



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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE BIOFILMES
DE POLIESTIRENO/NORBIXINA/HIDROXIAPATITA**

JANIEL COSTA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana

TERESINA – PI

2021

JANIEL COSTA DA SILVA

**SINTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE BIOFILMES
DE POLIESTIRENO/NORBIXINA/HIDROXIAPATITA**

Dissertação 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 materiais

Orientador: Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana

TERESINA – PI

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Sistemas de Bibliotecas

Gerada automaticamente com dados fornecidos pelo(a) Autor(a)

Silva, Janiel Costa da

S586s Síntese e caracterização físico-química e biológica de biofilmes de Poliestireno/Norbixina/Hidroxiapatita / Janiel Costa da Silva. - 2021.

81 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Instituto Federal do Piauí, Campus Teresina Central, 2021.

Orientador : Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana.

1. Biofilmes. 2. Poliestireno. 3. Norbixina. 4. Hidroxiapatita. 5. Reparação óssea. I. Título.

CDD - 620.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PIAUÍ - IFPI
CAMPUS TERESINA CENTRAL / DIRETORIA DE PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS / PPG-EM
Praça da Liberdade, 1597 - Centro - Teresina – PI, CEP. 64.000-040
Fone: (86) 3131 – 9468 endereço eletrônico: <http://ppgem.ifpi.edu.br/hom>

JANIEL COSTA DA SILVA

SINTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE BIOFILMES DE
POLIESTIRENO/NORBIXINA/HIDROXIAPATITA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do Instituto Federal do Piauí, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Aprovado em: 22 de Outubro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Assinado no original

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

Assinado no original

Prof. Dr. **Gilvan Moreira da Paz**
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI
Avaliador Interno

Assinado no original

Prof. Dr. **Charllyton Luis Sena da Costa**
Centro Universitário Santo Agostinho – UNIFSA
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, criador e formador de tudo, alicerce fundamental da minha vida e a quem tenho fé incontestável e inabalável no seu poder e glória, fonte de toda bondade, misericórdia, compaixão, confiança, determinação e perseverança por ter concedido na minha vida força pra superar as provações tanto na vida pessoal quanto na profissional que se levantaram na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana, pela disponibilidade para me orientar neste trabalho, confiança, paciência, apoio em todos os momentos e por estar sempre disponível e disposto para realizar os esclarecimentos, aprofundar meus conhecimentos e, principalmente, direcionar ideias e sugestões de trabalhos.

Aos professores Dr. Gilvan Moreira da Paz e Dr. Deuzuita dos Santos Freitas Viana, pela contribuição e ajuda através de informações técnicas prestada na elaboração e discussão de experimentos.

A minha querida esposa, Gesaiane de Andrade Silva, por toda paciência, cumplicidade, dedicação, força e principalmente por acreditar na minha capacidade de superar todas as provações que se levantaram nas nossas vidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Maria do Rosário Costa da Silva e Raimundo José da Silva Sobrinho, por me ensinar o significado das palavras honra, caráter, honestidade e perseverança, e por ter me proporcionado a oportunidade de estudar e por sempre acreditarem que poderia alcançar todos os meus sonhos nunca desistindo de lutar ao meu lado.

Os sonhos precisam de persistência e coragem para serem realizados. Nós os regamos com nossos erros, fragilidades e dificuldades. Quando lutamos por eles, nem sempre as pessoas que nos rodeiam nos apoiam e nos compreendem. Às vezes somos obrigados a tomar atitudes solitárias, tendo como companheiros apenas nossos próprios sonhos.

Augusto Cury

RESUMO

Os biomateriais poliméricos estão dentre os materiais mais empregados no âmbito médico, a eficácia dos biomateriais está relacionada principalmente à sua capacidade de interagir com as células do tecido danificado visando a cicatrização. O poliestireno (PS) é um polímero termoplástico, transparente, duro e quebradiço, porém, não biodegradável. O carotenoide norbixina (NBX) tem demonstrado ação anticancerígena e hipolipidêmica, como também, atividade antioxidante. A biocerâmica hidroxiapatita (HAP) trata-se de uma substância bioativa não tóxica, que provoca pouca reação tecidual, apresentando-se como um importante recurso para a substituição óssea. Esta pesquisa tem por objetivo analisar as características físicas, químicas e biológicas de biofilmes de PS/NBX/HAP sintetizados em diferentes proporções para aplicação no processo de reparação óssea. As análises térmicas revelaram que a incorporação de NBX e HAP não alteraram a estabilidade térmica dos biofilmes. As amostras levaram mais tempo para intumescer em solução de Fluido Corporal Simulado do que em água o que representou uma maior perda de massa no fluido corporal simulado. Apesar dos biofilmes apresentarem caráter hidrofílico, a incorporação de NBX e HAP propiciou uma diminuição da hidrofilicidade. Com relação ao pH e a condutividade, os biofilmes mostraram – se quimicamente estáveis e baixa condução de corrente elétrica o que facilita o processo de proliferação celular. O teste de toxicidade com *Artemia salina* evidenciou que os biofilmes não apresentam toxicidade, ou seja, podem ser considerados atóxicos.

Palavras – chave: Biofilmes. Poliestireno. Norbixina. Hidroxiapatita. Reparação Óssea.

ABSTRACT

Polymeric biomaterials are among the materials most used in the medical field, the effectiveness of biomaterials is mainly related to their ability to interact with cells in the damaged tissue, aiming at healing. Polystyrene (PS) is a thermoplastic polymer, transparent, hard and brittle, but not biodegradable. The carotenoid norbixin (NBX) has shown anticancer and hypolipidemic action, as well as antioxidant activity. Hydroxyapatite bioceramic (HAP) is a non-toxic bioactive substance that causes little tissue reaction, presenting itself as an important resource for bone replacement. This research aims to analyze the physical, chemical and biological characteristics of PS/NBX/HAP biofilms synthesized in different proportions for application in the bone repair process. Thermal analysis revealed that the incorporation of NBX and HAP did not alter the thermal stability of biofilms. The samples took longer to swell in the Simulated Body Fluid solution than in water which represented a greater loss of mass in the simulated body fluid. Although biofilms have a hydrophilic character, the incorporation of NBX and HAP provided a decrease in hydrophilicity. Regarding pH and conductivity, biofilms were shown to be chemically stable and low electrical current conduction, which facilitates the process of cell proliferation. The toxicity test with *Artemia salina* showed that biofilms do not present toxicity, that is, they can be considered non-toxic.

Keywords: Biofilms. Polystyrene. Norbixin. Hydroxyapatite. Bone Repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Representação de (A) monômeros ligados por ligações covalente ...	25
Figura 2	- Unidade monomérica do poliestireno (PS)	25
Figura 3	- Urucuzeiro (<i>Bixa orellana</i> L.), fruto urucum e suas sementes	27
Figura 4	- Fórmula estrutural da Bixina (a) e da Norbixina (b)	28
Figura 5	- Imagem (a) Hidroxiapatita porosa e (b) Hidroxiapatita densa utilizadas na reconstrução de tecidos ósseos	31
Figura 6	- Rede Cristalina da Hidroxiapatita (HAP)	32
Figura 7	- Fluxograma do processo de preparo da NBX	35
Figura 8	- Fluxograma da síntese da Hap pelo método da neutralização	35
Figura 9	- Fluxograma da síntese do biofilme 100PS	36
Figura 10	- Fluxograma da síntese dos biofilmes PS/NBX/HAP em diferentes proporções	37
Figura 11	- Aparelho utilizado na análise de microscopia óptica	38
Figura 12	- Aparelho utilizado na análise de Fluorescência de Raios - X	38
Figura 13	- Aparelho utilizado na análise térmica por TG	39
Figura 14	- Aparelho utilizado na análise térmica por DSC	39
Figura 15	- Aparelho utilizado na análise de absorção na região do Ultravioleta e Visível	40
Figura 16	- Obtenção do ângulo de contato na superfície dos biofilmes no programa Sulfens	43
Figura 17	- Representação do ângulo de contato (a) maior do que 90°, (b) menor do que 90° e (c) espalhamento total	44
Figura 18	- pHmetro utilizado na determinação do pH em água e SBF	45
Figura 19	- Condutímetro usado na medição da corrente elétrica em água e solução de SBF	46
Figura 20	- Fluxograma do ensaio de toxicidade com <i>Artêmia</i> salina dos biofilmes 90PS/5NBX/5HAP e 70PS/5NBX/25HAP	47
Figura 21	- Análise macroscópica dos biofilmes PS/NBX/HAP sintetizados em diferentes proporções	48
Figura 22	- Imagens microscópicas, com aumento de 400X, da superfície dos biofilmes	52

Figura 23	- (a) TG e (b) DTG dos componentes PS, NBx e HAP; (c) TG e (d) DTG dos biofilmes sintetizados	54
Figura 24	- Análise térmica por DSC (a) componentes PS, NBX, HAP e (b) biofilmes sintetizados em diferentes proporções	56
Figura 25	- Espectro de absorção UV-Vis dos componentes PS, NBX, HAP (a) e dos biofilmes sintetizados em diferentes proporções (b)	58
Figura 26	- Ensaio de intumescimento dos biofilmes em água (a) e SBF (b)	59
Figura 27	- Ensaio de degradação dos biofilmes em água e solução de SBF	61
Figura 28	- Dinâmica da molhabilidade para os biofilmes durante o tempo de 60s	62
Figura 29	- Energia de superfície dos biofilmes em água (componente total, polar e dispersiva)	64
Figura 30	- Valores do pH dos biofilmes imersos em água e SBF	65
Figura 31	- Condutividade elétrica dos biofilmes em (a) água e; (b) SBF	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Tipos, fórmula química e relação Ca/P das apatitas	30
Tabela 2	- Ficha técnica do PS	34
Tabela 3	- Proporções dos componentes PS, NBX e HAP nos biofilmes	36
Tabela 4	- Concentrações de íons de SBF em comparação com os encontrados no plasma humano	42
Tabela 5	- Valores energia de superfície, da componente polar e componente dispersiva da água, formamida e glicerol	45
Tabela 6	- Composição da parte inorgânica no PS	49
Tabela 7	- Composição química inorgânica da NBX	50
Tabela 8	- Composição química da biocerâmica HAP	51
Tabela 9	- Análise da toxicidade do biofilme 90PS/5NBX/5HAP	68
Tabela 10	- Análise da toxicidade do biofilme 70PS/5NBX/25HAP	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DSC	- Calorimetria Exploratória Diferencial
DTG	- Termogravimetria Diferencial
FRX	- Fluorescência de Raios - X
HAP	- Hidroxiapatita
MO	- Microscopia óptica
NBX	- Norbixina
PS	- Poliestireno
SBF	- Fluido Corporal Simulado
TG	- Termogravimetria
UV/Vis	- Ultravioleta /Visível
σ	- Condutividade elétrica
λ	- Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	JUSTIFICATIVA	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	BIOMATERIAIS	21
3.2	REPARAÇÃO ÓSSEA	23
3.3	POLIESTIRENO (PS)	24
3.4	NORBIXINA (NBX)	27
3.5	HIDROXIAPATITA (HAP)	29
4	METODOLOGIA	34
4.1	OBTENSÃO DO POLIESTIRENO	34
4.2	PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA NORBIXINA	34
4.3	SINTESE DA HIDROXIAPATITA	35
4.4	SINTESE DOS BIOFILMES	36
5	CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES	38
5.1	MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)	38
5.2	FLUORESCÊNCIA DE RAIOS - X (FRX)	38
5.3	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG)	39
5.4	ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	39
5.5	ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV-VIS)	40
5.6	ENSAIO DE INTUMESCIMENTO DOS BIOFILMES IMERSOS EM ÁGUA E SBF	40
5.7	ENSAIO DE PERDA DE MASSA DOS BIOFILMES QUANDO IMERSOS EM ÁGUA E SBF	41
5.8	ENSAIO DE MOLHABILIDADE E TENSÃO SUPERFICIAL DOS BIOFILMES	42
5.8.1	Ângulo de contato e molhabilidade nos biofilmes	42

5.8.2	Energia de superfície (Tensão superficial) nos biofilmes	44
5.9	DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE pH E CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS BIOFILMES EM ÁGUA E SOLUÇÃO DE SBF	45
5.10	ENSAIO DE TOXICIDADE COM <i>ARTÊMIA SALINA</i>	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1	SINTESE DOS BIOFILMES DE PS/NBX/HAP EM DIFERENTES PROPORÇÕES	48
6.2	ANALISE DE FLUORESCÊNCIA DE RAO – X DOS COMPONENTES PS, NBX E HAP	49
6.3	CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA SUPERFICIAL DOS BIOFILMES PS/NBX/HAP EM DIFERENTES PROPORÇÕES	52
6.4	ANALISE TERMOGRAVIMETRICA DAS AMOSTRAS (TG)	53
6.5	ANALISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)	55
6.6	ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV – VIS)	57
6.7	ENSAIO DE INTUMESCIMENTO DOS BIOFILMES IMERSOS EM ÁGUA E SBF	58
6.8	ENSAIO DE PERDA DE MASSA DOS BIOFILMES QUANDO IMERSOS EM ÁGUA E SBF.....	60
6.9	ENSAIO DE MOLHABILIDADE E TENSÃO SUPERFICIAL DOS BIOFILMES	62
6.9.1	Ângulo de contato e molhabilidade nos biofilmes	62
6.9.2	Energia de superfície (Tensão superficial) nos biofilmes	63
6.10	MEDIÇÃO DO PH E DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS BIOFILMES EM ÁGUA E SBF	64
6.10.1	Medidas de pH dos biofilmes imersos em água e SBF	64
6.10.2	Condutividade elétrica dos biofilmes em água e SBF	66
6.11	ENSAIO DE TOXICIDADE COM <i>ARTÊMIA SALINA</i>	68
7	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros registros da utilização de biomateriais datam de 4.000 A.C, em seu histórico, estes materiais, muitas vezes apresentavam insucesso, devido à falta de conhecimento e pesquisa a respeito dos conceitos relativos aos materiais, a infecção e as reações biológicas (GUEDES et al. 2021).

No início, o uso de biomateriais era baseado em metodologias de tentativas e erros, buscando sua propriedade de ser inerte (FALEIROS - SANTOS et al. 2020). Nos últimos anos, esse avanço atingiu a área da saúde, que se aliou à engenharia de materiais a partir de pesquisas que buscam desenvolver materiais e utilizá-los no meio biológico (biomateriais). Com isso, ocorreu uma grande evolução das técnicas de reconstituição parcial ou total de órgãos e tecidos (SOUSA et al. 2020).

Em contraste com outros tecidos, o osso é remodelado de forma contínua durante toda a vida da maioria dos vertebrados, inclusive o homem. Quando lesões ou defeitos ósseos ocorrem, nas mais variadas situações clínicas, a reconstrução tecidual, que devolve integridades funcional e mecânica, constitui-se num passo necessário para a reabilitação do paciente (COSTA, MIGUEL e ROSA, 2005).

A maior parte dessas lesões, em virtude do seu potencial de regeneração espontânea, repara-se adequadamente pelo emprego de terapias conservadoras ou técnicas cirúrgicas convencionais. Entretanto, procedimentos de enxertia e substituição óssea são freqüentemente necessários, especialmente, em ortopedia e em intervenções bucomaxilofaciais, quando da existência de defeitos extensos decorrentes de traumas, procedimentos cirúrgicos e deformidades ósseas congênitas (COSTA, MIGUEL e ROSA, 2005)

Por outro lado, Almeida Filho e colaboradores (2007) relatam que a utilização de materiais sintéticos, para substituição ou aumento dos tecidos biológicos, sempre foi uma grande preocupação nas áreas médica e odontológica. Para este fim, são confeccionados diversos dispositivos a partir de metais, cerâmicas, polímeros e, mais recentemente, compósitos. Na realidade, de acordo com Almeida Filho e colaboradores (2007) nem sempre são novos materiais no sentido estrito da palavra, são materiais dos quais se utilizam novas propriedades obtidas mediante diferentes composições químicas ou processos de fabricação.

Os biomateriais são materiais naturais ou sintéticos utilizados em aplicações médicas ou em contato com sistemas biológicos. Os biomateriais à base de

hidroxiapatita, junto com materiais poliméricos ou compósitos são bastante usados em sistemas de liberação controlada de fármacos ou como suporte para tecido celular (SOUSA et al. 2012),

Além disso, como a matriz mineral óssea é composta por um tipo de fosfato de cálcio, vários fosfatos de cálcio têm sido pesquisados para o desenvolvimento de substitutos ósseos. Estes materiais apresentam boa habilidade osteoindutiva, ou seja, induzem a diferenciação celular de células em linhagens osteogênicas e em tecido ósseo neoformado (COSTA et al. 2015).

A hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ é fabricada para uso clínico na forma de blocos ou grânulos, porosa ou densa. Grânulos porosos são estudados por serem bem tolerados pelo tecido ósseo, facilitarem a infiltração e proliferação de osteoblastos nos contornos dos grãos e em suas microporosidades, além de promoverem a proliferação de vasos sanguíneos que são essenciais ao processo reparativo (COSTA et al. 2015).

Porém, a possibilidade de solubilização dos componentes que irão fazer parte da composição do biomaterial apresenta uma grande importância. Além disso, Pereira e colaboradores (2016) relatam que a solubilização polimérica é uma importante área de estudo no tocante ao manuseamento e observação das características de um polímero. Também possui importantes aplicações na manipulação de fármacos, ciência das membranas, reciclagem plástica e mais recentemente na produção de tecidos humanos.

Atualmente, os biomateriais sintéticos são uma alternativa comum para limitar os aloenxertos que levam a um aumento da morbidade. Segundo Terranova e colaboradores (2016), em estudo anterior, foi demonstrado que o uso de um biomaterial não reabsorvível com alta rigidez poderia ser utilizado para auxiliar a osteocondução. O poliestireno, sigla PS, é um polímero citocompatível não biodegradável e bem conhecido, parece ser uma solução interessante para a geração de *scaffolds* de suporte à regeneração óssea em casos de grandes defeitos ósseos (TERRANOVA et al. 2016).

A incorporação da norbixina e dos compostos extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) apresentam grande potencial na obtenção de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, que são reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, antimicrobiana e antitumoral (ALVES et al. 2016).

De acordo com Santos e colaboradores (2002), a norbixina é um carotenóide solúvel em água originado da remoção hidrolítica de um grupo éster metílico da bixina, o principal carotenóide encontrado no material ceroso ao redor das sementes de *Bixa orellana*. Além disso, foi possível caracterizar o potencial antioxidante da norbixina *in vitro*, investigando seus efeitos no metabolismo dos lipídios plasmáticos, bem como na atividade plasmática da arilesterase / paraoxonase, em condições de alta ingestão de gordura.

Por isso, segundo Przekora (2019), a engenharia de tecido ósseo usa biomateriais implantáveis como suportes para células - tronco e células osteoprogenitoras para manter temporariamente a função, o crescimento e a organização do tecido ósseo durante o processo de sua regeneração, tornando – se o foco principal de estudos.

1.1 JUSTIFICATIVA

A bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados. Deste modo, essa ciência visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida (OLIVEIRA et al. 2010).

Os biomateriais compreendem uma representativa fração dos produtos que são utilizados na área da saúde, estimados em cerca de 300 mil há cerca de 10 anos. Porém o uso de biomateriais não é recente, na década de 50, houve o início do uso de biomateriais de forma mais sistematizada na qual se buscavam os materiais bioinertes. Com o passar do tempo, passou – se a buscar a bioatividade desses materiais, e mais recentemente, tem – se focado na regeneração de um tecido funcional, especificado no aspecto biológico (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015).

Além disso, o intenso crescimento observado no mercado de biomateriais é atribuído a três motivos principais: o primeiro motivo é o envelhecimento da população mundial; o segundo motivo é o aumento do poder aquisitivo e o padrão de vida nos países em desenvolvimento e, o terceiro motivo que é as melhorias tecnológicas na abordagem de doenças anteriormente vistas como não tratáveis. Neste sentido,

espera – se apreciável avanço na área de engenharia tecidual visando às aplicações no campo da medicina regenerativa (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015).

Portanto, a importância deste trabalho está na caracterização de biofilmes de PS/NBX/HAP, em diferentes composições, para uma possível aplicação no processo de reparação óssea e dessa forma, estabelecer um suporte para neoformação óssea, ou seja, a formação de uma nova estrutura óssea.

Além disso, esse biomaterial ainda deve possuir função imediata após a implantação e ter habilidade de remodelação e integração com o organismo, como também, para que seu uso estabeleça um menor tempo de recuperação para o tecido danificado.

E, conseqüentemente, o desenvolvimento desse estudo possa contribuir para o desenvolvimento do conhecimento técnico – científico fortalecendo de forma sucinta futuras pesquisas no campo dos biomateriais voltados ao processo de reparação óssea.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Analisar as características físicas, químicas e biológicas de biofilmes de PS/NBX/HAP sintetizados em diferentes proporções aplicáveis à reparação óssea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar macro e microscopicamente à influência da incorporação da hidroxiapatita e norbixina nos biofilmes sintetizados;
- ✓ Verificar o comportamento térmico dos biofilmes sintetizados;
- ✓ Estabelecer através de teste *in vitro* o comportamento dos biofilmes em água e em solução de Fluido Corporal Simulado (SBF);
- ✓ Determinar a hidrofiliicidade/hidrofobicidade dos biofilmes sintetizados;
- ✓ Preliminar a toxicidade dos biofilmes através do teste com *Artêmia salina*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMATERIAIS

A humanidade, desde épocas muito remotas, vem procurando formas de substituir tecidos vivos, tanto por questões de perda ou por doenças, utilizando como substitutos substâncias sintéticas e/ou naturais, as quais, recentemente, estão sendo chamadas de biomateriais (SOUZA et al. 2016). Com isso, a bioengenharia tecidual visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida (OLIVEIRA et al. 2010).

Segundo Oliveira e colaboradores (2010), a bioengenharia tecidual é um campo multidisciplinar que envolve a aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da saúde para assistir e acelerar a regeneração e o reparo de tecidos defeituosos ou danificados. Deste modo, essa ciência visa criar e aprimorar novas terapias e/ou desenvolver novos biomateriais que restaurem, melhorem ou impeçam o agravamento da função tecidual comprometida

Biomateriais são materiais artificiais que possuem características biológicas compatíveis. Dentre elas pode – se citar as propriedades osteoblásticas (que está relacionado com a proliferação celular), osteocondutoras (que está relacionado à neoformação óssea), e o plasma rico em plaquetas que, quando é adicionado ao enxerto, estimula a consolidação e a mineralização óssea na metade do tempo convencional (SOUZA et al. 2016).

Segundo Sinhoretí, Vitti e Sobrinho (2013) a evolução dos biomateriais é caracterizada por três diferentes gerações. A primeira geração corresponde aos materiais bioinertes, cujo foco é o de não provocar reação de corpo estranho no organismo. Já a segunda geração engloba os materiais bioativos e biodegradáveis e a terceira geração os materiais responsáveis por estimular respostas celulares em níveis moleculares (biomimética e engenharia tecidual).

É importante ter em mente que essas gerações são interpretadas de forma conceitual e não cronológica, uma vez que cada uma delas representa evolução nas propriedades dos materiais, ou seja, os biomateriais desenvolvidos atualmente não necessariamente pertencem a terceira geração (SINHORETI, VITTI e SOBRINHO, 2013).

De acordo com Pereira, Vasconcelos e Orefice (1999), a escolha de um material para ser usado como biomaterial passa necessariamente pela análise de um conjunto de requisitos que devem ser encontrados. O efeito do ambiente orgânico no material (corrosão, degradação) e o efeito do material no organismo são fenômenos que devem ser estudados com extremo cuidado, pois a eles está associado a chamada "biocompatibilidade". Dentre esses dois últimos aspectos, a interação dos tecidos vivos com o biomaterial, associada com o tipo de resposta do organismo à presença do material, é o ponto mais desafiador no desenvolvimento de biomateriais.

A aplicação de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo é relevante, pois eles não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente. Ou seja, uma das propriedades mais importantes a ser levada em consideração na seleção de um biomaterial é a sua composição química, que afeta diretamente sua taxa de reabsorção, bioatividade, citotoxicidade e biocompatibilidade (ROSTÁRRAGA et al. 2019).

Além disso, de acordo com Silva Junior e Orefice (2001), a introdução de biomateriais no corpo humano é uma das formas mais usuais de se restaurar ou substituir partes ou a totalidade de tecidos não-produtivos, fruto de traumas ou tumores. Uma série de fatores tem incentivado o desenvolvimento de novos biomateriais com comportamento superior e para novas aplicações.

Dentre os fatores mencionados, pode – se destacar o fraco desempenho dos materiais utilizados atualmente que são projetados para executarem suas funções por um período máximo de 10 anos (com o aumento do tempo de vida médio da população, torna-se necessário o desenvolvimento de biomateriais com propriedades superiores e capazes de cumprir suas atividades por tempos mais prolongados); necessidade de se reduzir o número de cirurgias de revisão destinadas a substituir implantes danificados; (no Brasil) necessidade de se atender a uma crescente demanda interna do produto e de se reduzir o custo dos materiais envolvidos; falta de doadores para transplantes (SILVA JUNIOR e OREFICE, 2001).

Consequentemente, a síntese de novos biomateriais decorre de um rápido progresso e realizações de pesquisas científicas na área de engenharia de materiais e se faz necessário o conhecimento sobre as interações entre biomateriais, tecidos biológicos e desempenho em uso clínico (ALVES et al. 2016).

Com isso, fica evidente que o desenvolvimento de procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos tem se tornado interessantes nos últimos anos, pois possibilitam a inserção do biomaterial e neoformação tecidual com a máxima preservação da anatomia e com a mínima agressão ao organismo (SANTOS et al. 2013).

3.2 REPARAÇÃO ÓSSEA

O processo de reparo ósseo ocorre em três fases: inflamatória, reparadora e de remodelação. Na fase inflamatória ocorre a formação de um coágulo sanguíneo envolvendo as superfícies ósseas no local da lesão, acompanhadas de edema mais ou menos intenso. Na fase reparadora, tem – se a formação de um calo fibroso por fibroblastos produtores de colágeno tipo III, envolvendo a região lesionada. E, na fase de remodelação, ocorre a formação de uma nova rede capilar, invadindo a região do coágulo juntamente com fibroblastos e osteoblastos, formando um novo tecido ósseo imaturo no local por um processo de ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva (VIEIRA, 2019).

Na prática ortopédica freqüentemente encontra-se dificuldade de reparação de defeitos ósseos, quando o rápido crescimento de tecido conjuntivo no interior desses defeitos impede a formação de tecido ósseo, causando alterações anatômicas e perturbações funcionais e exigindo procedimentos operatórios reconstrutivos, que têm na enxertia óssea seu principal método de tratamento (FIGUEIREDO et al. 2004).

Além das excelentes propriedades mecânicas, o osso revela um potencial único para reparação. O tecido ósseo é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais por meio do processo de regeneração, com a formação de novo tecido com a mesma organização estrutural do tecido anterior, sem a formação de cicatriz (AMADEI et al. 2006).

Após uma lesão óssea, uma sequência de eventos dinâmicos ocorre com o objetivo de restaurar a forma e a função do osso. Muitos desses mecanismos biológicos celulares ainda não foram completamente identificados, porém sabe-se que o processo é ativado pela liberação de fatores de crescimento e citocinas no local (AMADEI et al. 2006).

A depender da magnitude da lesão, o tecido ósseo tem a capacidade de se regenerar espontaneamente, porém, em perdas ósseas maiores (defeitos ósseos

críticos), a regeneração ocorre de forma limitada com formação de tecido fibroso. Nestas situações, há necessidade de utilizar enxertos ou substitutos ósseos. A utilização dos procedimentos de enxertia é restrita, devido, à limitação de áreas doadoras e a necessidade de procedimento cirúrgico adicional, aumentando assim a morbidade do paciente (ALMEIDA et al. 2014).

Diante destas dificuldades, a bioengenharia tecidual óssea colige conhecimentos de diversas áreas como a medicina, biologia e engenharia, para o desenvolvimento de materiais biocompatíveis, com características semelhantes ao tecido que se deseja recuperar (ALMEIDA et al. 2014).

A reconstrução tecidual de lesões amplas, causadas por traumas, processos infecciosos, neoplasias ou anomalias de desenvolvimento, representa um desafio em cirurgias ósseas. O resultado de tratamentos utilizados mostra-se muitas vezes imprevisível, demandando investigações continuadas sobre a natureza da osteogênese e métodos de controlá-la e estimulá-la (GONÇALVES, GUIMARÃES e GARCIA, 1998). A osteogênese necessária ao reparo de defeitos ósseos pode ser influenciada por vários fatores, como as matrizes ósseas utilizadas como material de implante e os fármacos com ação direta ou indireta no metabolismo ósseo (SASSIOTO et al. 2004).

Vários tipos de biomateriais e suas associações experimentais com diversas substâncias vêm sendo estudados no processo de reparação óssea, considerando que o tecido ósseo é um dos poucos tecidos de mamíferos capaz de reconstituir a estrutura lesada em sua forma original com restauração da estrutura histológica e propriedades mecânicas (SASSIOTO et al. 2004).

A cicatrização é um dos processos mais estudados atualmente. Pesquisas têm avaliado a importância de sua estimulação na reabilitação funcional e estética do paciente. Esta pode ocorrer por primeira ou segunda intenção, com estágios inflamatório, fibroblástico e remodelador (SILVA et al. 2007).

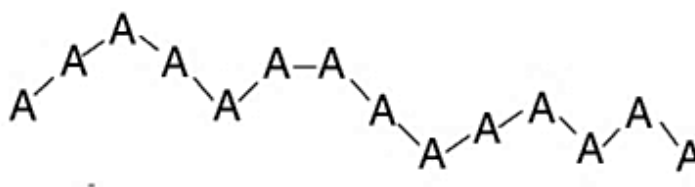
3.3 POLIESTIRENO (PS)

Os biomateriais poliméricos estão dentre os mais empregados no âmbito médico. As principais vantagens dos biomateriais poliméricos incluem a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), o processamento secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais

com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015).

Desta forma, são promissores em diferentes aplicações como, por exemplo, na regeneração e/ou substituição dos tecidos, dentre eles, o tecido ósseo. Em função das diferentes possibilidades de aplicação, formatos e formas de apresentação, a utilização destes polímeros depende de cada sítio e/ou aplicação clínica (SANTOS, MARINHO e MIGUEL, 2013)

Figura 1 - Representação de (A) monômeros ligados por ligações covalentes.

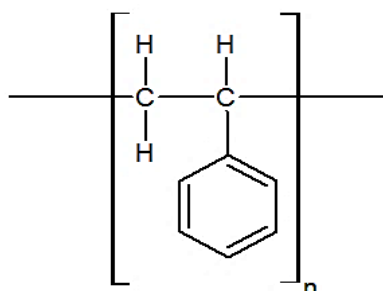


Fonte: SANTOS, MARINHO e MIGUEL (2013)

Polímeros são macromoléculas, naturais ou sintéticas, formadas por monômeros, figura 1, unidades menores, ligadas covalentemente entre si (SANTOS, MARINHO e MIGUEL, 2013). Os polímeros do tipo termoplásticos, são capazes de se fundir e solidificar repetidas vezes. Já os polímeros termorrígidos são insolúveis e as ligações são rompidas somente por elevadas quantidades de energia, com consequente degradação do polímero (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015).

O poliestireno, sigla PS, representado na figura 2, é um polímero termoplástico, transparente, duro e quebradiço, mas lento para biodegradar, obtido a partir da reação de polimerização radicalar do estireno, um hidrocarboneto aromático insaturado (LIANG et al. 2019).

Figura 2 – Unidade monomérica do poliestireno (PS)



Fonte: Autor (2021)

Também pode ser classificado como polímero estirênico ou como polímero vinílico devido a presença do radical vinil ($\text{CH}_2 = \text{CH} \text{---}$). Sua produção industrial se iniciou em 1930 na Alemanha pela BASF, por um processo onde primeiramente é preparado o monômero e em seguida é realizada a polimerização, obtendo – se um produto orgânico, hidrofóbico, apolar e amorfo, na maioria dos processos (MAUL et al. 2006).

Com fácil obtenção e baixo custo de produção, este polímero possui propriedades mecânicas moderadas, alta rigidez, transparência elevada, com uma temperatura de transição vítrea em torno de 100°C . Em temperatura ambiente é sólido, transparente, inodoro, incolor, atóxico e moderadamente inerte, possuindo boa estabilidade dimensional. Sua degradação se dá em uma temperatura em torno de 300°C (FREDIANI et al. 2014). No entanto, é não biodegradável, inflamável e solúvel em vários solventes clorados. Tem uma gama de aplicações comerciais que variam desde embalagens simples a engenharia avançada (YUSSIF et al. 2018).

O PS é um plástico flexível e amplamente utilizado em muitas aplicações devido ao seu baixo custo de produção e sua alta resistência a diversos ácidos, bases e solventes. Além disso, pode ser facilmente modificado para adotar diferentes cores e intensidades, e vários depósitos podem ser acomodados dentro do *backbone* do PS (ALOTAIBI, EL-HITI, YOUSIF et al. 2019).

Uma das vantagens em utilizar materiais sintéticos é evitar a coleta de outros materiais autogênicos para enxerto, como ossos, músculos e gordura. O tempo total necessário para a cirurgia é reduzido e também a extensão da ferida cirúrgica. Na clínica, a necessidade de enxertos ósseos vem crescendo em decorrência das cirurgias por traumas, tumores, craniossinostose e cirurgias com finalidades estéticas. A utilização de materiais sintéticos evita o uso de enxertos com tecidos alogênicos a partir de um banco de tecidos (MAIA et al. 2012).

Outra vantagem associada aos biomateriais é que são fabricados sob condições controladas e suas composições químicas são bem conhecidas e os materiais estão disponíveis em qualquer tempo e quantidade, considerando que as grandes reconstruções ou reoperações podem limitar o uso de enxertos autogênicos, evitando a morbidade dos doadores, a deformidade de crescimento, as dores e a reabsorção (MAIA et al. 2012).

3.4 NORBIXINA (NBX)

Os carotenóides possuem mais de 600 variantes estruturais e são encontrados em bactérias, algas, fungos e plantas superiores, em alguns crustáceos e em plumagem de aves. Os carotenóides possuem ligações duplas conjugadas em suas estruturas, atuam como antioxidantes (LIMA et al. 2001).

Os antioxidantes são substâncias que, em concentrações inferiores aos substratos oxidáveis, retardam ou previnem a oxidação destes, tornando – os indisponíveis para formação de espécies oxidantes (GARCIA et al. 2012).

Dentre os corantes naturais, o urucum é o mais usado pela indústria brasileira, representando cerca de 90% dos corantes naturais usados no Brasil e 70% no mundo. Do total de sementes de urucum produzido no Brasil, cerca de 25% são utilizados na preparação de extratos lipo e hidrossolúveis e o restante é usado na fabricação do colorífico, totalmente consumido no mercado interno (TOCCHINI e MERCADANTE, 2001).

O fruto urucum é retirado do urucuzeiro, de nome científico *Bixa orellana* L. que é uma planta nativa da América Tropical, figura 3. O corante responsável pela coloração do urucum apresenta-se convencionalmente de duas formas: a bixina lipossolúvel e a norbixina, que é hidrossolúvel (LIMA et al. 2001).

Figura 3 – Urucuzeiro (*Bixa orellana* L.), fruto urucum e suas sementes

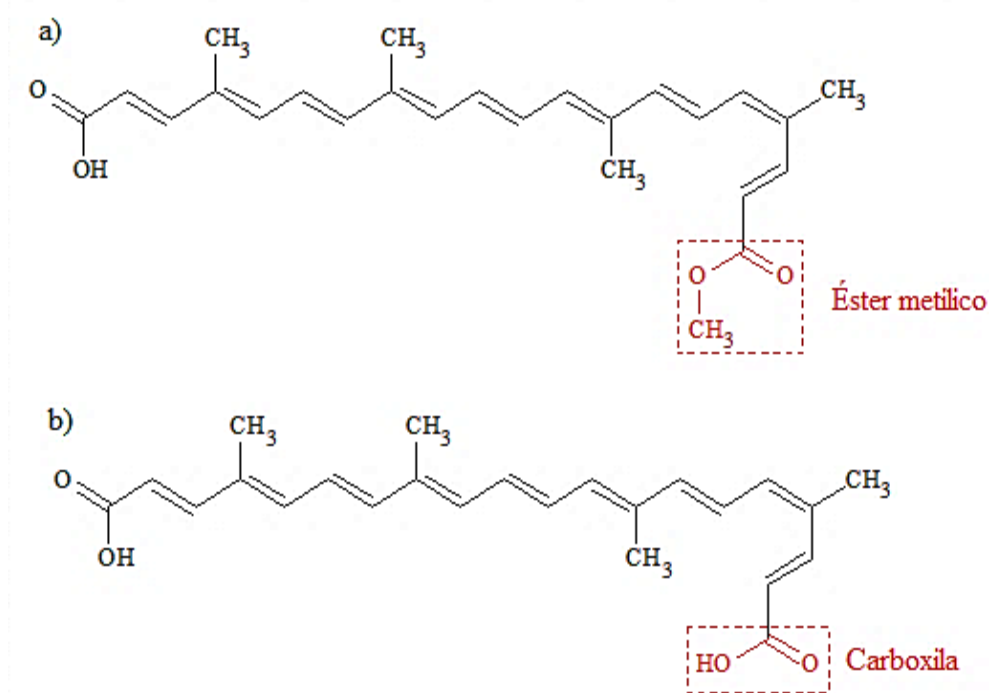


Fonte: <https://www.todafruta.com.br/urucum>

As diferenças estruturais, ilustradas na figura 4, conferem à bixina características lipossolúveis, devido à presença do éster metílico na molécula, enquanto a norbixina apresenta maior hidrossolubilidade em razão da presença do

grupamento carbonila, sítio de interações com moléculas de água. Com isso, a bixina como carotenoide de maior concentração nas soluções coloríficas lipossolúveis do urucum, enquanto a norbixina é predominante nas preparações hidrossolúveis (GARCIA et al. 2012).

Figura 4 - Fórmula estrutural da Bixina (a) e da Norbixina (b).



Fonte: GARCIA et al. (2012)

No entanto, não pode ser negligenciado que estes compostos sofrem isomerização devido à instabilidade das insaturações presentes na molécula frente às condições de processamento. Os isômeros *cis*, tanto da bixina quanto da norbixina, estão presentes naturalmente na planta, sendo convertidos na forma *trans*, mais estável, quando submetidos a altas temperaturas. As diferenças estruturais entre os isômeros *cis* e *trans* resultam em particularidades nas características físicas (GARCIA et al. 2012).

Porém, Silva e colaboradores (2001), relatam que existem uma relação inversa entre o risco de câncer e hiperlipidemias e o consumo de alimentos contendo carotenóides, demonstrando-se ação anticancerígena e hipolipidêmica. Além disso, os carotenóides possuem, também, atividade antioxidante e podem atuar sinergicamente com outros antioxidantes, proporcionando uma maior proteção contra espécies reativas de oxigênio.

Também, Santos e colaboradores (2014) relatam que uma das principais características dos carotenóides é a sua capacidade de reagir com radicais livres, principalmente com oxirradicais como o superóxido, radicais hidroperoxila e hidroxila. Estes radicais podem ser formados em decorrência de processos fisiológicos e patológicos como a fagocitose ou em decorrência de influências externas, como por exemplo, a exposição à radiação ultravioleta. A atuação como fotoprotetor e como quimiopreventivo do câncer, além de suas funções nutricionais já estabelecidas, justificam os diversos estudos sobre o potencial biológico destes compostos.

Dessa forma, este biomaterial é biodegradável, biocompatível e bioreabsorvível na fabricação de scaffolds devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais, incluindo diversos estudos que objetivaram avaliar suas propriedades em animais por meio de interações biológicas (SILVA JUNIOR et al. 2021).

3.5 HIDROXIAPATITA (HAP)

A procura de substitutos dos enxertos ósseos, capazes de promover a osteointegração, o restabelecimento, a remodelação e o reforço das estruturas ósseas, tem estimulado a pesquisa de materiais sintéticos capazes de substituir os enxertos ósseos. Os enxertos ósseos apresentam eficiência mecânica e biológica, mas as limitações relacionadas à sua utilização estão relacionadas com as complicações do local de sua retirada, e com a sua escassez nos pacientes submetidos a múltiplos procedimentos (MOREIRA et al. 2003).

O uso da hidroxiapatita (HAP) tem sido muito pesquisado desde seu surgimento como biomaterial, em 1970. A HAP é um fosfato de cálcio hidratado, principal componente (cerca de 95%) da fase mineral dos ossos e dentes humanos. O substantivo hidroxiapatita é formado pela junção das palavras “hidroxi” e “apatita”. “Hidroxi” refere-se ao grupo hidroxila (OH) e “apatita” é uma nômima mineral. A palavra “apatita” vem do grego e significa “decepciono”, por ser confundida com turmalina, berilo e outras pedras. A HAP é o material presente nos vertebrados, compondo o esqueleto ósseo e atuando como reserva de cálcio e fósforo (PINTO et al. 2007).

A HAP é fabricada para uso clínico na forma de blocos ou grânulos, porosa ou densa. Grânulos porosos são estudados por serem bem tolerados pelo tecido ósseo, facilitarem a infiltração e proliferação de osteoblastos nos contornos dos grãos e em

suas microporosidades, além de promoverem a proliferação de vasos sanguíneos que são essenciais ao processo reparativo (COSTA et al. 2015).

Embora a HAP sintética demonstre boa osteocondutividade, sua bioabsorção é baixa e ela permanece no organismo por muito tempo após a implantação, a hipótese é de que o biomaterial implantado seja absorvido pelos tecidos adjacentes e estimule, assim, a neoformação e reparação do tecido ósseo (COSTA et al. 2015).

A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. Porém composições estáveis podem ter esta razão estendida para aproximadamente 1,5. As possíveis relações Ca/P das apatitas, seus nomes e fórmulas estão apresentados na Tabela 1. (COSTA et al. 2009).

Tabela 1 - Tipos, fórmula química e relação Ca/P das apatitas.

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

Fonte: COSTA et al. (2009)

De acordo com Maia e colaboradores (2010), a forma sintética da HAP apresenta similaridade química e cristalográfica, entretanto, não idêntica à hidroxiapatita de ocorrência natural. Esse material cerâmico é sintetizado na forma

cristalina em pH baixo e então sinterizado entre 700 a 1300°C para formar uma massa sólida de hidroxiapatita. Este tipo de hidroxiapatita sólida está disponível em duas formas:

1ª Forma - Hidroxiapatita porosa

Pode ser produzida sinteticamente ou originada dos esqueletos de corais marinhos. O esqueleto de carbonato de cálcio do coral é convertido quimicamente em hidroxiapatita e a estrutura porosa original do coral é preservada. A vantagem significativa da hidroxiapatita porosa, permite o crescimento interno do tecido ósseo e é fixada pelo osso circunjacente em algumas semanas. Por causa da dificuldade de conformação devido à suscetibilidade de fratura, sua aplicação tem sido amplamente utilizada fora das áreas de pressão como enxerto sobre camada ou espaçador em osteotomia facial, figura 5(a);

2ª Forma - Hidroxiapatita densa

É inteiramente sintética, não apresenta poros e pode ser fabricada em blocos ou grãos. É de difícil conformação e não permite o crescimento interno de tecido. Entretanto, os grânulos apresentam maior adaptabilidade de contorno que os blocos, mas não integridade estrutural intrínseca e não se torna mecanicamente estável até ser envolvida pelo tecido ósteo-fibroso. Os grânulos são difíceis de serem mantidos dentro do local desejado de implante e há possibilidade de migração para áreas não pretendidas após alguns meses ou anos, figura 5(b).

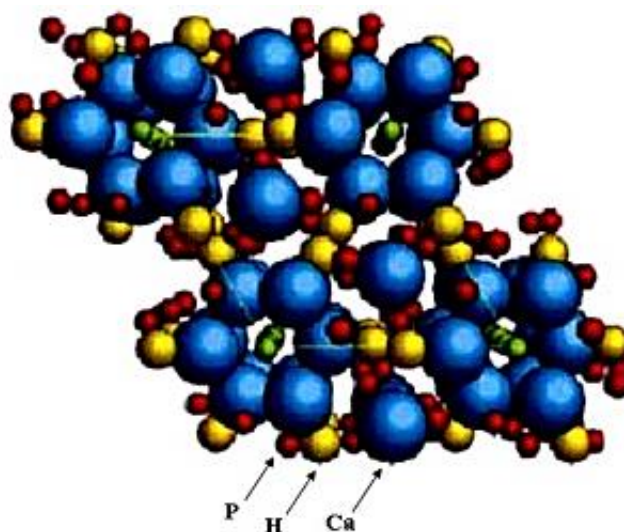
Figura 5 - Imagem (a) Hidroxiapatita porosa e (b) Hidroxiapatita densa utilizadas na reconstrução de tecidos ósseos.



Fonte: MAIA et al. (2010)

A figura 6 revela o arranjo de uma célula unitária da HAP. A estrutura porosa da HAP funciona como suporte passivo à neoformação vascular, o que leva à proliferação de fatores indutores da aposição óssea. A superfície porosa parece fornecer um substrato adicional à proliferação do tecido ósseo. A HAP permite a junção, proliferação, migração e expressão fenotípica de células ósseas, o que resulta em formação de novo osso, em aposição direta ao biomaterial (VITAL et al. 2006)

Figura 6 - Rede Cristalina da Hidroxiapatita (HAP)



Fonte: COSTA et al., (2009)

A estrutura cristalina da HAP lhe confere uma de suas mais importantes propriedades, a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas, sendo referida como capaz de incorporar metade dos elementos da tabela periódica em sua estrutura. Íons Ca^{2+} podem ser substituídos por um grande número de cátions metálicos mono e bivalentes, tais como K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{2+} , e íons trivalentes de elementos terra rara (GUASTALDI & APARECIDA, 2010).

A diferença de valência causada por qualquer substituição requer uma redução na carga aniônica para manter o balanço de carga. Íons PO_4^{3-} podem ser substituídos por íons AsO_4^{3-} , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SiO_4^{4-} , VO_4^{3-} e os íons OH^- por íons CO_3^{2-} , F^- , Cl^- . Todas as substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da HAP que, por sua

vez, alteram a degradação e o comportamento *in vivo* (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Segundo Moreira e colaboradores (2009), a cerâmica de HAP tem sido estudada por tratar-se de uma substância bioativa não tóxica, que provoca pouca reação tecidual, apresentando-se como um importante recurso para a substituição óssea. Além disso, de acordo com Vital e colaboradores (2006), a HAP é esterilizável e relativamente não absorvível. É vantajosa por causa de sua composição uniforme, segurança (não é alergênica ou carcinogênica) e pelo fato de sua microestrutura (tamanho dos poros) ser completamente controlável.

A HAP sintética possui propriedades de biocompatibilidade com o osso pelo fato de possuir a mesma estrutura cristalina, sendo assim considerada como o sólido inorgânico mais importante em biologia (Vital et al. 2006) e osteointegração, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses, daí o grande interesse em sua produção (COSTA et al. 2009).

As propriedades biológicas da HAP sintética são bem documentadas na literatura. Ela já foi utilizada na correção de defeitos ósseos no homem e em várias espécies animais, com resultados satisfatórios o suficiente para ser indicada como alternativa para a enxertia óssea na rotina clínica (Vital et al. 2006), revestimento de componentes metálicos para fixação ou no revestimento da superfície de metais (MOREIRA et al. 2003).

No entanto, Santos e colaboradores (2017) relatam que sua baixa tenacidade à fratura limita sua aplicação em locais de carga. Portanto, os fosfatos de cálcio por si só não podem ser usados em *scaffolds* de suporte de carga. Com isso, as partículas de HAP podem modificar a superfície química e fisicamente, de modo que amostras com alto conteúdo de HAP tendem a exibir diferenciação acentuada resultante de alta rugosidade da superfície e grande quantidade de HAP exposta.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DO POLIESTIRENO

Para realização do presente trabalho foi utilizado poliestireno, sigla PS, produzido por NEWPOP INDÚSTRIA QUÍMICA LTDA, São Paulo – SP, e fornecido gratuitamente pelo GRUPO SOFERRO LTDA, Teresina - PI. O PS apresenta aspecto sólido, com grânulos de poliestireno termoplástico com 0,25 mm a 2 mm de diâmetro.

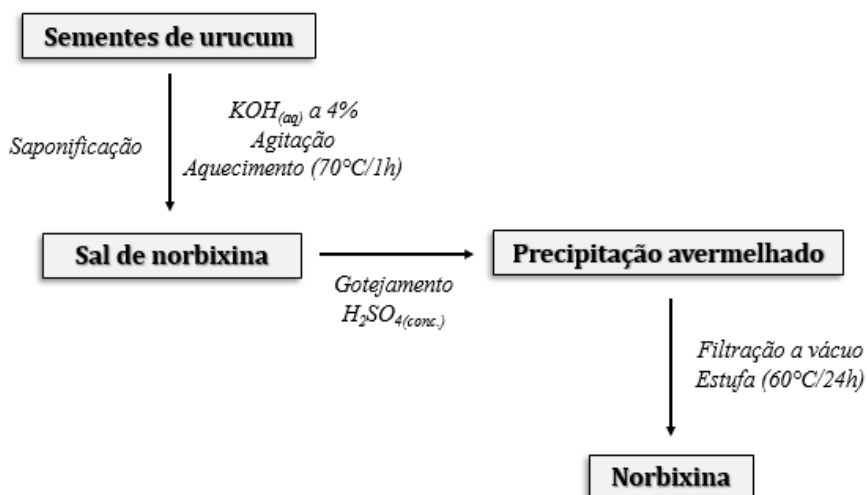
Tabela 2 - Ficha técnica do PS

Ficha Técnica do PS	
Densidade	9 – 16 kg/m ³
Granulometria	1,23 – 2,00 mm (> 95% em peso)
Teor de agente expensor	> 5,5% em peso (no momento da embalagem)
Teor de umidade residual	< 0,4%
Teor de monômero residual	≤ 500 ppm ou 0,05%

Fonte: Autor (2021)

4.2 PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA NORBIXINA

A norbixina utilizada foi extraída das sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) adquiridas no comércio local da cidade de Teresina – PI. A extração da norbixina foi realizada pelo método utilizado por Silva Júnior et al., (2021) com adaptações no laboratório de físico-química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí – IFPI, campus Teresina central. Inicialmente, 200 g de sementes de urucum foram previamente selecionadas, limpas e secas, em seguida, foi adicionada solução de hidróxido de potássio a 4% sob aquecimento constante e agitação a 70°C por 1 hora para gerar o sal de norbixina. Após a saponificação, foi adicionado H₂SO₄ concentrado gota a gota após a solução atingir a temperatura ambiente. Por fim, a norbixina (precipitado avermelhado) foi obtida por filtração a vácuo, seguida por lavagem com água destilada e seca em estufa a 60°C por 24h. O processo de obtenção está descrito no fluxograma da figura 7.

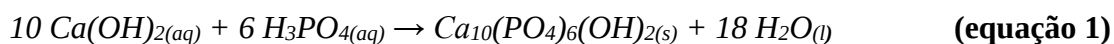
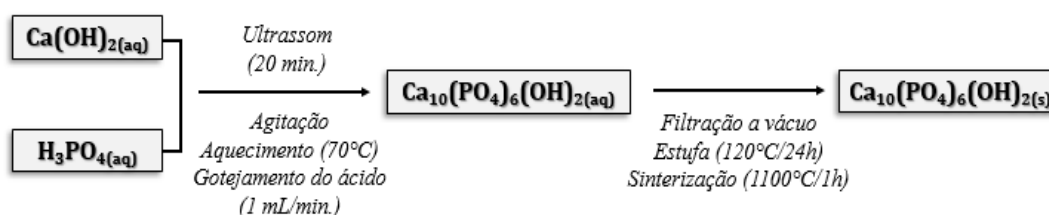
Figura 7 - Fluxograma do processo de preparo da NBX

Fonte: Autor (2021)

4.3 SÍNTESE DA HIDROXIAPATITA

O pó de HAP foi obtido através do processo de precipitação química a quente proposto por CAMARGO et al., (2014) utilizando uma suspensão de hidróxido de cálcio - $Ca(OH)_2$ e ácido ortofosfórico - H_3PO_4 , como descrito na equação 1.

Inicialmente, os reagentes foram dissolvidos em água destilada. A solução de hidróxido de cálcio foi colocada em aquecimento com agitação magnética. Ao atingir a temperatura desejada, iniciou-se o gotejamento da solução de ácido (1mL/min). Ao término do gotejamento, manteve-se a temperatura e a agitação por 24 horas. Ao final do tempo estipulado fez-se filtração a vácuo, em seguida, o filtrado foi seco em estufa a $120^{\circ}C$ por 24h. Por fim, realiza-se a sinterização do pó, em mufla durante 1 hora, a temperatura de $1100^{\circ}C$ como descrito no fluxograma da figura 8.

**Figura 8** - Fluxograma da síntese da HAP pelo método da neutralização

Fonte: Autor, (2021)

4.4 SÍNTESE DOS BIOFILMES

Os biofilmes de PS/NBX/HAP foram preparados pelo processo de evaporação de solvente (*solution casting*). As composições dos biofilmes com a matriz PS e suas respectivas proporções estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Proporções dos componentes PS, NBX e HAP nos biofilmes

Biofilmes	Proporção (%)		
	PS	NBX	HAP
100PS	100	-	-
90PS/5NBX/5HAP	90	5	5
85PS/5NBX/10HAP	85	5	10
80PS/5NBX/15HAP	80	5	15
75PS/5NBX/20HAP	75	5	20
70PS/5NBX/25HAP	70	5	25

Fonte: Autor (2021)

Na síntese do biofilme 100PS, o PS foi imerso em clorofórmio, a mistura foi colocada em ultrassom por 20 minutos. A mistura foi colocada sob aquecedor com agitador magnético a 55°C por 1 hora. Depois disso, a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo e, por fim, vertida em placa de Petri coberta com papel alumínio por um período de 24 horas como mostrado no fluxograma da figura 9.

Figura 9 - Fluxograma da síntese do biofilme 100PS

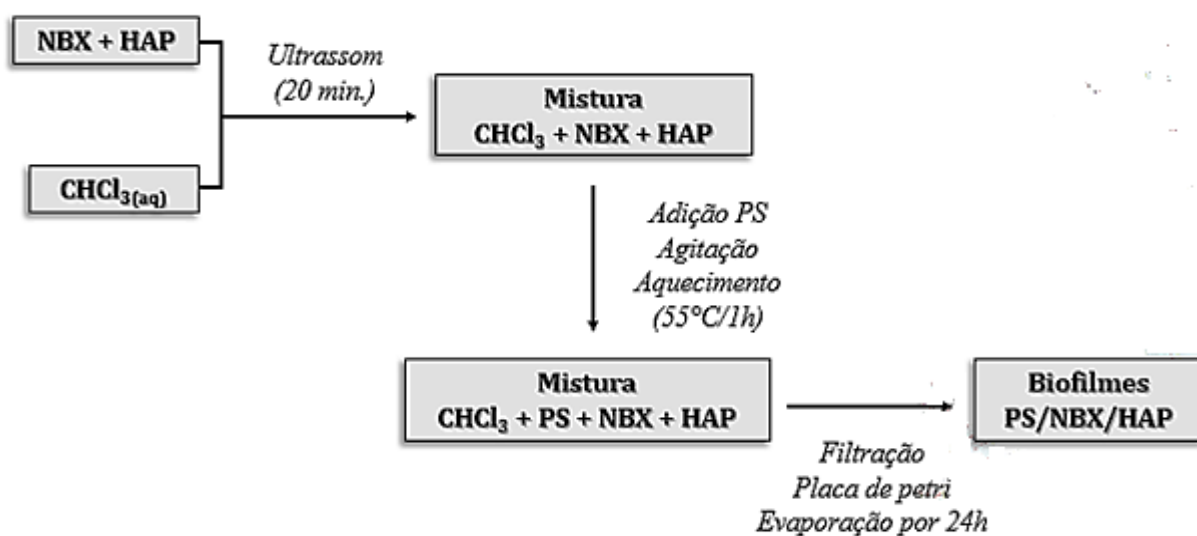


Fonte: Autor (2021)

Para síntese dos biofilmes PS/NBX/HAP nas diferentes proporções, seguiu as mesmas condições de síntese do biofilme puro 100PS, apenas incorporando a NBX e a HAP na etapa do ultrassom e depois sob agitação e aquecimento a 55°C, colocando

PS por último para dissolução durante o processo de síntese, como mostrado no fluxograma da figura 10.

Figura 10 - Fluxograma da síntese dos biofilmes PS/NBX/HAP em diferentes proporções.



Fonte: Autor (2021)

5 CARACTERIZAÇÃO DOS BIOFILMES

5.1 MICROSCOPIA ÓPTICA (MO)

Para este ensaio foi utilizado 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 (figura 11).

Figura 11 - Aparelho utilizado na análise de microscopia óptica



Fonte: Autor (2021)

5.2 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS - X (FRX)

Para esta análise foi utilizado um Espectrômetro por Fluorescência de Raios-X, modelo Epsilon 3 - XL da Panalytical, utilizando modo omnian, em ambiente de ar atmosférico e gás nitrogênio (figura 12). Segundo Rodrigues (2008), todos os metais ou óxidos não detectados em concentrações iguais ou superiores a 0,1% em massa devem ser citados.

Figura 12 - Aparelho utilizado na análise de Florescência de Raios - X



Fonte: Autor (2021)

5.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TG)

Os biofilmes foram submetidos a ensaios de TG em equipamento Shimadzu, modelo TGA-51. As condições da análise foram: faixa de temperatura de ensaio de 25°C a 1000°C, taxa de aquecimento 10°C. min⁻¹ e atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹ em porta amostra de platina (figura 13).

Figura 13 - Aparelho utilizado na análise térmica por TG



Fonte: Autor (2021)

5.4 ANALISE POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

As análises dos biofilmes por DSC foram realizados em equipamento da marca Shimadzu – Modelo DSC 60 PLUS, figura 14, 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 em atmosfera de nitrogênio a 50 mL.min⁻¹. Foi utilizado porta amostra de alumínio.

Figura 14 - Aparelho utilizado na análise térmica por DSC



Fonte: Autor (2021)

5.5 ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV-VIS)

Os espectros de absorção molecular no ultravioleta/visível foram obtidos em espectrômetro de duplo feixe SHIMADZU, modelo UV-2401 PC, figura 15. Foram preparadas soluções padrões de PS, NBX, HAP e das misturas PS/NBX/HAP em diferentes proporções usando clorofórmio como solvente. Para efetuar as análises, foram colocadas 5 a 10 gotas das soluções preparadas em cubetas de quartzo de 4 mL de capacidade com preenchimento da capacidade restante com solvente, em seguida, foram submetidas à análise espectral em faixa de varredura entre 900 a 190 nm.

Figura 15 - Aparelho utilizado na análise de absorção na região do Ultravioleta/Visível



Fonte: Autor (2021)

5.6 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO DOS BIOFILMES IMERSOS EM ÁGUA E SBF

O ensaio de intumescimento foi realizado em triplicata à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, seguindo procedimento proposto por Ferreira (2019) com adaptações. Utilizou – se amostras iniciais de mesma dimensão e massas entre 59 a 61 mg, aproximadamente.

Inicialmente, as amostras definidas dos biofilmes permaneceram incubados, em 50 mL de água e SBF, com $\text{pH} = 7,4$ sendo retiradas para pesagem após 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 24h, 48h, 120h, 144, 168 e 288h. Em seguida, nos intervalos pré determinados, as amostras eram retiradas e secas com papel de filtro para retirada do excesso de liquido da superfície seguida de pesagem. Ao término do experimento, os dados de pesagem foram comparados entre os diferentes períodos.

Segundo Gabas e Cavalcanti (2003) as características das cinéticas de intumescimento dos biofilmes representantes de todas as proporções foram determinadas a partir do cálculo do índice de intumescimento - $I_i(\%)$, equação 2.

$$I_i(\%) = \frac{m_i - m_s}{m_s} \times 100 \quad \text{(equação 2)}$$

em que m_i é a massa do filme após período de intumescimento e m_s representa a massa do filme seco.

5.7 ENSAIO DE PERDA DE MASSA DOS BIOFILMES QUANDO IMERSOS EM ÁGUA E SBF

De acordo com Bispo (2009), a degradação pode ser definida como a deterioração das propriedades de um material. As matrizes híbridas, destinadas à regeneração tecidual, são fabricadas com o objetivo de se degradarem na proporção que ocorre a regeneração do tecido danificado. Esta degradação ocorre preferencialmente por hidrólise. Os sinais mais comuns de que a degradação está ocorrendo, são a deterioração das propriedades mecânicas e redução da massa do material.

O ensaio de degradação *in vitro* foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-13 (1998), a qual avalia a degradação química de biomateriais poliméricos, segundo metodologia proposta por Nozaki e colaboradores (2012) com adaptações. As amostras foram previamente secas em estufa a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 horas e resfriadas à temperatura ambiente em dessecador. Cada amostra pesando entre 59 a 61 mg foram imersas individualmente em 50 mL de água destilada e 50 mL de SBF, separadamente por 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48, 120, 144, 168 e 288 horas.

A solução de Fluido Corporal Simulado (SBF) foi preparada segundo metodologia proposta por Kokubo e Takadama (2006) onde a solução foi preparada utilizando quantidade dos reagentes a fim de reproduzir a concentração de íons (mM) inorgânicos presentes no plasma humano. A tabela 4 mostra a concentração de íons de SBF em comparação com os encontrados no plasma de sangue humano.

Tabela 4 - Concentrações de íons de SBF em comparação com os encontrados no plasma humano.

	Concentrações de Íons (mM)								pH
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	
Plasma sanguíneo	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5	7,2 – 7,4
SBF	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5	7,4

Fonte: KOKUDO e TAKADAMA, (2006)

Após a realização do ensaio de degradação nos períodos pré determinados, as amostras foram removidas do meio, rapidamente secas com papel de filtro para retirada da água superficial, e imediatamente pesadas em balança analítica. No final, foram pesadas e a perda de massa em relação a massa inicial dos biofilmes foram avaliados de acordo com a equação 3, onde m_i é a massa seca inicial da amostra antes da degradação, m_f é a massa seca final após a degradação da amostra e M_{perdida} é a massa perdida no ensaio de degradação, em porcentagem.

$$M_{\text{perdida}} (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad \text{(equação 3)}$$

A média das massas perdidas, $M_{\text{perdida}}(\%)$, foram calculadas e então levantadas curvas de degradação dos biofilmes em função da proporção das amostras.

5.8 ENSAIO DE MOLHABILIDADE E TENSÃO SUPERFICIAL DOS BIOFILMES

5.8.1 Ângulo de contato e molhabilidade nos biofilmes.

A molhabilidade é uma importante propriedade de superfícies e está associada à tendência de um líquido espalhar-se ou não sobre a superfície. Do ponto de vista macroscópico, a molhabilidade de uma superfície é caracterizada por um parâmetro chamado ângulo de contato (θ), que é uma medida do quanto à água pode espalhar-se sobre a superfície (PIMENTEL, 2018).

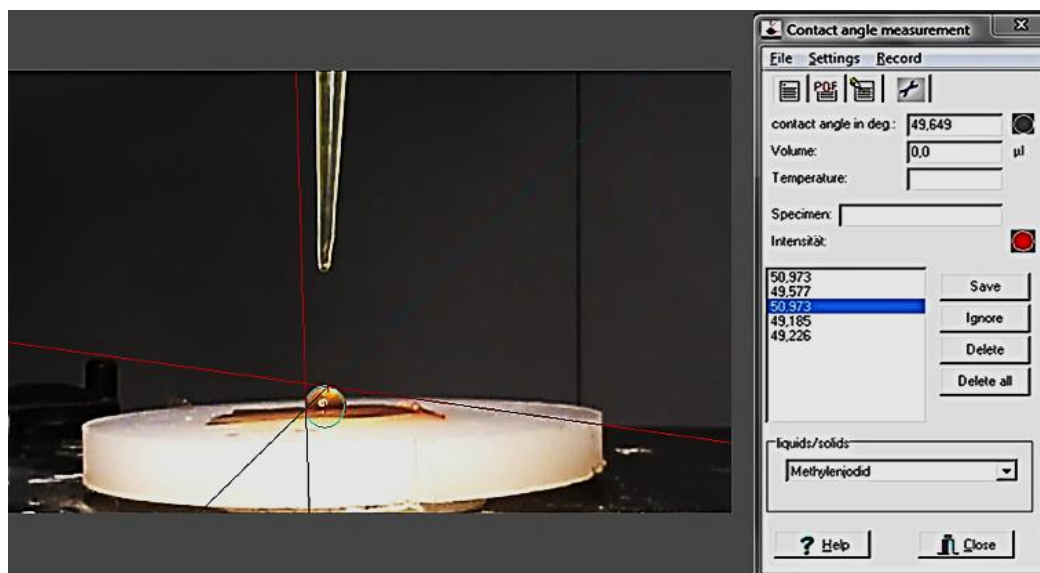
Segundo Vazirinasab, Jafari e Momen (2018), os termos hidroflicidade e hidrofobicidade são introduzidos para representar a afinidade relativa de gotículas de

água em superfícies sólidas. Em uma superfície hidrofílica, uma gotícula de água molha a maior superfície possível, entrando nos poros do material e saturando-o completamente. Por outro lado, uma gota de água é repelida por uma superfície hidrofóbica e, devido à ação de forças intermoleculares, assume uma forma quase esférica (VAZIRINASAB, JAFARI e MOMEN, 2018).

Para realização do ensaio da molhabilidade foi utilizado o método da gota séssil (PEREIRA et al. 2021). Para a realização da técnica foram utilizados três líquidos: água, formamida e glicerina. As amostras foram postas sobre uma base plana e em seguida foi gotejado 20 µL de cada um dos líquidos, primeiro foi realizada a análise com água em todas as amostras seguida da formamida e glicerina. Esse procedimento foi acompanhado e registrado em computador pelo programa Windows Movie Maker software.

Foram captadas e selecionadas imagens em sete tempos (00, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 segundos) para posteriormente análise no programa Surftens versão 4.7, onde foram realizadas cinco marcações em cada imagem, nos diferentes tempos e amostras para obtenção do ângulo de contato, figura 16.

Figura 16 - Obtenção do ângulo de contato dos biofilmes no programa Sulfens 4.7



Fonte: Autor (2021)

De acordo com Luz, Ribeiro e Pandolfelli (2008) o ângulo de contato depende do comportamento da água na superfície do material, por definição tem-se que: quando $\theta > 90^\circ$, não há o molhamento do sólido pelo líquido, ou seja, não ocorre o

espalhamento do líquido (superfície hidrofóbica) (Fig. 17a); quando $\theta < 90^\circ$, há o molhamento e o líquido se espalha espontaneamente (superfície hidrofílica) (Fig. 17b); quando $\theta \approx 0^\circ$, o líquido se espalha indefinidamente sobre o sólido, ou seja, o molhamento é total (Fig. 17c).

Figura 17 - Representação do ângulo de contato (a) maior do que 90° , (b) menor do que 90° e (c) espalhamento total.



Fonte: Autor (2021)

5.8.2 Energia de superfície (Tensão superficial) nos biofilmes

A energia de superfície é uma característica relevante no estudo dos biomateriais pois ela está associada a capacidade de outras substâncias interagirem/aderirem a superfície do material (PEREIRA et al., 2021). Para análise da energia de superfície utilizou-se os valores dos ângulos de contato encontrados juntamente com os valores da componente polar e dispersiva dos líquidos apresentados na tabela 5. A energia de superfície foi calculada utilizando a equação (3) de FOWKES (1963).

$$\left[\frac{1 + \cos\theta}{2} \right] \times \left[\frac{\gamma_l}{\sqrt{\gamma_l^d}} \right] = \sqrt{\gamma_s^p} \times \sqrt{\frac{\gamma_l^p}{\gamma_l^d}} + \sqrt{\gamma_s^d} \quad \text{(equação 4)}$$

Onde: γ , γ^p , γ^d , l e s são, respectivamente energia superficial, componente polar da energia de superfície, componente dispersiva da energia de superfície, líquido e sólido.

Tabela 5 - Valores energia de superfície, da componente polar e componente dispersiva da água, formamida e glicerol.

Tensão Superficial de Líquidos			
Líquidos	γ (mJ/m ²)	γ^p (mJ/m ²)	γ^d (mJ/m ²)
Água	72.8	51	21.8
Glicerol	63.4	26.2	37.2
Formamida	58.2	18.7	39.5

5.9 DETERMINAÇÃO DO pH E DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS BIOFILMES EM ÁGUA E SOLUÇÃO DE SBF

As medidas de pH foram realizadas com pHmetro digital portátil modelo pH – 1900 Instrutherm, figura 18, após período de 504 horas (21 dias) de imersão dos biofilmes em água e SBF em temperatura de 25°C ± 1°C.

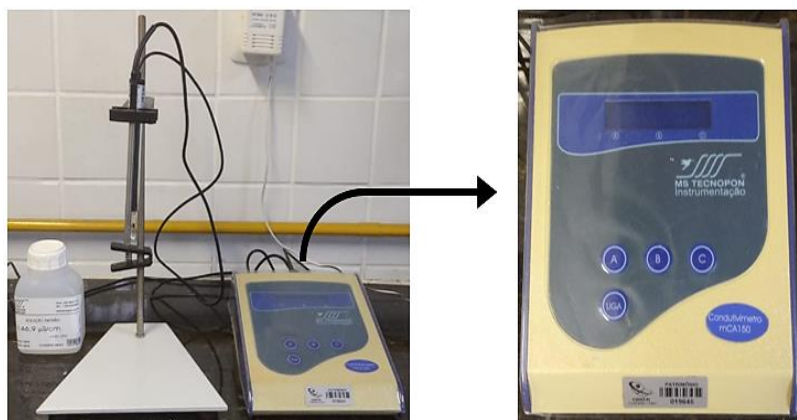
Figura 18 - pHmetro utilizado na determinação do pH em água e SBF



Fonte: Autor, (2021)

A condutividade elétrica foi realizada utilizando condutímetro modelo mCA 150 da MS TECNOPON instrumentação, figura 19, após período de 504 horas (21 dias) de imersão dos biofilmes em água e SBF em temperatura de 25°C ± 1,0°C.

Figura 19 - Condutímetro usado na medição da corrente elétrica em água e solução de SBF



Fonte: Autor, (2021)

A partir dos dados das medidas de pH e da condutividade elétrica em água e solução SBF foram feitas curvas tanto do pH quanto da condutividade elétrica em função das diferentes composições dos biofilmes confeccionados.

5.10 ENSAIO DE TOXICIDADE COM *ARTÊMIA SALINA*

Para o ensaio de toxicidade utilizou-se a *Artemia salina*, tipo de crustáceo marinho, organismo simples, que pode ser utilizado para determinar a letalidade de algum composto BALICA et. (2020).

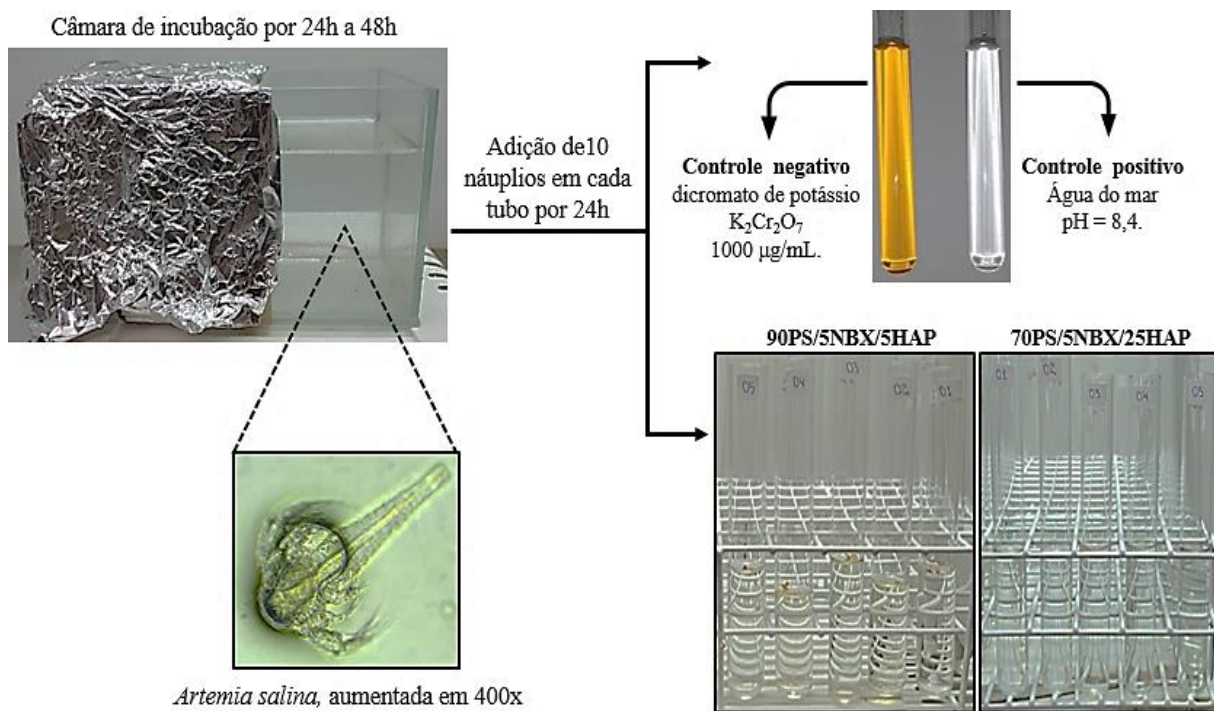
Com as amostras preparadas para a realização do teste de toxicidade aguda, seguindo o método proposto por Meyer e colaboradores (1982), os cistos foram incubados na água salina em uma câmara de incubação por 24 a 48h sob iluminação constante (lâmpadas de 20 watts) a temperatura média de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, figura 20.

Os ensaios foram realizados em quintuplicata onde 10 náuplios foram transferidos para cada tubo de ensaio contendo água do mar à uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ do material a ser testado Meyer et al. (1982) e Sousa et al. (2021) com adaptações.

Para o controle negativo foram usados apenas a mistura salina, e para o controle positivo uma solução de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a uma concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Após a incubação dos tubos por 24h, contaram-se os números de

náuplios (artêmias) mortos com auxílio de lupa e registrou a quantidade, a fim de calcular a toxicidade do material analisado.

Figura 20 - Fluxograma do ensaio de toxicidade com *Artêmia salina* dos biofilmes 90PS/5NBX/5HAP e 70PS/5NBX/25HAP



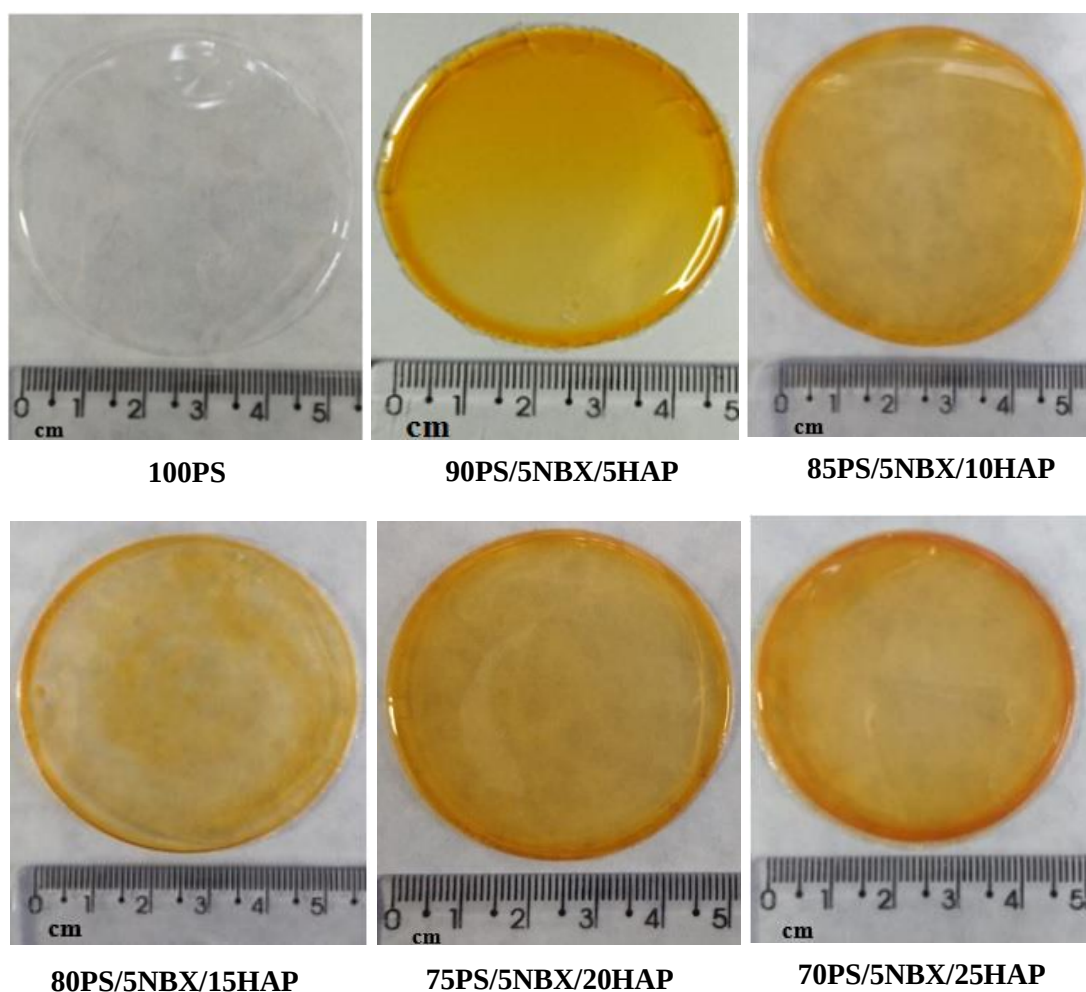
Fonte: Autor (2021)

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE DOS BIOFILMES DE PS/NBX/HAP EM DIFERENTES PROPORÇÕES

Os biofilmes de PS/NBX/HAP foram sintetizados a partir da dissolução dos componentes em clorofórmio PA em decorrência da solubilidade do PS e da NBX nesse solvente, ocorrendo a formação dos biofilmes pelo processo de evaporação de solvente. A figura 21 mostra algumas características, dentre elas, a homogeneidade, maleabilidade e coloração dos biofilmes sintetizados em diferentes proporções de PS, NBX e HAP.

Figura 21 - Análise macroscópica dos biofilmes PS/NBX/HAP sintetizados em diferentes proporções



Fonte: Autor (2021)

Os biofilmes 100PS, 90PS/5NBX/5HAP, 85PS/5NBX/10HAP, 80PS/5NBX/15HAP, 75PS/5NBX/20HAP e 70PS/5NBX/25HAP apresentam superfície lisa, homogênea, não apresentando diferenças na maleabilidade e nem no volume. Os biofilmes que possuem incorporação de NBX apresentam mudanças na coloração dos biofilmes sintetizados, porém, não ocorrendo alteração na maleabilidade das amostras.

Segundo Sousa e colaboradores (2016) ao sintetizar membranas de NBX e PHB constatou - se que a adição de norbixina ao PHB garantiu uma boa adesão entre os materiais e otimizou o aspecto da membrana. Também, de acordo com Farias e colaboradores (2020), a adição de sais de norbixina em filmes de alginato de sódio não influenciou significativamente a capacidade de intumescimento dos filmes, ou seja, não ocorreu o aumento de volume da amostra.

A incorporação da HAP provocou a formação de uma superfície homogênea, lisa e sem a presença de poros. Resultado contrário ao encontrado por Santos (2013) que produziu membranas à base de polihidroxibutirato e hidroxiapatita pelo método de prensagem e relatou que o material sintetizado apresenta uma superfície irregular, com a presença de poros distribuídos por toda superfície.

6.2 ANALISE DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS - X DO PS, NBX e HAP

A tabela 6 mostra a composição inorgânica presente no PS, onde a análise por FRX revelou a presença de, aproximadamente, 13% de componentes inorgânicos.

Tabela 6 - Composição da parte inorgânica no PS

Componentes	Concentração (%)
Mg	0,369
Si	1,798
P	1,019
Ca	1,565
Zn	1,030
Br	6,885

Fonte: Autor (2021).

A análise química qualitativa por espectrometria de Fluorescência de Raios - X, indica a presença dos elementos químicos Mg, Si, P, Ca, Zn e Br. A presença do Si na amostra de PS pode nos levar a acreditar em alguma possível contaminação durante os ensaios ou a algum erro instrumental, já que o Mg ($Z = 12$), Si ($Z = 14$) e Fósforo ($z = 15$) são elementos vizinhos na tabela periódica. Este fato pode provocar sobreposição de linhas espectrais dos elementos, em função das proximidades das energias de excitação dos elétrons, dificultando a análise. Este resultado está de acordo com o encontrado por FERNANDES (2012).

No caso do carotenoide NBX, a análise dos dados obtidos por FRX revelaram o percentual dos elementos inorgânicos apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Composição química inorgânica da NBX.

Componentes	Concentração (%)
Mg	0,450
Al	3,069
Si	3,392
P	0,462
S	16,457
Cl	0,737
K	67,170
Ti	1,128
Fe	6,837
Sn	0,115

Fonte: Autor (2021)

Deve-se ressaltar que a norbixina é extraída das sementes do urucum que são ricas em sais inorgânicos e considerar ainda que hidróxido de potássio (KOH) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) são utilizados em etapas do processo de obtenção da norbixina justificando os percentuais de 67,170% e 16,457% observados para o potássio (K) e para o enxofre (S), respectivamente. Este resultado está de acordo com Santos (2019) que observou no processo de produção da norbixina utilizada em sua pesquisa foi

utilizado o ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e não o ácido clorídrico (HCl) como proposto na literatura.

O resultado obtido por FRX para análise do pó de HAP gerado na síntese por neutralização ácido-base são apresentados na tabela 8. A HAP sintetizada apresenta baixas concentrações de contaminantes. De acordo com Rodrigues (2008) é importante salientar que todos os óxidos detectados em concentrações iguais ou superiores a 0,1% em massa devem ser citados.

Tabela 8 – Composição química da biocerâmica HAP

Componentes	Concentração (%)
MgO	2,014
Al_2O_3	0,117
P_2O_5	37,468
CaO	60,174
SrO	0,137

Fonte: Autor (2021).

A análise de FRX mostrou que o pó da HAP sintetizada não apresenta metais pesados, não pelo menos presente na análise de fluorescência, então ponto positivo para o material, pois tais metais são denominados perigosos. Este resultado está de acordo com o encontrado por Rodrigues (2008).

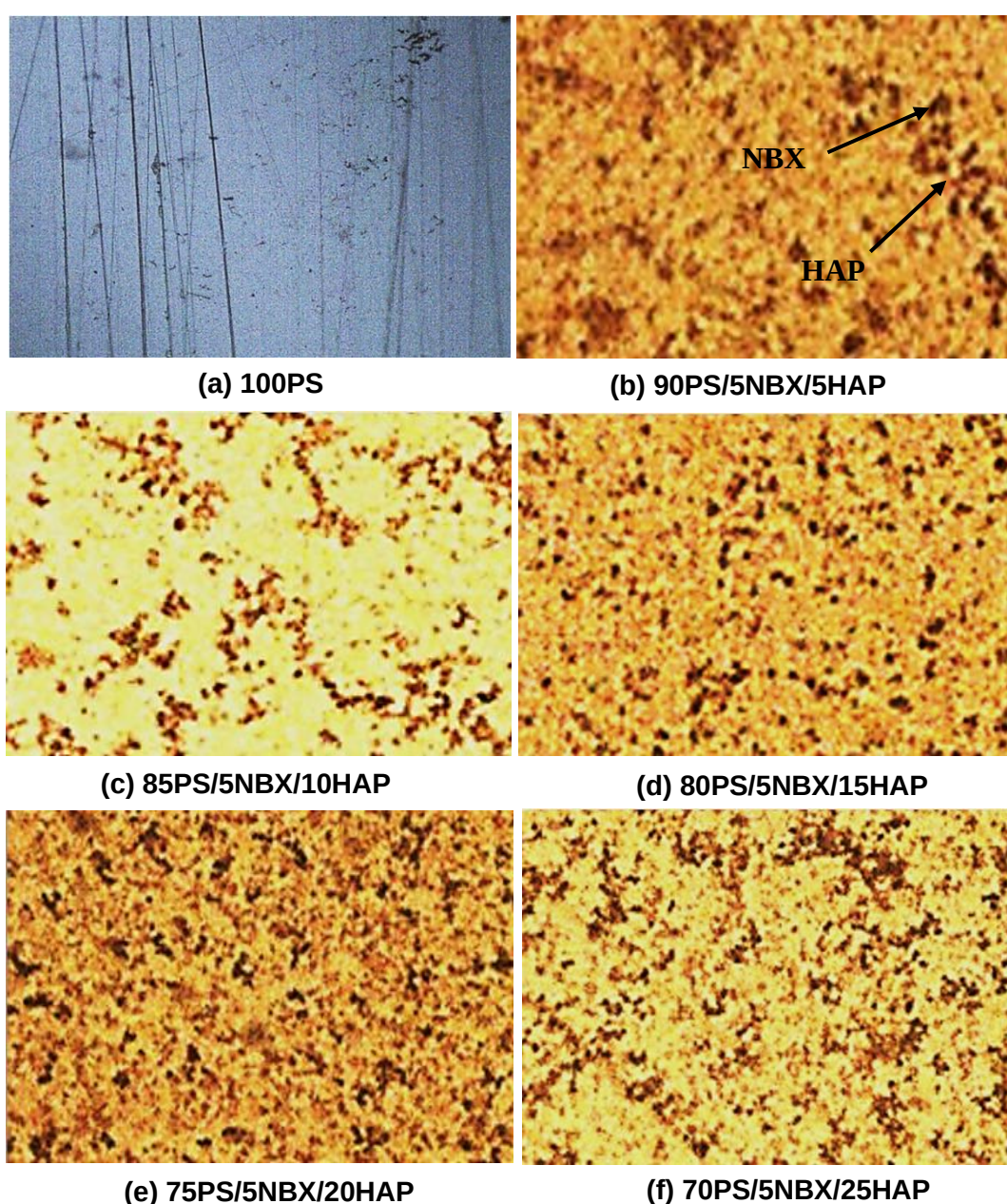
A análise confirma também a presença dos elementos químicos Ca e P que estão em maior quantidade na amostra. A partir dos resultados encontrados foi possível determinar a razão estequiométrica Ca/P da HAP sintetizada pelo método da neutralização, neste caso foi encontrado uma razão estequiométrica da hidroxiapatita ($\text{Ca/P} = 1,61$), sendo um dos principais fatores a ser controlado na obtenção desse fosfato de cálcio.

Segundo Galvão (2017) a diferença nos valores de Ca e P promove a decomposição do material, na cinética de crescimento de grãos e na cristalinidade do mineral. A hidroxiapatita que possuem uma razão Ca/P próxima de 1,67, valores determinados por FRX, são ditas estequiométricas.

6.3 MORFOLOGIA SUPERFICIAL DOS BIOFILMES EM DIFERENTES PROPORÇÕES

A partir das imagens microscópicas da superfície dos biofilmes feitas com aumento de 400X, figura 22, foi verificado a morfologia, formação de rachaduras, aglomerados e mudanças na matriz polimérica (PS) e nos biofilmes sintetizados em diferentes proporções.

Figura 22 - Imagens microscópicas, com aumento de 400X, da superfície dos biofilmes.



A microscopia do biofilme 100PS mostrou uma superfície plana e lisa, porém, com ranhuras, manchas e aglomerados de partículas de impurezas. Nos biofilmes com incorporação de NBX e HAP foi observado aglomerados escuros (NBX) e vesículas claras e nítidas (HAP).

A presença de ranhuras no biofilme 100PS pode estar relacionado ao método de processamento da amostra que ocorre por evaporação de solvente (GUIMARÃES e TANNOUS, 2014). Nos biofilmes sintetizados com a incorporação de NBX e HAP revelaram a presença de aglomerados escuros, vesículas claras e nítidas e alteração de cor.

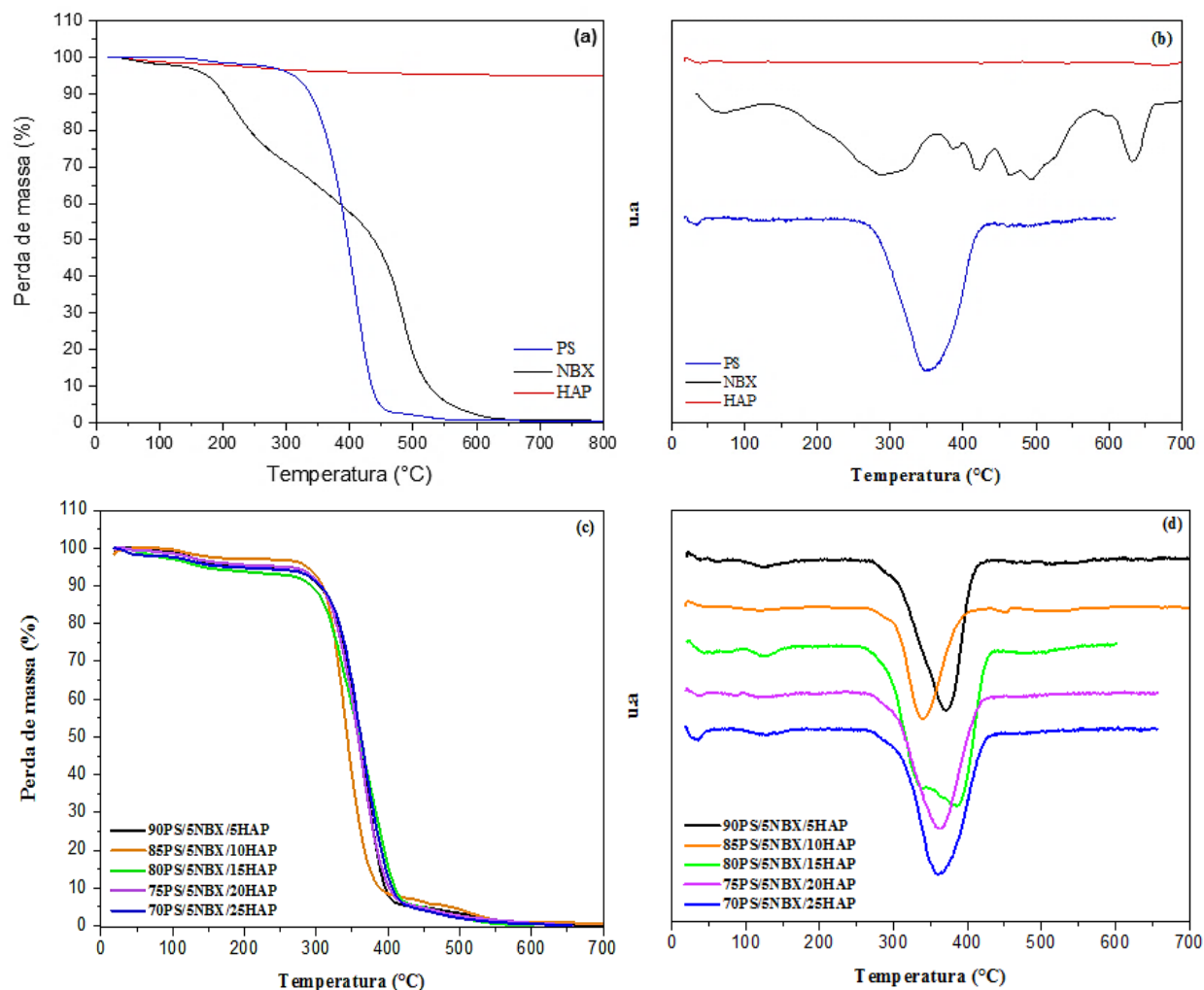
Segundo Silva Júnior e colaboradores (2021) a formação dos aglomerados escuros está associado à presença da norbixina que não sofreu degradação após o processo de esterificação e não alterou a cor do pigmento de vermelho para amarelo, e as vesículas claras e nítidas são devido a dispersão com inserção de HAP por toda a extensão dos biofilmes.

6.4 ANALISE TERMOGRAVIMETRICA DAS AMOSTRAS (TG)

A figura 23 mostra os resultados obtidos a partir da análise de TG e DTG tanto dos componentes PS, NBX e HAP quanto dos biofilmes sintetizados em diferentes composições.

De acordo com a análise das curvas de TG, figura 23(a) e DTG, figura 23(b), do PS, NBX e da HAP, foi observado que no biofilme 100PS ocorre a presença de três eventos térmicos envolvendo perdas de massa. O primeiro evento ocorre de 40 a 220°C com perda em massa de aproximadamente de 2% que está relacionada a perda de água superficialmente adsorvida no material. O segundo evento ocorre na faixa de temperatura de 270°C a 420°C apresentando perda de aproximadamente 91% em massa, segundo Botan e colaboradores (2011) e Jesus e colaboradores (2019), a partir deste ponto o material polimérico e suas cadeias sofreram degradação. O terceiro evento ocorre na faixa de temperatura de 430 a 535°C provocando perda de aproximadamente 5% que está relacionado ao monômero estireno que é o principal componente volátil produzido a partir da degradação térmica do PS sob atmosfera inerte, resultado este corroborado por Jesus et al. (2019).

Figura 23 - (a) TG e (b) DTG dos componentes PS, NBx e HAP; (c) TG e (d) DTG dos biofilmes sintetizados.



Fonte: Autor (2021).

Com relação a NBX, a curva termogravimétrica mostra quatro eventos térmicos. O primeiro evento ocorre de 40 a 160°C o que se observa perda de massa de 3,1% que é atribuída à evaporação de água adsorvida na superfície do material devido ao seu caráter higroscópico. O segundo evento ocorre de 160 a 340°C apresentando perda em torno de 21%. O terceiro evento ocorre de 340 a 570°C mostrando perda de 28% em massa. O quarto evento ocorre de 580 a 690°C apresentando perda de aproximadamente 6,6%. A partir de 700°C, ainda há a presença de aproximadamente 4% em massa restante. Estes resultados estão de acordo com as observações feitas por Silva Júnior e colaboradores (2021). Porém, com relação a HAP, por ser uma das cerâmicas mais estáveis, a TG mostra perda de massa em sua totalidade de

aproximadamente apenas 1%, resultado este que também é corroborado por Silva Júnior et al. (2021).

Para as curvas de TG figura 23(c) e DTG figura 23(d) dos biofilmes sintetizados em diferentes composições de PS, NBX e HAP, as curvas mostram que os biofilmes de composições 90PS/5NBX/5HAP, 75PS/5NBX/20HAP e 70PS/5NBX/25HAP apresentam três etapas de decomposição em massa, apresentando comportamento térmico semelhante ao biofilme 100PS.

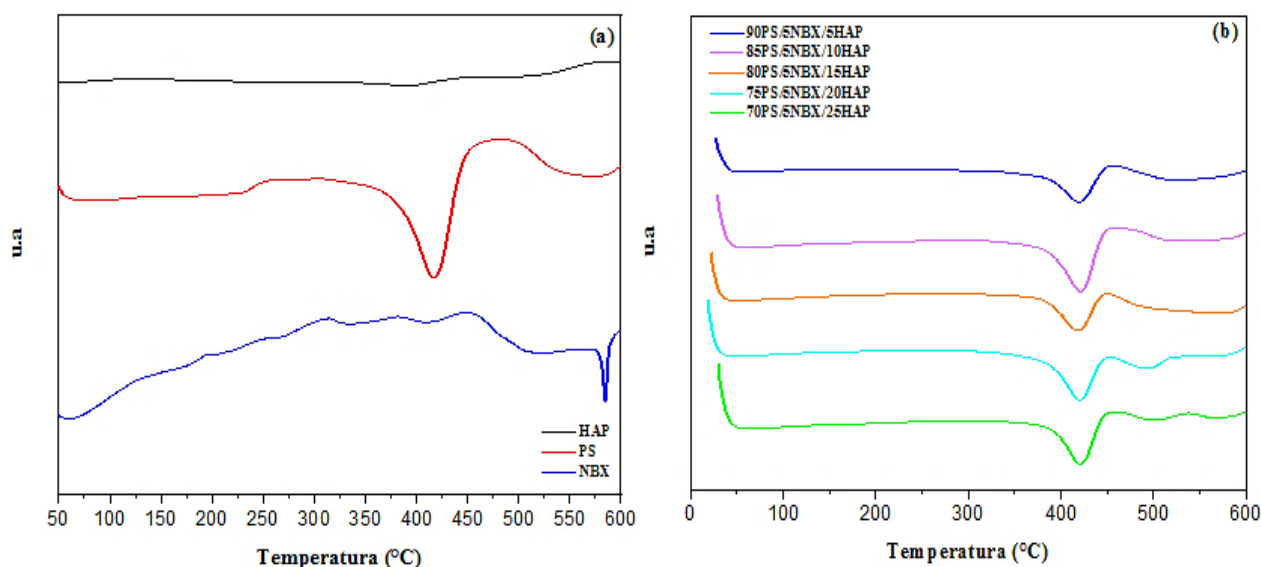
A primeira etapa de decomposição ocorre no intervalo de 30 a 220°C, o que está relacionado à saída de água adsorvida fisicamente na superfície do biofilme, o que ocorre até 100°C e a perda em massa após essa temperatura é explicada pela perda de água condensada de grupos hidroxilas (OH^-) presentes na HAP (SANTOS et al. 2019). A segunda e terceira etapas de degradação dos biofilmes estão relacionados a incorporação de NBX e HAP levaram a pequena redução da estabilidade térmica dos mesmos, o que foi também observado por Silva Júnior et al. (2021).

Contudo, o biofilme 85PS/5NBX/10HAP apresenta quatro etapas de decomposição, o que está relacionado a uma maior eliminação de tolueno, xileno e dimetila que ocorre durante a degradação da norbixina. E, o biofilme 80PS/5NBX/15HAP apresenta duas etapas de decomposição, o que está relacionado à adição de NBX e HAP que possuem uma degradação perfil ocorrendo em vários estágios, o que está de acordo com os resultados encontrados por Silva Júnior et al. (2021).

6.5 ANALISE POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC)

A análise térmica por DSC tem como objetivo mostrar mudanças de fases através do monitoramento do fluxo de calor em função da temperatura, independentemente da ocorrência ou não de variação de massa da amostra. A figura 24 mostra os resultados obtidos a partir das análises de DSC (a) para os componentes PS, NBX e HAP, e (b) dos biofilmes com incorporação de NBX e HAP em diferentes composições.

Figura 24 - Análise térmica por DSC (a) componentes PS, NBX, HAP e (b) biofilmes sintetizados em diferentes proporções.



Fonte: Autor (2021).

Analisando os dados térmicos das curvas de DSC apresentado na figura 24(a), observa-se que o PS apresenta um único evento endotérmico que ocorre na temperatura de 420°C, que está relacionado à decomposição do monômero estireno. Por ser amorfo, o PS não apresenta o pico relacionado à fusão do material o que também foi observado por Jesus et al., (2019).

Com relação a NBX, Perotti (2020) relata que a NBX isolada sofre quatro etapas de decomposição sob atmosfera oxidante devido à natureza exotérmica associada a todas as etapas e nenhum processo de fusão é observado, então, entre cerca de 170°C e até 300°C, a norbixina se decompõe liberando água (H₂O) e dióxido de carbono (CO₂).

No caso da HAP, a partir de 200°C a massa diminuiu gradativamente até uma temperatura de 500°C, provavelmente isso se deve à queima de solventes uma vez que o fluxo de calor, ainda que pequena mostra ser predominantemente exotérmico. Entre 550°C e 580°C, a massa diminuiu, mostrando um evento endotérmico característico o que pode estar associado à perda de água de hidratação. A partir 580°C a massa sofreu pequenas e gradativas diminuições da qual não se observou alteração significativa de massa, fato este corroborado por Santos et al. (2005).

Na curva de DSC apresentada na figura 24(b), observa-se que os biofilmes apresentam processos endodérmicos, com comportamento cristalino semelhante ao do PS. Os constituintes NBX e HAP incorporados pouco interferiram no comportamento do biofilme associados ao PS, porém, apresenta um significativo aumento da entalpia envolvida na degradação (JESUS et al. 2019). Segundo Oliveira e colaboradores (2013), a presença do PS não provoca diferenciação acentuada, pois o empacotamento e formação de cristais são dificultados pela incorporação do PS, fase amorfa da mistura, principalmente devido ao impedimento estérico do anel aromático do PS.

6.6. ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV – VIS)

O espectro UV-Vis dos componentes PS, NBX e HAP e dos biofilmes sintetizados em diferentes proporções estão mostrados na figura 25, onde foi observado as bandas fortes de absorção entre a região de comprimento de onda de 260, 270, 470 e 510 nm.

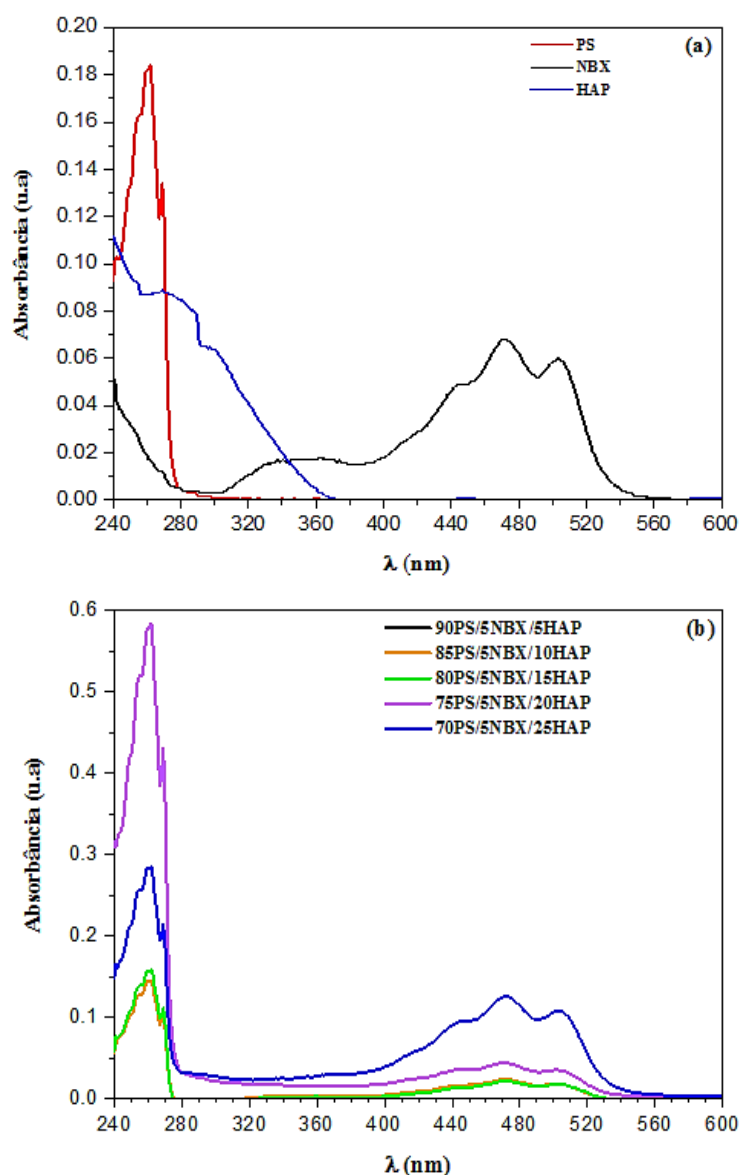
A figura 25(a) mostra o espectro de absorção de UV-Vis do PS onde foi possível observar uma banda forte entre 240 e 280 nm (máximo de 262 nm), que é atribuída à presença de um anel fenil em cada uma de suas unidades de repetição (THINH, BASAVARAJA e KIM, 2012). O espectro de absorção da NBX exibiu dois níveis máximos de absorbância em 473 e 504 nm. Segundo Ridwansyah, Wahyuni e Alimuddin, (2014) e Anantharaman, (2015) a norbixina tem uma absorbância específica em comprimento de onda máximo de 453 nm e 482 nm em solvente KOH a 0,5%.

Com relação a incorporação de HAP, o espectro de absorbância mostra absorção na região de 200 - 340nm, com uma banda de intensidade em 269 nm. A forte absorção abaixo de 400 nm está relacionado com a excitação de elétrons que ocorre facilmente em HAP calcinadas em temperaturas entre 900 e 1150°C (NISHIKAWA. 2001).

Já, com relação ao espectro de absorção Uv-Vis dos biofilmes, figura 25(b), devido ao acréscimo da HAP acompanhado da respectiva redução do PS, ocorre um aumento na absorção nas bandas em 471 e 502 nm, estas, específicas da NBX. Também, foi observado um aumento da absorção na banda em 262 nm, banda referente ao PS. Contudo, a banda de maior absorção relacionada à HAP encontra –

se sobreposta à banda referente ao PS, o que está de acordo com Silva Júnior et al. (2021) que relatou que a adição de NBX e HAP provoca alterações, principalmente na degradação do material, ocorrendo em vários estágios do processo.

Figura 25 - Espectro de absorção UV-Vis dos componentes PS, NBX, HAP (a) e dos biofilmes sintetizados em diferentes proporções (b).



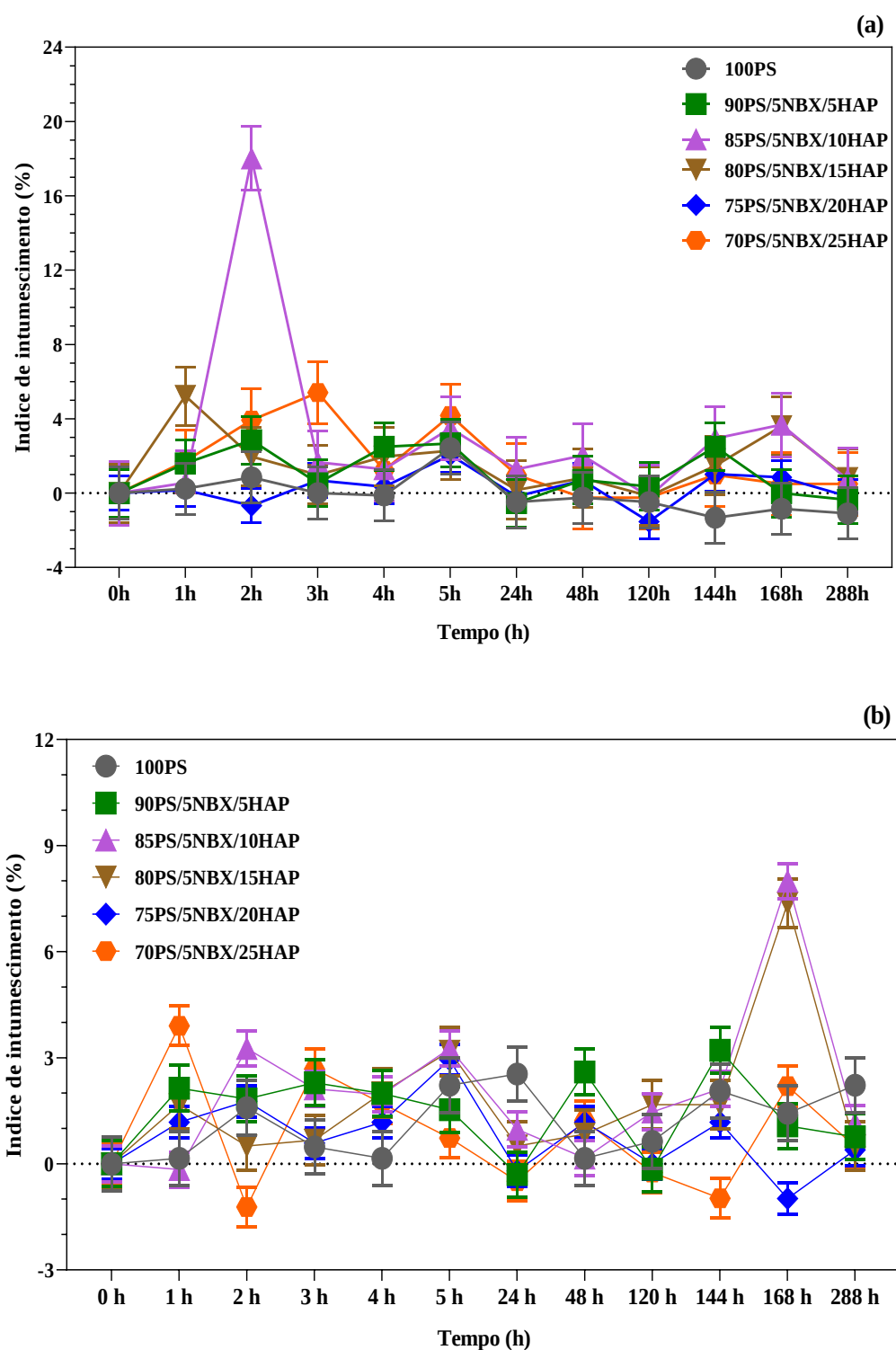
Fonte: Autor (2021).

6.7 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO DOS BIOFILMES IMERSOS EM ÁGUA E SBF

O ensaio de intumescimento foi realizado utilizando - se de água e SBF como solventes, para simular e entender como esses materiais reagiriam em contato com

os fluidos corporais. A figura 26 mostra as curvas levantadas de variação de massa, em porcentagem, para todas as amostras obtidas no ensaio de intumescimento na água, figura 26(a) e no SBF, figura 26(b)

Figura 26 - Ensaio de intumescimento dos biofilmes em água (a) e SBF (b).



A incorporação da NBX e HAP em diferentes proporções nos biofilmes teve o intuito de visualizar quais destas formulações teriam a melhor capacidade de intumescer. Porém, segundo Guimarães e colaboradores (2008) para o alcance de tal capacidade, fez-se necessário o uso de condições que reproduzissem as condições do meio fisiológico, obtendo assim resultados *in vitro* condizentes com o que ocorre no organismo.

Comparando as figuras 26 (a) e (b) observa – se que os biofilmes 85PS/5NBX/10HAP, 80PS/5NBX/15HAP e 70PS/5NBX/25HAP apresentam os maiores índices de hidratação, porém, nos biofilmes 85PS/5NBX/10HAP e 80PS/5NBX/15HAP houve o aumento no tempo para ocorrer o intumescimento em SBF. No caso do biofilme 70PS/5NBX/25HAP, ocorreu uma variação mínima do tempo transcorrido para que ocorresse o intumescimento tanto na água quanto no SBF.

Segundo Habitzreuter (2016), Rigo e Habitzreuter (2016) a incorporação de HAP altera o comportamento das amostras em meio aquoso, ou seja, a presença de cristais de HAP na rede polimérica diminui o intumescimento, reduzindo a afinidade por água dos polímeros, e também diminui o tempo em que ela resiste ao meio aquoso.

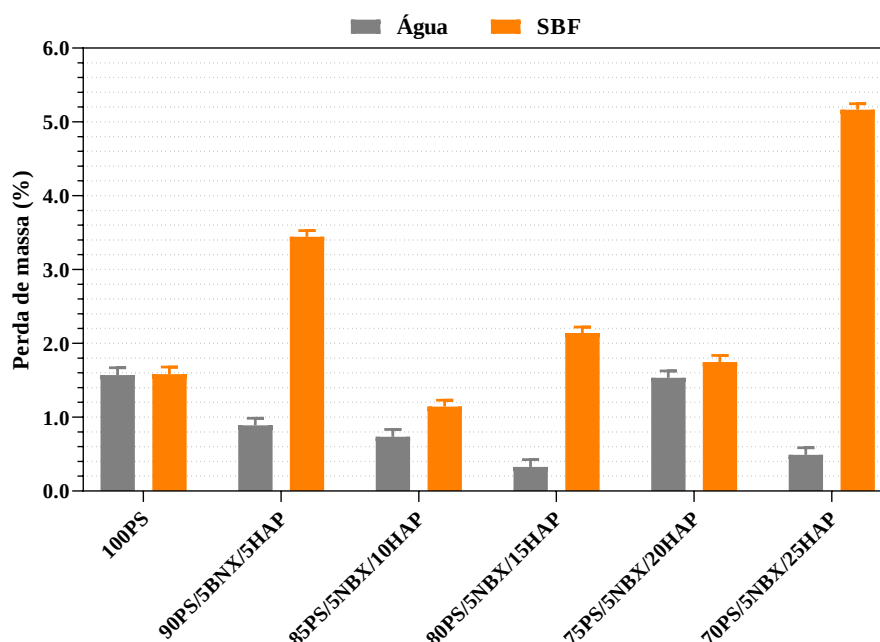
Também, de acordo com Ruivo (2020), a habilidade de absorção de água é um fator importante para materiais em regeneração tecidual, pois permite a absorção de fluidos corpóreos e a transferência de metabolitos e nutrientes e até mesmo migração de células responsáveis pela reconstrução do tecido lesionado.

Entretanto, Santos (2018) relata que elevadas taxas de absorção podem trazer consequências indesejáveis, como a redução da estabilidade estrutural do polímero, além da acelerada degradação e ataque de microrganismos.

6.8. ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DOS BIOFILMES QUANDO IMERSOS EM ÁGUA E SBF

A figura 27 ilustra os resultados obtido em função da perda de massa, tanto em água quanto em solução de SBF. Neste ensaio, observa – se que a perda de massa foi entre biofilmes contendo NBX e HAP incorporados. Também, nota – se que a massa dos biofilmes sofreu baixa perda de massa tanto em água quanto na solução de SBF, em relação à massa inicial.

Figura 27 – Ensaio de degradação dos biofilmes em água e solução de SBF



Fonte: Autor (2021)

Os biofilmes possuem em suas composições o polímero PS, um polímero não biodegradável, onde suas moléculas apresentam anéis aromáticos, que atraem os anéis das outras moléculas, fazendo com que ele fique mais quebradiço e menos flexível, evidenciado pelos valores próximos da perda de massa do PS tanto em água quanto em SBF. Além disso, a incorporação da NBX e da HAP nos biofilmes propiciaram maior degradação em SBF que apresentaram as maiores porcentagens de perda de massa em relação aos biofilmes imersos em água, ou seja, os biofilmes sofreram maior degradação em SBF.

Além disso, Guastaldi e Aparecida, (2010) relataram que nos organismos vivos, a facilidade de substituições catiônicas e aniônicas faz com que a HAP atue como reserva de cálcio e fósforo e um sistema regulador de diferentes íons nos líquidos corporais por meio de sua liberação ou armazenamento.

Segundo Sabir, Xú e Li, (2009) relataram que a partir da incorporação de vidro bioativo nos filmes de poliuretano foi observado ligeiro aumento da degradação do filme em SBF. O tempo de degradação de biomateriais pode variar de acordo com a aplicação desejada, obtendo-se desde materiais que se degradam rapidamente para a liberação de fármacos, por exemplo, até materiais que demoram um tempo maior para se degradar, como materiais para reparo de tecidos.

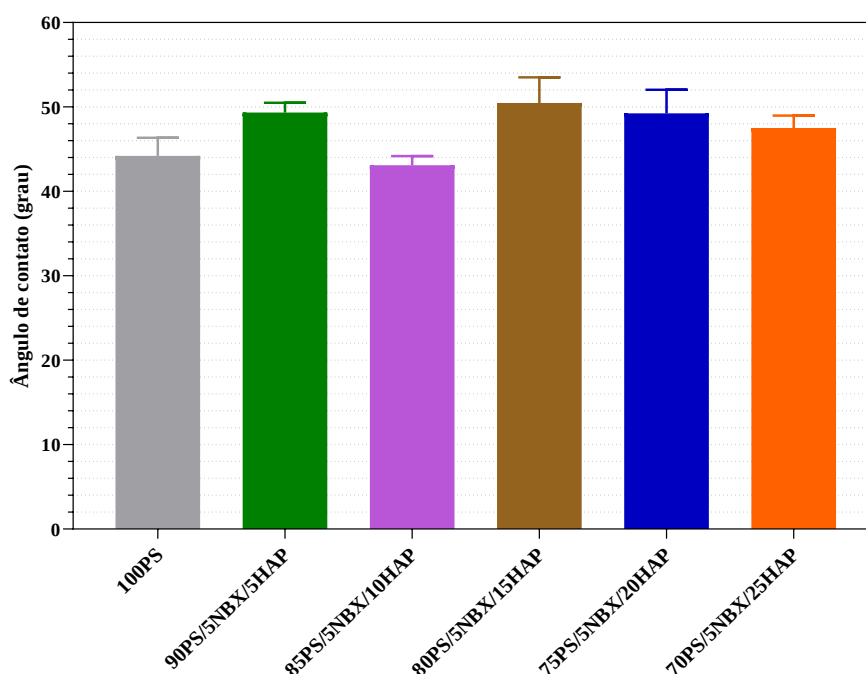
No entanto, Baltazar (2016) ao realizar estudos com HAP e colágeno, relatou que a presença de partículas de HAP nas membranas contendo colágeno apresentaram sempre maior perda do que as membranas preparadas sem HAP. Este comportamento pode ser explicado admitindo que a presença da HAP altera o empacotamento do colágeno na membrana, conferindo maior porosidade à membrana e aumentando o grau de exposição do colágeno ao sobrenadante, facilitando assim a sua degradação.

6.9 ENSAIO DE MOLHABILIDADE E TENSÃO SUPERFICIAL DOS BIOFILMES

6.9.1 Ângulo de contato e molhabilidade nos biofilmes

Na figura 28 Tem - se a dinâmica do teste de molhabilidade dos biofilmes em água onde todos os biofilmes sintetizados apresentaram hidrofilicidade, pois apresentaram $\theta < 90^\circ$, conforme classificação de Luz, Ribeiro e Pandolfelli (2008).

Figura 28 - Dinâmica da molhabilidade para os biofilmes durante o tempo de 60s.



Fonte: Autor (2021)

Nos resultados obtidos ficou constatado a redução da molhabilidade à medida que ocorreu o aumento da carga da biocerâmica (HAP), com exceção do biofilme 85PS/5NBX/10HAP que apresentou a maior hidrofiliabilidade dentre aqueles que possuem NBX e HAP incorporados.

Apesar da hidrofobicidade por parte do PS, a incorporação de carga de reforço permite um molhamento eficiente da matriz polimérica, melhorando a adesão entre a carga de reforço (NBX e HAP) e a matriz (PS). Além disso, a interação depende da natureza química e da ligação física entre carga/matriz (BORSOI et al. 2011).

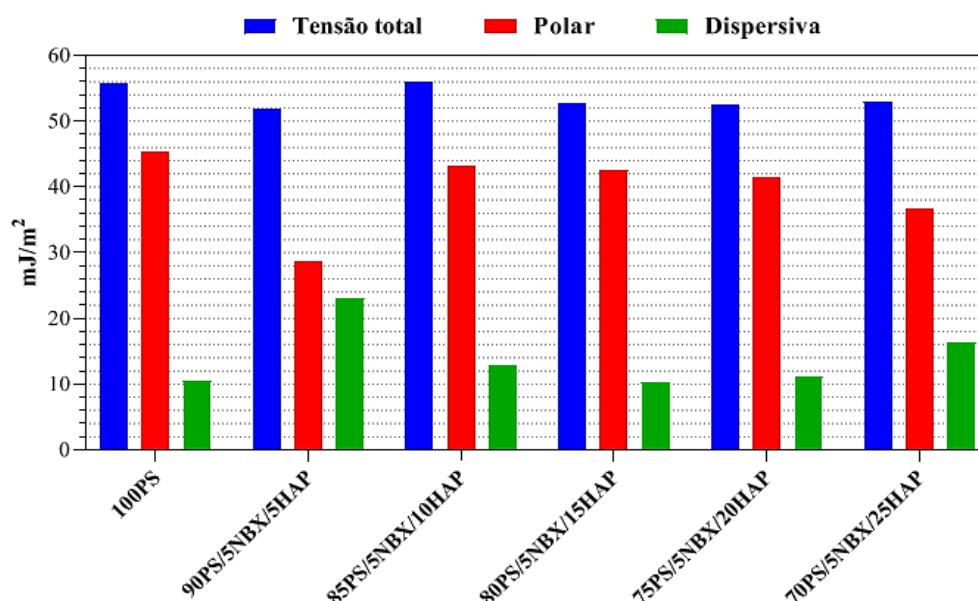
Tanto Sousa e colaboradores (2017) quanto Toledo (2010) observaram uma tendência à diminuição da hidrofiliabilidade das amostras de acordo com o aumento da carga de HAP. Dessa forma, a adição da HAP tornou as membranas menos hidrofílicas e com isso, pode – se confirmar que os biocompósitos tem comportamento receptível com o meio biológico. Além disso, Zheng e colaboradores (2014) relataram que as superfícies hidrofílicas podem aumentar a afinidade com as células contribuindo para a proliferação celular.

6.9.2 Energia de superfície (Tensão superficial) nos biofilmes

Na Figura 29 é mostrada as componentes de tensão (total, polar e dispersiva) dos biofilmes com base nos valores dos ângulos de contato determinados a partir do ensaio de molhabilidade. No caso da avaliação da tensão superficial dos biofilmes, Mâcedo (2013) relata que a energia de superfície dos biomateriais afeta as interações biológicas como: a adesão, a proliferação e a morfologia celular.

Ao comparar os biofilmes sintetizados foi possível observar que os biofilmes 90PS/5NBX/5HAP e 70PS/5NBX/25HAP apresentam a componente dispersiva maiores em relação ao biofilme 100PS. Com relação a componente polar ocorre sua diminuição à medida que ocorre o aumento da carga da biocerâmica (HAP). O decréscimo da componente total está relacionado com a incorporação da HAP que por sua vez provoca o decréscimo da componente polar o que pode estar relacionado ao caráter hidrofílico da HAP. Isso provavelmente ocorre devido as interações dos grupos polares da HAP com a superfície externa (SIQUEIRA, 2018).

Figura 29 - Energia de superfície dos biofilmes em água (componente total, polar e dispersiva).



Fonte: Autor (2021)

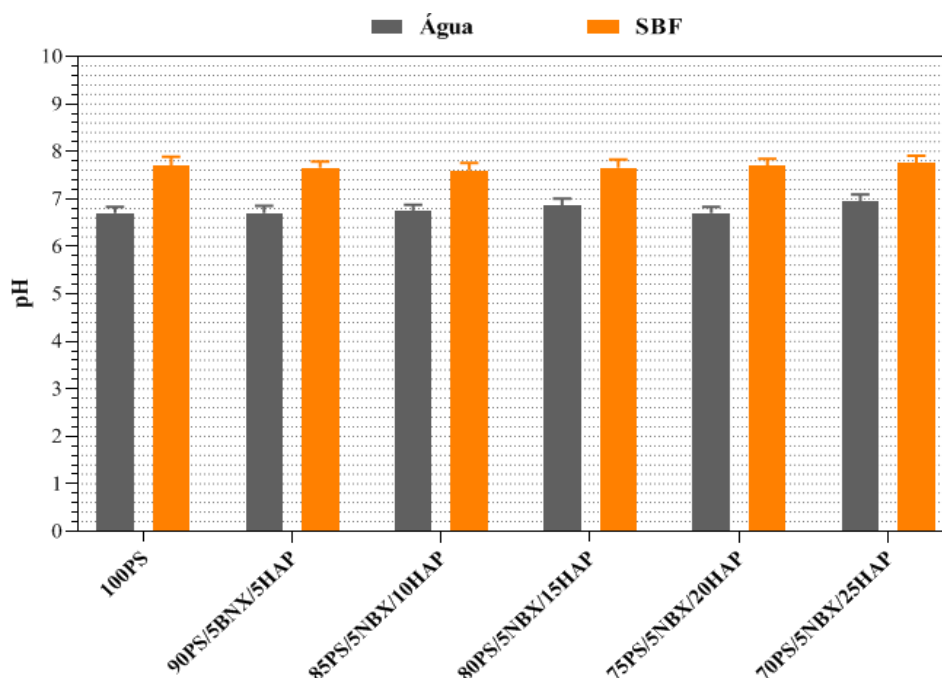
Nos biofilmes sintetizados, houve a predominância da componente polar em relação a componente dispersiva. De acordo com Macêdo e colaboradores (2010) essa predominância da componente polar está relacionada com a afinidade do material com a água, indicando, portanto, a hidrofiliabilidade do material. Também, segundo Ponsonnet (2003) essa predominância da componente polar em relação à componente dispersiva é importante na confecção de biomateriais cicatrizantes, pois a alta polaridade e energia de superfície têm efeito positivo na adesão e proliferação celular.

6.10 MEDIÇÃO DO PH E DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DOS BIOFILMES EM ÁGUA E SBF

6.10.1 Medidas de pH dos biofilmes imersos em água e SBF

Na figura 30 estão ilustradas as medidas de pH que foram obtidos após imersão dos biofilmes tanto em água e quanto na solução de SBF por um período de 504 horas, ou seja, 21 dias, em temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Figura 30 - Valores do pH dos biofilmes imersos em água e SBF



Fonte: Autor (2021).

Os biofilmes imersos em SBF apresentam os maiores valores para o pH em relação à imersão em água. Também foi observado que não ocorreu variação nos valores de pH, principalmente, nos imersos em SBF, visto que a solução de SBF é um sistema tamponado apontando as amostras como estáveis aos testes de citotoxicidade.

Segundo Oliveira, Andrade e Pandolfelli (2016), a ocorrência do aumento do pH dos biofilmes quando em contato com SBF sofreu menor variação do pH do meio devido a solução SBF apresentar entre seus constituintes o tampão tris, $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$. Maiores aumentos de pH foram verificados na presença de óxido de zinco e principalmente da HAP.

Contudo, Oliveira, Andrade e Pandolfelli (2016) mostraram que uma importante característica que deve ser avaliada na aplicação de biomateriais trata-se da interação físico-química da superfície desses materiais em contato com soluções simuladoras de fluido corporal. A liberação de íons OH^- é parcialmente tamponada pelo líquido sobrenadante resultando em aumento moderado do pH. Esse aumento no pH acentua a supersaturação da solução SBF com relação a apatitas o que promove a degradação das amostras.

Por outro lado, Pompeu e colaboradores (2013), relataram que menores níveis de pH alcançados indicam vantagens quanto as aplicações em ortopedia. Nestas aplicações, um requisito ideal para reparação óssea é a de desenvolver um pH neutro (6,5 - 8,5) durante e depois da aplicação para evitar efeitos citotóxicos.

Também, Lemos e colaboradores (2012) mostraram que a incorporação de HAP em matriz polimérica de quitosana não provocou grande variação de pH na solução de SBF, o que apontou as amostras como estáveis aos testes de citotoxicidade.

6.10.2 Condutividade elétrica dos biofilmes em água e SBF

Observa-se na figura 31 que os biofilmes imersos em água e solução SBF apresentam baixa condutividade elétrica. Além disso, nas amostras imersas em água, figura 31(a), ocorre variação significativa da condutividade elétrica à medida que foi ocorrendo o aumento da incorporação da HAP. No caso das amostras imersas em SBF, figura 31(b), não foi possível observar a variação significativa na condutividade elétrica pelo fato da solução de SBF ser um sistema tamponado.

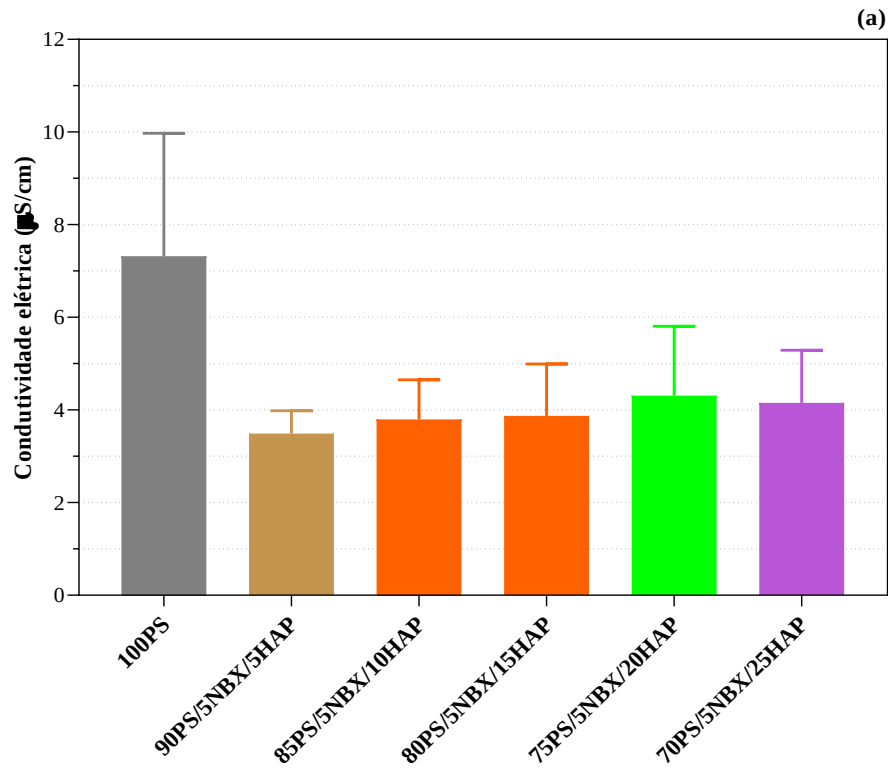
A figura 31(a) mostra um alto valor de condutividade elétrica apresentada pelo biofilme de 100PS em água fato este que é explicado pela presença de ligações C=C conjugadas. Segundo França e Dall'Antônia (2007) essa conjugação permite que seja criado um fluxo de elétrons em condições específicas. Os elétrons π da dupla ligação podem ser facilmente removidos ou adicionados para formar um íon, que, neste caso, é polimérico.

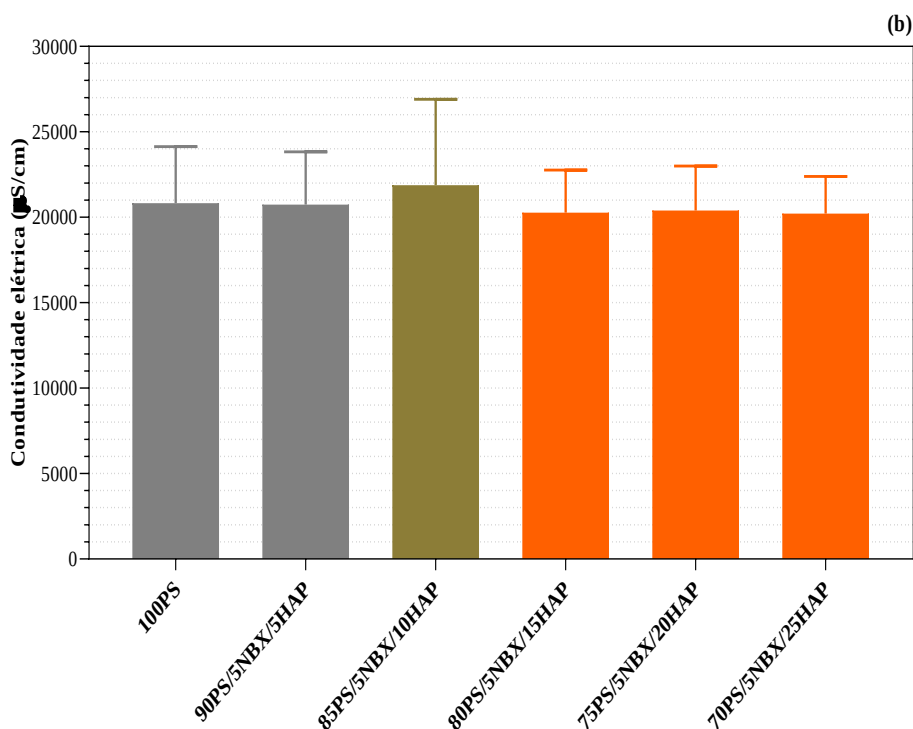
Além disso, o valor da condutividade elétrica é menor em água do que na solução de SBF, figura 31(b), este fato está relacionado com a presença dos íons Ca^{2+} e OH^- provenientes dos biofilmes. Segundo Pompeu et al. (2013) os íons de Ca^{2+} liberados são pouco solúveis em fluidos biológicos resultando na precipitação de HAP na solução. Dessa forma, o consumo de Ca^{2+} e OH^- para formação de HAP pode explicar o fato de a condutividade não ter aumentado em SBF como aumentou na água.

Por outro lado, de acordo com Pelacani e Vieira (2003) relataram que condutividade de um material determina sua viabilidade para que este possa ser aquecido eletricamente. Se a condutividade for muito baixa, provavelmente será

imprópria, no entanto, a condutividade pode afetar a estrutura da célula e aumentar a mobilidade iônica.

Figura 31 - Condutividade elétrica dos biofilmes em (a) água e; (b) SBF





Fonte: Autor (2021)

6.11 ENSAIO DE TOXICIDADE DOS BIOFILMES COM *ARTÊMIA SALINA*

O ensaio de toxicidade com *Artêmia salina* foi realizado no biofilme de maior proporção polimérica/menor proporção da cerâmica (90PS/5NBX/5HAP) e no biofilme de menor proporção polimérica/menor proporção da cerâmica (70PS/5NBX/25HAP), os náuplios foram expostos por 24h e avaliados o seu potencial de mortalidade de acordo com a tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Análise da toxicidade do biofilme 90PS/5NBX/5HAP

Amostras	01	02	03	04	05	$\bar{x}$	CN	CP
n	10	10	10	10	10	10	10	10
n ₋	0	2	0	0	0	0,4	0	10
n ₋ (%)	0	20	0	0	0	-	0	100

n = número de Nauplios; n₋ = mortes; n₋(%) = porcentagem; $\bar{x}$ = média; CN = controle negativo; CP = controle positivo.

Tabela 10 - Análise da toxicidade do biofilme 70PS/5NBX/25HAP

Amostras	01	02	03	04	05	$\bar{x}$	CN	CP
----------	----	----	----	----	----	-----------	----	----

n	10	10	10	10	10	10	10	10
n₋	0	0	0	1	0	0,2	0	10
n₋ (%)	0	0	0	10	0	-	0	100

n = número de Nauplios; n₋ = mortes; n₋(%) = porcentagem; $\bar{x}$ = média; CN = controle negativo; CP = controle positivo.

Analisando os dados das tabelas 9 e 10 houve a ocorrência da mortalidade de 20% na solução contendo o biofilme 90PS/5NBX/5HAP e 10% na solução contendo o biofilme 70PS/5NBX/25HAP, esse valor não classifica o material como um material tóxico nessas concentrações.

De acordo com Meyer e colaboradores (1982), quando a mortalidade desses náuplios está abaixo de 50% para uma concentração de 1000 µg/mL do material a ser testado, esse material é considerado atóxico.

Dessa forma, a taxa de mortalidade observada pode estar associada ao bromo, uma substância que possui certo grau de toxicidade, identificada na análise de FRX do PS. Segundo Rabelo (2000) ao PS é adicionado retardante de chama para fins de segurança, o que justifica a presença do elemento químico bromo, que é um elemento que apresenta toxicidade.

O teste de toxicidade feito com *Artêmia salina* é um ensaio biológico bastante usado para uma avaliação preliminar de toxicidade para compostos com atividade biológica (BELICA et al. 2020). As amostras dos biofilmes testados mostraram baixa toxicidade, com quantidade de náuplios vivos acima de 60% em todas as concentrações, para um tempo de observação de 24h.

7 CONCLUSÃO

A análise macroscópica revelou que os biofilmes apresentam uma superfície homogênea, lisa, com mudança de coloração, porém, sem diferenças na maleabilidade e no volume. No caso da análise microscópica, os biofilmes apresentaram aglomerados escuros e grânulos brancos, o que evidencia a incorporação de NBX e HAP.

A partir das análises térmicas foi observado que o processo de decomposição dos biofilmes ocorreu em temperaturas próximas mostrando a estabilidade térmica mesmo após o aumento da carga de HAP seguida de redução do PS.

O ensaio de degradação das amostras em água e solução SBF revelou que a incorporação de uma maior carga de HAP permitiu ao biofilme intumescer em menor tempo, porém, com comportamentos distintos em relação à perda de massa, sendo maior em SBF e menor em água.

Os biofilmes apresentaram caráter hidrofílico o que favorece a interação com o meio biológico, esta característica abre uma perspectiva de síntese dos biofilmes para um posterior contato com o corpo humano.

Com relação à estabilidade química, as amostras não apresentaram variação de pH na solução de SBF. Além disso, desenvolveram pH neutro nos dois meios analisados provocando a baixa variação da condutividade elétrica nos dois casos.

O ensaio de toxicidade revelou que as amostras possuindo cargas mínima e máxima da biocerâmica HAP não provocaram a mortalidade de 50% dos náuplios de *Artêmia salina*.

Contudo, os dados obtidos a partir das análises *in vitro* para aplicação *in vivo* devem ser realizadas com cuidado, pois o organismo vivo interage com o biomaterial de maneira muito mais complexa, envolvendo inúmeros fatores químicos, físicos e biológicos.

SUJESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Síntese de biofilmes com maior incorporação de carga de biocerâmica HAP com respectiva diminuição da carga do plastificante PS;
- ✓ Realização dos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade dos biofilmes por meio de testes *in vitro*;
- ✓ Realização de ensaios biológicos (tóxico, citotóxico e genotóxico) dos biofilmes por meio de teste *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R. S., RIBEIRO, I. I. A., SILVA, M. H. P., ROCHA, D. N., MIGUEL, F. B. e ROSA, F. P. Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 13, n. 3, pp. 331 - 336, 2014.
- ALOTAIBI, M. H., EL-HITI, G. A., YOUSIF, E., AHMED, D. S., HASHIM, H., HAMEED, A. e AHMED, A. Evaluation of the use of polyphosphates as photostabilizers and in the formation of ball-like polystyrene materials. **Journal of Polymer Research**, v. 26, n. 161, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1829-y>.
- AMADEI, S. U., SILVEIRA, V., PEREIRA, A. C., CARVALHO, Y. e ROCHA, R. F. Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial [online]**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, pp. 5 - 12, 2006. <https://doi.org/10.1590 / S1676-24442006000100003>.
- ANANTHARAMAN, A., PRIYA, R., HEMACHANDRAN, H., SIVARAMAKRISHNA, A., BABU, S. e SIVA, R. Studies on interaction of norbixin with DNA: Multispectroscopic and in silico analysis. **Spectrochimica acta Part A Molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 144, pp. 163 - 169, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.02.049>.
- ALVES, A. M. M., SOUSA, R. C., CARVALHO, T. M. P., CARVALHO, L. F. M., FILHO, A. L. M. M., MONTE, S. M., FERREIRA, D. C. L., FONSECA, K. M., OLIVEIRA, D. S. e VIANA, V. G. F. Avaliação do efeito genotóxico da membrana

polihidroxitirato/norbixina/etilenoglicol. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 77 - 87, 2016.

BALICA, N. M. P., CAMPELO, T. S., SILVA FILHO, E. C., SANTOS, M. R. M. C. Zircônia pigmentada obtida pelo método Pechini para aplicações odontológicas. **Revista Matéria**, v. 25, n. 4, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620200004.1175>.

BALTAZAR, J. M. A. **Degradação de membranas modificadas para regeneração de tecido periodontal**. Dissertação (Mestrado em Materiais e Dispositivos Biomédicos) - Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica, Universidade de Aveiro. Aveiro, 122p. 2016.

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

BORSOI, C., SCIENZA, L. C., ZATTERA, A. J., e ANGRIZANI, C. C. Obtenção e caracterização de compósitos utilizando poliestireno como matriz e resíduos de fibras de algodão da indústria têxtil como reforço. **Polímeros**, v. 21, p. 271-279, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000055>.

BOTAN, R., NOGUEIRA, T. R., LONA, L. M. F. e WYPYCH, F. Síntese e caracterização de nanocompósitos esfoliados de poliestireno: hidróxido duplo lamelar via polimerização in situ. **Polímeros [online]**, v. 21, n. 1, pp. 34 - 38, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000017>.

CAMARGO, C. L., MORTARI, S. R., VOLKMER, T. M., CAMARATTA, R., MACHADO, F. M., RODRIGUES JR, L.F. e SANTOS, L.A. Síntese de hidroxiapatita por precipitação em diferentes temperaturas. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica–CBEB**. 2014.

COSTA, A. C. F. M., LIMA, M. G., LIMA, L. H. M. A., CORDEIRO, V. V., VIANA, K. M. S., SOUZA, C. V. e LIRA, H. L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos – REMAP**, v. 4, n. 3, pp. 29 - 38, 2009.

COSTA, B. D., CAMARGO, N. H., OLESKOVICZ, N., GAVA, A., DALLABRIDA, A. L., REGALIN, D., LIMA, M. P. A. e MORAES, A. N. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**. Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, pp. 177 - 187, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000200015>.

COSTA, R. C. C., MIGUEL, F. B., ROSA, F. P. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 4, n. 1, pp. 70 - 76, 2005. <https://doi.org/10.9771 / cmbio.v4i1.4178>

FALEIROS - SANTOS, M. H., RIBEIRO, A. M., MESQUITA, W. D. e GURGEL, M. F. C. Evolução dos Biomateriais na Ortopedia e Cardiologia. **Revista Processos Químicos**, v. 13, n. 26, pp. 35 - 42, 2020.

FARIAS, Y. B., COUTINHO, A. K., ASSIS, R. Q. e RIOS, A. O. Biodegradable sodium alginate films incorporated with norbixin salts. **Journal of Food Process Engineering**. v. 43, n. 2, 2020. <https://doi.org/10.1111/jfpe.1334>

FERNANDES, G. A. Desenvolvimento de espumas semirrígidas de poliestireno com propriedades oxi-biodegradáveis. **Tese (Doutorado em Engenharia Química)** - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 120p. 2012.

FERREIRA, M. S. Monômeros sintetizados a partir de óleos vegetais para ROMP catalisada por complexos de rutênio: estudo térmico, microestrutural e de intumescimento dos polímeros obtidos. **Tese (Doutorado em Ciências)** – Instituto de química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 97p., 2019. <https://doi.org/10.11606/T.75.2019.tde-18032019-164935>

FIGUEIREDO, A. S., FAGUNDES, D. J., NOVO, N. F., INOUE, C. M., TAKITA, L. C. e SASSIOTO, M. C. P. Devitalized bovine bone, porous coralline hydroxyapatite, castor beans polyurethane and autograft implants in rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira [online]**, São Paulo, v. 19, n. 4, pp. 370 - 382, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000400008>.

FOWKES, F. M. Rate of adsorption of calcium dinonylnaphthalene sulfonate at the oil-water interface. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 67, n. 5, pp. 1094 - 1097, 1963.

FRANÇA, E. e DALL'ANTÔNIA, L. A. Novos compósitos de polianilina e exopolissacarídeos com aplicações em biomateriais: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 1, pp. 37 - 46, 2007. <https://doi.org/10.5433/1679-0375.2007v28n1p37>

FREDIANI, P., UNDRI, A., ROSI, L. e FREDIANI, M. Waste/contaminated polystyrene recycling through reverse polymerization. **Synthesis, characteristics and applications**, New York, ed. 1, chap. 1, p. 1 - 30, 2014.

GABAS, V. G. S. e CAVALCANTI, O. A. Influência da adição da goma arábica em filmes isolados de polímero acrílico: estudo das propriedades de intumescimento e de permeabilidade. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas [online]**, v. 39, n. 4, pp. 440 – 448, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000400012>.

GALVÃO, A. O. Adsorção de íons de Cadmio a partir da Hidroxiapatita e do Biovidro dispersos na Blenda Polimerica (PVA/Amido). **Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica)** – Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 119p., 2017.

GARCIA, C. E. R., BOLOGNESI, V. J., DIAS, J. F. G., MIGUEL, O. G. e COSTA, C. K. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como

antioxidantes em produtos cárneos. **Ciências Rural [online]**, v. 42, n. 8, pp. 1510-1517, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000800029>.

GONÇALVES, E. A. L., GUIMARAES, S. A. C. e GARCIA, R. B. Proteínas morfogenéticas ósseas: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo [online]**. São Paulo, v. 12, n. 3, pp. 299 - 304, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0103-06631998000300018>.

GUASTALDI, A. C. e APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova [online]**. São Paulo, v. 33, n. 6, pp. 1352 - 1358, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600025>.

GUEDES, F. C., DA ROCHA, L. N., DELGADO, I. A., BEZERRA, M. E. S., SILVA, T. L., MEDEIROS, M. L. B. B., e DE MENDONÇA, I. C. G. The role of biomaterials in restorative and minimally invasive dentistry. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, pp. 69889 - 69899, 2021.

GUIMARÃES, G. G., KATSUKI, G. I., ZANARDO, N. D., RIBEIRO, D. A. e CAVALCANTI, O. A. Avaliação da pectina-HPMC no processo de revestimento por compressão: I - Estudo da propriedade de intumescimento em núcleos revestidos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas [online]**, v. 44, n. 1, pp. 133 – 141, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322008000100015>.

GUIMARÃES, H. R. e TANNOUS, K. Estudo das propriedades físicas e térmicas de materiais compósitos de lignina e poliestireno. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, 2014. DOI: 10.5151/chemeng-cobec-ic-06-em-105.

HABITZREUTER, F. Avaliação das características físico-químicas e citotóxicas de membranas de gelatina/quitosana com hidroxiapatita obtidas por precipitação in situ. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais. Universidade de São Paulo. 86p., 2016.

JESUS, L. C. C., LUZ, S. M., LEÃO, R. M., ZATTERA, A. J. e AMICO, S. C. Comportamento térmico de compósitos de poliestireno reciclado reforçado com celulose de bagaço de cana. **Matéria (Rio Janeiro) [online]**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620190003.0736>.

KOKUBO, T. e TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, v. 27, n. 15, pp. 2907 - 2915, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>.

LEMO, E. M. F., DONNICI, C. L., PATRICIO, P. S. O., e MAGALHÃES, M. M. Filmes e matrizes híbridas de quitosana e vidro bioativo: avaliação da bioatividade e do comportamento mecânico. **7º COLAOB – Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, Natal – RN, 2012.

LIANG, J.Y., SHIN, S. R., LEE, S. H. e LEE, D. S. Characteristics of Self-Healable Copolymers of Styrene and Eugenol Terminated Polyurethane

Prepolymer. **Polymers**, v. 11, n. 10, pp. 1674 - 1690, 2019. <https://doi.org/10.3390/polym11101674>.

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S., TINOCO, A. L. A. e SILVA, J. F. Bixin, Norbixin and Quercetin and lipid metabolism effects in rabbits. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science [online]**. São Paulo, v. 38, n. 4, pp. 196 - 200, 2001. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962001000400010>.

LUZ, A. P., RIBEIRO, S., PANDOLFELLI, V. C. Artigo revisão: uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica**, v. 54, pp. 174 - 183, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0366-69132008000200007>

MACÊDO, M. O. C. Efeito do Tratamento por Plasma na Proliferação de Fibroblastos e Esterilização de Membranas de Quitosana. **Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia de Materiais)**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 97p., 2013.

MACÊDO, M. O. C., MACÊDO, H. R. A., BARBOSA, J. C. P., PEREIRA, M. R., e JÚNIOR, C. A. Perfil da molhabilidade em membranas de quitosana tratadas por plasma de hidrogênio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 5, n. 3, pp. 12 - 16, 2010.

MAIA, M., KLEIN, E. S., MONJE, T. V., E PAGLIOSA, C. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de cirurgia plástica**, v. 25, pp. 566-572, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1983-51752010000300029>.

MAUL, J., FRUSHOUR, B. G., KONTOFF, J. R., EICHENAUER, H., OTT, K. H. e SCHADE, C. Polystyrene and Styrene Copolymers. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry: Wiley-VHC: Weinheim**, 2006.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAM, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, **Journal of Medicinal Plant Research**. v. 45, n. 5, pp. 31 - 34, 1982. <http://doi: 10.1055/s-2007-971236>.

MOREIRA, A. S. B., PASTORELI, M. T., DAMASCENO, L. H. F. e DEFINO, H. L. A. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. **Acta Ortopédica Brasileira [online]**. São Paulo, v. 11, n. 4, pp. 240 - 250, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522003000400007>.

NISHIKAWA, H. Thermal behavior of hydroxyapatite in structural and spectrophotometric characteristics. **Materials Letters – MATER LETT**, v. 50, n. 5, pp. 364 - 370, 2001. [Hhttps://doi.org/10.1016/S0167-577X\(01\)00318-4](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(01)00318-4)

NOZAKI, A. C., MARQUES, R. F., MANZINE, L. M., FERREIRA, M., E MARCHI, J. Caracterização de intumescimento e degradação de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. **Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, 2012.

OLIVEIRA, I. R., ANDRADE, T. L. e PANDOLFELLI, V. C. Caracterização de composições a base de cimento de aluminato de cálcio em contato com solução

simuladora de fluido corporal. **60º Congresso Brasileiro de Cerâmica**. São Paulo, 2016.

OLIVEIRA, I. R., ANDRADE, T. L. e PANDOLFELLI, V. C. Bioatividade in vitro de fases de cimento de aluminato de cálcio. **60º Congresso Brasileiro de Cerâmica**. São Paulo, 2016.

OLIVEIRA, L. S. A. F., OLIVEIRA, C. S., MACHADO, A. P. L., e ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, pp. 37 – 44, 2010. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v9i1.4730>

OLIVEIRA, R. V. B., FERREIRA, C. I., PEIXOTO, L. J. F., BIANCHI, O., SILVA, P. A., DEMORI, R., SILVA, R. P. e VERONESE, V. B. Mistura polipropileno/poliestireno: um exemplo da relação processamento-estrutura-propriedade no ensino de polímeros. **Polímeros [online]**, São Carlos, v. 23, n. 1, pp. 91 - 96, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282013005000001>.

PELACANI, V. e VIEIRA, J. Condutividade elétrica do suco de manga. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 1, pp. 43- 45, 2003.

PEREIRA, A. A. C., SANTOS, E. R. M., JESUS, A. A., MEDEIROS, A. M., OLIVEIRA, J. e SOUZA, J. A. B. Estudo de solubilidade do poliestireno (PS) e da policaprolactona (PCL) em diferentes solventes orgânicos. Anais do congresso brasileiro de engenharia química. Campinas, **Anais eletrônicos Galoá**, 2016.

PEREIRA, A. V., VASCONCELOS, W. L. e OREFICE, R. L. Novos biomateriais: híbridos orgânicos-inorgânicos bioativos. **Polímeros [online]**, São Carlos, v. 9, n. 4, pp. 104 - 109, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0104-14281999000400018>.

PEREIRA, R. C., SOUSA, M. V. DOS S, MACÊDO, M. D. O. C., VIANA, V. G. F., e MACÊDO, H. R. A. Characterization of chitosana films produced with incorporation of anacardium microcarpum ducque extract. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, pp. 51376 - 51394, 2021. doi:10.34117/bjdv7n5-503.

PEROTTI, G. F., SILVA, F. F., COUTO, R. A. A., LIMA, F. C. D. A., PETRILLI, H. M., LEROUX, F., FERREIRA, A. M. C. e CONSTANTINO, V. R. L. Intercalation of Apocarotenoids from annatto (Bixa orellana L.) into layered double hydroxides. **Journal of the Brazilian Chemical Society [online]**, São Paulo, v. 31, n. 11, pp. 2211 - 2223, 2020. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200065>.

PIMENTEL, C. A. Membranas de poli(éter-éter-cetona) sulfonado com incorporação de hidroxiapatita para aplicação como biomaterial. **Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais)** – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, 149p., 2018.

PINTO, J. G. S., CIPRANDI, M. T. O., AGUIAR, R. C., HERNANDEZ, P. A. G. e JUNIOR, A. N. S. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais—uma revisão de conceitos atuais. **Revista da Faculdade de Odontologia-UPF**, v. 12, n. 3, pp. 79 - 84, 2007.

PIRES, A. L. R., BIERHALZ, A. C. K. e MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, São Paulo, v. 38, n. 7, pp. 957 - 971, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.

POMPEU, L. L. M. F., SANTOS, G. L., PANDOLFELLI, V. C. e OLIVEIRA, I. R. Aluminatos de cálcio e seu potencial para aplicação em endodontia e ortopedia. **Cerâmica [online]**, São Paulo, v. 59, n. 350, pp. 216 - 224, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0366-69132013000200004>.

PONSONNET, L., REYBIER, K., RENAULT, N. J., COMTE, V., LAGNEAU, C., LISSAC, M. e MARTELET, C. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. **Materials Science and Engineering**, v. 23, n. 4, pp. 551 – 560, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(03\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(03)00033-X).

PRZEKORA, A. The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**, v. 97, pp. 1036 - 1051, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.061>.

RABELO, M. **Aditivação de polímero**. São Paulo: Artliber editora, 2000.

RIDWANSYAH, R., WAHYUNI, N. e ALIMUDDIN, A. H. Uji Fotostabilitas Kaolinit-Norbixin Berdasarkan Analisis Spektra UV-Vis. **Jurnal Kimia Khatulistiwa**, v. 3, n. 2, 2014.

RIGO, E. C. S. e HABITZREUTER, F. Avaliação das características físico-químicas e citotóxicas de membranas de gelatina/quitosana com hidroxiapatita obtidas por precipitação in situ. **60º Congresso Brasileiro de Cerâmica**, São Paulo, 2016.

RODRIGUES, L. R. Síntese e caracterização de hidroxiapatita e titânia nanoestruturadas para a fabricação de compósitos. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica)** - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 114p., 2008.

ROS-TÁRRAGA, P., MAZÓN, P., SAINZ, M. A., MESEGUER-OLMO, L. e AZA, P. N. Surface modifications of a diopside–wollastonite eutectic ceramic after acellular and cellular in vitro tests, **Surface and Coatings Technology**, v. 378, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.124965>.

RUIVO, M. R. B. A. Análise in vitro da liberação de antimicrobianos em compósitos de hidroxiapatita, quitosana e nanotubo de carbono como dispositivo de liberação de fármacos. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 94p., 2020.

SABIR, M. I., XU, X. e LI, L. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 21, pp. 5713 - 5724, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3770-7>.

SANTOS, A. A., SILVA, M. V., GUERREIRO, L. T., ALVES, M. V., BASTOS, V. L. C., BASTOS, J. C., E KOVARY, K. (2002). Influência da norbixina nas lipoproteínas associadas ao colesterol plasmático, atividade da arilesterase / paraoxonase

plasmática e peroxidação lipídica hepática de camundongos Swiss em dieta rica em gordura. **Química alimentar**, v. 77, n. 4, pág. 393-399, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00363-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00363-6).

SANTOS, A. L. N. Desenvolvimento de filmes de Quitosana/PVA/Norbixina com potencial aplicação em regeneração de tecidos. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais)** - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, 86p., 2019.

SANTOS, E. P. Membranas de quitosana/bioativos naturais com atividade antimicrobiana para tratamento de lesões cutâneas. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)** - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 138p., 2018.

SANTOS, G. A., BARBOSA, A. A., OLIVEIRA, L. M., FERRAZ, A. V., OLIVIER, N. C., ACCHAR, W. e DANTAS, A. C. S. Produção de compósitos de poli-hidroxibutirato e hidroxiapatita (PHB/HA) para uso como biomaterial. **Cerâmica [online]**, São Paulo, v. 63, n. 368, pp. 557 - 561, 2017. <https://doi.org/10.1590/0366-69132017633682152>.

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

SANTOS, G. G., MARINHO, S. M. O. C. e MIGUEL, F. B. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.12, n.3, pp. 367 - 373, 2013.

SANTOS, J. A. A., SOUSA, M. F. A. M., SILVA, E. L. V. e JUNIOR, F. C. A. A. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais [online]**, Botucatu, v. 16, n. 3, pp. 637 - 643, 2014. https://doi.org/10.1590/1983-084x/12_120.

SANTOS, M. L., FLORENTINO, A. O., SAEKI, M. J., APARECIDA, A. H., FOOK, M. V. L. e GUASTALDI, A. C. Síntese de hidroxiapatita pelo método sol-gel utilizando precursores alternativos: nitrato de cálcio e ácido fosfórico. **Eclética Química [online]**, São Paulo, v. 30, n. 3, pp. 29 - 35, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702005000300004>.

SANTOS, M. V. B., FEITOSA, G. T., OSAJIMA, J. A., SANTOS, R. L. P. e FILHO, E. C. S. Desenvolvimento de biomaterial composto por hidroxiapatita e clorexidina para aplicação na cavidade oral. **Cerâmica [online]**, São Paulo, v. 65, n. 373, pp. 130 - 138, 2019. <https://doi.org/10.1590/0366-69132019653732441>.

SASSIOTO, M. C. P., FILHO, N. C., FACCO, G. G., SODRÉ, S. T., NEVES, N., PURISCO, S. U. e FARIAS, A. G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira [online]**, São Paulo, v. 19, n. 6, pp. 637 - 641, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000600010>.

SILVA, E. M., GOMES, S. P., ULBRICH, L. M. e GIOVANINI, A. F. Avaliação histológica da laserterapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia - RSBO**, v. 4, n. 2, pp. 29 - 35, 2007.

SILVA JUNIOR, P. E. e OREFICE, R. L. Compósitos Bioativos Obtidos a Partir da Inserção de Vidro Bioativo em Matriz de Poli (Metacrilato de Metila). **Polímeros [online]**, São Carlos, v. 11, n. 3, pp. 109 - 115, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282001000300009>.

SILVA JUNIOR, R. M., VIANA, D. S. F., SILVA, D. A., SANTOS, A. L. N., RAMOS, I. F. S., SOUSA, G., SILVA, J. C. e VIANA, V. G. F. Development and characterization of thin film composite developed from poly (vinyl alcohol) (PVA)/polyethylene glycol (PEG)/norbixin (NBx)/hydroxyapatite. **Colloid and Polymer Science**, v. 299, n. 5, pp. 1 – 12, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00396-020-04777-3>.

SILVA, R. R., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S., ALBINO, L. F. T., AMEIDA, M. R. e LEÃO, M. A. Curcumina e norbixina: ação no metabolismo lipídico de aves domésticas. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 34, n. 2, pp. 177 - 182, 2001. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v34i2p177-182>.

SILVA, R. F. e PITA, V. J. R. R. Compósitos de poliestireno e argila aniônica funcionalizada com cinamato com propriedade de absorção de UV. **Polímeros [online]**, São Carlos, v. 23, n. 6, pp. 778-783, 2013. <https://doi.org/10.4322/polimeros.2013.057>.

SINHORETI, M. A. C., VITTI, R. P. e SOBRINHO, L. C. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas [online]**, São Paulo, vol.67, n.4, pp. 256 - 261, 2013.

SIQUEIRA, A. S. Obtenção de andaimes poliméricos baseados em poli (ácido láctico), hidroxiapatita e óxido de grafeno utilizando o método de manufatura aditiva por “fused deposition modeling”. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais e Nanotecnologia)** – Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2018.

SOUSA, E. V., ARAUJO, M. N., MAZZETTO, S. E., SILVA, C. C., SOMBRA, A. S. e MACÊDO, A. A. Caracterização de biomaterial à base de hidroxiapatita e biopolímeros para aplicação biomédica. **Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação - VII CONNEPI**, Tocantins, 2012.

SOUSA, M. V. S., PEREIRA, T. F., MÂCEDO, H. R. A. e MÂCEDO, M. D. O. C. Analise de testes toxicológicos Artemia salina e Allium cepa em membranas de quitosana com liquido da castanha do caju (LCC). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, pp. 33902 – 33909, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-036>

SOUSA, R. C., VIANA, V. G. F., CARVALHO, L. F. M. e VASCONCELOS, D. F. P. Uso de Poli-hidroxibutirato e Norbixina como Biomaterial para Regeneração Óssea:

um mapeamento tecnológico. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 3, pp. 805 - 822, 2020. <http://dx.doi.org/10.9771/cp.v13i3.30513>.

SOUSA, R. C., CARVALHO, L. F. M., OLIVEIRA, D. S., COSTA, C. L. S., ALMEIDA, S. M., NEVES, S. M. V., FILHO, A. L. M. M., AMARAL, F. P. M. e VIANA, V. G. F. Síntese e caracterização de membranas de norbixina, etilenoglicol e PHB para aplicações em biomateriais. **9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 13º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Órgãos Artificiais e Engenharia de Tecidos – SLABO**, Foz do Iguaçu - PR, 2016.

SOUSA, W. J. B., BARBOSA, R.C., FOOK, M. V. L., FILGUEIRA, P. T. D., e TOMAZ, A. F. Membranas de polihidroxibutirato com hidroxiapatita para utilização como biomaterial. **Matéria [online]**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 4, ed.11902. 2017. <https://doi.org/10.1590/S1517-707620170004.0236>.

SOUZA, G., ELIAS, F. V., SOUZA, R. e JOAQUIM, F. L. S. Hidroxiapatita como biomaterial utilizado em enxerto ósseo na implantodontia: uma reflexão. São Paulo, **Revista Odontológica de Araçatuba**, v.37, n.3, pp. 33 - 39, 2016.

TERRANOVA, L., MALLET, R., PERROT, R. e CHAPPARD, D. Polystyrene scaffolds based on microfibers as a bone substitute; development and in vitro study. **Acta Biomaterials**, v. 29, pp. 380 - 388, 2016. doi: 10.1016/j.actbio.2015.10.042.

THINH, P. X., BASAVARAJA, C., KIM, D. G. e HUH, D. S. Characterization and electrochemical behaviors of honeycomb-patterned poly(N-vinylcarbazole)/polystyrene composite films. **Polymer Bulletin**. v. 69, pp. 81 – 94, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0727-9>.

TOCCHINI, L. e MERCADANTE, A. Z. Extraction and determination of bixin and norbixin in annatto spice ("colorífico"). **Food Science and Technology [online]**, v. 21, n. 3, pp. 310-313, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612001000300010>.

TOLEDO, C. H. W. Desenvolvimento de compósitos de PEUAPM / Hidroxiapatita para aplicações como biomateriais. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)** - Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, 61p., 2010.

VAZIRINASAB, E., JAFARI, R. e MOMEN, G. Application of superhydrophobic coatings as a corrosion barrier: A review. **Surface and Coatings Technology**, v. 341, p. 40–56, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.11.053>.

VIEIRA, I. R. Estudo do processo de regeneração óssea utilizando membranas sintéticas com aditivos funcionais: estudo in vitro. **TCC (Graduação em Odontologia)** – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 30p., 2019.

VITAL, C.C., BORGESII, A. P. B., FONSECA, C. C., TSIOMIS, A. C., CARVALHO, T. B., FONTES, E. B., SENA, M.P. e FÓFANO, G. Biocompatibility and behavior of hydroxyapatite on bone defect on rabbit's ulna. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, pp. 175-183, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000200005>.

YOUSIF, E., AHMED, D. S., EL-HITI, G. A., ALOTAIBI, M. H., HASHIM, H., HAMEED, A. S. e AHMED, A. Fabrication of Novel Ball-Like Polystyrene Films Containing Schiff Base Microspheres as Photostabilizers. **Polymers**, v. 10, ed. 11, pp. 1185, 2018. <https://doi.org/10.3390/polym10111185>.

ZHENG, R., DUAN. H., XUE, J., LIU, Y., FENG, B., ZHAO, S., ZHU, Y., LIU, Y., HE, A., ZHANG, W., Liu, W., CAO, Y. e ZHOU, G. The influence of Gelatin/PCL ratio and 3D construct shape of electro spun membranes on cartilage regeneration. **Biomaterials**, v. 35, n. 1, pp. 152 – 164, 2014. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.082. Epub 2013 Oct 14. PMID: 24135269.