam formato cúbico e recobrem as superfícies ósseas ativas, produzindo osso novo por síntese e montagem da matriz extracelular (ROEDER; MATTHEWS; KALAJZIC, 2016). Possui a capacidade de produzir várias proteínas, tais como osteocalcina, fosfatase alcalina e uma grande quantidade de colágeno de tipo I (SAINT-PASTOU TERRIER; GASQUE, 2017) .

Na figura 3.4 pode ser observado células ósseas enfatizando a participação dos hormônios, citocinas, fatores de crescimento e moléculas transmissoras de sinais que são os fatores-chave na formação e maturação óssea, pois permitem a comunicação entre os osteoblastos e osteoclastos. A reabsorção e formação óssea na remodelagem são processos conjugados, controlados por fatores sistêmicos e citocinas locais, algumas destas depositadas na matriz óssea, adaptado de Cotran *et al.* (2010).

Figura 2.4- Fluxograma que ilustra o desenvolvimento de osteoblastos e osteoclastos provenientes de células da medula óssea



Fonte: Cotran *et al.* (2010).

A matriz mineral óssea representa a principal reserva de íons minerais, especialmente cálcio e fósforo (DUPLOMB *et al.*, 2006). A matriz extracelular do osso, que é rica em colágeno tipo I, é conhecida como osteóide quando ainda não mineralizada. É o acúmulo de fósforo de cálcio na forma de HAp que assegurará a mineralização do osso recém-criado (SAINT-PASTOU TERRIER; GASQUE, 2017).

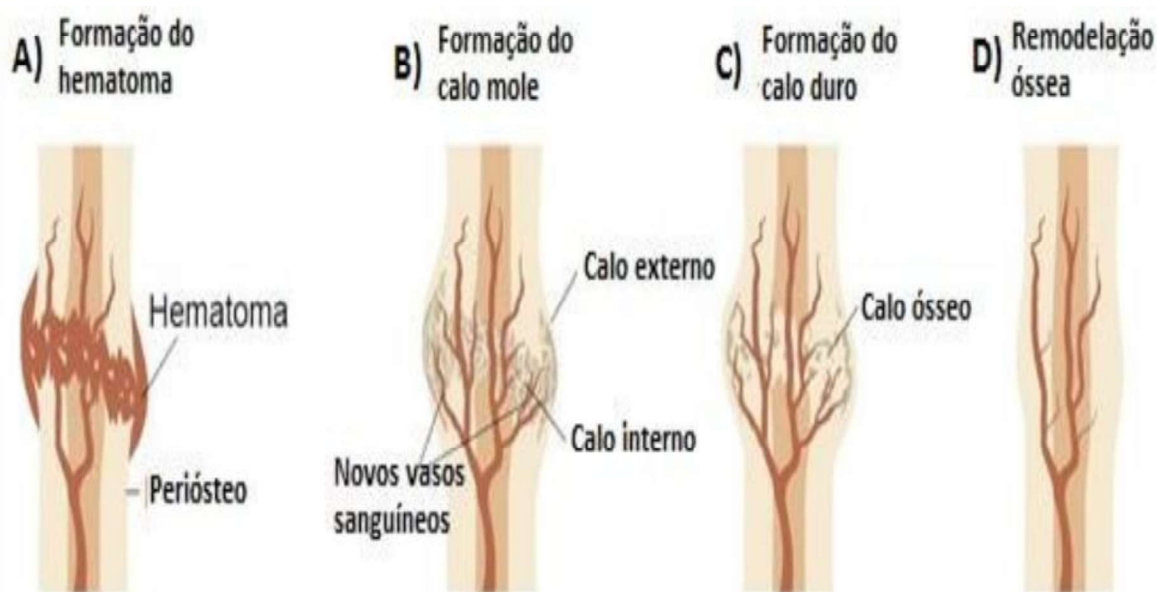
O tecido ósseo, quando lesado, é capaz de regenerar-se (KATCHBURIAN; ARANA, 2004) formando o osso novo, idêntico ao tecido não lesionado (DUPLOMB *et al.*, 2006). A regeneração óssea é um termo aplicado ao processo biológico em que estrutura e a função do tecido lesado ou perdido são completamente restaurados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O reparo da fratura é um processo complexo que exige o recrutamento, a diferenciação e a atividade de diferentes tipos de células que produzem e remodelam de forma coordenada a matriz óssea para restabelecer a anatomia e a função do osso lesionado. Durante a cicatrização de fraturas, várias moléculas contribuem para uma cascata de eventos de sinalização celular e um dos principais mecanismos de sinalização que desencadeia a diferenciação dos osteoblastos é por meio da adenosina (BRADASCHIA-CORREA *et al.*, 2017).

O processo de reparo em si é composto por quatro fases (figura 3.5) que se sobrepõem. Inicialmente há uma fase de resposta inflamatória imediata que leva ao recrutamento de células-tronco mesenquimais e subsequente diferenciação em

condrócitos que produzem cartilagens e osteoblastos, que formam o osso. Depois é produzida uma matriz cartilaginosa, que mineraliza, e ocorre uma transição para osso, com iniciativa da reabsorção da cartilagem mineralizada. A formação do osso primário é seguida por remodelação, em que o calo ósseo inicial é modificado por formação e reabsorção óssea secundária para restaurar a estrutura anatômica que suporta cargas mecânicas (GERSTENFELD *et al.*, 2003, 2006)

Figura 2.5- Etapas reparação óssea



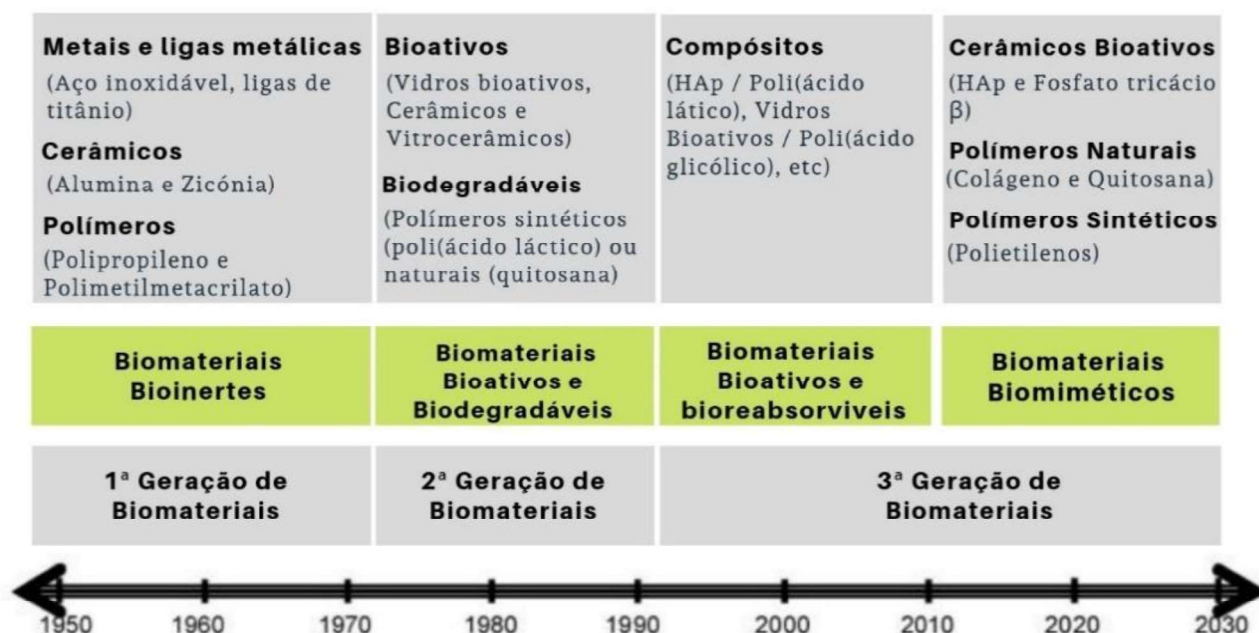
Fonte: Adaptado de Carano; Filvaroff (2003).

3.6 APLICAÇÃO DE BIOMATERIAIS PARA REPARAÇÃO ÓSSEA

O crescimento e progresso das investigações acerca dos biomateriais deram-se de acordo com os avanços nos conhecimentos adquiridos relacionados ao microambiente do local das lesões. Consequentemente, as alterações nos requisitos e características pretendidas para um determinado material, conduziram à criação de três gerações de biomateriais, conforme a figura 3.7 (HENCH; POLAK, 2002).

A primeira geração é composta por materiais bioinertes, a segunda engloba materiais bioativos e biodegradáveis e a terceira, projetada para impulsionar respostas celulares específicas ao nível molecular, por conciliar a bioatividade e biodegradabilidade da geração anterior (HENCH; POLAK, 2002).

Figura 2.6- Evolução cronológica do desenvolvimento dos biomateriais utilizados na reparação e regeneração óssea



Fonte: Adaptado de Murugan; Ramakrishna (2005).

Os biomateriais utilizados na reconstrução e/ou substituição óssea devem seguir alguns mecanismos biológicos como: osteogênese, osteocondução e osteoindução (CHAN *et al.*, 2009; JARDIM *et al.*, 2009; POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEZ; RAMIREZ-VICK, 2014).

A osteoindução trata-se de uma característica indispensável à regeneração do tecido ósseo, pois estimula os fatores de crescimento exógenos, o que causa a diferenciação das células que iniciam o seu processo de formação. A osteocondução fornece uma matriz de suporte e facilita a adesão das células ósseas e a osteogênese é o processo que induz a geração efetiva de tecido por parte das células ósseas (CHAN *et al.*, 2009; POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEZ; RAMIREZ-VICK, 2014).

Ademais, devem proporcionar a migração de osteoblastos ou de células precursoras de osteoblastos para o local lesado e de fatores regulatórios que promovam esse o recrutamento das células que auxiliam na reparação óssea, assim. Além disso, precisam proporcionar uma estrutura adequada, que servirá de apoio para a neoformação óssea (MATURANA *et al.*, 2014).

Dentre os biomateriais, as membranas compostas de extratos naturais são muito empregadas para estimular a regeneração em defeitos ósseos com o intuito

de separar o tecido mole do tecido ósseo, produzindo uma barreira que impedirá a migração de células do tecido epitelial e conjuntivo; proporcionando as células de formação de osso um espaço isolado destinado à regeneração óssea (CARVALHO *et al.*, 2010; PIRES, 2010; REIS *et al.*, 2012; RAKHMATIA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2015, 2016; SOUSA *et al.*, 2016). As membranas devem se manter estáveis, para não interferir na osseointegração, e recobertas para que não se transforme em um foco de infecção (MACEDO *et al.*, 2003).

Investigando os efeitos das membranas para regeneração óssea, Dimitriou *et al.*, (2012) relatam que estas devem promover regeneração óssea de forma previsível, sem a presença de efeitos colaterais. Além do mais, devem ser de fácil manipulação e custo acessível.

As membranas biológicas utilizadas na reparação óssea podem ser reabsorvíveis e não absorvíveis. As membranas não absorvíveis mantêm sua integridade estrutural e podem permanecer por muito tempo sobre o tecido ósseo. Sua estabilidade dimensional e desenho permitem um completo controle de sua aplicação e minimização das variações de efeito. Contudo, requer um segundo procedimento cirúrgico para serem removidas (COSTA *et al.*, 2016).

Já as membranas absorvíveis eliminam a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico, para remoção apresentando como benefícios a promoção da cura da ferida por meio da fixação do coágulo, estabilização da ferida e homeostase (OH *et al.*, 2003; STAVROPOULOS *et al.*, 2004; CURY *et al.*, 2005). Segundo Faverani *et al.*, (2014) as membrana de colágeno, um exemplo e membranas absorvíveis, além das propriedades já citadas, também promovem o aumento primário da cicatrização da ferida por meio de sua habilidade quimiotática de atrair fibroblastos.

A literatura mostra que diversos estudos experimentais têm sido desenvolvidos para avaliar a resposta de membranas na reparação do tecido ósseo.

Silva *et al.*, (2011) avaliaram o processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos experimentais realizados na parede alveolar do seio maxilar, comunicando-se com a cavidade sinusal utilizando membranas de colágeno e fásia temporal, em quatro macacos pregos, observando que o uso de membranas de colágeno trouxe benefícios ao processo de reparo ósseo.

Pértile (2007) avaliou a adesão, proliferação e viabilidade de fibroblastos de camundongo, linhagem L929, em suporte biopolimérico. Dois tipos de celulose

bacteriana foram utilizados: uma produzida em laboratório e outra comercial (BIONEXT®). Foram observadas diferenças morfológicas significativas nas células. Os fibroblastos permaneceram com morfologia arredondada. A celulose bacteriana permitiu a adesão, crescimento, proliferação e viabilidade das células.

4 METODOLOGIA

4.1 EXTRAÇÃO DA BIXINA

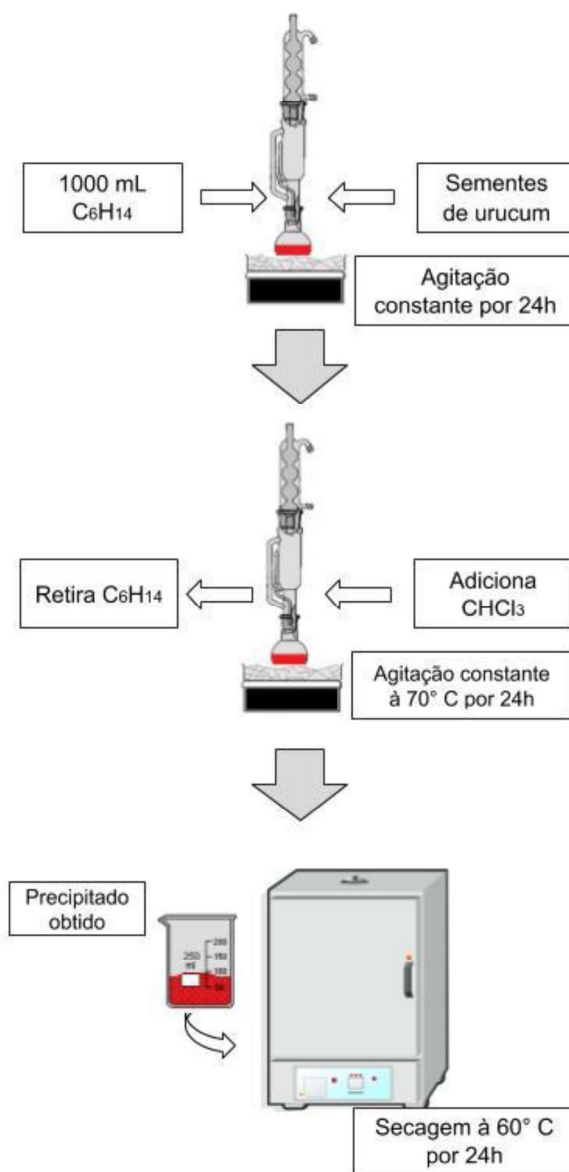
A matéria-prima denominada bixina (Figura 0.1) foi extraída de sementes do urucum (*Bixaorellana L.*) adquirida no município de Agricolândia – PI (Latitude: 05° 47' 56" S e Longitude: 42° 40' 08" W), conforme procedimento adaptado do método descrito por

. Aproximadamente 200 g de sementes de urucum, previamente limpas de resíduos de folhas e cascas, foram adicionadas em extrator Soxhlet com 1000 mL de hexano (C_6H_{14}) sob agitação constante, por 24 horas. Após este período o hexano foi removido e em seguida, adicionou-o clorofórmio ($CHCl_3$) a 70°C durante 24 horas. Depois, o precipitado foi filtrado e seco em estufa a 60°C por 24 horas, ver Figura 0.2.

Figura 0.1- Bixina em pó



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 0.2- Fluxograma da síntese da Bixina

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 SÍNTESE DA HAp

O pó de HAp foi obtido por precipitação química utilizando hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) e fosfato de amônio (dibásico) ($(NH_4)_2HPO_4$), como descrito na equação 4.1. Inicialmente, os reagentes foram dissolvidos em água deionizada e misturados. A mistura permaneceu sob agitação constante em temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi lavado com água destilada. Após essa etapa, a suspensão foi seca em estufa a $100^\circ C$ por 24h, como descrito no fluxograma da Figura 0.3.

O pó obtido foi analisado em DRX em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando-se radiação K α do cobre, tensão de 40kV, corrente de 30mA, varredura entre 10 a 90° e velocidade de varredura de 2°/min para comparação dos picos obtidos com os característicos da HAp.

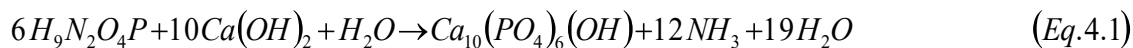
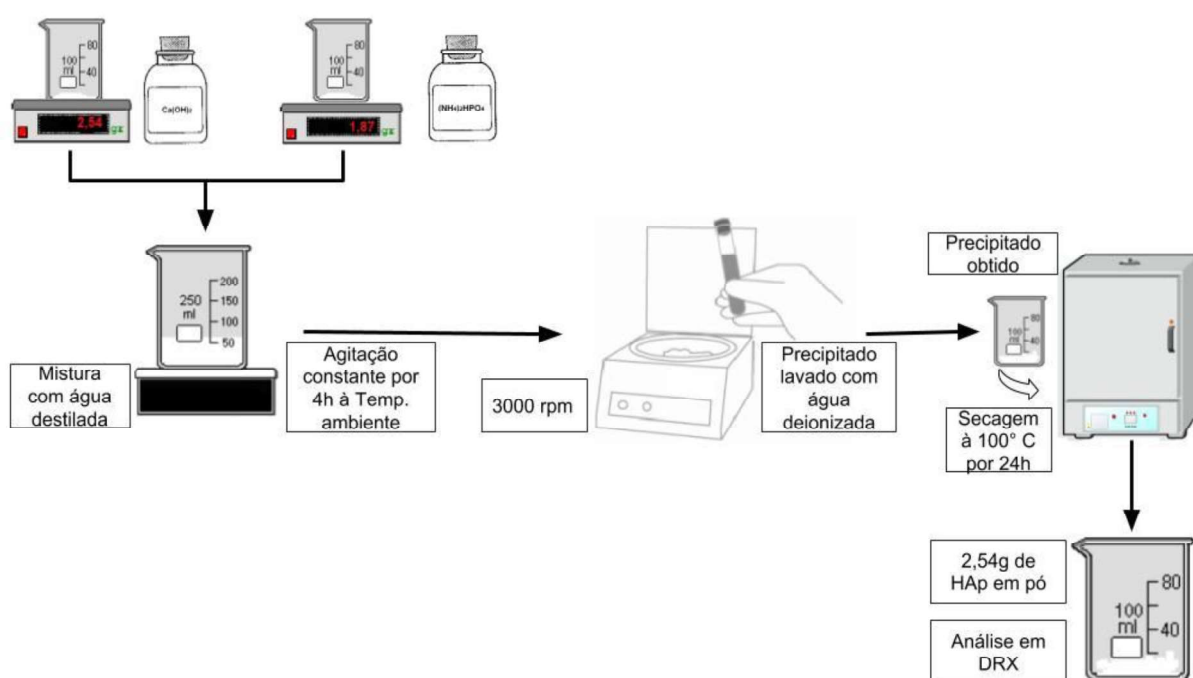


Figura 0.3 - Fluxograma da síntese da HAp



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 OBTENÇÃO DO POLIHIDROXIBUTIRATO - PHB

Para o processamento das membranas foi utilizado o PHB, fornecido pela empresa PHB Industrial S/A (Serrana, SP – Brasil) na forma de pó sem tratamento prévio. Este polímero foi preparado a partir da fermentação da sacarose da cana de açúcar por bactérias *Alcaligenes eutrophus*. Na Tabela 0.1, apresentam propriedades do PHB.

Tabela 0.1- Propriedades do PHB BIOCYCLE 1000.

	Valor	Método (*)
Propriedades físicas		
Densidade	1,20 g/cm ³	D792
Índice de Fluidez	6,5 g/10min	D1238 (190 °C, 2,16 Kg)
Propriedades mecânicas		
Resistência à tração	32 MPa	D638
Alongamento na ruptura	4,0%	D638
Módulo de Flexão	2.200 Mpa	D790
Resistência ao Impacto	28 J/m	D256
Izod com entalhe		
Propriedades térmicas		
Temperatura de fusão cristalina	170 – 175 °C	D3418
Temperatura de Distorção ao calor - HDT	117 °C	D648 (0,45 MPa)
	65 °C	D648 (1,8 MPa)
Temperatura de amolecimento Vicat	135 °C	D1525

(*) Segundo a American Society for Testing and Materials (ASTM)

Fonte: Dados do Fabricante (PHB Industrial S/A).

4.4 PROCESSAMENTO DAS MEMBRANAS

As membranas de PHB/Bixina/HAp foram preparadas pelo processo de evaporação de solvente (*solution casting*). As composições das membranas com a matriz PHB e suas respectivas concentrações estão descritas na Tabela 0.2.

Tabela 0.2– Composição das membranas: PHB, Bixina e HAp

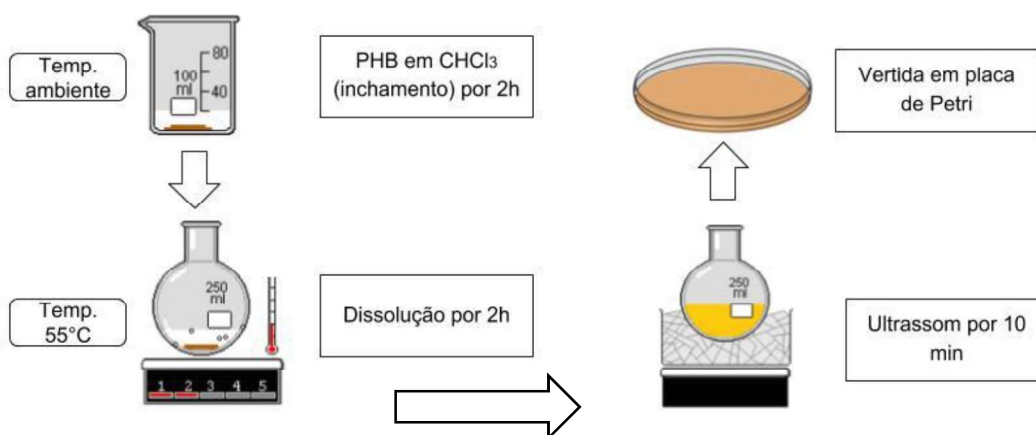
Membrana	Composição (%)		
	PHB	Bixina	HAp
P100	100	-	-
P50/H50	50	-	50
P50/B50	50	50	-
P70/B15/H15	70	15	15
P60/B20/H20	60	20	20
P50/B30/H20	50	30	20

Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, o PHB foi imerso em clorofórmio por 2 h para inchamento. Em seguida, a mistura permaneceu em aquecimento a 55 °C sob agitação constante por

igual período. No P100, contendo somente PHB, após temperatura ambiente, a mistura permaneceu por 10 minutos em ultrassom e filtrado em papel filtro quantitativo faixa preta. Em seguida, vertida na placa de Petri por um período de 24 horas e coberta com papel alumínio (Figura 0.4).

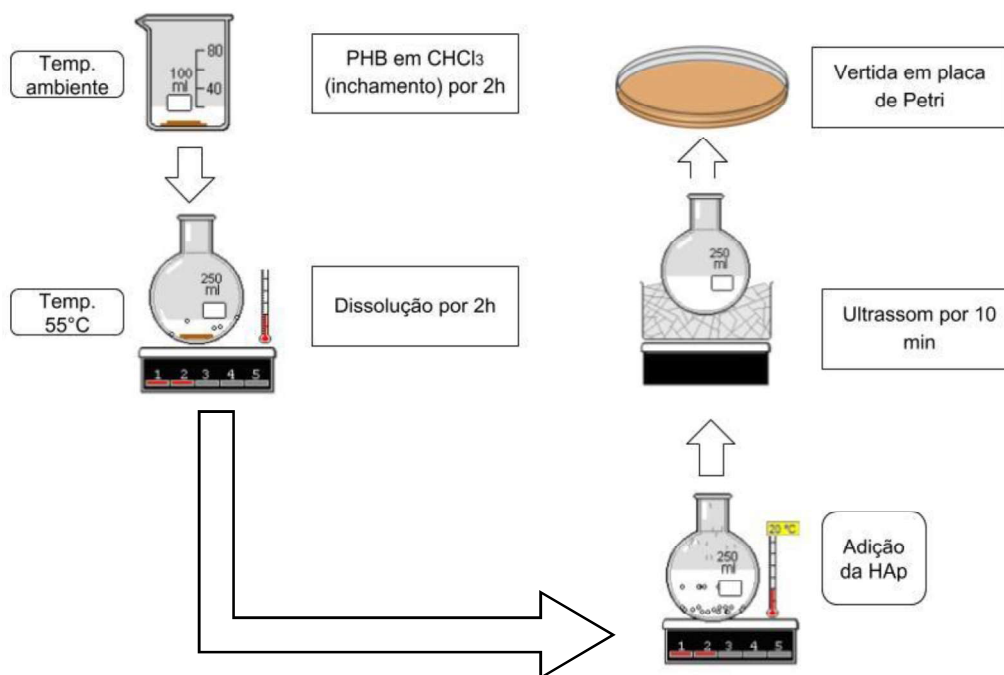
Figura 0.4 - Fluxograma da preparação da proporção P100.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a confecção do P50/H50 (PHB/HAp) seguiu as mesmas condições de preparação de P100 apenas adicionou a HAp antes da etapa do Ultrassom, Figura 0.5.

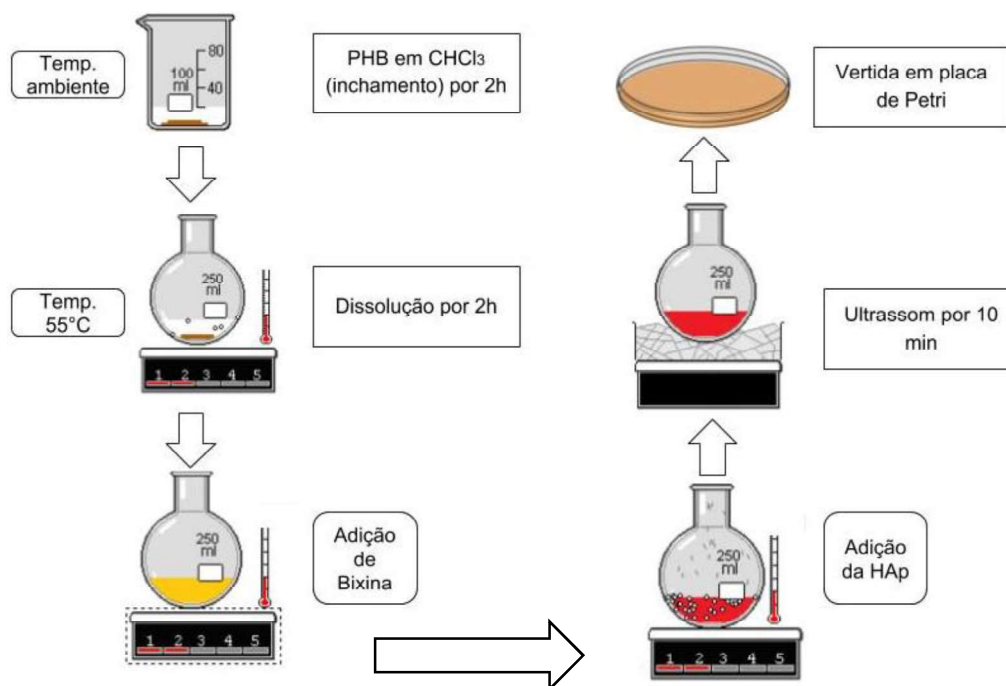
Figura 0.5 - Fluxograma da preparação da proporção P50/H50.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após dissolução completa do PHB a 55 °C foram preparadas as membranas P70/B15/H15, P60/B20/H20 e P50/B30/H20. Nesta etapa, foi adicionada ao PHB bixina e HAp, seguindo o mesmo processo acima descrito (Figura 0.6).

Figura 0.6-Fluxograma da preparação das demais proporções de membranas



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

4.5.1 Microscopia Ótica (MO)

A caracterização da Microscopia Ótica das membranas seguiu o procedimento interno do laboratório. O equipamento utilizado nesse ensaio foi um Microscópio Óptico da marca Hirox de reflexão e transmissão com acessórios 2D e variação de 10X, acoplado a uma estação de Análise de Imagens.

4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

As análises morfológicas da superfície do PHB, bixina, HAp e das proporções de membrana foram medidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no microscópio modelo SSX-550 Superscan SHIMADZU®. Para a realização das análises as amostras foram secas em estufa à temperatura de 60 °C por 24 horas e em seguida transferidas para um dessecador, onde foram mantidas

até a análise. As amostras foram recobertas com ouro em metalizador, modelo SC-701 da Sanyu Electron por não possuírem natureza condutora. O equipamento foi operado em 15 kV. O material do filamento utilizado foi de tungstênio.

4.5.3 Fluorescência de raios-X - FRX

A composição química das amostras foi determinada por fluorescência de raios-X por energia dispersiva (FRX). Os elementos presentes em cada amostra foram determinados qualitativamente e quantitativamente. Para este tipo de análise utilizou-se um Espectrômetro por Fluorescência de Raios-X, modelo Epsilon 30 da Panalytical. O método utilizado foi o semi quantitativo, em uma atmosfera de vácuo.

4.5.4 Difração de raio-X - DRX

Os difratogramas das amostras foram registrados em um difratômetro da Shimadzu® modelo XRD-6000, com um detector de radiação PIXcel/3D. A fonte de radiação de $\text{CuK}\alpha = 0,154\text{nm}$, operando com uma voltagem de 40 kV e com uma corrente de 30 mA. A velocidade adotada de varredura foi de $0,014^\circ/\text{min}$ para valores de 2θ entre 10° e 90° a uma taxa de $2^\circ/\text{min}$.

4.5.5 Espectroscopia de infravermelho - FTIR

Esta técnica foi utilizada para detectar as alterações ocorridas nas amostras. Os espectros de absorção para as amostras foram realizadas em um espectrômetro da marca Shimadzu, modelo IRA Ftnity-1, com varredura de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr.

4.5.6 Análise termogravimétrica - TGA

As amostras em estudo foram submetidas a ensaios de TGA em equipamento da marca Shimadzu, modelo TGA-51. As condições da análise foram: faixa de temperatura de ensaio de 25°C a 1000°C , taxa de aquecimento $10^\circ\text{C. min}^{-1}$ e atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min^{-1} em porta amostra de platina.

4.5.7 Calorimetria exploratória diferencial - DSC

As análises foram realizadas em equipamento da marca Shimadzu – Modelo DSC 60 PLUS de acordo com as seguintes condições: faixa de temperatura de

ensaio de 25 °C a 600 °C, taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio a 50 ml.min⁻¹. Foi utilizado porta amostra de alumínio.

4.5.8 Capacidade de Absorção das Membranas

Os ensaios de capacidade de absorção foram realizados adotando como referência a norma ISO 62:2008 e estudos realizados por Lima *et al.*, (2007); Bouchonneau *et al.*, (2010); Almeida *et al.*, (2013) que medem a quantidade de água absorvida em matrizes poliméricas.

As amostras foram confeccionadas em placas de petri 60x15mm e previamente secas em estufa a (50 ± 2) °C durante 24 h e resfriadas à temperatura ambiente no dessecador, foram submetidos à imersão em água deionizada, solução fisiológica (0,9%) e saliva artificial determinando-se o total de solução absorvida até a saturação da amostra nos tempos pré-determinados 1h, 6h, 8h, 24h, 48h, 7dias, 14 dias, 21 dias, 28 dias e 35 dias.

Após passagem inicial, as amostras foram imersas em 300 mL de água deionizada a temperatura ambiente (28 ± 2) °C. Nos tempos pré-determinados, as membranas foram retiradas da água, o excesso de água superficial será removido com papel filtro e a massa determinada.

Em seguida, foram realizados os ensaios de absorção das membranas por imersão em 300 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% seguindo os mesmos parâmetros acima mencionados. As pesagens foram feitas após o término de tempo de imersão de cada amostra até que a diferença de massa (em relação à pesagem anterior) fosse menor que 1%.

Uma terceira análise foi realizada, com os parâmetros acima citados, objetivando avaliar a absorção e a degradação em 300 mL de saliva artificial (pH=5) simulando meio biológico.

Para cada ensaio calculou-se a percentagem em massa segundo a equação 4.2. Onde: **m₁** é a massa da amostra, em miligramas (mg), após secagem e antes da imersão, **m₂** é a massa da amostra, em miligramas (mg), após imersão e **A_{massa}** é a percentagem de absorção para cada amostra.

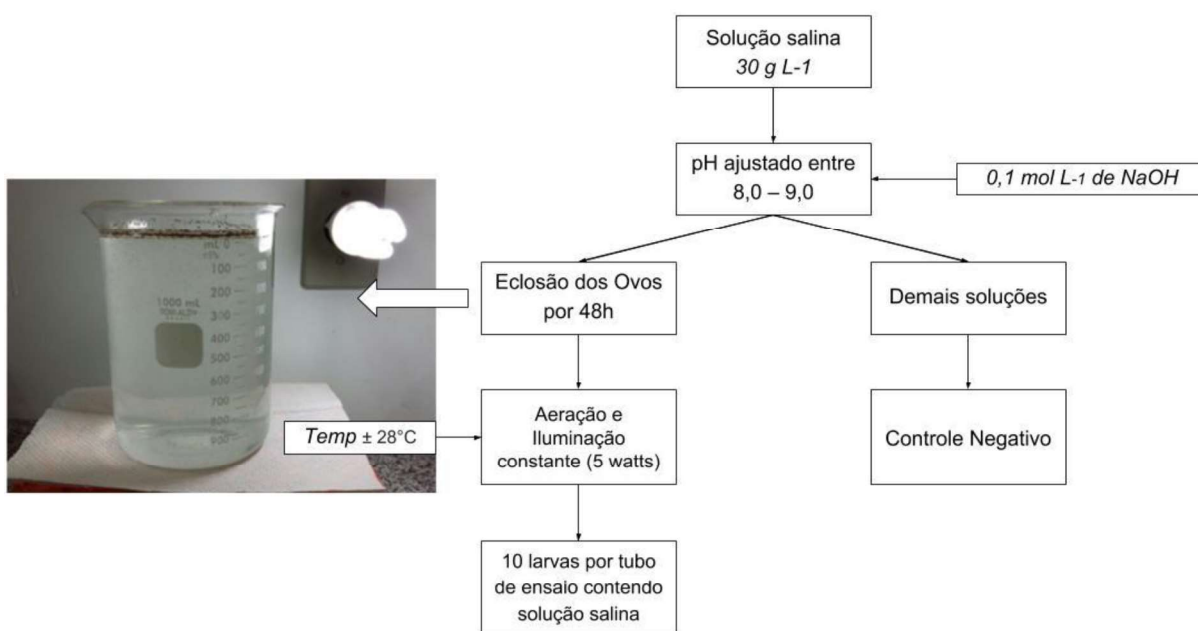
$$A_{\text{água}} (\%) = \frac{(M_2 - M_1)}{M_1} \times 100 \quad \text{Eq.4.2}$$

4.5.9 Ensaios de toxicidade aguda

Os ensaios de toxicidade com *Artemia salina* foi adaptado conforme método de Meyer *et al.* (1982). Preparou-se uma solução salina (sal grosso e água mineral) a 30 g/L e para ajustar o pH entre (8,0 – 9,0) adicionou-se gota a gota de uma solução de NaOH a 0,1 mol/L.

Parte da solução foi utilizada para eclosão dos ovos e a outra metade para futuras diluições. Os ovos foram imersos na solução salina para eclodir por 48 horas, sob aeração e iluminação constante (lâmpada de 5 watts) a temperatura média de 28°C, ver Figura 0.7.

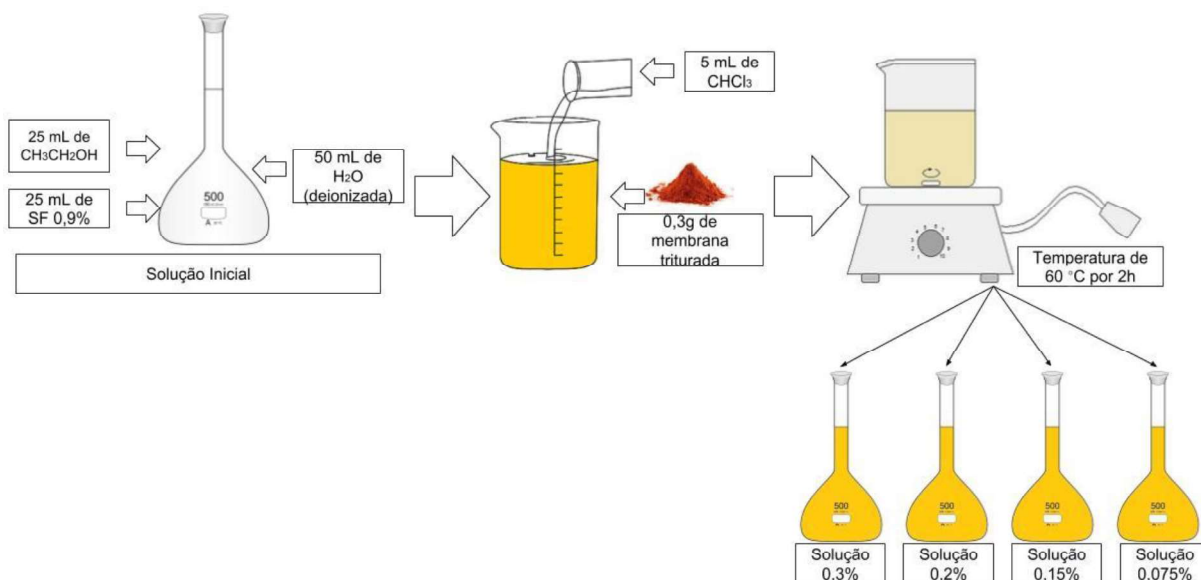
Figura 0.7– Fluxograma do ensaio de toxidade aguda evidenciado Ovos de *Artemia salina* em solução salina para eclosão



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a eclosão dos ovos, transferiu-se 10 larvas para cada tubo de ensaio contendo solução salina, os crustáceos que migraram para o lado da incidência da luz foram escolhidos por apresentar maior resistência. Os ensaios foram realizados em triplicata e os animais mortos e vivos após 24 horas foram contados com auxílio de uma Lupa de Bancada Articulável com Lente Bifocal de 5D e 20D - Yaxun® modelo139. As membranas por serem insolúveis em água, foram trituradas e preparados extratos dissolvidos em etanol, SF 0,9% e CHCl₃, conforme fluxograma da Figura 0.8.

Figura 0.8- Fluxograma de preparação dos extratos da membrana.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A porcentagem de larvas de *Artemia salina* mortas, comparado ao aumento da concentração do extrato da membrana foram ajustados e utilizados para estimar a concentração de extrato correspondente a matar 50% das *Artemia salina*, valor representativo da DL_{50} . Para o controle negativo foi realizado teste somente com água salina e para o controle positivo foi utilizado dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) a 10 mg/L.

4.5.10 Esterilização das membranas de PHB/Bixina/HAp

Para esterilização, as amostras foram expostas à luz ultravioleta (UV) durante 30 minutos em câmara de fluxo laminar vertical – Pa50 ECO. Os materiais utilizados para corte e manipulação das membranas foram higienizados com álcool a 70% e em seguida expostas à luz ultravioleta (UV) durante 30 minutos.

4.5.11 Controle microbiológico

Os testes de controle microbiológico foram realizados no Laboratório de Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga, setor de Microbiologia (LACEN-PI) com cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231.

As amostras foram cortadas em forma de discos e colocadas em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo *Müller Hinton* inoculadas com 2 mL de inóculo

contendo $1,5 \times 10^8$ células/mL Após a inoculação foi retirado o excesso com auxílio de pipeta. As placas permaneceram entreabertas em câmara de fluxo laminar até apresentarem superfície seca. Posteriormente, três discos de amostras foram distribuídos na superfície da placa que foram incubadas à 37°C por 24 h.

Após este período havendo a formação de halo de inibição, os seus diâmetros serão mensurados com o auxílio de um paquímetro. A fim de garantir a qualidade dos ensaios, os testes foram realizados em triplicata.

4.5.12 Dados estatísticos

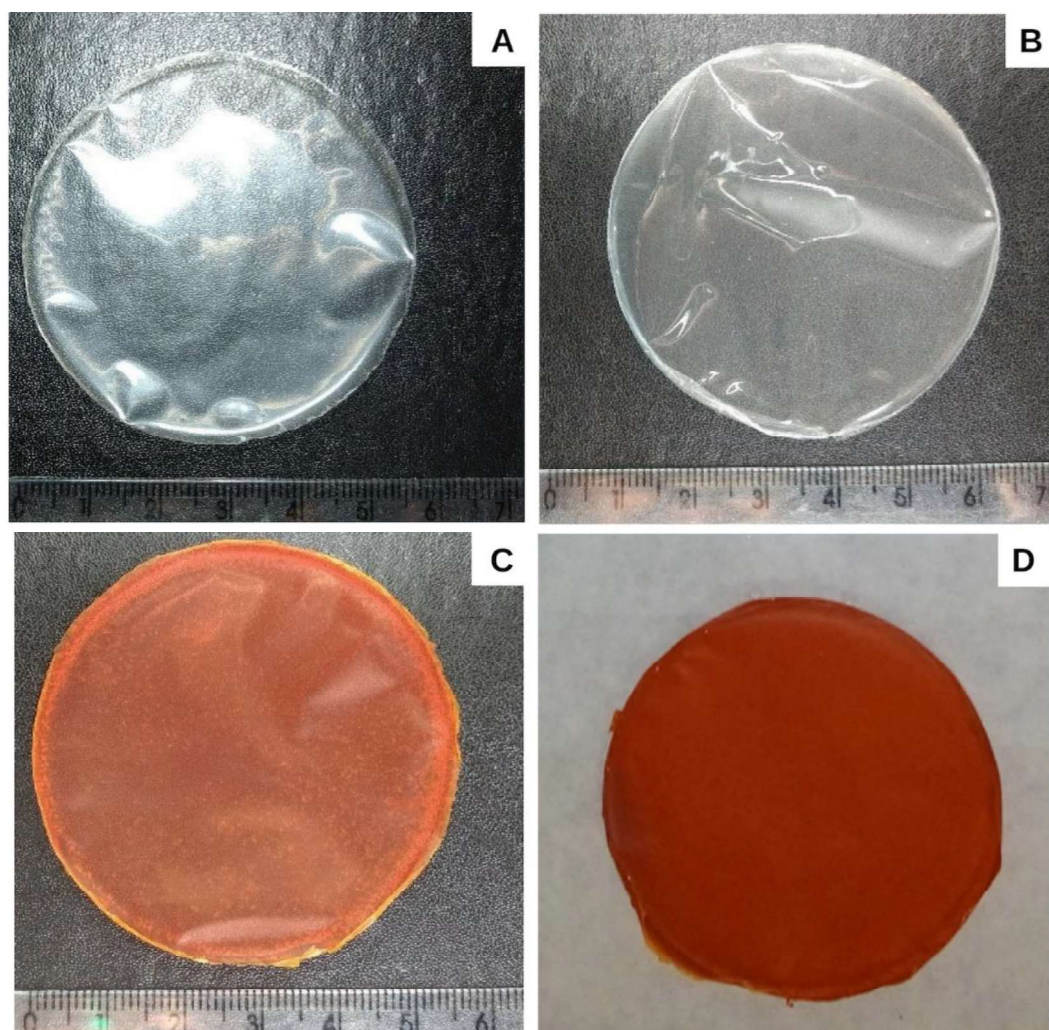
A análise estatística dos dados foi realizada de forma quantitativa e descritiva, utilizando One-Way ANOVA e o teste t de Student por meio dos programas Origin (Versão 8.0), SPSS Estatística® (Versão 20.0) e Microsoft Excel® (Versão 2016). Os testes foram realizados a um nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como médias e desvio padrão.

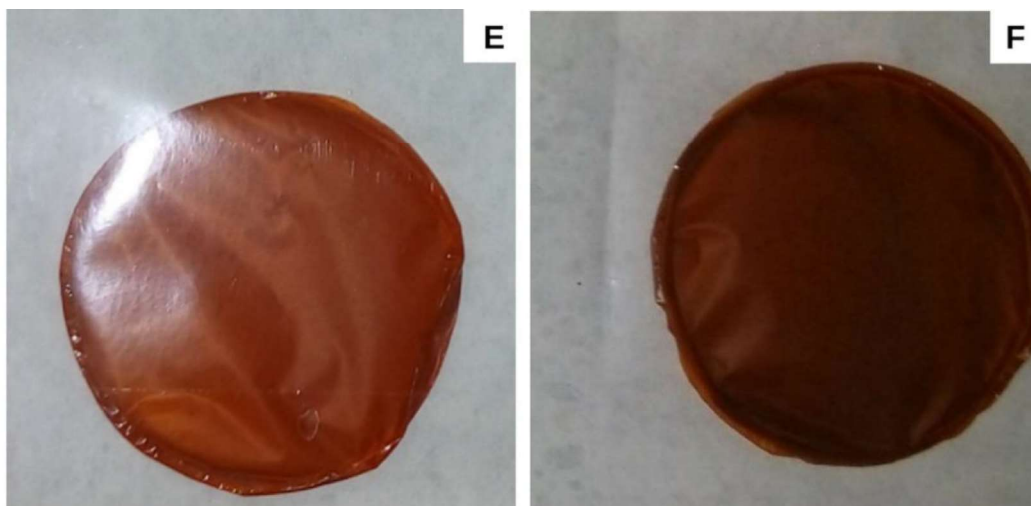
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas de PHB/Bixina/HAp foram processadas em Clorofórmio PA (Dinâmica®) devido a solubilidade da bixina e PHB neste solvente e de sua facilidade de evaporação em temperatura ambiente o que proporciona a formação de membranas pelo método de evaporação solvente. Na Figura 5.1, podem ser observadas as proporções de membranas com as seguintes características: homogeneidade, continuidade, maleabilidade e coloração avermelhada. A proporção P60/B20/H20 (Figura 5.1-B) apresentou maior rigidez em comparação as demais proporções.

Figura 5.1- Membranas de PHB/Bixina/HAp nas proporções: A) P50/H50; B) P50/B50; C) P70/B15/H15; D) P60/B20/H20 e E) P50/B30/H20





Fonte: Elaborado pelo autor.

Para estabelecer um parâmetro comparativo, foram confeccionadas membrana de PHB (P100) e membrana de PHB/HAp (P50/H50). Na Figura 5.1-A, observa-se que a membrana de PHB Puro apresenta superfície homogênea, não porosa, com coloração levemente esbranquiçada. Ao adicionar HAp (Figura 5.1-B) observa-se que a membrana passa a apresentar superfície heterogênea, rugosa, descontínua corroborando com os achados de Sousa *et al.* (2017).

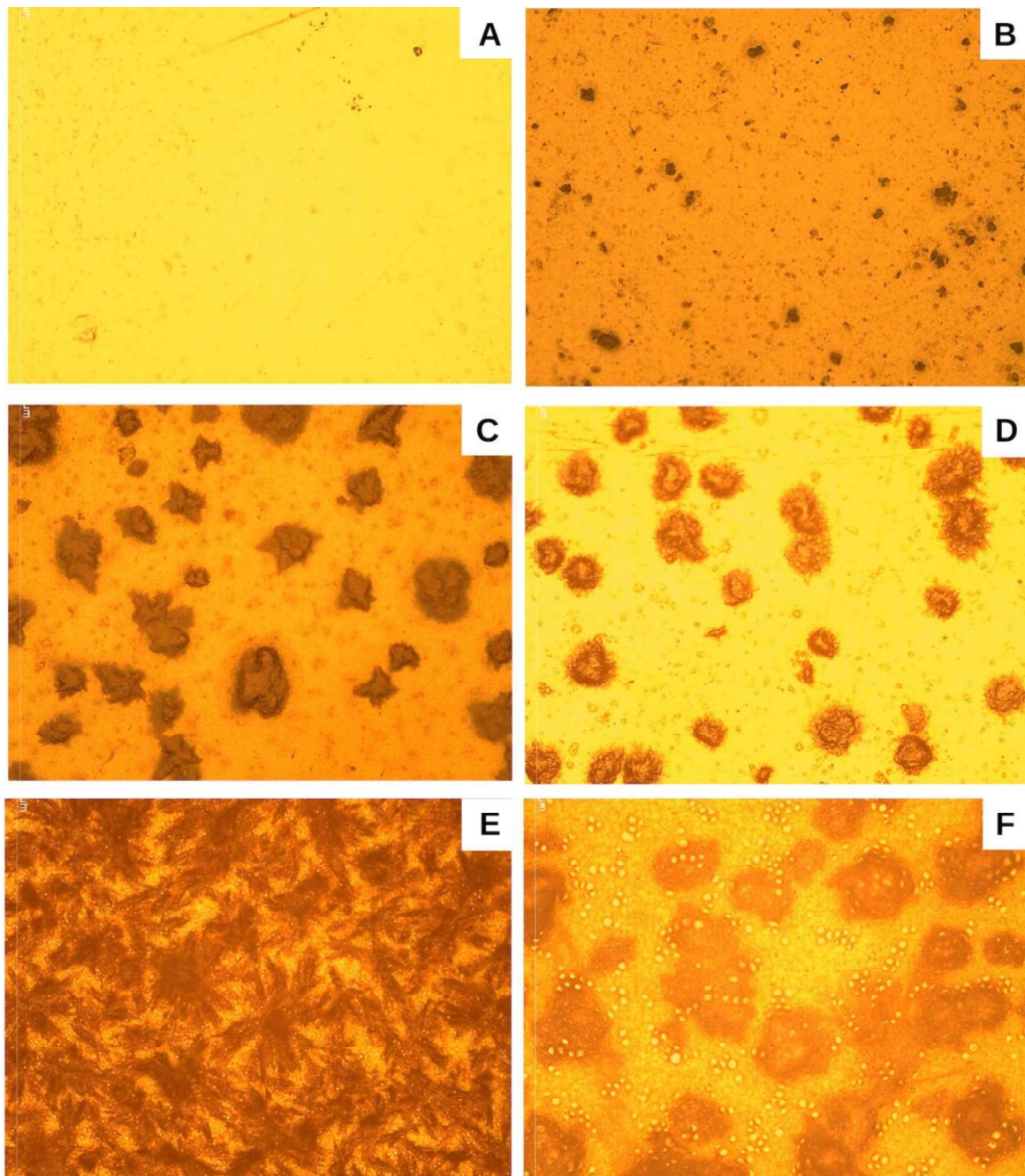
Resultados semelhantes foram observados por Santos (2013) que produziu membranas de PHB e HAp, por meio do método de prensagem, observado que as membranas apresentavam superfície irregular com presença de partículas não fundidas e poros distribuídos em toda superfície.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Segundo Wan *et al.* (2005) a morfologia do biomaterial tem impacto na sua adesão ao tecido e a presença e tamanho dos poros pode ter uma influência no crescimento celular e subsequente proliferação.

A Figura 5.2 evidencia as micrografias ópticas das diferentes proporções de membrana. Em relação à superfície das membranas evidenciadas na Figura 5.2 - C, D, E e F, verifica-se a presença de aglomerados de bixina com tamanhos variados e que se intensificam a medida que a sua proporção aumenta na composição da membrana. Na Figura 5.2-A, observa-se superfície homogênea e regular. Já na Figura 5.2-B ressaltar aglomerados com aspectos mais regulares podendo ser associada à presença de HAp na composição da membrana.

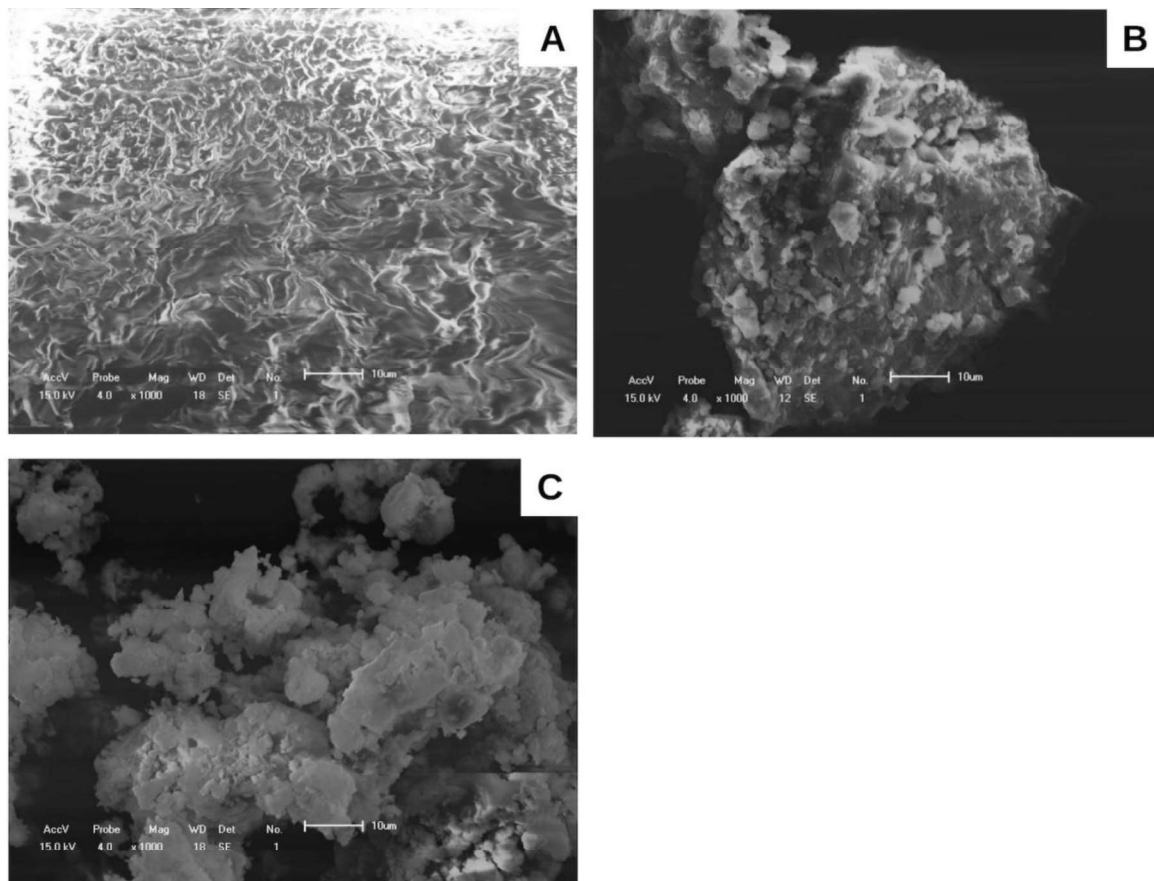
Figura 5.2—Microscopia óptica com aumento de 10X das membranas de PHB/Bixina/HAp:
A) P100; B) P50/H50; C) P50/B50; D) P70/B15/H15; E) P60/B20/H20 e F) P50/B30/H20.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na análise da morfologia do PHB em pó por MEV é possível observar estrutura homogênea e irregular que se estendem em todas as direções (Figura 5.3-A). Em contrapartida, a micrografia da superfície da bixina apresenta aglomerados sob os cristais de bixina que, provavelmente, podem ser impurezas, Figura 5.3-B. A imagem da HAp pura apresenta partículas em formatos laminares, irregulares e homogêneos corroborando com o estudo de Oliveira *et al.* (2009),

Figura 5.3-C.

Figura 5.3 - Micrografia das amostras: (A) PHB puro, (B) Bixina e (C) HAp

Fonte: Elaborado pelo autor.

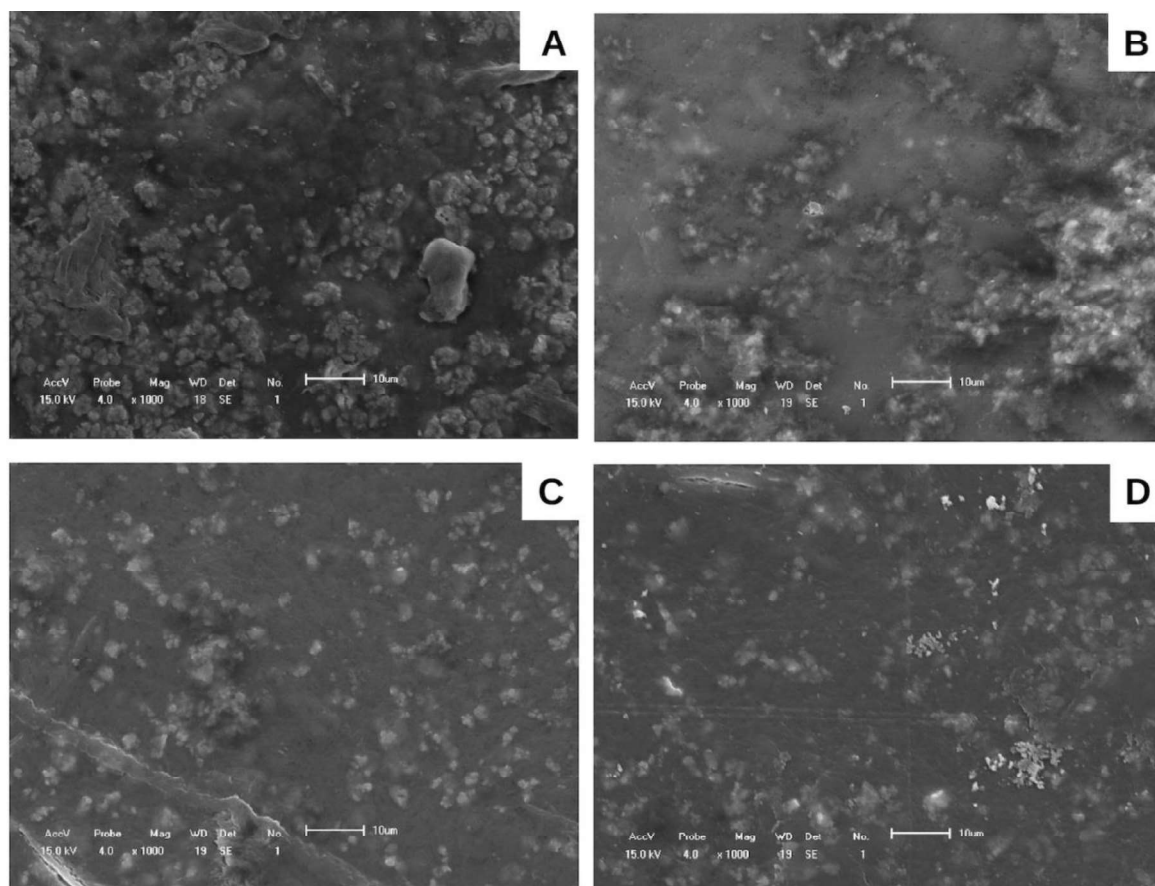
Na

Figura 5.4 podem-se observar as micrografias da superfície de controle P100 e das membranas P70/B15/H15; P60/B20/H20 e P50/B30/H20, respectivamente. Verifica-se que P70/B15/H15 apresenta superfície com textura homogênea comparado ao controle (P100), provavelmente, deve ter ocorrido o encapsulamento da bixina na matriz polimérica, como mostra a

Figura 5.4-B. Estes resultados corroboram com Loss *et al.* (2016).

Por outro lado, as membranas com maiores porcentagens de HAp (P60/B20/H20 e P50/B30/H20) apresentaram maiores aglomerados, devido maior agregação de cristais de HAp na matriz polimérica de PHB.

Figura 5.4- Micrografias das membranas de PHB/Bixina/HAp: A) P100; B) P70/B15/H15; C) P60/B20/H20 e D) P50/B30/H20.

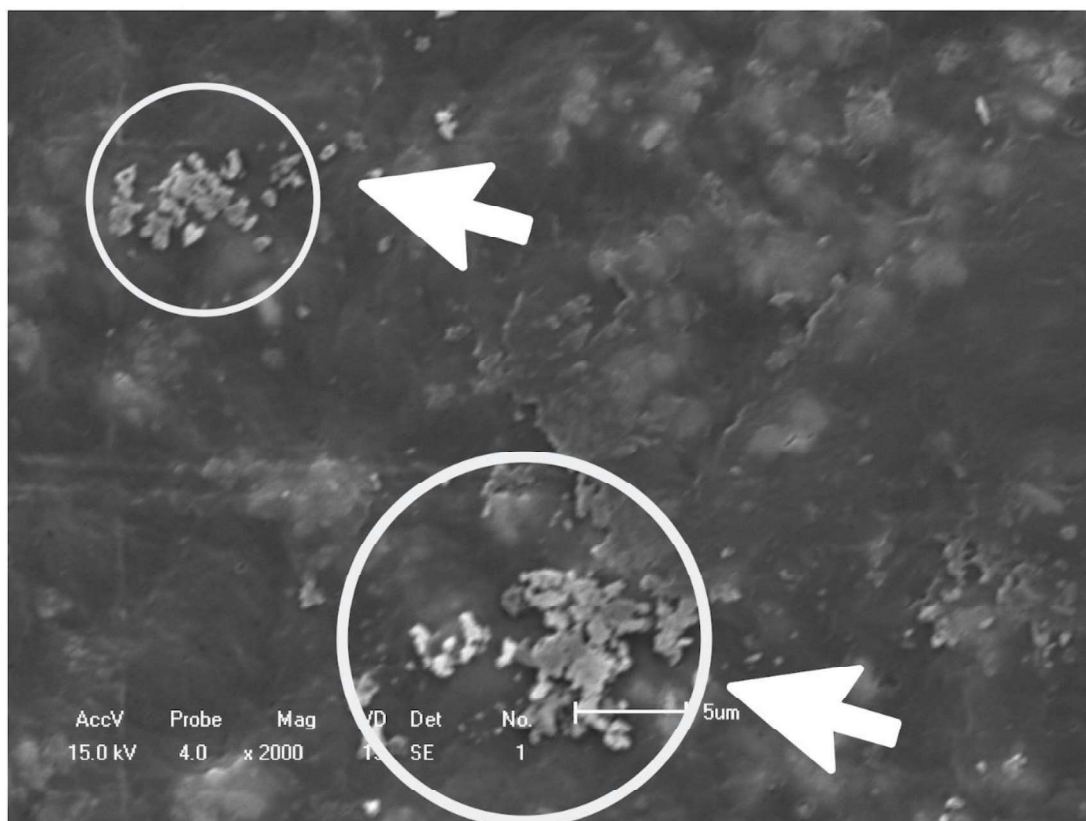


Fonte: Elaborado pelo autor.

Em uma magnificação de 2000X da proporção P50/B30/H20 é possível observar a presença de aglomerados de HAp na superfície (indicado por seta), ver figura 5.5. A presença dos aglomerados na superfície da membrana, segundo Wan *et al.* (2005) e Yuan *et al.* (2015), podem favorecer o processo de adesão, proliferação e diferenciação de tipos celulares como fibroblastos e osteoblastos, induzindo as células a produzirem componentes da matriz extracelular, facilitando a cicatrização. Para Anselme (2000), esses aglomerados podem favorecer a presença

ligações físico-químicas, por meio de forças iônicas e forças de Van der Waals, aderindo o biomaterial ao tecido.

Figura 5.5- Micrografia da membrana P50/B30/H20 com magnificação de 2000x evidenciando os aglomerados de HAp em sua superfície.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

5.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

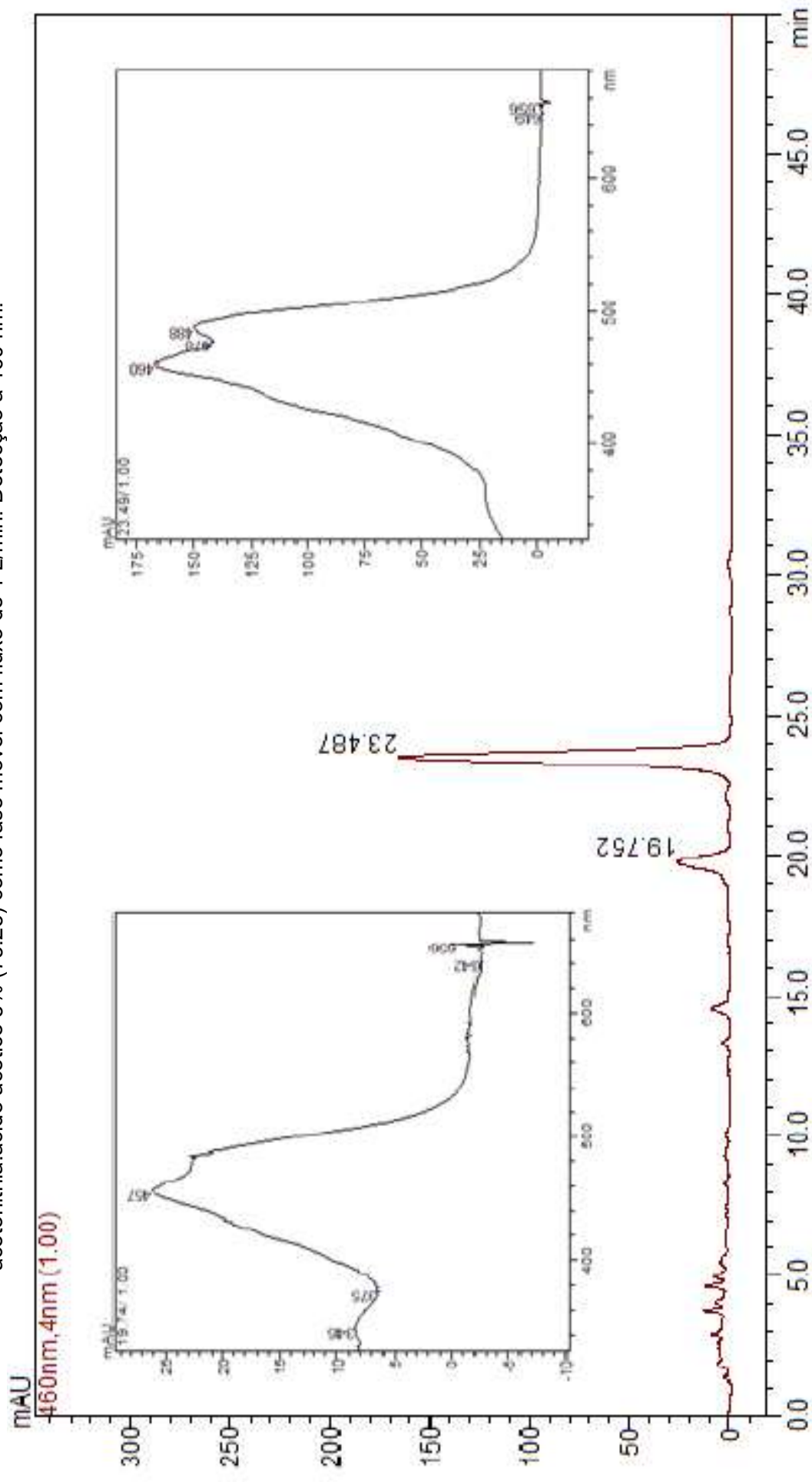
O método cromatográfico utilizado para esta análise foi comprovado, pois não há picos de interferência significativos, corroborando com o estudo de Silva, (2007) que objetivou purificar, identificar e quantificar pigmentos de urucum extraídos com diferentes metodologias, utilizando-se técnicas de análise espectroscópicas e cromatográficas.

Neste trabalho, observa-se a presença de picos minoritários nos cromatogramas com tempos de retenção próximos aos da bixina, indicando que esses produtos poderiam ser isômeros geométricos da bixina (19,792 min) (

Figura 5.6-A). Entretanto, destacou-se a verificação da presença de bixina (

Figura 5.6-B).

Figura 5.6 - Cromatograma, obtido por CLAE, do padrão de bixina. Condições cromatográficas: coluna Lichrospher 100 RP-18 e acetona/nitrila:ácido acético 5% (75:25) como fase móvel com fluxo de 1 L/min. Detecção a 460 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

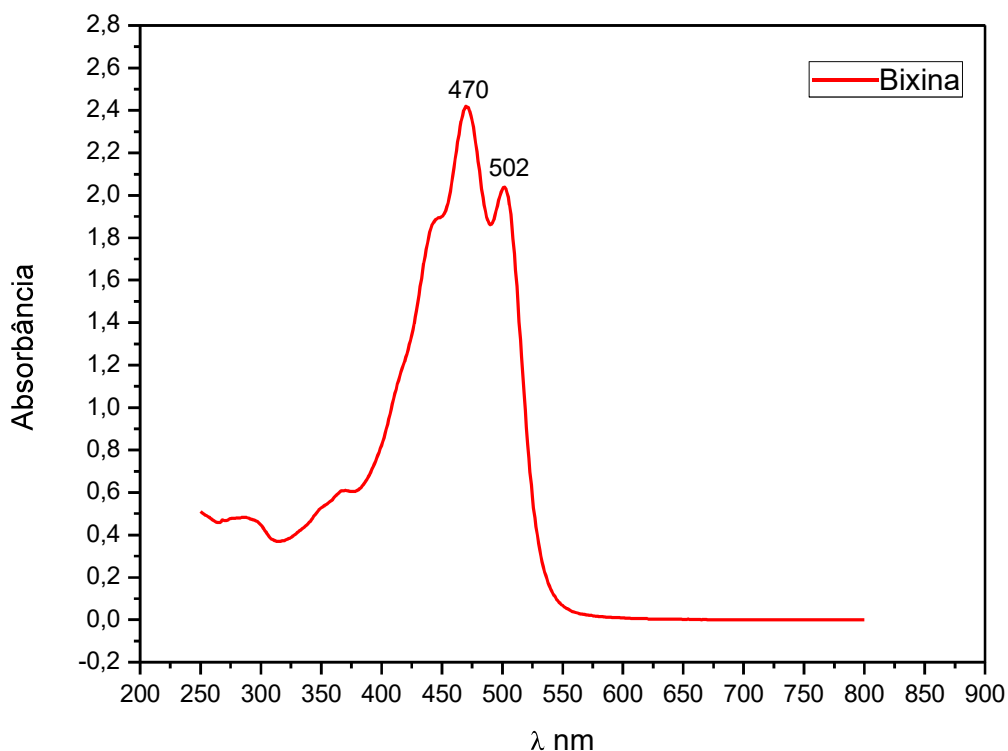
5.3.2 - Análise por Espectrofotometria UV/Visível

Os valores dos picos observados no espectro da bixina podem variar de acordo com o solvente utilizado para sua diluição (RAHMALIA *et al.*, 2014). Por apresentar uma estrutura molecular com 25 átomos de carbono e grupos terminais ácido e metil éster apresenta maior afinidade com solventes polares (RAHMALIA; FABRE; MOULOINGUI, 2015). De acordo com Levy e Rivadeneira(2000), a bixina diluída em clorofórmio apresenta picos da cis-bixina na região de 471 nm e 503 nm.

Deste modo, o pó de bixina foi diluído em clorofórmio, de acordo com metodologia utilizada por Tocchini; Mercadante(TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). Os picos de absorção encontrados neste trabalho foram semelhantes aos descritos na literatura (LEVY LW; RIVADENEIRA DM, 2000; SILVA, 2007).

Segundo Silva (2007), os carotenoides não apresentam absorção nos comprimentos de onda da região correspondente a ultravioleta. Para Rahmalia *et al.* (2015), as duplas ligações conjugadas presentes na estrutura da bixina constituem o grupo cromóforo absorvedor de luz, resultando na forte banda de absorção acima de 400 nm, como observado nesta análise de UV-Vis (Figura 5.7).

Figura 5.7–Espectro UV-vis da Bixina diluída em CHCl_3 (P.A).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 - Espectrometria de Fluorescência de Raios-X - FRX

Pela análise elementar realizada no FRX, observa-se que os principais constituintes da bixina são: Potássio, cloro, enxofre. A presença de cloro (25,468%) pode ser associada ao solvente utilizado durante a extração, ver

Tabela 5.1.

Os metais potássio (67,526%), magnésio (1,867%), compõem a parte mineralógica, como observado por Silva *et al.* (2016). Esses dados são relevantes, pois, ainda são escassos os estudos que definem um percentual para os constituintes da bixina.

Tabela 5.1 - Composição Química da bixina pela Espectrometria de Fluorescência de Raios-X - FRX

Componente	%
Potássio (K)	67,526
Cloro (Cl)	25,468
Enxofre (S)	2,029
Fósforo (P)	1,973
Magnésio (Mg)	1,867
Prata (Ag)	0,517
Ferro (Fe)	0,464
Manganês (Mn)	0,156

Fonte: Elaborado pelo autor.

A composição das membranas é apresentada na Tabela 5.2. Os valores de cálcio obtidos nas membranas P70/B15/H15 (48,44%), P60/B20/H20 (64,67%) e P50/B30/H20 (52,76%), respectivamente, apresentaram valores próximos citados na literatura por Galdino *et al.* (2014). A P50/B30/H20 apresentou melhor razão Ca/P (1,40) comparado com a P70/B15/H15 (1,22) e P60/B20/H20 (2,66). A presença de Ca é um fator aceitável na reparação óssea, devido sua importância no plasma sanguíneo e nos ossos. Resultados obtidos por CROCI *et al.*, (2003) e RATH *et al.*, (2000), ressaltaram também a sua importância para resistência óssea.

Os valores obtidos para o fósforo nas P70/B15/H15 (39,61%) P60/B20/H20 (24,27%) e P50/B30/H20 (37,58%), destaca-se a membrana (P50/B30/H20), pela razão Ca/P (1,40), quando combinado com o Ca na forma de HAp. Outro fator que pode ser observado neste estudo é a presença de Mg a P70/B15/H15 (1,46%) e P50/B30/H20 (2,42%), pois este metal aumenta resistência plaquetária pelo controle

da agregação das plaquetas por um mecanismo competitivo antagonista do cálcio, como citado por Ramirez (2017).

Tabela 5.2- Composição Química das membranas de PHB/Bixina/HAp em três diferentes proporções

Componente	Percentual na Amostra		
	P70/B15/H15	P60/B20/H20	P50/B30/H20
Cálcio (Ca)	48,44%	64,67%	52,76%
Fósforo (P)	39,61%	24,27%	37,58%
Cloro (Cl)	0,32%	2,83%	0,28%
Alumínio (Al)	2,72%	-	-
Silício (Si)	2,72%	6,67%	2,01%
Enxofre (S)	3,20%	-	3,59%
Magnésio (Mg)	1,46%	-	2,42%
Potássio (K)	1,40%	1,00%	1,29%
Vanádio (V)	0,02%	0,11%	-
Flúor (F)	-	0,37%	-
Titânio (Ti)	0,03%	0,07%	0,02%
Ferro (Fe)	0,06%	-	0,06%
Estrôncio (Sr)	0,01%	-	0,01%

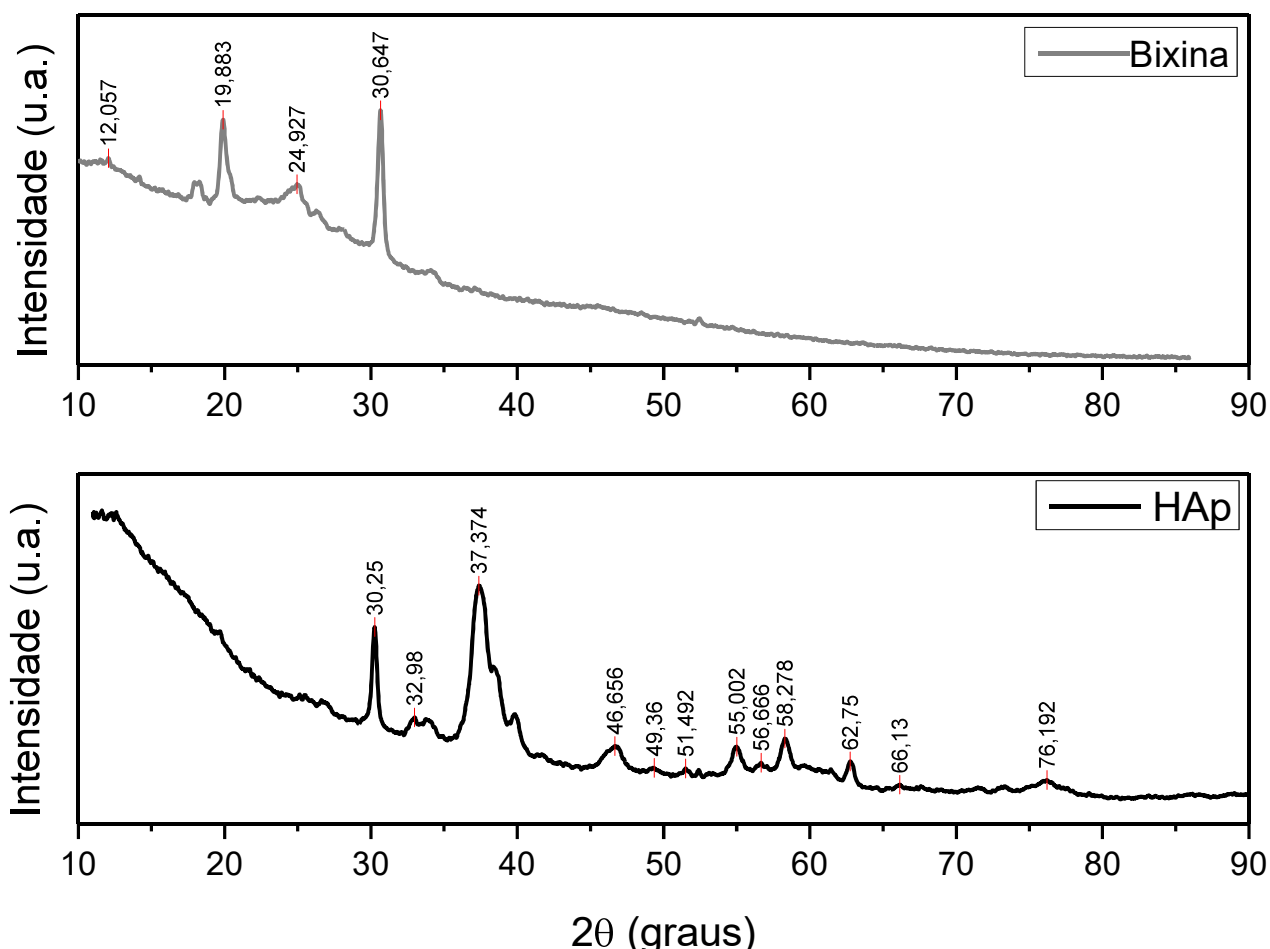
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.4 - Difração de Raio-X -DRX

A bixina foi submetida à análise de difração de raios-X para verificar a cristalinidade do material representada na Figura 5.8-A. No difratograma da bixina observa-se a presença de picos em $2\theta = 17,947^\circ$, $19,891^\circ$, $25,011^\circ$ e $30,657^\circ$, característicos de material semicristalino. Estes resultados também foram encontrados por Lima *et al.*, (2006).

Na Figura 5.8-A, são apresentados os valores obtidos do difratograma da HAp. Observou-se picos característicos em 2θ iguais $30,25^\circ$, $33,74^\circ$, $37,40^\circ$, $39,81^\circ$, $46,67^\circ$, $49,30^\circ$, $51,47^\circ$, $54,97^\circ$, $58,30^\circ$, $62,76^\circ$ e $76,19^\circ$. Os índices de cristalinidade foram comparados a ficha cristalográfica ICDD 00-001-1008, e mostraram que este material é cristalino. Corroborando com os resultados de Aquino (2015), que em seu trabalho encontrou picos cristalinos similares aos encontrados por este autor.

Figura 5.8 - Espectro de difração de raios X (DRX) da Bixina e HAp

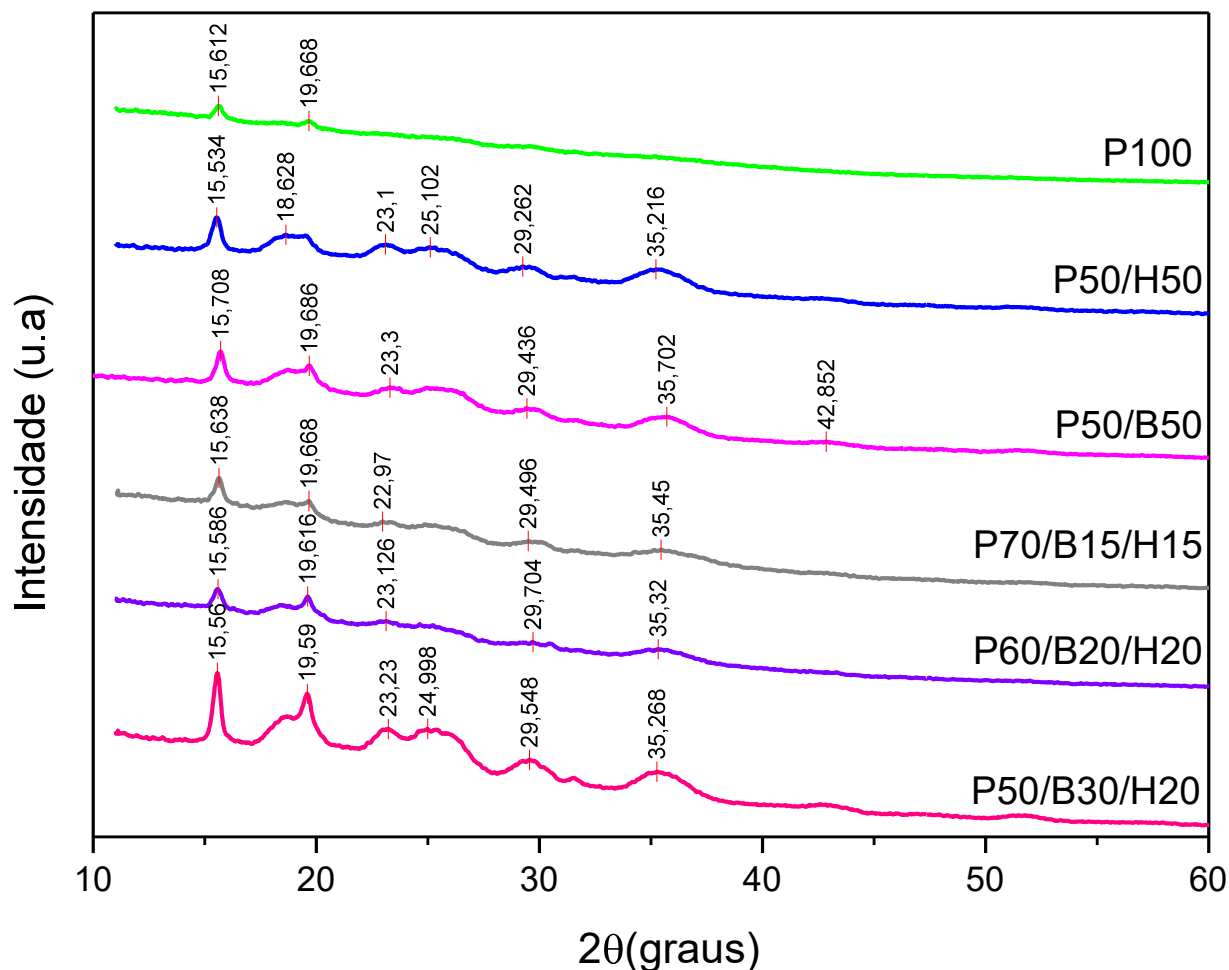


Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises dos índices de cristalinidade das proporções de membrana e das proporções controle são apresentadas na Figura 5.9. Sousa *et al.* (2016), observou que a limitação do crescimento de cristais, o resfriamento rápido e o menor tempo de conformação do material, provavelmente, podem interferir no grau de cristalinidade das membranas. Ainda, também foi observado por DUARTE *et al.* (2004); CONZ; GRANJEIRO; SOARES (2005) que a cristalinidade altera o desempenho do biomaterial *in vivo*, então, quanto menor o índice de cristalinidade, melhor a reabsorção e as propriedades mecânicas pelo organismo.

Observa-se ainda que, os picos em P100 (29,28°), P70/B15/H15 (29,46°), P60/B20/H20 (29,70°) e P50/B30/H20 (29,58°), corroboram aos encontrados por De Sá *et al.* (2016), que em seu estudo encontrou pico em 2θ igual a 29,57°, que sugere a incorporação dos constituintes da matriz. Vale ressaltar que, a P70/B15/H15 apresenta picos com menor intensidade comparada com a P50/B30/H20.

Figura 5.9- Espectro de difração das membranas de PHB/Bixina/HAp com duas filtragens



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 CARACTERIZAÇÃO TERMOGRAVIMÉTRICA

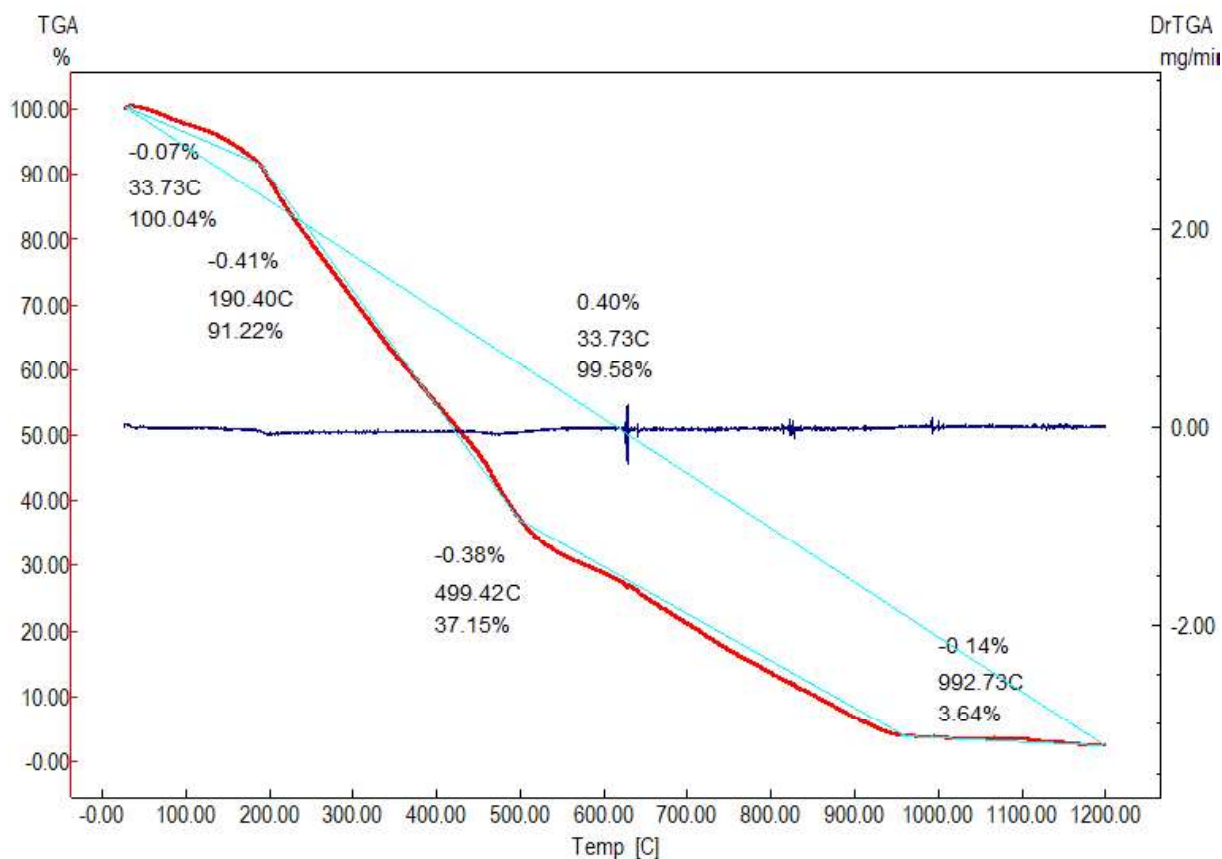
5.4.1 - Análise Termogravimétrica - TG

Na análise da curva de TG para a bixina, em atmosfera de nitrogênio, Figura 5.10, verificou-se a presença de eventos térmicos de perda de massa. O primeiro evento com perda de massa de 2,35 % é associado à umidade presente, em que a temperatura variou de 20-120 °C. Depois, ocorre uma perda na faixa de 120-200°C, correspondente a 9,02%. Observa-se que, a partir de 200-400°C ocorre uma perda significativa de 38,41%. Segundo Montenegro *et al.* (MONTENEGRO *et al.*, 2004) por meio do aquecendo o isômero cis-bixina é convertido em isômero trans ocorrendo está isomerização entre 200-240°C.

A degradação da bixina é mais intensa em torno de 200° C, como pode ser observado na Figura 5.10, resultado também encontrado Silva *et al.*(2005) indicando

que o grau de degradação está relacionado com o aumento da temperatura. Desta forma, acredita-se que degradação térmica ocorra mais significativamente por volta de 200°C.

Figura 5.10 - Termogravimetria da amostra de bixina

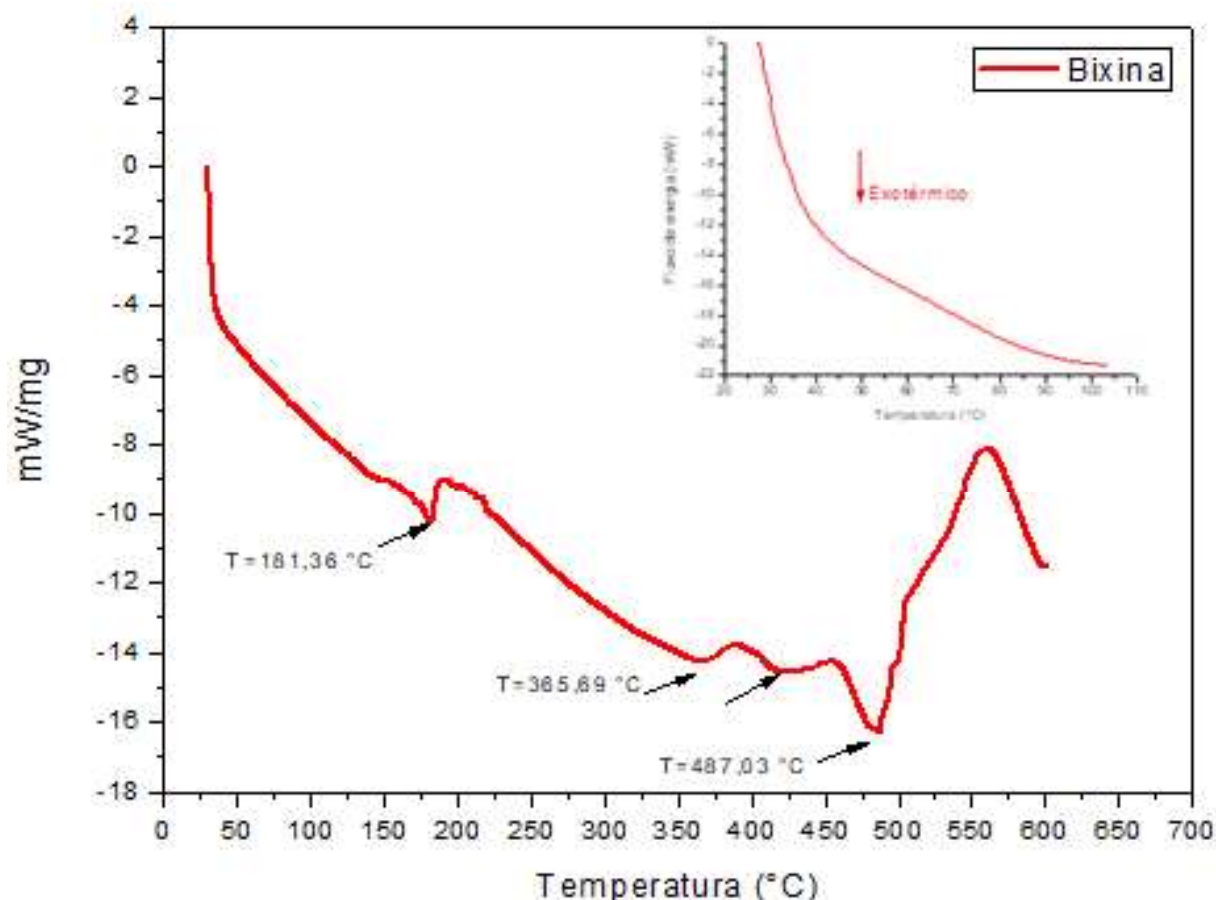


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2 -Calorimetria Exploratória Diferencial - DSC

Verificando a curva de DSC para a bixina, em atmosfera de nitrogênio, (figura 5.8), pode-se observar a presença de eventos térmicos de natureza endotérmica e exotérmica. O termograma da bixina mostra pico endotérmico na faixa de a 142,59 a 196,52 °C que é atribuído a fusão da bixina, como observado na curva de TG, Figura 5.11. Corroborando com estudo de Satyanarayana *et al.*(2003) encontrou picos endotérmico similares aos encontrado neste estudo. Os eventos térmicos que ocorre 348,03 a 384,54 °C e 450,45 a 505,37 °C pode ser atribuído à degradação da bixina.

Figura 5.11 -Curvas DSC para amostra de Bixina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 - CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

5.5.1 – Capacidade de absorção

A capacidade de absorção foi avaliada em água deionizada, SF 0,9% e Saliva artificial de modo a simular as suas condições de aplicação. Utilizou-se água deionizada e SF 0,9% (Fresenius®) os quais seriam potencialmente empregados para a hidratação das membranas antes de seu uso *in vivo*; e saliva artificial a qual simula um ambiente mais complexo com concentração de sais próxima à do corpo humano.

Em geral, as membranas produzidas neste trabalho apresentaram maior capacidade de absorção em água, seguido por saliva artificial e SF 0,9%, Figura 5.12, Figura 5.13 e Figura 5.14, respectivamente. Segundo Thein-Han; Kitiyanant; Misra (2008), essa habilidade de absorção de água é um fator importante

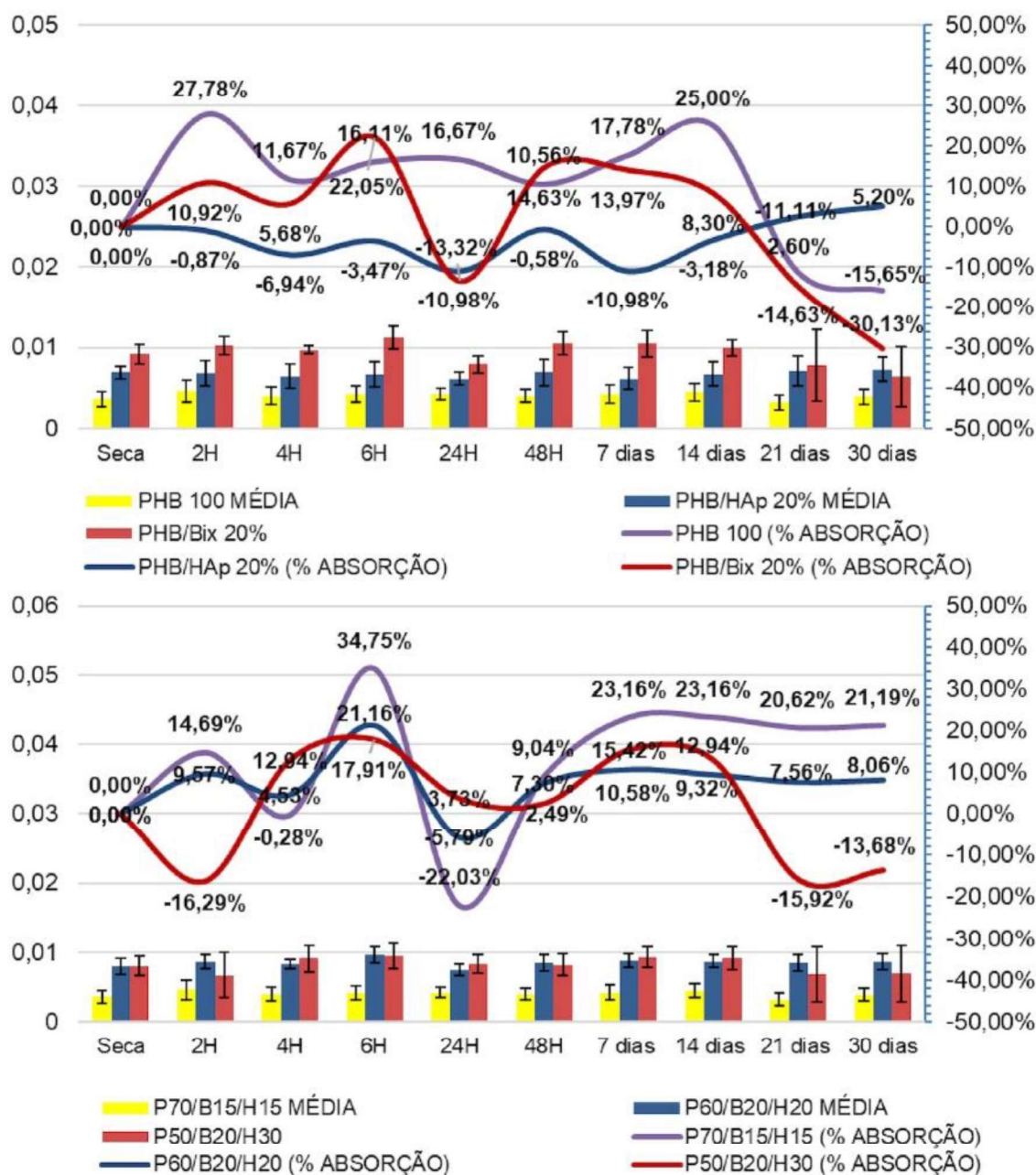
para materiais implantáveis, pois ela permite a absorção de fluidos corpóreos e a transferência de nutrientes e metabólitos.

Observou-se que as membranas apresentaram maior capacidade de absorção e maior degradação dos corpos de prova em meio a água deionizada, especialmente da proporção P50/B20/H30, ver Figura 5.13. Segundo Fernandes (2009) a elevada taxa de absorção de água traz consequências indesejáveis como a redução da estabilidade estrutural do polímero, ou seja, a presença constante de umidade provoca o intumescimento da matriz acelerando a degradação por ataque de microrganismos.

Ressalta-se ainda, que nos ensaios com água deionizada, SF 0,9% e Saliva artificial a medida que se aumenta a concentração de HAp nas membranas ocorre uma maior perda de massa. Na proporção P50/B20/H30 ocorre perdas de -100%, -24,20% e -13,68%, respectivamente. Segundo estudo de Shishatskaya; Khlusov; Volova (2006) esta variação é devido ao caráter hidrofílico da HAp em relação ao PHB.

O comportamento das membranas é passível a uma margem de erro devido às condições adversas do ambiente em que foi realizado o ensaio, como a própria umidade do ar.

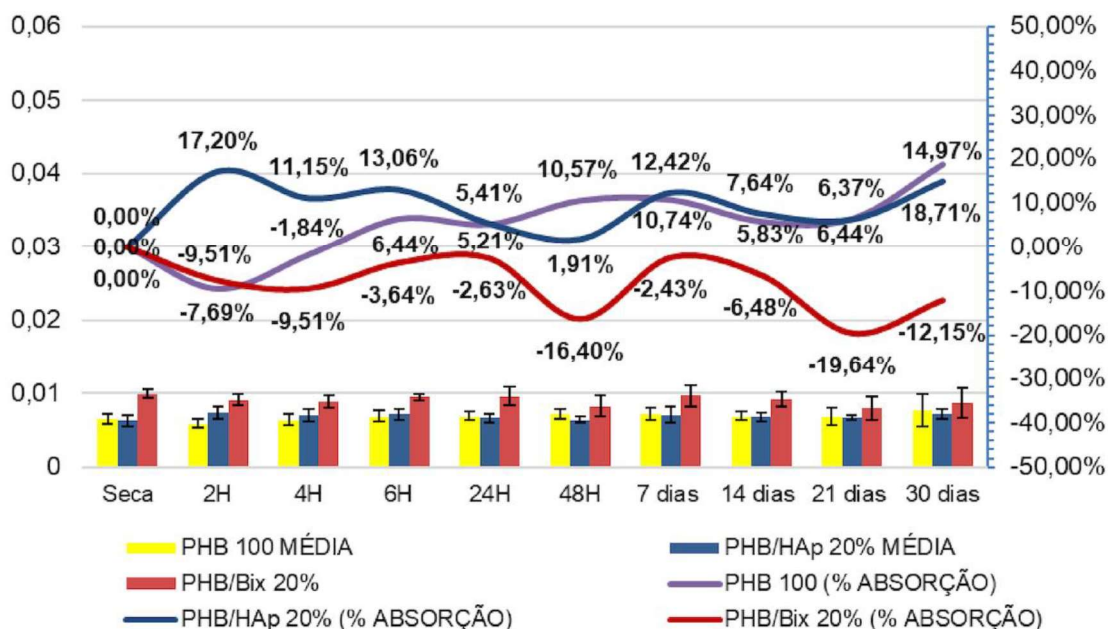
Figura 5.12- Absorção de saliva nas proporções A) PHB 100, PHB/HAp 20% e PHB/Bix 20% e B) P70/B15/H15, P60/B20/H20 e P50/B20/H30.



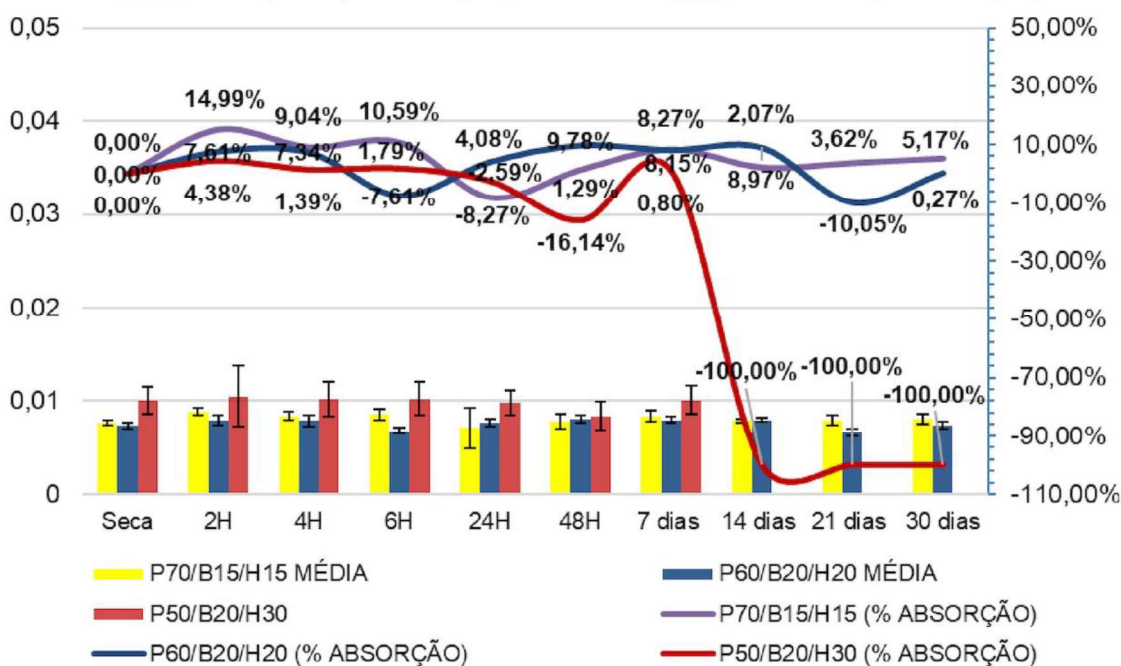
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5.13 - Absorção de água deionizada nas proporções A) PHB 100, PHB/HAp 20% e PHB/Bix 20% e B) P70/B15/H15, P60/B20/H20 e P50/B20/H30.

A

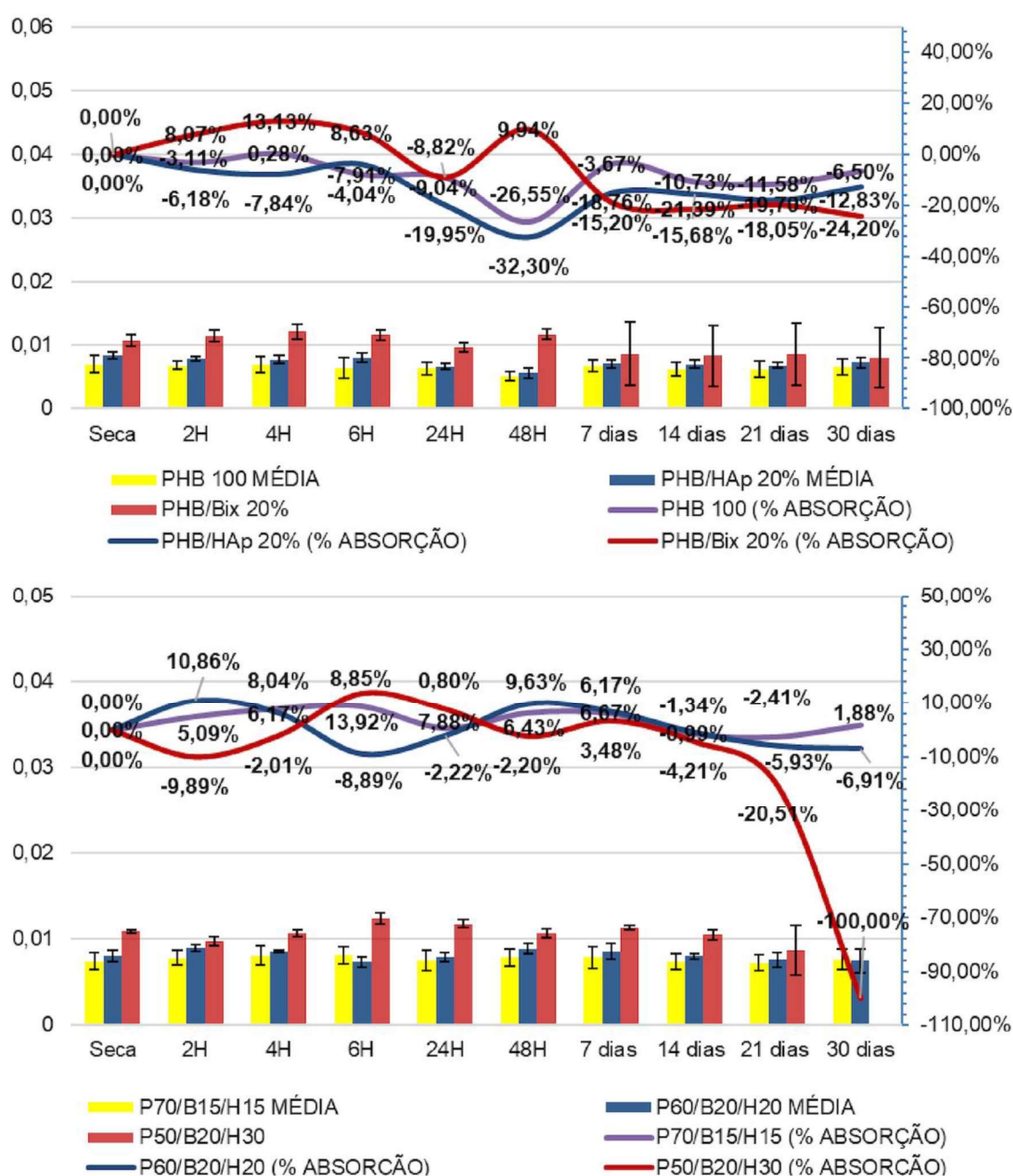


B



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5.14- Absorção de SF 0,9% nas proporções A) PHB 100, PHB/HAp 20% e PHB/Bix 20% e B) P70/B15/H15, P60/B20/H20 e P50/B20/H30.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.2 - Toxicidade Aguda com *Artemia Salina*

Nesse estudo, a contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24h (Tabela 5.3) em diferentes concentrações do extrato das membranas, os valores encontrados se mostraram distantes do esperado, não havendo linearidade, ou seja, não se pode afirmar que à medida que se aumenta a concentração da substância testada, aumenta o número de *Artemias* mortas.

Tabela 5.3- Média e porcentagem da quantidade de *Artemias salinas* mortas

Proporção	Concentração de membrana testada (mg kg ⁻¹)	Média de <i>Artemias</i> mortas (unidades)	% de <i>Artemias</i> mortas	Valor de P
CN	0	1±1,73	100	0,0121
CP	10	10±0,00	100	*
	0,300	10±0,00	100	*
	0,200	10±0,00	100	*
P70/B15/H15	0,150	4,33±1,53	43,3	0,1663
	0,075	10±0,00	100	*
	0,300	10±0,00	100	*
P60/B20/H20	0,200	10±0,00	100	*
	0,150	10±0,00	100	*
	0,075	8±1,00	80	0,052
	0,300	10±0,00	100	*
P50/B30/H20	0,200	10±0,00	100	*
	0,150	10±0,00	100	*
	0,075	10±0,00	100	*

Fonte: Elaborado pelo autor

Na tentativa de obter êxito no teste, os procedimentos foram realizados duas vezes, sendo a primeira com extrato da membrana sem previa filtração e o segundo após filtração do extrato. Na primeira tentativa observou-se que as *Artemias* apresentavam ao centro da sua estrutura coloração avermelhada, fato sugestivo da ingestão das partículas de membranas, acontecimento não observado no segundo ensaio.

Com os ensaios observou-se que na proporção P70/B15/H15, somente na concentração 0,075% houve menos mortes, nas concentrações 0.300 mg kg⁻¹, 0,2 mg kg⁻¹ e 0,15 mg kg⁻¹ todas as *Artemias* morreram. Já na proporção P60/B20/H20 apenas a concentração 0,15 mg kg⁻¹ apresentaram menos mortes e nas

concentrações 0,3 mg kg⁻¹, 0,2 mg kg⁻¹ e 0,075 mg kg⁻¹ todas as Artemias morreram. Na proporção P50/B30/H20 todas as Artemias morreram. No CP, todas as Artemias veio a óbito, algo esperado, pois o dicromato de potássio é uma substância tóxica de referência.

Estudos com extratos do urucum não apresentaram efeitos tóxicos e nem danos celulares nos animais testados (PAUMGARTTEN *et al.*, 2002; AGNER *et al.*, 2004). Assim como, os demais componentes da membrana, PHB e HAp, que apresentam vasta literatura sobre seus efeitos de Citocompatibilidade (ESPOSITO *et al.*, 2010).

Paumgartten *et al.* (2002) analisaram extratos do urucum desidratado com 28% de Bixina em ratas prenhas administrados por via oral até 500mg.kg⁻¹ de massa corporal ao dia, entre o 6° e 15° dia de gravidez, não apresentaram efeitos adversos nas ratas ou fetos, fato que sugere que o urucum não apresenta toxicidade ou embriotoxicidade nestas condições.

Uma explicação provável para o grande número de mortes é a oxidação lipídica (rancidez oxidativa) uma das principais alterações que ocorrem em carotenoides e que origina radicais livres, que podem ser gerados durante o metabolismo normal das células ou resultantes da ação de iniciadores, como a luz neste caso, e que apresenta como importante catalizador o cloreto de Sódio (NaCl) podendo resultar em substâncias tóxicas, como a acroleína malonaldeído (MDA) e os óxidos de colesterol (GARCIA *et al.*, 2012).

5.5.3 - Teste antimicrobiano

No teste de difusão de discos não houve formação de halo de inibição nas proporções de membrana analisadas, caracterizando que, neste teste, ambas as proporções não apresentam atividade bactericida, mas mostraram atividades bacteriostáticas. Uma explicação provável seria o baixo percentual de Bixina na membrana, sendo este insuficiente para conferir atividade antimicrobiana ao material. Outra explicação seria um possível encapsulamento da Bixina na matriz de PHB, evitando a migração da mesma no meio e, conseqüentemente, interferindo em sua capacidade inibitória ao crescimento microbiano.

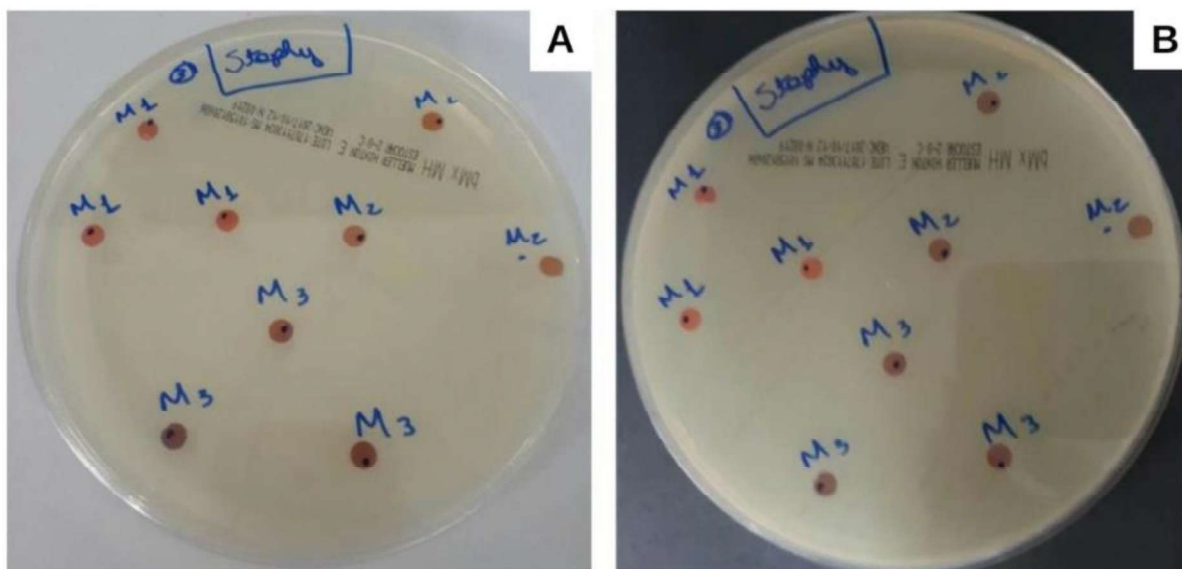
Ressalta-se que os testes foram realizados para analisar se as proporções de membrana apresentavam patógenos que, em condições favoráveis, pudessem se replicar ou aderir à membrana causando alguma manifestação clínica ao utilizá-las

como biomateriais. Segundo Moraes *et al.* (2013), a adesão bacteriana aos biomateriais é um processo de alta complexidade com importante preocupação clínica devido a sua evidente influência sobre a morbimortalidade dos pacientes que fazem uso.

Moraes *et al.* (2013) evidencia ainda que a adesão bacteriana pode ser influenciada por vários fatores do microambiente como temperatura, concentração de microrganismos, tempo de exposição, condições teciduais, proteínas teciduais e plasmáticas, características das bactérias e dos materiais, pH e antimicrobianos

Nesta análise, os resultados evidenciam uma atividade bacteriostática nas cepas de *Staphylococcus aureus* (Figura 5.15) que são os microrganismos responsáveis por 60 a 70% das infecções associadas à biomateriais devido à sua capacidade de aderir e formar uma espessa matriz extracelular com múltiplas camadas sobre a superfície de polímeros (CAMPOCCIA; MONTANARO; ARCIOLA, 2006; ARIZA; EUBA; MURILLO, 2008; MORAES *et al.*, 2013).

Figura 5.15- Ensaio da atividade antimicrobiana com *Staphylococcus aureus* (CGP)A) após preparação dos meios de cultura; B) placas após 24 h de incubação à 37°C

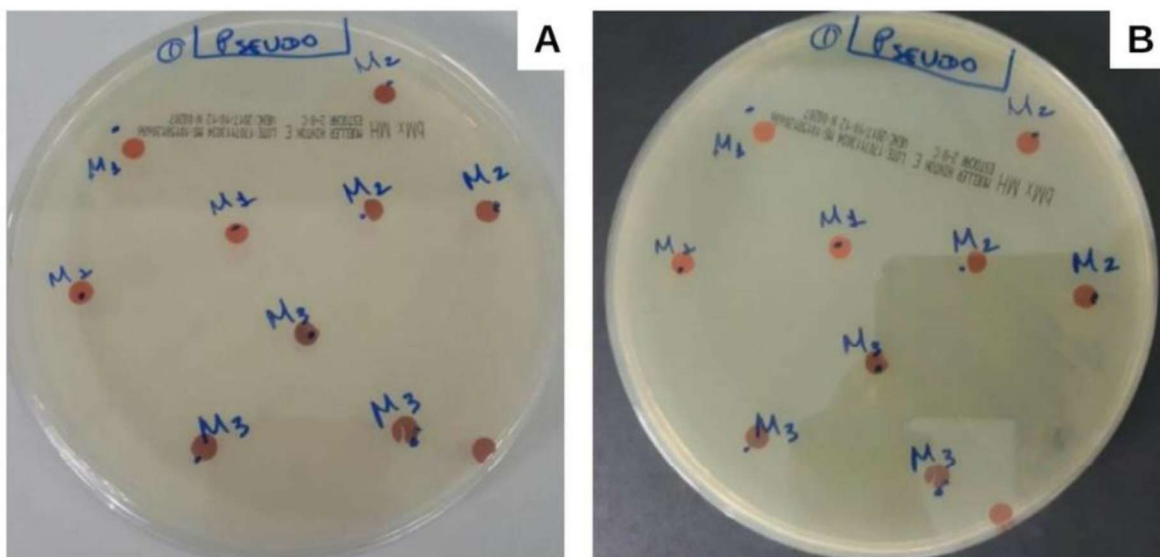


Fonte: Elaborado pelo autor.

Atividade semelhante foi observada nas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 5.16), frequência relacionada a doenças em pacientes com comprometimento imunológico, acompanhado de procedimentos invasivos, queimaduras e feridas operatórias (MATA; ABEGG, 2007). Segundo Santos Filho *et*

al. (2002), cepas de *P. aeruginosa* tornaram-se capazes de produzir potentes betalactamases, enzimas que destroem antibióticos, incluindo os carbapenêmicos, convertendo-se em grande ameaça aos pacientes hospitalizados.

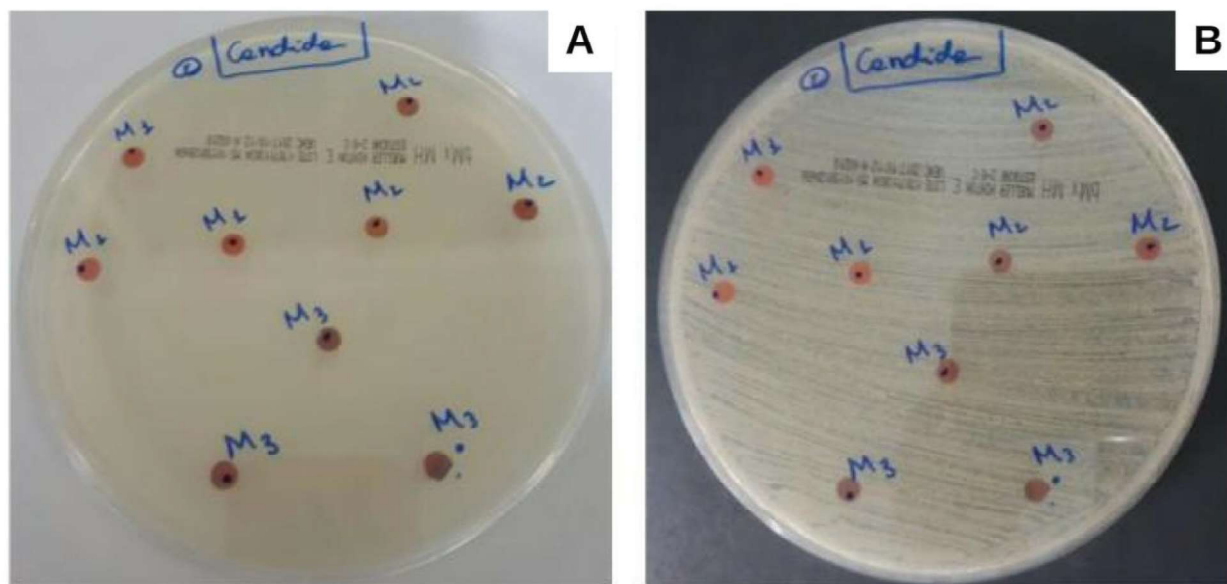
Figura 5.16 - Ensaio da atividade antimicrobiana com *Pseudomonas aeruginosa* A) após preparação dos meios de cultura; B) placas após 24 h de incubação à 37°C



Fonte: Elaborado pelo autor.

Biomateriais utilizados na cavidade bucal podem ser frequentemente, associados a infecções por *candida albicans* (RÓZALSKA et al., 1995). Os resultados evidenciam uma atividade bacteriostática nas cepas *candida albicans* (Figura 5.17) o que pode favorecer o uso do Biomaterial na ROG da clínica odontológica.

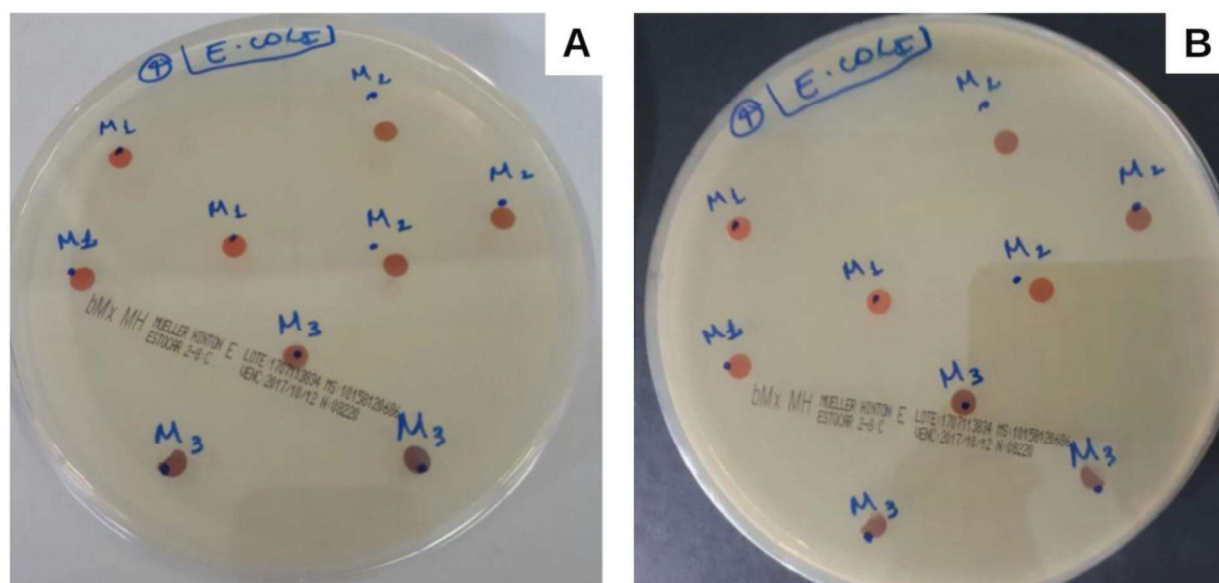
Figura 5.17- Ensaio da atividade antimicrobiana com *Candida albicans* A) após preparação dos meios de cultura; B) placas após 24 h de incubação à 37°C



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em estudo realizado por Mota; Oliveira; Souto (2018) a *Escherichia coli* (BGN) foi considerado um micro-organismo com perfil de multirresistência bastante significativo sendo identificadas e responsável por infecções no ambiente hospitalar. Neste estudo, a análise microbiológica apresentou efeito bacteriostático para a cepas de *E. coli* o que favorece seu uso como biomaterial.

Figura 5.18 - Ensaio da atividade antimicrobiana com *Escherichia coli* (BGN) A) após preparação dos meios de cultura; B) placas após 24 h de incubação à 37°C



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram obtidas membranas de PHB, Bixina e HAp com características homogênea, não porosa e estruturas semicristalinas.
- Pôde-se perceber que ao adicionar HAp e bixina as membranas apresentaram maior espessura em comparação com a membrana controle P100.
- Quanto à morfologia as análises por MO e MEV mostraram que as membranas apresentam superfícies irregulares, com presença de aglomerados, característica favoráveis para a aplicação como biomaterial por favorecer o processo de adesão e proliferação celular.
- As análises de fluorescência por raios-X mostraram que a membrana P50/B30/H20 apresentou melhor proporção Ca/P. E os resultados obtidos por difração por raios-X indicaram que a bixina é um material semicristalino e a HAp é um material cristalino. Já a proporção de membrana P70/B15/H15 apresentou menor índice de cristalinidade, em comparação as demais proporções, o que sugere melhor interação com a matriz e maior possibilidade de uso como biomaterial, visto que quanto menor a cristalinidade menor será o tempo de degradação do biomaterial *in vivo*.
- As análises termogravimétricas para a bixina indicaram que o material é hidrofóbico, aproximadamente 15% de umidade. E os resultados obtidos por DSC mostraram que a fusão da bixina ocorre próximo a 200 °C.
- A capacidade de absorção e perda de massa das membranas em diferentes soluções aquosas indica que as proporções P70/B15/H15 e P60/B20/H20 são mais adequadas para aplicações que requeiram estabilidade do biomaterial, como fraturas extensas, enquanto a proporção P50/B20/H30 seria mais adequada para aplicações como possível dispensador de fármacos visto a degradação quando em contato com fluidos fisiológicos.

- Foi observado que as membranas apresentaram comportamento bacteriostático o que dificulta a formação de microrganismos.
- O teste de toxicidade com *Artemia salina* não é indicado para esse biomaterial pela necessidade de exposição das lavas e do extrato a luz e consequente degradação do material.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar a avaliação do potencial tóxico, citotóxico e genotóxico das membranas obtidas por meio de testes *in vivo*.
- Caracterizar por intermédio de ensaios mecânicos as membranas em estudo;
- Realizar a complementação da caracterização físico-química da membrana.
- Realizar prospecção tecnológica acerca de publicações que abordem os tipos de membranas com extratos vegetais desenvolvidas nesta pesquisa;
- Avaliar o potencial de Membrana na Consolidação de Fraturas em Ratas com Osteoporose Induzida.

REFERENCIAS

- AGNER, A. R. et al. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1687–1693, 1 out. 2004.
- ALMEIDA, J. M. V. de; S. L. Á. de; V.-J. G. M. S. G. de A. et al. Avaliação da adesão de hidroxiapatita sobre implantes metálicos utilizando jato com suspensão de bicarbonato de sódio. **Research on Biomedical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 133–139, 25 out. 2011.
- ALMEIDA, S. M. et al. Síntese e caracterização de membranas de norbixina, etilenoglicol e phb para aplicações em biomateriais. 2016.
- AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. **Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667–681, 1 abr. 2000.
- AQUINO, L. R. C. de. **PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CIMENTOS À BASE DE HIDROXIAPATITA E DE GALACTOMANANA**. 2015. Universidade Federal do Maranhão - UFMA Campus Imperatriz, 2015.
- ARIZA, J.; EUBA, G.; MURILLO, Ó. Infecciones relacionadas con las prótesis articulares. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, n. 6, p. 380–390, jul. 2008.
- AVELLA, M.; MARTUSCELLI, E.; RAIMO, M. Review Properties of blends and composites based on poly(3-hydroxy)butyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) (PHBV) copolymers. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 3, p. 523–545, 2000.
- BARBOSA-FILHO, J. M., et al. Teor de Bixina em Quatro Variedades de Bixa Orellana L. Cultivadas na Paraíba, **Revista brasileira farmacognosia** 7–8 (1998) 41–47.
- BLAIR, H. C.; ZAIDI, M.; SCHLESINGER, P. H. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. **Biochem. J**, v. 364, p. 329–341, 2002.
- BOHMERT, K. et al. Constitutive expression of the beta-ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants. **Plant physiology**, v. 128, n. 4, p. 1282–90, 1 abr. 2002.
- BONARTSEV, A. P. et al. New poly(3-hydroxybutyrate)-based systems for controlled release of dipyrindamole and indomethacin. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 625–630, dez. 2006.
- BRADASCHIA-CORREA, V. et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulates bone

formation and remodeling during intramembranous bone repair in aging mice. **Tissue and Cell**, jul. 2017.

CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance. **Biomaterials**, v. 27, n. 11, p. 2331–2339, abr. 2006.

CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 3–12, nov. 2014.

CARANO, R. A. .; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 21, p. 980–989, 1 nov. 2003.

CARVALHO, P. S. P. de et al. Biomateriais aplicados a Implantodontia Biomaterials applied to Implantology. **REVISTA IMPLANTNEWS**, p. 56–65, 2010.

CAVALCANTE, L. C. D.; LAGE, M. C. S. M.; FABRIS, J. D. Análise química de pigmento vermelho em osso humano. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1117–1120, 2008.

CHAN, W. D. et al. Tissue Engineering Scaffolds for the Regeneration of Craniofacial Bone. v. 75, n. 5, 2009.

CHANDRASHEKAR, K. T.; SAXENA, C. Biograft-HT as a bone graft material in the treatment of periodontal vertical defects and its clinical and radiological evaluation: Clinical study. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 13, n. 3, p. 138–44, set. 2009.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. de A. Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, n. 2, p. 136–140, jun. 2005.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, p. 29–38, 2009.

COSTA, B. D. et al. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 177–187, fev. 2015.

COSTA, C. L. S. da; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de Bixa orellana L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 149–152, fev. 2005.

COSTA, J. B. Z. et al. O USO DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS - uma revisão de literatura. **Revista Bahiana de Odontologia**, v. 7, n. 1, p. 14–21, 2016.

COUTINHO, B. C. et al. A IMPORTÂNCIA E AS VANTAGENS DO POLIHIDROXIBUTIRATO (PLÁSTICO BIODEGRADÁVEL). **HOLOS**, v. 3, n. 0, p. 76, 24 dez. 2007.

CROCI, A. T. et al. Efeito do concentrado de plasma em falhas ósseas provocadas em fêmures de camundongos como estimulação de formação óssea: estudo experimental. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 230–239, dez. 2003.

CULLUM, P. E. et al. Evaluation of hydroxylapatite particles in repair of alveolar clefts in dogs. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 46, n. 4, p. 290–6, 1 abr. 1988.

CURY, P. R. et al. Root resorption and ankylosis associated with guided tissue regeneration. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 136, n. 3, p. 337–41, 1 mar. 2005.

DALAPICULA, S. S.; CONZ, M. B. Caracterização físico-química de biomateriais para enxerto ósseo de origem alógena e xenógena. **REVISTA IMPLANTNEWS**, v. 5, n. 2, p. 205–13, 2008.

DIAS, R. C. M. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE CITOTOXICIDADE DA MATRIZ POROSA DE NANOCOMPÓSITO BIODEGRADÁVEL**. 2006. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2006.

DIMITRIOU, R. et al. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. **BMC Medicine**, v. 10, n. 1, p. 81, 26 dez. 2012.

DUARTE, M. A. T. et al. Estudo da Compactação a Frio de Poli (3-Hidroxibutirato)-Morfologia e Resistência à Compressão. **Revista Matéria**, v. 9, n. ISSN 1517-7076, p. 386 – 391, 2004.

DUNHAM, N. W.; ALLARD, K. R. A preliminary pharmacologic investigation of the roots of Bixa orellana. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 49, p. 218–9, abr. 1960.

DUPLOMB, L. et al. Concise Review: Embryonic Stem Cells: A New Tool to Study Osteoblast and Osteoclast Differentiation. **STEM CELLS**, v. 25, n. 3, p. 544–552, 9 nov. 2006.

ESPOSITO, A. R. et al. Citocompatibilidade de Blendas de Poli((hidroxi butirato) (PPD/PHB) para Aplicações em Engenharia de Tecido Cartilaginoso. **Polímeros**, v. 20, p. 383–388, 2010.

FAVERANI, L. P. et al. Surgical techniques for maxillary bone grafting - literature review. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 41, n. 1, p. 61–67, jan. 2014.

FERNANDES, L. L. **Produção e caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. 2009. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

FRANCO, K. L. **Avaliação Clínico-Cirúrgica, Radiológica e Histológica da**

Reparação Óssea Após Utilização de Hap-91, Col. Hap-91 e Int.Hap-91 em Defeito Provocado Experimentalmente na Tíbia de Cães. 2000. Monografia Especialização. Departamento de Veterinária - UFV, 2000.

GALDINO, A. G. S. et al. Análise de ensaios in vitro do compósito de 50% HA-50% TiO₂ Fabricados Pelo Método Da Esponja Polimérica. v. 60, p. 586–593, 2014.

GARCIA, C. E. R. et al. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (Bixa orellana L .) como antioxidantes em produtos cárneos. **Ciência Rural**, v. 42, n. ISSN 0103-8478, p. 1510–1517, 2012.

GERSTENFELD, L. C. et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 5, p. 873–884, 1 abr. 2003.

GERSTENFELD, L. C. et al. Three-dimensional Reconstruction of Fracture Callus Morphogenesis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 11, p. 1215–1228, 24 nov. 2006.

GIÁCOMO, D. I. et al. Efeito de pasta com nanopartículas de hidroxiapatita e fluoreto sobre a desmineralização da dentina. v. 68, n. 2, p. 112–116, 2014.

GOMES, L. C. et al. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. **Cerâmica**, v. 58, n. 348, p. 448–452, dez. 2012.

GREDES, T. et al. Histological and molecular-biological analyses of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) patches for enhancement of bone regeneration. **Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, v. 199, p. 36–42, maio 2015.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352–1358, 2010.

HASIRCI, V. et al. Oxygen plasma modification of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) film surfaces for tissue engineering purposes. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 87, n. 8, p. 1285–1289, 22 fev. 2003.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science (New York, N.Y.)**, v. 295, n. 5557, p. 1014–7, 8 fev. 2002.

JARDIM, C. G. et al. ENXERTO ÓSSEO EM ODONTOLOGIA BONE GRAFT IN ODONTOLOGY. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 30, n. 2, p. 24–28, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica Texto e Atlas**. GUANABARA ed. Rio de Janeiro - RJ: GUANABARA KOOGAN, 2013.

KAWACHI, E. Y. et al. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518–522, ago. 2000.

KOHLMEIER, L.; HASTINGS, S. B. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids

in cardiovascular disease prevention. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1370S–1376S, 1 dez. 1995.

KUNZE, C. et al. In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 192–201, 1 jan. 2006.

LACERDA, K. A.; LAMEIRAS, F. S.; SILVA, V. V. Síntese e caracterização de matrizes porosas de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 59, n. 2, p. 217–223, jun. 2006.

LACERDA, K. A.; LAMEIRAS, F. S.; SILVA, V. V. Avaliação da biodegradação de matrizes porosas à base de hidroxiapatita para aplicação como fontes radioativas em braquiterapia. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1216–1221, 2009.

LEVY, L. W.; RIVADENEIRA, D. M. Annatto. In: LAURO, G. J.; FRANCIS, F. J. **Natural food colorants – science and technology**. IFT Basic Symposium Series, Marcel Dekker, Inc., 2000, Cap. 6, p. 115-152.

LIMA, A. L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. B. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos*. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. v.38, p. 196–200, 2001.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T. de; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 305–314, set. 2003.

LIMA, R. J. C. et al. Taninos hidrolisáveis em Bixa orellana L. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 507–509, jun. 2006.

LINDEN, M. S. S. et al. Biocompatibilidade entre implantes de titânio com e sem cobertura de hidroxiapatita. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 1, n. 1, 1996.

LOSS, R. A. et al. Encapsulation of eugenyl acetate in PHBV using SEDS technique and in vitro release evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 10, p. 3859–3864, 2016.

MA, B. et al. Hydroxyapatite nanobelt/poly(lactic acid) Janus membrane with osteoinduction/barrier dual functions for precise bone defect repair. **Acta Biomaterialia**, v. 71, p. 108–117, 15 abr. 2018.

MACEDO, N. L. de et al. Guided bone regeneration with subperiosteal implants of PTFE and hydroxyapatite physical barriers in rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 14, n. 2, p. 119–124, 2003.

MATA, P. T. G. da; ABEGG, M. A. DESCRIÇÃO DE CASO DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS POR *Pseudomonas aeruginosa*. **Arq Mudi.**, v. 11, n. 2, p. 20–25, 2007.

MATURANA, L. G. et al. Estudo das células Neuro2A sobre os biomateriais PCL e PLLA. **Polímeros**, v. 24, n. 6, p. 733–739, dez. 2014.

MEYER, B. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 29 maio 1982.

MIKAN V, J. F.; OLIVEROS A, W. D. Osteoclastogese e doença óssea. **Revista Med**, v. 15, n. ISSN 0121-5256, p. 261–270, 2007.

MOTA, F. S. da; OLIVEIRA, H. A. de; SOUTO, R. C. F. Profile and prevalence of antimicrobial resistance of negative-Gram bacteria isolated from intensive care patients. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

MONTENEGRO, M. A. et al. Model Studies on the Photosensitized Isomerization of Bixin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 367–373, 2004.

MORAES, M. N. et al. Mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 23, n. 1, p. 99–104, 2013.

MURUGAN, R.; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. **Composites Science and Technology**, v. 65, n. 15–16, p. 2385–2406, 1 dez. 2005.

MUTHUKUMAR, T. et al. Preparation, characterization, and in vitro bioactivity of Bixa orellana extract-impregnated collagen microspheres. **Journal of Materials Science**, v. 49, n. 16, p. 5730–5737, 16 ago. 2014.

NATH, R. et al. Code of practice for brachytherapy physics: Report of the AAPM Radiation Therapy Committee Task Group No. 56. **Medical Physics**, v. 24, n. 10, p. 1557–1598, out. 1997.

OH, T.-J. et al. Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 1, p. 80–90, 1 fev. 2003.

OKAZAKI, A. et al. Osseous tissue reaction around hydroxyapatite block implanted into proximal metaphysis of tibia of rat with collagen-induced arthritis. **Biomaterials**, v. 21, n. 5, p. 483–487, 1 mar. 2000.

OLIVEIRA, L. S. de A. F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras Biomaterials for bone regeneration – Methods of analyses and future perspectives. **méd. biol**, v. 9, n. 1, p. 37–44, 2010.

OLIVEIRA, S. V et al. Caracterização química e morfológica do pirofosfato de cálcio obtido por via úmida. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, p. 11–20, 2009.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. de M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: Fundamentos e aplicações**. 1.ed. 1.re ed. Rio de Janeiro - RJ: Cultura Médica: Guanabara

Koogan, 2012.

OZAKI, A. T.; DUARTE, P. D. C. FITOTERÁPICOS UTILIZADOS NA MEDICINA VETERINÁRIA, EM CÃES E GATOS. **Infarma**, v. V18, 2006.

PARIMALAN, R. et al. Annatto Fruit Pericarp: Newer Source As a Potential Fuel. **Energy & Fuels**, v. 21, n. 2, p. 1181–1182, mar. 2007.

PAUMGARTEN, F. J. . et al. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p. 1595–1601, 1 nov. 2002.

PÉRTILE, R. A. N. **Estudo in vitro da interação da linhagem de fibroblastos L929 com membranas de celulose bacteriana para aplicações em engenharia de tecidos**. 2007. Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.

PINHEIRO, T. C. et al. Implantes de hidroxiapatita em falhas ósseas produzidas no fêmur de ratos submetidos ao tabagismo passivo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 43, n. 10, p. 433–441, out. 2008.

PINZÓN-GARCÍA, A. D. et al. Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded PCL nanofibers in diabetic mice. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 13 jun. 2016.

PINZÓN-GARCÍA, A. D. et al. Evidence of hypoglycemic, lipid-lowering and hepatoprotective effects of the Bixin and Bixin: β -CD inclusion compound in high-fat-fed obese mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 363–372, 1 out. 2018.

PIRES, A. L. R. et al. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

PIRES, G. **BIOMATERIAIS DERIVADOS DE QUITOSANA E HIDROXIAPATITA COM POTENCIAL PARA PREENCHIMENTO ÓSSEO** Geovanna Pires. 2010. UNICAMP, 2010.

POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J. E. Scaffold design for bone regeneration. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 15–56, jan. 2014.

PURICELLI, E. Avaliação histológica de implantes de hidroxiapatita em defeito ósseo alveolar dentado em humano: relato de caso. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 43, n. 1, 2002.

RAHMALIA, W. et al. Aprotic solvents effect on the UV–visible absorption spectra of bixin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 131, p. 455–460, 15 out. 2014.

RAHMALIA, W.; FABRE, J.-F.; MOULOUGUI, Z. Effects of Cyclohexane/Acetone Ratio on Bixin Extraction Yield by Accelerated Solvent Extraction Method. **Procedia Chemistry**, v. 14, p. 455–464, 1 jan. 2015.

RAKHMATIA, Y. D. et al. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 57, n. 1, p. 3–14, jan. 2013.

RAMIREZ, A. V. G. A importância do magnésio na doença cardiovascular. **International Journal of Nutrology**, v. 9, n. 4, p. 242–253, 20 jan. 2017.

RATH, N. C. et al. Factors regulating bone maturity and strength in poultry. **Poultry science**, v. 79, n. 7, p. 1024–32, jul. 2000.

REIS, E. C. C. et al. Desenvolvimento e caracterização de membranas rígidas, osteocondutoras e reabsorvíveis de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para regeneração periodontal. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 73–79, 2012.

REY, C. et al. Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials. **Materials Science and Engineering: C**, v. 27, n. 2, p. 198–205, 1 mar. 2007.

RIOS, A. de O.; MERCADANTE, A. Z. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES PARA OBTENÇÃO DE PADRÃO DE BIXINA E DAS ETAPAS DE EXTRAÇÃO E SAPONIFICAÇÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE BIXINA. **Alim. Nutr.**, v. 15, p. 12, 2004.

RODRIGUES, F. C. **EFEITOS DE NARINGENINA, BIXINA, LEITES DE VACA E CABRA E EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO DE COELHOS**. 2003. Universidade Federal de Viçosa, 2003.

RODRIGUES, L. B. Aplicações de biomateriais em ortopedia. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, 4 out. 2013a.

RODRIGUES, L. M. **Obtenção de extratos com bixina a partir de sementes de Urucum desengorduradas: estudo dos parâmetros de processo**. 2013b. FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS - FEA, 2013.

ROEDER, E.; MATTHEWS, B. G.; KALAJZIC, I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. **Bone**, v. 92, p. 189–195, nov. 2016.

RÓZALSKA, B. et al. Biomaterial-associated infection with *Candida albicans* in mice. **Microbiology and immunology**, v. 39, n. 7, p. 443–50, 1995.

SAINT-PASTOU TERRIER, C.; GASQUE, P. Bone responses in health and infectious diseases: a focus on osteoblasts. **Journal of Infection**, 2017.

SAKAMOTO, F. C. **Obtenção e caracterização de filmes de PHB utilizando a técnica de solution blow spinning**. 2013. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2013.

SANTOS, G. A. dos. **PRODUÇÃO DE COMPÓSITOS À BASE DE POLIHIDROXIBUTIRATO E HIDROXIAPATITA PARA A APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAIS**. 2013. UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO

FRANCISCO, 2013.

SANTOS FILHO, L. et al. Determinação da produção de metalo-beta-lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 4, p. 291–296, 2002.

SANTOS, J. A. A. et al. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3 suppl 1, p. 637–643, 2014.

SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA RAO, P. G.; RAO, D. G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). 2003.

SCOTCHFORD, C. A. et al. Osteoblast responses to collagen-PVA bioartificial polymers in vitro: the effects of cross-linking method and collagen content. **Biomaterials**, v. 19, n. 1–3, p. 1–11, 1 jan. 1998.

SCOTTER, M. J. Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. **Food Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 177–185, jan. 1995.

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 Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 17, n. 5, p. 481–498, jan. 2006.

SILVA, A. N. et al. Bone defect repair on the alveolar wall of the maxillary sinus using collagen membranes and temporal fascia: an experimental study in monkeys. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 77, n. 4, p. 439–446, ago. 2011.

SILVA, E. C. da et al. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA E MINERALÓGICA DO CORANTE EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE URUCUM. **22º CBECiMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, v. 1, n. 1, p. 8539–8546, 2016.

SILVA, L. F. da et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732–1743, 2007.

SILVA, M. A. C. da. **MEMBRANAS BIOREABSORVÍVEIS DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) CARREGADAS COM METRONIDAZOL PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA**. 2014. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

SILVA, F. M. S. e et al. MEMBRANAS ABSORVÍVEIS X NÃO-ABSORVÍVEIS NA IMPLANTODONTIA: REVISÃO DA LITERATURA Resorbable versus Non-Resorbable Membranes in Implantology: a Review of the literature. **Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac., Camaragibe**, v. 5458, n. 2, p. 19–24, 2005a.

SILVA, M. C. D. et al. Thermogravimetric investigations on the thermal degradation of bixin, derived from the seeds of annatto (*bixa orellana* L.). **Journal of Thermal**

Analysis and Calorimetry, v. 79, n. 2, p. 277–281, 2005b.

SILVA, P. I. **Pollyanna ibrahim silva métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum**. Dissertação (Mestrado) 2007. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomateriais na odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**, p. 256–261, 2013.

SONG, N. et al. Pigment epithelium derived factor play a positive role in bone mineralization of osteoblasts derived from diabetic patients. **Gene**, v. 627, p. 563–568, 2017.

SOUSA, W. J. B. de et al. Membranas de polihidroxibutirato com hidroxiapatita para utilização como biomaterial. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, n. 4, 2 out. 2017.

SOUSA, R. C. de A. L. M. M. F. et al. Genotoxicity Evaluation of Polystyrene Membrane with Collagen and Norbixin by Micronucleus Test and Comet Assay. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention ISSN (Online)**, v. 5, n. 4, p. 2319–6718, 2016.

STAVROPOULOS, F. et al. A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. An experimental study in a canine model. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 4, p. 435–442, 1 ago. 2004.

SUO, Q. L. et al. Micronization of the natural pigment-bixin by the SEDS process through prefilming atomization. **Powder Technology**, v. 154, n. 2–3, p. 110–115, jul. 2005.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 6 Suppl 3, n. Suppl 3, p. S311–24, 6 jun. 2009.

TERRA, J. et al. The structure of strontium-doped hydroxyapatite: an experimental and theoretical study. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 11, n. 3, p. 568–577, 21 jan. 2009.

THEIN-HAN, W. W.; KITTYANANT, Y.; MISRA, R. D. K. Chitosan as scaffold matrix for tissue engineering. **Materials Science and Technology**, v. 24, n. 9, p. 1062–1075, 19 set. 2008.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO, POR CLAE, DE BIXINA E NORBIXINA EM COLORÍFICOS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310–313, dez. 2001.

VALSAMIS, H. A. et al. Antiepileptic drugs and bone metabolism. **Nutrition & Metabolism**, v. 3, n. 1, p. 36, 6 set. 2006.

WAN, Y. et al. Adhesion and proliferation of OCT-1 osteoblast-like cells on micro- and nano-scale topography structured poly(l-lactide). **Biomaterials**, v. 26, n. 21, p.

4453–4459, 1 jul. 2005.

WRIGHT, T. W. Definitions in Biomaterials. **Journal of Biomechanics**, v. 22, n. 1, p. 79, 1 jan. 1989.

XUE, L. et al. Bixin protects against particle-induced long-term lung injury in an NRF2-dependent manner. **Toxicology research**, v. 7, n. 2, p. 258–270, 1 mar. 2018.

YUAN, G. et al. Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chitosan Films Containing Carvacrol and Pomegranate Peel Extract. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11034–11045, 15 jun. 2015.

YUSÁ-MARCO, D. J. et al. CHARACTERIZATION OF COLOURING COMPOUNDS IN ANNATTO (BIXA ORELLANA L.) USED IN HISTORIC TEXTILES BY MEANS OF UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY AND FT-IR SPECTROSCOPY. **ARCHÉ. PUBLICACIÓN DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE RESTAURACIÓN DEL PATRIMONIO DE LA UPV**, v. 3, p. 1–6, 2008.

ZARRINGHALAMI, S.; SAHARI, M. A.; HAMIDI-ESFEHANI, Z. Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. **Meat Science**, v. 81, n. 1, p. 281–284, jan. 2009.

ZHANG, H. et al. Therapeutic potential of bixin in PM2.5 particles-induced lung injury in an Nrf2-dependent manner. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 126, p. 166–176, 1 out. 2018.

ZHANG, Y.; ZHONG, Q. Probing the binding between norbixin and dairy proteins by spectroscopy methods. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 611–616, 15 ago. 2013.