

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

MATHEUS FELIPE CELESTINO

**OBTENÇÃO DE FILAMENTOS COMPÓSITOS BASEADOS EM
POLI(HIDROXIBUTIRATO)/CELULOSE BACTERIANA MICRONIZADA PARA
APLICAÇÃO NA ENGENHARIA TECIDUAL**

ARARAQUARA

2023

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

MATHEUS FELIPE CELESTINO

**OBTENÇÃO DE FILAMENTOS COMPÓSITOS BASEADOS EM
POLI(HIDROXIBUTIRATO)/CELULOSE BACTERIANA MICRONIZADA PARA
APLICAÇÃO NA ENGENHARIA TECIDUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

ARARAQUARA

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

C386o Celestino, Matheus Felipe

Obtenção de filamentos compósitos baseados em Poli (Hiboxibutiratro)/celulose bacteriana micronizada para aplicação na engenharia tecidual/Matheus Felipe Celestino. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2023.

72f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

1. Manufatura aditiva. 2. Celulose bacteriana. 3. Poli (hiboxibutiratro)
4. Engenharia tecidual. 5. Scaffolds. I. Título.

CDU 577.4

MATHEUS FELIPE CELESTINO

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 27 de fevereiro de 2023

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA


Profª Drª MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA
Universidade de Araraquara - UNIARA


Profª. Drª. JOSY ANTEVELI OSAJIMA FURTINI
Universidade Federal do Piauí - UFPI

RESUMO

A manufatura aditiva, também conhecida como impressão 3D, é uma tecnologia que permite a construção rápida de objetos com alta precisão. Essa tecnologia tem sido amplamente utilizada na engenharia tecidual para a obtenção de *scaffolds*, estruturas de suporte para o crescimento celular. Os *scaffolds* devem ser biodegradáveis, atóxicos e biocompatíveis e, por isso, há um crescente interesse na utilização de biopolímeros para sua obtenção, tais quais o poli(hidroxibutirato) (PHB) e a celulose bacteriana (CB) que, além de possuírem essas características, possuem também, respectivamente, propriedades osteoindutoras e de resistência mecânica e, portanto, podem ser aplicados para a obtenção de *scaffolds* aplicados no sistema esquelético. Nesse contexto, o objetivo principal do estudo foi a obtenção de filamentos compósitos baseados em PHB/CB micronizada e suas respectivas caracterizações para averiguação do potencial de obtenção de *scaffolds* utilizando a impressão 3D visando regeneração óssea. A CB micronizada foi obtida após a fragmentação em moinho de bolas de sobras de CB se encaixando no conceito da economia circular por utilizar um processo sustentável e sobras de outros processos industriais. Foram avaliados micronizados obtidos nas frequências de 10, 20 e 30 Hz e o micronizado obtido em 20 Hz foi selecionado para a obtenção dos filamentos ao passo que apresentou diâmetro médio de $124 \pm 13 \mu\text{m}$ e área superficial de $1,6 \text{ m}^2/\text{g}$, características que facilitariam a homogeneização com os *pellets* de PHB para a obtenção dos filamentos. Além disso, o grau de polimerização (DP) e o índice de cristalinidade (ICr) mensurados, 845 e 0,69 respectivamente, comprovaram a amorfização de parte da CB, o que torna o micronizado mais susceptível a degradação e reabsorção corporal, características importantes para os *scaffolds*. Obteve-se os filamentos variando-se a porcentagem de CB micronizada inserida em relação ao PHB. Apesar das concentrações variadas de CB, os filamentos compósitos apresentaram apenas os grupos funcionais do PHB, conforme demonstrado na espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) dos filamentos mostraram que as temperaturas de pico (T_{pico}) da degradação do PHB diminuem conforme aumenta-se a concentração de CB, sendo a menor igual a 248°C referente ao filamento compósito PHB/CB 2,0% que apresenta a maior concentração de CB. Embora tenha ocorrido uma variação no comportamento térmico dos filamentos essa não foi significativa para impossibilitar a impressão tendo em vista que a temperatura de fusão do PHB é de 170°C , porém os filamentos com concentrações de CB acima de 0,5% entupiram o bico da impressora.

Palavras-chave: Manufatura aditiva; Celulose bacteriana; Poli(hidroxibutirato); Engenharia tecidual; *Scaffolds*.

ABSTRACT

Additive manufacturing, also known as 3D printing, is a technology that allows the rapid construction of objects with high precision. This technology has been widely used in tissue engineering to obtain scaffolds, support structures for cell growth. Scaffolds must be biodegradable, non-toxic, and biocompatible and, therefore, there is a growing interest in the use of biopolymers to obtain them, such as poly(hydroxybutyrate) (PHB) and bacterial cellulose (BC) which, in addition to having these characteristics, also have, respectively, osteoinductive and mechanical resistance properties and, therefore, can be applied to obtain scaffolds applied to the skeletal system. In this context, the main objective of the study was to obtain composite filaments based on micronized PHB/BC and their respective characterizations to investigate the potential for obtaining scaffolds using 3D printing aimed at bone regeneration. The micronized BC was obtained after the fragmentation of BC scraps in a ball mill, fitting the concept of the circular economy by using a sustainable process and scraps from other industrial processes. Micronized obtained at frequencies of 10, 20 and 30 Hz were evaluated and the micronized obtained at 20 Hz was selected to obtain the filaments as it had a mean diameter of $124 \pm 13 \mu\text{m}$ and a surface area of $1.6 \text{ m}^2/\text{g}$, characteristics that would facilitate the homogenization with the PHB pellets to obtain the filaments. In addition, the degree of polymerization (DP) and the crystallinity index (ICr) measured, 845 and 0.69 respectively, confirmed the amorphization of part of the BC, which makes the micronized product more susceptible to degradation and body reabsorption, important characteristics for the scaffolds. The filaments were obtained by varying the percentage of micronized BC inserted in relation to the PHB. Despite the varying concentrations of BC, the composite filaments showed only the PHB functional groups, as demonstrated by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The derivatives of the thermogravimetric curves (DTG) of the filaments showed that the peak temperatures (T_{peak}) of PHB degradation decrease as the concentration of CB increases, the lowest is equal to 248°C referring to the composite filament PHB/CB 2, 0% which has the highest concentration of CB. Although there was a variation in the thermal behavior of the filaments, this was not significant to make printing impossible, considering that the PHB melting temperature is 170°C , but the filaments with CB concentrations above 0.5% clogged the nozzle from the printer.

Keywords: Additive manufacturing; Bacterial cellulose; Poly(hydroxybutyrate); Tissue engineering; Scaffolds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais tipos e técnicas de manufatura aditiva. Fonte: PRADEEP e PAUL, 2022	4
Figura 2. Esquema simplificado de manufatura aditiva utilizando a técnica de modelação por deposição fundida (FDM). Fonte: Adaptado de SANTIAGO et al (2021).	5
Figura 3. Estrutura geral dos polihidroxicanoatos (PHAs) e principais radicais. Fonte: Adaptado de MEHRPOUYA et al (2021).	7
Figura 4. Esquema representativo tridimensional (3D) da celulose bacteriana (CB). Fonte: DE OLIVEIRA BARUD et al (2016).	12
Figura 5. Resíduo (A) e micronizados de celulose bacteriana (CB) em 10 (B), 20 (C) e 30 (D) Hz.	18
Figura 6. Difrátogramas de raios-X dos resíduos de celulose bacteriana (CB) sem micronização e micronizados em 10, 20 e 30 Hz.	20
Figura 7. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do resíduo de celulose bacteriana (CB).	24
Figura 8. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 10 Hz.	24
Figura 9. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 20 Hz.	25
Figura 10. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 30 Hz.	25
Figura 11. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do resíduo de celulose bacteriana (CB).	26
Figura 12. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 10 Hz.	27
Figura 13. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 20 Hz.	27
Figura 14. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 30 Hz.	28
Figura 15. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do resíduo de celulose bacteriana (CB) e dos micronizados em 10, 20 e 30 Hz.	30
Figura 16. Microscopia força atômica do resíduo de celulose bacteriana (CB): (A) imagem 2D em $50 \mu\text{m}^2$, (B) imagem 2D em $10 \mu\text{m}^2$ e (C) imagem 3D em $50 \mu\text{m}^2$.	31
Figura 17. Microscopias de força atômica 2D (à esquerda) e 3D (à direita) dos resíduos de celulose bacteriana (CB) micronizados em 10, 20 e 30 Hz.	32

Figura 18. Gráfico de rugosidade média quadrática do resíduo de celulose bacteriana (CB) e dos micronizados em 10, 20 e 30 Hz.....	33
Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do resíduo de celulose bacteriana (CB).....	34
Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 10 Hz.....	34
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 20 Hz.....	35
Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 30 Hz.....	35
Figura 23. Filamento de Poli (3- hidroxibutirato) puro e filamentos compósitos baseados em Poli (3 - hidroxibutirato)(PHB)/ Celulose bacteriana (CB).....	41
Figura 24. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento de poli(hidroxibutirato) (PHB) puro.	42
Figura 25. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 0,25 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.....	43
Figura 26. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 0,5 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.....	43
Figura 27. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 1,0 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.....	44
Figura 28. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 2,0 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.....	44
Figura 29. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento de poli(hidroxibutirato) (PHB) puro.	45
Figura 30. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 0,25 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.....	46
Figura 31. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 0,5 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.....	46
Figura 32. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 1,0 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.....	47

Figura 33. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento compósito de poli(hidroxi-butirato) (PHB)/ 2,0 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.....	47
Figura 34. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz e dos filamentos de poli (hidroxi-butirato) (PHB) puro e dos filamentos compósitos baseados em PHB/CB.	48
Figura 35. Microscopias eletrônica de Varredura (MEV) dos filamentos: (A) PHB puro, (B) PHB + CB 0,25%, (C) PHB + CB 0,5%, (D) PHB + CB 1 % e (E) PHB + CB 2%.....	49
Figura 36. Scaffolds impressos utilizando o filamento de Poli (3 - hidroxi-butirato) (PHB) puro (à esquerda) e o filamento compósito baseado em Poli (3 - hidroxi-butirato) (PHB)/ Celulose bacteriana (CB) 0,25% (à direita).....	50

LISTA DE TABELAS

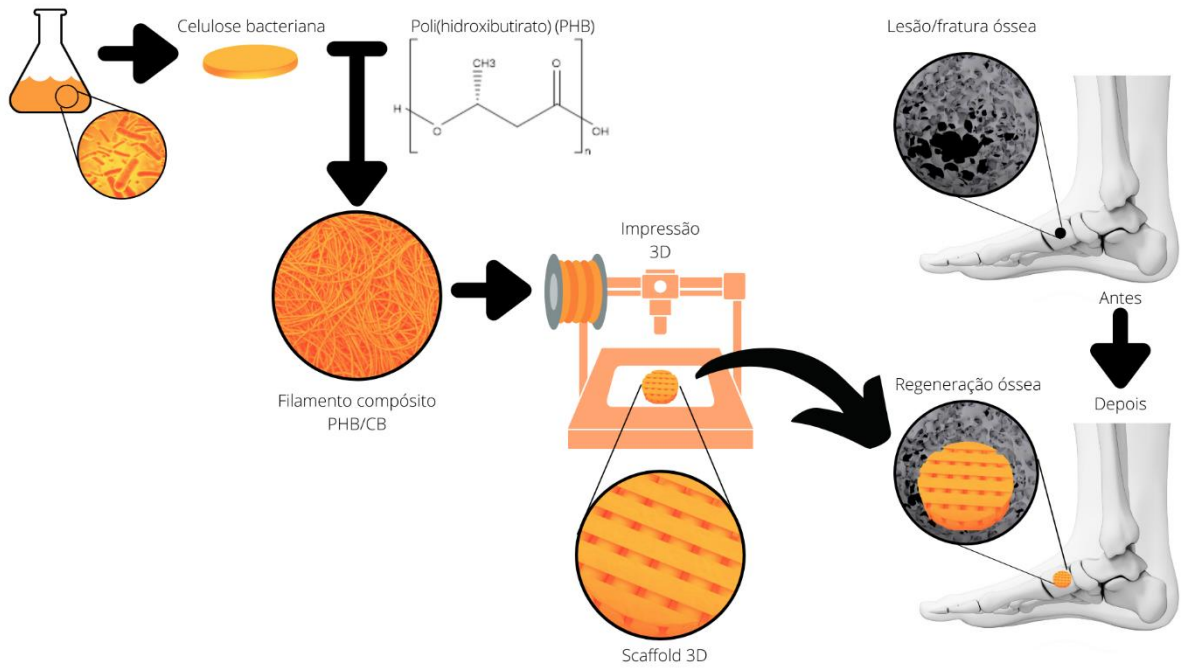
Tabela 1. Índices de cristalinidade determinados pelos métodos de Segal e de deconvolução de picos para os resíduos de celulose bacteriana (CB) sem micronização e micronizados em 10, 20 e 30 Hz.....	20
Tabela 2. Tamanho médio e desvio padrão dos resíduos de celulose bacteriana (CB) micronizados em 10, 20 e 30 Hz.	21
Tabela 3. Área superficial dos resíduos de celulose bacteriana (CB) micronizados em 10, 20 e 30 Hz.	22
Tabela 4. Grau de polimerização (DP) do resíduo de celulose bacteriana (CB) e dos micronizados em 10, 20 e 30 Hz.	29
Tabela 5. Concentrações de celulose bacteriana (CB) utilizadas nas composições dos filamentos compósitos baseados em PHB/CB.	39

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1 – CONTEXTUALIZAÇÃO.....	2
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo geral.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
CAPÍTULO 2 – CELULOSE BACTERIANA MICRONIZADA	12
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1. Obtenção dos micronizados.....	16
2.2. Difração de Raios-X (DRX)	16
2.3. Granulometria.....	16
2.4. Área superficial.....	16
2.5. Análise térmica.....	17
2.6. Grau de polimerização (DP).....	17
2.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	17
2.8. Microscopia de Força Atômica (AFM)	17
2.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	18
3.1. Obtenção dos micronizados.....	18
3.2. Difração de raios-X (DRX).....	18
3.3. Granulometria.....	21
3.4. Área superficial.....	22
3.5. Análise térmica.....	22
3.5.1. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG).....	22
3.5.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	25
3.6. Grau de polimerização (DP).....	28

3.7.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	29
3.8.	Microscopia de força atômica (AFM)	30
3.9.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	33
4.	CONCLUSÃO	36
CAPÍTULO 3 – FILAMENTOS COMPÓSITOS BASEADOS EM PHB/CB		37
1.	INTRODUÇÃO	37
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
2.1.	Obtenção dos filamentos compósitos baseados em PHB/CB	39
2.2.	Análise térmica.....	39
2.3.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	40
2.4.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	40
2.5.	Impressão 3D dos <i>scaffolds</i>	40
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	41
3.1.	Aspecto e caracterização macroscópica dos filamentos.....	41
3.2.	Análise térmica.....	41
3.2.1.	Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG).....	41
3.2.2.	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	45
3.3.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	47
3.4.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
3.5.	Impressão 3D do <i>scaffolds</i>	50
4.	CONCLUSÃO	51
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....		52
1.	CONCLUSÕES	52
2.	PERSPECTIVAS	52
REFERÊNCIAS.....		53

RESUMO GRÁFICO



APRESENTAÇÃO

Essa dissertação apresenta em quatro capítulos a obtenção e caracterização de filamentos compósitos de poli(hidroxibutirato) (PHB) e resíduos micronizados de CB para utilização na manufatura aditiva visando a obtenção de *scaffolds* biocompatíveis aplicáveis na regeneração tecidual óssea.

No capítulo 1 encontra-se uma breve introdução e contextualização sobre a importância da engenharia tecidual, impressão 3D, PHB, CB e os trabalhos que têm sido desenvolvidos nessa área.

O capítulo 2 aborda sobre micronizados de CB: obtenção, características e potenciais de aplicação. Apresenta-se os resultados e discussões das análises realizadas e os motivos da seleção do micronizado em 20 Hz.

O capítulo 3 apresenta os materiais e métodos da obtenção e caracterização dos filamentos compósitos de PHB e CB demonstrando as diferenças entre as composições e o efeito das mesmas nas caracterizações.

As conclusões e as perspectivas são desenvolvidas no capítulo 4.

CAPÍTULO 1 – CONTEXTUALIZAÇÃO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

O sistema esquelético, constituído por ossos, cartilagens, tendões e ligamentos, é responsável por diversas funções biomecânicas e fisiológicas no corpo humano tais como fornecer suporte e proteção aos órgãos moles (YI *et al*, 2022). Essas funções são essenciais para a vida e, portanto, demandam de atenção para com os componentes do sistema. Os ossos, componentes característicos do sistema, requerem preocupação, pois são vítimas de várias condições que podem ocasionar defeitos e/ou danos, como traumas, osteoporose, infecções e câncer (CHEN *et al*, 2021; MALLIAPPAN *et al*, 2022).

O osso é um tecido conjuntivo compósito heterogêneo composto por minerais (65% m/m) que confere dureza e resistência ao estresse mecânico, matéria orgânica (25% m/m) que confere flexibilidade e elasticidade e água (10 % m/m) (MALLIAPPAN *et al*, 2022). Apesar da elevada resistência mecânica e flexibilidade, as condições supracitadas podem ocasionar danos e/ou defeitos na matriz óssea. Quando lesionada, essa matriz possui a capacidade de se regenerar mimetizando exatamente a condição original, entretanto, para fraturas ou defeitos superiores ao dobro do diâmetro do osso afetado a autorreparação pode não ser adequada e eficiente, além de ser um processo extremamente demorado (CHEN *et al*, 2021; MAIA *et al*, 2022; MALLIAPPAN *et al*, 2022). Nesses casos, utilizam-se enxertos ósseos para fazer a reparação podendo estes serem autoenxertos, quando o osso é transplantado de um indivíduo para si mesmo, aloenxertos, quando o transplante ocorre entre indivíduos geneticamente diferentes, porém da mesma espécie, ou xenoenxertos, quando se realiza o transplante entre indivíduos de espécie diferentes (MAIA *et al*, 2022; YI *et al*, 2022).

Atualmente os autoenxertos são considerados o padrão ouro para o tratamento de fraturas ou defeitos ósseos e possuem uma taxa de sucesso superior a 90%, porém ainda sim apresentam uma série de problemas como complicações na coleta óssea, massa óssea limitada e morbidade em áreas doadoras, longos tempos de cirurgia, dores e infecções pós-operatórias no local da intervenção e cicatrizes (CHEN *et al*, 2021; MAIA *et al*, 2022; MALLIAPPAN *et al*, 2022).

Para lidar com essas limitações outras abordagens têm sido desenvolvidas e aprimoradas no campo da engenharia tecidual principalmente as estratégias focadas no uso de *scaffolds* (QU *et al*, 2019; MAIA *et al*, 2022). Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais (3D) porosas projetadas para o processo de regeneração tecidual servindo como carreador ou suporte para fixação, proliferação e diferenciação celular e suas interações com a matriz óssea (MOHAMMADI ZERANKESHI, BAKHSHI e ALIZADEH, 2022). Essas estruturas devem possuir características específicas como biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade, não imunogenicidade e apresentar propriedades mecânicas semelhantes ao osso (GHASSEMI *et al*, 2018; TARIVERDIAN *et al*, 2019; MAIA *et al*, 2022). Além disso, o *scaffold* deve apresentar morfologia semelhante ao do defeito e porosidade adequada, 10 – 30% para ossos corticais e 50 – 90% para ossos esponjosos (GHASSEMI *et al*, 2018).

Para que a morfologia e a porosidade sejam controladas é necessário um processo de fabricação que permite obter objetos com precisão e para isso existem diversas técnicas que podem ser empregadas como liofilização, evaporação de solvente, *electrospinning* e a manufatura aditiva.

A manufatura aditiva, também conhecida como impressão 3D, é um processo confecção de objetos personalizados através da sobreposição camada por camada de um determinado material distinguindo-se dos processos de fabricação convencionais, como processos subtrativos (fresagem e perfuração), processos formativos (fundição ou forjamento) e processos de união (soldagem) (CONNER *et al*, 2014; SANTIAGO *et al*, 2021). Utilizando a impressão 3D pode-se obter protótipos de forma rápida, simples e com toda a complexidade requerida. Através da impressão 3D é possível, por meio de *softwares* de design, ter total controle sobre a produção das peças, com predição de erros e a possibilidade de encerrar o processo imediatamente ao se notar alguma irregularidade no processo minimizando os gastos de tempo, energia e material (LINO e NETO, 2000; TAKAGAKI, 2013; CONNER *et al*, 2014; MEHRPOUYA *et al*, 2021; PRADEEP e PAUL, 2022).

Atualmente existem diversas tecnologias de manufatura aditiva capazes de fornecer protótipos com alta precisão em sua geometria, conforme demonstrado na Figura 1.

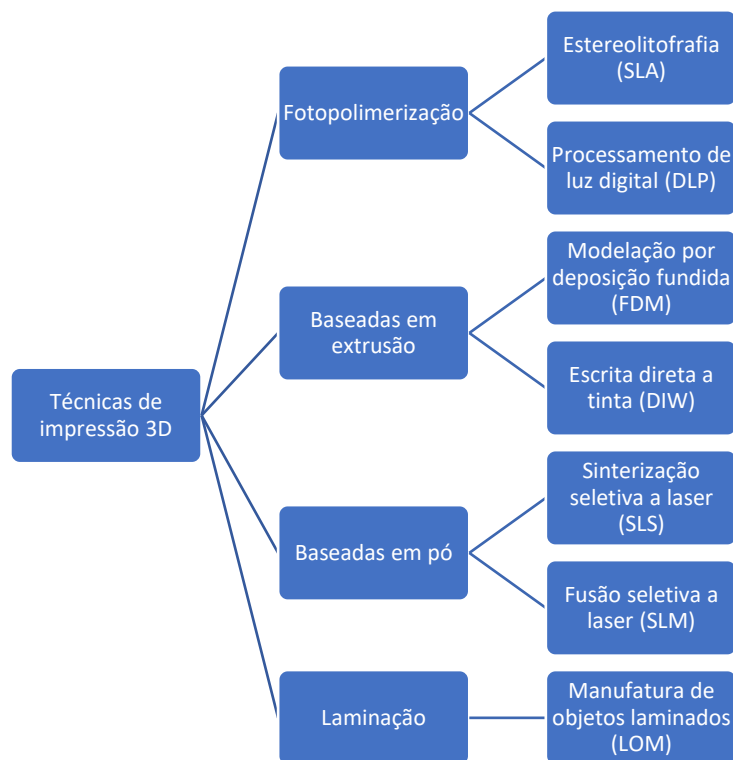


Figura 1. Principais tipos e técnicas de manufatura aditiva. Fonte: PRADEEP e PAUL, 2022

Cada uma dessas técnicas possui seus próprios métodos de operação, velocidade, volume, precisão do processo, acabamento e tipo de material utilizado, normalmente metais e polímeros (GORNÍ, 2001; TAKAGAKI, 2013; CONNER *et al*, 2014; GISARIO *et al*, 2019; GOH *et al*, 2020).

A SLA e o DLP são técnicas de fotopolimerização similares que confeccionam objetos utilizando resinas líquidas fotocuráveis, ou seja, resinas que se solidificam conforme a incidência de luz UV. A diferença entre essas técnicas é que o DLP utiliza um projetor como forma de manipulação da fonte de luz UV, enquanto a SLA utiliza *lasers* (TAKAGAKI, 2013).

A SLS é uma técnica que se baseiam na sinterização seletiva a laser dos grânulos de um material em pó camada a camada. A SLM é uma variação da SLS, após a fusão seletiva a técnica aquece o objeto suficientemente para que os grânulos também sejam fundidos em conjunto (TAKAGAKI, 2013).

A LOM, uma técnica de laminação, confecciona os objetos utilizando lâminas do material base unidas por calor e/ou pressão que são seccionadas utilizando *lasers* ou lâminas.

As técnicas baseadas em extrusão estão em ascensão atualmente, pois permitem a utilização de uma ampla gama de materiais como polímeros, hidrogeis e biotintas (PRADEEP e PAUL, 2022). Nestas técnicas um material é carregado à impressora e extrudado através de um cabeçote que se move horizontal e verticalmente sobre uma plataforma semiaderente. À medida que o material se solidifica o cabeçote passa a depositar a segunda camada de filamento e assim sucessivamente (TAKAGAKI, 2013; CONNER *et al*, 2014).

Entre as técnicas baseadas em extrusão a FDM é a técnica de impressão 3D que mais tem se destacado no mercado para a obtenção de *scaffolds*. A técnica utiliza filamentos para alimentar o cabeçote que os aquece até a temperatura de fusão para que então sejam extrudados camada por camada, conforme demonstrado na Figura 2 (TAKAGAKI, 2013; CONNER *et al*, 2014; SADEGHIANMARYAN *et al*, 2022).

A simplicidade e melhor custo-benefício da FDM fizeram com que ocorresse a disseminação das impressoras 3D que utilizam essa técnica sendo utilizadas não somente para a engenharia tecidual, mas também para fins educacionais e domésticos (TAKAGAKI, 2013; TORRADO PEREZ, ROBERSON e WICKER, 2014).

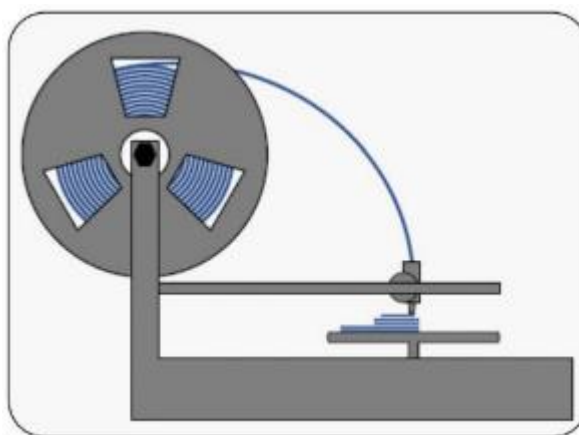


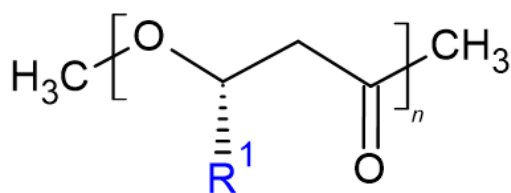
Figura 2. Esquema simplificado de manufatura aditiva utilizando a técnica de modelação por deposição fundida (FDM). Fonte: Adaptado de SANTIAGO *et al* (2021).

Embora simples, um dos grandes empecilhos da FDM é que as impressoras disponíveis comercialmente que utilizam essa técnica possuem um limite superior de aquecimento igual a 300 °C, portanto, materiais com ponto de fusão (T_m) superiores a essa temperatura não podem ser utilizados fazendo com que apenas alguns materiais poliméricos possam ser utilizados (TORRADO PEREZ, ROBERSON e WICKER, 2014).

Os polímeros são a classe de materiais mais utilizada na manufatura aditiva em virtude da alta disponibilidade, diversidade de aplicações e baixo custo (MEHRPOUYA *et al*, 2021). Hoje em dia, a utilização de biopolímeros, polímeros de origens naturais, é preferível para impressão 3D voltada à engenharia tecidual por serem biocompatíveis, renováveis, não tóxicos, biodegradáveis, sustentáveis e ecologicamente corretos (UDAYAKUMAR *et al*, 2021). Além disso, podem apresentar propriedades mecânicas similares às propriedades dos polímeros baseados em petróleo (JIANG e ZHANG, 2017). Essas características fazem com que os biopolímeros sejam aplicados em diversas áreas e indústrias como, por exemplo, na cosmética, farmacêutica, têxtil, medicina regenerativa e engenharia de tecidos (LIU, J. *et al*, 2019; LI *et al*, 2021).

O poli (ácido lático) (PLA), obtido através da polimerização do seu monômero, o ácido lático, é um exemplo de biopolímero termoplástico biodegradável e biorreabsorvível aplicado com sucesso na medicina regenerativa e engenharia de tecidos sendo amplamente utilizado para a construção de *scaffolds* via impressão 3D FDM (CARVALHO, 2013; JIANG e ZHANG, 2017; MATOS *et al*, 2019; BARUD *et al*, 2020).

Além do PLA, uma classe de biopolímeros tem ganho bastante destaque nos últimos anos são os polihidroxicanoatos (PHAs). Os PHAs possuem uma temperatura de transição vítrea, T_g , mais baixa em comparação ao PLA, porém, diferentemente do PLA, os PHAs são sintetizados diretamente a partir do metabolismo bacteriano ocorrendo em baixas concentrações de nitrogênio, fósforo, oxigênio ou magnésio e um excesso de carbono, representando uma vantagem quando comparado ao PLA. Outras vantagens dos PHAs em relação ao PLA são a total biodegradabilidade e a multiplicidade de suas estruturas – Figura 3 (JIANG e ZHANG, 2017; MEHRPOUYA *et al*, 2021).



R ¹	Nomenclatura
CH ₃	Poli(3-hidroxi butirato) (PHB)
C ₂ H ₅	Poli(3-hidro valerato) (PHV)
C ₃ H ₇	Poli(3-hidroxi hexanoato) (PHHx)
C ₅ H ₁₁	Poli(3-hidroxi octanoato) (PHO)

Figura 3. Estrutura geral dos polihidroxi alcanoatos (PHAs) e principais radicais. Fonte: Adaptado de MEHRPOUYA et al (2021).

Um dos membros mais estudados da família dos PHAs é o poli(hidroxi butirato) (PHB). O PHB é um biopolímero biodegradável, piezoelétrico e biocompatível com várias linhagens celulares, incluindo osteoblastos, células epiteliais e condrócitos. A alta biocompatibilidade se deve ao fato de naturalmente haver a presença de PHB de baixo peso molecular no organismo, além de seu produto de degradação, o ácido 3-hidroxi butírico, ser um metabólito natural de diversos órgãos como cérebro, coração, pulmão, dentre outros. Essas características, juntamente com a capacidade de estimular o crescimento ósseo, as propriedades mecânicas e o alto custo-benefício, fazem do PHB um material com enorme potencial de aplicação na área médica (PARVIZIFARD e KARBASI, 2020; SOLEYMANI EIL BAKHTIARI, KARBASI e TOLOUE, 2021).

Embora tenha características desejáveis para um amplo espectro de aplicações, o PHB possui algumas deficiências que limitam sua utilização para produção de *scaffolds* aplicados na engenharia tecidual, principalmente se utilizada a técnica de FDM, como: hidrofobicidade, baixa taxa de degradação, fragilidade e contaminação por compostos pirogênicos e instabilidade térmica (PARVIZIFARD e KARBASI, 2020; SOLEYMANI EIL BAKHTIARI, KARBASI e TOLOUE, 2021). Para contornar essas deficiências uma das estratégias utilizadas é a obtenção de compósitos, materiais multifásicos que exibem as propriedades inertes de cada constituinte e propriedades intermediárias decorrentes da região interfacial (SILVA, 2014; SOLEYMANI EIL BAKHTIARI, KARBASI e TOLOUE, 2021).

A obtenção de compósitos PHB/outras biopolímeros tem sido amplamente empregada para suprir os limites do PHB, sendo a celulose um dos biopolímeros mais utilizados. DA SILVA MOURA et al (2019) utilizaram fibras de coco tratadas (40-60%

de celulose na composição) para o reforço das propriedades mecânicas e observaram que as fibras melhoraram a estabilidade térmica e o módulo de elasticidade do compósito sem a necessidade de outros aditivos. BARUD *et al* (2011a) utilizaram celulose bacteriana (CB) e obtiveram compósitos com melhores propriedades mecânicas do que para os polímeros isolados, principalmente quanto a resistência à tração, alongamento até a ruptura e o módulo de Young.

Composta por unidades de β -D-glicopirranose unidas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas, a celulose é o polímero natural mais abundante da Terra (SILVA *et al*, 2009; BARUD *et al*, 2011a; BARUD *et al*, 2011b; KUHNT. e CAMARERO-ESPINOSA, 2021). Esse homopolissacarídeo é o componente principal da parede celular, fornecendo rigidez e firmeza às plantas. Encontrada em grandes quantidades em fontes vegetais como algodão, linho e juta, a celulose também pode ser obtida através de outras fontes como algas marinhas, musgos, animais marinhos e bactérias (LIMA *et al*, 2015). Por conta da elevada resistência física e mecânica, ausência de impurezas e elevada biocompatibilidade, a CB tem sido um material muito útil para a obtenção de biocompósitos e, conseqüentemente, para a construção de *scaffolds* para o crescimento celular e engenharia de tecidos. Entretanto, assim como o PHB, a CB também possui limitações: a CB não é facilmente absorvida pelo corpo, forma uma malha densa que pode limitar a adesão e o crescimento celular e não possui propriedades antibacterianas (DE OLIVEIRA BARUD *et al*, 2015; COURTENAY *et al*, 2017). Além disso, apesar da aplicabilidade, o baixo rendimento do processo produtivo torna a CB comercialmente onerosa (ANTONIO *et al*, 2012).

A reabsorção da CB pelo corpo por ser incrementada através da mudança da sua estrutura de cristalina para uma estrutura amorfa, efeito que pode ser obtido por meio da micronização da CB empregando processos mecanoquímicos, processos que utilizam força mecânica externa, tal como a moagem, para alterar a estrutura de um determinado material (STOJAKOVIC, J. e MACGILLIVRAY, L. R., 2017). Segundo PARK *et al* (2010) a amorfização da celulose proporciona maior acessibilidade para enzimas fazendo, assim, com que a CB seja degradada mais rapidamente, uma característica importante para os componentes dos *scaffolds*.

A demanda de CB, que viria a ser outro empecilho relevante, pode ser suprida utilizando-se resíduos de CB produzidas para outros fins, introduzindo-se um conceito

estratégico denominado Economia Circular (EC). Apesar de apresentar desafios como os relativos à termodinâmica, definição dos limites do sistema de EC e desafios na governança e gestão dos fluxos de materiais e energia interorganizacionais e intersetoriais do tipo EC, a EC é vista como um pré-requisito da sustentabilidade (KORHONEN, HONKASALO e SEPPÄLÄ, 2018). A EC enfatiza a reutilização de produtos, componentes e materiais, remanufatura, renovação, reparo, cascadeamento e atualização, além de fontes de energia renováveis, do início ao fim do processo o que destaca a importância de ciclos de materiais de alto valor e alta qualidade de uma nova maneira e mostra as possibilidades da economia compartilhada juntamente com a produção sustentável para uma cultura de produção-consumo mais sustentável (GEISSDOERFER, 2017; KORHONEN, HONKASALO e SEPPÄLÄ, 2018).

Nesse contexto, tendo em vista a demanda e a importância da engenharia de tecidos e cientes da busca por novos biomateriais com boas propriedades e amplo espectro de aplicação, os compósitos baseados em PHB/CB podem fazer com que suas propriedades individuais se complementem e suas limitações para utilização na engenharia tecidual sejam suplantadas. Assim, os compósitos poliméricos de PHB/CB, produzidos por meio da adição da CB micronizada ao PHB podem ser utilizados para a obtenção de filamentos com características desejáveis para a impressão de *scaffolds* aplicados na regeneração tecidual por meio da impressão 3D FDM propondo um novo material par tal fim justificando assim sua obtenção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse capítulo consiste em contextualizar e justificar a obtenção de filamentos compósitos baseados em PHB/CB para aplicação na construção de *scaffolds* biocompatíveis utilizados na engenharia tecidual óssea e produzidos através da manufatura aditiva empregando a técnica de FDM.

2.2. Objetivos específicos

- Mostrar a engenharia tecidual como uma alternativa para os métodos de manutenção e regeneração óssea utilizados atualmente;
- Evidenciar a importância das pesquisas por novos biomateriais e biocompósitos para aplicação na engenharia tecidual;
- Difundir a aplicação da manufatura aditiva através da utilização de biopolímeros reaproveitados;

CONCLUSÃO

Com o aumento da população mundial e a elevação da expectativa de vida houve um aumento da necessidade de procedimentos ortopédicos para reparações ósseas decorrentes de traumas, doenças degenerativas e neoplasias. Por intermédio da obtenção e aplicação de filamentos compósitos baseados em PHB/CB via manufatura aditiva esses procedimentos podem ser realizados em maior quantidade, com maior rapidez, precisão e menores taxas de rejeição tendo em vista a elevada compatibilidade dos biopolímeros aplicados facilitando o dia a dia e melhorando a qualidade de vida dos indivíduos. O emprego da manufatura aditiva na engenharia tecidual possibilita não somente a economia de gastos de tempo, energia e dinheiro com procedimentos, mas também economia com o material utilizado se adotando o conceito da economia circular, algo importante para a sustentabilidade líquida global.

CAPÍTULO 2 – CELULOSE BACTERIANA MICRONIZADA

1. INTRODUÇÃO

Relatada pela primeira vez por Brown (1886) a CB, apresentada na Figura 4, pode ser produzida por diferentes bactérias, sejam elas Gram-negativas, como as do gênero *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Alcaligenes*, ou gram-positivas, como a *Sarcina ventriculi* (WANG, TAVAKOLI e TANG, 2019; SEDDIQI *et al*, 2021). Como mencionado anteriormente, a CB é composta por unidades de β -D-glicopiranosose unidas entre si por ligações β -1,4-glicosídicas dispostas em uma rede de fibrilas em forma de fita com menos de 100 nm de comprimento e 2-4 nm de diâmetro e, diferentemente da celulose de origem vegetal, essa rede é livre de lignina, hemicelulose e outros constituintes dos materiais lignocelulósicos (BARUD *et al*, 2011b).

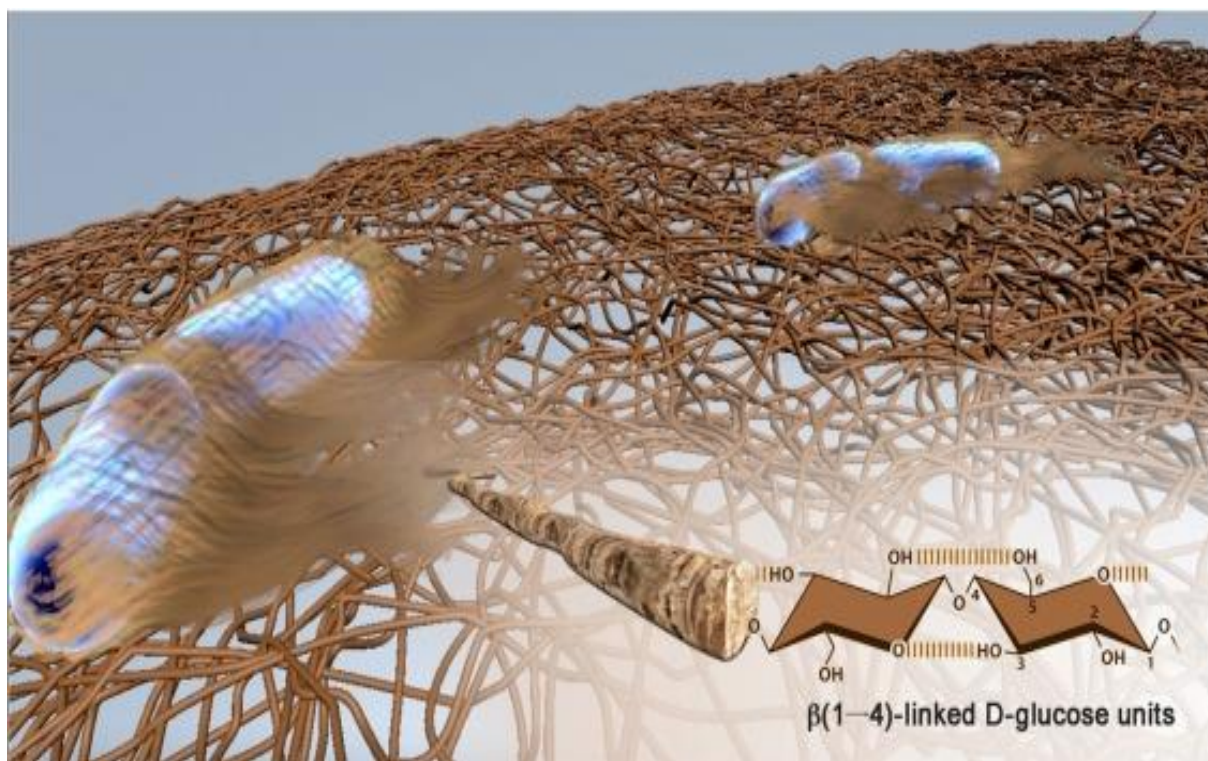


Figura 4. Esquema representativo tridimensional (3D) da celulose bacteriana (CB). Fonte: DE OLIVEIRA BARUD *et al* (2016).

Além da composição a CB se difere das celuloses de outras fontes ao apresentar elevado grau de pureza, elevado grau de polimerização (até 8000), cristalinidade (70-80%), alto teor de água (até 99%), resistência física e mecânica, flexibilidade e elevada biocompatibilidade (BARUD *et al*, 2011b; DE OLIVEIRA BARUD *et al*, 2015).

Desde que foi descoberta a CB, também conhecida por biocelulose, tem atraído o interesse de diversas áreas tais como a têxtil, eletrônica, alimentícia, cosmética e médica pois, além da alta pureza, fibras ultrafinas, estrutura cristalina, alta resistência mecânica, alta capacidade de retenção de água e alto grau de polimerização, a CB é um biomaterial não citotóxico, não genotóxico, biodegradável e biocompatível (DE OLIVEIRA BARUD *et al*, 2015; SEDDIQI *et al*, 2021). Esse interesse é refletido à medida que se pode encontrar uma variedade de trabalhos, produtos e processos envolvendo a celulose bacteriana, sendo alguns já consolidados no mercado como os curativos para cicatrização de feridas de queimaduras e úlceras, e outros considerados promissores, como para utilização em diodos orgânicos emissores de luz (OLED), sigla do inglês para “Organic Light Emitting Diodes” (LEGNANI *et al*, 2019; ZHENG *et al*, 2020).

A elevada aplicabilidade da CB não se deve apenas às características únicas, mas também às formas e estruturas empregadas. A CB pode ser utilizada na forma de membrana, seja úmida ou seca, na forma de nanomateriais de celulose (CNM), como os nanocristais de celulose (CNC), as nanofibras de celulose (CNF), obtidos através da ruptura dos domínios amorfos ou da simples separação dos feixes das fibras, e como partículas micronizadas de celulose (CMP), obtidas através de tratamentos capazes de enfraquecer as interações supramoleculares em um processo denominado ativação da celulose (KUHNT. e CAMARERO-ESPINOSA, 2021).

Apesar das excelentes propriedades, das diversas formas de utilização e, conseqüentemente, da alta aplicabilidade, empregar a CB possui adversidades a serem superadas como a produção em grande escala, o custo, a qualidade da CB e a utilização de reagentes químicos perigosos nos processos de obtenção dos CNM e CMP.

Atualmente em países asiáticos como Indonésia e Filipinas são sintetizadas entre 500 e 1500 toneladas de CB por ano, entretanto, a produção é manual e, portanto, não possui condições controladas o que dificulta o escalonamento e a obtenção de materiais com alta qualidade (KLEMM *et al*, 2018). Dessa forma, nos últimos anos realizou-se uma série de investimentos para melhorar as técnicas de cultivo de CB e, assim, ampliar sua utilização. Os investimentos permitiram o acesso às condições de produção controladas, obtenção de materiais de alta qualidade e ampliação da escala de produção, no entanto, reduzir os custos de operação e a

produção contínua sendo um desafio, por isso, cada vez mais, tem-se buscado opções como novos projetos de biorreatores e automação e a utilização de matérias primas alternativas, principalmente resíduos (KLEMM *et al*, 2018; SEDDIQI *et al*, 2021).

Utilizar resíduos e desenvolver produtos e processos que reduzam a utilização e a geração de substâncias perigosas estão em concordância com o conceito estratégico da economia circular e, conseqüentemente, com o Acordo de Paris, que visa reduzir a emissão de gases do efeito estufa e combater as mudanças climáticas, e aos Objetivos para o Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU) (GUPTA *et al*, 2021; VELENTURF e PURNELL, 2021). A economia circular visa atingir níveis de consumo e produção sustentáveis, sem riscos à saúde humana e ao meio ambiente, enfatizando a reutilização de produtos, componentes e materiais, além de fontes de energia e processos renováveis (GEISSDOERFER, 2017; KORHONEN, HONKASALO e SEPPÄLÄ, 2018; GUPTA *et al*, 2021; VELENTURF e PURNELL, 2021).

MELO *et al* (2020), por exemplo, demonstraram a economia circular da CB ao reciclar resíduos de CB provenientes da moldagem comercial de curativos para feridas, obter CNC e desenvolver uma embalagem sustentável e biodegradável.

Outro exemplo da Economia Circular atuando na cadeia produtiva da CB e de seus derivados é substituição de processos e/ou reagentes químicos perigosos empregados principalmente nos processos de pré-tratamento e de hidrólise da CB para a obtenção de CNM e CMP por processos e/ou reagentes verdes (HUANG *et al*, 2019). Atualmente é comum fazer uso de agentes de intumescimento como o dimetilsulfóxido (DMSO) e o dimetilformamida (DMF) para ativar a celulose e assim alcançar as partículas micronizadas, porém esses reagentes, além de apresentarem risco à saúde humana, não são ecológicos e exigem gastos financeiros e energéticos para produção, purificação, coleta, reciclagem e descarte, por isso, cada vez mais tem-se buscados alternativas sustentáveis para a obtenção dessas estruturas, como, por exemplo, processos mecanoquímicos (HUANG *et al*, 2019).

A mecanoquímica pode ser definida como reações químicas e mudanças estruturais induzidas por energia mecânica externa advinda de processos mecânicos como, por exemplo, moagem e agitação (STOJAKOVIC, J. e MACGILLIVRAY, L. R., 2017; TSUZUKI *et al*, 2022). A mecanoquímica conduzida por moagem, denominada

micronização, é uma estratégia poderosa para síntese rápida, limpa e ambientalmente amigável ao evitar a utilização de solventes perigosos e processos dispendiosos para obtenção dessas estruturas (TONG, M.-L. e CHEN, X.-M., 2017).

Embora seja um processo mecanoquímico simples, a moagem afeta diretamente a estrutura da CB, logo, a estrutura final e, conseqüentemente, as características são dose/dependente dos parâmetros do processo principalmente em relação à frequência e ao tempo empregado, portanto é essencial caracterizar os micronizados obtidos com o intuito de conhecer sobre a estrutura e propriedades e, então, direcionar para uma aplicação. (MATTONAI *et al*, 2018; HUANG *et al*, 2019; LING *et al*, 2019).

Nesse contexto, visando se encaixar dentro do conceito da economia circular e obter um produto com alto valor agregado para a obtenção de filamentos compósitos baseados em poli(hidroxibutirato)/celulose bacteriana micronizada para aplicação na engenharia tecidual, utilizou-se resíduos industriais de celulose bacteriana para obter micronizados aplicando a moagem por moinho de bolas em diferentes frequências e posterior caracterização para a seleção do micronizado ideal para o propósito da dissertação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos micronizados

Os resíduos de celulose bacteriana foram fornecidos pela empresa BioSmart Nanotechnology LDTA ([“https://www.biosmartnano.com/”](https://www.biosmartnano.com/)) e micronizados utilizando o moinho de bolas Polymix® PX-IG 2000 Impact Grinder da empresa Kinematica por 20 minutos nas frequências de 10, 20 e 30 Hz. Posteriormente, para o estudo da influência da moagem, os micronizados e o resíduos foram submetidos às análises de caracterização.

2.2. Difração de Raios-X (DRX)

Realizou-se a difração de raio-X (DRX) utilizando um difratômetro Shimadzu modelo XRD-6000, operando a uma potência de 40 kV com 40 mA de corrente e radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54148 \text{ \AA}$), no intervalo angular de 2θ de 5 a 40° , velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$ e passo angular de $0,02^\circ$. A partir dos difratogramas obtidos utilizou-se os métodos de Segal e de deconvolução de picos para determinar e analisar a influência da micronização nos índices de cristalinidade (ICr).

A Equação utilizada para o método de Segal é dada por:

$$\text{ICr} = \frac{(I_{200} - I_{am})}{I_{200}} \quad (1)$$

na qual ICr expressa o índice de cristalinidade relativo, I_{200} é a intensidade máxima (em unidades arbitrárias) do pico referente ao plano (200) e I_{am} é a intensidade de difração nas mesmas unidades em $2\theta = 18^\circ$.

Para determinar a porção cristalina utilizando a deconvolução de picos utilizou-se o a função pseudovoight 1. Através dessa função é possível determinar os picos referentes à porção cristalina e à porção amorfa e suas respectivas participações na curva acumulativa.

2.3. Granulometria

Determinou-se a granulometria dos micronizados utilizando o analisador do tamanho de partículas PSA 1190 LD da Anton-Paar.

2.4. Área superficial

A área superficial dos micronizados foi determinada através do método B.E.T. utilizando o analisador de área superficial e tamanhos de poros NOVAtouch da Anton-Paar com nitrogênio como adsorbato.

2.5. Análise térmica

As análises térmicas, análise termogravimétrica (TGA), derivada termogravimétrica (DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram realizadas utilizando o equipamento SDT Q600 da TA Instruments. As amostras foram aquecidas em um cadinho de alumina de 30 a 600 °C, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/min.

2.6. Grau de polimerização (DP)

O grau de polimerização da celulose (DP) foi determinado aplicando os procedimentos da norma TAPPI T 230om-94: *Viscosity of pulp (capillary viscometer method)* (2013) utilizando o viscosímetro tipo Cannon-Fenske transparente nº150. Realizou-se as medições dos tempos em triplicata e a média obtida foi utilizada para calcular o grau de polimerização seguindo os cálculos apresentados por ANDRITSOU *et al* (2018).

2.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Realizou-se a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR) das amostras moídas e do resíduo utilizando um espectrofotômetro Bruker-Vertex 70. Obteve-se o espectro utilizando 64 varreduras de 4500 a 450 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} .

2.8. Microscopia de Força Atômica (AFM)

As microscopias de força atômica (AFM) foram realizadas utilizando o TOSCA 400 da Anton-Paar com mesa de isolamento ativo de vibração para bancadas. Utilizou-se o modo *tapping* e *cantilever* tipo Arrow™ NCR da Nanoworld.

2.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) foram obtidas utilizando o microscópio da JEOL, modelo 7500F, com aceleração de voltagem de 2,00 kV. Os micronizados foram fixados em um suporte de cobre com fita adesiva dupla face de carbono e recobertos com carbono.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Obtenção dos micronizados

A CB foi micronizada por 20 minutos em três diferentes frequências de moagem: 10, 20 e 30 Hz. Observou-se que, ao final da moagem, os micronizados em 10 Hz, Figura 5B, assemelhavam-se a pequenos flocos dos resíduos de CB (Figura 5A) enquanto que os micronizados em 20 e 30 Hz (Figura 5C e 5D respectivamente) ficaram com um aspecto de pó. Notou-se ainda um tom amarelado no micronizado em 30 Hz, possivelmente ocorrido pelo aumento da temperatura do processo ocasionado pelas colisões das bolas.



Figura 5. Resíduo (A) e micronizados de celulose bacteriana (CB) em 10 (B), 20 (C) e 30 (D) Hz.

3.2. Difração de raios-X (DRX)

O processo mecanoquímico, amplamente difundido na literatura, têm sido aplicado para a obtenção de materiais micronizados. Essa técnica fragmenta a celulose em micropartículas por meio de colisões mecânicas que quebram as ligações de hidrogênio, responsáveis pela maioria das ligações intra e intermoleculares e, conseqüentemente, pela estrutura cristalina tridimensional (MATTONAI *et al*, 2018; HUANG *et al*, 2019; LING *et al*, 2019).

Celuloses com índices elevados de cristalinidade possuem a estrutura mais organizada e, portanto, são mais estáveis térmica e mecanicamente e podem atuar como aditivos de reforço de propriedades mecânicas e como recursos sustentáveis para combustíveis líquidos e produtos químicos, enquanto celuloses com alto teor amorfo são mais acessíveis, susceptíveis ao ataque de reagentes, e possuem maior capacidade de sorção sendo mais facilmente digeridas por enzimas e possibilitando

interação com diversos reagentes (CIOLACU, CIOLACU e POPA, 2010; PARK *et al*, 2010; IOELOVICH, 2021).

Para o desenvolvimento dos filamentos compósitos é necessário que os micronizados apresentem um balanço adequado entre as características de uma celulose cristalina e uma celulose amorfa ao passo que a CB, nesse caso, é um agente de reforço, mas também precisa ser degradada pelo organismo à medida que as células se diferenciam e o tecido se regenera. Logo, é essencial determinar a cristalinidade do micronizado, propriedade indicada pelo IC_r .

Optou-se por determinar o IC_r por meio da avaliação dos difratogramas de raio-X pela simplicidade das técnicas empregadas, tais como o método de Segal e o método de deconvolução de picos.

O método de Segal considera apenas as alturas nos difratogramas (I_{200} e I_{am} - intensidade máxima do pico referente ao plano (200) e a intensidade de difração da porção amorfa onde $2\theta = 18^\circ$, respectivamente) e, por isso, é o método mais simples e, conseqüentemente, o mais utilizado na medição dos IC_r .

PARK *et al* (2010) relataram que os picos I_{200} e I_{am} não estão alinhados com a altura máxima do pico do amorfo, assim, o valor I_{am} é significativamente subestimado, resultando em uma superestimação do IC_r , além disso, destacaram a omissão do método para as contribuições dos demais picos cristalinos e suas respectivas variações de larguras. LING *et al* (2019) também criticaram o método alegando que a área sob os picos é mais importante que a altura tendo em vista que parte da intensidade de difração atribuída ao material amorfo pelo método de Segal pode ser devido à sobreposição dos picos largos resultantes de pequenos cristalitos.

Apesar das críticas, esse método é útil para comparar as diferenças relativas entre amostras justificando assim o emprego da técnica, porém ela não deve ser usada como um método para estimar a quantidade de material cristalino e amorfo em uma amostra de celulose (PARK *et al*, 2010).

Para estimar as porções cristalinas e amorfas utilizou-se o método de deconvolução de picos, pois este considera as contribuições da celulose amorfa e cristalina para todo o espectro e, por isso, essa técnica possui maior precisão para determinar o IC_r quando comparado ao método de Segal. Embora seja mais preciso que o método de Segal, a deconvolução não se apresenta como o melhor método para determinar o IC_r da celulose tendo em vista que os picos apresentados são muito

amplos e não bem resolvidos, com picos sobrepostos, porém, é uma técnica que apresenta uma boa aproximação do IC_r sem grandes problemas (PARK *et al*, 2010).

Ambas técnicas foram aplicadas para calcular os IC_r das amostras de celulose bacteriana micronizada e do resíduo de CB baseando-se nos difratogramas apresentados na Figura 6 e os resultados apresentados na Tabela 1.

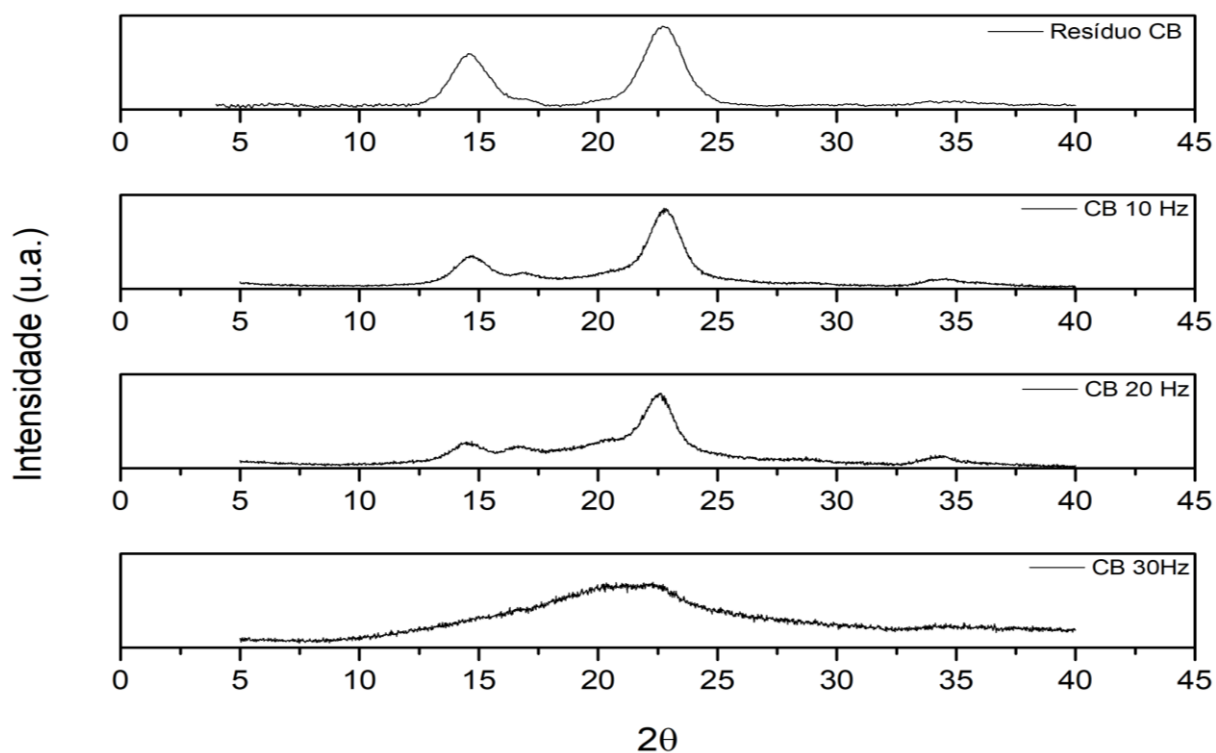


Figura 6. Difratogramas de raios-X dos resíduos de celulose bacteriana (CB) sem micronização e micronizados em 10, 20 e 30 Hz.

Tabela 1. Índices de cristalinidade determinados pelos métodos de Segal e de deconvolução de picos para os resíduos de celulose bacteriana (CB) sem micronização e micronizados em 10, 20 e 30 Hz

Método	Resíduo	CB 10 Hz	CB 20 Hz	CB 30 Hz
Segal	0,99	0,89	0,81	0,27
Deconvolução	0,99	0,80	0,69	0,32

Observando os valores obtidos percebe-se que o método de Segal fornece maiores valores de IC_r quando comparado com o método de deconvolução de picos, exceto pelo IC_r do micronizado em 30 Hz. Esses valores retratam a superestimação do IC_r relatada anteriormente e reforçam os resultados obtidos por PARK *et al* (2010), LING *et al* (2019) e LAN *et al*, (2022).

Observando-se os valores do IC_r nota-se que a CB micronizada em 10 Hz manteve a maior parte de sua estrutura cristalina, enquanto a CB micronizada em 30 Hz teve suas ligações quebradas e, conseqüentemente, apresentou o domínio da porção amorfa. A CB micronizada em 20 Hz apresentou maior equilíbrio entre as porções, o que pode favorecer a obtenção do compósito.

3.3. Granulometria

Os resultados da análise granulométrica, mostrados na Tabela 2, demonstraram uma relação inversamente proporcional entre a frequência de moagem e o diâmetro médio dos micronizados: à medida que a frequência aumenta o diâmetro médio diminui. Essa relação pode ser observada nas três faixas de medições, D10, D50 e D90, que representam, respectivamente, os percentis 10, 50 e 90 do volume total de partículas.

A moagem de bolas reduziu o diâmetro médio das partículas, porém observa-se variações do desvio padrão nos percentis. Na frequência de 10 Hz houve a redução das partículas, porém não de todas, logo, o desvio padrão observado foi superior aos desvios das demais frequências empregadas.

Na frequência de 30 Hz observa-se o aumento do desvio padrão em relação ao desvio observado em 20 Hz. O ocorrido, observado anteriormente nos trabalhos de VAN CRAEYVELD *et al* (2009), NIEMI *et al* (2012), GAO *et al* (2017) e ZHENG *et al* (2018), se deve aos fenômenos aglomerativos que ocorrem em processos mais energéticos e/ou mais longos onde a porção amorfa do material é gradualmente mais exposta. Nesse caso, ocorrem os fenômenos de quebra e aglomeração simultaneamente.

Tabela 2. Tamanho médio e desvio padrão dos resíduos de celulose bacteriana (CB) micronizados em 10, 20 e 30 Hz.

Amostra	Diâmetro médio (μm)		
	D10	D50	D90
10 Hz	$33,3 \pm 6,4$	$109,9 \pm 18,6$	$276,1 \pm 87,5$
20 Hz	$7,8 \pm 0,7$	$53,6 \pm 3,5$	$123,8 \pm 12,7$
30 Hz	$6,4 \pm 1,8$	$41,5 \pm 12,6$	$74,9 \pm 24,4$

O diâmetro médio dos micronizados e seus respectivos desvios padrão são parâmetros fundamentais para a aplicação do micronizado na obtenção do filamento, pois interferem diretamente na obtenção de um compósito homogêneo e na capacidade desse compósito ser extrudado de forma uniforme, sem quebras e sem causar o entupimento dos cabeçotes da extrusora e da impressora 3D.

O micronizado em 10 Hz apresentou diâmetro e desvio padrão elevado comparado aos demais, o que poderia vir a ser um empecilho para a obtenção e impressão do filamento. Os micronizados em 20 e 30 Hz apresentaram diâmetros próximos entre si, porém o desvio padrão dos micronizados em 20 Hz foi menor, portanto, os micronizados em 20 Hz poderiam fornecer uma melhor homogeneidade aos filamentos.

3.4. Área superficial

Na análise da determinação da área superficial esperava-se que a relação entre o valor obtido e a frequência de moagem estabelecessem uma proporcionalidade direta de modo que o incremento da frequência de moagem aumentasse a área superficial observada assim como os resultados da análise granulométrica e os resultados obtidos por LAN *et al* (2022). Essa relação foi observada, conforme demonstrado na Tabela 3, entretanto, notou-se que na frequência de 30 Hz a área superficial obtida diminuiu em comparação às moagens realizadas em 10 e 20 Hz indicando, novamente, assim como observado na determinação do diâmetro médio, a agregação dos micronizados em virtude da alta energia transferida no processo possibilitando o aumento da porção amorfo da celulose e, conseqüentemente, a agregação dos mesmos.

Tabela 3. Área superficial dos resíduos de celulose bacteriana (CB) micronizados em 10, 20 e 30 Hz.

Amostra	Área Superficial (m ² /g)
10 Hz	1,47
20 Hz	1,59
30 Hz	1,20

3.5. Análise térmica

3.5.1. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG)

Por meio da TGA e DTG, Figuras 7 – 10, é possível observar, respectivamente, a faixa de temperatura onde ocorre perdas de massa significativas e as temperaturas nas quais a taxa de variação é máxima, T_{pico} , bem como as temperaturas de início, T_{onset} , e de fim, T_{offset} , da inflexão da TG.

Ao analisar a TGA e a DTG observam-se dois eventos com perdas de massas consideráveis em todas as amostras corridas. No primeiro evento, entre 50 e 150 °C, ocorre a perda de aproximadamente 5% da massa inicial que corresponde à vaporização da umidade. No segundo evento, entre 250 e 400 °C, a perda de massa é de aproximadamente 75% e retrata a degradação térmica da celulose, ou seja, os processos de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas seguida da formação de resíduos carbonáceos (BARUD, 2006; LIMA *et al*, 2015).

A micronização da celulose quebrou as ligações de hidrogênio que mantinham a estrutura cristalina tridimensional fazendo com que as cadeias de celulose fossem despolimerizadas e amorfizadas, conforme demonstrado anteriormente pela DRX. Esses fenômenos aumentaram a entropia do sistema o que, conseqüentemente, levou a uma diminuição nas temperaturas de decomposição conforme demonstrado através da T_{pico} , T_{onset} , e T_{offset} indicadas na curva de DTG (HUANG *et al*, 2019). Os fenômenos de despolimerização e amorfização são incrementados com o aumento da frequência de moagem, logo, as temperaturas T_{pico} , T_{onset} , e T_{offset} são menores e os eventos de perda de massa são antecipados.

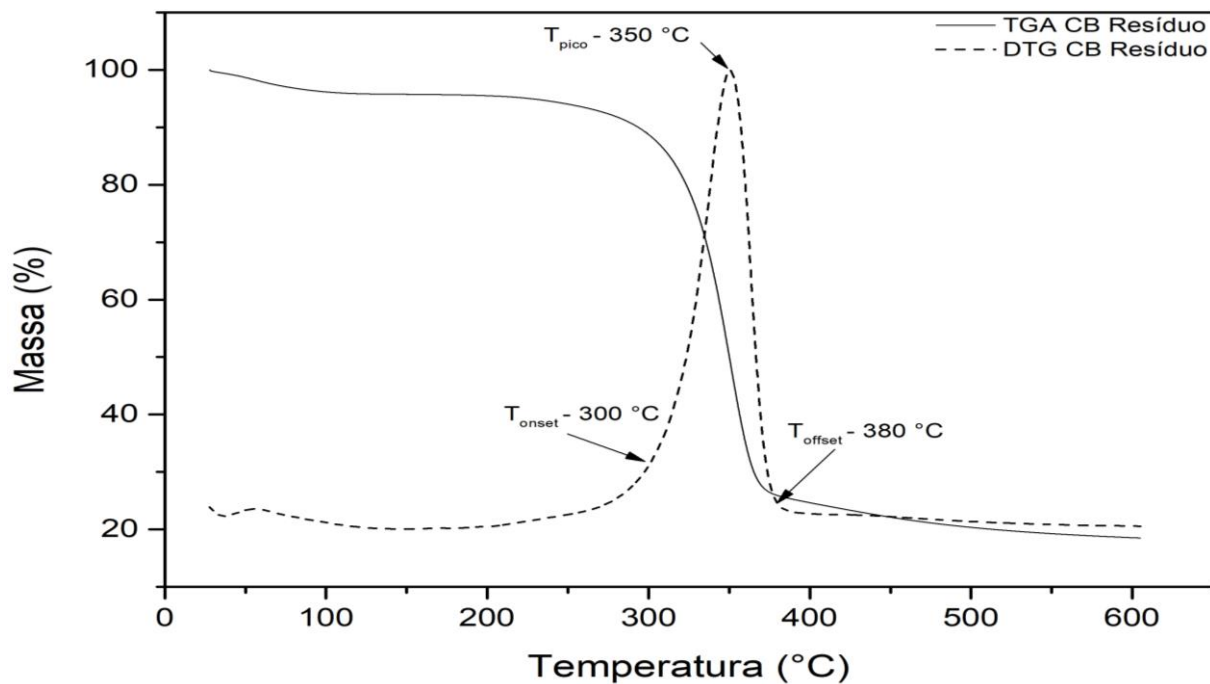


Figura 7. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do resíduo de celulose bacteriana (CB).

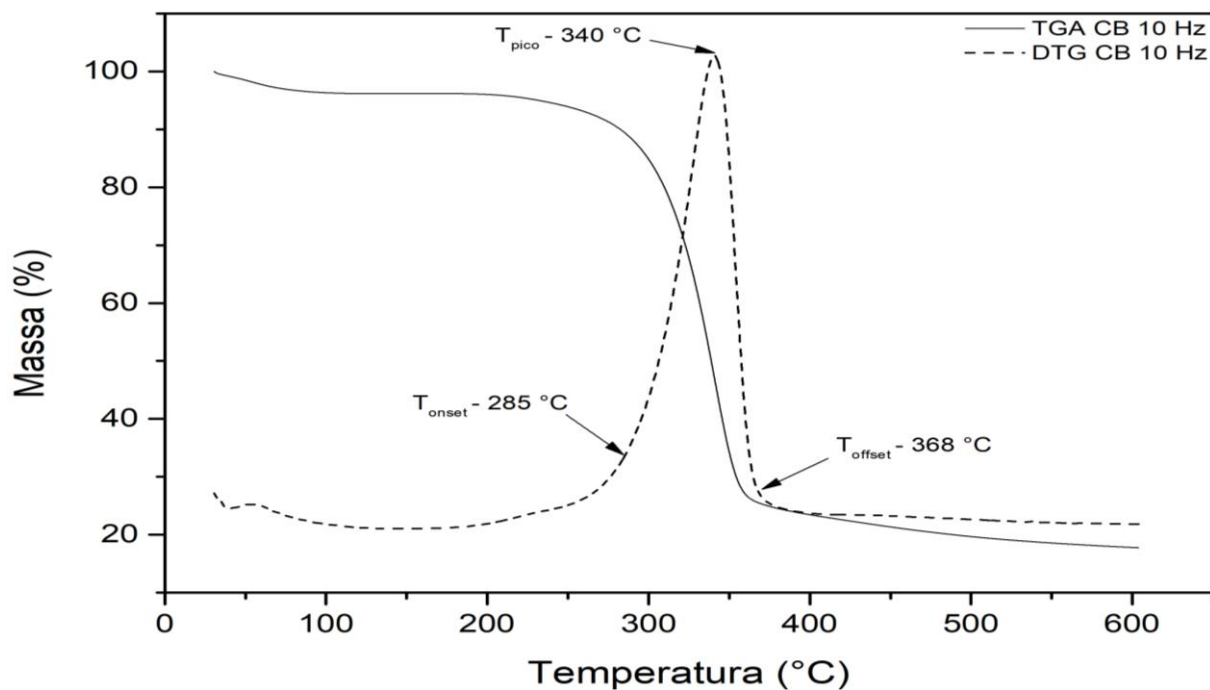


Figura 8. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 10 Hz.

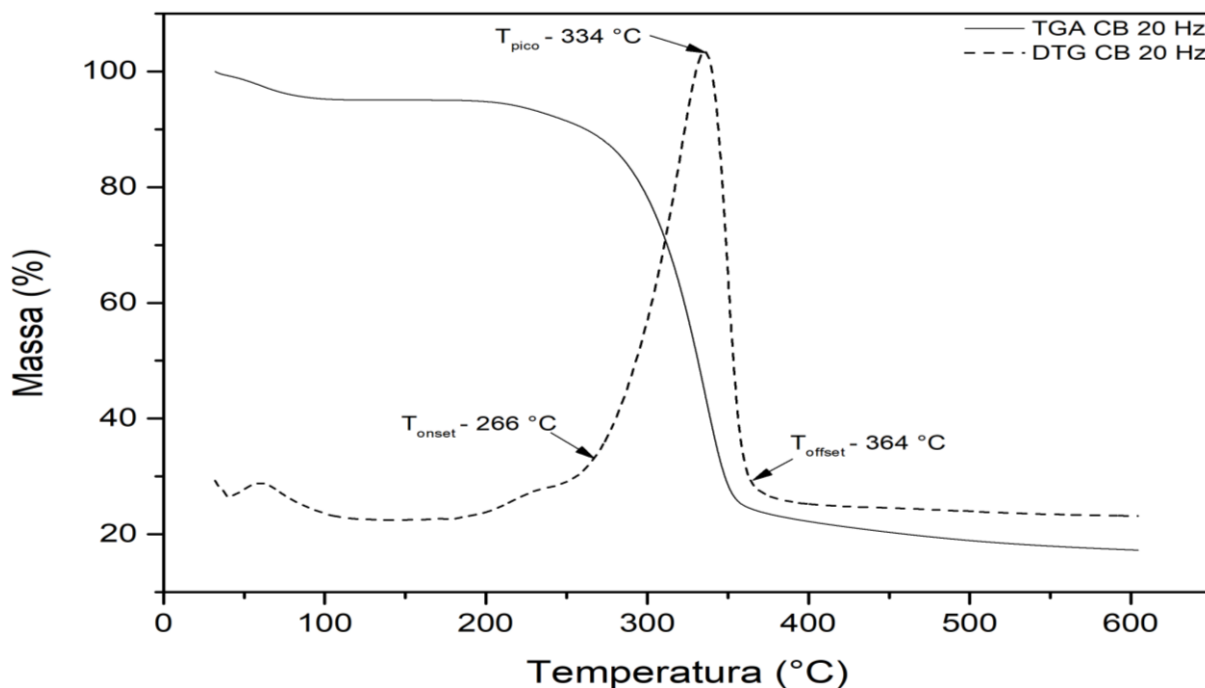


Figura 9. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 20 Hz.

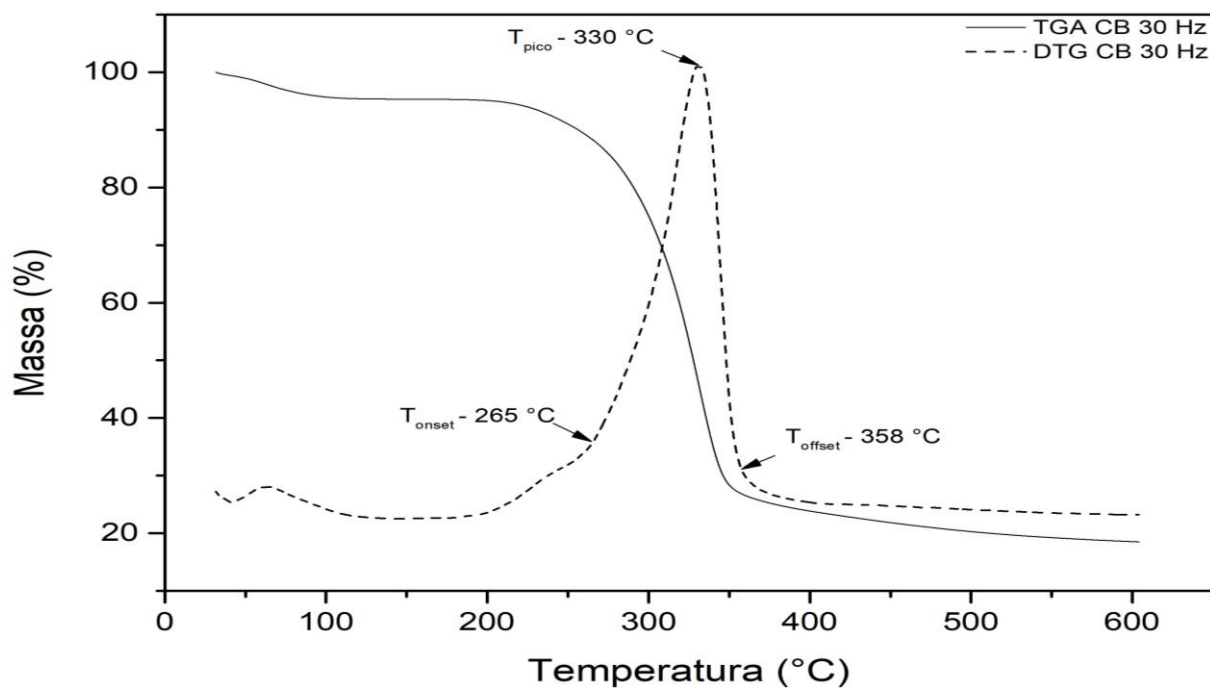


Figura 10. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 30 Hz.

3.5.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Assim como nas análises de TGA e DTG, nas curvas do DSC (Figuras 11-14) é possível observar dois eventos térmicos. O primeiro evento, em aproximadamente

70 °C, é um evento endotérmico referente a desidratação da CB. O segundo evento em aproximadamente 365°C é um evento exotérmico referente a decomposição da celulose, mais especificamente à fragmentação das ligações dos grupos carbonila e carboxila (BARUD, 2006).

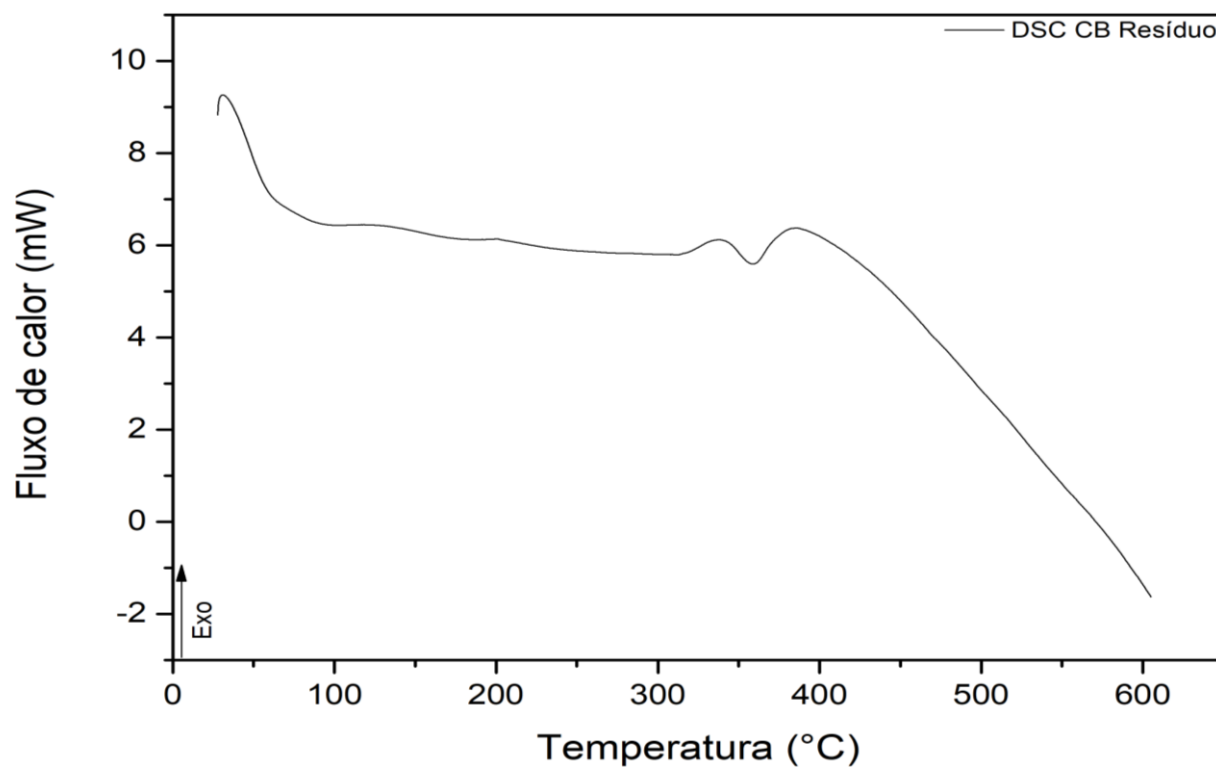


Figura 11. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do resíduo de celulose bacteriana (CB).

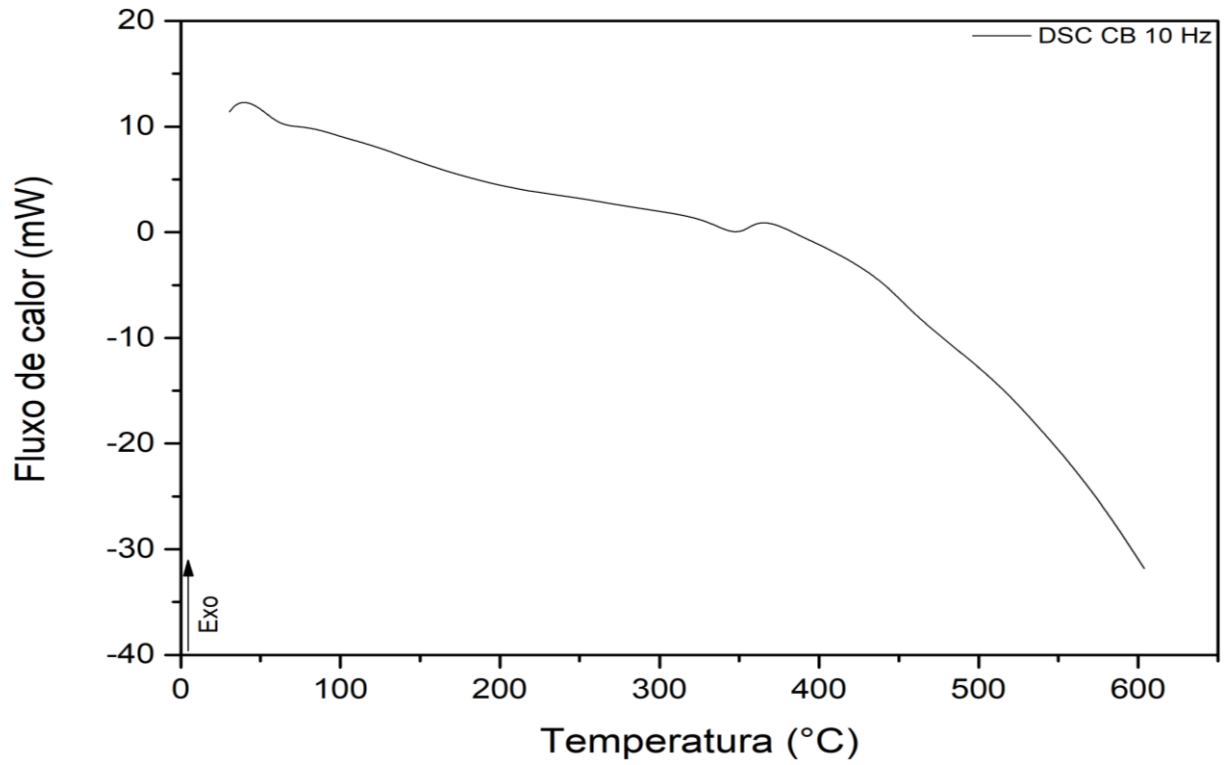


Figura 12. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 10 Hz.

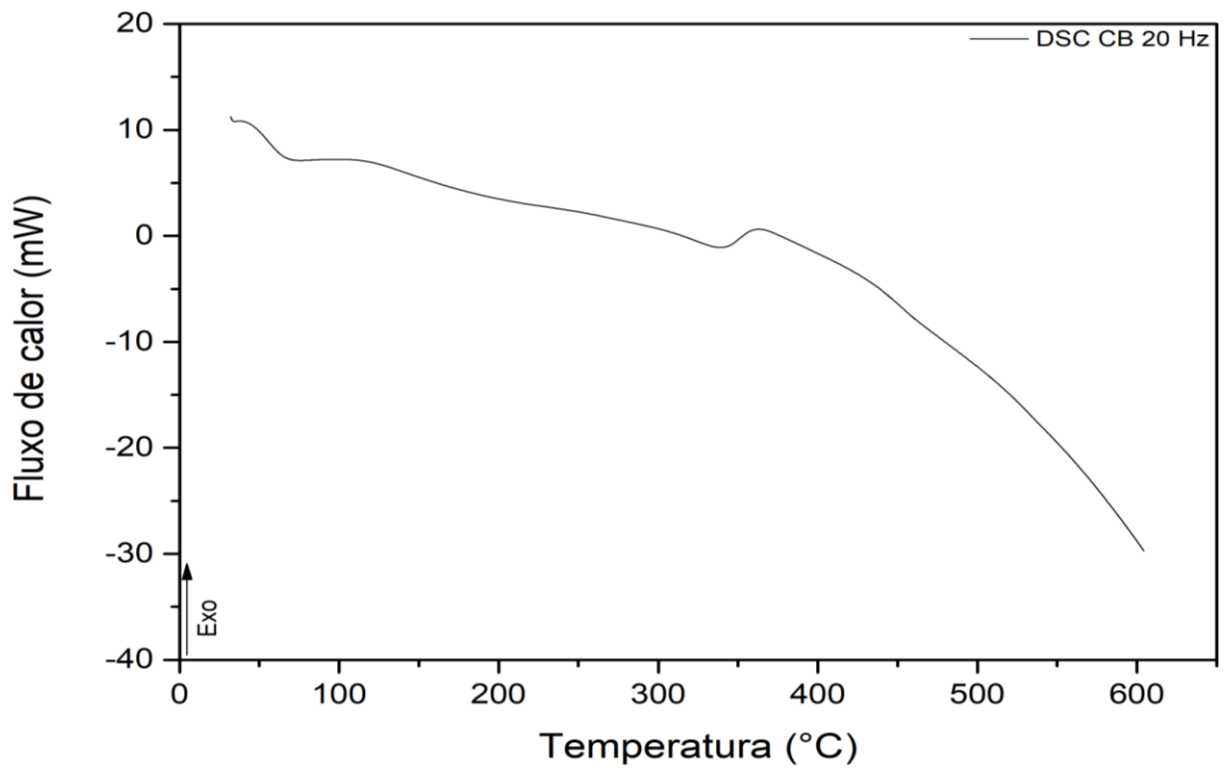


Figura 13. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 20 Hz.

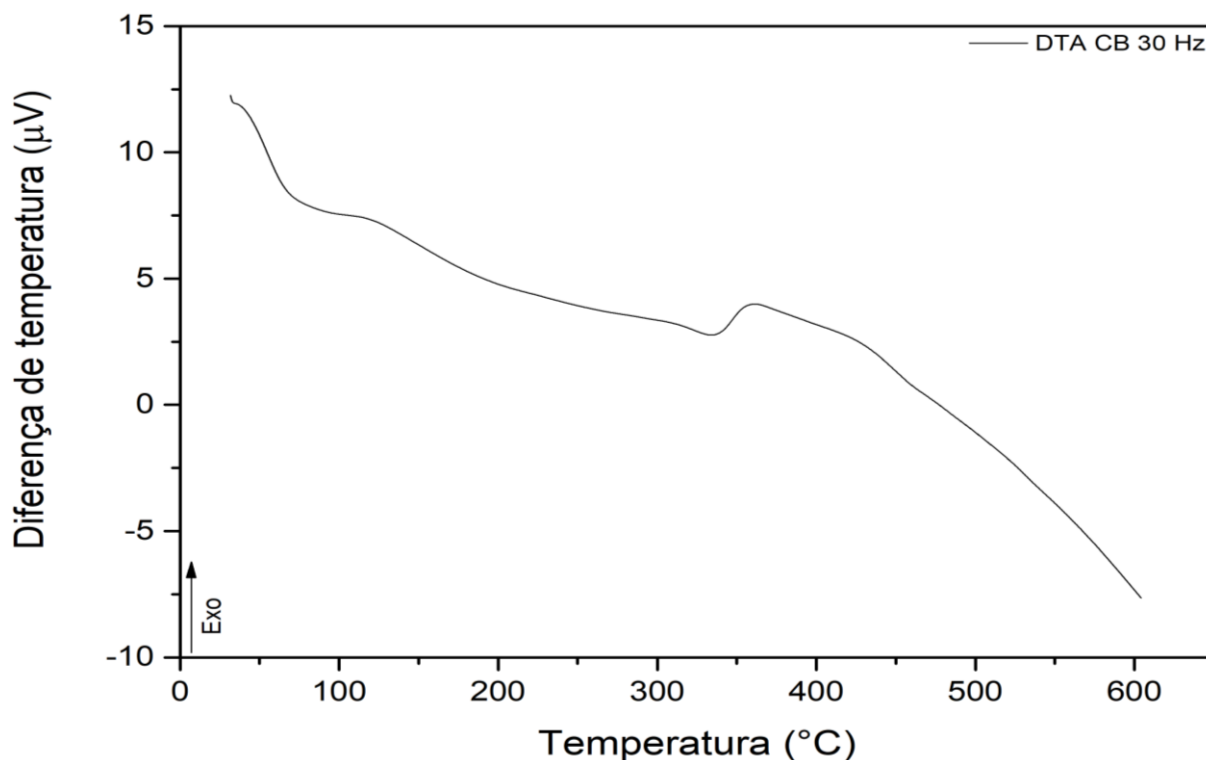


Figura 14. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 30 Hz.

3.6. Grau de polimerização (DP)

O DP se refere ao número de unidades estruturais repetidas que se observa na constituição de uma macromolécula, ou seja, o número de monômeros que constituem o polímero. JI *et al* (2016) e LIU, H. *et al* (2019) observaram em seus respectivos trabalhos que processos de micronização tendem a reduzir o grau de polimerização dos polímeros devido à quebra das ligações que unem os monômeros que, no caso da celulose bacteriana, são ligações glicosídicas β -1,4

À medida que a frequência empregada no processo de micronização aumenta, a quebra das ligações aumenta e, conseqüentemente, o DP diminui, conforme confirmado segundo os valores apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Grau de polimerização (DP) do resíduo de celulose bacteriana (CB) e dos micronizados em 10, 20 e 30 Hz.

Amostra	Tempo de escoamento médio (s)	Grau de polimerização – DP
Solvente + água	31	-
Resíduos	977,33	1576,28
CB 10 Hz	798,33	1387,87
CB 20 Hz	380,33	845,12
CB 30 Hz	83	207,97

ANDRITSOU *et al* (2018) obtiveram um DP de 1620 para a CB, valor muito próximo ao obtido nos experimentos realizados (1576,283) o que indica que o método é reproduzível e confiável e que o valor de DP para a CB possui pouca variação.

3.7. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

No espectro para o resíduo de celulose bacteriana e os micronizados, Figura 15, observou-se a presença de bandas de absorção significativas no mesmo comprimento de onda, indicando similaridade entre os grupos funcionais, ou seja, não houve indício da formação de novas ligações ou alterações na estrutura química.

Observou-se também que conforme aumentou-se a frequência da moagem dos resíduos ocorreu a diminuição da transmitância das bandas, o que ficou bem evidente nas bandas em 3300 cm^{-1} referente ao estiramento OH e em $1140\text{-}1015\text{ cm}^{-1}$ referente à deformação CO (BARUD, 2010). Pode se inferir que esse fato ocorreu em virtude da diminuição da cristalinidade da CB ao passo que a micronização quebra as ligações de hidrogênio (ZHENG *et al*, 2018). Esse efeito também foi observado por AVOLIO *et al* (2012), TANG *et al* (2013), ZHENG *et al* (2018) e KANO, DE SOUZA e ROSA (2019) em seus respectivos trabalhos.

As demais bandas de absorção observadas referentes à celulose bacteriana são: 2880 cm^{-1} – estiramento CH de alcanos e estiramento assimétrico CH_2 ; 1645 cm^{-1} – deformação OH; 1420 cm^{-1} – deformação CH_2 ; 1370 cm^{-1} – deformação OH (BARUD, 2010).

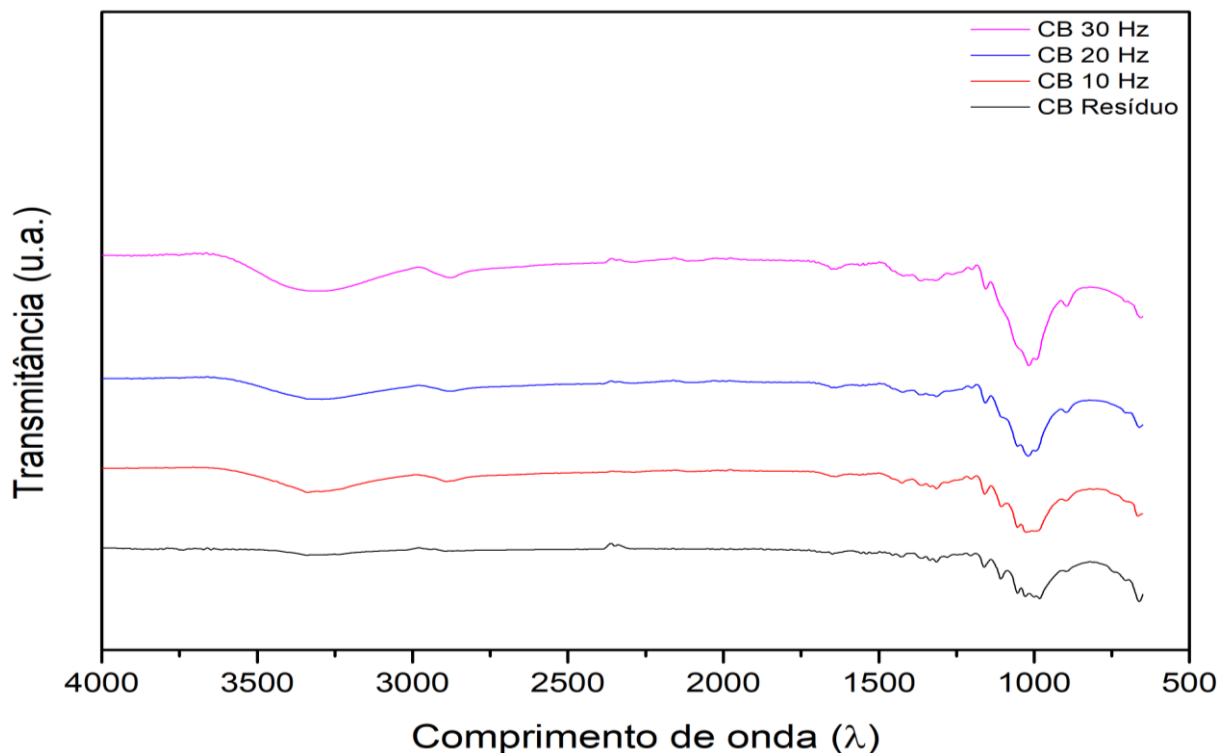


Figura 15. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) do resíduo de celulose bacteriana (CB) e dos micronizados em 10, 20 e 30 Hz.

3.8. Microscopia de força atômica (AFM)

A partir das microscopias de força atômica foi possível determinar o formato e o diâmetro das fibras de celulose e a rugosidade média quadrática dos micronizados.

As membranas de CB foram analisadas com áreas de 50 e 10 μm^2 , Figuras 16A e 16B respectivamente. Na Figura 16A foi possível observar o formato e o diâmetro das fibras, aproximadamente 17 μm , porém as fibras podem estar sobrepostas ou agrupadas como mostra a imagem 16B, onde o diâmetro observado é de aproximadamente 5 μm . A Figura 16C apresenta a imagem tridimensional das fibras.

A AFM para pós não é usual, uma vez que a varredura em áreas relativamente maiores se torna mais complexa acarretando um forte efeito na rugosidade média e nos desvios. É possível observar o aumento da complexidade da análise e o efeito na rugosidade média à medida que se compara as microscopias obtidas dos micronizados, Figura 17, e o gráfico de rugosidade média quadrática, Figura 18.

Conforme demonstrado anteriormente na análise granulométrica e na análise de área superficial, o aumento da frequência de moagem tende a diminuir a granulometria e aumentar a área superficial, logo, é compreensível que o micronizado

em 20 Hz tenha uma rugosidade média maior e maiores desvios quando comparado ao micronizado em 10 Hz.

A microscopia do micronizado em 30 Hz indica menor rugosidade média que o micronizado em 20 Hz. Isso se deve aos efeitos aglomerativos observados de em processos energéticos onde a porção amorfa do material é exposta, tal qual o processo de micronização (VAN CRAEYVELD *et al*, 2009; NIEMI *et al*, 2011; GAO *et al*, 2017; ZHENG *et al*, 2018). A partir disso, é possível inferir que a aglomeração desses micronizados proporciona um material mais compacto e com as fibras interconectadas o que reduz a rugosidade média e os desvios, fato também observado por ARAÚJO *et al* (2018).

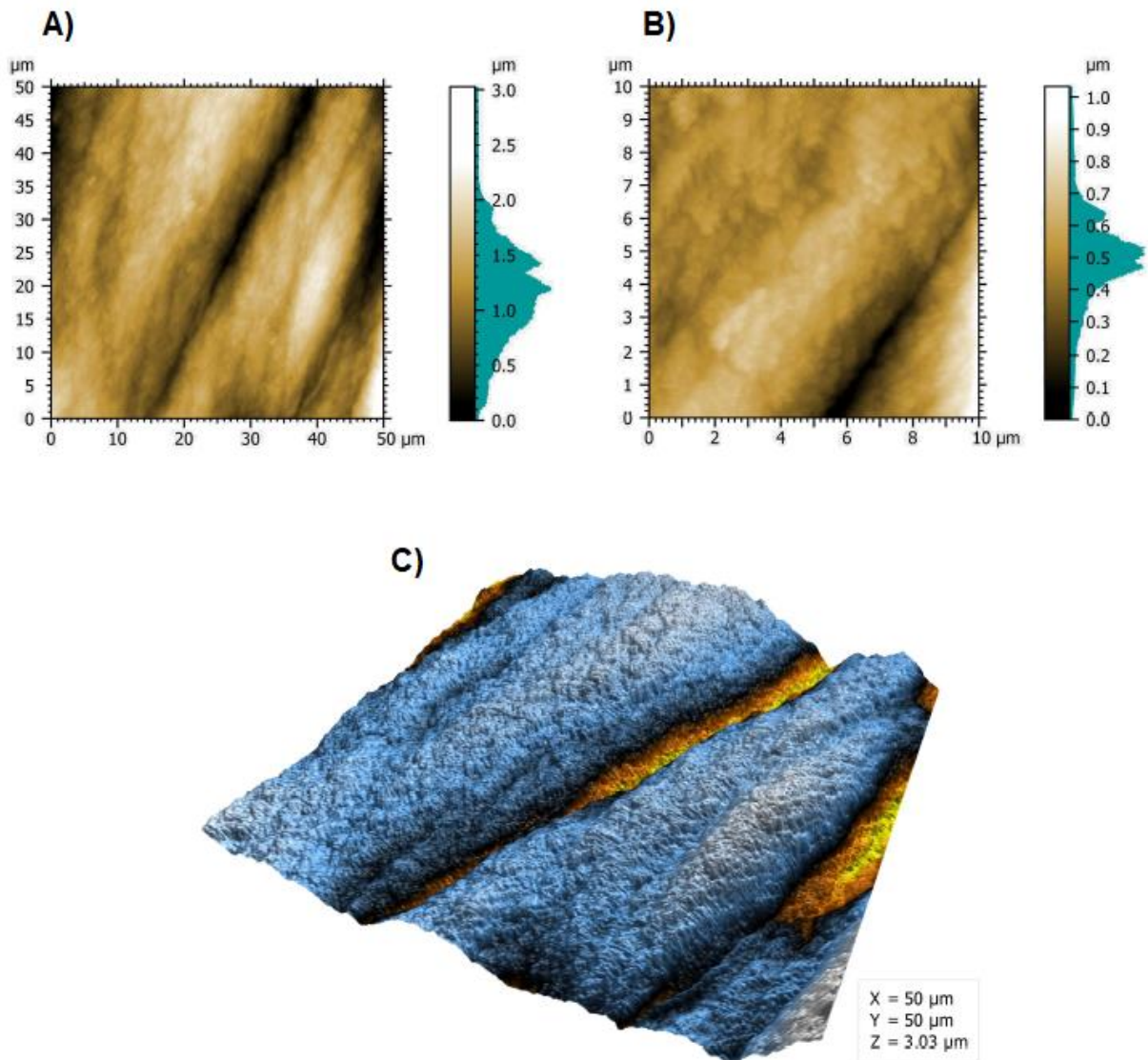


Figura 16. Microscopia força atômica do resíduo de celulose bacteriana (CB): (A) imagem 2D em 50 µm², (B) imagem 2D em 10 µm² e (C) imagem 3D em 50 µm².

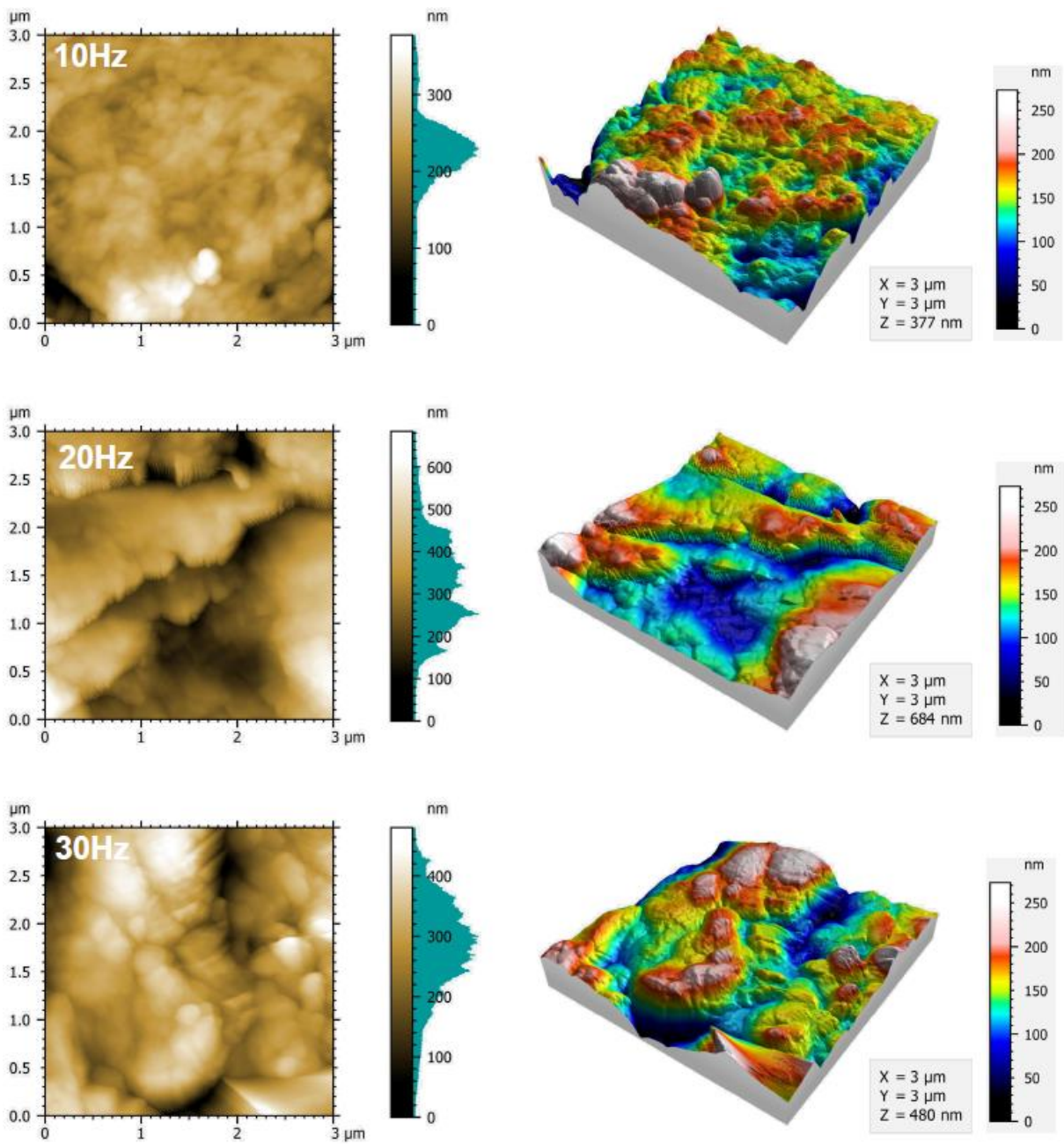


Figura 17. Microscopias de força atômica 2D (à esquerda) e 3D (à direita) dos resíduos de celulose bacteriana (CB) micronizados em 10, 20 e 30 Hz.

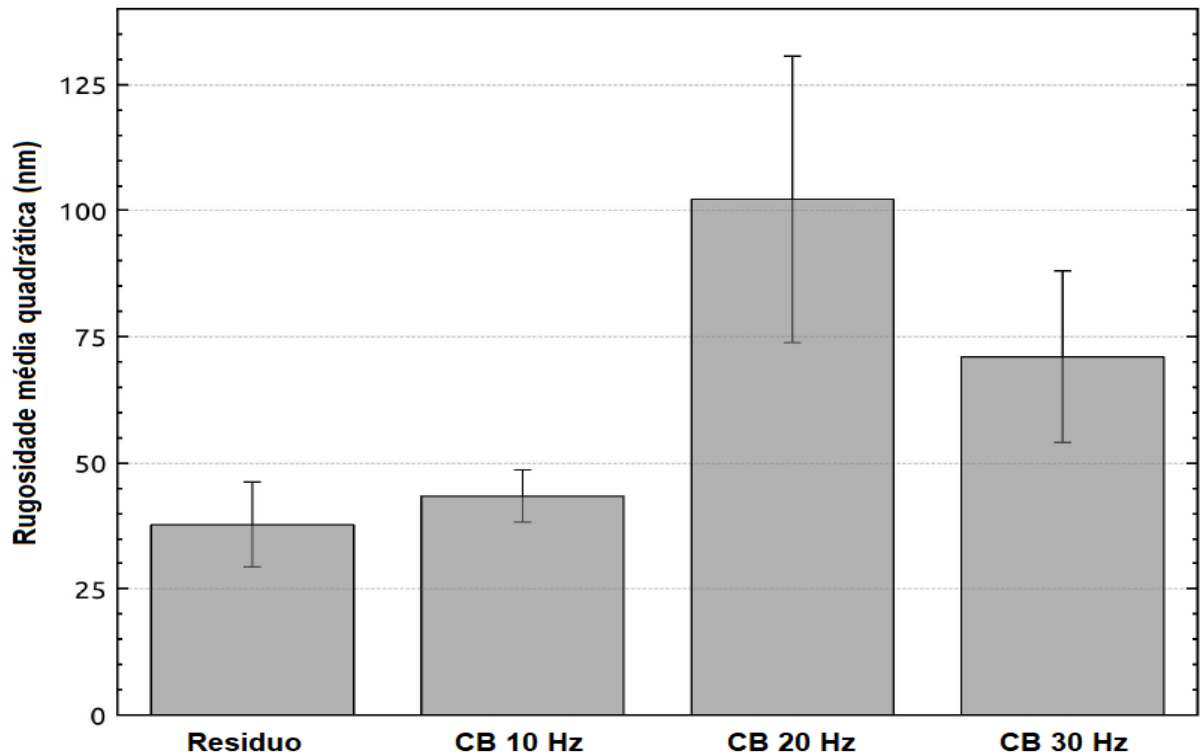


Figura 18. Gráfico de rugosidade média quadrática do resíduo de celulose bacteriana (CB) e dos micronizados em 10, 20 e 30 Hz.

3.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio das microscopias, Figura 19 a 22, determinou-se o diâmetro médio das fibras de CB em $11\mu\text{m}$. Observou-se ainda que o incremento da frequência de moagem desconfigurou as fibras de celulose, formando aglomerados.

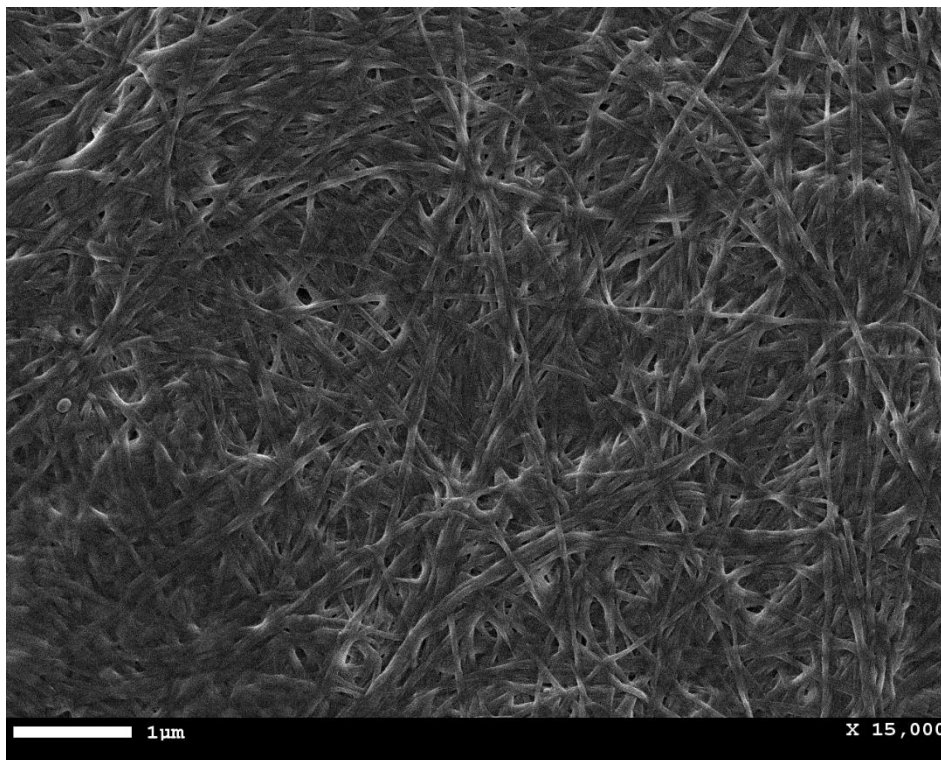


Figura 19. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do resíduo de celulose bacteriana (CB).

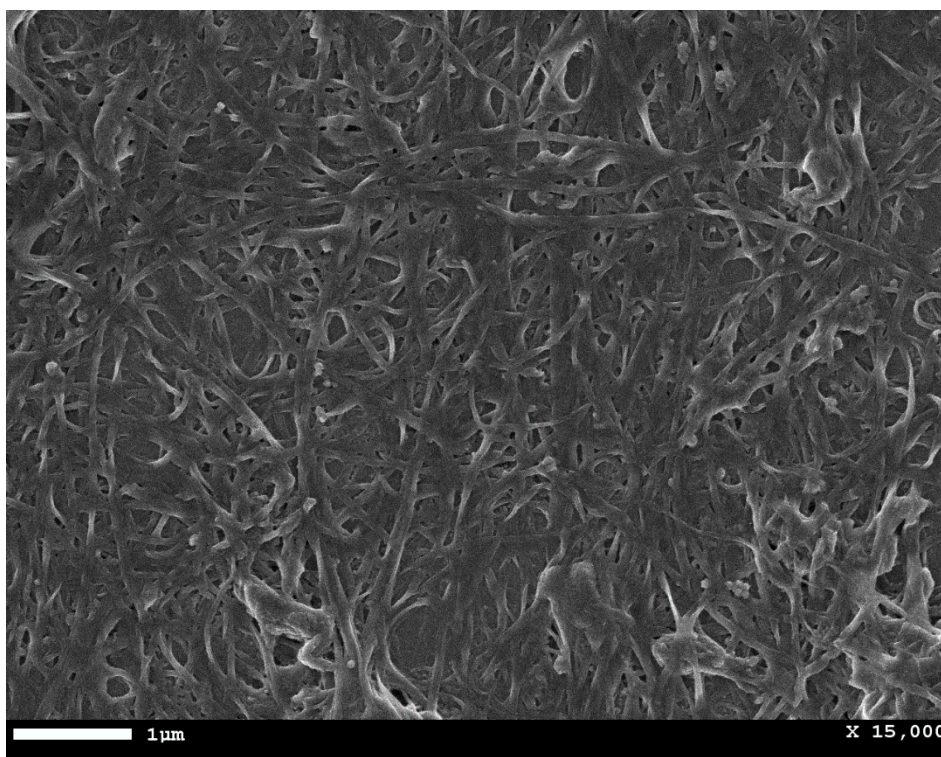


Figura 20. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 10 Hz.

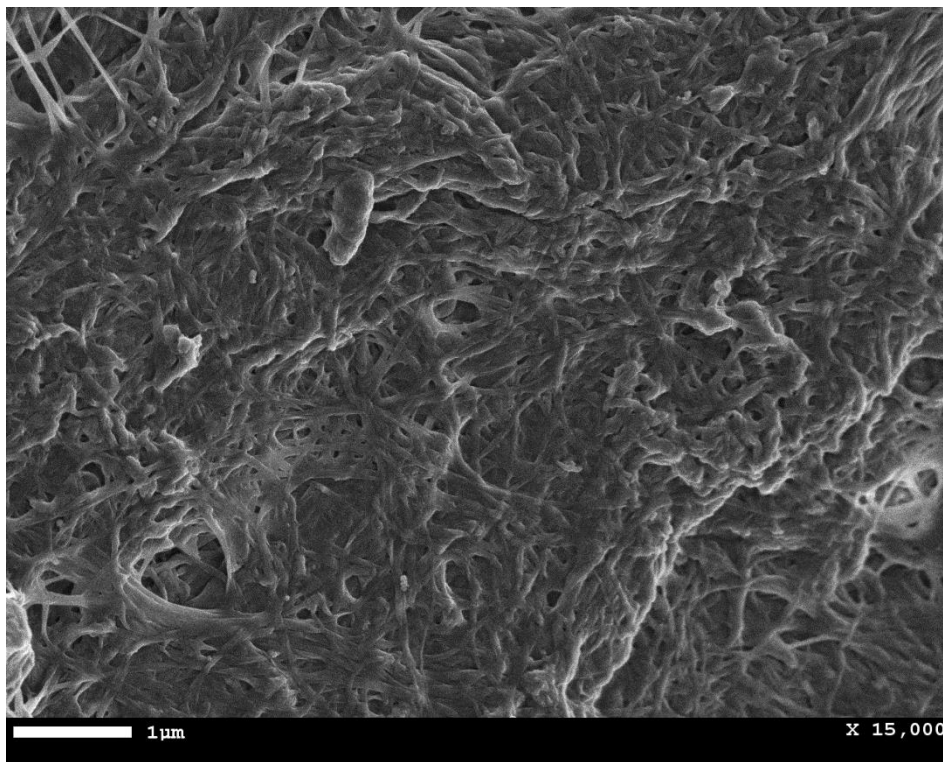


Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 20 Hz.

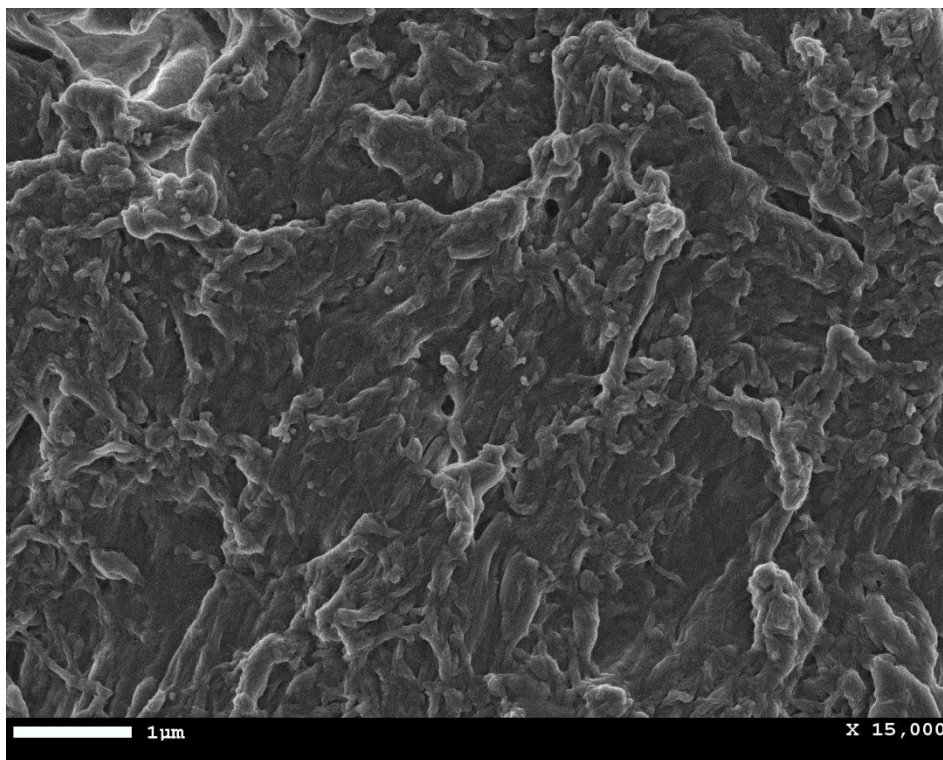


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do resíduo de celulose bacteriana (CB) micronizado em 30 Hz.

4. CONCLUSÃO

A a micronização é um processo mecanoquímico capaz de alterar as estruturas e, conseqüentemente, as propriedades dos materiais a depender dos parâmetros empregados. No caso da CB não foi diferente, pois observou-se que aplicando diferentes frequências de moagem é possível obter micronizados com estruturas e características diferentes.

Dentre os micronizados obtidos, o micronizado em 20 Hz apresentou as melhores propriedades para aplicação na obtenção dos compósitos baseados em PHB/CB. Conforme constatado pela DRX, esse micronizado apresentou equilíbrio entre as porções cristalina e amorfo, uma característica importante para os filamentos compósitos, pois a CB deve realizar a função de um agente de reforço simultaneamente em que é degradada à medida que ocorre a regeneração tecidual. Essa análise foi complementada pela análise térmica ao demonstrar que conforme ocorre a redução da porção cristalina ocorre também uma redução da resistência térmica, entretanto, para o micronizado em 20 Hz a redução foi insignificante tendo em vista o ponto de fusão do PHB e a aplicação em que seria utilizada.

Nesse sentido, optou-se pela seleção dos micronizados em 20 Hz para a obtenção dos filamentos compósitos.

CAPÍTULO 3 – FILAMENTOS COMPÓSITOS BASEADOS EM PHB/CB

1. INTRODUÇÃO

Os polihidroxicanoatos (PHA) são uma família de biopolímeros intracelulares sintetizados por bactérias como carbono intracelular e grânulos de armazenamento de energia em condições de excesso de carbono e baixas concentrações de nitrogênio, fósforo, oxigênio ou magnésio (BARUD *et al*, 2011a; SINDHU *et al*, 2011). A família de biopolímeros PHA tem sido amplamente utilizada para aplicações biomédicas, como placas ósseas, suturas, rebites, grampos, parafusos, pinos ortopédicos, scaffolds de medula óssea e dispositivos de regeneração meniscal (ZHAO *et al*, 2003; LIM *et al*, 2017).

Um dos membros mais dos PHA's mais estudado e empregado nas aplicações biomédicas mencionadas acima é o poli(hidroxi-butilato) – PHB. Esse biopolímero é produzido naturalmente por microrganismos e, atualmente, estima-se ao menos 75 gêneros diferentes de bactérias são capazes de acumular grânulos intracelulares de PHB (SINDHU *et al*, 2011).

O PHB é um biopolímero altamente biocompatível, isso porque o PHB de baixo peso molecular e seu produto de degradação, o ácido 3-hidroxibutírico, são encontrados no organismo humano (PARVIZIFARD e KARBASI, 2020; SOLEYMANI EIL BAKHTIARI, KARBASI e TOLOUE, 2021). Além disso, o PHB é um biopolímero biodegradável, piezoelétrico, altamente cristalino, hidrofóbico, osteoindutor e com características mecânicas similares às de um termoplástico convencional, oferecendo a possibilidade de substituição de polímeros não degradáveis tais como o polipropileno e o polietileno (BARUD *et al*, 2011; HOSOKAWA *et al*, 2017).

Por conta dessas características o PHB tem sido empregado na obtenção de *scaffolds* para engenharia tecidual óssea, tal qual o trabalho desenvolvido por PEREIRA *et al* (2012), porém, embora tenha características desejáveis para um amplo espectro de aplicações e uma alta temperatura de fusão (~175 °C), o PHB apresenta desvantagens que limitam suas aplicações na engenharia tecidual sendo a instabilidade térmica e fragilidade as principais (BARUD *et al*, 2011a). Em alguns casos é necessário associá-lo a outros polímeros, plastificantes ou aditivos tais como a CB (PARVIZIFARD e KARBASI, 2020; SOLEYMANI EIL BAKHTIARI, KARBASI e

TOLOUE, 2021). Diversos pesquisadores têm utilizado a CB como aditivo natural na engenharia tecidual, por conta da pureza e das excelentes propriedades mecânicas e térmicas (BARUD, 2006).

Nesse contexto, os filamentos de compósitos baseados em PHB e CB foram desenvolvidos para incrementar a utilização do PHB na engenharia tecidual utilizando uma impressora 3D FDM sem perder as propriedades de regeneração tecidual.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos filamentos compósitos baseados em PHB/CB

Para a obtenção dos compósitos foram utilizados os resíduos de CB, fornecidos pela empresa BioSmart Nanotechnology, e o PHB (Bicycle 1000, PHB Industrial S/A, São Paulo). Os resíduos de CB foram micronizados em 20 Hz devido ao IC_r granulometria e elevada área superficial.

Ambos biopolímeros foram misturados em um misturador termocinético (MH-50H, 48 A, MH Equipamentos Ltda., Guarulhos, SP, Brasil), com a velocidade mantida em 5250 rpm. A quantidade de CB inserida variou em proporções entre 0 e 2% m/m, conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações de celulose bacteriana (CB) utilizadas nas composições dos filamentos compósitos baseados em PHB/CB.

Filamento	Concentração CB 20 Hz (%)
PHB/CB 0%	0
PHB/CB 0,25%	0,25
PHB/CB 0,5%	0,5
PHB/CB 1%	1
PHB/CB 2%	2

Os compósitos obtidos foram moídos em um moinho granulador (Plastimax, 3,7 kW, Rio Grande do Sul, Brasil) e secos a 50^o C por 2 h. Para a obtenção dos filamentos os compósitos obtidos foram extrudados em uma mini extrusora (Weellzoom, modelo B Desktop, Guangdong Prov, China), simulando uma extrusora industrial. A temperatura utilizada no processamento dos filamentos foi na faixa de 160-165°C e a velocidade de extrusão utilizada foi de 85 mm/min.

2.2. Análise térmica

Assim como a análise térmica dos resíduos e micronizados de CB, a análise dos filamentos foi realizada utilizando o equipamento SDT Q600 da TA Instruments.

As amostras foram aquecidas em um cadinho de alumina de 30 a 600 °C, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/min.

2.3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Realizou-se a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo de reflexão total atenuada (FTIR-ATR) dos filamentos utilizando um espectrofotômetro Bruker-Vertex 70. Obteve-se o espectro utilizando 64 varreduras de 4500 a 450 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} .

2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas de varredura dos filamentos também foram obtidas utilizando o microscópio da JEOL, modelo 7500F, com aceleração de voltagem de 2,00 kV. Os filamentos foram fixados em um suporte de cobre com fita adesiva dupla face de carbono e recobertos com carbono.

As imagens foram obtidas na seção transversal dos filamentos.

2.5. Impressão 3D dos *scaffolds*

Após as caracterizações os filamentos foram utilizados para a impressão de *scaffolds* com o intuito de se avaliar o desempenho dos filamentos na impressão.

O design digital dos *scaffolds* foi obtido do banco de arquivos do “Thingiverse”. O dimensionamento e o fatiamento do design foram realizados utilizando-se o *software* Ultimaker Cura 4.0. Os *scaffolds* foram dimensionados com 10 x 10 x 5 mm nos eixos x, y e z respectivamente e o preenchimento da peça foi ajustado para 50%.

A impressão foi realizada em uma impressora 3D CREALITY Ender-3, com velocidade máxima de 180mm/s, bico de 0.4mm, estrutura em alumínio anodizado e área de impressão de 220 x 220 x 250 mm. A temperatura empregada no processo foi de 185 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Aspecto e caracterização macroscópica dos filamentos

Todos os filamentos obtidos aparentavam homogeneidade quanto a espessura. Não se observou rachaduras, falhas, queimaduras ou aglomerados de CB, conforme demonstrado na Figura 23.

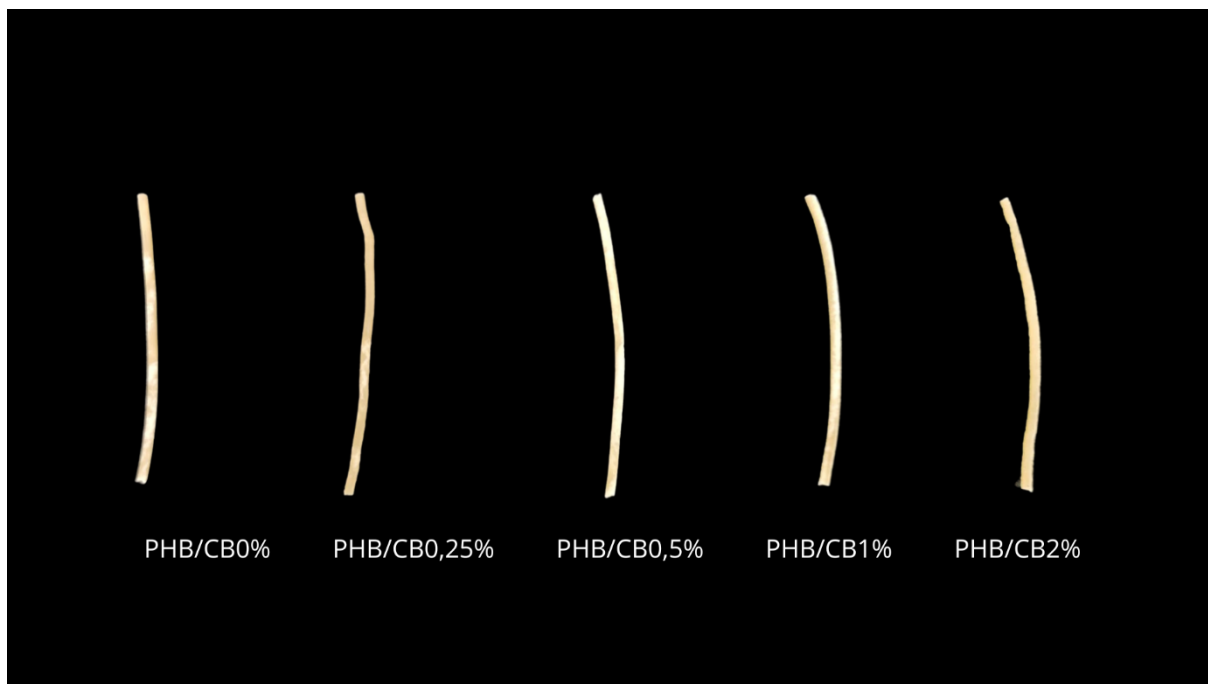


Figura 23. Filamento de Poli (3- hidroxibutirato) puro e filamentos compósitos baseados em Poli (3 - hidroxibutirato)(PHB)/ Celulose bacteriana (CB)

Todos os filamentos apresentaram relativa resistência a fratura, porém os filamentos sem CB, com 0,25% de CB e com 0,5% de CB pareceram mais maleáveis e flexíveis que os demais.

3.2. Análise térmica

3.2.1. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG)

Ao analisar as curvas TGA e DTG obtidas, Figuras 24-28, observa-se dois eventos com perdas de massas em todas as amostras corridas. No primeiro evento, entre 50 e 120 °C, ocorre uma perda de massa sutil que correspondente à vaporização da umidade residual. No segundo evento, entre 170 e 350 °C, a perda de massa é significativa, pois ocorre a degradação completa do PHB em virtude, principalmente, da β -clivagem das cadeias do PHB em ligações “C=O” e “C – O” o que facilita a formação de ácido crotônico, voláteis diméricos, triméricos e tetraméricos (BARUD *et al*, 2011a; PRADHAN *et al*, 2017; VAHABI *et al*, 2019).

REIS *et al* (2015), BARUD *et al* (2011a), GIAQUINTO *et al* (2017), HOSOKAWA *et al* (2017) PRADHAN *et al* (2017) e VAHABI *et al* (2019) observaram os mesmos eventos em seus respectivos experimentos. PRADHAN *et al* (2017) ainda observaram que o PHB sintetizado a partir da fermentação dos hidrolisados ricos em hexose possuía maior cristalinidade e maior resistência à degradação térmica.

Nas TGA's e DTG's dos filamentos é possível observar que os filamentos com concentrações maiores de CB apresentaram redução da resistência térmica. No caso, o filamento compósito PHB/CB 2,0%, o filamento com maior concentração de CB micronizada, foi o que apresentou menor resistência térmica. Essa redução da resistência térmica está relacionada à diminuição da cristalinidade do filamento à medida em que o micronizado é adicionado uma vez que com a micronização da celulose e, conseqüentemente, a quebra das ligações de hidrogênio, a porção amorfa da celulose é exposta e a estrutura cristalina tridimensional, responsável pela resistência térmica, se perde.

Considerando que os filamentos serão empregados para a obtenção de *scaffolds*, a diminuição da estabilidade térmica observada não representa um problema para aplicação na impressão 3D uma vez que a T_m média do PHB, temperatura usada na impressão, é de 170°C e a menor T_{onset} observada foi de 235°C.

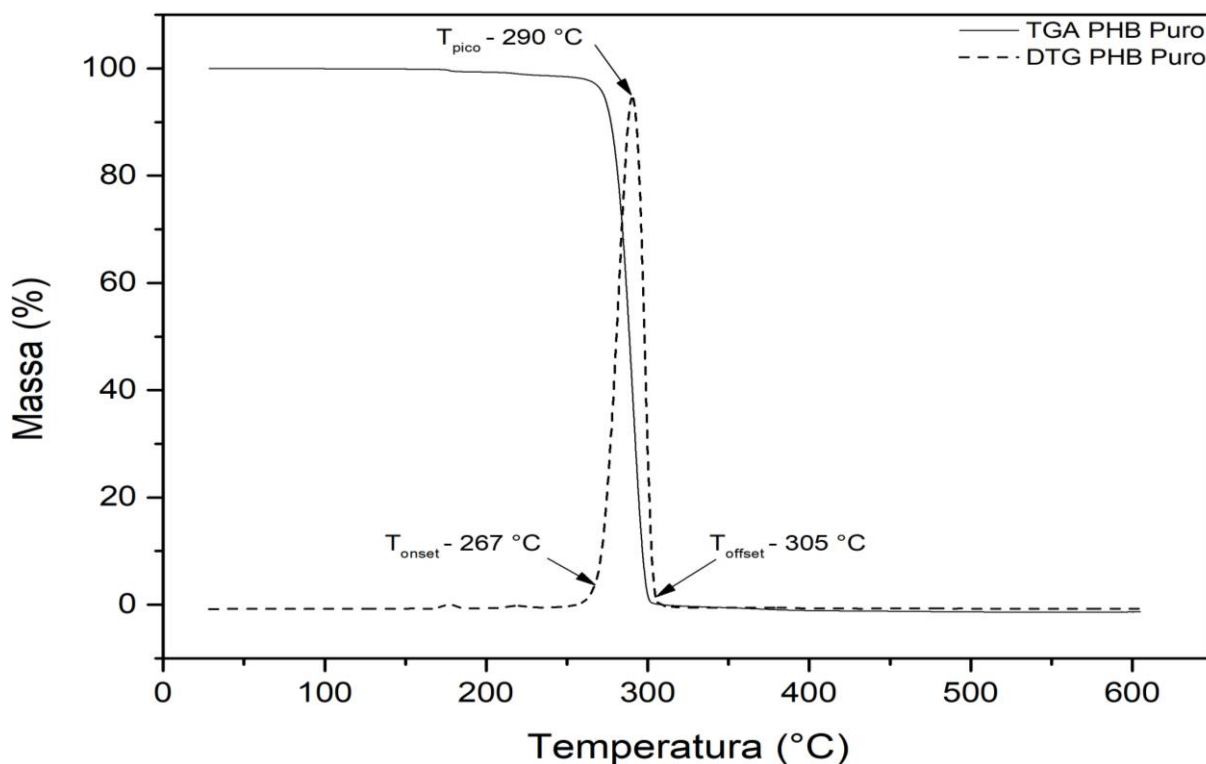


Figura 24. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento de poli(hidroxi-butilato) (PHB) puro.

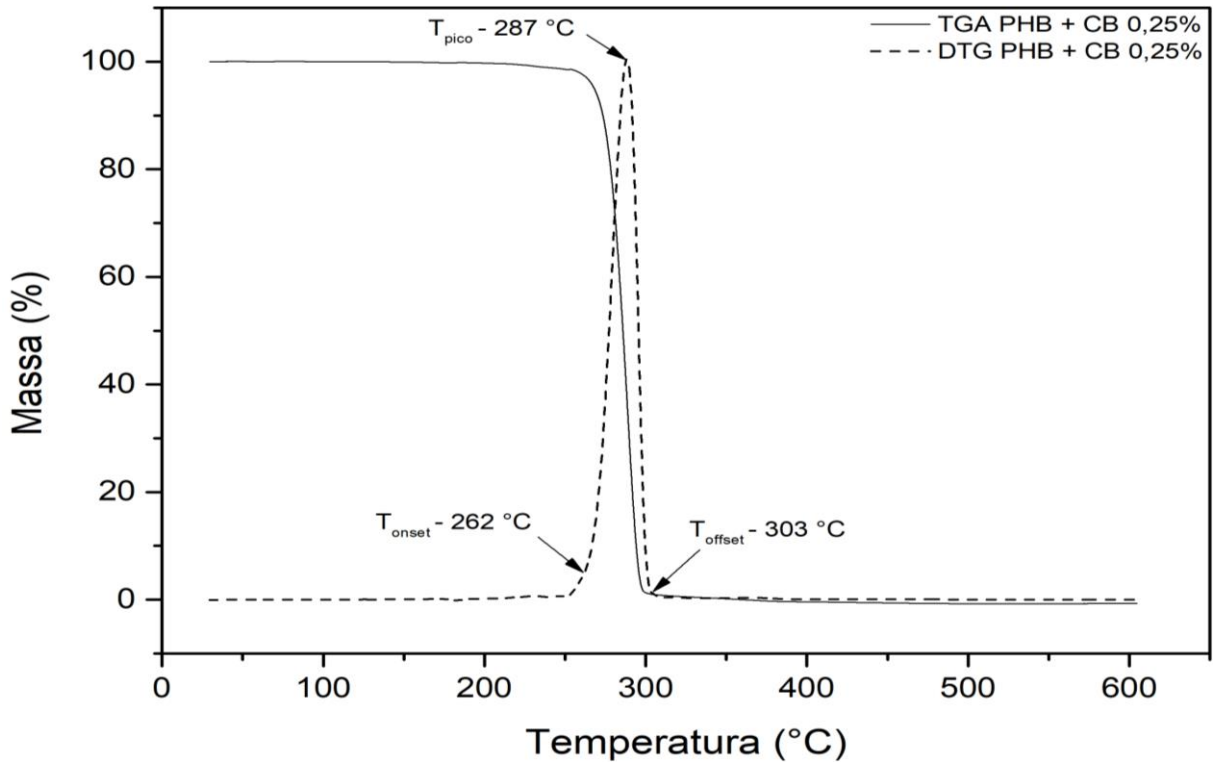


Figura 25. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento composto de poli(hidroxiбутирато) (PHB)/0,25 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.

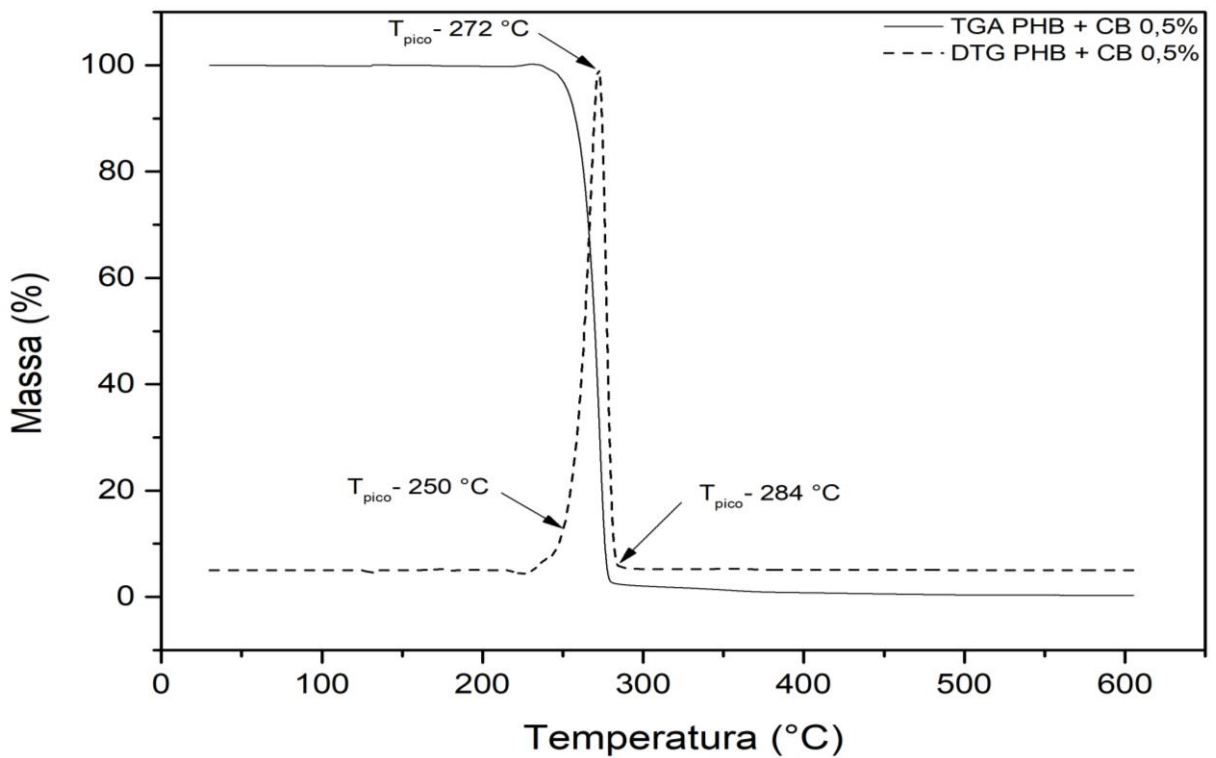


Figura 26. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento composto de poli(hidroxiбутирато) (PHB)/0,5 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.

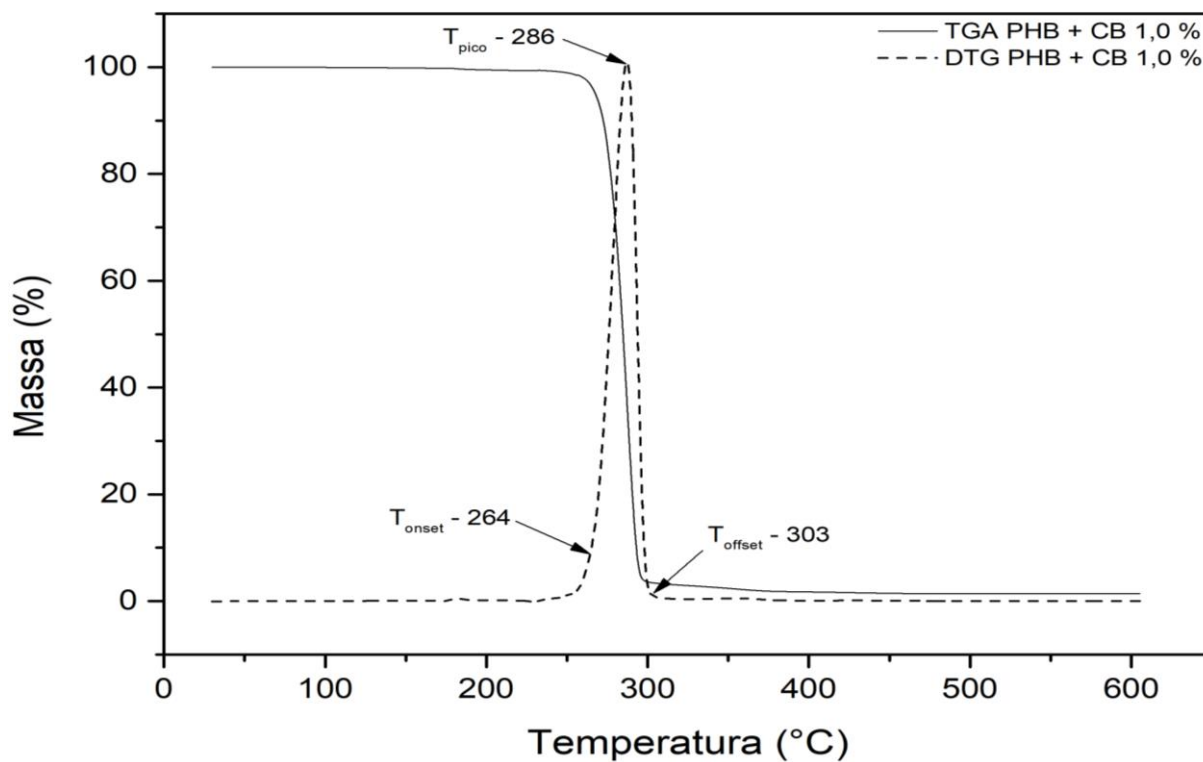


Figura 27. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento composto de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 1,0 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.

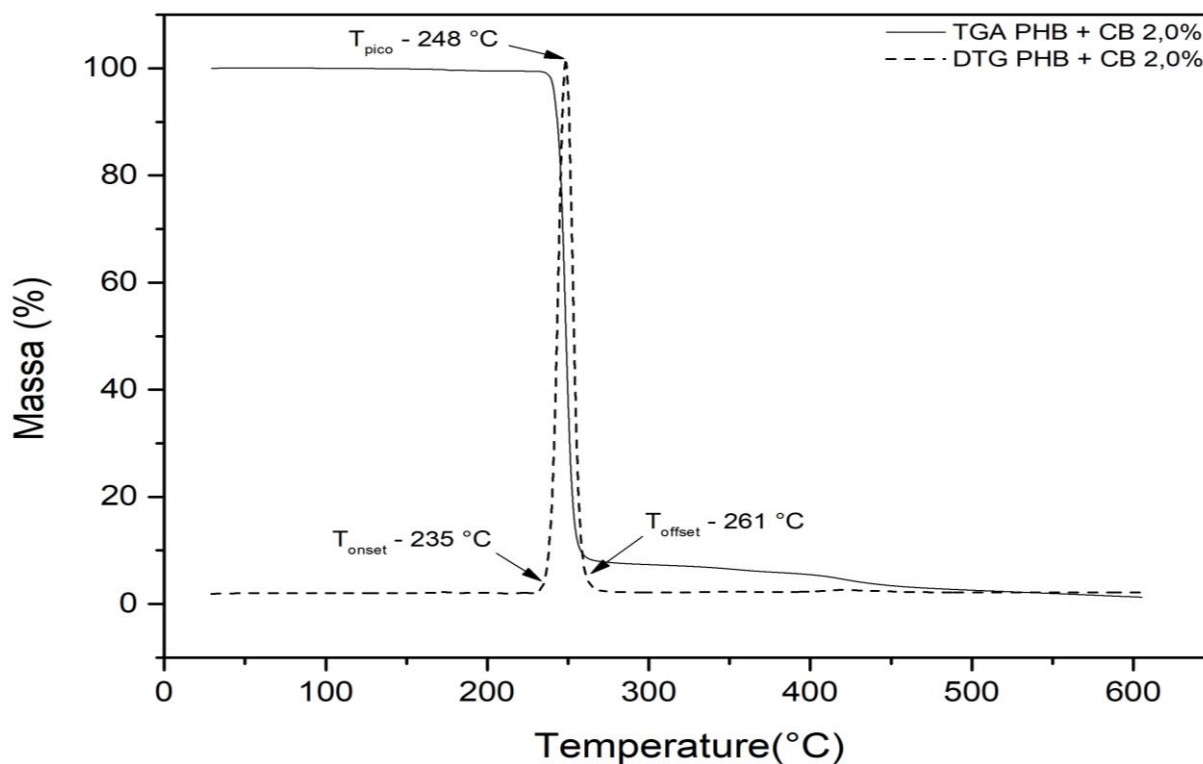


Figura 28. Análise termogravimétrica (TGA) e derivada termogravimétrica (DTG) do filamento composto de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 2,0 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.

3.2.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC dos filamentos, Figuras 29 – 33, mostram dois picos de eventos endotérmicos em torno de 180°C e 290 °C que se referem, respectivamente, à fusão e decomposição do PHB. Esses mesmos picos também foram observados nos trabalhos de BARUD *et al* (2011a), REIS *et al* (2015) e PRADHAN *et al* (2017).

A literatura apresenta a T_m do PHB próxima a 170 °C, porém as T_m do PHB e seus compósitos dependem de muitos fatores, como morfologia e tamanho das partículas, cinética de cristalização e processo de composição (REIS *et al*, 2015). PRADHAN *et al* (2017) obtiveram PHB através de *B. megabacterium* e *C. necator* cujos T_m observados foram de 175°C e 176 °C, respectivamente, valores também superiores aos que a literatura traz como padrão.

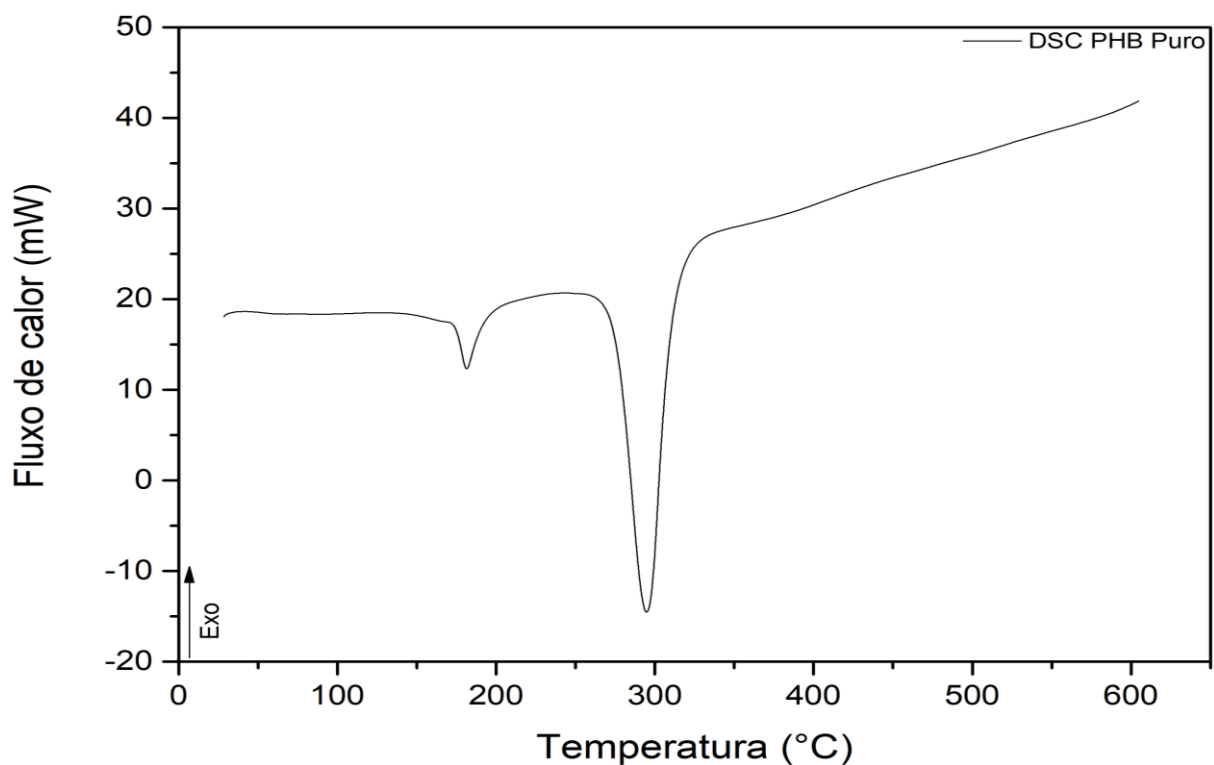


Figura 29. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento de poli(hidroxibutirato) (PHB) puro.

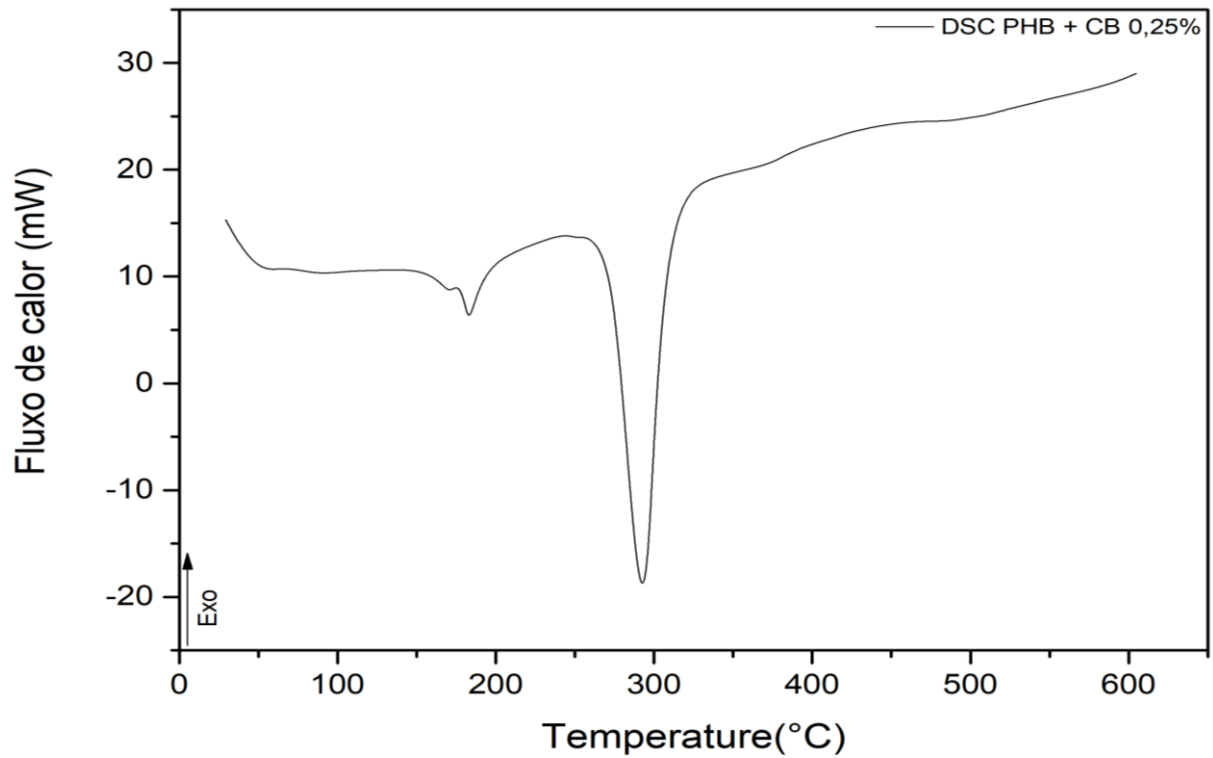


Figura 30. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 0,25 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.

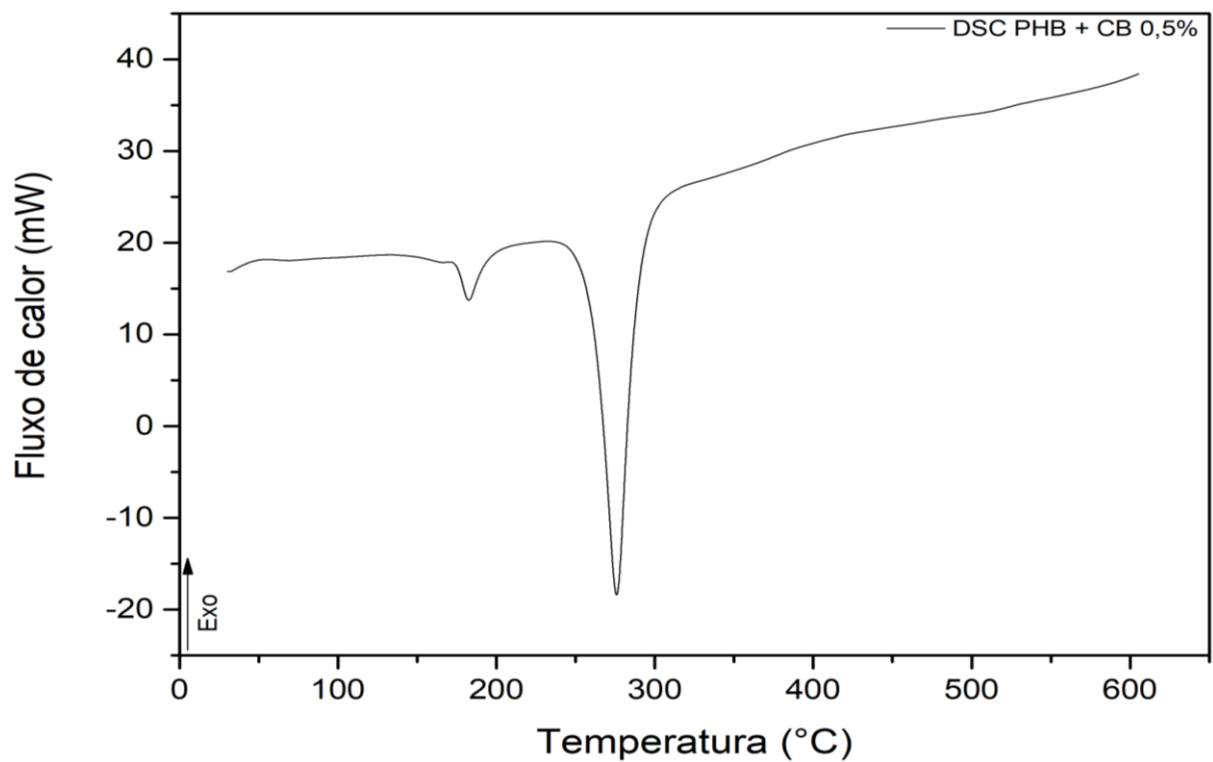


Figura 31. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 0,5 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.

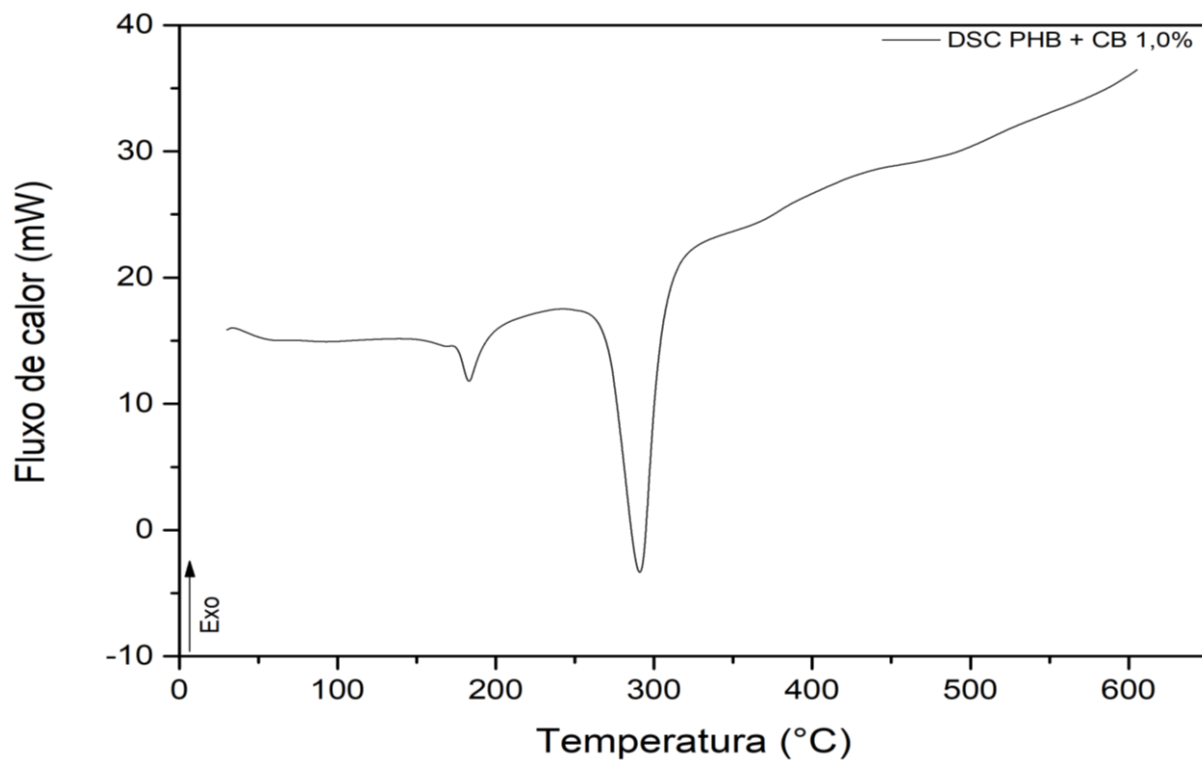


Figura 32. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 1,0 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.

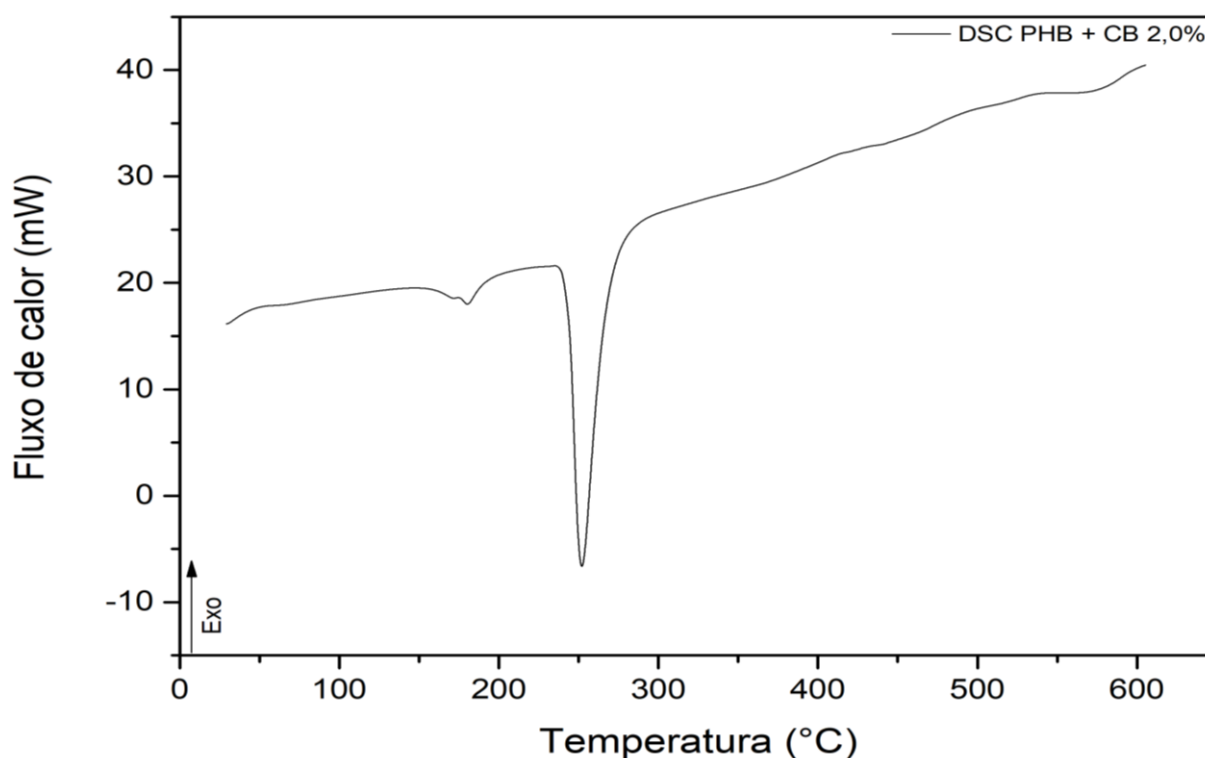


Figura 33. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do filamento compósito de poli(hidroxibutirato) (PHB)/ 2,0 % celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz.

3.3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 34, apresenta as principais bandas observadas são referentes ao PHB. São elas: 1000 – 1300 cm^{-1} – alongamento C-O do grupo éster; 1455 cm^{-1} – flexão assimétrica de $-\text{CH}_2$ ou $-\text{CH}_3$; 1718 cm^{-1} – alongamento C=O do éster; 1271 cm^{-1} – grupo CH; 2853 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} e 2981 cm^{-1} – alongamento C-H (SINDHU *et al*, 2011; RAMEZANI, M.; AMOOZEGAR, M.A.; VENTOSA, A., 2015).

Nota-se que a CB micronizada possui picos diferentes em relação ao PHB, entretanto esses picos não foram observados nos espectros dos filamentos compósitos que permaneceram com a maioria das características individuais do PHB. Isso demonstra que, mesmo utilizando a CB micronizada como agente de reforço, é possível manter, na maioria do material, os grupamentos químicos do PHB.

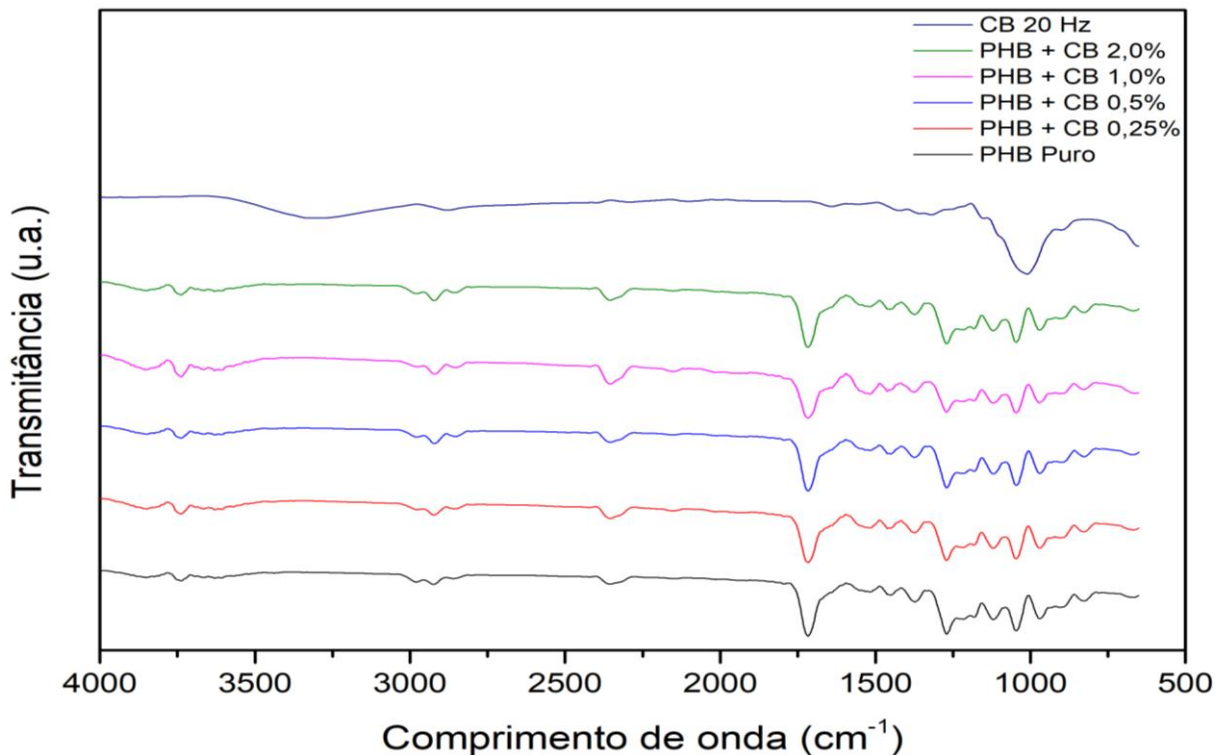


Figura 34. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da celulose bacteriana (CB) micronizada em 20 Hz e dos filamentos de poli (hidroxibutirato) (PHB) puro e dos filamentos compósitos baseados em PHB/CB.

3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio das microscopias dos filamentos, agrupadas na Figura 35, determinou-se o diâmetro médio dos filamentos, cerca de $1,60 \text{ mm} \pm 0,04$. Também foi possível observar que a seção transversal continha uma superfície inteiramente uniforme, compacta e sem bolhas indicando homogeneidade, uma característica essencial para os filamentos utilizados na impressão 3D.

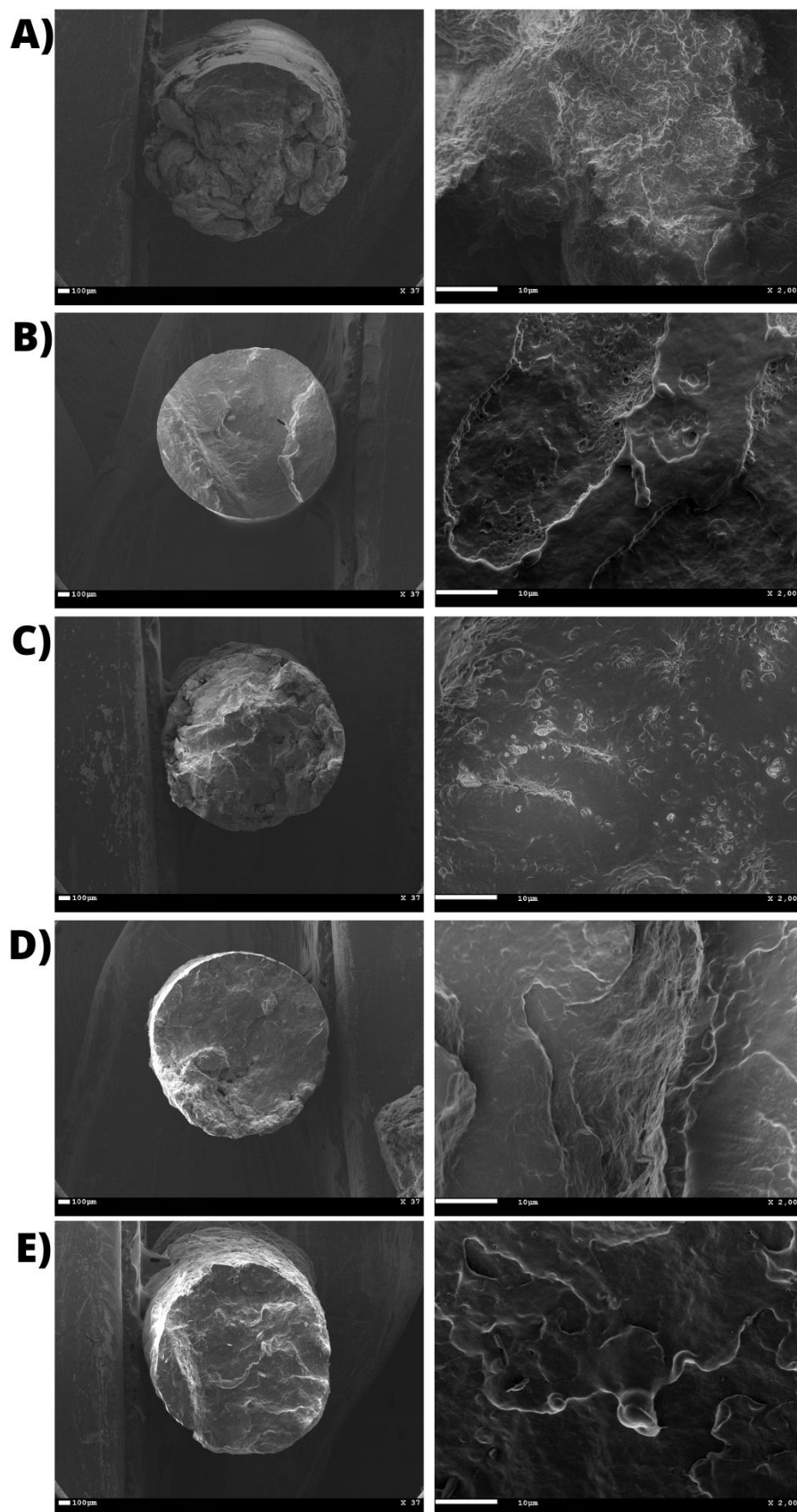


Figura 35. Microscopias eletrônica de Varredura (MEV) dos filamentos: (A) PHB puro, (B) PHB + CB 0,25%, (C) PHB + CB 0,5%, (D) PHB + CB 1 % e (E) PHB + CB 2%

3.5. Impressão 3D do scaffolds

Os filamentos de PHB puro e PHB/CB 0,25% foram impressos de forma homogênea, sem entupir o cabeçote ou quebrar o filamento (Figura 36). Os filamentos com porcentagens maiores de CB micronizada (0,5%, 1,0 % e 2,0 %) causaram o entupimento do bico da impressora (diâmetro 0,4 mm). Esse entupimento provavelmente ocorreu pela aglomeração das partículas de celulose na superfície do filamento e pela consequente alteração na viscosidade do material (ZANINI *et al*, 2021).

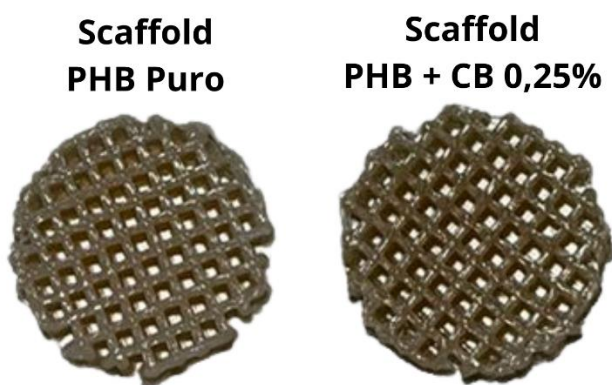


Figura 36. Scaffolds impressos utilizando o filamento de Poli (3 - hidroxibutirato) (PHB) puro (à esquerda) e o filamento compósito baseado em Poli (3 - hidroxibutirato) (PHB)/ Celulose bacteriana (CB) 0,25% (à direita)

4. CONCLUSÃO

O processo de obtenção dos filamentos empregado permitiu obter filamentos compósitos baseados em PHB/CB homogêneos, sem rachaduras ou quebras, características de um material passível de ser utilizado na impressão 3D.

Nas caracterizações, provavelmente em virtude do percentual da composição, observou-se que os filamentos apresentaram maior similaridade ao PHB que a CB independentemente da concentração de CB empregada. Como a CB está aplicada como agente de reforço esperava-se esse resultado, porém, são necessários ensaios mecânicos para avaliar a influência da CB quanto a resistência do material e ensaios de biocompatibilidade, citotoxicidade e de degradação para avaliar a influência da CB quanto à não rejeição das células, promoção de alteração metabólica e tempo de degradação do material, respectivamente.

Apesar da obtenção dos filamentos ter ocorrido sem complicações, observou-se que o aumento da concentração de celulose pode dificultar ou mesmo impedir a impressão dos scaffolds, logo, para com o intuito de evitar o entupimento do bico da impressora propõe-se algumas melhorias para o processo:

- 1 – Utilização de um misturador termocinético para obter filamentos com uma melhor dispersão de CB;
- 2 – Utilização da CB em escala nanométrica;
- 3 – Utilização de um bico com diâmetro maior;
- 4 – Utilização de uma impressora capaz de trabalhar com materiais de maiores viscosidades;

Embora a caracterização preliminar realizada neste trabalho não seja suficiente para validar os filamentos obtidos como um biocompósito aplicável na engenharia de tecidos, a obtenção desses filamentos, propósito do trabalho se mostrou um procedimento válido e interessante não somente pensando na obtenção de filamentos destinados à engenharia de tecidos, mas também a outras áreas.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

1. CONCLUSÕES

A utilização de resíduos industriais de CB em novos processos e produtos é uma forma de agregar valor aos mesmos, uma vez que, além de alinhar com os objetivos dos conceitos da economia circular e da sustentabilidade, a CB é um produto cobiçado no mercado por conta das suas propriedades, formatos de utilização e multifuncionalidade.

Naturalmente a CB já é um biomaterial com amplo espectro de aplicações, porém, o emprego do processo de micronização é capaz de incrementar essas aplicações uma vez que a micronização é um processamento que pode modificar a estrutura da CB fazendo com que este apresente características diferentes das características originais. Neste trabalho, obteve-se micronizados em três frequências de moagem diferentes (10, 20 e 30 Hz) que possibilitou a obtenção de três materiais com características diferentes, logo, a partir de um processo sustentável, é possível obter materiais com características adequadas de acordo com a finalidade.

Para a obtenção dos filamentos empregou-se os micronizados em 20 Hz em função da granulometria, homogeneidade e da relação entre a porção cristalina e a porção amorfa. Esse micronizado possibilitou obter compósitos mais homogêneos e uniformes. Conforme observado, para obter materiais compósitos não basta apenas misturar os dois componentes, mas é necessário também entender como ocorre essa interação e quais efeitos um processamento ou uma mistura de componentes terá no produto final. No caso dos filamentos, a diminuição da resistência térmica em função da incorporação da CB micronizada até a concentração de 0,25 % não foi significativa a ponto de impossibilitar a impressão, porém concentrações maiores podem requerer modificações no processo.

2. PERSPECTIVAS

A continuação dessa pesquisa consiste em avaliar a biocompatibilidade, citotoxicidade e propriedades mecânicas dos Scaffolds filamentos. Além disso, verificar a possibilidade de se implementar as melhorias propostas para a impressão dos filamentos com concentrações de 0,5, 1 e 2 % de CB.

REFERÊNCIAS

ANDRITSOU, V. *et al.* Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 10365–10373, 2018.

ANTONIO, R. V. *et al.* Produção de celulose bacteriana a partir de diferentes substratos. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 1, n. 2, p. 176, 2012.

ARAÚJO, I. M. S. *et al.* Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose–copper oxide nanocomposites and evaluation of their antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 179, n. May 2017, p. 341–349, 2018.

AVOLIO, R. *et al.* A multitechnique approach to assess the effect of ball milling on cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 265–273, 2012.

BARUD, H. S. **Preparo e caracterização de novos compósitos de celulose bacteriana**. 2006. 114 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/97942>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.

BARUD, H. S. **Materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 2010. 172 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/105766>>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2022.

BARUD, H. S. *et al.* Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1279–1284, 2011a.

BARUD, H. S. *et al.* Antimicrobial bacterial cellulose-silver nanoparticles composite membranes. **Journal of Nanomaterials**, v.2011 , 2011b.

BARUD, H. S. *et al.* Polylactic acid scaffolds obtained by 3D printing and modified by oxygen plasma. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 23, n. 1, p. 97–106, 2020.

BROWN, A. J. An acetic ferment, which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, London*, v. 49, p. 432-439, 1886.

CARVALHO, A. C. M. de. **Síntese e caracterização do poli(ácido láctico) para potencial uso em sistemas de liberação controlada de fármacos**. 2013. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Materiais, Ufrn, Natal, 2013. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/12842/1/S%C3%ADnteseCaract%20erizacaoPoli_Carvalho_2013.pdf. Acesso em: 25 jun. 2021

CHEN, Y. Q. *et al.* Multi-functional osteoclasts in matrix-based tissue engineering bone. **Chinese Journal of Traumatology - English Edition**, 2021.

CIOLACU, D., CIOLACU, F. e POPA, V. I. Amorphous cellulose—structure and characterization. **Cellulose chemistry and technology**, v. 45, n. 1, p. 13, 2011.

CONNER, B. P. *et al.* Making sense of 3-D printing: Creating a map of additive manufacturing products and services. **Additive Manufacturing**, v. 1, p. 64–76, 2014.

COURTENAY, J. C. *et al.* Surface modified cellulose scaffolds for tissue engineering. **Cellulose**, v. 24, n. 1, p. 253–267, 2017.

DA SILVA MOURA, A. *et al.* The influence of the coconut fiber treated as reinforcement in PHB (polyhydroxybutyrate) composites. **Materials Today Communications**, v. 18, n. Maio 2018, p. 191–198, 2019.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G. *et al.* Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 41–51, 2015.

DE OLIVEIRA BARUD, H. G. *et al.* A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 406–420, 2016.

GAO, C. *et al.* Regularity and mechanism of wheat straw properties change in ball milling process at cellular scale. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 214–219, 2017.

GEISSDOERFER, M. *et al.* The Circular Economy – A new sustainability paradigm? **Journal of Cleaner Production**, v. 143, n. Fevereiro, p. 757–768, 2017.

GHASSEMI, T. *et al.* Current concepts in scaffolding for bone tissue engineering. **Archives of Bone and Joint Surgery**, v. 6, n. 2, p. 90–99, 2018.

GIAQUINTO, C. D. M. *et al.* Evaluation of the mechanical and thermal properties of PHB/canola oil films. **Polimeros**, v. 27, n. 3, p. 201–207, 2017.

GISARIO, A. *et al.* Metal additive manufacturing in the commercial aviation industry: A review. **Journal of Manufacturing Systems**, v. 53, n. May, p. 124–149, 2019.

GOH, G. D. *et al.* Process–Structure–Properties in Polymer Additive Manufacturing via Material Extrusion: A Review. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, v. 45, n. 2, p. 113–133, 2020.

GORNI, A. A. Introdução à prototipagem rápida e seus processos. **Plástico Industrial**, p. 230-239, 2001.

GUPTA, H.; KUMAR, A.; WASAN, P. Industry 4.0, cleaner production and circular economy: An integrative framework for evaluating ethical and sustainable business performance of manufacturing organizations. **Journal of Cleaner Production**, v. 295, p. 126253, 2021.

HOSOKAWA, M. N. *et al.* Polyhydroxybutyrate composites with random mats of sisal and coconut fibers. **Materials Research**, v. 20, n. 1, p. 279–290, 2017.

HUANG, L. *et al.* Mechanical activation and characterization of micronized cellulose particles from pulp fiber. **Industrial Crops and Products**, v. 141, n. August, p. 111750, 2019.

IOELOVICH, M. Preparation, characterization and application of amorphized cellulose—a review. **Polymers**, v. 13, n. 24, 2021.

JI, G. *et al.* Mechanical fragmentation of corncob at different plant scales: Impact and mechanism on microstructure features and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 205, p. 159–165, 2016.

JIANG, L.; ZHANG, J. **Biodegradable and Biobased Polymers**. Applied Plastics Engineering Handbook. Ed. 2. P. 127-143. Elsevier Inc. 2017.

KANO, F. S.; DE SOUZA, A. G.; ROSA, D. DOS S. Variation of the milling conditions in the obtaining of nanocellulose from the paper sludge. **Revista Materia**, v. 24, n. 3, 2019.

KLEMM, D. *et al.* Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. **Materials Today**, v. 21, n. 7, p. 720–748, 2018.

KORHONEN, J.; HONKASALO, A.; SEPPÄLÄ, J. Circular Economy: The Concept and its Limitations. **Ecological Economics**, v. 143, p. 37–46, 2018.

KUHNT, T.; CAMARERO-ESPINOSA, S. Additive manufacturing of nanocellulose based scaffolds for tissue engineering: Beyond a reinforcement filler. **Carbohydrate Polymers**, v. 252, n. July 2020, p. 117159, 2021.

LAN, L. *et al.* Effect of Ball-Milling Pretreatment of Cellulose on Its Photoreforming for H₂ Production. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 10, n. 15, p. 4862–4871, 2022.

LEGNANI, C. *et al.* Transparent bacterial cellulose nanocomposites used as substrate for organic light-emitting diodes. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 30, n. 18, p. 16718–16723, 2019.

LI, N. *et al.* 3D printing to innovate biopolymer materials for demanding applications: A review. **Materials Today Chemistry**, v. 20, 2021.

LIM, J. *et al.* Emerging bone tissue engineering via Polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 917–929, 2017.

LIMA, L. R. *et al.* Cellulose Nanocrystals From Bacterial Cellulose. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1140–1147, 2015.

LING, Z. *et al.* Effects of ball milling on the structure of cotton cellulose. **Cellulose**, v. 26, n. 1, p. 305–328, 2019.

LINO, F. J.; NETO, R. J. A prototipagem rápida na indústria nacional. **2º Encontro Nacional do Colégio de Engenharia Mecânica da Ordem dos Engenheiros, Coimbra**, p. 4.15-4.22, 2000.

LIU, H. et al. Mechanochemical deconstruction of lignocellulosic cell wall polymers with ball-milling. **Bioresource Technology**, v. 286, n. March, p. 121364, 2019.

LIU, J. *et al.* Current advances and future perspectives of 3D printing natural-derived biopolymers. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, n. Junho 2018, p. 297–316, 2019.

MAIA, F. R. *et al.* Recent approaches towards bone tissue engineering. **Bone**, v. 154, n. Junho 2021, p. 116256, 2022.

MALLIAPPAN, S. P. *et al.* Bone tissue engineering: Anionic polysaccharides as promising scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 283, n. Janeiro, p. 119142, 2022.

MATOS, B. D. M. *et al.* Evaluation of commercially available polylactic acid (PLA) filaments for 3D printing applications. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 137, n. 2, p. 555–562, 2019.

MATTONAI, M. *et al.* Effect of ball-milling on crystallinity index, degree of polymerization and thermal stability of cellulose. **Bioresource Technology**, v. 270, n. Julho p. 270–277, 2018.

MELO, P. T. S. et al. Upcycling Microbial Cellulose Scraps into Nanowhiskers with Engineered Performance as Fillers in All-Cellulose Composites. **ACS applied materials & interfaces**, v. 12, n. 41, p. 46661–46666, 2020.

MEHRPOUYA, M. *et al.* Additive manufacturing of polyhydroxyalkanoates (PHAs) biopolymers: materials, printing techniques, and applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 127, n. Maio p. 112216, 2021.

MOHAMMADI ZERANKESHI, M.; BAKHSHI, R.; ALIZADEH, R. Polymer/metal composite 3D porous bone tissue engineering scaffolds fabricated by additive manufacturing techniques: A review. **Bioprinting**, v. 25, n. Janeiro, p. e00191, 2022.

NIEMI, P. et al. Effect of a milling pre-treatment on the enzymatic hydrolysis of carbohydrates in brewer's spent grain. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 155–160, 2012.

PARK, S. *et al.* Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnol Biofuels** 3, p. 10, 2010.

PARVIZIFARD, M.; KARBASI, S. Physical, mechanical and biological performance of PHB-Chitosan/MWCNTs nanocomposite coating deposited on bioglass based scaffold: Potential application in bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 645–662, 2020.

PEREIRA, T. F. et al. 3D printing of poly(3-hydroxybutyrate) porous structures using selective laser sintering. **Macromolecular Symposia**, v. 319, n. 1, p. 64–73, 2012.

PRADEEP, P. V.; PAUL, L. Review on novel biomaterials and innovative 3D printing techniques in biomedical applications. **Materials Today: Proceedings**, 2022.

PRADHAN, S. *et al.* Microbial production, ultrasound-assisted extraction and characterization of biopolymer polyhydroxybutyrate (PHB) from terrestrial (*P. hysterophorus*) and aquatic (*E. crassipes*) invasive weeds. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 304–310, 2017.

QU, H. *et al.* Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. **RSC Advances**, v. 9, n. 45, p. 26252–26262, 2019.

RAMEZANI, M.; AMOOZEGAR, M. A.; VENTOSA, A. Screening and comparative assay of poly-hydroxyalkanoates produced by bacteria isolated from the Gavkhooni Wetland in Iran and evaluation of poly- β -hydroxybutyrate production by halotolerant bacterium *Oceanimonas* sp. GK1. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 517–526, 2015.

REIS, K. C. *et al.* Particles of coffee wastes as reinforcement in polyhydroxybutyrate (PHB) based composites. **Materials Research**, v. 18, n. 3, p. 546–552, 2015.

SADEGHIANMARYAN, A. *et al.* Fabrication of chitosan/alginate/hydroxyapatite hybrid scaffolds using 3D printing and impregnating techniques for potential cartilage regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 204, n. Janeiro, p. 62–75, 2022.

SANTIAGO, J. V. B. *et al.* Evaluation of thermoplastic filaments to construct a disposable 3D printed platform for atomic absorption spectrometry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, n. 0123456789, 2021.

SEDDIQUI, H. *et al.* **Cellulose and its derivatives: towards biomedical applications.** [s.l.] Springer Netherlands, v. 28, 2021.

SINDHU, R. *et al.* Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 4, p. 783–794, 2011.

SILVA, R. *et al.* Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, I. L. A da. **Propriedades e estrutura de compósitos poliméricos reforçados com fibras contínuas de juta.** Universidade Estadual do Norte Fluminense–UENF. Centro de Ciências e Tecnologia. Tese de Doutorado. 110f, 2014.

SOLEYMANI EIL BAKHTIARI, S.; KARBASI, S.; TOLOUE, E. B. Modified poly(3-hydroxybutyrate)-based scaffolds in tissue engineering applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 986–998, 2021.

STOJAKOVIC, J. e MACGILLIVRAY, L. R. 7.05 - Cocrystals and Templates to Control Solid-State [2+2] Photodimerizations, **Comprehensive Supramolecular Chemistry II**, Elsevier, p. 84, 2017.

TANG, L. *et al.* Organic solvent-free and efficient manufacture of functionalized cellulose nanocrystals via one-pot tandem reactions. **Green Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 2369–2373, 2013.

TAPPI - TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **TAPPI T230 om – 94: Viscosity of pulp (capillary viscometer method)**, 2013.

TARIVERDIAN, T. *et al.* **Scaffold for bone tissue engineering**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2019.

TAKAGAKI, Luiz Koiti. Tecnologia de Impressão 3D. **RIT-REVISTA INOVAÇÃO TECNOLÓGICA**, v. 2, n. 2, 2013.

TONG, M.-L. e CHEN, X.-M. Chapter 8 - Synthesis of Coordination Compounds and Coordination Polymers. **Modern Inorganic Synthetic Chemistry**, 2ª edição, Elsevier, p. 189-217, 2017.

TORRADO PEREZ, A. R.; ROBERSON, D. A.; WICKER, R. B. Fracture surface analysis of 3D-printed tensile specimens of novel ABS-based materials. **Journal of Failure Analysis and Prevention**, v. 14, n. 3, p. 343–353, 2014.

TSUZUKI, T. Mechanochemical synthesis of nanoparticles, **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**, Elsevier, 2022.

UDAYAKUMAR, G. P. *et al.* Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 4, p. 105322, 2021

VAHABI, H. *et al.* Thermal stability and flammability behavior of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) based composites. **Materials**, v. 12, n. 14, p. 1–14, 2019.

VAN CRAEYVELD, V. *et al.* Extensive dry ball milling of wheat and rye bran leads to in situ production of arabinoxylan oligosaccharides through nanoscale fragmentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8467–8473, 2009.

VELENTURF, A. P. M.; PURNELL, P. Principles for a sustainable circular economy. **Sustainable Production and Consumption**, v. 27, p. 1437–1457, 2021.

WANG, J.; TAVAKOLI, J.; TANG, Y. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, n. Maio, p. 63–76, 2019.

YI, J. *et al.* Modular protein engineering-based biomaterials for skeletal tissue engineering. **Biomaterials**, v. 282, 2022.

ZANINI, N. et al. Palm Fibers Residues from Agro-industries as Reinforcement in Biopolymer Filaments for 3D-printed Scaffolds. **Fibers and Polymers**, v. 22, n. 10, p. 2689–2699, 2021.

ZHAO, K. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1041–1045, 2003.

ZHENG, L. et al. Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Antibacterial Materials as Wound Dressings. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. Novembro, p. 1–15, 2020.

ZHENG, Y. et al. Effects of ball milling processes on the microstructure and rheological properties of microcrystalline cellulose as a sustainable polymer additive. **Materials**, v. 11, n. 7, p. 1–13, 2018.