

Membranas de polihidroxibutirato com hidroxiapatita para utilização como biomaterial

Membranes polyhydroxybutyrate with hydroxyapatite for use as biomaterials

Wladymyr Jefferson Bacalhau de Sousa¹, Rossemberg Cardoso Barbosa¹,
Marcus Vinícius Lia Fook¹, Pedro Tardelly Diniz Filgueira¹,
Alecsandra Ferreira Tomaz²

¹ Departamento de Engenharia de Materiais, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Brasil

e-mail: wladymyrjb@yahoo.com.br; rcbvet@gmail.com; marcusvinicius@dema.ufcg.edu.br; pedrotardelly@gmail.com

² Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil

e-mail:alecsandratomaz@hotmail.com

RESUMO

O avanço da tecnologia dos biomateriais permite desenvolver materiais que auxiliam nos processos reconstrutivos de partes do corpo e incrementam tratamentos e melhora a qualidade de vida dos seres humanos. O Polihidroxibutirato (PHB) é um polímero biocompatível, biodegradável, muito estudado para aplicações médicas e suas propriedades ainda podem ser adequadas para outras diversas aplicações com a incorporação da hidroxiapatita (HA). Esta é uma carga inorgânica biocompatível e bioativa já presente nos tecidos ósseos do organismo. Desta forma, este trabalho teve como objetivo obter membranas composta por PHB e HA para utilização como biomaterial em regeneração tecidual óssea e guiada. Para obtenção das membranas, o PHB foi processado em uma extrusora monorosca de bancada AX-Plásticos (16-mm), com Razão LD=26, a uma taxa de compressão de 1,5, específica para produção de filmes planos. Foram confeccionadas membranas de PHB puro, e os compósitos de PHB com 1%, 2% e 3% de HA. Após obtenção das membranas, as mesmas foram caracterizadas por Difração de raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) / Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS), Citotoxicidade e Molhabilidade. Nos difratogramas foi possível observar um perfil de material semicristalino e que a adição da HA diminuiu esse perfil. Nas micrografias foi visualizada uma superfície de um material denso e rugoso. Já no EDS foi evidenciado os elementos químicos presentes no PHB e na HA. O ensaio de citotoxicidade confirmou a viabilidade e consequentemente a biocompatibilidade do material obtido. Já o ensaio de Molhabilidade confirmou o caráter hidrofílico das membranas. Fundamentado nesses resultados, pode-se concluir que a metodologia para obtenção das membranas foi eficaz, sendo as mesmas biocompatíveis e que a quantidade da carga vai depender da indicação de uso do biomaterial em questão.

Palavras-chave: PHB. Hidroxiapatita. Biomateriais. Biocompatível.

ABSTRACT

The advancement of biomaterials technology allows the development of materials that assist in reconstructive procedures of the body parts and increase treatment and improves the humans quality of life. The polyhydroxybutyrate (PHB) is a biocompatible polymer, biodegradable, widely studied for medical applications and its properties can also be suitable for other various applications with hydroxyapatite (HA) incorporation. This is a bioactive and biocompatible inorganic filler already present in bone tissues. Thus, this study aimed to obtain membranes composed of PHB and HA for use as biomaterials in bone tissue regeneration and guided. To obtain the membranes, PHB was processed in a single screw extruder AX-Plastics bench (16 mm), with LD Ratio = 26, a compression ratio of 1.5, specific for the production of flat film. Pure PHB membranes were prepared, and composite PHB with 1%, 2% and 3% HA. After obtaining the membranes, they were characterized by X-ray diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM) / Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and Cytotoxicity. In the diffraction profile it was observed a semicrystalline material and the addition of HA decreased this profile. In the micrographs it was visualized a surface of a dense and rough material. The EDS evidenced the chemical elements present in the PHB and HA. The cytotoxicity assay confirmed the viability and thus the biocompatibility of the material. The

Wettability test confirmed the hydrophilic character of the membranes. Based on these results, we can conclude that the method for obtaining the composite was effective, being biocompatible and the charge amount will depend on the biomaterial usage indication concerned.

Keywords: 1. PHB. 2. Hydroxyapatite. 3. Biomaterials. 4. Biocompatible

1. INTRODUÇÃO

Uma das áreas prioritárias da biotecnologia refere-se ao desenvolvimento de novos biomateriais. Estes materiais podem ser empregados, por um período de tempo indeterminado, como um todo, ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais [1].

Na região bucomaxilofacial, a reabsorção severa da mandíbula e maxila associada à perda dos dentes pode levar a defeitos anatômicos, comprometendo a função e a estética e, em muitos casos inviabiliza a colocação de um implante dentário. Devido à sua habilidade de decomposição e reabsorção, o polihidroxibutirato (PHB) é um candidato para a utilização de matrizes bioativas, tanto como substituto do osso como implantes que guiarão o tecido ósseo ao crescimento e, conseqüentemente, será substituído pelo novo tecido [2].

O PHB apresenta um grande diferencial, a biodegradabilidade, que o torna ainda mais atraente, do ponto de vista tecnológico e ambiental [3]. As propriedades mecânicas do PHB são mais próximas às do osso, comparadas aos metais, o que reduz o risco de falha/fratura nos pontos de concentração de tensão no tecido ósseo [4].

As propriedades do PHB ainda podem ser potencializadas com a adição de cargas inorgânicas bioativas como a hidroxiapatita (HA), que é um fosfato de cálcio semelhante ao encontrado nos ossos, cuja fórmula química é $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Isso, além de melhorar as propriedades mecânicas do biomaterial, pode acelerar o processo de regeneração óssea e, conseqüentemente, diminuir o tempo de cura do paciente [5].

Em decorrência da semelhança da HA com a parte mineral de ossos e dentes, observam-se características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, osteocondutividade e bioatividade; a HA ainda favorece a proliferação de células ósseas (fibroblastos e osteoblastos), o que torna seu uso em aplicações de implantes biomédicos e regeneração óssea extremamente interessante [6,7].

Sadat-Shojai e colaboradores [8] confeccionaram membranas tridimensionais de nano-HAp / PHB para regeneração óssea in vivo. Szubert e colaboradores [9] modificaram a superfície do PHB com deposição de hidroxiapatita. Sadat-Shojai e colaboradores [10] estudaram a síntese de nanocompósitos baseados em PHB e HA para aplicação na reparação e regeneração óssea. Em todos os artigos é possível ver uma carência clínica, e os autores indicam a necessidade de realizar mais estudos.

Mediante essas observações, este trabalho tem como propósito estudar, desenvolver e caracterizar o PHB, a HA e o biocompósito obtido a partir desses dois materiais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado PHB adquirido na forma de pó pela PHB Industrial S.A., Peso molecular 600 kg/mol, Pureza 99,5%, Ponto de Fusão 170-180°C; Ácido fosfórico PA obtidos do fornecedor Vetec; Clorofórmio P.A., fornecido pela Isofar; casca de ovo de galinha (*Gallus gallus domesticus*); Água destilada.

2.1 Obtenção da hidroxiapatita

As cascas de ovos foram lavadas com água corrente, secadas em estufa a 50°C, submetidas à trituração em Almofariz e Pistilo e em seguida peneira malha 100 mesh para obtenção do pó. Em seguida o pó da casca do ovo foi submetido a um ciclo térmico de aquecimento a 800°C por 3 horas, com taxa de aquecimento de 10°C/min, para a obtenção do óxido de cálcio.

A hidroxiapatita foi obtida pelo método de precipitação por via úmida, onde foi colocado 5,6 g óxido de cálcio em 150 mL de água destilada, posteriormente adicionou 30 mL de ácido fosfórico a 2 M por gotejamento controlado (aproximadamente 1,0 mL/min), sob temperatura de $\pm 80^\circ\text{C}$ e agitação magnética. Após a completa adição da solução de ácido fosfórico, o produto obtido permaneceu por um período de ± 5 horas, sob agitação magnética à temperatura de 100°C, até que o líquido fosse totalmente evaporado formando uma pasta viscosa. Essa pasta foi levada para a estufa a 110°C por 24 horas. Em seguida, o produto final foi desaglomerado no almofariz, passado em peneira de malha 325 mesh, obtendo partículas de tamanho máximo 44µm e calcinada a 900°C por 2 horas.

2.2 Preparação das Membranas de PHB com Hidroxiapatita

Para obtenção das membranas, o PHB com e sem (1%, 2% e 3%) Hidroxiapatita foi extrusado à 44rpm, torque de 39nm, com um perfil de temperatura de 170/175/177°C na extrusora monorosca de bancada AX-Plásticos (16-mm), com Razão LD=26, a uma taxa de compressão de 1,5, específica para produção de filmes planos. A sequência operacional de elaboração das membranas é observada na Figura 1.

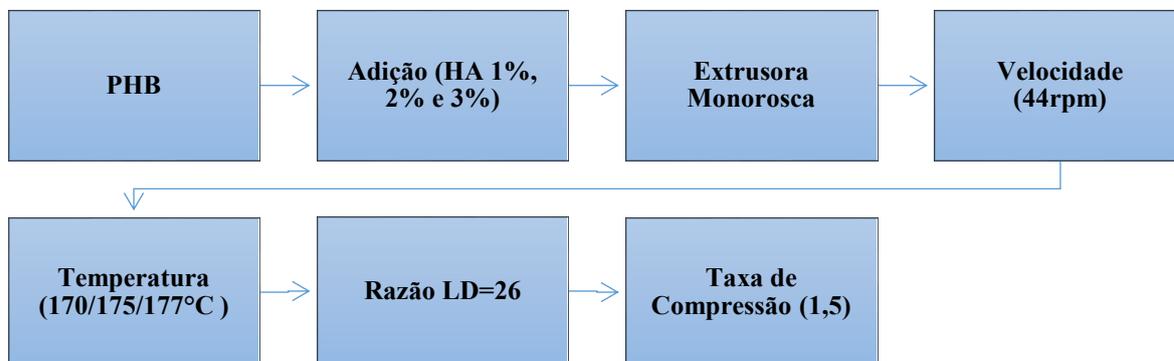


Figura 1: Sequência operacional de elaboração das membranas.

2.3 Amostras

A Tabela 1 ilustra as codificações das respectivas amostras.

Tabela 1: Denominação das amostras.

CÓDIGO	AMOSTRAS
HA	Hidroxiapatita
PHBE	Polihidroxibutirato_ Membrana Extrusada
PHBEHA1	Polihidroxibutirato_ Membrana Extrusada com 1% de HA
PHBEHA2	Polihidroxibutirato_ Membrana Extrusada com 2% de HA
PHBEHA3	Polihidroxibutirato_ Membrana Extrusada com 3% de HA

2.4 Caracterização

As membranas de PHB/HA foram caracterizadas por Difração de raios-X (DRX), que é um ensaio que mostra o perfil cristalográfico do material, utilizando um difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 6000) com varredura angular de 5° a 80° com passo de 1°/min, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ -2 θ , utilizando radiação CuK α na tensão de 40KV e corrente de 30mA; Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumentos de 500x, profundidade de foco de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras; Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X(EDS) com detector acoplado ao MEV de bancada, modelo TM-1000 da marca Hitachi; O ensaio de tração foi realizado em uma Máquina Universal Instron, modelo 3366, célula de carga 500N com aplicação de uma velocidade de carregamento de 50 mm/min. Este ensaio foi realizado com base na norma ASTM D 3039/D 3039M-08 e foram ensaiados 5 corpos de prova, com o propósito de avaliar o comportamento mecânico dos biocompósitos. Citotoxicidade, com a finalidade de saber se o material pode ser utilizado no organismo e Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato para determinar a hidrofiliabilidade das membranas, as análises por medida de ângulo de contato foram efetuadas após o gotejamento de água destilada na superfície das membranas, foi utilizada uma câmara digital para capturar a imagem, acopladas num aparelho goniômetro desenvolvido por técnicos da Unidade Acadêmica de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, as imagens capturadas foram, posteriormente, remetidas a um computador que possui um programa específico para ser feita a conversão do ângulo da interface líquido-material em unidade de tensão interfacial.

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* das membranas foi realizada pelo teste de avaliação da viabilidade celular fibroblastos por MTT [brometo de 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio] de acordo com a ISO 10993-5:2009 [11]. Foi utilizado o método direto de contato entre o substrato do material e as células. A linha celular foi L929 fibroblastos adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro, o calculo da viabilidade foi por meio do Teste de Grubbs para Outliers, posteriormente desse teste o calculo da média e

o desvio padrão corrigido foi realizado pelo Graph Pad Prism 6. O Espectro fotômetro utilizado para leitura da viabilidade foi o aparelho Victor X3 marca Perkin Elmer.

As análises foram realizadas no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste-CERTBIO, laboratório acreditado na Norma ABNT ISSO/IEC 17025:2005, CRL 0799 para ensaios Químicos e Ensaios Biológicos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Difração de raios X (DRX)

A amostra de hidroxiapatita foi analisada pelo Método de Rietveld de Refinamento utilizando o programa General System Analyzer Structure (GSAS II), com a ficha estrutural CIF 81442 do ICSD - Inorganic Crystal Structure Database. Os parâmetros instrumentais foram previamente calculados empregando um padrão NIST 660a de LaB6. Os valores de fator de perfil ponderado (Rwp) (~10%) atingidos nos refinamentos foram aceitáveis.

De acordo com o difratograma (Figura 2) observou-se na amostra apenas a fase cristalina da Hidroxiapatita (Ca/P de 1,67) e está de acordo com o encontrado pelo Programa X'Pert HighScore Plus PCRD com autor das fichas Calculated [12] e Hughes, Cameron e Crowley [13].

O perfil de difração característico da HA mostra picos intensos e é identificado em: 25,9°, 31,6°, 32,9° e 33,9° em 2θ, correspondentes, respectivamente, às reflexões dos planos (002), (002), (121) e (112), e esse resultado corrobora com Araújo e colaboradores [14].

Kamalanathan e colaboradores [15] sintetizaram fosfato de cálcio a partir da casca do ovo e conseguiram obter hidroxiapatita utilizando faixa de temperatura de calcinação entre 900° e 1250 ° C e o pico mais intenso foi observado próximo a 2 θ = 31,7. Tomaselli [16] também obteve a hidroxiapatita pelo método de via úmida, utilizando temperatura de calcinação a 900°.

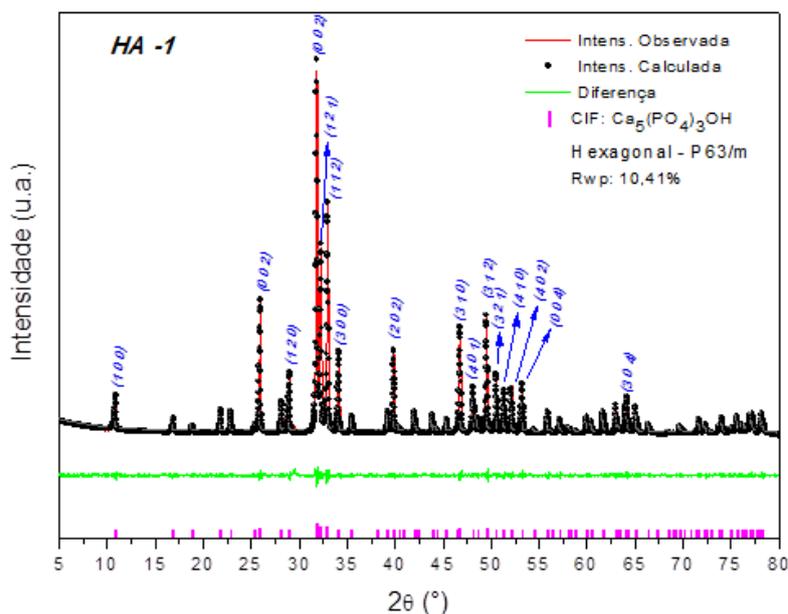


Figura 2: Difratograma de DRX da Hidroxiapatita obtida a partir da casca do ovo

Analisando o difratograma do PHBE (Figura3) verifica-se um material de perfil semicristalino com dois picos bem definidos de cristalinidade em $2\theta=13,66^\circ$ e $2\theta=17,11^\circ$. Comportamentos similares foram relatados por Mendes [17] que constatou dois picos bem definidos de cristalinidade em torno de $2\theta=13,2^\circ$ e $2\theta=16,7^\circ$. Já Thire, Ribeiro e Andrade [18] obteve em seus resultados dois picos bem definidos de cristalinidade em torno de $2\theta=13,6^\circ$ e $2\theta=17,1^\circ$ e célula unitária tipo ortorrômbica.

Nos difratogramas (Figura 3) observou que a HA torna o material menos cristalino, a presença da HA limita o número e o crescimento de cristais de PHB, além deste fator pode-se inferir que o resfriamento rápido e o tempo menor de conformação do material o tornou menos cristalino.

O conhecimento da cristalinidade é de suma importância para os biomateriais, pois ela influencia no desempenho in vivo por afetar a reabsorção e suas propriedades mecânicas. As zonas amorfas são biodegradadas mais rapidamente e conseqüentemente reabsorvidas do que as regiões cristalinas [19, 20, 21].

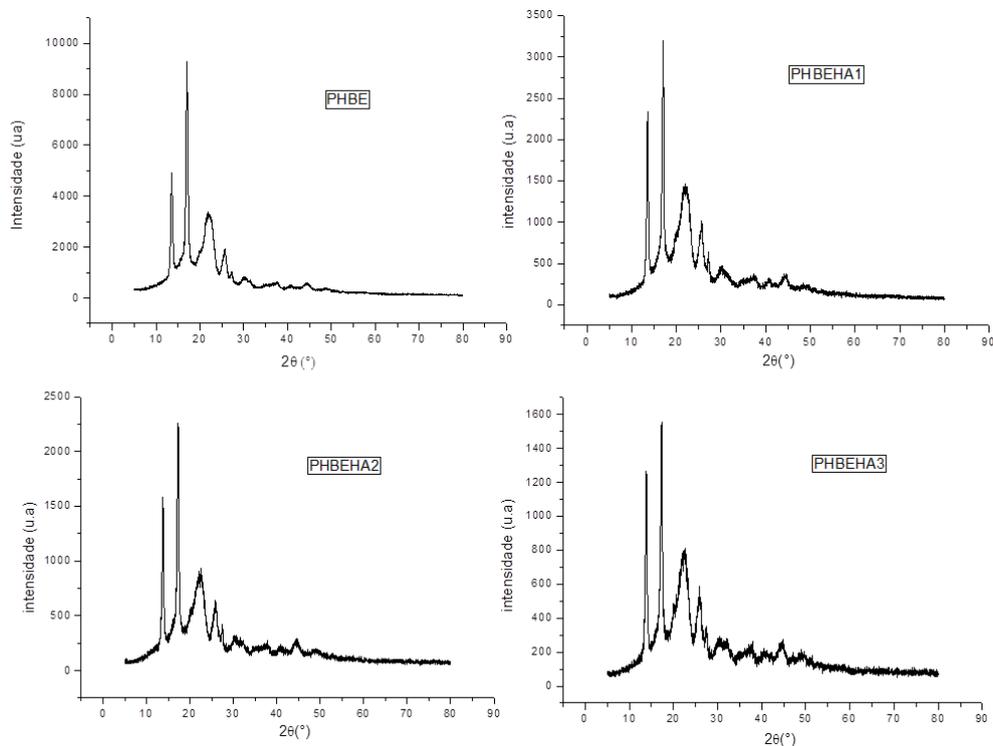


Figura 3: Difratoograma do PHBE e dos biocompósitos

Canevarolo [22] relata que, quando uma massa polimérica com capacidade de cristalização, é rapidamente resfriada a partir do fundido para uma dada temperatura entre temperatura de transição vítrea (Tg) e temperatura de fusão (Tm), sua cristalinidade diminui. Quanto mais lento o resfriamento mais cristalino se torna o material.

3.2 Ensaio Mecânico de Tração

Os ensaios mecânicos de tração foram realizados com o propósito de avaliar o comportamento mecânico das membranas e dos biocompósitos estudados. Para tanto, em conformidade com a norma ASTM D 3039/D 3039M-08 [23], foram preparados e ensaiados 10 corpos de prova para cada composição do material de PHB obtido, sendo 5 na direção longitudinal (sentido da extrusão) e 5 perpendiculares à extrusão.

A Tabela 2 ilustra os valores médios do módulo de elasticidade, resistência à tração e a deformação dos materiais ensaiados.

Tabela 2: Resistência à tração em relação a membrana de PHBE e os biocompósitos.

AMOSTRAS	Módulo de Elasticidade (MPa/mm)	Deformação Máxima (mm)	Tensão (MPa)
PHBE (Direção Longitudinal- DL)	1034,38	0,59743	20,599
PHBE (Direção Perpendicular- DP)	1022,39	0,51004	17,382
PHBEHA1 (DL)	977,05	0,65662	21,385
PHBEHA1 (DP)	774,06	0,67836	17,503
PHBEHA2 (DL)	923,84	0,73519	22,640
PHBEHA2 (DP)	837,97	0,74007	20,672
PHBEHA3 (DL)	919,71	0,86991	26,669
PHBEHA3 (DP)	862,33	0,88842	25,537

Fonte: Própria

Analisando-se os dados da Tabela 2 pode-se observar que as amostras PHBE, nas duas direções estudadas, apresentaram menor resistência à tração e à deformação quando comparadas aos biocompósitos. Sendo que a resistência à tração e deformação foram maiores no sentido longitudinal. De acordo com Pachekoski, Dalmolin e Agnelli [24] o PHB tem baixa deformação e alto módulo elástico devido ao seu caráter rígido e frágil.

A tensão e deformação nos biocompósitos foram aumentando à medida que HA foi acrescentada na composição, indicando uma redução na fragilidade do biocompósito tornando-o mais flexível. A diminuição no valor do módulo elástico e aumento significativo na deformação antes da ruptura está relacionado, possivelmente, à redução da cristalinidade do material como observado no ensaio de DRX. O módulo elástico é uma medida de rigidez, portanto, quanto maior o módulo mais rígido é o material. Para os polímeros, o módulo elástico aumenta com o grau de cristalinidade [25].

Ao analisar o sentido da realização do ensaio à resistência à tração, verifica-se que no sentido longitudinal os compósitos são mais flexíveis e tem uma maior deformação.

O PHB possui uma alta cristalinidade, aproximadamente 80% que lhe atribui características mecânicas de material rígido e frágil [26]. Entretanto, quando adicionada a carga de HA com diferentes proporções o material estudado se tornou menos cristalino e, conseqüentemente, mais flexível e menos frágil comparando com a membrana de PHBE.

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

Na Figura 4 é observada a micrografia das membranas de PHBE e de PHBEHA1, PHBEHA2 e PHBEHA3 e na Tabela 2 seus respectivos EDS

Ao analisar a micrografia da membrana de PHBE observa-se uma superfície rugosa e descontínua. Ao analisar os resultados da Tabela 2 referentes ao EDS do PHBE constatou-se a presença dos elementos O e C característicos do PHB.

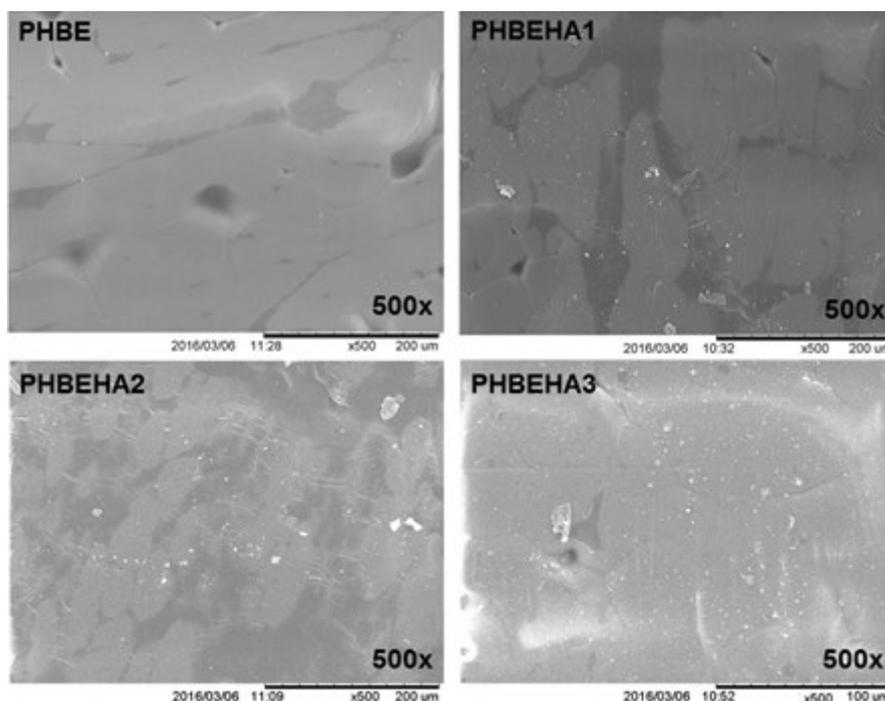


Figura 4: Micrografia das membranas de PHBE, PHBEHA1, PHBEHA2 e PHBEHA3. Magnitude de 500x

Já na micrografia dos biocompósitos PHBEHA (1, 2 e 3), observa-se uma superfície rugosa, presença de partículas e uma maior descontinuidade. Verifica-se um aumento gradativo de partículas devido à incorporação das diferentes concentrações de hidroxiapatita que é confirmado pelo EDS (Tabela 3), onde há um aumento no percentual de Cálcio (Ca) e Fósforo (P) de acordo com o aumento da porcentagem de HA. O ensaio de MEV/EDS corroboram com os ensaios de DRX.

Tabela 3: Identificação da composição química das membranas de PHBE, PHBEHA1, PHBEHA2 e PHBEHA3, realizada por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

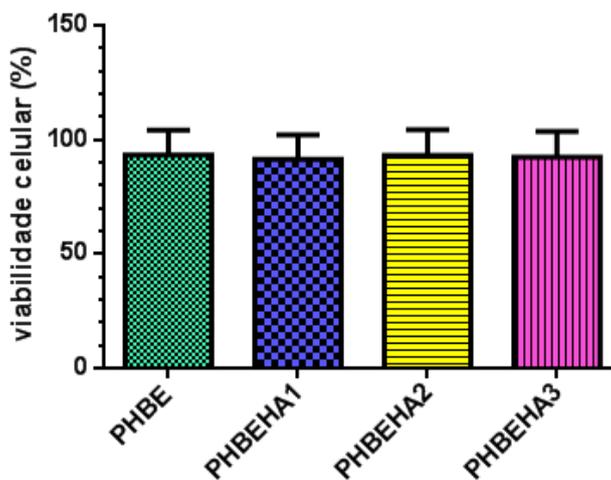
AMOSTRAS	CARBONO (%)	OXIGÊNIO (%)	CÁLCIO (%)	FÓSFORO (%)
PHBE	77,57	22,43	-	-
PHBEHA1	78,76	20,88	0,19	0,18
PHBEHA2	77,78	18,85	2,29	1,08
PHBEHA3	53,86	36,47	7,30	2,37

Fonte: Própria

Santos [27] produziu membranas à base de polihidroxibutirato e hidroxiapatita pelo método de prensagem e ele relata que seu material apresentou uma superfície irregular com presença de partículas não fundidas e poros distribuídos em toda superfície.

3.4 Citotoxicidade

Os resultados de citotoxicidade das membranas de PHBE/HA estão ilustrados na Figura 5 com seus respectivos cálculos de incerteza. Quando comparada o percentual de citotoxicidade das membranas com o valor mínimo determinado por Bispo [28] que é de 50% e pela norma ISO 10993-5:2009 que é de 70% pode se afirmar que todas as membranas apresentam-se viáveis uma vez que encontraram-se com percentual de viabilidade acima de 80%. Além disso constatou-se que a adição da HA não alterou a viabilidade do material.

**Figura 5:** Viabilidade celular das membranas de PHBE e dos biocompósitos

Resultados semelhantes foram encontrados por Malmonge e colaboradores [29] onde o PHB não foi considerado citotóxico nem por contato direto nem indireto. Siqueira [30] também enfoca que biocompósitos formulados, PHB/HA, nas distintas composições, não apresentaram citotoxicidade e não desenvolveram resposta inflamatória acentuada, sendo considerados biocompatíveis. Com base na norma ISO 10993-5 [31] podemos confirmar que o material estudado é biocompatível, característica essa imprescindível para que um material possa ser utilizado como biomaterial.

3.5 Molhabilidade por Medida de Ângulo de Contato

Foram utilizadas cinco amostras de cada tipo de membrana e biocompósito, realizando cinco medições em cada uma delas e obtidos a média dos ângulos de contatos.

De acordo com os resultados (Figura 6), verifica-se que todas as membranas apresentaram as medidas de ângulo de contato menor que 90° o que indica hidrofiliabilidade, constatou-se uma tendência a diminuição da hidrofiliabilidade de acordo com o aumento da carga (HA). Desta forma, pode-se afirmar que a adição da HA tornou as membranas menos hidrofílicas. Analisando-se esses resultados, pressupõe-se que os biocompósitos tem comportamento receptível com o meio biológico.

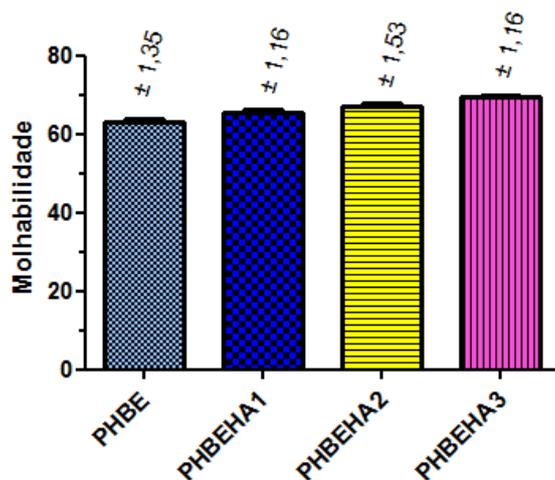


Figura 6: Molhabilidade por medida de ângulo de contato para os diferentes tipos de membranas

Sousa [24] confeccionou membranas de quitosana, vitamina E e fosfato de cálcio nas concentrações de 1%, 3% e 5% e ele também, constatou que adição do fosfato tornou suas membranas menos hidrofílicas.

4. CONCLUSÕES

Todas as membranas desenvolvidas indicaram ser viáveis como biomaterial, pois não apresentaram citotoxicidade, o que confirmou a sua biocompatibilidade. As membranas apresentaram-se hidrofílicas favorecendo a interação com o meio biológico, além da ação bioativa da HA que irá favorecer o crescimento do tecido ósseo.

Quando comparada a membrana de PHB com os compósitos, constatou que o biocompósito manteve-se hidrofílico, biocompatível e introduziu a propriedade de bioatividade característica essa que o PHB não possui, estimulando dessa forma o crescimento tecidual ósseo.

Sendo assim, pode-se concluir que o biocompósito tem potencial para ser utilizado na regeneração óssea guiada e regeneração tecidual guiada, sendo necessário de outras caracterizações complementares para confirmação desse potencial.

5. AGRADECIMENTOS

CAPES; CERTBIO; UFCG e PPG-CEMat

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN F. J., *et al.*, *An introduction to materials in medicine*, Academic Press, 2005.
- [2] LINDHE J., LANG N. P., KARRING T., *“Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral”*, 5ª Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- [3] COUTINHO, B. C., MIRANDA, G. B. SAMPAIO, G. R. *et al.*, A importância e as desvantagens polihidroxibutirato (plástico biodegradável), *Holos*, v.3. 2004.
- [4] ORÉFICE, R.L., PEREIRA, M.M., MANSUR, H.S., *Biomateriais – Fundamentos e aplicações*. 1ª Ed, Editora Cultura Médica, 2012.
- [5] APARECIDA, A. H., FOOK, M. V. L., SANTOS, M. L., *et al.*, “Estudo da influência dos íons K⁺, Mg²⁺, SO₄²⁻ e CO₃²⁻ na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP)”, *Química Nova*, v. 30, n. 4, pp. 892-896, 2007.
- [6] REY, C, COMBES, C, DROUET, C, *et al.*, “Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: implications for biominerals and biomaterials”, *Materials Science and Engineering: C*, v. 27, n. 2, pp. 198-205, 2007.
- [7] GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H., “Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos”, *Química Nova*, v. 33, n. 6, pp. 1352-1358, 2010.

- [8] SADAT-SHOJAIA, M., KHORASANI, M-T., JAMSHIDI, A. A new strategy for fabrication of bone scaffolds using electrospun nano-HAp/PHB fibers and protein hydrogels, *Chemical Engineering Journal*. n. 289, p. 38 – 47, 2016.
- [9] SZUBERTA, M., ADAMSKA, K., SZYBOWICZ, M., *et al.*, The increase of apatite layer formation by the poly(3-hydroxybutyrate) surfacemodification of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate. *Materials Science and Engineering C*. n. 34, p. 236 - 244, 2014.
- [10] SADAT-SHOJAI, M., KHORASANI, M. T., JAMSHIDI, A., *et al.*, Nano-hydroxyapatite reinforced polyhydroxybutyrate composites: A comprehensive study on the structural and in vitro biological properties. *Materials Science & Engineering C*, doi: 10.1016/j.msec.2013.02.041. 2013.
- [11] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 10993-5, “*Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*”, 2009.
- [12] CALCULATED. *Programa X'Pert HighScore Plus PCRD*. From ICSD using POWD-12++, 1997.
- [13] HUGHES, J. M., CAMERON, M., CROWLEY, K. D., “Structural Variations in Natural F, OH, and Cl Apatites”, *American Mineralogist*, v. 74, pp. 870, 1989.
- [14] ARAÚJO, J. C., SENA, L., BASTOS, I. N., *et al.*, “Síntese da hidroxiapatita e refinamento estrutural por difração de raios-x”, *Química Nova*, v. 30, n. 8, pp. 1853-1859, 2007.
- [15] KAMALANATHAN, P., RAMESH, S., BANG, L. T., *et al.*, “Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor”, *Elsevier Ceramics International*, v. 40, pp. 16349–16359, 2014.
- [16] TOMASELLI, M. G., *Síntese e Caracterização de Hidroxiapatita Obtida a partir da Casca de Ovo de Galinha*, Monografia de Graduação, EEL-USP, Lorena, SP, Brasil, 2014.
- [17] MENDES, F. M., *Produção e caracterização de bioplásticos a partir de amido de batata*. Dissertação de M. Sc., PGQ - IQSC - USP. São Carlos, São Paulo, Brasil, 2009.
- [18] THIRE', R. M. S. M., RIBEIRO, T. A. A., ANDRADE, C. T., “Effect of Starch Addition on Compression-Molded Poly (3-hydroxybutyrate)/Starch Blends”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 100, pp. 4338-4347, 2006.
- [19] DUARTE, M. A. T., JÚLIO, C. F., MARTINS, E. S., *et al.*, “Estudo da compactação a frio de poli(3-Hidroxibutirato) - Morfologia e resistência à compressão”, *Revista Matéria*, v. 9, n. 4, pp. 386-391, 2004.
- [20] CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M. SOARES, G. A., “Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft”, *Jornal. Appl. Oral Science*, v. 13, pp.136, 2005.
- [21] SHISHATSKAYA, E. I., KHLUSOV, I. A., VOLOVA, T. G. “A hybrid PHB hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation” *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition*, v. 17, n. 5, pp. 481-498, 2006.
- [22] CANEVAROLO Jr, S. V., *Ciência dos Polímeros*, 2ª Ed., Editora Artliber, 2006.
- [23] ASTM, AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. D 3039/D 3039M - 08: Standard Test Method for Tensile Properties of Polymer Matrix Composite Materials. Pennsylvania, 2008.
- [24] PACHEKOSKI, W. M., DALMOLIN, C., AGNELLI, J. A M. “Blendas poliméricas iodegradáveis de PHB e PLA para fabricação de filmes”, *Polímeros*, v. 24 n. 4, 2014.
- [25] FREITAS, R. L. M. *Efeito da temperatura de resfriamento sobre as propriedades de polímeros amorfos e semicristalinos*. Trabalho de Conclusão de Curso., CEM-Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2014.
- [26] CASARIN. S. A. *Blendas de PHBV e PCL para uso em dispositivo de osteossíntese*. Tese de Dr. PPGECM- UFSC. São Carlos-SP. 2010.
- [27] SANTOS, G. A., *Produção de compósitos à base de polihidroxibutirato e hidroxiapatita para a aplicação como biomateriais*. Dissertação de M. Sc, UNIVASF, Juazeiro, Bahia, Brasil, 2013.
- [28] BISPO, V. M., *Estudo do efeito da reticulação por Genipin em suportes biocompatíveis de Quitosana-PVA*, Tese de D. Sc., UFMG. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 2009.
- [29] MALMONGE, S. M., OKAJIMA, L. H., JUNIOR, A. R. S., *et al.*, “Compósitos Pierzoelétricos de PHB – Avaliação da Citotoxicidade” In: Anais do 8ª-Congresso Brasileiro de Polímeros, Rio Grande do Norte, Natal, Brasil, 2015
- [30] SIQUEIRA, L. C. B. *Formulação e Caracterização de Biomateriais Compósitos com hidroxiapatita*, Dissertação de M. Sc., PPGECM – UENF, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.

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

[32] SOUSA, W. J. B. *Desenvolvimento de Filmes Híbridos de Quitosana/Fosfato de Cálcio com Incorporação de Vitamina E.*, Dissertação de M. Sc., PRPG-CEMat - UFCG, Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2012.