

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

Lucas Noboru Fatori Trevizan

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS
EM NANOCELULOSE BACTERIANA, APLICÁVEIS À BIOIMPRESSÃO 3D
EM MEDICINA REGENERATIVA

Araraquara, SP

2022

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

Lucas Noboru Fatori Trevizan

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS BASEADOS
EM NANOCELULOSE BACTERIANA, APLICÁVEIS À BIOIMPRESSÃO 3D
EM MEDICINA REGENERATIVA

Tese de Doutorado 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 Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientador: Professor Doutor Hernane da Silva Barud

Coorientador: Professor Doutor Caio Gomide Otoni

Coorientadora: Doutora Aline Passos Ribeiro

Araraquara, SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

T789d Trevizan, Lucas Noboru Fatori

Desenvolvimento e caracterização de hidrogéis baseados em nanocelulose bacteriana, aplicáveis à bioimpressão 3D em medicina regenerativa/Lucas Noboru Fatori Trevizan. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2023.

82f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Medicina Regenerativa- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

1. Biotintas. 2. Bioimpressão 3D. 3. Biomateriais. 4. Nanofibras de celulose bacteriana. 5. Gelatina. 6. Goma gelana. I. Título.


CDU 57.089

LUCAS NOBORU FATORI TREVIZAN

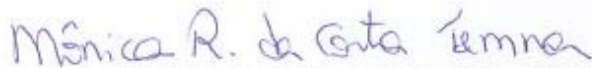
Tese apresentada a Universidade de Araraquara – UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal

Araraquara, 15 de dezembro de 2022

BANCA EXAMINADORA



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



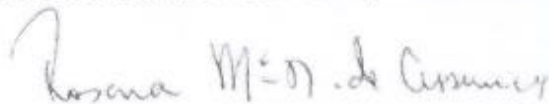
Profª Drª MÔNICA ROSAS DA COSTA IEMMA
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. RODRIGO ALVARENGA REZENDE
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. CLÓVIS AUGUSTO RIBEIRO
Instituto de Química de Araraquara/UNESP



Profª Drª ROSANA MARIA NASCIMENTO DE ASSUNÇÃO
Universidade Federal de Uberlândia/UFU

“A resistência vem em primeiro lugar, e ela permanece superior a todas as forças do processo, seu efeito obriga a mudarem as relações de poder.”

(Sexo, Poder E A Política Da Identidade – Michel Foucault)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente aos meus familiares pela ajuda nos anos de Doutorado.

Agradeço ao Professor Doutor *Hernane da Silva Barud*, pela orientação, experiência e ouvidos durante o processo de doutoramento.

Agradeço equipe do laboratório BIOPOLMAT pelo companheirismo e colaboração, em especial a *Mayté Paredes Zaldivar*, a *Lais Roncalho de Lima* e *Amanda Maria Claro* pela amizade e desabafos da vida acadêmica.

Agradeço ao Professor Doutor *Caio Gomide Otoni*, pelo auxílio e compreensão como coorientador da tese, além de auxiliar durante o processo de internacionalização.

Agradeço a Doutora *Aline Passos Ribeiro* pela ajuda e colaboração de pesquisa juntamente ao grupo SINCONTRON e SIRIUS, deixo meus agradecimentos.

Agradeço ao Professor Doutor *Orlando J. Rojas*, pela colaboração no exterior juntamente a *University of British Columbia* e a equipe do laboratório BiCMat. E agradeço ao ELAP e ao Governo do Canadá pela bolsa de estudos durante ao período de estudo no exterior.

Agradeço a CAPES, pelo apoio logístico e fornecimento da bolsa de estudos nível doutorado - Processo da CAPES/PROSUP 88887.371888/2019-00.

Agradeço às pessoas que fizeram parte da minha vida no Canadá, em especial para *Rachel Damiani de Souza*, *João Gabriel Santos*, *Mariana Sá* pela imensa parceria que cresceu em pouco tempo, que levarei pro resto da vida.

Agradeço a Equipe da secretaria da UNIARA, em especial a *Sandra R. Pavanelli* e a *Rosana Pazini* pela amizade e ajuda durante todo o meu processo de doutorado.

Agradeço aos meus amigos que conheci graças à UNIARA, especialmente a *Caroline Yamada*, *Ivonilde Bezerra da Silva Oliveira Lima* e *Reinaldo Oliveira Lima*

Agradeço aos meus amigos que sempre me acompanharam desde o início da minha vida escolar, em especial à: *Guilherme F. da S. Moraes*; *Ruy de A. Elias*, *Samela M. F. da Rocha*. Pois mesmo após muitos anos distantes nossa amizade continua sendo sempre a mesma e nunca deixando de faltar nas horas de necessidade.

Agradeço aos meus amigos que sempre me apoiaram desde a graduação, e mesmo com a distância permanecem intactas nossas relações: *Tatiene M. Zenni*; *Lorena A. Froio*; *Amanda Z. Crivelaro*; *Suelem M. Assmann*; *Guilherme M. Subtil*; *Guilherme G. M. Lugo*;

Agradeço a todos os amigos que fiz durante o processo de mudança de estado, pelo apoio e companheirismo que eu encontrei em Araraquara, nos tornando uma grande família nos últimos anos, *Mariza A. Fernandes*, *Lays R. Moura*, *João O. D. Abreu*, *Aldo S. Lima* e *Mário S. P. de Oliveira*;

E por fim agradeço de coração uma das pessoas mais importantes no processo de doutoramento, alguém que me ajudou a me colocar de volta no lugar, sendo companheiro nas fases difíceis, um amigo verdadeiro, estando presente mesmo quando faltava estabilidade emocional, agradeço imensamente a *Mauro Almeida Lima* por ter sido um irmão nesses últimos anos.

RESUMO

Nos últimos anos, houve uma demanda crescente por transplantes de tecidos e órgãos, culminando em longas filas de espera. Como alternativa para atender tal demanda, pode-se citar a manufatura aditiva de tecidos e órgãos a partir de biotintas (impressão tridimensional). As biotintas, por sua vez, devem atender aos requisitos tanto físicos quanto biológicos, como por exemplo: capacidade de impressão, degradação, funcionalização, integridade mecânica, assim como, serem compatíveis com o organismo e células alvo dos estudos, levando a um desenvolvimento e crescimento sem rejeição ou efeitos adversos, ou seja, possuindo biocompatibilidade e bioatividade. Em estudos de bioimpressão, hidrogéis carregados com células são geralmente utilizados devido às suas propriedades modificáveis de estruturação e sua capacidade de mimetizar o microambiente celular. As formulações destes hidrogéis podem derivar-se de materiais sintéticos, naturais ou misturas de ambos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar novas biotintas baseadas em nanofibras de celulose bacteriana (NFCB) tratadas ou não por processo enzimático, de endoglucanase, e associadas a gelatina (Gel) e goma gelana (GG) para bioimpressão 3D. Inicialmente, para verificação de áreas de potencial aplicação de biotintas e polímeros utilizados em mercado, foi realizado uma prospecção tecnológica sobre polímeros utilizados em patentes direcionadas à bioimpressão 3D em medicina regenerativa. Em seguida, diferentes formulações de NFCB/GG e NFCB/Gel foram testadas com diversos parâmetros de teor de polímero (massa/massa). A melhor biotinta (1:1; Gelatina/Nanofibra de nanocelulose bacteriana) foi utilizada para bioimpressão 3D de um corpo de prova. As propriedades físicas das formulações e hidrogéis impressos foram estudadas por técnicas como análise termogravimétrica; espectroscopia de absorção na região do infravermelho; microscopia eletrônica de varredura, microscopia óptica e reometria. Os hidrogéis obtidos apresentaram boa estabilidade térmica, viscosidade adequada para bioimpressão, homogeneidade sem a presença de particulados no hidrogel. Por fim, o ensaio de viabilidade celular indicou que o *scaffold* bioimpresso não apresentou citotoxicidade perante a linhagem de fibroblastos murinos derivados de tecido conjuntivo (L929) indicando seu potencial para aplicação em bioimpressão 3D na medicina regenerativa.

Palavras-chave: Biotintas; Bioimpressão 3D; Biomateriais; Nanofibras de Celulose Bacteriana; Gelatina; Goma Gelana.

ABSTRACT

In recent years, there has been a growing demand for tissue and organ transplants, culminating in long waiting lines. As an alternative to meet this demand, one can cite the additive manufacturing of tissues and organs from bioinks (three-dimensional printing). Bioinks, in turn, must meet both physical and biological requirements, such as: printing capacity, degradation, functionalization, mechanical integrity, as well as being compatible with the target organism and cells of the studies, leading to a development and growth without rejection or adverse effects, that is, having biocompatibility and bioactivity. In bioprinting studies, cell-loaded hydrogels are generally used due to their modifiable structuring properties and their ability to mimic the cellular microenvironment. The formulations of these hydrogels can be derived from synthetic, natural materials or mixtures of both. Given the above, the objective of this work was to develop and characterize new bioinks based on bacterial cellulose nanofibers (NFCB) treated or not by an enzymatic process, endoglucanase, and associated with gelatin (Gel) and gellan gum (GG) for 3D bioprinting. Initially, to verify areas of potential application of bioinks and polymers used in the market, a technological survey was carried out on polymers used in patents aimed at 3D bioprinting in regenerative medicine. Then, different formulations of NFCB/GG and NFCB/Gel were tested with different parameters of polymer content (mass/mass). The best bioink (1:1; Gelatin/Nanofiber from bacterial nanocellulose) was used for 3D bioprinting of a specimen. The physical properties of printed formulations and hydrogels were studied by techniques such as thermogravimetric analysis; absorption spectroscopy in the infrared region; scanning electron microscopy, optical microscopy and rheometry. The hydrogels obtained showed good thermal stability, adequate viscosity for bioprinting, homogeneity without the presence of particulates in the hydrogel. Finally, the cell viability assay indicated that the bioprinted scaffold did not present cytotoxicity against the murine fibroblast lineage derived from connective tissue (L929), indicating its potential for application in 3D bioprinting in regenerative medicine.

Keywords: Bioinks; 3D Bioprinting; Biomaterials; Bacterial Cellulose Nanofibers; Gelatin; Gellan Gum.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. Biotecnologia.....	1
1.2. Engenharia de tecidos	2
1.3. Manufatura Aditiva ou Impressão 3D	3
1.4. Histórico da Impressão 3D	3
1.5. Bioimpressão 3D.....	5
1.6. Biotintas para Impressão 3D.....	6
1.2. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO.....	6
CAPÍTULO 1: PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA: POLÍMEROS APLICADOS AO DESENVOLVIMENTO DE BIOTINTAS PARA BIOIMPRESSÃO 3D.....	7
2. INTRODUÇÃO - PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA	8
2.2. Conceitos Gerais sobre Propriedade Intelectual	8
3. OBJETIVO	10
4. METODOLOGIA.....	10
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
6. CONCLUSÃO – CAPÍTULO 1.....	18
7. PUBLICAÇÃO RELACIONADA	18
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO DE NANOFIBRAS DE NANOCELULOSE BACTERIANA PELO PROCESSO DE GRINDER E ATIVIDADE ENZIMÁTICA PÓS-PROCESSAMENTO	22
2. OBJETIVO	26
3. METODOLOGIA.....	26
3.1. Obtenção da Nanocelulose Bacteriana	26
3.2. Extração das Nanofibras de Nanocelulose Bacteriana	26
3.3. Tratamento Enzimático	27
3.4. Tamanho e Distribuição de Partícula.....	28
3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	28
3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	29
3.7. Grau de polimerização.....	29
3.8. Difratoimetria de Raios X (DRX)	30
3.10. Análise Termogravimétrica	31
3.11. Reometria	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1. Tamanho e Distribuição de Partícula.....	32
4.2. Tratamento enzimático	34
4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35
4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	37
4.5. Grau de Polimerização.....	38
4.6. Difratoimetria de Raios X (DRX)	40
4.7. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	42
4.8. Análise Térmica.....	43
4.9. Reometria.....	44
5. CONCLUSÃO – CAPÍTULO 2.....	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEL DE NANOFIBRA DE NANOCELULOSE BACTERIANA/GELATINA/GOMA

GELANA	51
1. INTRODUÇÃO	52
1.1. Biopolímeros	52
1.2. Hidrogéis para Bioimpressão	53
1.3. Associação Polimérica com Nanocelulose	54
1.4. Gelatina	55
2. OBJETIVO	56
3. METODOLOGIA.....	57
3.1. Obtenção da Nanocelulose Bacteriana	57
3.2. Extração das nanofibras de NCB.....	57
3.3. Seleção da Concentração do Agente Gelificante (Goma Gelana).....	57
3.4. Obtenção do Hidrogel de NFCB/Gelatina/Goma Gelana.....	58
3.5. Reometria	59
3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	59
3.6 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	59
3.7. Análise Térmica.....	60
3.8. Bioimpressão.....	60
3.9. Ensaio de Citotoxicidade	60
4. RESULTADOS E DICUSSÃO.....	62
4.1. Seleção da Concentração do Agente Gelificante (Goma Gelana).....	62
4.2. Reometria	65
4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	68
4.4. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	70
4.5. Análise de Termogravimetria	72
4.6. Bioimpressão.....	74
4.7. Ensaio de Citotoxicidade	75
5. CONCLUSÃO– CAPÍTULO 3.....	76
6. CONCLUSÃO FINAL	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Artigos e patentes dos biopolímeros associados ao desenvolvimento de tintas e biotintas aplicáveis a impressão 3D.....	12
Tabela 2. Dados de tempo de fluxo obtidos através da análise de grau de polimerização por viscosímetro.	39
Tabela 3. Dados obtidos da análise de grau de polimerização por viscosímetro	40
Tabela 4. Índices de cristalinidade das amostras de nanocelulose bacteriana e seus respectivos tratamentos segundo as análises de difratometria de raios X.	41
Tabela 5. Análise reométrica das amostras de nanocelulose bacteriana seguindo os parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald de Waele (1913).....	45
Tabela 6. Proporção das concentrações de teores mássicos (em %) dos hidrogéis desenvolvidos, sendo a massa de sólidos totais 5% (m/m).	58
Tabela 7. Parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald-de Waele (1913) .	63
Tabela 8. Parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald-de Waele (1913) .	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificações da Biotecnologia divididas por cores segundo Da Silva (2004).	1
Figura 2. Tríade da Engenharia de Tecidos. Adaptado de O'BRIEN (2011).....	3
Figura 3. Linha do tempo de impressoras 3D com a divisão de eras e eventos marcantes de acordo com Jakus, 2019. (Adaptado de JAKUS, 2019).	5
Figura 4. Número de artigos publicados para cada biopolímero selecionado. Fonte: Autoria própria	13
Figura 5. Número de patentes publicadas para cada biopolímero selecionados. Fonte: Autoria própria	13
Figura 6. Número de artigos científicos por ano de publicação no Scopus e Web of Science (2010-2022). Fonte: Autoria Própria.	14
Figura 7. Número de patentes depositadas por ano de publicação nas bases de patentes EPO e DERWENT (2010-2022). Fonte: Autoria Própria.	15
Figura 8. Ranking dos países que mais publicaram patentes dos biopolímeros associados a impressão 3D. Fonte: Autoria própria	16
Figura 9. Principais classificações internacionais de patentes atribuídas às patentes dos biopolímeros selecionados. Fonte: Autoria própria.....	17
Figura 10. Estrutura do monômero da celulose (adaptado de PINKET, et al., 2009)...	24
Figura 11. Diagrama esquemático dos componentes principais para produção da nanocelulose bacteriana (Adaptado de BROWN JR, 1989).....	25
Figura 12. Distribuição do tamanho de partícula expressa em Dx10, Dx50 e Dx90 resultante da desfibrilação de NCB em relação a ciclos de passagem pelo equipamento SuperMassColloider. (Fonte: Autoria Própria).	32
Figura 13. Perfil de distribuição do tamanho de partículas durante a desfibrilação de nanocelulose bacteriana por ultra refinação. (Fonte: Autoria Própria).	33
Figura 14. Distribuição do tamanho de partícula expressa em Dx10, Dx50 e Dx90 resultante da desfibrilação de NCB com e sem o tratamento enzimático pós processamento. (Fonte: Autoria Própria).....	34
Figura 15. Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras de nanocelulose bacteriana, sendo: a. Dispersão de Celulose (Ciclo 0); b. Ciclo 5; c. Ciclo 10; d. Pós-tratamento enzimático. Com ampliações de: 1. 15.000X e 2. 100.000X. (Fonte: Autoria Própria).	37
Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão das nanofibras de celulose bacteriana (NFCB) com e sem tratamento enzimático de endoglucanase (EG). a. NFCB; b. NFCB + EG. Fonte: Autoria Própria.....	38
Figura 17. Difratoograma de Raios X das amostras de nanocelulose bacteriana. Fonte: Autoria Própria.	40
Figura 18. Espectro de ATR-FTIR das amostras nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); nanofibra de nanocelulose bacteriana pós tratamento com endoglucanase (NFCB+EG). Fonte: Autoria Própria.	42
Figura 19. Gráficos obtidos a partir dos dados de análise térmica. Análise de Termogravimetria (TG); Termogravimetria Derivada (DTG). Sendo: nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); sem tratamento enzimático (s); com tratamento enzimático (c), Fonte: Autoria Própria.	43

Figura 20. Gráfico obtido da análise de reometria: Viscosidade (η) em função da taxa de cisalhamento (γ). (Fonte: Autoria Própria).	45
Figura 21. Imagens coletadas pelo equipamento Hydro Sight a fins de acompanhamento de análise de tamanho de partícula. a. Dispersão de nanocelulose bacteriana; b. Ciclo 1; c. Ciclo 2; d. Ciclo 3; e. Ciclo 4; f. Ciclo 5; g. Ciclo 6; h. Ciclo 7; i. Ciclo 8; j. Ciclo 9; k. Ciclo 10. (Fonte: Autoria Própria).....	47
Figura 22. Estrutura básica da Gelatina (Adaptada de KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2005).	55
Figura 23. Estrutura do monômero de Goma Gelana (Adaptado de MORRIS et al., 2012).	56
Figura 24. Dados obtidos pela análise de reometria de diferentes concentrações de Goma Gelana (GG), sendo: a. curvas de viscosidade dos hidrogéis de GG versus taxa de cisalhamento; b. Dados de viscosidade média de hidrogéis com diferentes teores de GG.	63
Figura 25. Avaliação de diferentes concentrações de hidrogéis de Goma Gelana frente a formação de filamento e scaffold a partir do método de bioimpressão 3D (Largura: 20 mm X comprimento: 20 mm X altura: 15 mm). Fonte: Autoria Própria.	64
Figura 26. Scaffolds de Goma Gelana após o processo de reticulação (20 mm X 20 mm X 15 mm). Fonte: Autoria Própria	65
Figura 27. Gráfico obtido da análise de reometria: Viscosidade (η) em função da taxa de cisalhamento (γ). Sendo: nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); Endoglucanase (EG); gelatina (Gel); goma gelana (GG); a. sem tratamento enzimático; b. com tratamento enzimático. (Fonte: Autoria Própria).....	66
Figura 28. Microscopia Eletrônica de Varredura dos hidrogéis e seus constituintes, sendo: a. NFCB; b. NFCB+EG; c. Gel; d. GG; e. Hidrogel de Gel/GG/NFCB; f. Hidrogel de Gel/GG/NFCB+EG. Com ampliações de: 1. 100X; 2. 15.000X e 3. 100.000X. (Fonte: Autoria Própria).	69
Figura 29. Espectro de ATR-FTIR das amostras de hidrogéis de NFCB/Gel/GG, sendo: a. Hidrogéis utilizando NFCB sem tratamento enzimático; b. Hidrogéis utilizando NFCB com tratamento enzimático; onde, nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); Endoglucanase (EG); Goma Gelana (GG); (Fonte: Autoria Própria).	70
Figura 30. Gráficos dos hidrogéis de NFCB/Gel/GG, e seus respectivos controles. a. Análise de Termogravimetria (TG); B. Termogravimetria Derivada (DTG). Sendo: nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); Endoglucanase (EG); Gelatina (Gel); goma gelana (GG). (Fonte: Autoria Própria).....	72
Figura 31. Scaffolds bioimpressos 20 mm x 20 mm X 15 mm de NFCB/Gel/GG. a. NFCB; b. NFCB+EG. Fonte: Autoria própria.....	74
Figura 33. Avaliação da citotoxicidade dos scaffolds de goma gelana e gelatina reticulados com cloreto de alumínio em células L929. A viabilidade celular (%) foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando MTT.	75

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Biotecnologia

Com o advento das novas tecnologias e a produção de novos produtos, a biotecnologia pode ser considerada uma das maiores áreas em expansão do cenário atual. De origem multidisciplinar, a biotecnologia tem por conceito a integração de diversas áreas do conhecimento como biologia, química, engenharia, microbiologia, genética, fisiologia, agronomia, zootecnia, entre outras (GUSMÃO et al, 2017).

Embora a biotecnologia possuir uma vasta distribuição de áreas do conhecimento, sua organização foi classificada em cores para facilitar sua caracterização ao seu perfil de atuação e sua conexão a efeitos psicológicos da humanidade (**FIGURA 1**) (DA SILVA, 2004).

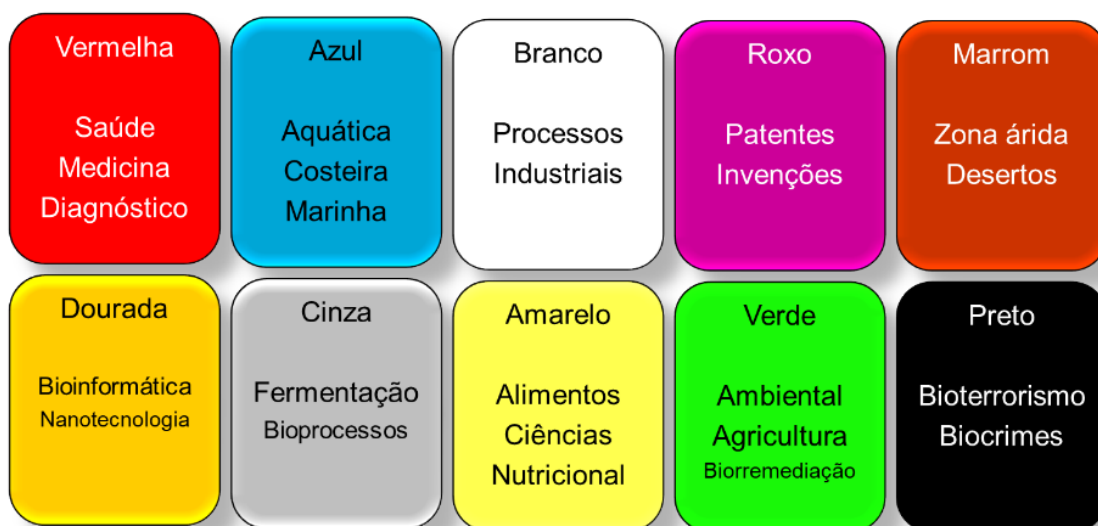


Figura 1. Classificações da Biotecnologia divididas por cores segundo Da Silva (2004).

Entretanto, ao se retratar em sua definição, pode se encontrar várias referências a mesma. Segundo Ferro (2010), o termo “biotecnologia” foi utilizado inicialmente em 1919 pelo húngaro Karl Ereky. Anos mais tarde, Scriban (1985) descreve a biotecnologia como o conjunto de conhecimentos técnicos e métodos, de base científica ou prática, que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços. Posteriormente, em 1992, a Convenção de Diversidade Biológica da Organização das Nações Unidas (ONU), determina que biotecnologia é qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos, ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica. Tal definição foi ratificada por cerca de 168 países, além de ser aceita por entidades

mundiais como a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) e Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* - WHO) (GUSMÃO et al, 2017). Outra definição encontrada para biotecnologia é dada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, e se refere ao termo biotecnologia, como “A integração das ciências naturais e das ciências da engenharia para alcançar a aplicação de organismos, células, suas partes e análogos moleculares para produtos e serviços” (IUPAC,1992).

Com o desenvolvimento da população, uma das principais áreas da biotecnologia que se expandiu foi a biotecnologia vermelha, sendo a sua principal aplicação direcionada a saúde. Com este avanço, áreas como diagnósticos, tratamentos e prevenções de doenças se tornaram pontos chave para o desenvolvimento de tecnologia, principalmente quando relacionado a engenharia de tecidos.

1.2. Engenharia de tecidos

O termo engenharia de tecidos foi inicialmente descrito em 1988 como "a aplicação de princípios e métodos de ciências da engenharia e da vida, em direção à compreensão fundamental de relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos, e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido" (O'BRIEN, 2011). Além disso, a engenharia de tecidos apresenta um caráter multidisciplinar, que engloba conhecimentos químicos, físicos, biológicos e médicos para o desenvolvimento de substitutos biológicos viáveis para a restauração, manutenção e adequação dos mesmos em suas funções. Desta forma, possui como objetivo desenvolver opções terapêuticas para serem aplicadas em condições clínicas específicas, pela substituição e/ou regeneração de tecidos utilizando biomateriais (CAI & XU, 2011; SHI et al., 2012; SHI et al., 2014).

A engenharia de tecidos dispõe-se diretamente da utilização de suportes 3D porosos para condicionar ambientes mais propícios para a regeneração de tecidos e órgãos. Estes suportes, chamados de *scaffolds*, essencialmente funcionam como um modelo para a formação de tecido, onde tipicamente são cultivados com células e fatores de crescimentos, ou ocasionalmente submetidos a estímulos biofísicos sob a forma de um biorreator (MARTIN et al., 2004). Estes *scaffolds* de células são cultivados *in vitro* para sintetizar os tecidos que poderão ser implantados no local da ferida ou diretamente no local da lesão, utilizando-se o próprio corpo do paciente como sistema, em que a regeneração de tecidos ou órgãos é induzida *in vivo*. Esta combinação de células, fatores

de crescimento e *scaffolds* é muitas vezes referida como a tríade da engenharia de tecidos, mostrada na **Figura 2** (O'BRIEN, 2011).

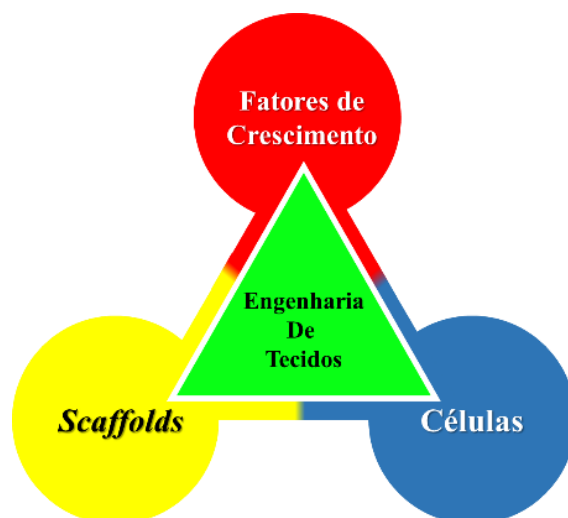


Figura 2. Tríade da Engenharia de Tecidos. Adaptado de O'BRIEN (2011).

A engenharia de tecidos convencional envolve a cultura de células, semeando-as em *scaffolds* biocompatíveis, permitindo o seu crescimento e maturação (*in vitro* ou via biorreator) para formação dos tecidos desejados. Atualmente, a tecnologia de bioimpressão 3D permite obter sistemas com maior precisão na relação espacial entre os elementos individuais do tecido desejado, constituindo uma grande promessa para aplicações na biotecnologia e medicina regenerativa (BISHOP et al., 2017).

1.3. Manufatura Aditiva ou Impressão 3D

A impressão 3D é um método pelo qual plásticos, metais ou polímeros são depositados em camadas para a produção de um objeto tridimensional (SCHUBERT; LANGEVELD; DONOSO, 2013). Atualmente, sua aplicação tem sido direcionada a diversas propostas (HAGER; GOLONKA; PUTANOWICZ, 2016). Além disso, os avanços das tecnologias têm impulsionado novas rotas para sua aplicação, principalmente nas áreas biomédicas (CHIA & WU, 2015).

1.4. Histórico da Impressão 3D

Quando relacionadas as companhias de impressão 3D, a história começa com a Helisys, fundada por Feygin em 1985, a qual seu principal subsidio era o processamento por laminação em chapas, embora sua primeira entrega fora realizada em 1991, a companhia teve sua finalização nos anos 2000 (BEAMAN et al., 1997). Também em

1985, Deken, no Japão, introduzia em mercado a primeira máquina de estereolitografia, SLP 300 (BEAMAN, et al., 1997; BOURELL, 2016).

Em 1986, Hull e Freed formaram a *3D Systems*, sendo considerada a primeira máquina de manufatura aditiva moderna, a SLA-1, foi lançada em 1987, e sua primeira venda ocorreu em 1988, tendo sua patente aprovada em 1992 (HULL, 1992). Em 1988, a empresa *Stratasys* foi fundada como a primeira companhia a desenvolver modelos baseados em modelagem de deposição fundida, *Fused Deposition Modeling* (FDM), em 1991 e sua patente foi aceita em 1992 (CRUMP, 1992; BEAMAN, et al., 1997).

De acordo com o estudo realizado por Jakus (2019), a evolução das empresas de bio-impressão 3D estão divididas entre eras (**FIGURA 3**). A primeira era (1970-1980) foi marcada pela primeira demonstração de um protótipo de manufatura aditiva. Logo em seguida, a segunda era (1980-1990), torna-se marcada pelo surgimento dos modelos de estereolitografia e sinterização seletiva de laser, juntamente com o a criação da *3D Systems*. A terceira era (1990-2005) foi marcada pelo aumento dos recursos computacionais e o amadurecimento da impressão 3D industrial, o que impulsionou o surgimento de outras novas companhias de impressão 3D pelo mundo. A quarta era (2005-2012) teve como principal fator a rápida expansão e maior conscientização da impressão 3D, o que resultou em uma ampliação da área, principalmente com a crescente aplicabilidade da técnica. Na quinta e sexta era (2012-2017), surgem as impressoras 3D de segunda geração e o início da aplicação médica desta tecnologia. Por fim, com o fim do período de patentes, a impressão 3D tornou-se muito popular em todo o mundo, atingindo até setores domésticos, e, sob a influência da revolução industrial 4.0, tornou-se uma ferramenta muito direcionada em todas as áreas do conhecimento.

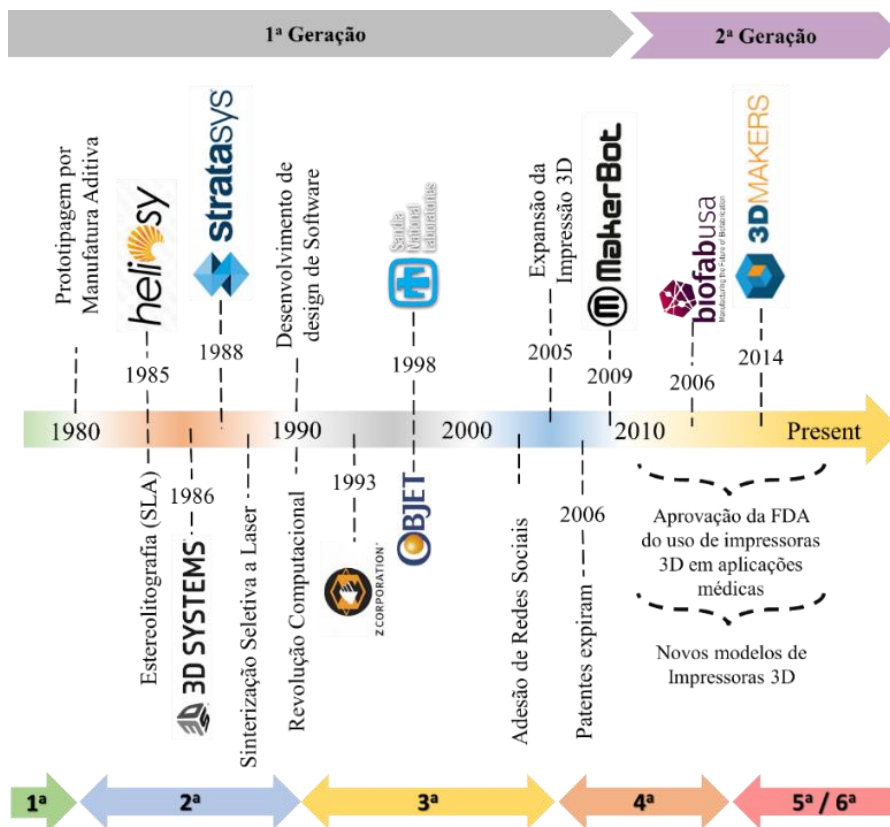


Figura 3. Linha do tempo de impressoras 3D com a divisão de eras e eventos marcantes de acordo com Jakus, 2019. (Adaptado de JAKUS, 2019).

1.5. Bioimpressão 3D

A tecnologia de bioimpressão 3D utiliza técnicas da manufatura aditiva, relaciona-se diretamente sob a deposição de biomateriais, células, estruturas biológicas e fatores de crescimento camada por camada (*layer by layer*), a fim da produção de tecidos e órgãos biosemelhantes e biocompatíveis. Além disso, tal tecnologia possibilita a utilização da impressão de suspensões celulares em uma estrutura com ou sem *scaffold* (BISHOP et al., 2017; JI & GUVENDIREN, 2017).

Um dos principais pontos a ser ressaltado no processo de bioimpressão, é sua característica branda e amistosa às células, uma vez que tal técnica deve possibilitar a impressão das mesmas sem danos além de permitir a manutenção da sobrevivência celular após o procedimento. Desta forma, tal requisito limita muitas técnicas convencionais de impressão 3D que se tornam inadequadas para tal finalidade. Diferentemente das outras técnicas as principais vantagens da utilização da bioimpressão 3D são: deposição precisa, reprodutibilidade, simplicidade e distribuição controlada de células, além da sobrevivência celular após o procedimento de impressão (JI & GUVENDIREN, 2017).

Dessa maneira, a partir dos dados apresentados anteriormente, denota-se a importância do desenvolvimento de novos biomateriais com tais propriedades que permitam uma adequação de e aplicabilidade “bem-sucedida”, ou seja, o desenvolvimento de biotintas de melhores características e maior abrangência de aplicabilidade (DERAKHSHANFAR et al., 2018).

1.6. Biotintas para Impressão 3D

As biotintas mais usadas para impressão de tecidos e órgãos são: hidrogéis carregados de células (*cell-laden hydrogel*), soluções de matriz extracelular descelularizada e suspensões de células. Entre estes, os hidrogéis carregados de células são particularmente atraentes devido a suas propriedades que variam de acordo com sua composição e sua capacidade de reproduzir o microambiente celular. As formulações podem utilizar tanto hidrogéis naturais (agarose, alginato, quitosana colágeno, gelatina e ácido hialurônico), sintéticos (polietilenoglicol e poloxâmeros), quanto misturas de ambos (KESTI et al., 2015; JI& GUVENDIREN, 2017).

Entretanto, quando referidos as novas técnicas de bioimpressão aplicáveis a medicina regenerativa, deve se ressaltar que o aprofundamento na área médica vem acompanhada de um desenvolvimento inventivo e de propriedade intelectual perante a sociedade, uma vez que a tecnologia sai à mercado e incentiva campos de pesquisa e inovação tanto a nível nacional quanto internacional. Com isso denota-se alguns conceitos sobre propriedade intelectual.

1.2. OBJETIVO GERAL DO TRABALHO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar novas biotintas baseadas em nanofibras de celulose bacteriana tratadas ou não por processo enzimático, de endoglucanase, e associadas a gelatina e goma gelana para bioimpressão 3D. Dessa forma o atual trabalho foi subdividido em três capítulos, nos quais foram verificados o número de publicações referentes a artigos e patentes aplicados no desenvolvimento de biotintas para bioimpressão 3D (Capítulo 1). Em seguida foi realizado uma caracterização de nanofibras de nanocelulose bacteriana direcionada como matriz para hidrogéis potencialmente aplicáveis para a bioimpressão, sendo estas submetidas a processamento enzimático ou não (Capítulo 2). E por fim foi realizado um estudo de desenvolvimento de hidrogel contendo nanofibras de nanocelulose bacteriana, goma gelana e gelatina para a bioimpressão de *scaffolds* aplicáveis a medicina regenerativa (Capítulo 3).

**CAPÍTULO 1: PROSPECÇÃO
TECNOLÓGICA: POLÍMEROS APLICADOS
AO DESENVOLVIMENTO DE BIOTINTAS
PARA BIOIMPRESSÃO 3D**

2. INTRODUÇÃO - PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

2.2. Conceitos Gerais sobre Propriedade Intelectual

Em resumo, os conceitos de propriedade intelectual e industrial podem ser descritos como um sistema formulado com o escopo de proteger e assegurar a exclusividade da atividade intelectual relacionando os campos literário, artístico e inclusive o campo industrial. Podendo estar ligada tanto a proteção de bens tangíveis como a proteção de bens intangíveis. Segundo a mesma classificação, tal sistema pode ser dividido em três classes:

1. **Propriedade industrial:** patentes “*lato sensu*”, marca, desenho industrial, entre outros;
2. **Direito autoral:** direito de autor, de software, entre outros;
3. **Proteção “sui generis”:** cultivares, topografias, circuitos integrados e conhecimentos tradicionais.

Além disso, quando direcionado a assuntos regulatórios biotecnológicos existem aspectos em âmbito nacional que diferem quanto ao internacional. Dessa maneira, com o intuito de desenvolver a propriedade industrial no Brasil foi criada, em 1970, um órgão Federal vinculado ao Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, o Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) o qual possui a finalidade de concessão de patentes (GOIATA & NAVES, 2017).

Segundo este sistema de patentes nacional, possuímos a Lei de Propriedade Industrial nº 9.279, sancionada em 14 de maio de 1996, na qual disponibiliza normas de regulamentação onde o Brasil se posiciona de forma clara quanto ao patenteamento de determinadas Biotecnologias.

Art. 10 - Não se considera invenção nem modelo de utilidade:

[...]

VIII - técnicas e métodos operatórios ou cirúrgicos, bem como métodos terapêuticos ou de diagnóstico, para aplicação no corpo humano ou animal;

IX - o todo ou parte de seres vivos naturais e materiais biológicos encontrados na natureza, ou ainda que dela isolados, inclusive o

genoma ou germoplasma de qualquer ser vivo natural e os processos biológicos naturais.

[...]

Art. 18 - Não são patenteáveis:

[...]

III - o todo ou parte dos seres vivos, exceto os microrganismos transgênicos que atendam aos três requisitos de patenteabilidade - novidade, atividade inventiva e aplicação industrial - previstos no art. 80 e que não sejam mera descoberta.

PARÁGRAFO ÚNICO - Para os fins desta lei, microrganismos transgênicos são organismos, exceto o todo ou parte de plantas ou de animais, que expressem, mediante intervenção humana direta em sua composição genética, uma característica normalmente não alcançável pela espécie em condições naturais. (BRASIL,1996)

Adicionalmente o INPI também apresentou o Estudo Comparativo dos Critérios de Patenteabilidade para Invenções Biotecnológicas em Diferentes Países do INPI, o qual também considera patenteável no Brasil:

[...] As composições que contenham material genético ou sequências de aminoácidos ou vírus, desde que devidamente caracterizadas como composições (ou seja, modificados em laboratório/grifo nosso);

As composições contendo extratos, moléculas, substâncias ou misturas obtidas de ou produzidas a partir de vegetais, animais ou microrganismos encontrados na natureza, desde que devidamente caracterizadas como composições, não são consideradas como produtos biológicos naturais;

Processos de extração/ isolamento. [...] (2007, p. 15-16)

Ao referido a nível internacional as regulamentações que regem o patenteamento biotecnológico, tem demonstrado que em diversos países é possível se patentear material

biológico. Contudo ainda é possível encontrar uma certa resistência quando se refere a motivos de ética, moral ou até mesmo conceitos legais vigentes do local (GOIATA & NAVES, 2017).

Dessa forma, devido as diferentes normativas para o depósito de patentes o objetivo deste trabalho foi realizar uma prospecção tecnológica das aplicações de hidrogéis utilizados para a bioimpressão 3D em medicina regenerativa.

3. OBJETIVO

O objetivo deste capítulo foi realizar uma prospecção tecnológica de polímeros utilizados para o desenvolvimento de hidrogéis direcionados a bioimpressão. A análise foi realizada a partir dos dados publicados nos periódicos das bases de dados *Web of Science* e *Scopus* e também por meio de buscas de patentes nas bases do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), *Derwent Innovation Index* e do *European Patent Office* (EPO) no período dos últimos 10 anos.

4. METODOLOGIA

Para este estudo foi realizado uma busca de anterioridade em bases de artigos e patentes nos anos de 2010 até abril de 2022. Os artigos foram pesquisados nas bases de artigos *Web of Science* e *Scopus* e as patentes nas bases do *European Patent Office* (EPO), do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) e da *Derwent World Patents Index*. Inicialmente foram realizadas buscas com as palavras-chave “*biopolymers*” AND “*bioink*”, e “*biopolymers*” AND “*3D Bioprinting*”. Dos biopolímeros encontrados, foram selecionados os sete com maior número de artigos encontrados: Ácido Hialurônico, Alginato, Colágeno, Gelatina, Celulose, Quitosana e Seda.

Depois de selecionados os biopolímeros, a pesquisa foi realizada com as palavras-chave “*Hyaluronic Acid*” AND “*Bioink*”, “*Hyaluronic Acid*” AND “*bioprinting*”, “*Alginate*” AND “*Bioink*”, “*Alginate*” AND “*bioprinting*”, “*Collagen*” AND “*Bioink*”, “*Collagen*” AND “*bioprinting*”, “*Gelatin*” AND “*Bioink*”, “*Gelatin*” AND “*bioprinting*”, “*Cellulose*” AND “*Bioink*”, “*Cellulose*” AND “*bioprinting*”, “*Chitosan*” AND “*Bioink*”, “*Chitosan*” AND “*bioprinting*”, e “*Silk*” AND “*Bioink*”, “*Silk*” AND “*bioprinting*”. Nos bancos internacionais (EPO e DERWENT), as buscas foram realizadas com os termos em inglês, contudo, no banco nacional de busca de patentes (INPI), foram feitas buscas com palavras em português e pelo fato de ter encontrado somente uma patente utilizando as palavras-chave “*bioink*” e “*bioprinting*”, além disso,

foi utilizada uma outra palavra chave correspondente à pesquisa que é “impressão 3D” o que resultou no aumento de patentes encontradas. Após a coleta de dados, foram comparados em relação a anos de publicação (data de publicação para patente), países de origem e número IPC (Classificação Internacional de Patentes).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se avaliar por comparação total, nota-se que a o volume de artigos publicados relacionados ao desenvolvimento de biotintas e bioimpressão é bem maior quando comparado a quantidade de patentes que são publicadas.

Ao analisar os dados da **Tabela 1**, foram encontrados no total 1931 artigos na base de dados *Scopus* e 1676 artigos encontrado na base de dados da *Web of Science* no período de 2010 até abril de 2022 Estes artigos foram relacionados ao desenvolvimento de tintas/hidrogéis/biotintas para aplicação na bioimpressão dos polímeros selecionados, 2010 a 2022.

Quando referido aos bancos de patentes podemos observar que pelo Escritório Europeu de patentes (EPO) foram encontradas 941 anterioridades referentes ao desenvolvimento de “biotintas”, “bioimpressão” para impressão 3D, já no banco Derwent pode-se encontrar 581 anterioridades referindo ao mesmo tema. Ao analisar a busca no banco nacional de patentes, INPI, denota-se uma redução muito brusca quando comparados a nível internacional. Contudo, é importante ressaltar que fora focado anterioridades que possuísse os polímeros selecionados para os desenvolvimentos de materiais aplicáveis a impressão 3D.

Segundo o estudo realizado por Do Nascimento e colaboradores (2020) pelo qual foi realizado uma prospecção tecnológica dos termos: *3D bioprinted* (bioimpressão 3D), *engineer tissue* (engenharia de tecidos), *tissue bioprinted* (tecido bio impresso), *tissue bioprinting* (bioimpressão de tecido), *3D tissue printing* (impressão 3D de tecido) e *bioprinting* (bioimpressão), pode se encontrar 886 patentes depositadas seguindo tal condições de pesquisa. Adicionalmente, foi observado durante o processo de coleta de dados no INPI, que grande parte das patentes relacionadas ao termo “*bioink*” estão direcionadas ao desenvolvimento de técnicas de preparo de células ou proteínas para aplicação em hidrogéis para impressão 3D, ou desenvolvimento de equipamentos voltados a impressão (bioimpressoras, cabeçotes de extrusão e afins). Com isso, indica que o desenvolvimento de novos modelos de bioimpressão já estão em desenvolvimento

no Brasil, contudo o desenvolvimento de “tintas” ainda está em ascensão no cenário nacional.

Tabela 1. Artigos e patentes dos biopolímeros associados ao desenvolvimento de tintas e biotintas aplicáveis a impressão 3D.

Termo	Base de Artigos		Base de Patentes		
	<i>Scopus</i>	<i>Web of Science</i>	EPO	Derwent	INPI
“Gelatin” AND “Bioink” “Bioprinting”	569	512	191	124	
“Alginate” AND “Bioink” “Bioprinting”	570	469	169	103	1
“Collagen” AND “Bioink” “bioprinting”	363	308	192	116	2
“Hyaluronic Acid” AND “Bioink” “bioprinting”	134	120	142	87	
“Cellulose” AND “Bioink” “bioprinting”	108	92	89	57	1
“Chitosan” AND “Bioink” “bioprinting”	89	101	113	74	
“Silk” AND “Bioink” “bioprinting”	98	74	45	20	
Total	1931	1676	941	581	3

Fonte: Autoria Própria

Ao relacionar aos polímeros por banco de dados, a Gelatina, o Alginato e Colágeno respectivamente ganharam destaque nos bancos de dados de artigos (**Figura 4**) enquanto de patentes o polímero que mais publicou patentes foi o colágeno seguido da gelatina e alginato (**Figura 5**). Segundo o estudo realizado por Da Costa Borges (2020), no qual fazendo uma prospecção tecnológica de biopolímeros usados para regeneração óssea demonstrou que o colágeno, alginato e gelatina estavam incluídos na pesquisa sendo o colágeno o polímero natural mais citados tanto nos artigos como em patentes.

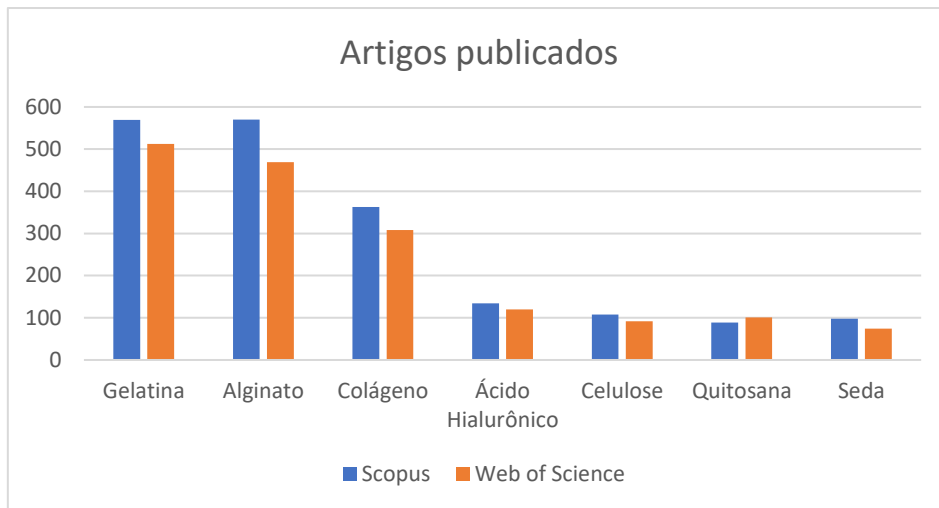


Figura 4. Número de artigos publicados para cada biopolímero selecionado. Fonte: Autoria própria

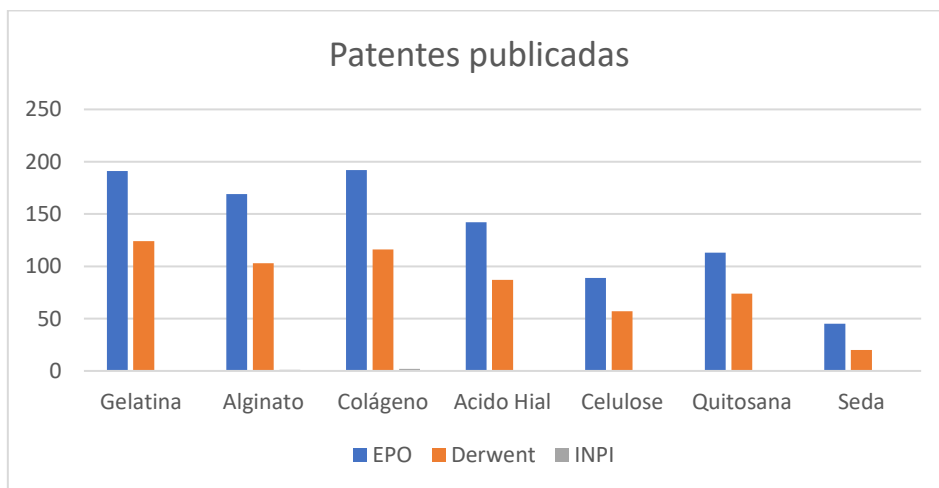


Figura 5. Número de patentes publicadas para cada biopolímero selecionados. Fonte: Autoria própria

Quando comparado os polímeros em relação a cada ano, nota-se que para as publicações de artigos científicos houve um aumento de pesquisas relacionadas a todos os polímeros selecionados com exceção do ano de 2022 devido a pesquisa limitada até abril de 2022 (**Figura 6**).

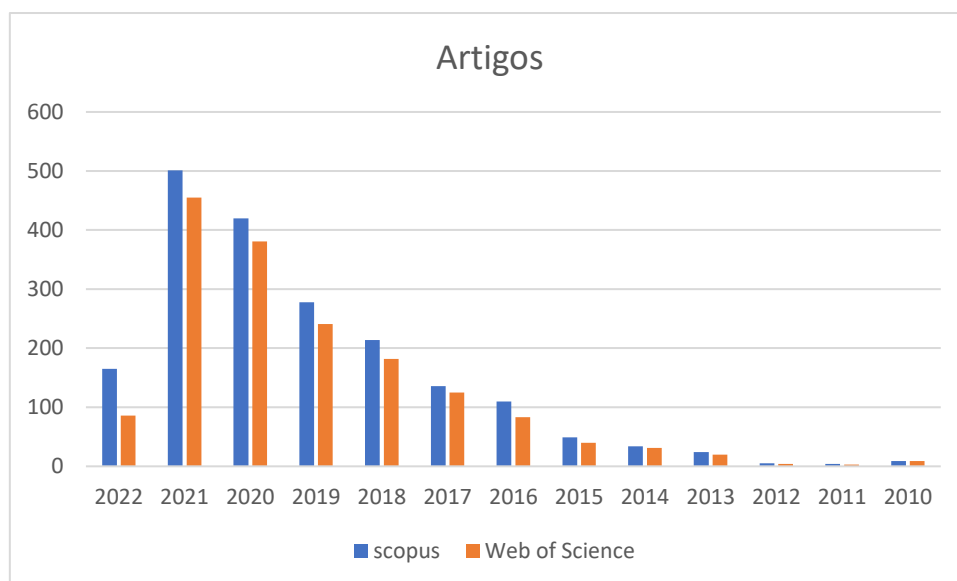


Figura 6. Número de artigos científicos por ano de publicação no Scopus e Web of Science (2010-2022). Fonte: Autoria Própria.

Ao relacionar os dados obtidos aos anos para os depósitos de patentes internacionais (**Figura 7**), pode-se observar um acréscimo nos depósitos até o ano de 2019 na EPO seguida de uma pequena queda nos anos 2020 e 2021. Além disso, na base de patente *Derwent* houve aumento até no ano de 2020 e observa um decréscimo ano de 2021.

Deve-se lembrar que os anos de 2020 e 2021 foram marcados pela grande perda global causada pela epidemia mundial causada pela Sars-Covid-19 (Covid 19). Dessa forma, tanto os escritórios de patentes quanto os grupos de pesquisa científico tiveram seu fechamento como medida sanitária, o que provavelmente refletiu na redução no número de patentes depositadas destes anos.

Ao analisarmos o cenário brasileiro, os dados do INPI, podemos notar que o Brasil ainda está em seu início da fase de desenvolvimento e patenteamento de tintas aplicáveis a bioimpressão, pela análise anual das patentes observa-se que 2020 foi encontrado somente 1 publicação utilizando o alginato e 2 publicações utilizando o colágeno. Contudo, observa-se que no número de publicações houveram 12 publicações no *Scopus* e 10 publicações no *Web of Science*. Assim indicando uma área em crescimento no cenário nacional.

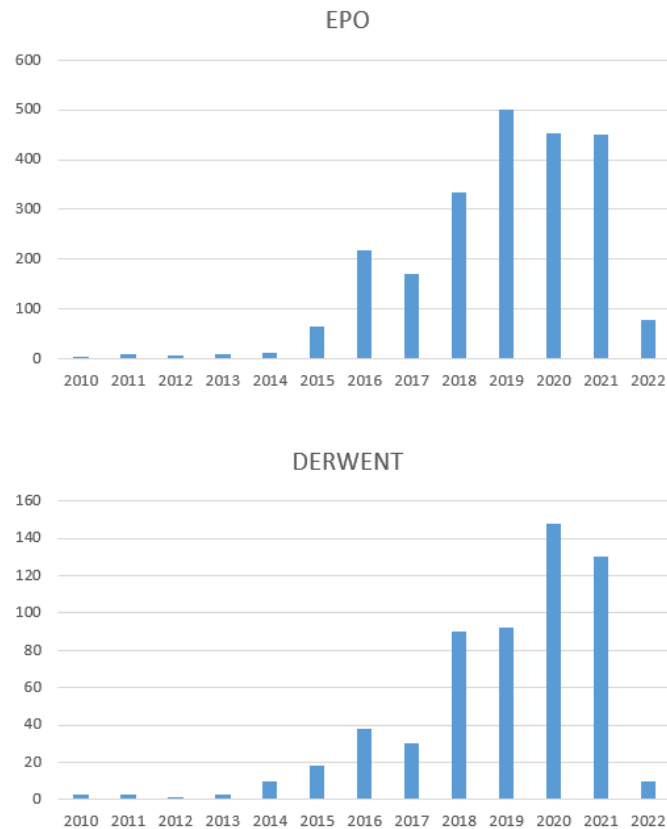


Figura 7. Número de patentes depositadas por ano de publicação nas bases de patentes EPO e DERWENT (2010-2022). Fonte: Autoria Própria.

Adicionalmente, quando analisado o conteúdo das patentes, denota-se que o desenvolvimento de patentes de tintas para a aplicação específica da bioimpressão pode se encontrar diretamente com o uso das palavras chave na anterioridade depositada, por exemplo (da tradução), “Formulações de Bio-Tinta, Lentícula Córnea Bio-Impressa e suas Aplicações”, na qual se refere no desenvolvimento e metodologia de impressão de uma córnea baseada em um hidrogel de ácido hialurônico (BHOWMICK, et al., 2021).

Outra anterioridade encontrada no banco nacional de patentes relacionados aos polímeros em estudo, é a depositada por Nelson e colaboradores (2020), intitulada “Composição de Biotinta para Bioimpressão 3D, Método de Fabricação de uma Composição de Biotinta para Bioimpressão 3D e Método de Fabricação de uma Bioestrutura Impressa em 3D” (BR 11 2020 018027 0 A2), na qual se refere a desenvolvimento de uma biotinta utilizando nanocelulose na forma de nanocristais de celulose e associado a alginato como combinação iônica reticulante e água, segundo descrição. Contudo, embora depositada no Brasil sua origem é dos Estados Unidos, nos traz ao outro ponto abordado nesta pesquisa, o índice de patentes depositadas pelos países.

Segundo os dados obtidos da análise de anterioridades nos bancos de patentes relacionada a origem do pedido (**Figura 8**) Nota-se que a maior parte das solicitações de patentes provem de países desenvolvidos, em ambos as bases de pesquisa os Estados Unidos e China lideram a quantidade de depósitos de patentes. Em seguida, pode se observar que há a presença da Coréia do sul, Índia e um número considerável de publicações pela Organização Internacional de Propriedade Intelectual (WO).

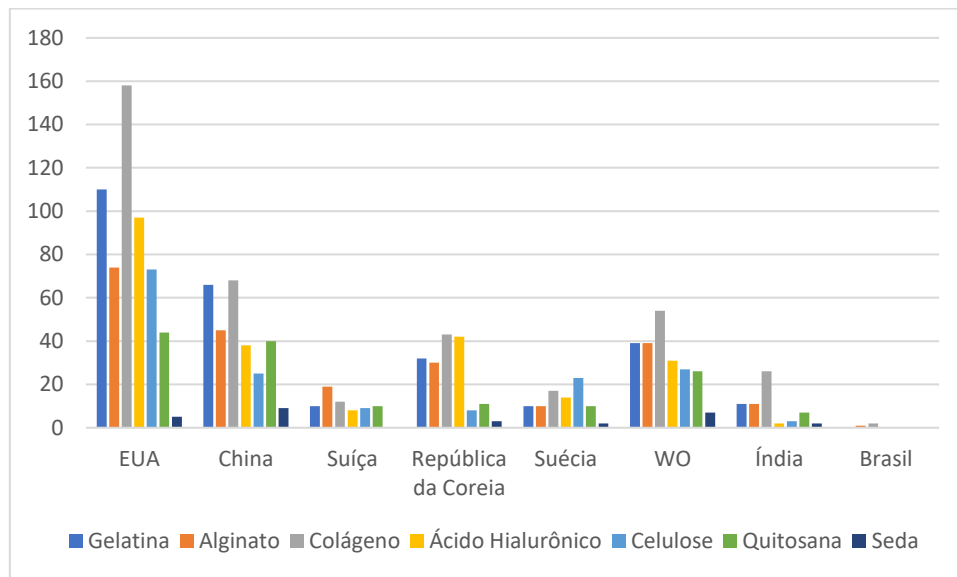


Figura 8. Ranking dos países que mais publicaram patentes dos biopolímeros associados a impressão 3D. Fonte: Autoria própria

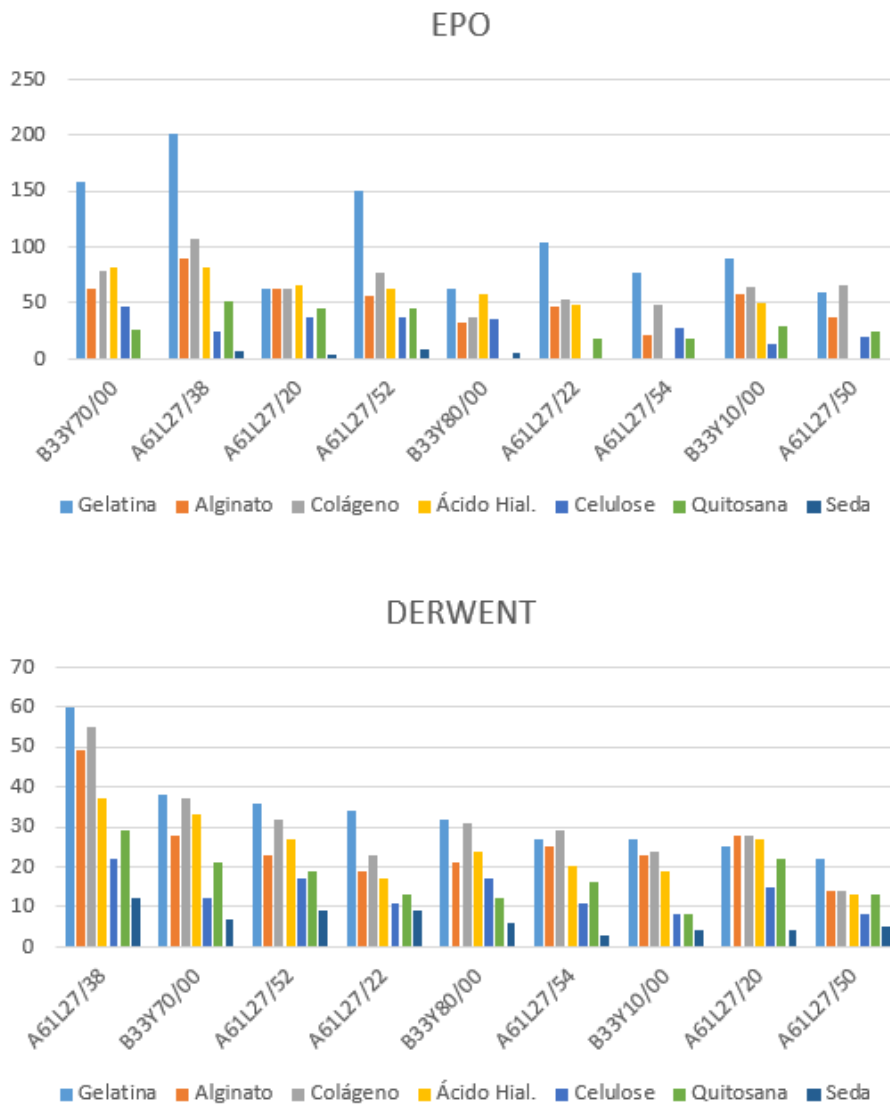


Figura 9. Principais classificações internacionais de patentes atribuídas às patentes dos biopolímeros selecionados. Fonte: Autoria própria

Para a classificação de patentes dos polímeros utilizados para o desenvolvimento de hidrogéis direcionados a bioimpressão realizado nesta pesquisa demonstrou que os códigos IPC mais citados foram os A61L27/38 e B33Y70/00 conforme **Figura 9**, sendo que o A61L 27/38 está relacionado com pesquisas contendo células animais adicionadas (órgãos ou tecidos contendo células nativas) e B33Y70/00 é a fabricação de objetos tridimensionais (3D) por deposição de aditivo. Estes resultados vêm corroborar com a pesquisa de impressão 3D dos biopolímeros.

6. CONCLUSÃO – CAPÍTULO 1

Esta prospecção tecnológica mostrou as tendências científicas relacionados aos polímeros selecionados nesta pesquisa, os quais estão voltados para o desenvolvimento de tintas aplicáveis à bioimpressão 3D, no período de 2010 até abril de 2022. Foi possível verificar neste estudo, que o colágeno, a gelatina e o alginato são os polímeros de maior utilização no desenvolvimento de biotintas. Também, foi possível observar que há um aumento no interesse em se desenvolver novos materiais biopoliméricos para esta área sendo como indicativo o crescimento de artigos relacionados a este tema.

Além disso, nota-se uma pequena participação do Brasil no desenvolvimento de biotintas, contudo estudos apontaram que para a área de bioimpressão com outros materiais e desenvolvimento de técnicas, já estão sendo realizados, o que indica um futuro promissor para a área de aplicação e desenvolvimento de biotintas a nível nacional.

7. PUBLICAÇÃO RELACIONADA

- Trevizan, L. N. F., da Costa Borges, M. A., & da Silva Barud, H. (2022). Prospecção tecnológica: polímeros aplicados ao desenvolvimento de biotintas para bioimpressão 3D Technological prospection: polymers applied to the development of bioinks for 3D bioprinting. *Brazilian Journal of Development*, 8(5), 42163-42181. DOI: DOI:10.34117/bjdv8n5-612

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEAMAN, J. J.; BARLOW, J.W.; BOURELL, D. L.; CRAWFORD, R. H.; MARCUS, H. L.; MCALEA, K. P. *Solid Freeform Fabrication: A New Direction in Manufacturing*. Boston: Kluwer. 1997.

BISHOP, E. S.; MOSTAFA, S.; PAKVASA, M.; et al. 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes and Diseases*, v. 4, n. 4, p. 185–195, 2017.

BOURELL, D. L. (2016). Perspectives on Additive Manufacturing. *Annual Review of Materials Research*, 46(1), 1–18. doi:10.1146/annurev-matsci-070115-031606

BHOWMICK, T.; CHANDRU, A.; SELVAM, S.; AGRAWAL, P.; BEN THOMAS, M.; BELLUR, P.; MENON, D. “BIO-INK FORMULATIONS, BIO-PRINTED CORNEAL LENTICULE, AND APPLICATIONS THEREOF”; WO2021019563A2; Publicação: Fev. 04, 2021.

BRASIL. Ministério da Economia. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. **Boletim Mensal de Propriedade Industrial: Estatísticas Preliminares**. Rio de Janeiro, v. 4, n. 8, p. 1-21, ago. 2019. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/sobre/estatisticas>. Acesso em: 3 dez. 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Convenção sobre Diversidade Biológica** (CDB). Aprovada pelo Decreto Legislativo nº 2, de 1994. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/agencia-informma/item/7513-conven%C3%A7%C3%A3o-sobre-diversidade-biol%C3%B3gica-cdb>. Acesso em: 3 dez. 2021.

BUARQUE, M. D. B. M.; ALMEIDA, L. E.; THIRÉ, R. M. S. M.; JUNIOR, J. M. O.; LIMA, P. A. L.; ANDRADE, G. S.; ROCHA, I. A. “PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SCAFFOLDS TRIDIMENSIONAIS PARA REGENERAÇÃO DE TECIDO ARTICULAR E PRODUTO OBTIDO”; BR 10 2018 014316 6 A2; Publicação Fev. 04, 2020.

CAI, X.-J.; XU, Y.-Y. Nanomaterials in controlled drug release. *Cytotechnology*, v. 63, n. 4, p. 319–323, 2011.

CHIA, H. N.; WU, B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of biological engineering*, v. 9, n. 1, p. 4, 2015.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB. Disponível em: < <https://cib.org.br/faq/o-que-e-biotecnologia/>, 2019>. Acesso em: 30 Dez. 2021.

CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY. 1992. Disponível em: <<http://www.cbd.int/>>. Acesso em: 30 Dez. 2021.

CRUMP, S. Scott. **Apparatus and method for creating three-dimensional objects**. U.S. Patent n. 5,121,329, 9 jun. 1992.

DA COSTA BORGES, Marco Antonio et al. Biopolímeros para regeneração óssea na Odontologia: uma prospecção tecnológica.

DA SILVA, E. J. The colours of biotechnology: science, development and humankind. **Electronic journal of biotechnology**, 7(3), 01-02, 2004.

DERAKHSHANFAR, S.; MBELECK, R.; XU, K.; et al. 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances. **Bioactive Materials**, v. 3, n. 2, p. 144–156, 2018.

DO É NASCIMENTO, G. D., PEDUTI, G. P., DE CARVALHO, A. M. L., DINIZ, M. C. Bioimpressão 3D de tecidos e órgãos: uma prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, 13(5), 1383-1383, 2020.

FERRO, E. S. Biotecnologia translacional: hemopressina e outros peptídeos intracelulares. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 109-121, 2010.

GOIATÁ, Sarah Rêgo; DE OLIVEIRA NAVES, Bruno Torquato. Patentes em biotecnologia, 2017.

GUSMÃO, A. O.; DA SILVA, A. R.; MEDEIROS, M. O. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade**, v. 16, n. 1, 2017.

HAGER, I.; GOLONKA, A.; PUTANOWICZ, R. 3D printing of buildings and building components as the future of sustainable construction? **Procedia Engineering**, v. 151, p. 292-299, 2016.

HULL, Charles W. et al. **Method and apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography**. U.S. Patent n. 5,137,662, 11 ago. 1992.

IUPAC Recommendations, Glossary for chemists of terms used in biotechnology, **Pure Applied Chemistry**, Vol. 64, No. 1, pp. 143-168, 1992 DOI: <http://dx.doi.org/10.1351/pac199264010143>

JAKUS, A. E. An Introduction to 3D PrintingdPast, Present, and Future Promise. **3D Printing in Orthopaedic Surgery**, p. 1, 2018.

Jl, S.; GUVENDIREN, M. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. April, p. 1–8, 2017.

KESTI, M.; EBERHARDT, C.; PAGLICCIA, G.; et al. Bioprinting Complex Cartilaginous Structures with Clinically Compliant Biomaterials. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 48, p. 7406–7417, 2015. KIM, S. H.; LEE, J. Y.; OH, S. J.; “HYDROGEL COMPOSITION AND BIOINK COMPOSITION INCLUDING THE SAME”; US2020101194A; Publicação: Fev. 04,

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia**. 2. ed. [E-book]. Rio de Janeiro: BTeduc, 2016.

MARTIN, I.; WENDT, D.; HEBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 80–86, 2004.

NELSON, K.; WHITAKER, I.; JESSOP, Z.; AL-SABAH, A.; “Composição De Biotinta Para Bioimpressão 3d, Método De Fabricação De Uma Composição De Biotinta Para Bioimpressão 3d E Método De Fabricação De Uma Bioestrutura Impressa Em 3D”, BR 11 2020 018027 0 A2; Publicação: Dez., 22, 2020.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, 2011.

SCHUBERT, C.; VAN LANGEVELD, M. C.; DONOSO, L. A. Innovations in 3D printing: a 3D overview from optics to organs. **British Journal of Ophthalmology**, v. 98, n. 2, p. 159-161, 2014.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. S. Paulo: Manole, 1985

SHI, Q.; LI, Y.; SUN, J.; ZHANG, H.; CHEN, L.; CHEN, B.; YANG, H.; WANG, Z. The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2. **Biomaterials**, v. 33, n. 28, p. 6644–6649, 2012.

SHI, L. B.; CAI, H. X.; CHEN, L. K.; WU, Y.; ZHU, S. A.; GONG, X. N.; XIA, Y. X.; OUYANG, H. W.; ZOU, X. H. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency. **Biomaterials**, v. 35, n. 5, p. 1519–1530, 2014.

**CAPÍTULO 2: EXTRAÇÃO DE NANOFIBRAS
DE NANOCELULOSE BACTERIANA PELO
PROCESSO DE GRINDER E ATIVIDADE
ENZIMÁTICA PÓS-PROCESSAMENTO**

1. INTRODUÇÃO

A celulose ($C_6H_{10}O_5$) - um homopolissacarídeo linear de alta massa molecular com ligações β -1,4 glicosídicas formadas após a polimerização de unidades de anidroglicose. Tal polímero têm recebido muita atenção em diferentes áreas da pesquisa, principalmente para aplicações biomédicas e farmacêuticas. Devido a sua característica de ser um biopolímero renovável e muito abundante, o qual alcança 1 trilhão de toneladas na natureza e apresentando um aumento de aproximadamente 100 bilhões de toneladas por ano como resultado da fotossíntese (KLEMM et al., 2005). Este polímero apresenta propriedades únicas, tais como alta resistência mecânica e rigidez, biodegradabilidade e renovabilidade, as quais se devem, principalmente, à habilidade dos grupamentos hidroxílicos formarem interações supramoleculares do tipo ligações de hidrogênio, levando ao empacotamento estrutural da celulose numa forma fibrilar e semicristalina (KOLAKOVIC et al., 2012; JORFI & FOSTER, 2015).

Além disso, a celulose também pode ser obtida a partir da bactéria do gênero *Komagataeibacter* Sp. que produz a celulose bacteriana. A nanocelulose bacteriana (NCB) apresenta uma estrutura tridimensional baseada em nanofibrilas de celulose – com diâmetros entre 3 e 3,5 nm - com elevado grau de entrecruzamento, através de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (**Figura 10**). (MACHADO et al., 2016). Ao se retratar a perspectiva de mercado em comparação com a celulose vegetal e bacteriana, Donini e colaboradores (2010) estimaram que, por exemplo, 1 hectare de eucalipto como Incremento Médio Anual (IMA) de 50 m^3 , além de considerar uma densidade básica de 500kg por m^3 , resulta em um IMA de 25 toneladas por hectare/ano. Ou seja, se estimarmos um plantio com 7 anos com um teor de aproximadamente de 45% de celulose, teríamos 80 toneladas de celulose por hectare em 7 anos de cultivo (GOMIDE et al., 2005). Tal produção é alcançada com a celulose bacteriana seguindo um rendimento hipotético de 15 gramas por litro em 50 horas em um biorreator de 500 m^3 (média de 0,3 g por hora). Em outras palavras, tem-se uma produção de celulose bacteriana equivalente a 1 hectare de eucalipto em sete anos sendo produzida em aproximadamente em 22 dias (DONINI et al., 2010).

Adicionalmente, as principais vantagens da NCB são: estrutura química similar à celulose vegetal; elevada pureza química (livre de lignina, hemicelulose e pectinas) que elimina etapas posteriores de purificação; densidade superior à celulose de plantas e diâmetro reduzido das fibras; elevado módulo de Young e possibilidade de produção em

escala industrial através de algumas espécies de bactérias gram-negativas (ABEER et al., 2014; OLIVEIRA BARUD et al., 2015).

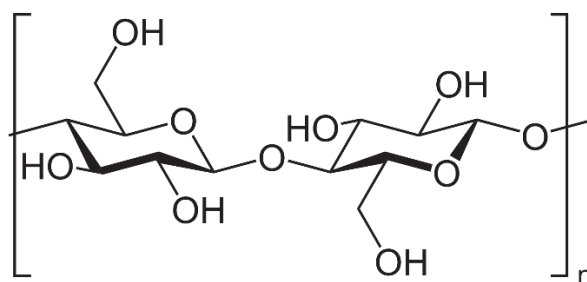


Figura 10. Estrutura do monômero da celulose (adaptado de PINKET, et al., 2009).

Devido a essas propriedades peculiares, a NCB apresenta aplicações na medicina como substitutos temporários da pele, tubos para cirurgia, lentes de contato, nanocompósitos antimicrobianos, entre outras. As empresas Nexfill, Bionext e Membracel utilizam a CB produzida no Brasil como substituto temporário de pele. Na área de alimentos é bastante empregada como espessante e como fonte de fibras em alimentos funcionais.

Adicionalmente, o termo nanocelulose bacteriana é o nome dado para diferentes tipos de celulose que possuem pelo menos uma dimensão menor que 100nm (AITOMÄKI & OKSMAN, 2014), podendo ser obtida por dois tipos de processos: *bottom-up* (biosíntese), na qual a formação da nanocelulose bacteriana é realizada no interior celular e em seguida é exsudada por um “componente de exportação celular” ou “bocal de extrusão biológico” o que resulta em uma protofibrila de cerca de 2-4 nm de diâmetro, que posteriormente se agrupa na forma de microfibrila de 80 nm-4 μ m (**Figura 11**) (IGUCHI et al., 2000); ou *top-down* (desintegração) de maneira que: i) a nanocelulose bacteriana corresponde a um exo-polissacarídeo produzido a partir de algumas bactérias gram-negativas e com diâmetro reduzido (20-100 nm) e numerosa quantidade de fibrilas; ii) nanocristais de celulose (ou *nanowhiskers* de celulose) com diâmetro variando entre 5-20 nm (MATHEW et al., 2008) e extensão de 100-500 nm são obtidos por processos químicos, tais como a hidrólise ácida da celulose vegetal, na qual as regiões amorfas são removidas, preservando somente a porção cristalina e iii) nanofibrilas de celulose, consistindo de nanofibras elementares e agregadas de 1 μ m de extensão e 10-100 nm de diâmetro, obtidas por processos mecânicos em *grinder* ou homogeneizador de alta pressão, os quais promovem uma esfoliação das ligações de hidrogênio interfibrilares (KIM et al., 2015).

Como resultado do processo de fibrilação, as micro e nanofibrilas têm um aumento da área superficial e uma redução em seu tamanho fibrilar, o que potencializa as interações entre as fibrilas relacionadas à grande quantidade de grupos hidroxila. Por esse motivo, a interação com a água, a viscosidade, o módulo de elasticidade e a flexibilidade também são aumentados (BERTO, et al., 2019).

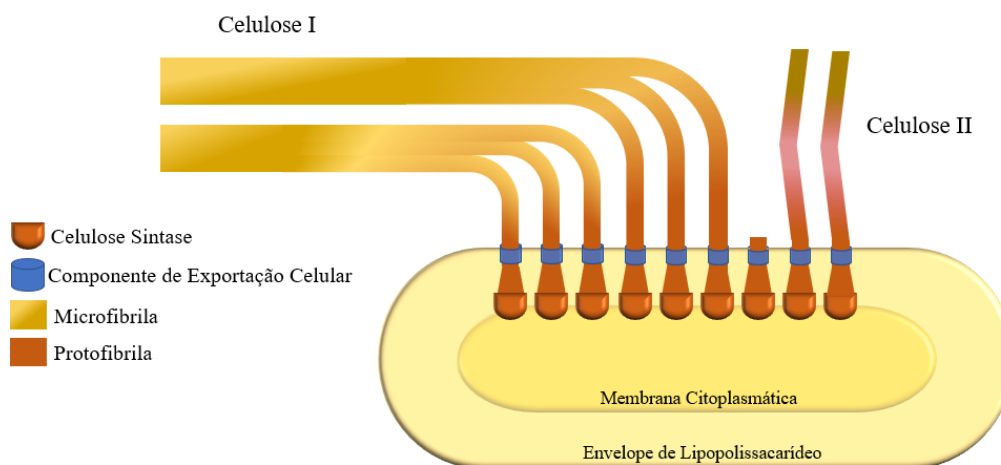


Figura 11. Diagrama esquemático dos componentes principais para produção da nanocelulose bacteriana (Adaptado de BROWN JR, 1989).

No sentido de melhorar as propriedades mecânicas da nanocelulose, estudos têm mostrado a utilização dos processos de moagem associados à tratamentos enzimáticos principalmente às modificações das propriedades mecânicas relacionadas as nanofibras de celulose. Dessa forma, enzimas hidrolisadoras de celulose, são aplicadas devido a seu efeito de desfibrilação eficaz, além de possuir um custo relativamente menor, maior disponibilidade comercial e biossegurança, tanto considerando a natureza da enzima quanto o produto liberado de suas interações com o substrato (BERTO et al., 2021). O tratamento enzimático utilizando a enzima endoglucase ocorre devido ao mecanismo da enzima, que afeta as regiões amorfas da celulose, quebrando as aleatoriamente ligações glicosídicas e introduzindo novas pontas reductoras e não reductoras. Adicionalmente, as endoglucanases possuem a capacidade de preservar as regiões cristalinas da celulose (BIAN et al., 2019).

A NCB tem sido alvo de importantes e avançadas pesquisas nas últimas décadas para aplicações biomédicas, seja na forma de curativos para feridas de difícil cicatrização e queimaduras, ou como substituintes cutâneo, ósseo, de cartilagens, entre outros, o que se deve, principalmente, à grande similaridade da sua estrutura nanofibrilar com as fibras colágenas (BÄCKDAHL et al., 2006). Além disso, estudos recentes indicam que a utilização de hidrogéis de nanocelulose bacteriana aplicadas à bioimpressão são

promissoras devido a sua capacidade de agregação e estruturação 3D (WANG et al., 2018; SHIN et al., 2019).

Com bases nos dados supracitados, o trabalho teve como objetivo realizar a extração de nanofibras de nanocelulose bacteriana e realizar uma comparação das nanofibras extraídas com ou não a aplicação enzimática, uma vez que, a utilização enzimática possa alterar as propriedades mecânicas das nanofibras de nanocelulose bacteriana.

2. OBJETIVO

O objetivo deste capítulo foi verificar a obtenção e caracterização de nanofibras de nanocelulose bacteriana utilizando ou não um pós tratamento enzimático.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção da Nanocelulose Bacteriana

As membranas de Nanocelulose Bacteriana foram fornecidas grupo *Seven* Indústria de produtos Biotecnológicos Ltda, situada no estado do Paraná, Brasil. O cultivo da bactéria *Komagataeibacter xylinus* foi realizado em bandejas de 30 cm X 50 cm com tempo de cultivo de 96 horas a 28°C. O meio de cultura foi composto por glicose 2% (m/v); peptona 0,5% (m/v); fosfato dissódico anidro 0,27% (m/v); e ácido cítrico monoidratado 0,115% (m/v). Posteriormente ao cultivo, as mantas de NCB obtidas foram limpas para a remoção de resíduos do meio de cultivo e remoção das bactérias. O processo limpeza foi realizado submetendo as membranas de NCB úmidas à uma solução básica de Hidróxido de sódio (NaOH) 0,1% (m/v) a temperatura de 70°C. Posteriormente foi submetido a um banho ultrassônico utilizando água destilada para a remoção do NaOH.

3.2. Extração das Nanofibras de Nanocelulose Bacteriana

A metodologia utilizada foi de Berto & Arantes (2019) com modificações para nanocelulose bacteriana. Inicialmente as mantas de nanocelulose bacteriana foram recortadas em peças menores a fim de reduzir a resistividade quando relacionada ao ultra refinador. Os pedaços da membrana de nanocelulose bacteriana foram desfibrilados no ultra refinador de disco *SuperMassColloider* (Masuko, modelo MKCA6-5J). Utilizando discos (modelo MKGA10-80) feitos de material cerâmico (óxido de alumínio e resina) sem porosidade para prevenir a infiltração de partículas nanométricas e também para permitir um melhor encaixe entre os discos.

Durante a operação, um dos discos permaneceu estacionário e outro em movimento, com rotação de 1600 rpm. A distância entre os discos foi determinada e fixada, e esses parâmetros foram fixados para as mantas de nanocelulose. Resumidamente, a posição de movimento zero foi determinada pelo ruído gerado pela posição de contato entre os dois discos antes do carregamento da suspensão.

A partir da posição de movimento zero, o ultra refinador foi carregado com a suspensão celulósica e os discos foram imediatamente ajustados para a posição de amplitude de -100 µm entre os discos. Embora a posição seja negativa, a presença da suspensão de nanocelulose atua como um lubrificante garantindo que os discos não se toquem e assim se desgastem. O ultra refinador foi operado com sistema de refrigeração utilizando fluxo de água à temperatura ambiente; além disso, foi necessário reajustar a posição do movimento zero para cada novo ciclo.

Os procedimentos foram realizados sob supervisão do Professor Doutor Vadeir Arantes, e a Doutora Gabriela Leila Berto no Laboratório de Biocatálise e Bioprodutos, Faculdade de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo

3.3. Tratamento Enzimático

Após a obtenção das suspensões de NFCB, uma fração amostral foi submetido a um pós tratamento enzimático (NFCB+EG). Dessa forma, utilizou-se a enzima monocomponente endoglucanase (EG) (FiberCare R, lote CGK20074) aplicada sem purificação adicional. A unidade de atividade EG foi determinada como 1µmol de glicose liberada por minuto por mililitro. Todos os experimentos de pós-tratamento enzimático foram realizados em etapa única à 50°C e 5% (m/m) de sólidos (em uma base de peso seco) em tampão fosfato-citrato pH 6,0 a uma concentração final de 50 mM. O volume da reação foi acondicionado em Erlenmeyer de 2 L e mantido em agitador orbital (*Thermo Scientific*) em velocidade constante de agitação (250 rpm). Ao final do pós-tratamento, a mistura reacional foi condicionada em água à 100°C por 30 minutos para inativar a enzima. Em seguida, a suspensão de fibras foi filtrada a vácuo com membrana *miracloth*, com excesso de água destilada para remoção das enzimas. As condições enzimáticas foram limitadas à carga de 25 EGU/g polpa e o tempo de reação a 3h (BERTO et al., 2021).

3.4. Tamanho e Distribuição de Partícula

Os tamanhos de partícula e a distribuição de tamanho de partícula das suspensões foram determinados por *Low Angle Laser Light Scattering* (LALLS), também chamada de técnica de difração a laser, usando o analisador de tamanho de partícula de difração a laser Mastersizer 3000 (*Malvern Instruments*) com duas fontes de luz, vermelho (632,8 nm) e azul (470 nm), permitindo uma faixa de medição de 10 nm – 3500 µm. O equipamento foi acoplado a uma unidade de dispersão de amostra automatizada de médio volume (*Hydro MV*, Malvern) com uma bomba centrífuga embutida para circular a amostra suspensa dentro da célula de análise, uma sonda ultrassônica em linha e um agitador para evitar a sedimentação e agregação das partículas no tanque da unidade de amostra. As análises foram realizadas em baixa obscuridade (0,5 – 4 %) – medida da concentração da suspensão durante a análise – com velocidade de rotação de agitação de 3500 rpm e sem sonicação, conforme descrito em Berto & Arantes. (2019).

Segundo a teoria de espalhamento de Mie, a qual é utilizada pelo software *Malvern Mastersizer 3000* para converter os dados para a distribuição de tamanho de partícula. O número do tamanho da partícula está relacionado ao valor do diâmetro hidrodinâmico da partícula equivalente, calculado automaticamente. As distribuições finais de tamanho de partícula foram relatadas como o número de densidade de tamanho de partícula. Antes de cada análise, a unidade de dispersão foi automaticamente limpa três vezes com água ultrapura. A unidade *Hydro Sight* é acoplada ao analisador de partículas, que permite a visualização em tempo real junto com a captura de imagem da amostra em linha durante a medição de partículas. A resolução do *Hydro Sight* (Malvern) é igual à de um microscópio óptico, com limite de visualização próximo de 1,4 – 14.000 µm, que não permite a visualização de nanoestruturas, mas monitora a diminuição do tamanho das partículas.

Os procedimentos foram realizados sob supervisão do Professor Doutor Vadeir Arantes, e a Doutora Gabriela Leila Berto no Laboratório de Biocatálise e Bioprodutos, Faculdade de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

3.5. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JMF - 6700F). Todas as amostras foram depositadas em suportes de cobre, recobertas por uma camada de carbono com espessura de 1-10 nm, com microscópio operando na tensão de 2 kV. A análises foram realizadas no Laboratório

de Microscopia Avançada, Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Protocolos para Nanotecnologia, Instituto de Química, UNESP, São Paulo, Brasil. O grupo amostral foi composto por NFCB (com e sem tratamento enzimático). Todas as amostras foram submetidas ao processo de liofilização previamente ao procedimento experimental.

3.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a caracterização morfológica das NFCB foi feita a avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (MET), empregando o Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol JEM 2100F operando sob 200 kV, alocado no Laboratório de Nanociência e Nanotecnologia (LNNano) situado no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas/SP. Para a obtenção das fotomicrografias, as amostras de NFCB foram colocadas em grades de cobre com filme de carbono. Posteriormente foi realizada a contrastação negativa com uma solução de acetato de uranila 2% em água (m/v) por 1min, seguida de remoção de excesso. Tal procedimento foi realizado duas vezes a fim de garantir a melhor contrastação do material para análise.

3.7. Grau de polimerização

Para as análises do grau de polimerização, do inglês *Degree of Polymerization* (DP), foram utilizadas cerca de 0,125 g das amostras das nanofibras de celulose bacteriana secas. As amostras foram adicionadas a 25 mL de uma solução de etilenodiamina cúprica (1M) e água destilada (1:1), posteriormente a solução foi submetida a agitação a 400 rpm sob atmosfera de nitrogênio por 2 horas, até completa desagregação. Em seguida, o grau de polimerização de cada amostra foi mensurado utilizando 7 mL da solução preparada adicionadas à um viscosímetro capilar manual (*Cannon-Fenske* de fluxo direto N. 150, *Special Glass*), imerso em um banho de água a temperatura constante ($25 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Posteriormente, determinou-se o tempo de fluxo das soluções e do branco (Etilenodiamina cúprica + água). As análises das amostras foram realizadas em triplicata.

A partir dos resultados de cada amostra, a viscosidade relativa (η_r), específica (η_{sp}) e intrínseca (η), a massa molecular média de cada material (M) e o grau de polimerização, foram calculados de acordo com as equações a seguir.

Equação 1. Viscosidade relativa (η_r).

$$\eta_r = \frac{t}{t_0}$$

Onde t = tempo médio de fluxo da solução e t_0 = tempo médio de fluxo do solvente, em segundos.

Equação 2. Viscosidade específica (η_{sp}).

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

Onde η_r = Viscosidade relativa.

Equação 3. Viscosidade intrínseca (η)

$$\eta = \sqrt{\frac{2(\eta_{sp} - \ln \eta_t)}{c}}$$

Onde c = concentração específica da celulose dissolvida na solução, em g/dL, ou seja, $c = 0,125$.

Equação 4. Massa Molecular Média

A massa molecular média (M), em cada caso, foi calculada a partir da equação empírica de Mark–Houwlin:

$$\eta = K \times M^\alpha$$

Na qual $\alpha = 0,905$ e $K = 1,33 \times 10^{-4}$ dL/g para o sistema celulose- etilenodiamina cúprica nas condições empregadas (Polymer Data Handbook, 2019).

Equação 5. Grau de Polimerização (DP)

O grau de polimerização foi então calculado dividindo-se a massa molecular média de cada material pela massa molecular de uma unidade de anidroglicose (162):

$$DP = \frac{M}{162}$$

3.8. Difractometria de Raios X (DRX)

Os difratogramas de Raios-X foram obtidos em um equipamento da marca Rigaku, modelo MiniFlex II Desktop em 40 kV e 30 mA (1200W), empregando radiação filtrada Cu K α ($\lambda = 1,5418$ Å). Varrendo o ângulo de obtenção 2Θ entre 2-60° na com a

taxa de 2°/min. As análises foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP.

3.9. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos utilizando o espectrômetro *Carry 630 FTIR Agilent*, no Laboratório CBQuim, Universidade de Araraquara (UNIARA), Araraquara, São Paulo. As medidas foram realizadas no modo ATR (refletância total atenuada), de 4000 a 600 cm^{-1} e 64 varreduras. As amostras foram previamente liofilizadas antes da análise.

3.10. Análise Termogravimétrica

As análises de Termogravimetria (TG) foram efetuadas utilizando equipamento modelo SDT Q600 (*TA Instruments*, USA). As condições utilizadas para o experimento foram atmosfera de ar sintético com vazão de 100 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, com intervalo de 30°C até 600°C . Utilizou-se aproximadamente 3-10 mg de cada amostra de NFCB, as amostras foram condicionadas inicialmente a um cadinho de alumina, e o ensaio foi realizado utilizando um cadinho de alumina vazio como referência.

3.11. Reometria

As análises foram realizadas em reômetro modelo AR1500 EX (*TA Instruments*). As medidas foram realizadas baseadas no modelo proposto por Dávila & D'ávila (2019) com modificações. Os testes foram conduzidos utilizando uma geometria cone-placa de 40mm de diâmetro com GAP de 0,5 mm, sob temperatura ambiente. As medidas de viscosidade foram realizadas em três etapas. Inicialmente foi realizado o teste de varredura de amplitude, para a definição do intervalo de viscoelasticidade linear (LVE) ($\gamma_0 = 1\%$). Posteriormente, testes de varredura de frequência foram realizados. Em seguida foi realizado uma avaliação de aumento de estresse de material pelo método de fluxo, as medidas de viscosidade foram realizadas na faixa de frequência de $0,01\text{-}700\text{ s}^{-1}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tamanho e Distribuição de Partícula

Durante o ultrarrefinamento das amostras de NCB, o número de ciclos (início da alimentação de amostra no ultrarrefinador até a saída total) foram monitorados e agrupados como valor médio, o primeiro ciclo fora realizado o processamento das mantas de NCB para obtenção da primeira suspensão de celulose (ciclo 0), assim foi indicado como “dispersão”, para posterior nomenclatura numeral (ciclo 1-10), a cada fim de ciclo fora coletado uma alíquota e analisados o seu tamanho de partícula (Dx10; Dx50 e Dx90) e a distribuição de tamanho e área superficial por difração a laser.

A NCB foi ultra refinada até atingir o tamanho de partícula em nanoescala, sendo indicados pelos valores de Dx10; Dx50 e Dx90 (**Figura 12**). Ao alcançar a escala nanométrica pode se observar que as nanofibras apresentaram um Dx90 de aproximadamente de 799 nm. Dessa forma, ao atingir o valor médio de 425-799 nm foi interrompido o processamento das amostras de NCB. A redução do tamanho de partícula referente a escala nanométrica também pode ser observada pela análise do *Hydro Sight*, na qual sua resolução não foi possível visualizar as partículas devido ao seu espectro de análise (**ANEXO I – Figura 21**).

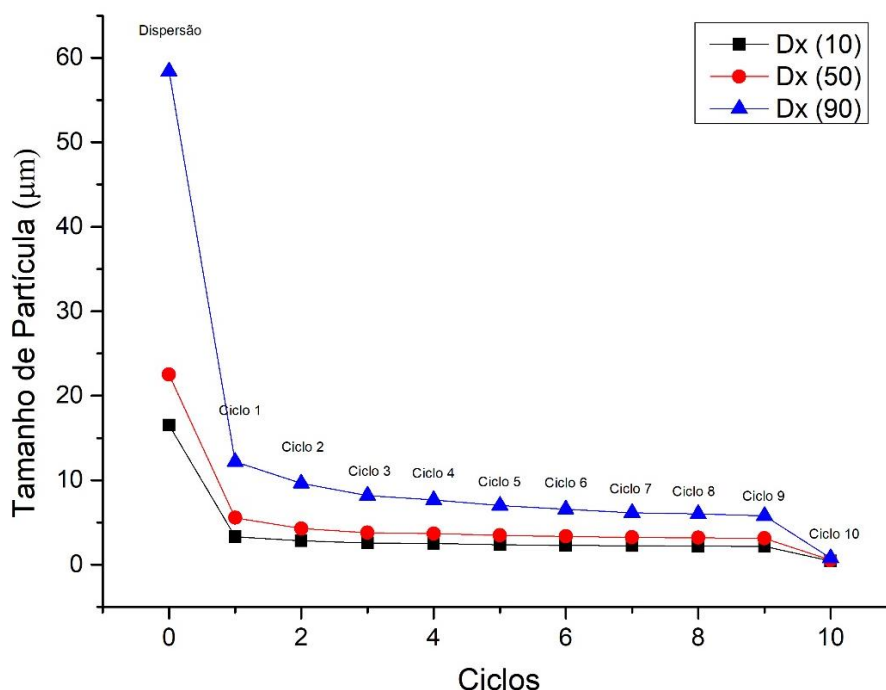


Figura 12. Distribuição do tamanho de partícula expressa em Dx10, Dx50 e Dx90 resultante da desfibrilação de NCB em relação a ciclos de passagem pelo equipamento SuperMassColloider. (Fonte: Autoria Própria).

Segundos os dados obtidos, podemos verificar que houve uma redução brusca do tamanho de partícula da dispersão de NCB (Dx90; 58,4 μm) em relação ao primeiro ciclo (Dx90; 12,2 μm). Após esta variação, nota-se houve uma queda no tamanho de partícula, contudo a redução do tamanho não fora significativa entre os ciclos, exceto para o décimo ciclo que apresentou uma queda maior na escala de tamanho, pela qual foi caracterizado por um pico único e estreito por volta de 800 μm , indicando elevada uniformidade de tamanho do material ultra refinado (**Figura 13**).

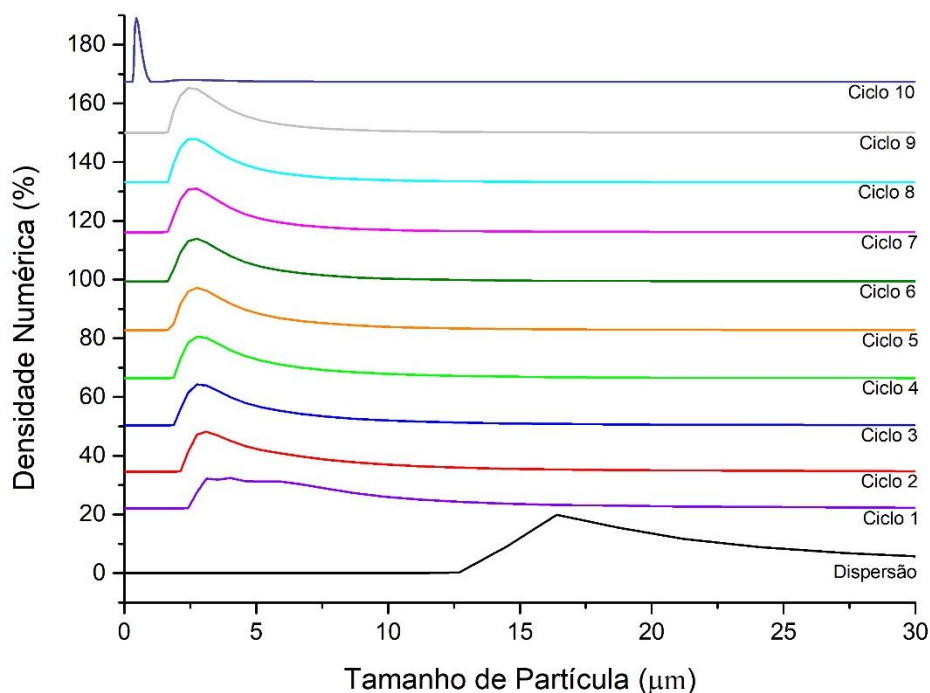


Figura 13. Perfil de distribuição do tamanho de partículas durante a desfibrilação de nanocelulose bacteriana por ultra refinação. (Fonte: Autoria Própria).

Segundo o estudo realizado por Wang e colaboradores (2016), a reduções nos tamanhos de partícula já eram previstas, uma vez que o ultra refinador resulta na redução de tamanho especialmente na direção longitudinal da fibra. O estudo realizado por Berto & Arantes (2019) sugere que a o padrão de distribuição do tamanho de partícula permanece praticamente constante durante o processo de ultrarefino, provavelmente devido ao fato de que mesmo com a delaminação no sentido longitudinal, o comprimento da fibra ainda permanece preservado, dessa maneira seu tamanho é mantido sem modificação do diâmetro hidrodinâmico. Além disso, o mesmo estudo indica que a presença do pico de menor tamanho de partícula no último ciclo, o qual denota a passagem da NCB para sua escala nanométrica, se justifica com a delaminação máxima

das fibras em seu comprimento, o que resulta na danificação das mesmas, reduzindo assim o tamanho das fibras em seu diâmetro esférico equivalente ao volume de empacotamento (BERTO & ARANTES, 2019).

4.2. Tratamento enzimático

Ao avaliar o mecanismo de ação da endoglucanase (EG), a enzima se direciona preferencialmente as regiões menos ordenadas das fibras de NCB, assim quebrando aleatoriamente as ligações glicosídicas acessíveis, dessa forma a reação induz ao surgimento de novas extremidades reductoras e não reductoras (BERTO et al., 2021). Dessa forma, ao comparar os valores de Dx10; Dx50 e Dx90 (**Figura 14**) nota-se que houve um aumento no tamanho de partícula após o pós-tratamento enzimático resultante do aumento da reatividade superficial das moléculas de celulose bacteriana devido a exposição dos grupamentos hidroxilas.

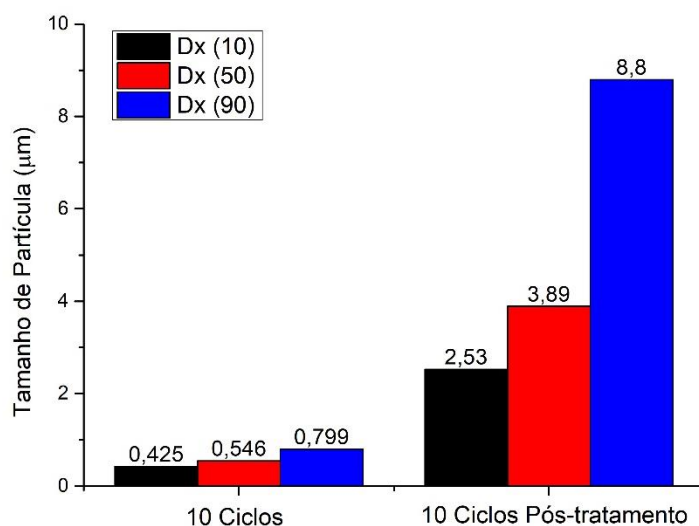


Figura 14. Distribuição do tamanho de partícula expressa em Dx10, Dx50 e Dx90 resultante da desfibrilação de NCB com e sem o tratamento enzimático pós processamento. (Fonte: Autoria Própria).

Segundo Kargarzadeh et al. (2018) a celulose nativa é disposta em fibras nas quais a maioria das cadeias posicionam-se em localizações não expostas. Em seu estado sólido, ou fibrilar, a maior parte dos grupos hidroxilas permanecem dentro da estrutura, assim não participando das reações de ligação na superfície. Dessa maneira, após a aplicação da EG, tais grupos hidroxilas são expostos os quais tornam-se reativos.

Além disso, ao se retratar das fibras de nanocelulose, denota-se que sua estrutura contém diversos tipos de irregularidades, como dobras e torções das microfibrilas, assim como espaços vazios, microporos superficiais, e depressões, ou seja, a área superficial de

uma fibra de celulose nativa é maior quando a área de superfície de uma fibra idealmente lisa da mesma dimensão (LYND et al., 2002). Após o processo de esfoliação seguido do processo enzimático da nanocelulose bacteriana, nota-se que, com a separação das fibras de nanocelulose e a adição de pontas terminais afeta consideravelmente sua área superficial, aumentando assim, as interações das hidroxilas presentes na nanofibra de nanocelulose, as quais resulta em uma maior interação interfibrilar devido a maior reatividade superficial (IBARRA & KÖPCKE, 2010).

Segundos estudos encontrados na literatura, o tamanho de partícula pode variar dependendo do método de obtenção e tratamento da matéria prima, tanto para nanocristais quanto para nanofibras de celulose em geral (IOELOVICH et al., 2017; KARGARZADEH et al., 2018). Além disso, quanto menor o tamanho da partícula a probabilidade delas interagirem entre si são maiores, ou seja, a agregação em escala nanométrica é resultante do aumento de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas presentes no material, o qual modifica o comportamento, elevando o tamanho das partículas (ARAKI, 2013; BARROS, 2020).

Portanto, estima-se que ocorreu o aumento de tamanho de partícula após o tratamento com a endoglucanase, devido ao aumento da área superficial das fibras de nanocelulose, o qual também resultou no aumento de cadeias expostas do grupamento hidroxila, resultando em maiores quantidades de ligações de hidrogênio, levando à aglomeração das fibras de NCB.

4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras de NCB foi observada através da análise de MEV (**Figura 15**). Como pode ser observado pelas microscopias das nanofibras, todas as amostras mostram o emaranhamento de direcionamento randômicos das fibras de NCB, sendo sua organização espacial em formato de “teia”.

Ao compararmos a morfologia das fibras da dispersão de NCB (**Figura 15. a1**) nota-se que o processo de separação das fibras ocorre devido ao aumento dos espaços interfibrilar que podem ser observados nas ampliações do Ciclo 5 (**Figura 15. b1**) e no Ciclo 10 (**Figura 15. c1**). Além disso, denota-se que na microscopia do Ciclo 10 pode observar na ampliação de 100.000X (**Figura 15. c2**), a separação da fibra de celulose em fibrilas de menores tamanhos (indicado pela seta vermelha), tal efeito se relaciona ao fato da delaminação no sentido longitudinal, como citado anteriormente (WANG et al., 2016; BERTO & ARANTES, 2020).

Por fim, o uso do pós-tratamento enzimático nas nanofibras de NCB apresentou modificações em relação a porosidade das nanofibras quando observadas na ampliação de 15.000X (**Figura 15. d1**), na qual houve uma redução na porosidade quando comparada a NFCB no ciclo 10. Além disso, ao observarmos a amostra após o uso da endoglucanase com uma ampliação maior, é possível notar a formação de regiões onde ocorreram um corte das fibras de NCB, indicadas pelas setas vermelhas na **Figura 15. d2**. Indicando assim, o mecanismo da endoglucanase que se direciona para as regiões amorfas da celulose, resultando em corte da mesma.

Dessa forma, os resultados obtidos pela análise de MEV, indicaram que houve o processo de desfibrilação das fibras de NCB, além de indicar que houve a atividade da endoglucanase sob as NFCB obtidas.

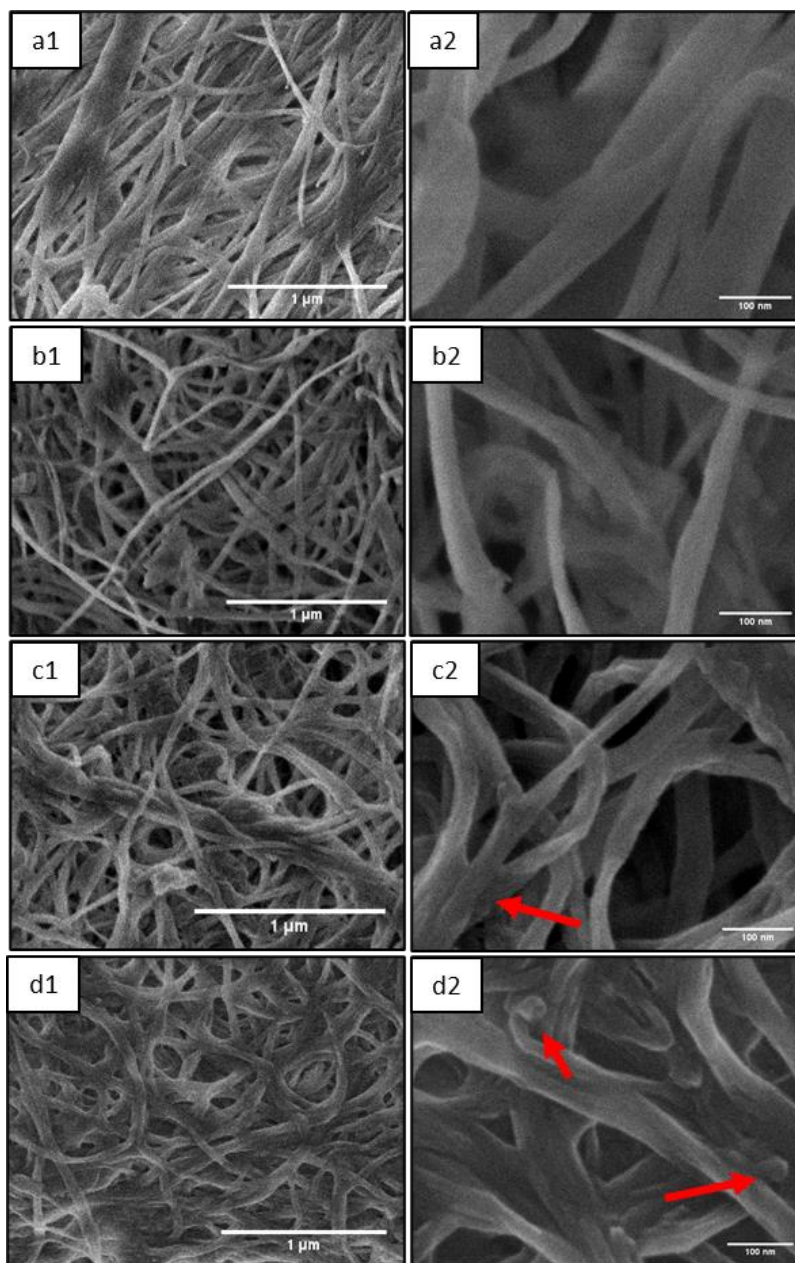


Figura 15. Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras de nanocelulose bacteriana, sendo: a. Dispersão de Celulose (Ciclo 0); b. Ciclo 5; c. Ciclo 10; d. Pós-tratamento enzimático. Com ampliações de: 1. 15.000X e 2. 100.000X. (Fonte: Aatoria Própria).

4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia geral da NFCB em relação a dimensão e distribuição são mostradas na **Figura 16**. Em aspecto geral, tanto as nanofibras de celulose bacteriana (NFCB) e as nanofibras tratadas enzimaticamente pela endoglucanase (NFCB+EG), apresentaram um perfil semelhante com aspecto menor de $0,8 \mu\text{m}$, produzindo um emaranhado de rede de nanofibras. Deve-se ressaltar que, devido o preparo das amostras, ambas as amostras foram previamente diluídas para facilitar a captação dos dados pela análise de

transmissão. Com isso, podemos notar que o tamanho de partícula encontrado na análise MET, corrobora com os dados de Dx50 e DX90 encontrados anteriormente para a amostra após o ultrarrefinamento (**Figura 14**). Em ambas as amostras as NFCB foram encontradas distribuídas homogeneamente com alto nível de desfibrilação, característica esta, típicas de nanofibras de nanocelulose obtidas por desfibrilação mecânica (CHINGA-CARRASCO, 2011; KUMAR et al., 2014). Além disso, nota-se que após o tratamento com a enzima endoglucanase as regiões terminais são aparentes indicando a atividade enzimática, mostrado pelas setas vermelhas (**Figura 16. b.**).

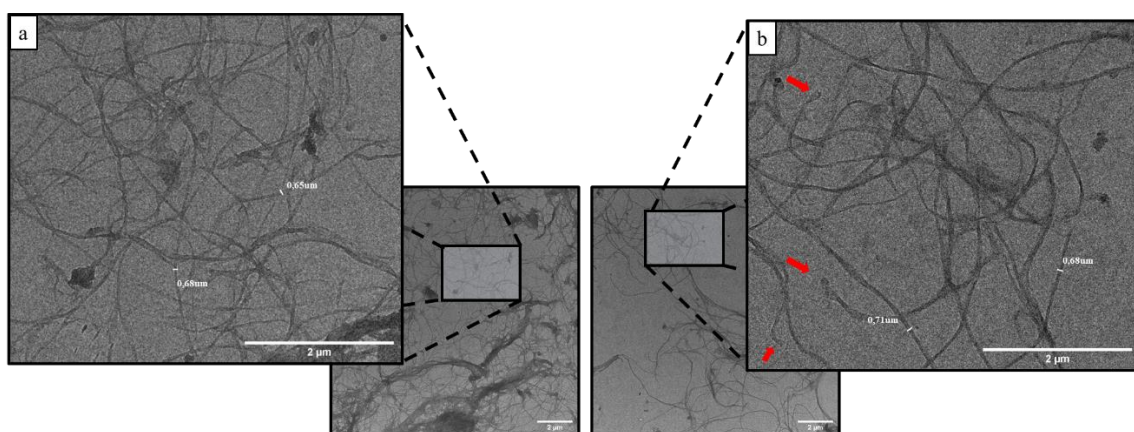


Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão das nanofibras de celulose bacteriana (NFCB) com e sem tratamento enzimático de endoglucanase (EG). **a.** NFCB; **b.** NFCB + EG. Fonte: Autoria Própria.

Dessa forma, os resultados obtidos pela análise de MET, indicaram que houve o processo de desfibrilação das fibras de NCB corroborando com os dados citados anteriormente pela análise do tamanho de partícula. Além disso, os dados indicaram que houve o processamento enzimático das NFCB, da mesma maneira que fora indicado pela análise de MEV (**Figura 15. d2.**). Tais alterações são importantes para uma possível aplicação na medicina regenerativa, uma vez que, a NFCB ainda apresente sua morfologia intrínseca, permitindo assim alcançar seu desempenho mecânico característico dos materiais celulósicos (KONTTURI, et al., 2018).

4.5. Grau de Polimerização

Baseados na análise do DP das NFCB, pode-se observar que houve uma brusca redução de tempo de fluxo no viscosímetro, quando comparadas as amostras das nanofibras de nanocelulose (NFCB) com as tratadas enzimaticamente (NFCB+EG) (**Tabela 2**). Os valores indicaram que as NFCB obtiveram um tempo médio de 1.515

segundos (25'15'') e as NFCB tratadas enzimaticamente apresentaram um valor aproximadamente 5 vezes menor, 286 segundos (4'46''). Outro ponto a se observar foi que os valores de DP e viscosidade reduziram após tratamento enzimático, como observado na **Tabela 3**. Com a redução da viscosidade do material, já se esperava que o tempo de fluxo no viscosímetro seria menor. Uma vez que a enzima atuaria cortando a molécula de NCB, o surgimento de fragmentos da molécula de celulose resultaria na perda de viscosidade do mesmo. Além disso, com o surgimento de blocos menores das fibras de NCB, o DP conseqüentemente seria menor após o processamento enzimático, destacando uma queda de aproximadamente 3 vezes quando comparadas às NFCB (DP = 4432,687) com as NFCB+EG (DP = 1475,201).

Tabela 2. Dados de tempo de fluxo obtidos através da análise de grau de polimerização por viscosímetro.

Amostra	Tempo (s)			
	t ₁	t ₂	t ₃	t médio
Etilenodiamina cúprica + água	31	31	31	31
NFCB	1514	1520	1511	1515
NFCB+EG	287	286	286	286

Fonte: Aatoria Própria

A utilização das endoglucanases (EGs) é comumente direcionada para a redução do DP devido a clivagem aleatória das ligações glicosídicas das regiões menos organizadas presentes na nanocelulose. Dessa forma, também é inserido novas regiões terminais redutoras e não-redutoras na estrutura da NCB. Tal fator se relaciona principalmente com a fragmentação da estrutura que leva a redução do tamanho molecular das cadeias de nanocelulose. Conseqüentemente, com a fragmentação das cadeias de celulose facilita maior interação de grupos hidroxilas devido a maior reatividade de superfície fibrilar (HALLAC & RAGAUSKAS, 2010; IBARRA & KÖPCKE, 2010).

Tabela 3. Dados obtidos da análise de grau de polimerização por viscosímetro

Amostra	Tempo (s)	η_r	η_{sp}	η	M	DP
NFCB	1515	48,9	47,9	26,5	718095,3	4432,687
NFCB+EG	286	9,2	8,2	9,8	238982,6	1475,201

*NFCB: Nanofibra de celulose bacteriana; EG: Endoglucanase; η_r : Viscosidade Relativa; η_{sp} : Viscosidade Específica; η : Viscosidade intrínseca; M: Massa molecular média; DP: Grau de polimerização. Fonte: Autoria Própria

4.6. Difratomia de Raios X (DRX)

A **Figura 17** apresenta os difratogramas de raios X. Segundo estudo da literatura o difratograma apresentou picos característicos a celulose bacteriana sendo indicado nas regiões de $2\theta = 15,4^\circ$, $17,4^\circ$ e $23,4^\circ$ (LIMA et al., 2015). A partir dos difratogramas de raios X foi possível calcular o índice de cristalinidade de cada amostra segundo a equação de Segal (**Equação 6**):

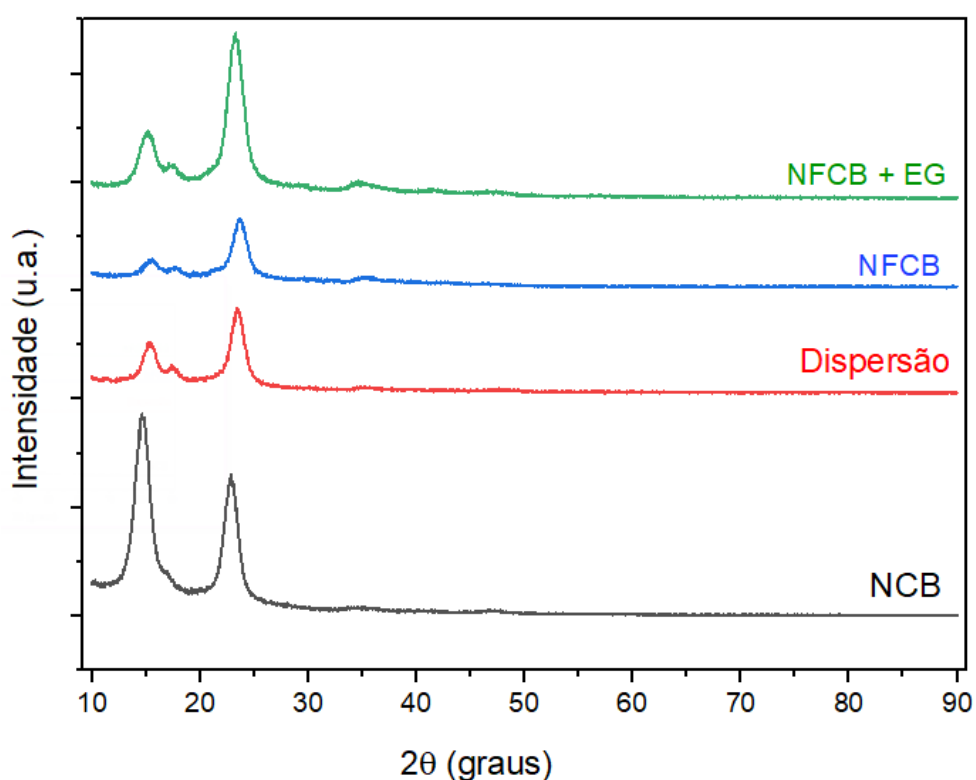


Figura 17. Difrátograma de Raios X das amostras de nanocelulose bacteriana. Fonte: Autoria Própria.

Equação 6. Equação de Segal.

$$CrI = \frac{(I_{200} - I_{am})}{I_{200}}$$

Na qual na qual, CrI 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 $2\theta = 19^\circ$ (SEGAL, 1959). Os índices de cristalinidade foram expressos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Índices de cristalinidade das amostras de nanocelulose bacteriana e seus respectivos tratamentos segundo as análises de difratometria de raios X.

Amostra	Região Cristalina		Região Amorfa		Cristalinidade (%)
	2θ	Intensidade	2θ	Intensidade	
NCB	22,88°	2599,51	19,45°	420,91	83,81
Dispersão	23,45°	1601,45	19,49°	266,7	83,35
NFCB	23,65°	1282,63	19,49°	217,36	83,05
NFCB+EG	23,29°	3085,27	19,25°	375,82	87,82

*NCB: nanocelulose bacteriana; NFCB: Nanofibra de celulose bacteriana; EG: Endoglucanase. Fonte: Autoria Própria

Segundos os dados obtidos podem-se observar que os índices de cristalinidade das amostras sem o tratamento enzimático pela endoglucanase se aproxima de cerca de 83,4% em média, após o tratamento enzimático denota-se um acréscimo da cristalinidade para 87,82%. Em geral, a atividade das endoglucanases é relacionada a hidrólise das ligações glicosídicas β -1,4 presentes nas regiões menos organizadas da estrutura da molécula de nanocelulose (HALLAC & RAGAUSKAS, 2010).

Tal mecanismo é dado por dois principais processos de hidrólise seguindo a configuração da ligação glicosídica: a inversão e retenção (KOSHLAND, 1953). O mecanismo de inversão usa um deslocamento direto do grupo abandonador do carboidrato, o que conseqüentemente resulta na inversão da configuração anomérica. O mecanismo de retenção utiliza um deslocamento duplo com retenção da configuração anomérica. Ambos os mecanismos usam dois resíduos carboxílicos em locais opostos do plano do carboidrato que atuam como um ácido geral e uma base geral (para o mecanismo de inversão). Como resultado dos ataques na região menos ordenada da NCB pela endoglucanase, a parede fibrilar sofre um inchaço que resulta no aumento na acessibilidade de solventes externos as camadas mais internas da estrutura (KOSHLAND, 1953; IBARRA & KÖPCKE, 2010).

Dessa forma, constata-se a atividade enzimática da endoglucanase, uma vez que houve o acréscimo do índice de cristalinidade, propriedades como a viscosidade e a termodinâmica do material também são afetadas, tais propriedades serão abordadas nas próximas sessões do trabalho.

4.7. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os dados obtidos pela análise de ATR-FTIR foram expressos pela **Figura 18**. Todos os dados do espectro de FTIR foram plotados pelo programa e estatística OriginPro 9.0.

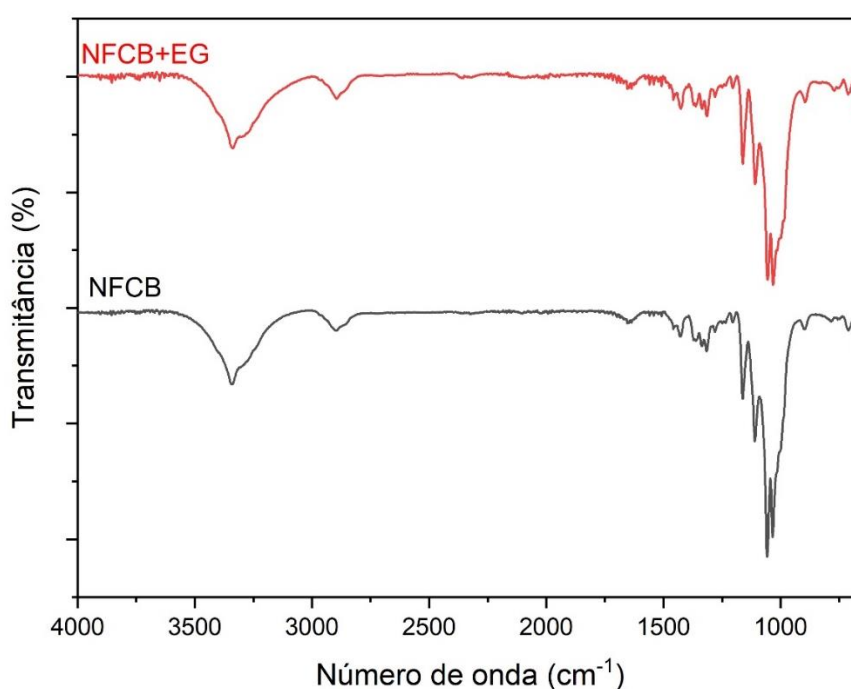


Figura 18. Espectro de ATR-FTIR das amostras nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); nanofibra de nanocelulose bacteriana pós tratamento com endoglucanase (NFCB+EG). Fonte: Autoria Própria.

Os dados obtidos pela análise de ATR-FTIR indicaram um perfil de material celulósico, pode se observar que não houveram modificações em relação aos grupamentos de químicos quando relacionados as NFCB e o pós-tratamento enzimático. Ambos os espectros apresentaram banda na região entre 3000 cm⁻¹ a 3500 cm⁻¹, referentes ao estiramento do grupo hidroxila, um pico na região de 1600 cm⁻¹, referente a curvatura assimétrica de CH₂, e pequenos picos na região de 1100 cm⁻¹, relacionados ao alongamento da ligação C-O. Além disso, observa-se o pico próximo a 1645-1650 cm⁻¹

atribuído a deformação angular das ligações na molécula de água. Segundo estudos na literatura, o espectro de NCB apresenta picos nas regiões entre 984 cm^{-1} e 1106 cm^{-1} correspondentes ao alongamento da ligação C-O atribuído principalmente aos álcoois primários; uma banda na região de 1160 cm^{-1} atribuída ao alongamento assimétrico de C-O-C; e dois picos em 1313 cm^{-1} atribuído à curvatura simétrica de CH_2 e 1426 cm^{-1} referente a curvatura assimétrica de CH_2 (GRANDE et al., 2009; JAYANI et al., 2020).

Dessa forma, através das análises de ATR-FTIR, pode-se verificar que não houveram alterações no perfil de material celulósico das NFCB quando comparadas com as NFCB após o tratamento enzimático com a endoglucanase.

4.8. Análise Térmica

Os dados obtidos pela análise térmica foram plotados na **Figura 19**. Os valores de massa foram expressos em % de massa versus o aquecimento das amostras - Termogravimetria (TG). Além disso, para melhor compreensão dos eventos térmicos ocorridos durante a variação de temperatura os dados da Termogravimetria Derivada (DTG) foram plotados, no qual fora utilizado a primeira derivada da curva de TG e relacionada a temperatura de degradação (EINHORN-STOLL et al., 2007). Os dados foram plotados utilizando a ferramenta estatística OriginPro 9.0.

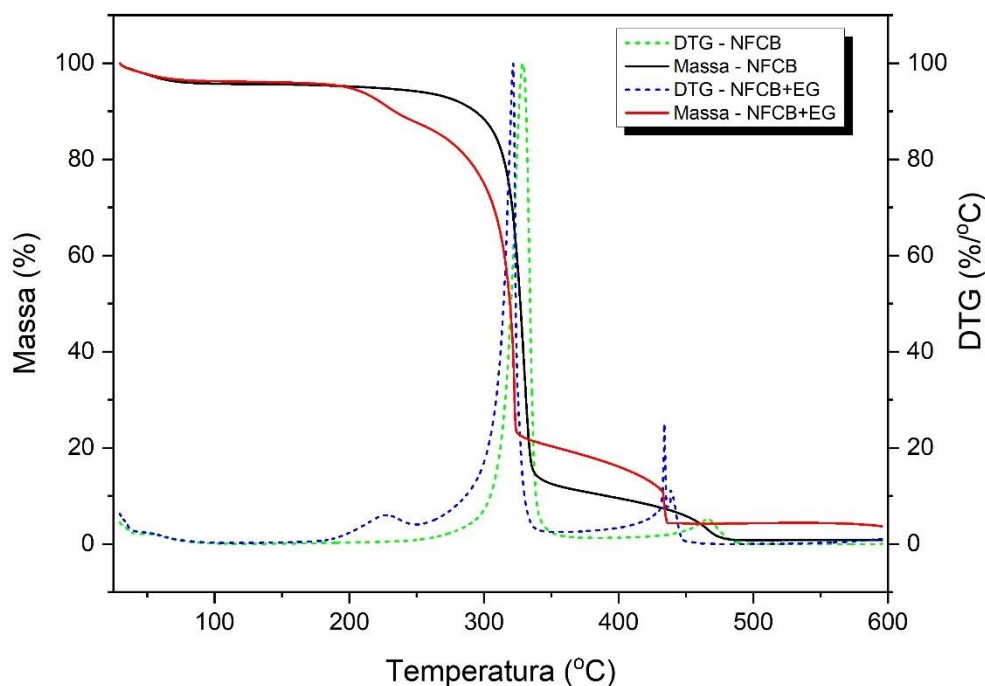


Figura 19. Gráficos obtidos a partir dos dados de análise térmica. Análise de Termogravimetria (TG); Termogravimetria Derivada (DTG). Sendo: nanofibra de

nanocelulose bacteriana (NFCB); sem tratamento enzimático (s); com tratamento enzimático (c), Fonte: Autoria Própria.

Inicialmente, observa-se um evento de perda de massa de 5% em torno de 30°C até 100°C devido à redução da umidade presente na amostra. Ao avaliarmos os dados das amostras podemos observar que a amostra de NFCB sem o tratamento enzimático, apresentou dois eventos de perda de massa, o primeiro iniciando à 275°C e o segundo à 450°C. Quando comparada a NFCB com o tratamento enzimático, podemos notar uma mudança em relação a temperatura de início destes eventos, sendo à 200°C o primeiro; e aproximadamente a 440°C o segundo.

Segundo estudos na literatura, a curva de TG apresentou um perfil característico para materiais celulósicos, devido a desidratação, despolimerização e decomposição das unidades glicosídicas. O processo de degradação da NCB é dado por três eventos característicos, o primeiro evento é relacionado a desidratação completa da amostra, que ocorre por volta da temperatura de 100°C, correlacionada a perda de água presente na amostra. O segundo evento é relacionado a decomposição das unidades de celulose que passam para anidroglicose, por volta dos 300°C, sendo marcada geralmente pelo maior evento de perda de massa, e por fim, o terceiro evento é caracterizado pela decomposição da anidroglicose com a formação de dióxido de carbono (CO₂), pelo qual leva a formação de resíduos carbonáceos entre 450-500°C (DE SALVI, et al. 2012; LIMA et al., 2015).

Dessa maneira ao compararmos as NFCB com e sem o tratamento enzimático, conclui-se que houve uma mudança no início do processo de degradação térmica do material NFCB+EG, possivelmente tal variação se relaciona com a diminuição da massa molecular do polímero e ao maior acesso do material de baixa massa. Contudo, ao visar a aplicação na área da medicina regenerativa, as NFCB são promissoras devido a estabilidade térmica até 200°C, uma vez que sua possível aplicação será visada à 37°C e seu processamento será utilizado previamente sob temperatura ambiente.

4.9. Reometria

Os resultados obtidos pela análise de viscosidade das NFCB foram plotados em razão de viscosidade pela taxa de cisalhamento (**Figura 20**). As amostras inferiores ao ciclo 5 não puderam realizar as medidas de reometria, devido a perda de água durante o procedimento que levava ao travamento do equipamento. Além disso, fora selecionado um ponto mediano entre o ciclo 5 e o ciclo 10, no caso o ciclo 7, para realizar a comparação das viscosidades entre os ciclos. Por fim, o ciclo 10 pós-tratamento

enzimático também fora selecionado. Os dados foram plotados utilizando a ferramenta estatística OriginPro 9.0.

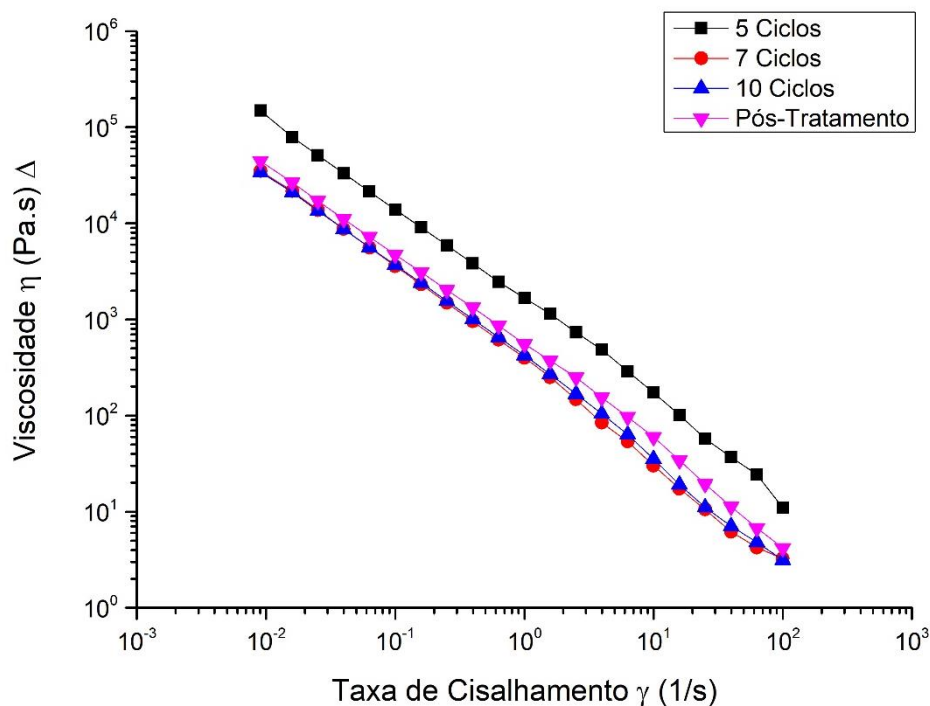


Figura 20. Gráfico obtido da análise de reometria: Viscosidade (η) em função da taxa de cisalhamento (γ). (Fonte: Autoria Própria).

Adicionalmente, as curvas de viscosidade foram analisadas utilizando a lei de potência proposta por Ostwald de Waele (1913), os valores indicaram o índice da lei de potência “n”, que define por si o comportamento de viscosidade do material relacionado, o índice “m” que indica a consistência que se relaciona a grandeza de viscosidade (**Tabela 5**). Posteriormente, o material fora classificado de acordo com Morrison (2001), onde: $n > 1$, dilatante; $n = 1$, newtoniano e $n < 1$ pseudoplástico.

Tabela 5. Análise reométrica das amostras de nanocelulose bacteriana seguindo os parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald de Waele (1913).

Amostras	$m (Pa. s^{-1})$	$n (-)$	R^2
Ciclo 5	1468,58	-0,967532	0,995952
Ciclo 7	335,528	-1,02816	0,998491
Ciclo 10	357,548	-1,01354	0,997930
Pós-Tratamento	501,176	-0,984574	0,997646

(Fonte: Autoria Própria).

O comportamento de viscosidade das amostras apresentou uma redução à medida que a taxa de cisalhamento aumentava, sendo considerado tixotrópico, com perfil não

newtoniano. Segundo o estudo apontado por Hasan (2012), tal comportamento já era esperado, pelo fato que as cadeias do polímero da celulose quando cisalhadas se desenrolam e se alinham na direção do cisalhamento, com isso a como medida de resistência ao fluxo, a viscosidade do material é reduzida.

Além disso, nota-se uma redução de viscosidade para os ciclos finais quando comparados entre os ciclos do ultrarrefinamento. Contudo, quando comparado o ciclo 7 (335,528 Pa. s⁻¹) com o Ciclo 10 (357,548 Pa. s⁻¹) a viscosidade apresentou uma mudança muito inferior quando verificado no ciclo 5 (1468,58 Pa. s⁻¹). Dessa forma, o resultado comprova que o processo de extração das nanofibras reduz a viscosidade de NCB à medida que a delaminação da mesma separa as fibras, suas propriedades relacionadas a viscosidade também são reduzidas.

Já quando comparados a viscosidade do ciclo 10 com o pós-tratamento enzimático, nota-se que houve um aumento de viscosidade de +143,628 Pa. s⁻¹. Tal aumento pode estar relacionado com os dados que foram discutidos anteriormente na seção 4.2., uma vez que a endoglucanase expõe os grupamentos hidroxilas, tal efeito torna possível maiores interações intermoleculares de ligações de hidrogênio, os quais induz a formação dos agregados das nanofibras. Dessa forma, com o aumento das forças entre as moléculas de NCB, a viscosidade possivelmente é alterada, pois a estruturação das nanofibras também é modificada como resultado das exposições dos grupamentos mais internos de hidroxilas o que aumente a reatividade superficial do material resulta na aglomeração das nanofibras de menores densidades moleculares obtidas após o processamento da nanocelulose bacteriana (ARAKI, 2013).

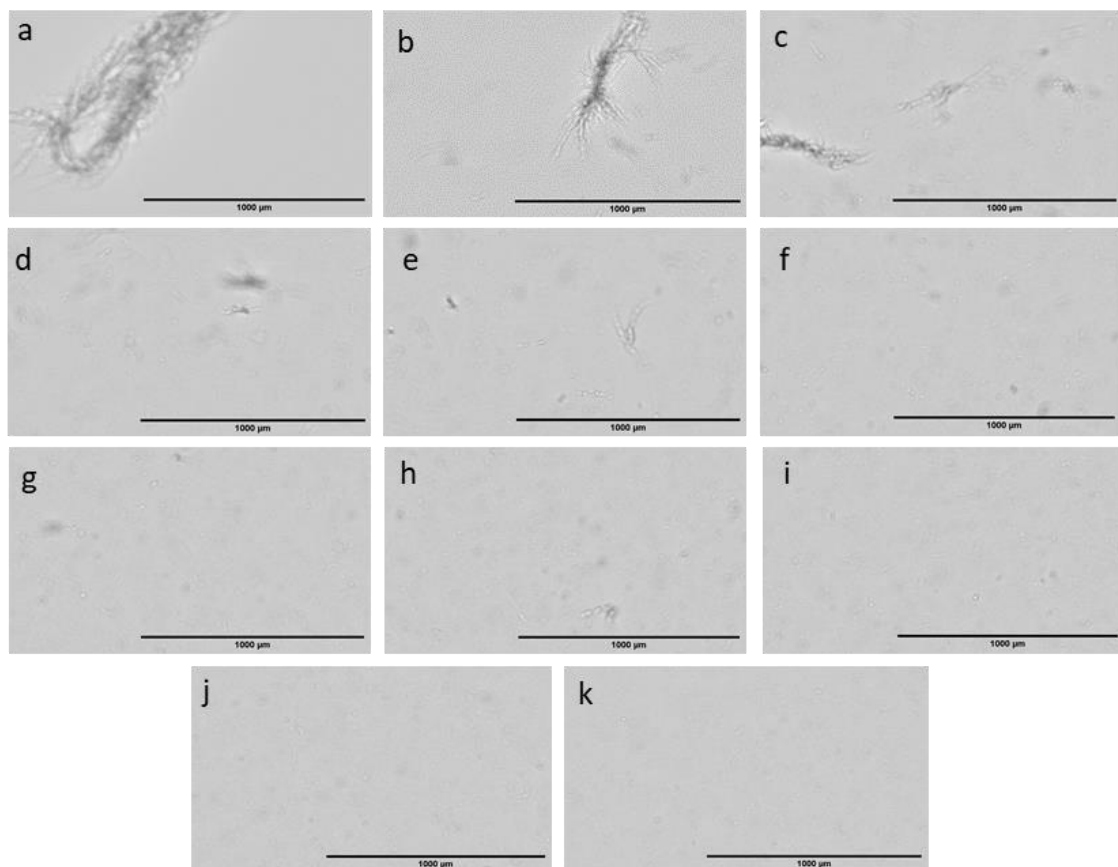
5. CONCLUSÃO – CAPÍTULO 2

A partir dos dados demonstrados anteriormente, conclui-se que houve extração das nanofibras de nanocelulose bacteriana, alcançando a escala nanométrica em uma de suas dimensões. Além disso, após o processamento enzimático notou-se um leve aumento do índice de cristalinidade das NFCB, indicando que houve a atividade enzimática clivando as regiões menos organizadas na estrutura da NCB. Adicionalmente, as NFCB apresentaram boa estabilidade térmica com início da decomposição mássica a partir de 200°C, e viscosidade de 357,548 Pa. s⁻¹ após o processamento por ultra refinação, e apresentou um acréscimo de viscosidade após o tratamento enzimático das nanofibras ultra refinadas (501,176 Pa. s⁻¹). Por fim, baseados nos dados obtidos deste capítulo, as nanofibras de nanocelulose bacteriana são promissoras para a aplicação em bioimpressão

3D, uma vez que a NFCB podem ser utilizadas como material de reforço conjugados com outros polímeros (modificando propriedades mecânicas das biotintas), e possuem estabilidade no intervalo de temperatura aplicável a medicina regenerativa (36°C-37°C), contudo é necessário um estudo de associação com outros polímeros para garantir a estruturação tridimensional após o processo de bioimpressão e um ensaio de citotoxicidade do hidrogel a fim de indicar aplicabilidade biológica.

ANEXO I

Figura 21. Imagens coletadas pelo equipamento *Hydro Sight* a fins de acompanhamento de análise de tamanho de partícula. a. Dispersão de nanocelulose bacteriana; b. Ciclo 1; c. Ciclo 2; d. Ciclo 3; e. Ciclo 4; f. Ciclo 5; g. Ciclo 6; h. Ciclo 7; i. Ciclo 8; j. Ciclo 9; k. Ciclo 10. (Fonte: Autoria Própria).



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEER, M. M.; MOHD AMIN, M. C. I.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose-based drug delivery systems: Their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1047–1061, 2014.

AITOMÄKI, Y.; OKSMAN, K. Reinforcing efficiency of nanocellulose in polymers. **Reactive and Functional Polymers**, v. 85, p. 151–156, 2014.

ARAKI, J. Electrostatic or steric? Preparations and characterizations of well-dispersed systems containing rod-like nanowhiskers of crystalline polysaccharides. **Soft Matter** 9:4125–4141, 2013.

BÄCKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A.; et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141–2149, 2006.

BARROS, S. D. S. Síntese e caracterização de nanocelulose a partir da folha de abacaxi (*Ananás comosus* (L) *merril*) cv vitória, 2020.

BERTO, G. L., ARANTES, V. Kinetic changes in cellulose properties during defibrillation into microfibrillated cellulose and cellulose nanofibrils by ultra-refining. **International journal of biological macromolecules**, 127, 637-648, 2019.

BERTO, G. L., MATTOS, B. D., ROJAS, O. J., ARANTES, V. Single-step fiber pretreatment with monocomponent endoglucanase: Defibrillation energy and cellulose nanofibril quality. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 9(5), 2260-2270, 2021.

BIAN, H.; DONG, M.; CHEN, L.; ZHOU, X.; NI, S.; FANG, G.; DAI, H. Comparison of mixed enzymatic pretreatment and post-treatment for enhancing the cellulose nanofibrillation efficiency. **Bioresource technology**, 293, 122171, 2019.

CHINGA-CARRASCO, G. Cellulose Fibres, Nanofibrils and Microfibrils: The Morphological Sequence of MFC Components from a Plant Physiology and Fiber Technology Point of View. **Nanoscale Res. Lett.** 6, 417, 2011.

DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 101, n. 1-4, p. 675-686, 2019.

DE SALVI, D. T., BARUD, H. S., CAIUT, J. M. A., MESSADDEQ, Y., RIBEIRO, S. J. Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic–inorganic hybrid films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, 63(2), 211-218, 2012.

DONINI, Í. A.; DE SALVI, D. T.; FUKUMOTO, F. K.; LUSTRI, W. R.; BARUD, H. S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, 35, 165-178, 2010.

EINHORN-STOLL, U.; KUNZEK, H.; DONGOWSKI, G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1101-1112, 2007.

GOMIDE, J. L.; COLODETTE, J. L.; OLIVEIRA, R. C. D.; SILVA, C. M. Caracterização tecnológica, para produção de celulose, da nova geração de clones de Eucalyptus do Brasil. *Revista Árvore*, 29, 129-137, 2005.

GRANDE, C. J., TORRES, F. G., GOMEZ, C. M., TRONCOSO, O. P., CANET-FERRER, J., & MARTÍNEZ-PASTOR, J. Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, 29(4), 1098-1104, 2009.

HALLAC, B. B.; RAGAUSKAS, A. J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, n. 2, p. 215-225, 2011.

HASAN, N.; BIAK, D. R.A.; KAMARUDIN, S. Application of bacterial cellulose (BC) in natural facial scrub. **International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology**, v. 2, n. 4, p. 1-4, 2012.

IGUCHI, M., YAMANAKA, S., & BUDHIONO, A. Bacterial cellulose—a masterpiece of nature's arts. **Journal of materials science**, 35(2), 261-270, 2000.

IOELOVICH, M. Characterization of various kinds of nanocellulose. **Handbook of nanocellulose and cellulose nanocomposites**, 1, 51-1001 2017.

JAYANI, T., SANJEEV, B., MARIMUTHU, S., UTHANDI, S. Bacterial Cellulose Nano Fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016. **Carbohydrate Polymers**, 250, 116965, 2020.

JORFI, M.; FOSTER, E. J. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, p. 41719, 2015.

KARGARZADEH, H., MARIANO, M., GOPAKUMAR, D., AHMAD, I., THOMAS, S., DUFRESNE, A., ... & LIN, N. Advances in cellulose nanomaterials. **Cellulose**, 25(4), 2151-2189, 2018.

KOSHLAND JR, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. **Biological reviews**, v. 28, n. 4, p. 416-436, 1953.

KIM, J. H.; SHIM, B. S.; KIM, H. S.; et al. Review of nanocellulose for sustainable future materials. **International Journal of Precision Engineering and Manufacturing - Green Technology**, v. 2, n. 2, p. 197–213, 2015.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KOLAKOVIC, R.; LAAKSONEN, T.; PELTONEN, L.; LAUKKANEN, A.; HIRVONEN, J. Spray-dried nanofibrillar cellulose microparticles for sustained drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 47–55, 2012.

KONTTURI, E.; LAAKSONEN, P.; LINDER, M. B.; NONAPPA; GRÖSCHEL, A. H.; ROJAS, O. J.; IKKALA, O. Advanced Materials through Assembly of **Nanocelluloses**. *Adv. Mater.* 30, 1703779, 2018.

KUMAR, V.; BOLLSTRÖM, R.; YANG, A.; CHEN, Q.; CHEN, G.; SALMINEN, P.; BOUSFIELD, D.; TOIVAKKA, M. Comparison of Nano- and Microfibrillated Cellulose Films. *Cellulose*, 21, 3443–3456, 2014.

LIMA, L. R., SANTOS, D. B., SANTOS, M. V., BARUD, H. S., HENRIQUE, M. A., PASQUINI, D., RIBEIRO, S. J. Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. *Química Nova*, 38, 1140-1147, 2015.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL; W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(3), 506-577, 2002.

MACHADO, R. T. A.; GUTIERREZ, J.; TERCJAK, A.; TROVATTI, E.; UAHIB, F. G. M.; NASCIMENTO, A. P.; BERRETA, A. A.; RIBEIRO, S. J. L.; BARUD, H. S. *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production. *Carbohydrate polymers*, v. 152, p. 841-849, 2016.

MATHEW, A. P.; THIELEMANS, W.; DUFRESNE, A. Mechanical Properties of Nanocomposites from Sorbitol Plasticized Starch and Tunicin Whiskers. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 109, p. 4065–4074, 2008.

MORRISON, F. A. Understanding rheology. *Topics in Chem. Eng.*, 2001.

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

OSTWALD, W. ET AL. Colloids and their viscosity. *Transactions of the Faraday Society*, v. 91, n. 2264, p. 69, 1913.

PINKERT, A., MARSH, K. N., PANG, S., STAIGER, M. P. Ionic liquids and their interaction with cellulose. *Chemical reviews*, 109(12), 6712-6728, 2009.

R. M. BROWN JR., in “Cellulose: Structural and Functional Aspects” (Ellis Howoodide), p. 145, 1989.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN JR., A. E.; CONRAD, C. M.; *Text. Res. J.* 1959, 29, 786.

SHIN, S.; KWAK, H.; HYUN, J. Transparent cellulose nanofiber based open cell culture platform using matrix-assisted 3D printing. *Carbohydrate polymers*, v. 225, p. 115235, 2019.

WANG, Q.; SUN, J.; YAO, Q.; JI, C.; LIU, J.; ZHU, Q. 3D printing with cellulose materials. *Cellulose*, v. 25, n. 8, p. 4275-4301, 2018.

WANG, W., MOZUCH, M. D., SABO, R. C., KERSTEN, P., ZHU, J. Y., JIN, Y. Endoglucanase post-milling treatment for producing cellulose nanofibers from bleached eucalyptus fibers by a supermasscolloider. *Cellulose*, 23(3), 1859-1870, 2016.

**CAPÍTULO 3: DESENVOLVIMENTO E
CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGEL DE
NANOFIBRA DE NANOCELULOSE
BACTERIANA/GELATINA/GOMA GELANA**

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista os avanços da medicina regenerativa dos últimos anos, e o desenvolvimento de técnicas de manufatura aditiva ou impressão 3D, conceitos como a utilização de biomateriais se tornaram uma das alternativas para o desenvolvimento de novas técnicas de regeneração de tecidos.

Entretanto, a obtenção de sucesso destas técnicas está diretamente ligada a associação de materiais de diversas naturezas, sendo sua principal utilização, o uso de materiais biopoliméricos. Tais materiais, são utilizados para mimetizar a arquitetura da matriz extracelular (MEC) dos tecidos vivos, caracterizando-se por uma organização complexa de proteínas estruturais e fibras (CAI & XU, 2011; SHI et al., 2014). Dessa maneira, os biomateriais são utilizados para atuar na interface biológica viabilizando, tratando, aumentando, melhorando ou substituindo qualquer tecido, órgão ou função do organismo (WILLIAMS, 2009). Considerando um biomaterial ideal, características como a variedade de tamanhos e formas, além de suas propriedades químicas, físicas e a biocompatibilidade com o organismo alvo tornam-se fatores essenciais à sua aplicação (CHAPEKAR, 2000).

Os biomateriais encontram-se divididos em dois tipos: os naturais e os sintéticos. Biomateriais naturais simulam a estrutura e composição da matriz extracelular nativa, o que permite a inserção de fatores crescimento e outras proteínas capazes de impulsionar funções celulares. Já os biomateriais sintéticos não possuem a característica de simulação da matriz extracelular nativa e geralmente são constituídos por peptídeos de automontagem que podem ser modificados a fim de adquirir características biologicamente ativas. Contudo, eles geralmente necessitam de moléculas sinalizadoras para ajudar na interação entre as células e o material, e ainda, a sua degradação pode produzir subprodutos indesejáveis, dependente do polímero utilizado. (HOLMES, 2002; NG et al., 2004).

1.1. Biopolímeros

Os biopolímeros são polímeros provenientes de organismos vivos, possuindo uma infinidade de derivados, os quais são de suma importância a vida no planeta. Além disso, os biopolímeros demonstram diversas propriedades que atraem interesse para suas aplicações (ELNASHAR, 2010).

Segundo a classificação demonstrada por SHALINI (2009), os biopolímeros são derivados de fontes renováveis, que se divide em três classificações dependentes de sua origem de produção:

1. Polímeros extraídos diretamente de biomassa (polissacarídeos: amido, celulose, quitina/quitosana, etc.; proteínas: colágeno/gelatina, albumina, seda, etc.);
2. Polímeros produzidos por síntese química usando monômeros de origem renovável (poliácido lático - PLA);
3. Polímeros produzidos por microrganismos ou bactérias modificadas geneticamente (polihidroxicanoatos – PHAs, polihidroxiacetato – PHA, polihidroxiacetato – PHA, polihidroxiacetato – PHA, etc.).

Adicionalmente, os biopolímeros podem ser considerados como um material “verde”, possuindo uma degradação rápida de apenas algumas semanas, enquanto os outros provenientes de recursos não renováveis demoram várias semanas podendo alcançar até anos para se decompor (KUMAR, 2013).

Além disso, a utilização de biopolímeros para a regeneração tecidual se torna muito atraente, uma vez que tais materiais possuem uma diversificada viabilidade de aplicação sendo conjugada com outras técnicas, assim como a tecnologia bioimpressão 3D, com a utilização de hidrogéis de compósitos biopoliméricos.

1.2. Hidrogéis para Bioimpressão

Quando referido a bioimpressão 3D, os hidrogéis devem satisfazer requisitos tanto de materiais convencionais quanto de materiais biológicos para uma aplicabilidade otimizada funcional, além de reduzir os índices de rejeição do organismo alvo. Tais propriedades relacionadas a este material se correlacionam diretamente com a capacidade de impressão, mecânica, degradação, funcionalização, e devem atenderem os requisitos biológicos, ou seja, biocompatibilidade, citocompatibilidade e bioatividade (JI & GUVENDIREN, 2017). O termo “biotinta” é utilizado normalmente para hidrogéis com componentes celulares que foram dispostos dentro de hidrogéis previamente ao processo de impressão (GROLL et al., 2018).

Juntamente com as propriedades da biotinta, outros parâmetros fundamentais são relacionados, por exemplo: I- sua capacidade de impressão deve garantir uma processabilidade e fidelidade de impressão, II- a viscosidade da composição e a resistência mecânica da construção impressa deve se auto sustentar na estruturação 3D, a qual afeta diretamente a eficiência de incorporação das células, III- sua degradação,

principalmente relacionada à integração funcional *in vivo* da construção do impresso deve permitir que a matriz extracelular das células substitua gradualmente o constructo (JI & GUVENDIREN, 2017).

Tanto a biotinta, quanto os produtos de degradação não devem conter materiais que induzam resposta inflamatória no hospedeiro quando implantados (JI & GUVENDIREN, 2017). Além disso, a funcionalização torna-se necessária para incorporar moléculas sinalizadoras quando é preciso direcionar o comportamento celular, como adesão, migração e diferenciação. Já a biocompatibilidade e citocompatibilidade permitem uma alta viabilidade celular, tanto antes quanto depois da impressão (KESTI et al., 2015; JI & GUVENDIREN, 2017).

Geralmente, quando referido a estas formulações de biotintas de hidrogéis, se utiliza uma solução polimérica viscosa (massa em % de polímero $\geq 3\%$) para impressão, seguida de uma rápida reticulação ou gelificação após impressão para manter a estrutura 3D. Existem três formas de reticulação: física, química e biológica. A primeira, utiliza interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, a segunda forma ligações covalentes, enquanto a terceira parte do princípio de reações enzimáticas ou metabólicas para a conversão da estrutura (como é o exemplo do fibrinogênio e trombina) (MUR 2016; GOPINATHAN & NOH, 2018).

Dessa maneira, ressaltamos a importância da busca de novos biomateriais que em associação destes biopolímeros tornem-se de alto valor agregado, explorando assim, cada vez mais a área da engenharia de tecidos.

1.3. Associação Polimérica com Nanocelulose

Assim como expresso no capítulo anterior, diferentes estudos na literatura têm demonstrado a potencialidade da NC como reforço em nanocompósitos empregando diferentes polímeros, como amido (MATHEW et al., 2008), hidroxietilcelulose (SEHAQUI et al., 2011), quitosana (HASSAN et al., 2012), alginato (PARK et al., 2015) e pectina (KHORASANI & SHOJAOSADATI, 2016), dentre outros. O que justifica o aumento no interesse pela forma de nanofibras de celulose (NFC). Tal utilização da NFC é retratada devido a seus importantes fatores, como sua elevada área superficial, resistência mecânica, facilidade de preparação, alto rendimento, e possibilidade de reforçar com eficiência nanocompósitos, os quais passam a apresentar excelentes propriedades de físico-químicas. Com isso, a utilização de biopolímeros se torna um atrativo para a associação com a NFC, a qual foi investigada no atual trabalho. Além

disso, relacionado a este estudo, serão utilizados dois polímeros naturais de alto interesse em aplicações biomédicas: a gelatina e a goma gelana.

1.4. Gelatina

A gelatina solúvel é obtida industrialmente a partir do colágeno contido em ossos ou peles de animais. Além disso, suas propriedades estão diretamente ligadas sob a influência da fonte do material, idade do animal, e o tipo de colágeno extraído (JOHNSTON-BANKS, 1990). Sua composição é basicamente originada de uma mistura heterogênea de polipeptídios de fitas simples ou múltiplas, cada uma possuindo conformações de hélice de prolina estendida contendo entre 300 e 4.000 aminoácidos (**Figura 22**) (KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2005).

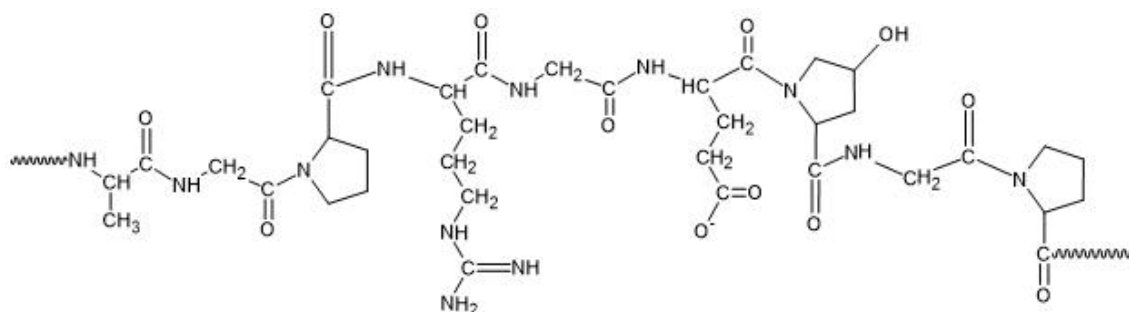


Figura 22. Estrutura básica da Gelatina (Adaptada de KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2005).

Quando referido a gelatina e ao colágeno denota-se formas distintas da mesma macromolécula, de maneira que a gelificação da gelatina é descrita como uma reestruturação parcial do colágeno (LEDWARD, 1986). Tal processo de extração da gelatina é dada por clivagem ácida ou básica das ligações covalentes intermoleculares e intramoleculares que estabilizam do colágeno, realizada normalmente por um pré-tratamento com água acima de 45°C, seguida de uma extração dependente de pH, e temperatura de extração (KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2005).

Sua aplicação relaciona-se diretamente com suas propriedades de elasticidade, consistência e estabilidade, intumescimento, reversibilidade térmica, gelificação, além de ser utilizado como um filme externo para proteger contra a secagem, a luz e o oxigênio. Além disso, a gelatina influencia diretamente em propriedades reológicas (essencialmente força e viscosidade do gel), mas também é determinada por outras características, particularmente cor, transparência, sabor e facilidade de dissolução em água (JOHN, 1977, MONTERO & GUÍLLEN, 2000).

1.5. Goma Gelana

A goma gelana por sua vez é um exopolissacarídeo hidrofílico linear aniônico obtido através do processo de fermentação aeróbia pela bactéria *Sphingomonas elodea* (MORRIS et al., 2012). Sua utilização comercial geralmente se refere a aplicação em cremes e na indústria alimentícia, devido às suas características espessantes, e a possibilidade de formação de géis transparentes resistentes ao calor e baixos pHs, mesmo em baixas concentrações (OGAWA et al., 2006; PICONE, 2008; PATIL et al., 2010). Sua estrutura é constituída de unidades repetidas do tetrassacarídeo (β -1,3-D-glicose, β -1,4-D-ácido glucurônico, β -1,4-D-glicose e α -1,4-L-ramnose). Na sua forma nativa possui dois grupamentos acila que estão ligados a um único resíduo de glicose, sendo um acetil e um gliceril (**Figura 23**) (CHANDRASEKARAN et al., 1988; GIAVASIS et al., 2000; PICONE, 2008), que são removidos por hidrólise alcalina para gerar as formas comerciais, disponíveis com alto ou baixo grau de acilação (MORRIS et al., 2012).

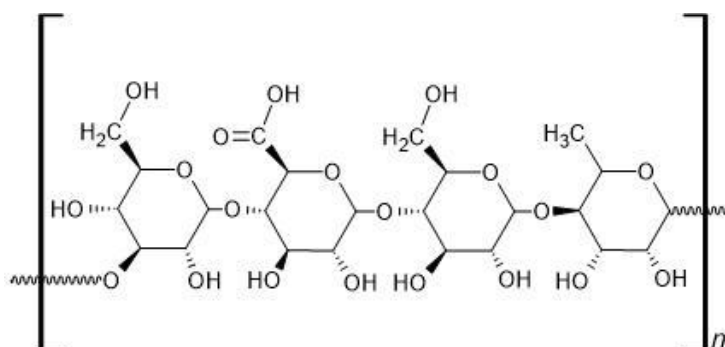


Figura 23. Estrutura do monômero de Goma Gelana (Adaptado de MORRIS et al., 2012).

Dessa forma a associação de biopolímeros denota-se uma ferramenta muito útil para a aplicação na área de regeneração tecidual. Visando tal aplicação, o objetivo do atual trabalho foi desenvolver e caracterizar um hidrogel baseados em nanofibra de nanocelulose bacteriana, associada a gelatina e goma gelana.

2. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar um hidrogel de nanofibra de nanocelulose bacteriana com gelatina e goma gelana, visando o desenvolvimento de uma tinta/biotinta aplicável a bioimpressão 3D.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção da Nanocelulose Bacteriana

A obtenção da nanocelulose bacteriana (NCB) foi realizada seguindo a metodologia proposta no **Capítulo 2**. As membranas de nanocelulose bacteriana foram fornecidas grupo *Seven Indústria de produtos Biotecnológicos Ltda*, situada no estado do Paraná, Brasil. O cultivo da bactéria *Komagataeibacter xylinus* foi realizado em bandejas de 30 cm X 50 cm com tempo de cultivo de 96 horas a 28°C. O meio de cultura foi composto por glicose 2% (m/v); peptona 0,5% (m/v); fosfato dissódico anidro 0,27% (m/v); e ácido cítrico monoidratado 0,115% (m/v). Posteriormente ao cultivo, as mantas de NCB obtidas foram limpas para a remoção de resíduos do meio de cultivo e remoção das bactérias. O processo limpeza foi realizado submetendo as membranas de NCB húmidas à uma solução básica de Hidróxido de sódio - NaOH 0,1% (m/v) a temperatura de 70°C. Posteriormente foi submetido a um banho ultrassônico utilizando água destilada para a remoção do NaOH.

3.2. Extração das nanofibras de NCB

A extração das nanofibras de nanocelulose bacteriana (NFCB) foi realizada seguindo a metodologia proposta no **Capítulo 2**. Para o isolamento das NFCB, as mantas de NCB foram desfibriladas com a utilização de um ultra - refinador de disco *Supermasscolloider* adicionando água destilada (Masuko, modelo MKCA6-5J, modelo de disco MKGA10-80). Além disso, após a extração das nanofibras, foi realizado um processamento com metade do amostral obtido utilizando uma endoglucanase *FiberCare® R*, obtendo dois tratamentos: com tratamento enzimático (CE) e sem tratamento (SE). Todos os procedimentos da atual etapa do trabalho foram realizados sob supervisão do Professor Doutor Vadeir Arantes, e a Doutora Gabriela Leila Berto no Laboratório de Biocatálise e Bioprodutos, Faculdade de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

3.3. Seleção da Concentração do Agente Gelificante (Goma Gelana)

Para a seleção do agente gelificante, foi levado em consideração a viscosidade do hidrogel direcionado a produção de filamento no processo de bioimpressão 3D de *scaffolds*. Dessa forma, foram realizados estudos com diferentes concentrações de Goma gelana (GG) (0,5%; 1%; 1,5%; 2%, 2,5% e 3%). Posteriormente, foi realizada a caracterização da viscosidade por reometria e análise por microscopia óptica. Para a

análise de Reometria foram utilizados os parâmetros presentes na **SEÇÃO 3.7.** do atual capítulo. Para a avaliação por microscopia ótica foi realizado um Microscópio Digital USB *Bysameyee* acoplado a saída de extrusão da bioimpressora 3D modelo BioEdPrinter V2 para polímeros (*Bioedtech*[®]), a fim de observar a formação de filamento adequado à bioimpressão, fora extrudado 5 mm³ de hidrogel com porcentagem de velocidade de 200%. Posteriormente, a fim de se observar a formação da estrutura do *scaffold*, foi realizada a bioimpressão dos hidrogéis de GG de diferentes proporções percentuais, seguindo a metodologia proposta na **SEÇÃO 3.8.** deste capítulo.

3.4. Obtenção do Hidrogel de NFCB/Gelatina/Goma Gelana

Para a obtenção dos hidrogéis diferentes teores mássicos de NFCB, Gelatina (Gel) e Goma gelana foram misturados, de acordo com a **Tabela 6.** A concentração utilizada de foi de GG 2,5%, selecionada baseada em estudo prévio indicado na **SEÇÃO 3.3.1.** Seguindo dados da literatura a utilização de baixos teores de compostos sólidos indicam uma maior eficiência na redução de citotoxicidade dos hidrogéis além de reduzirem o custo do mesmo a fim de escalonamento (DÁVILA & D'ÁVILA, 2019). Dessa forma, foi utilizada a proporção de sólidos o NFCB/Gel em intervalos de 0,625% no intervalo de (0% a 2,5%), levando em consideração a proporção de 5% de sólidos totais (NFCB + Gelatina + GG). A princípio, foi misturado as soluções de nanofibras de nanocelulose bacteriana e gelatina, sob agitação magnética a 90°C (até completa homogeneização), por fim, fora adicionado as concentrações de goma gelana.

Tabela 6. Proporção das concentrações de teores mássicos (em %) dos hidrogéis desenvolvidos, sendo a massa de sólidos totais 5% (m/m).

	NFCB	Gelatina	Goma Gelana	Água
Amostras	%	%	%	%
1A	0	2,5	2,5	95
2A	0,625	1,875	2,5	95
3A	1,25	1,25	2,5	95
4A	1,875	0,625	2,5	95
5A	2,5	0	2,5	95

Fonte: Autoria Própria

3.5. Reometria

As análises foram realizadas em reômetro modelo AR1500 EX (*TA Instruments*). As medidas foram realizadas baseadas no modelo proposto por Dávila & D'ávila (2019) com modificações. Os testes foram conduzidos utilizando uma geometria cone-placa de 40mm de diâmetro com GAP de 0,5 mm, sob temperatura ambiente. As medidas de viscosidade foram realizadas em três etapas. Inicialmente foi realizado o teste de varredura de amplitude, para a definição do intervalo de viscoelasticidade linear (LVE) ($\gamma_0 = 1\%$ para hidrogéis). Posteriormente, testes de varredura de frequência foram realizados. E em seguida fora realizado uma avaliação de aumento de estresse de material pelo método de fluxo, as medidas de viscosidade foram realizadas na faixa de frequência de 0,01-700 s⁻¹.

3.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras foi observada em um microscópio eletrônico de varredura (JEOL JMF-6700F). Todas as amostras foram depositadas em suportes de cobre, recobertas por uma camada de carbono com espessura de 1-10 nm, com microscópio operando na tensão de 2 kV. A análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Avançada, Centro de Caracterização e Desenvolvimento de Protocolos para Nanotecnologia, Instituto de Química, UNESP, São Paulo, Brasil. O grupo amostral foi composto por NFCB (com e sem tratamento enzimático), Gel e GG, e seus respectivos controles, os hidrogéis de NFCB (com e sem tratamento enzimático) e Gel/GG foram utilizados na proporção de 50/50 NFCB/Gel respectivamente. Todas as amostras foram submetidas ao processo de liofilização previamente ao procedimento experimental.

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

Os espectros de FTIR foram obtidos utilizando o espectrômetro *Carry 630 FTIR Agilent*, no Laboratório CBQuim, Universidade de Araraquara (UNIARA), Araraquara, São Paulo. As medidas foram realizadas no modo ATR (refletância total atenuada), de 4000 a 600 cm⁻¹ e 64 varreduras. As amostras foram previamente liofilizadas antes da análise.

3.7. Análise Térmica

As análises de Termogravimetria (TG) foram efetuadas utilizando equipamento modelo SDT Q600 (*TA Instruments*, USA). As condições utilizadas para o experimento foram atmosfera de ar sintético com vazão de 100 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, com intervalo de 30°C até 600°C. Utilizou-se aproximadamente 3-10 mg de cada amostra de NFCB, as amostras foram condicionadas inicialmente a um cadinho de alumina, e o ensaio foi realizado utilizando um cadinho de alumina vazio como referência.

3.8. Bioimpressão

Para a bioimpressão dos *Scaffolds* dos hidrogéis selecionados nas etapas anteriores, foi utilizado uma bioimpressora 3D modelo BioEdPrinter V2 para polímeros (*Bioedtech*[®]) com o *software Simplify 3D*. A critério de melhorar a qualidade de impressão do *scaffold*, denota-se a importância da seleção de parâmetros para tal processo, como: vazão de hidrogel, afetada diretamente pela viscosidade do material, sendo considerada inversamente proporcional à sua viscosidade, ou seja, maiores vazões para hidrogéis menos viscosos, e menores para hidrogéis mais viscosos (fluidos); outro, ponto importante é o tamanho e preenchimento do impresso, que relaciona-se a orientação da extrusora durante o processo de impressão, principalmente por se tratar de hidrogéis, o constructo não pode apresentar rotas de extrusão sem a presença de uma camada de base (filamentos de extrusão suspensos), pois devido à viscosidade do material, tal região impressa “escorre” perdendo a sua estrutura. Dessa forma, foi utilizado um bocal de extrusão de 0,5 mm de diâmetro, sem alteração no multiplicador de vazão de 1X (uma vez), fora utilizado um objeto de formato quadrado de 20 mm largura, 20 mm de comprimento e 15 mm de altura (desenhado com o auxílio do software gratuito *Tinkercad 3D online*), com preenchimento de 35% do tipo grade (*grid*) e velocidade de extrusão de 200 mm/min, e distanciamento inicial de base de 0,8 mm (0,3 mm do bocal de extrusão + 0,5 mm de configuração de camada de basal) antes do processo de impressão. Posteriormente, os *scaffolds* bioimpressos foram reticulados utilizando cloreto de cálcio 0,1M por 12 horas.

3.9. Ensaio de Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade, utilizou-se fibroblastos de murinos derivados de tecido conjuntivo (L929) adquiridos da ATCC (*American Type Culture Collection*), que

foram gentilmente cedidas pelo laboratório da Prof^ª. Gisele Faria da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Inicialmente, as células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), com posterior incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 2 repiques consecutivos, iniciou-se o ensaio de citotoxicidade, empregando uma concentração de 1x10⁴ células/poço, que foram incubadas em placa de 96 poços. A placa foi mantida por 24 horas em incubadora, respeitando os mesmos parâmetros de temperatura e porcentagem de CO₂ descritos anteriormente.

Paralelamente ao plaqueio das células, os meios de extração (tratamento) empregando os *scaffolds* de NFCB/Gel/GG reticulados com cloreto de cálcio, foram preparadas de acordo com a ISO 10993-12. Para tal, 1,5 cm² de cada *scaffold* foi disposto em microtubo com a adição de 2 mL de meio de cultura (DMEM + 10% de soro fetal bovino). Os filmes em contato com os meios foram deixados sob agitação por 24 horas a 37°C. Finalizado o período de agitação, os meios foram filtrados em filtro de seringa 0,22 µm. Após a filtragem, estes foram adicionados sobre a monocamada celular empregando 100 µL/poço, seguido da incubação em estufa de CO₂ por mais 24 h. Decorrido as 24 h de tratamento, os meios de extração foram removidos, seguido da lavagem com *Phosphate Buffer Saline* (PBS) por duas vezes consecutivas. Finalizado essa etapa, 100 µL de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) previamente diluído na concentração de 1 mg/mL foram adicionados em cada poço. A placa foi novamente incubada a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da formação dos cristais violeta de formazana (3 horas). Finalizado o período de incubação, o MTT foi retirado dos poços e os cristais de formazana formados foram solubilizados adicionando-se 50 µL de álcool isopropílico absoluto.

Os valores de absorbância (Abs) foram obtidos em espectrofotômetro de microplacas (*SoftMax*® Pro 5), com leitura em comprimento de onda a 570 nm. Como controle de morte celular (controle positivo), as células foram tratadas com DMSO (Dimetilsulfóxido) a 10% e como controle de sobrevivência (controle negativo), as células foram tratadas com DMEM + 10% SFB. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, em três ensaios independentes, incluindo os controles (MOSMANN et al., 1983). Com os valores de Absorbância, calculou-se a média da porcentagem de

viabilidade celular em relação ao controle de sobrevivência (100%), conforme apresentado pela **Equação 7** (norma ISO 10993-5):

Equação 7. Cálculo da porcentagem de viabilidade celular dos Scaffolds de NFCB/Gel/GG

$$\frac{(\text{Absorbância da amostra} - \text{Absorbância do branco})}{(\text{Absorbância do controle de sobrevivência} - \text{Absorbância branco})} \times 100$$

4. RESULTADOS E DICUSSÃO

4.1. Seleção da Concentração do Agente Gelificante (Goma Gelana)

Tendo em vista o desenvolvimento de hidrogéis para a Bioimpressão 3D, é fundamental avaliar a reologia dos materiais, para distinguir os materiais adequados ou não para esse tipo de técnica. Dessa forma, se torna necessário o estudo de reologia com o intuito de antecipar o comportamento dos materiais durante o processo de Bioimpressão (AKIRA *et al.* 2018).

Um hidrogel adequado para bioimpressão deve possuir características tixotrópicas, um comportamento não newtoniano, de forma que a tensão aumente, enquanto a viscosidade do material reduz e posteriormente, o mesmo hidrogel necessita uma capacidade de recuperação, com tempo adequado (Dávila & D'Ávila, 2017).

Dessa forma, para a seleção do agente gelificante, foi levado em consideração a viscosidade do hidrogel direcionado a produção de filamento no processo de bioimpressão 3D de *scaffolds*. Com isso, as curvas de viscosidade (**Figura 24. a.**) foram analisadas seguindo a lei de potência (*Power-law fluid*) proposta pelo modelo de Ostwald-de Waele (1913), no qual “n” é o índice da lei de potência, e também define o comportamento de viscosidade. Além disso, “m” é o índice de consistência que se relaciona a grandeza de viscosidade (**Tabela 7**). Para a classificação entre dilatante, newtoniano e pseudoplástico foi utilizado a classificação de Morrison (2001), onde: $n > 1$, dilatante; $n = 1$, newtoniano e $n < 1$ pseudoplástico. Posteriormente, a viscosidade média foi utilizada para a construção de uma curva de viscosidade comparando cada formulação de acordo com a concentração de GG. Todos os dados foram obtidos e tratados utilizando o software TRIOS AR-1500 fornecida pelo próprio fabricante do equipamento.

Tabela 7. Parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald-de Waele (1913)

Amostra	m (Pa. s)	n (-)	R^2
Goma Gelana 0,5%	0,205977	-0,111164	0,812209
Goma Gelana 1%	19,6957	-0,753160	0,996857
Goma Gelana 1,5%	53,4470	-0,866242	0,995229
Goma Gelana 2%	89,9376	-0,952117	0,993473
Goma Gelana 2,5%	225,962	-1,06442	0,997886
Goma Gelana 3,0%	472,439	-1,01465	0,993918

Fonte: Autoria própria

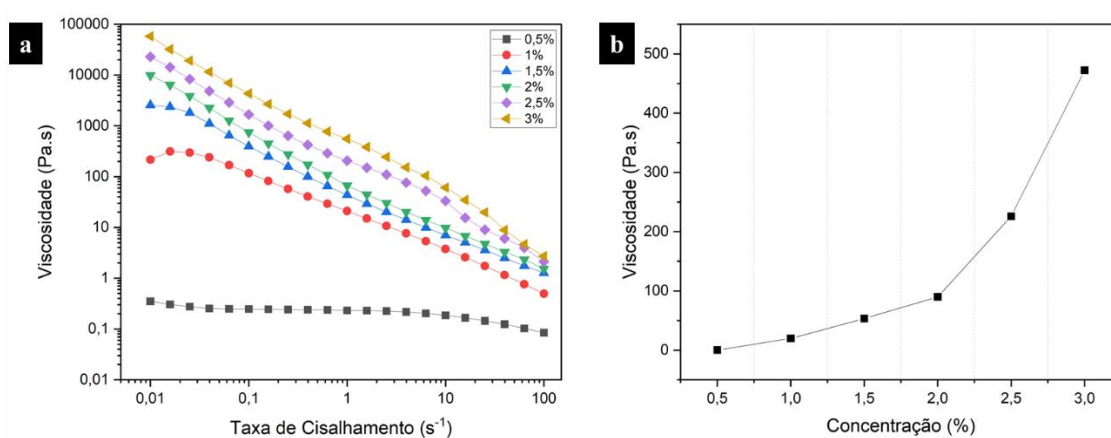


Figura 24. Dados obtidos pela análise de reometria de diferentes concentrações de Goma Gelana (GG), sendo: **a.** curvas de viscosidade dos hidrogéis de GG versus taxa de cisalhamento; **b.** Dados de viscosidade média de hidrogéis com diferentes teores de GG.

Em seguida as imagens obtidas por microscopia ótica foram utilizadas para a comparação do comportamento de viscosidade durante o processo de extrusão, e em seguida foi analisado a formação do *scaffold* após a bioimpressão.

Ao observarmos os dados da análise de reometria, pode-se notar que a viscosidade média dos hidrogéis de GG era diretamente proporcional a sua concentração (**Figura 24. b.**), ou seja, em concentração de menor teor de GG (0,5%) sua viscosidade era 0,205977 Pa. s., em comparação à sua viscosidade de maior concentração (3%) sua viscosidade média aumenta consideravelmente quando comparado a viscosidade inicial (472,439 Pa. s). Tal fato relaciona-se a característica observada por Yuguchi *et al.* (1993), na qual, a goma gelana tende se ramificar ou ciclizar devido a presença de ambiente aquoso, com isso aumentando seu volume. Dessa maneira, ao aumentar a concentração de GG,

aumenta-se também as cadeias presentes de GG que consequentemente resulta no aumento da viscosidade (YUGUCHI *et al*, 1993).

Adicionalmente, todos os hidrogéis de GG, apresentaram características de material pseudoplástico, pelo qual, ao aumentar a taxa de cisalhamento sua viscosidade reduz, sendo adequado ao processo de bioimpressão 3D, uma vez que o hidrogel necessita do aumento de fluidez para a passagem no bico da extrusora quando submetidas a pressão.

Além disso, os dados obtidos por microscopia ótica (**Figura 25**) corroboram com os dados provenientes da reometria, uma vez que, altas viscosidades em baixas taxas de cisalhamento, impedem a formação de gotículas devido as tensões superficiais e a fragmentação do material impresso, em contrapartida, uma baixa viscosidade em altas tensões de cisalhamento, auxilia no processo de extrusão, contudo há a formação de gotículas (MALDA *et al*, 2013).

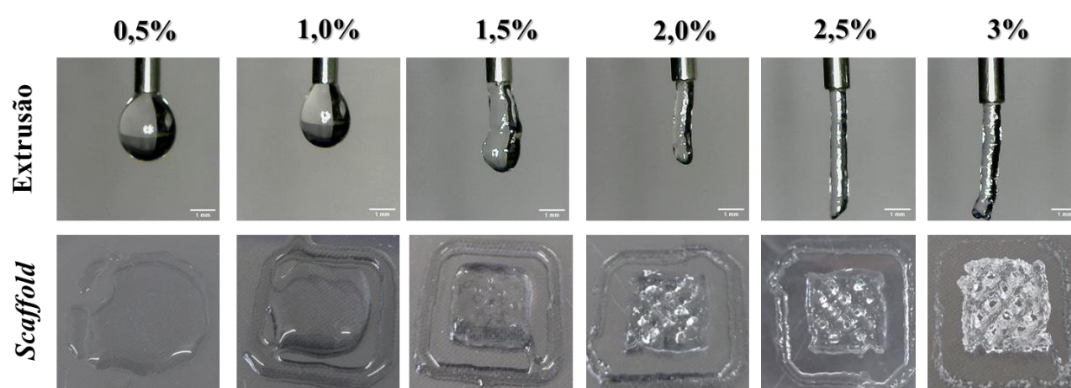


Figura 25. Avaliação de diferentes concentrações de hidrogéis de Goma Gelana frente a formação de filamento e *scaffold* a partir do método de bioimpressão 3D (Largura: 20 mm X comprimento: 20 mm X altura: 15 mm). Fonte: Autoria Própria.

Como pode ser observado na **Figura 25**, os hidrogéis com menor viscosidade (menores concentração de GG) apresentaram a formação de uma gotícula durante o processo de extrusão do material, o qual não é favorável para a Bioimpressão 3D, uma vez que a viscosidade não consegue manter a estruturação após o processo de extrusão. Contudo ao observarmos os hidrogéis de maior viscosidade pode-se notar a formação de um filamento cilíndrico uniforme, os quais, indicam uma maior estruturação, sendo indicados como promissores a aplicação na bioimpressão. Além disso, os hidrogéis com viscosidade de menores valores após o processo de bioimpressão resultaram na perda de estruturação 3D do material, como indicado pela **Figura 25**, pode – se observar que não houveram a formação de poros, ou seja, houve um processo de “espalhamento” do hidrogel após a extrusão, na qual resultou na redução da porosidade e de estruturação

tridimensional. Por fim foram selecionados os hidrogéis das concentrações de 2%, 2,5% e 3% para a reticulação em cloreto de cálcio.

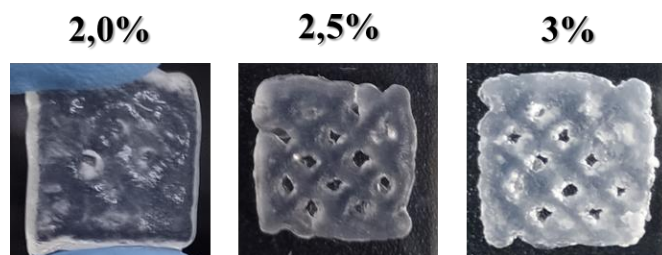


Figura 26. Scaffolds de Goma Gelana após o processo de reticulação (20 mm X 20 mm X 15 mm). Fonte: Autoria Própria

Os resultados da reticulação (**Figura 26**) indicaram a presença da formação da porosidade dos *scaffolds*, contudo para o hidrogel da concentração de 2% notou-se que a porosidade foi perdida. A atuação do cloreto de cálcio favorece a melhor ligação entre a estrutura do hidrogel, tornando-o mais rígido e mais estável em relação as ligações entre as camadas do hidrogel. Além disso, o tratamento com este reticulante induz uma transformação das moléculas de GG em agregados de hélices, no qual, resulta em uma estrutura de maior densidade com menor taxa de intumescimento (WEN et al., 2014). Dessa forma, baseados nos resultados da reticulação, foi selecionado o hidrogel de 2,5% para a aplicação nos estudos posteriores.

4.2. Reometria

Quando referido ao padrão de desenvolvimento de hidrogéis para a aplicação em bioimpressão 3D, torna-se fundamental a avaliação reológica para distinção de materiais com características adequadas ou não para seus fins. Dessa maneira, com estudos de reologia é possível antecipar o comportamento dos hidrogéis ou biotintas em sua aplicação durante o processo de impressão (AKIRA; LUIS, 2018). Segundo o estudo realizado por Dávila & D'Ávila (2017), um hidrogel adequado para a bioimpressão deve possuir características tixotrópicas um comportamento não newtoniano, no qual a medida de a tensão de estresse aumente, a viscosidade do material deve reduzir e posteriormente ter uma recuperação em tempo razoável.

A printabilidade dos hidrogéis foi inicialmente avaliada por meio de medidas de viscosidade de cisalhamento em estado estacionário. Na **Figura 27** são mostradas as curvas de viscosidade para diferentes misturas dos hidrogéis e seus componentes primários.

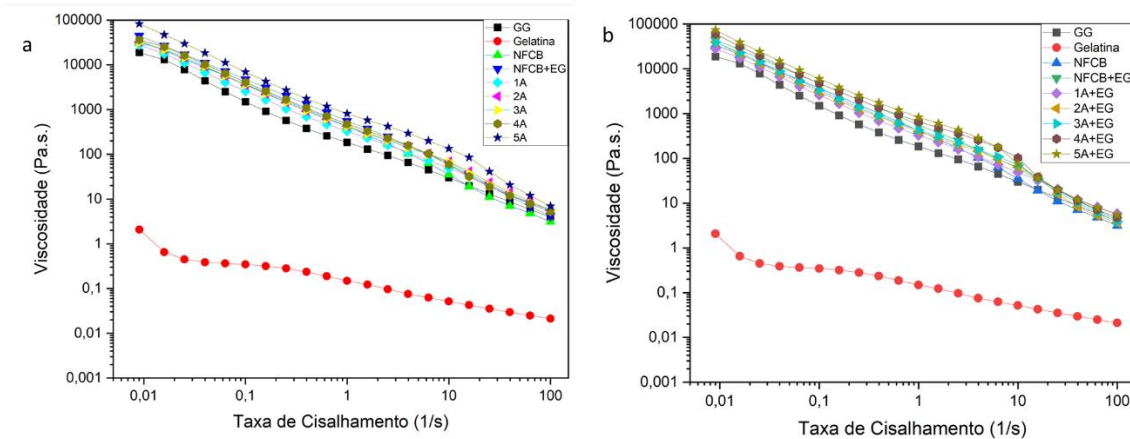


Figura 27. Gráfico obtido da análise de reometria: Viscosidade (η) em função da taxa de cisalhamento (γ). Sendo: nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); Endoglucanase (EG); gelatina (Gel); goma gelana (GG); **a.** sem tratamento enzimático; **b.** com tratamento enzimático. (Fonte: Autoria Própria).

Ao avaliarmos a viscosidade dos materiais (**Figura 27**) observa-se que as amostras possuem um perfil de materiais não-newtonianos, além da característica de tixotropia, ou seja, à medida que as amostras são submetidas a uma taxa de cisalhamento, sua viscosidade é reduzida. Segundo Malda et al. (2013), o comportamento tixotrópico é um fator chave para o desenvolvimento de tintas para extrusão 3D, segundo tal estudo, a alta viscosidade em baixas taxas de cisalhamento, impede a formação de gotículas por tensão superficial e o colapso do objeto impresso, enquanto uma baixa viscosidade em altas tensões de cisalhamento, auxilia no processo de extrusão. Adicionalmente, segundo Zhang e colaboradores (2014), tal comportamento é uma característica relacionada as soluções poliméricas devido a sua rede de emaranhamento.

Posteriormente, as curvas de viscosidade foram analisadas seguindo a lei de potência (*Power-law fluid*) proposta pelo modelo de Ostwald-de Waele (1913) (**Tabela 8**), no qual “n” é o índice da lei de potência, e também define o comportamento de viscosidade. Além disso, “m” é o índice de consistência que se relaciona a grandeza de viscosidade. Dessa forma, para a classificação entre dilatante, newtoniano e pseudoplástico foi utilizado a classificação de Morrison (2001), onde: $n > 1$, dilatante; $n = 1$, newtoniano e $n < 1$ pseudoplástico.

Tabela 8. Parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald-de Waele (1913)

Padrões			
Amostras	m (Pa. s⁻¹)	n (-)	R²
GG	225,962	-1,06442	0,997886
Gelatina	0,140043	-0,41196	0,966763
NFCB	152,912	-0,88233	0,98049
NFCG+EG	83,4937	-0,79793	0,968935
NFCB+EG/Gel/GG			
Amostras	m (Pa. s⁻¹)	n (-)	R²
1A	355,295	-0,90138	0,998474
2A	390,764	-0,95754	0,993588
3A	423,298	-0,95164	0,994319
4A	586,524	-0,96678	0,989401
5A	627,746	-0,99243	0,990864
1A+EG	355,295	-0,90138	0,998474
2A+EG	453,166	-0,91523	0,997931
3A+EG	441,788	-0,92641	0,998266
4A+EG	467,066	-0,95361	0,998005
5A+EG	836,501	-0,94685	0,993991

Fonte: Autoria Própria

Analisando os dados de viscosidade (**Tabela 8**), se observa que a Gelatina possui a menor viscosidade quando comparadas aos outros componentes (0,140043 Pa. s⁻¹). Logo em seguida é possível notar que as NFCB possuem uma viscosidade intermediária (152,912 Pa. s⁻¹ e 83,4937 Pa. s⁻¹). Por fim a goma gelana apresenta a maior viscosidade quando comparados aos componentes puros (225,962 Pa. s⁻¹).

Embora os componentes puros apresentarem uma viscosidade relativamente baixa, após a combinação dos mesmos, sua viscosidade aumenta abruptamente quando comparada aos hidrogéis com maiores concentração de GG. Ao se analisar a viscosidade dos hidrogéis nota-se que todos os hidrogéis apresentaram viscosidade maior que a do agente gelificante, indicando uma estruturação pela associação polimérica. Outro ponto a se ressaltar, é que a medida em que a concentração de NFCB é aumentada, sua viscosidade também aumenta gradativamente, com isso sugere-se que a incorporação da NFCB atua como agente de reforço ao hidrogel produzido (HUANG et al., 2019).

Além disso, quando comparadas as viscosidades dos hidrogéis com a maior quantidade mássica de NFCB observa-se que a viscosidade do hidrogel contendo a NFCB pós processamento enzimático é superior que as NFCB puras. Conforme citado no capítulo anterior, a atuação enzimática ocasiona a inserção de pontas e terminações a estrutura fibrilar da NFCB, assim aumenta sua área superficial, resultando em uma maior

associação com os polímeros contidos no hidrogel, o que provavelmente ocasiona o aumento da viscosidade.

Dessa forma, os dados obtidos da análise de reometria mostram que houve uma interação entre as redes de NFCB, pela qual serviu de “reforço” aumentando a viscosidade das mesmas. Por fim, nesta etapa foi selecionado o hidrogel 3A para futuras aplicações no processo de bioimpressão. Tal formulação foi selecionada devido a sua viscosidade intermediária a suas outras formulações. Dessa forma, o hidrogel permite a estruturação tridimensional, e previne entupimentos da extrusora durante o processo de bioimpressão, o que pode ocorrer com hidrogéis de alta viscosidade.

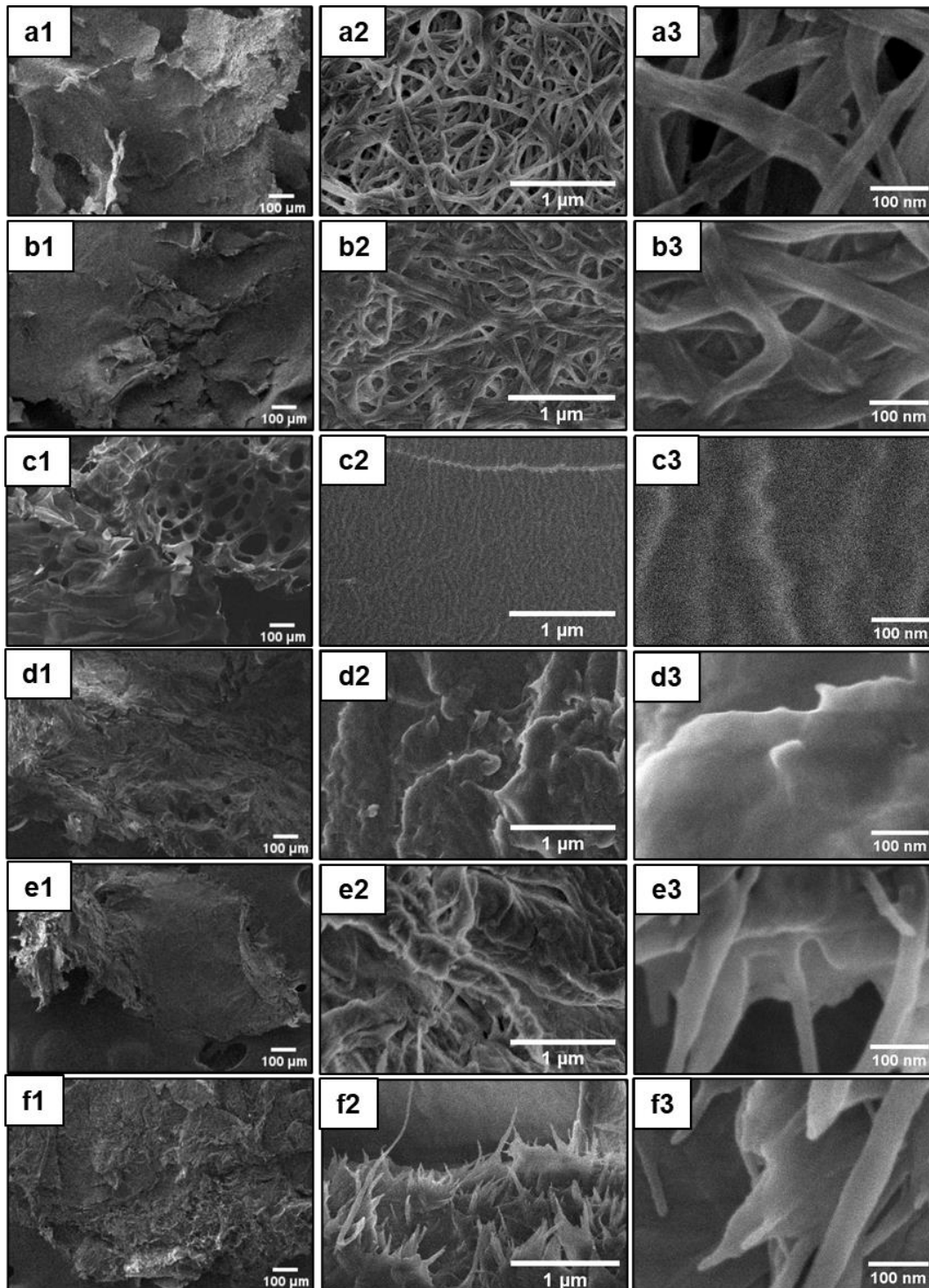
4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos materiais constituintes do hidrogel foram observadas através da análise de MEV (**FIGURA 28**). Como pode ser observado pelas microscopias das nanofibras (**FIGURA 28. a-b**), ambas as amostras mostram a características dos emaranhados de direcionamento randômicos das fibras de NCB, sendo sua organização espacial em formato de “teia”. Outro ponto a ser ressaltado que na amostra de gelatina (**FIGURA 28. c1**) é possível observar sua porosidade resultante da secagem do hidrogel, e a formação de orifícios circulares provavelmente relacionados a presença de bolhas de ar.

Quando analisadas o hidrogel de goma gelana (**FIGURA 28. d**), observa-se a formação de “grumos”, possivelmente relacionadas ao processo de contração do material durante a remoção de água após o processo de liofilização, tal formação também é observada para a amostra de gelatina que é bem elucidada na ampliação de 100.000X (**FIGURA 28. c3**). Outro aspecto interessante a se observar, foi que tanto para a amostra de gelatina quanto para a amostra de goma gelana, não foi possível notar a presença de particulados, o que indica as dispersões homogêneas de ambos os materiais.

Ao se observar a microscopias dos hidrogéis contendo todos os constituintes NFCB/Gel/GG (**FIGURA 28. e-f**), observa-se a formação de uma camada recobrando as nanofibras. Além disso, a formação desta estrutura sem a presença de partículas sob a mesma, indica que a goma gelana e gelatina estão distribuídas uniformemente nesta “camada de revestimento”. Tal fato pode estar relacionado as suas características hidrofílicas que facilitam a dissolução em meio aquoso (GELINSKI, 2018), assim facilitando sua associação de ambos os polímeros quando hidratados, indicando elevada miscibilidade entre eles. Adicionalmente, os mesmos apresentam um efeito sinérgico

como descrito por Zheng e colaboradores (2018), no qual indicam que ambos os polímeros se estruturam em conjunto.



Segundo os estudos realizados por Melchels et al. (2014) e Mouser et al. (2016) que realizaram o desenvolvimento de hidrogéis para bioimpressão com gelatina-metacrilamida em associação com goma gelana, ambos indicam que a associação destes polímeros é dada por ligações cruzadas iônicas entre as cadeias presentes na gelana com os íons presentes na gelatina.

Já quando referido ao efeito de revestimento das nanofibras, as microscopias mostraram as NFCB imersas saindo de uma “camada de revestimento” (FIGURA 28. e3-f3). Segundo o estudo realizado Wang et al., (2018), no qual o autor desenvolveu um hidrogel de nanocelulose bacteriana e gelatina, tal efeito já fora observado após a adição da gelatina, onde a gelatina se deposita na superfície das fibras atuando como revestimento das mesmas. Além disso, tanto a goma gelana quanto a gelatina são conhecidas por servir de revestimento para produtos de diferentes origens, além de servir como espessante, ou modificador reológico (MELCHELS et al., 2014; GELINSKI, 2018).

Dessa maneira, conclui-se que o desenvolvimento dos hidrogéis foram adequados ao processo de preparação, uma vez que não houve a presença de elementos particulados, o qual indicaram elevada miscibilidade dos elementos das formulações.

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

Os dados obtidos pela análise de ATR-FTIR foram expressos pela Figura 29. Todos os dados do espectro de FTIR foram plotados pelo programa e estatística OriginPro 9.0.

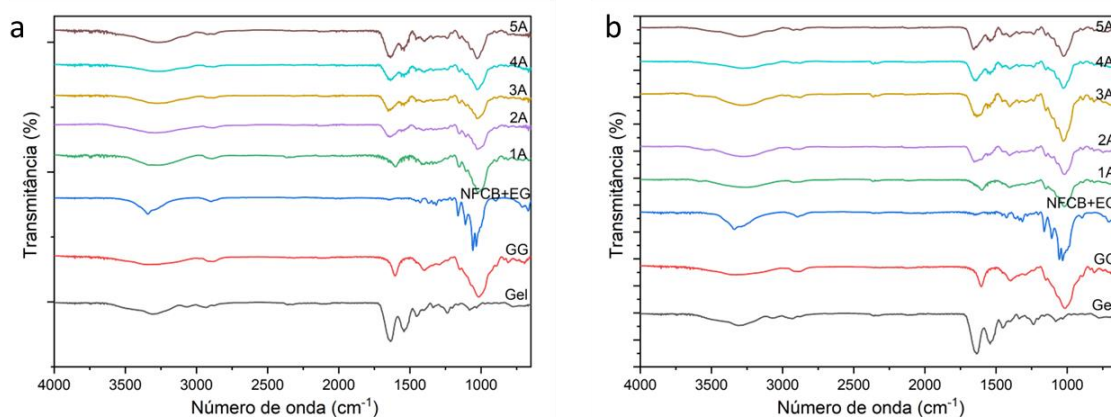


Figura 29. Espectro de ATR-FTIR das amostras de hidrogéis de NFCB/Gel/GG, sendo: **a.** Hidrogéis utilizando NFCB sem tratamento enzimático; **b.** Hidrogéis utilizando NFCB

com tratamento enzimático; onde, nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); Endoglucanase (EG); Goma Gelana (GG); (Fonte: Autoria Própria).

Ao observarmos o espectro de FTIR obtido, pode se destacar que para todas as amostras observa-se uma banda bem definida na região entre 3000 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} . Além disso, nota-se um pico na região de 1600 cm^{-1} . Segundo o estudo realizado por Grande e colaboradores (2009), o espectro de NCB apresenta picos característicos nas regiões entre 984 cm^{-1} e 1106 cm^{-1} correspondentes ao alongamento da ligação C-O atribuído principalmente aos álcoois primários; uma banda na região de 1160 cm^{-1} atribuída ao alongamento assimétrico de C-O-C; e dois picos em 1313 cm^{-1} atribuído à curvatura simétrica de CH_2 e 1426 cm^{-1} referente a curvatura assimétrica de CH_2 .

Quando avaliado o espectro da gelatina é importante denotar que a gelatina pura apresenta picos característicos na região de 3290 cm^{-1} e 2960 cm^{-1} que são referentes ao alongamento de N-H e alongamento alifático de C-H, respectivamente (ROKHADE et al., 2006). Adicionalmente, ao se referir a GG, estudos na literatura indicam que a mesma apresenta picos de estiramentos de -OH acerca de 3000 cm^{-1} e um pico em 1030 cm^{-1} referente as ligações ente C-O. Além de apresentar picos nas regiões de 1220 cm^{-1} referente ao alongamento de C-C, e entre a região de 1300 cm^{-1} a 1470 cm^{-1} referente a flexão de C-H (AGIBAYEVA ET AL., 2020).

Segundo o estudo realizado por Treesuppharat et al. (2017), no qual o autor desenvolveu um hidrogel de nanocelulose bacteriana e gelatina, para a aplicação na entrega de fármacos (*drug-delivery*), o autor cita que os espectros apresentaram picos largos nas regiões de 3400 cm^{-1} , o qual foi atribuído à vibração de estiramento de N-H e também apresentou o pico na região de 1600 cm^{-1} , que fora atribuído a região de alongamento de C=O. Entretanto, segundo autor a região de 3600 cm^{-1} a é atribuída a muitos mecanismos de reação, como exemplo a formação de ligações de Hidrogênio presente na nanocelulose bacteriana e na rede da estrutura a gelatina.

Dessa forma ao avaliarmos o espectro de FTIR dos hidrogéis obtidos, ressalta-se que não houveram modificações significativas quando comparados aos espectros de seus componentes básicos, dessa maneira torna-se necessário a utilização de outra técnica que comprove a associação dos polímeros utilizados, uma vez que os hidrogéis possuem um teor elevado de água tal associação não pode ser confirmada. Além disso, observa-se que ao compararmos a estrutura química de cada componente, os grupamentos químicos apresentados, se assemelham entres eles com poucas diferenças entre si.

4.5. Análise de Termogravimetria

Os dados obtidos a partir das análises térmicas foram expressas pela **Figura 30**. Os valores referentes a massa utilizada foram expressos em porcentagem (%), indicando a perda de massa durante o aquecimento da amostra – Termogravimetria (TG) (**FIGURA 30. a.**). Para avaliar os eventos térmicos ocorridos durante o aquecimento das amostras, a Termogravimetria Derivada (DTG) foi plotada na **Figura 30. b.**, utilizando a primeira derivada da curva de TG e relacionada a velocidade de degradação (EINHORN-STOLL et al., 2007). Os dados foram plotados utilizando a ferramenta estatística OriginPro 9.0.

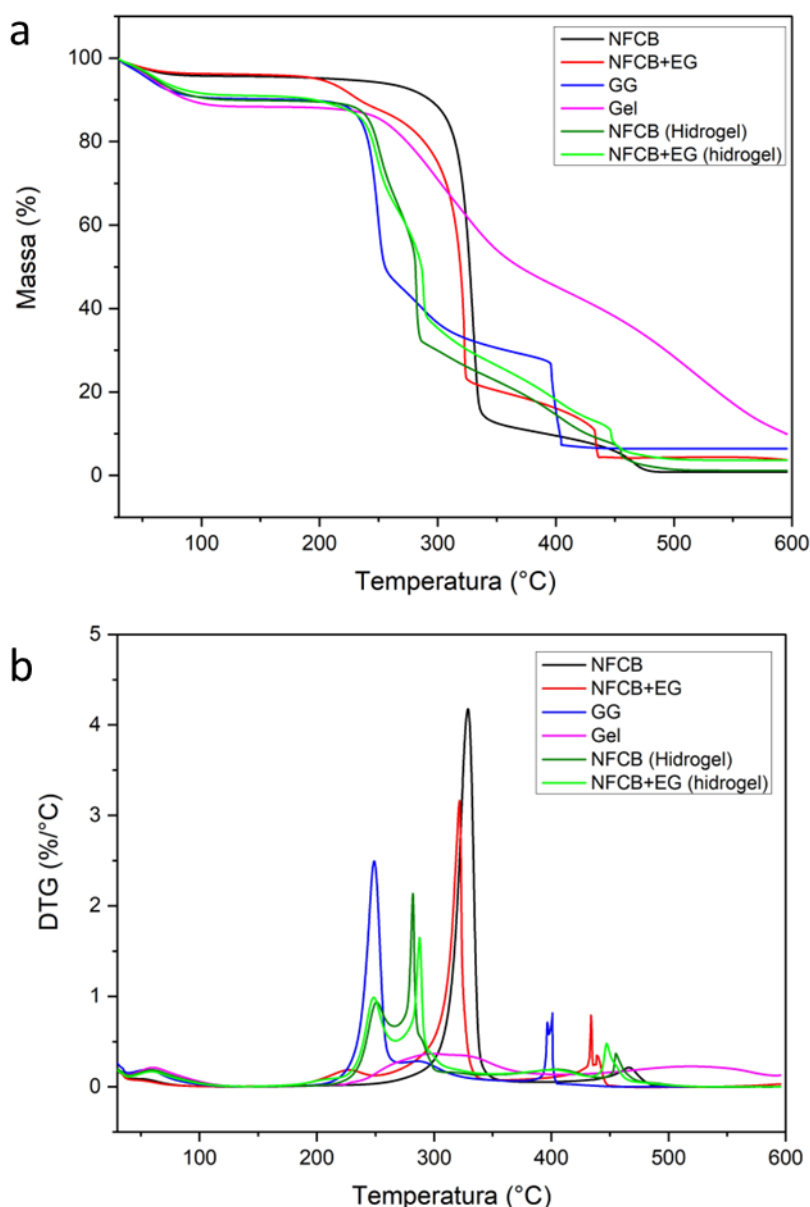


Figura 30. Gráficos dos hidrogéis de NFCB/Gel/GG, e seus respectivos controles. a. Análise de Termogravimetria (TG); B. Termogravimetria Derivada (DTG). Sendo: nanofibra de nanocelulose bacteriana (NFCB); Endoglucanase (EG); Gelatina (Gel); goma gelana (GG). (Fonte: Autoria Própria).

Inicialmente, observa-se um evento de perda de massa de 5 a 10% em torno de 30°C até 100°C devido à vaporização da umidade presente em algumas amostras. Ao avaliarmos os dados das amostras controles (**Figura 30**), podemos observar que a amostra de NFCB sem o tratamento enzimático, apresentou dois eventos de perda de massa, o primeiro iniciando à 275°C e o segundo à 450°C. Quando comparada a NFCB com o tratamento enzimático, podemos notar uma mudança em relação a temperatura de início destes eventos, sendo à 200°C o primeiro; e aproximadamente a 440°C o segundo. Como citado anteriormente, no **Capítulo 2**, materiais celulósicos apresentam eventos de degradação por volta de 300°C, decorrente do processo de despolimerização, desidratação e decomposição de unidades glicosídicas, o que resulta em elevada perda de massa, o que pode ser observado entre 300°C e 350°C. Após tal processo, ocorre a despolimerização (formação de elementos voláteis) e decomposição do material, em gases acima de 420°C (DE SALVI, et al. 2012; LIMA et al., 2015).

Além disso, nota-se que a GG também apresentou dois eventos bem destacados, em seu primeiro evento iniciando à 220°C, a GG expressa uma queda de aproximadamente de 45% de sua massa total, segundo Arun Krishna & Vishalakshi (2017), tal evento ocorre devido à decomposição da estrutura principal de polissacarídeos da GG. Em seguida, o segundo evento que ocorre por volta de 400°C, apresenta uma redução de aproximadamente 39%. Por fim, cerca de 6% da amostra permanece como matéria residual à 600°C (ARUN KRISHNA & VISHALAKSHI, 2017).

A gelatina por sua vez, apresentou uma queda gradual quando comparada às outras amostras, seu evento inicial de perda de massa começa à 220°C, combinado a um segundo evento aproximadamente iniciado à 400°C. Também, a amostra de Gel apresentou cerca de 10% de matéria residual à 600°C. Segundo estudos da literatura, o estágio de degradação da gelatina nas faixas de 200°C-470°C e 470 °C-700°C, são referentes à degradação de proteínas e decomposição térmica das ligações (*networks*) presentes na estrutura da gelatina (BARRETOS, PIRES, SOLDI, 2002; MISHRA, MAJEED, BANTHIA, 2011; KUZEMA, et al., 2015). Além disso, denota-se que a temperatura estimada para a degradação total da gelatina se situa próximo de 850°C, o que justifica a presença de cerca de 10% de resíduo final à temperatura de 600°C (KUZEMA, et al., 2015).

Os dados obtidos dos hidrogéis de NFCB/Gel/GG, apresentaram três eventos de perda de massa (**Figura 30. a.**), quando analisado o hidrogel sem o tratamento enzimático [NFCB+EG], o primeiro evento inicia-se por volta de 200°C (perdendo 30% de massa),

seguido por um evento de maior intensidade à 280°C, no qual perde 20% de massa, como pode ser observado pela **Figura 30. b**. Além disso, o mesmo hidrogel apresentou um último evento a cerca de 450°C, finalizando com cerca de 1% de resíduo. Em comparação, o hidrogel com o tratamento enzimático [NFCB+EG], apresentou eventos de degradação com algumas alterações quando relacionadas ao hidrogel sem o tratamento enzimático. Por sua vez, o hidrogel com tratamento enzimático exibiu um perfil semelhante ao hidrogel (NFCB), contudo seu evento inicial de degradação de massa foi em torno de 180°C com aproximadamente perda de 20% de massa, apresentando o segundo evento à 270°C com 30% de redução de massa, e o último evento à 430°C, resultando a 3% de resíduo a 600°C.

Quando comparado as matérias primas ao hidrogel, observa-se que após a adição da gelatina e da goma gelana há uma redução da temperatura de degradação do material, provavelmente relacionada a decomposição da cadeia polissacarídica da goma gelana (220°C). Dessa maneira, os resultados obtidos mostram que houve a interação dos componentes das matérias primas de maneira que os mesmos se associassem de maneira efetiva, o que corrobora com os dados obtidos anteriormente. Contudo, embora a redução da estabilidade térmica das NFCB, o material obtido ainda possui uma estabilidade térmica até a temperatura de 200°C, o que ainda se considera desejável para a atual etapa do trabalho, uma vez que o material será disposto a temperaturas de cultivo celular de 37°C. Por fim, conclui-se nesta etapa do trabalho a obtenção de um material resistente a temperatura de 200°C, de possível aplicação a temperaturas de cultivo celular.

4.6. Bioimpressão

Para o processo de Bioimpressão fora realizado a impressão de um *scaffold* como corpo de prova utilizado para verificação de estruturação 3D, no qual indicou que o hidrogel selecionado foi adequado a bioimpressão sendo aplicável a ensaios celulares.

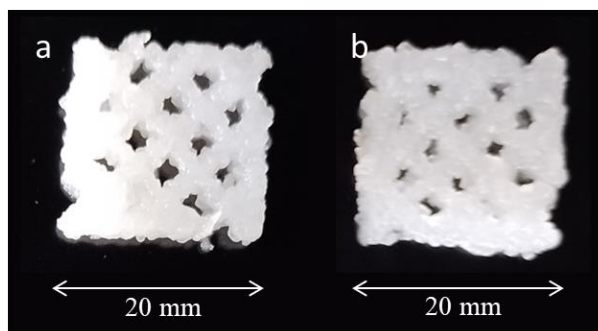


Figura 31. Scaffolds bioimpressos 20 mm x 20 mm X 15 mm de NFCB/Gel/GG. a. NFCB; b. NFCB+EG. Fonte: Aatoria própria.

Segundo estudos na literatura a aquisição da geometria externa de construções de tecido é crítico para representar com precisão formas anatomicamente corretas uma vez que tal constructo possui a capacidade de mimetizar o microambiente celular, dessa forma, torna-se necessário uma reprodução confiável do mesmo (OZBOLAT & GUDAPATI, 2016). Outro ponto importante para a impressão 3D, se relaciona a arquitetura interna, que demanda de canais internos e poros interconectados que permitam a fixação e proliferação celular, além de permitir o fluxo de nutrientes e regeneração tecidual (OZBOLAT et al., 2012)

Dessa forma, a impressão do *scaffold* (**Figura 31.**) utilizando tanto as NFCB com e sem o tratamento enzimático foram consideradas promissoras para a aplicação na área de medicina regenerativa, apresentando uma estruturação e porosidade adequada para cultivos celulares

4.7. Ensaio de Citotoxicidade

Conforme apresentado na **Figura 32** abaixo, pode-se constatar que nenhum dos materiais demonstraram efeito tóxico para as células, com a manutenção da viabilidade celular acima de 70%. De acordo com a ISO 10993-5, a viabilidade celular deve ser superior a 70% para que os materiais/dispositivos médicos testados sejam considerados atóxicos e seguros.

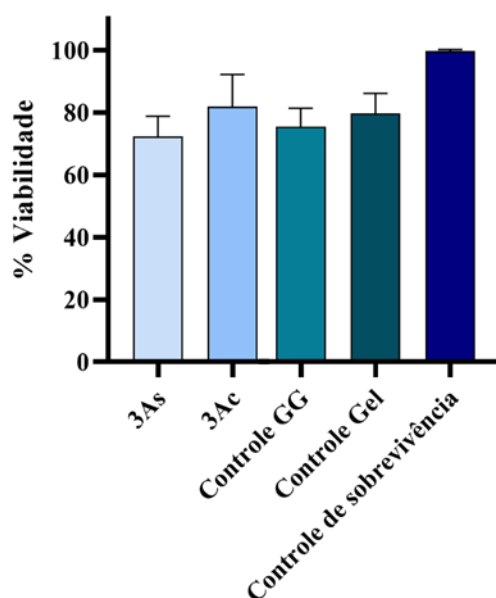


Figura 32. Avaliação da citotoxicidade dos scaffolds de goma gelana e gelatina reticulados com cloreto de alumínio em células L929. A viabilidade celular (%) foi determinada pelo ensaio colorimétrico utilizando MTT.

Segundos dados encontrados na literatura, estudo utilizando a associação polimérica da NCB com gelatina, indicaram que a proliferação celular em um microambiente tumoral é contínua e robusta, na qual a taxa de desenvolvimento celular permanece contínua (Wang et al., 2018). Outro ponto importante, é que a rugosidade presente no scaffold auxilia no desenvolvimento e fixação celular, e associado a porosidade do mesmo se torna um fator chave para o desenvolvimento tecidual após a semeadura das células (SHAHOO et al., 2005).

Dessa maneira, pode-se concluir que os *scaffolds* provenientes da bioimpressão dos hidrogéis de NFCB/Gel/GG não apresentaram citotoxicidade frente a linhagem celular L929, sendo considerado um potencial alternativo para aplicação na área de medicina regenerativa.

5. CONCLUSÃO– CAPÍTULO 3

Conclui-se que houve a obtenção de hidrogéis potencialmente aplicáveis a bioimpressão 3D e a medicina regenerativa. O qual pode-se observar que houve miscibilidade das matérias primas utilizadas, obtendo um hidrogel homogêneo. Além disso, o hidrogel obtido demonstrou-se termicamente estável até temperaturas de 200°C, além de possuir um comportamento de viscosidade desejável à extrusão do processo de bioimpressão 3D. Por fim, os hidrogéis obtidos não apresentaram citotoxicidade, sendo promissores a aplicação na área de medicina regenerativa.

6. CONCLUSÃO FINAL

Conclui-se a partir do atual trabalho, que os hidrogéis baseados em NCB são altamente promissores para a área de pesquisa em medicina regenerativa, e que a utilização de associações biopoliméricas ainda está em desenvolvimento no cenário nacional, contudo quando comparadas a nível mundial, já se denota um grande investimento em tal área. Além disso a utilização de NFCB pode se tornar uma alternativa de grande valor agregado sendo considerado um nanomaterial que possibilita a obtenção de hidrogéis macios que atuam como reforço para diversas aplicações. Dessa forma, o desenvolvimento do hidrogel proposto pode ser considerado uma possível alternativa para futuramente ser aplicado na área de regeneração tecidual, o qual foi considerado termicamente resistente, não citotóxico, reologicamente adequado, possibilitando a bioimpressão de *scaffolds* de elevada resolução e reprodutibilidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIBAYEVA, L. E., KALDYBEKOV, D. B., PORFIRYEVA, N. N., GARIPOVA, V. R., MANGAZBAYEVA, R. A., MOUSTAFINE, R. I., ..., KHUTORYANSKIY, V. V. Gellan gum and its methacrylated derivatives as in situ gelling mucoadhesive formulations of pilocarpine: In vitro and in vivo studies. **International journal of pharmaceutics**, 577, 119093, 2020.

AKIRA, M.; LUIS, D. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, 2018.

ARAKI, J. Electrostatic or steric? Preparations and characterizations of well-dispersed systems containing rod-like nanowhiskers of crystalline polysaccharides. **Soft Matter** 9:4125–4141, 2013.

ARUN KRISHNA, K., VISHALAKSHI, B. Gellan gum-based novel composite hydrogel: Evaluation as adsorbent for cationic dyes. **Journal of Applied Polymer Science**, 134(47), 45527, 2017.

BARRETO, P. L. M., PIRES, A. T. N., SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Polymer Degradation and Stability**, 79(1), 147-152, 2003.

BERTO, G. L.; MATTOS, B. D.; ROJAS, O. J.; ARANTES, V. Single-step fiber pretreatment with monocomponent endoglucanase: defibrillation energy and cellulose nanofibril quality. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, 9(5), 2260-2270, 2021.

CAI, X.-J.; XU, Y.-Y. Nanomaterials in controlled drug release. **Cytotechnology**, v. 63, n. 4, p. 319–323, 2011.

CHANDRASEKARAN, R., PUIGJANER, L. C., JOYCE, K. L., ARNOTT, S. Cation interactions in gellan: an X-ray study of the potassium salt. **Carbohydrate Research**, 181, 23-40, 1988.

CHAPEKAR, M. S. Tissue engineering: Challenges and opportunities. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 53, n. 6, p. 617–620, 2000.

DÁVILA, J. L.; D'ÁVILA, M. A. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 101, n. 1-4, p. 675-686, 2019.

DE SALVI, D. T., BARUD, H. S., CAIUT, J. M. A., MESSADDEQ, Y., & RIBEIRO, S. J. Self-supported bacterial cellulose/boehmite organic–inorganic hybrid films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, 63(2), 211-218, 2012.

EINHORN-STOLL, U.; KUNZEK, H.; DONGOWSKI, G. Thermal analysis of chemically and mechanically modified pectins. **Food Hydrocolloids**, v. 21, n. 7, p. 1101-1112, 2007.

ELNASHAR, M. *Biopolymers*, Edited by Assoc. Prof. Dr. Magdy M. Elnashar; ISBN 978-953-307-109-1. Editor: Professor Dr. Magdy M. Elnashar, publicado por Sciyo Inc. 2010

GELINSKY, M. Biopolymer hydrogel bioinks. In *3D Bioprinting for Reconstructive Surgery* (pp. 125-136). **Woodhead Publishing**, 2018.

GIAVASIS, I., HARVEY, L. M., McNeil, B. Gellan gum. **Critical reviews in biotechnology**, 20(3), 177-211, 2000.

GOPINATHAN, J.; NOH, I. Recent trends in bioinks for 3D printing. **Biomaterialsresearch**, v. 22, n. 1, p. 11, 2018.

GRANDE, C. J., TORRES, F. G., GOMEZ, C. M., TRONCOSO, O. P., CANET-FERRER, J., & MARTÍNEZ-PASTOR, J. Development of self-assembled bacterial cellulose–starch nanocomposites. **Materials Science and Engineering: C**, 29(4), 1098-1104, 2009.

GROLL, J., BURDICK, J. A., CHO, D. W., DERBY, B., GELINSKY, M., HEILSHORN, S. C., ..., WOODFIELD, T. B. F. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. **Biofabrication**, 11(1), 013001, 2018.

HASSAN, M. L.; FADEL, S. M.; EL-WAKIL, N. A.; OKSMAN, K. Chitosan/rice straw nanofibers nanocomposites: Preparation, mechanical, and dynamic thermomechanical properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. SUPPL. 2, p. E216–E222, 2012.

HOLMES, T. C. Novel peptide-based biomaterial scaffolds for tissue engineering. **Trends in biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 16-21, 2002.

HOSAKUN, Y., HALÁSZ, K., HORVÁTH, M., CSÓKA, L., DJOKOVIĆ, V. ATR-FTIR study of the interaction of CO₂ with bacterial cellulose-based membranes. *Chemical Engineering Journal*, 324, 83-92, 2017.

HUANG, JIEYU; ZHAO, MIN; CAI, YIBING; ZIMNIEWSKA, MALGORZATA; LI, DAWEI; WEI, QUFU. A Dual-Mode Wearable Sensor Based on Bacterial Cellulose Reinforced Hydrogels for Highly Sensitive Strain/Pressure Sensing. **Advanced Electronic Materials**, (2019), 1900934–. doi:10.1002/aelm.201900934

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, "Biological evaluation of medical devices". Part 12: Sample preparation and reference materials, 4 ed, ISO 10993-12, 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, "Biological evaluation of medical devices". Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods", 3st ed, ISO 10993-5, 2009.

JI, S.; GUVENDIREN, M. Recent Advances in Bioink Design for 3D Bioprinting of Tissues and Organs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. April, p. 1–8, 2017.

JOHN, N. R. Uses of gelatin in edible products. In A. G. Ward, & A. Courts (Eds.), The science and technology of gelatin, pp. 365. New York: **Academic Press Inc.** 1977.

JOHNSTON-BANKS, F. A. "Gelatin: Food Gels", p. 233-289, 1990.

KESTI, M.; EBERHARDT, C.; PAGLICCIA, G.; et al. Bioprinting Complex Cartilaginous Structures with Clinically Compliant Biomaterials. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 48, p. 7406–7417, 2015.

KHORASANI, A. C.; SHOJAOSADATI, S. A. Bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposites as prebiotics against drying and gastrointestinal condition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 9–18, 2016.

KOMMAREDDY, Sushma; SHENOY, Dinesh B.; AMIJI, Mansoor M. Gelatin nanoparticles and their biofunctionalization. **Nanotechnologies for the life sciences: Online**, 2007.

KUMAR, S. S. Biopolymers in Medical Applications. **TechnicalTextile.Net**. 2013.

KUZEMA, P. O., STAVINSKAYA, O. N., LAGUTA, I. V., KAZAKOVA, O. A. Thermogravimetric study of water affinity of gelatin materials. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 122(3), 1231-1237, 2015.

LEDWARD, D. A. Gelatin. **Handbook of hydrocolloids**, p. 67-86, 2000.

LIMA, L. R., SANTOS, D. B., SANTOS, M. V., BARUD, H. S., HENRIQUE, M. A., PASQUINI, D., ... RIBEIRO, S. J. Nanocristais de celulose a partir de celulose bacteriana. **Química Nova**, 38, 1140-1147, 2015.

MALDA, J., VISSER, J., MELCHELS, F. P., J'UNGST, T., HENNINK, W. E., DHERT, W. J., GROLL, J., HUTMACHER, D. W. 25th anniversary article: engineering hydrogels for biofabrication. **Adv Mater** 25(36):5011, 2013

MATHEW, A. P.; THIELEMANS, W.; DUFRESNE, A. Mechanical Properties of Nanocomposites from Sorbitol Plasticized Starch and Tunicin Whiskers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 109, p. 4065–4074, 2008.

MELCHELS, F. P., DHERT, W. J., HUTMACHER, D. W., MALDA, J. Development and characterisation of a new bioink for additive tissue manufacturing. **Journal of Materials Chemistry B**, 2(16), 2282-2289, 2014.

MISHRA, R. K., MAJEED, A. B. A., BANTHIA, A. K. Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *International Journal of Plastics Technology*, 15(1), 82-95, 2011.

MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Extracting conditions for megrim (*Lepidorhombus bosci*) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. *Journal of Food Science*, 65(3), 434-438, 2000.

MORRIS, E. R., NISHINARI, K., RINAUDO, M. Gelation of gellan—a review. **Food Hydrocolloids**, 28(2), 373-411, 2012.

MORRISON, F. A. Understanding rheology. **Topics in Chemical Engineering**, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 16, p. 55-63, 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MOUSER, V. H. M.; MELCHELS, F. P. W.; VISSER, J.; et al. Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. **Biofabrication**, v. 8, n. 3, p. 035003, 2016.

MURR, L. E. Frontiers of 3D printing/additive manufacturing: from human organs to aircraft fabrication. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 32, n. 10, p. 987-995, 2016.

NG, K. W.; KHOR, H. L.; HUTMACHER, D. W. In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts. **Biomaterials**, v. 25, n. 14, p. 2807–2818, 2004.

NOOR, I. S. M., MAJID, S. R., AROF, A. K., DJURADO, D., NETO, S. C., PAWLICKA, A. Characteristics of gellan gum–LiCF₃SO₃ polymer electrolytes. *Solid State Ionics*, 225, 649-653, 2012.

OZBOLAT, IBRAHIM T.; KHODA, A.K.M.B.; MARCHANY, MICHELLE; GARDELLA, JOSEPH A.; KOC, BAHATTIN. Hybrid tissue scaffolds for controlled

release applications. **Virtual and Physical Prototyping**, 7(1), 37–47, 2012. doi:10.1080/17452759.2012.668700

OZBOLAT, I.; GUDAPATI, H. A review on design for bioprinting. *Bioprinting*, 3-4, 1–14, 2016. doi:10.1016/j.bprint.2016.11.001

OGAWA, E., TAKAHASHI, R., YAJIMA, H., NISHINARI, K. Effects of molar mass on the coil to helix transition of sodium-type gellan gums in aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, 20(2-3), 378-385, 2006.

OSTWALD, W. ET AL. Colloids and their viscosity. *Transactions of the Faraday Society*, v. 91, n. 2264, p. 69, 1913.

PARK, M.; LEE, D.; HYUN, J. Nanocellulose-alginate hydrogel for cell encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 223–228, 2015.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Ionotropic Gelation and Polyelectrolyte Complexation: The Novel Techniques to Design Hydrogel Particulate Sustained, Modulated Drug Delivery System: a review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010

PICONE, C. S. F. Influência da conformação da gelatina sobre a gelificação das proteínas do leite. 2008. 141f (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008.

ROKHADE, A. P., AGNIHOTRI, S. A., PATIL, S. A., MALLIKARJUNA, N. N., KULKARNI, P. V., AMINABHAVI, T. M. (2006). Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. *Carbohydrate polymers*, 65(3), 243-252, 2006.

SEHAQUI, H.; ZHOU, Q.; BERGLUND, L. A. Nanostructured biocomposites of high toughness—a wood cellulose nanofiber network in ductile hydroxyethylcellulose matrix. **Soft Matter**, v. 7, n. 16, p. 7342–7350, 2011.

SHALINI, R.; SINGH, A. Biobased Packaging Materials for the Food Industry. *J. Food Sci. & Technol. Nepal*, v. 5, p. 16-20, 2009.

SHI, L. B.; CAI, H. X.; CHEN, L. K.; WU, Y.; ZHU, S. A.; GONG, X. N.; XIA, Y. X.; OUYANG, H. W.; ZOU, X. H. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency. **Biomaterials**, v. 35, n. 5, p. 1519–1530, 2014.

SAHOO, S.K.; PANDA, A.K.; LABHASETWAR, V. Characterization of porous PLGA/PLA microparticles as a scaffold for three-dimensional growth of breast cancer cells. **Biomacromolecules** 2005, 6, 1132–1139.

TREESUPPHARAT, W., ROJANAPANTHU, P., SIANGSANOH, C., MANUSPIYA, H., & UMMARTYOTIN, S. Synthesis and characterization of bacterial cellulose and gelatin-based hydrogel composites for drug-delivery systems. **Biotechnology reports**, 15, 84-91, 2017.

WANG, Q.; SUN, J.; YAO, Q.; JI, C.; LIU, J.; ZHU, Q. 3D printing with cellulose materials. **Cellulose**, v. 25, n. 8, p. 4275-4301, 2018.

WEN, CAI; LU, LINGLING; LI, XINSONG. An interpenetrating network biohydrogel of gelatin and gellan gum by using a combination of enzymatic and ionic crosslinking approaches. **Polymer International**, 63(9), 1643–1649. 2014. doi:10.1002/pi.4683

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

YUGUCHI, Y., MIMURA, M., KITAMURA, S., URAKAWA, H., AND KAJIWARA, K. 1993. Structural characteristics of gellan in aqueous solutions. **Food Hydrocoll.**, 7: 373-385.

YU, F., ZHANG, F., LUAN, T., ZHANG, Z., ZHANG, H. Rheological studies of hyaluronan solutions based on the scaling law and constitutive models. **Polymer**, 55, 295–301, 2014.

ZHANG, W., LIAN, Q., LI, D., WANG, K., HAO, D., BIAN, W., ..., JIN, Z. Cartilage repair and subchondral bone migration using 3d printing osteochondral composites: A one-year-period study in rabbit trochlea. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ZHENG, Y., LIANG, Y., ZHANG, D., SUN, X., LIANG, L., LI, J., & LIU, Y. N. Gelatin-based hydrogels blended with gellan as an injectable wound dressing. **ACS omega**, 3(5), 4766-4775, 2018.