

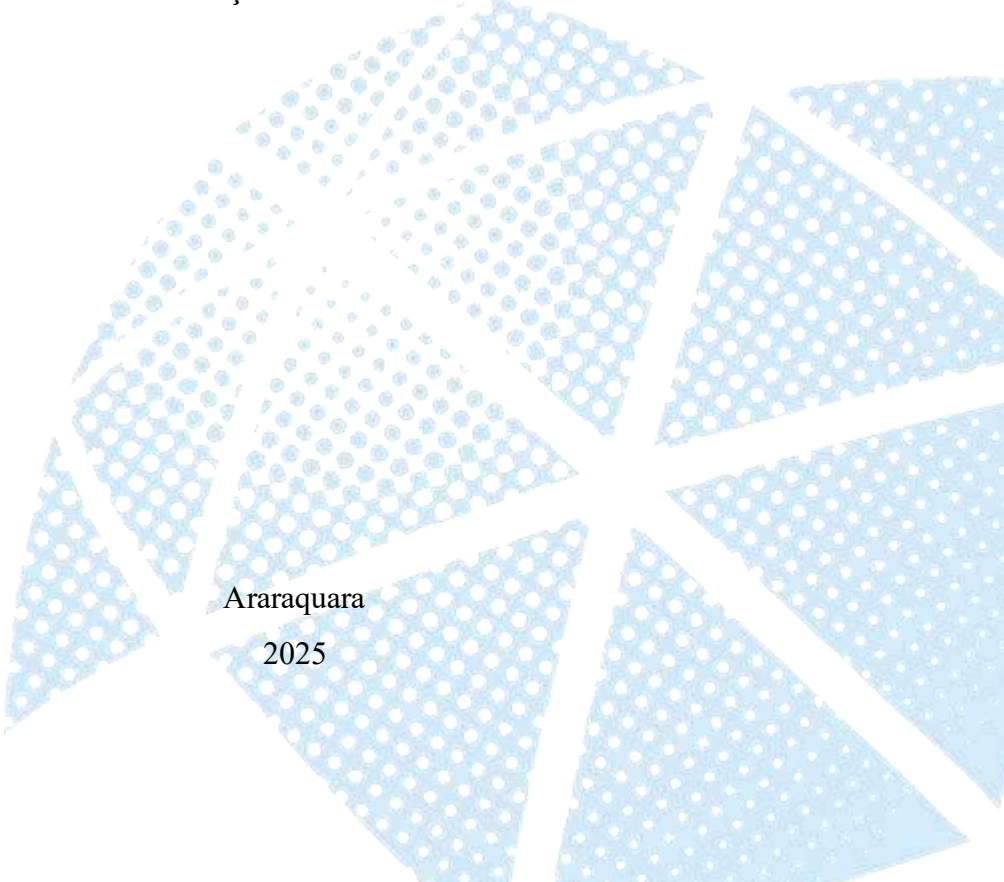
**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**Instituto de Química - Câmpus de Araraquara**

**LUYGUI GASPARDOSILVA**

**HIDROGÉIS DE BIOPOLÍMEROS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE  
FÁRMACOS E APLICAÇÕES EM IMPRESSÃO 3D**

Araraquara

2025



**LUYGUI GASPARDO SILVA**

**HIDROGÉIS DE BIOPOLÍMEROS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE  
FÁRMACOS E APLICAÇÕES EM IMPRESSÃO 3D**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Instituto de Química, Araraquara, para  
obtenção do título de Bacharel em Engenharia  
Química.

Orientador: Prof. Dr. Elias Paiva Ferreira Neto  
Coorientador: Prof. Dr. Hernane da Silva  
Barud

Araraquara

2025

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| S586h | <p>Silva, Luygui Gaspardo</p> <p>Hidrogéis de biopolímeros para liberação controlada de fármacos e aplicações em impressão 3D / Luygui Gaspardo Silva. -- Araraquara, 2025</p> <p>112 f. : il.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara</p> <p>Orientador: Elias Paiva Ferreira Neto</p> <p>1. Impressão 3D. 2. Materiais biocompatíveis. 3. Fármacos. 4. Materiais biomédicos. 5. Colóides. I. Título.</p> |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**LUYGUI GASPARDO SILVA**

**HIDROGÉIS DE BIOPOLÍMEROS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE  
FÁRMACOS E APLICAÇÕES EM IMPRESSÃO 3D**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Estadual Paulista (UNESP) Instituto de  
Química, Araraquara, para obtenção do título de  
Bacharel em Engenharia Química

Data da defesa: 04/07/2025

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **ELIAS PAIVA FERREIRA NETO**  
Data: 08/07/2025 12:53:50-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Elias Paiva Ferreira Neto

Documento assinado digitalmente  
 **MARINA DE LIMA FONTES**  
Data: 08/07/2025 15:24:45-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dra. Marina de Lima Fontes

Documento assinado digitalmente  
 **MAURICIO CAVICCHIOLI**  
Data: 08/07/2025 15:06:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Maurício Cavicchioli

Dedico este trabalho a todos aqueles que algum dia tiveram a força, a dedicação e persistência de nunca desistirem de seus sonhos. Em especial, dedico ao meu pai, Luis Carlos Silva, e à minha mãe, Fabiana Bardela Gaspardo, que, com dedicação e amor, me proporcionaram chegar tão longe e conquistar o marco de ser o primeiro filho a me formar em uma Universidade Pública. À minha irmã, Nadya Gaspardo Silva, e ao meu irmão, Derek Gaspardo Silva, por sempre acreditarem em mim e por me oferecerem todo seu amor. À minha companheira, Kelle Jarcy Azevedo Villela, que foi minha fortaleza, oferecendo apoio incondicional e conselhos que me tornaram uma pessoa melhor a cada dia. Aos meus amigos e à República Sueca, que terão um lugar eterno em meu coração.

## **AGRADECIMENTOS**

Expresso minha mais profunda gratidão aos meus orientadores, Prof. Dr. Sidney José Lima Ribeiro, Prof. Dr. Hernane da Silva Barud, e Dr. Gilberto Siqueira, que, além de mentores, tornaram-se verdadeiros amigos e figuras paternas na jornada científica. Com eles, aprendi a enxergar o mundo sob novas perspectivas e compreendi que a ciência brasileira, mesmo diante de desafios, é resiliente, essencial e de altíssima qualidade.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo imprescindível apoio financeiro, concedido por meio dos Processos nº 2021/09352-3 e nº 2023/11382-3, que possibilitou a realização deste trabalho e o avanço da ciência no Brasil.

“A ciência não é apenas compatível com a espiritualidade; é uma profunda fonte de espiritualidade. Quando reconhecemos nosso lugar em uma imensidão de anos-luz e no fluxo do tempo, quando compreendemos a complexidade, a beleza e a sutileza da vida, então esse sentimento de elevação e humildade é, na verdade, espiritual. [...] A ciência é não apenas destruidora de ilusões; ela também pode inspirar um profundo respeito, até reverência, diante do universo.”

(SAGAN, 1997, p. 34)

## RESUMO

Os hidrogéis são materiais promissores para aplicações biomédicas, devido à sua biocompatibilidade e capacidade de incorporação de fármacos. Neste trabalho, foram desenvolvidos hidrogéis à base de nanocristais de celulose bacteriana (BCNC), fibroína de seda (FB), goma gelana (GG) e nanopartículas magnéticas (NPM), com o objetivo de avaliar suas propriedades físico-químicas, estruturais e biológicas. A síntese dos BCNC foi realizada por hidrólise ácida da celulose bacteriana, e os hidrogéis foram formulados com diferentes composições para otimizar suas propriedades. A caracterização dos materiais foi realizada por diversas técnicas. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) confirmou que os BCNC possuem morfologia de whiskers, com comprimento médio de 183 nm e espessura média de 23 nm. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) demonstrou a adesão das NPM às superfícies dos hidrogéis, enquanto a Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-ATR) confirmou a presença e interação dos precursores na matriz polimérica. A Análise Termogravimétrica (TGA) indicou que os hidrogéis possuem resistência térmica superior a 240°C, sendo adequados para aplicações biomédicas. Os ensaios reológicos mostraram que os hidrogéis possuem comportamento pseudoplástico, com tensão de escoamento em torno de 400 Pa e módulo elástico ( $G'$ ) superior ao módulo viscoso ( $G''$ ), demonstrando sua adequação para impressão 3D. Os testes de liberação controlada do fármaco diclofenaco de sódio indicaram que o modelo de Korsmeyer-Peppas foi o que melhor descreveu a cinética de liberação, caracterizando um mecanismo pseudo-Fickiano. Além disso, os ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade demonstraram que os hidrogéis são atóxicos. Os resultados obtidos evidenciam o elevado potencial dos hidrogéis desenvolvidos para aplicações biomédicas. A partir da utilização da impressão 3D, foi possível fabricar estruturas funcionalizadas para a liberação controlada de fármacos, com perspectivas promissoras de aplicação em curativos avançados e scaffolds para engenharia tecidual, delineando novas possibilidades de pesquisa e inovação no campo da engenharia de biomateriais.

**Palavras-chave:** Impressão 3D; materiais biocompatíveis; fármacos; materiais biomédicos

## ABSTRACT

Hydrogels are promising materials for biomedical applications due to their biocompatibility and ability to incorporate drugs. In this study, hydrogels based on bacterial cellulose nanocrystals (BCNC), silk fibroin (FB), gellan gum (GG), and magnetic nanoparticles (NPM) were developed with the aim of evaluating their physicochemical, structural, and biological properties. The BCNCs were synthesized by acid hydrolysis of bacterial cellulose, and the hydrogels were formulated with different compositions to optimize their properties. The materials were characterized using various techniques. Transmission Electron Microscopy (TEM) confirmed that the BCNCs exhibit a whisker-like morphology, with an average length of 183 nm and an average thickness of 23 nm. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed the adhesion of NPMs to the surfaces of the hydrogels, while Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR-ATR) confirmed the presence and interaction of the precursors within the polymeric matrix. Thermogravimetric Analysis (TGA) indicated that the hydrogels exhibit thermal stability above 240°C, making them suitable for biomedical applications. Rheological tests showed that the hydrogels exhibit pseudoplastic behavior, with a yield stress of around 400 Pa and an elastic modulus ( $G'$ ) higher than the viscous modulus ( $G''$ ), demonstrating their suitability for 3D printing. The controlled drug release tests using sodium diclofenac indicated that the Korsmeyer-Peppas model best described the release kinetics, characterizing a pseudo-Fickian mechanism. Furthermore, cytotoxicity and mutagenicity assays demonstrated that the hydrogels did not show toxic effects, confirming their biocompatibility. The results obtained highlight the high potential of the developed hydrogels for biomedical applications. Through the use of 3D printing, it was possible to fabricate functionalized structures for controlled drug delivery, with promising prospects for application in advanced wound dressings and scaffolds for tissue engineering, outlining new opportunities for research and innovation in the field of biomaterials engineering.

**Keywords:** hydrogels; 3D printing; biocompatibility, drug release, biomedical

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) evidenciando a morfologia típica dos CNCs obtidos por hidrólise ácida. Observa-se uma distribuição aleatória dos cristais, com regiões de sobreposição, característica comum a amostras secas sobre a grade. A morfologia alongada, com aspecto de bastonetes, é compatível com a estrutura altamente cristalina dos CNCs e condiz com o padrão observado em materiais obtidos a partir da degradação seletiva das regiões amorfas da celulose..... | 22 |
| <b>Figura 2:</b> Bicho da seda domesticado; casulos com FB e a sericina. Estruturas secundárias da FB da seda: $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 23 |
| <b>Figura 3:</b> Estrutura do monômero de GG .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 26 |
| <b>Figura 4:</b> Mudanças na conformação nas cadeias da GG durante a gelificação.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 26 |
| <b>Figura 5:</b> Solução de BCNC extraídas usando folhas de celulose bacteriana secas .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 50 |
| <b>Figura 6:</b> Solução de BCNC extraídas usando folhas de celulose bacteriana úmidas .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 50 |
| <b>Figura 7:</b> Birefringencia de uma solução de BCNC 3%(m/V), observadas usando dois polarizadores.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 51 |
| <b>Figura 8:</b> Microscopia Eletrônica de Transmissão dos BCNC.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 52 |
| <b>Figura 9:</b> Microscopia de força atômica (AFM) dos BCNC .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 52 |
| <b>Figura 10:</b> Histograma de distribuição de tamanho e largura dos BCNC .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 52 |
| <b>Figura 11:</b> Dialise dos BCNC.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 55 |
| <b>Figura 12:</b> FTIR-ATR do hidrogel FB/GG/CNC. O hidrogel tinha a composição de 11% de CNC, 0,5% de GG e 0,5% de FB. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 56 |
| <b>Figura 13:</b> Reograma apresentando a viscosidade (Pa.s) em função da taxa de cisalhamento (1/s). Curvas de viscosidade dos hidrogéis. Amostra 1 (6%CNC, 1%FB, 0,75%GG e 92,25% água), Amostra 2 (7%CNC, 1%FB, 0,75%GG e 91,25% água), Amostra 4 (10%CNC, 0,5%FB, 0,5%GG e 89% água), Amostra 6 (10%CNC, 1%FB, 1%GG e 88% água) e Amostra 7 (11%CNC, 0,5%FB, 0,5%GG e 88% água) .....                                                                                                                        | 58 |
| <b>Figura 14.</b> Mudanças no módulo elástico (G') e no módulo viscoso (G'') em função da tensão de cisalhamento para as amostras de hidrogel. A. Variação da concentração de CNC (6 a 8%), mantendo as outras composições constantes (1%FB e 0,75%GG). B. Variação na concentração de FB (0,5 a 1%), mantendo as outras composições constantes (10% CNC e 0,5% GG). C. Variação na concentração de GG ( 0,5 A 1%), mantendo as outras composições constantes (10% CNC e 1% FB). ....                            | 59 |
| <b>Figura 15:</b> Estruturas impressas usando a amostra 7 (11% CNC, 0.5% FB, 0.5% GG e 88% H2O).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 61 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 16:</b> Microscopia Eletrônica de Varredura, hidrogel 11%CNC, 0.5% GG, 0.5%FB e 88% água, pós impressão 3D .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 62 |
| <b>Figura 17:</b> Microscopia Óptica do hidrogel 11%CNC, 0.5% GG, 0.5%FB e 88% água, pós impressão 3D .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 62 |
| <b>Figura 18:</b> Histograma da distribuição de comprimento de filamento e tamanho de poros na análise de Microscopia Óptica (amostras não liofilizadas), após impressão 3D. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 63 |
| <b>Figura 19:</b> Histograma da distribuição de comprimento de filamento e tamanho de poros na análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (amostras liofilizadas), após impressão 3D. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 64 |
| <b>Figura 20:</b> Reograma apresentando Viscosidade ( $\eta$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\gamma$ ). Curvas de viscosidade referente aos hidrogéis. Amostras 8(2,5%GG, 3% DS e 94,5%água), 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), amostra 10 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água ), amostra 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água), amostra 12 (2,5%GG,3,3%NPM, 3% DS e 91,2% água), amostra 13 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM e 87,6%) e amostra 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3,3%DS e 84,6% água) ..... | 67 |
| <b>Figura 21:</b> Mudanças no módulo elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) em função da frequência para as amostras 8(2,5%GG, 3% DS e 94,5%água), 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), amostra 10 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água ), 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água), 12 (2,5%GG,3,3%NPM, 3% DS e 91,2% água), 13 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM e 87,6%) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3,3%DS e 84,6% água) .....                                                                                    | 68 |
| <b>Figura 22:</b> Curva de Calibração do DS.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 69 |
| <b>Figura 23:</b> Modelo de Ordem zero aplicado para os valores de concentração acumulada de fármaco liberado das amostras 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC,3 %DS e 87,9% água) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3% DS e 84,6% água) .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 70 |
| <b>Figura 24:</b> Modelo de Primeira ordem aplicado para os valores de concentração acumulada de fármaco liberado das amostras 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC,3 %DS e 87,9% água) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3% DS e 84,6% água) .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 71 |
| <b>Figura 25:</b> Modelo de Higuchi aplicado para os valores de concentração acumulada de fármaco liberado das amostras 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3% DS e 84,6% água) .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 72 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 26:</b> Modelo de Korsmeyer - Peppas aplicado para os valores de concentração acumulada de fármaco liberado das amostras 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3% DS e 84,6% água) .....                                                                                                                                                                                       | 73 |
| <b>Figura 27:</b> Análise Termogravimétrica e DTG. NPM. (A); BCNC. (B); GG. (C); FB.(D); DS. (E) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 76 |
| <b>Figura 28:</b> Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG) das amostras 8 ((2,5%GG, 3%DS e 94,5%água) (A), 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC e 3% DS) (B), 10(2,5%GG, 3,3%FB e 3% DS) (C) e 11 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC e 3% DS) (D).....                                                                                                                                                                                                                                   | 78 |
| <b>Figura 29:</b> Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG) das amostras 12 ((2,5%GG,3,3%NPM e 3% DS) (A), 13 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM) (B) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM e 3,3%DS) (C).....                                                                                                                                                                                                                                              | 78 |
| <b>Figura 30:</b> FTIR-ATR dos hidrogéis de FB/BCNC/GG/NPM/DS. <b>Amostra 8.</b> 2,5% GG/ 3% DS; <b>Amostra 9.</b> 2,5% GG/3% DS/3,3% BCNC; <b>Amostra 10;</b> 2,5% GG/3% DS/3,3% FB; <b>Amostra 11.</b> 2,5% GG/3% DS/3,3% BCNC/3,3% FB. <b>Amostra 12.</b> 2,5% GG/ 3% DS/ 3,3% NPM; <b>Amostra 13.</b> 2,5% GG/3,3% BCNC/3,3% FB/ 3,3% NPM. <b>Amostra 14.</b> 2,5% GG/3% DS/3,3% BCNC/3,3% FB/ 3,3% NPM .....                                                                       | 80 |
| <b>Figura 31:</b> Microscopia eletrônica de Transmissão dos BCNC e das NPM. As formas circulares da imagem dos BCNC são referentes aos “furos” da camada de carbono do grid e podem ser desconsiderados de qualquer influência nas análises e amostras .....                                                                                                                                                                                                                            | 82 |
| <b>Figura 32:</b> Histogramas dos BCNC e NPM; <b>A.</b> BCNC distribuição de comprimento; <b>B.</b> BCNC distribuição de área. <b>C.</b> NPM distribuição de comprimento; <b>D.</b> NPM distribuição de área. ...                                                                                                                                                                                                                                                                       | 83 |
| <b>Figura 33:</b> Microscopia eletrônica de Varredura das NPM. Ampliação 1000x. GG. Ampliação FB. 1200x. Amostras 15 (2%GG e 2%NPM). Ampliação 2000x; .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 84 |
| <b>Figura 34:</b> Microscopia eletrônica de Varredura das <b>Amostras 16</b> (2,5%GG, 2,5%NPM e 95% água). Ampliação 2500x. <b>Amostra 17</b> (2%GG, 0,25%FB, 1,25%BCNC, 0,5%NPM e 95,5% água). Ampliação 3500x. <b>Amostra 18</b> (2,5%GG, 0,31%FB, 1,56%BCNC, 0,63%NPM e 95%água). Ampliação 5000x. <b>Amostra 19.</b> ( (2%GG, 0,67%FB, 0,67%BCNC, 0,67%NPM, 95,5%água) Ampliação 15000x. <b>Amostra 20</b> (2,5%GG, 0,83%FB, 0,83%BCNC, 0,83%NPM e 95% água). Ampliação 2500x ..... | 84 |
| <b>Figura 35:</b> NPM em solução aquosa respondendo ao campo magnético do ímã, confirmando suas propriedades magnéticas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 85 |

**Figura 36:**Análise EDS dos hidrogéis. **A.** Amostra 19 (2%GG, 0,67%FB, 0,67%BCNC, 0,67%NPM e 95% água); **B.** Amostra 20 (2,5%GG, 0,83%FB, 0,83%BCNC, 0,83%NPM e 95% água) .....86

**Figura 37:**Avaliação da citotoxicidade das amostras 21 ( 0,3% GG, 0,3%FB, 6% BCNC, 0,3%NPM) e 22 ( 0,3%GG, 0,3%FB e 6%BCNC) frente as linhagens de(A) fibroblasto murino e (B) osteoblasto humano, respectivamente. O MTT foi utilizado como reagente colorimétrico. ....87

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Comparativo entre os principais tipos de nanocelulose .....                                                                                                                                                                   | 20 |
| <b>Tabela 2:</b> Principais diferenças entre citotoxicidade e biocompatibilidade.....                                                                                                                                                          | 33 |
| <b>Tabela 3:</b> Tempo de coleta de cada alíquota.....                                                                                                                                                                                         | 38 |
| <b>Tabela 4:</b> Proporções utilizadas em massa (m/m) para obtenção dos hidrogéis desenvolvidos .....                                                                                                                                          | 40 |
| <b>Tabela 5:</b> Proporção das concentrações de teores mássicos (em %) dos hidrogéis desenvolvidos. ....                                                                                                                                       | 43 |
| <b>Tabela 6:</b> Proporção das concentrações de teores mássicos (em %) dos hidrogéis desenvolvidos. ....                                                                                                                                       | 46 |
| <b>Tabela 7:</b> Diferentes parâmetros utilizados na hidrólise ácida da celulose bacteriana para a obtenção dos BCNC .....                                                                                                                     | 49 |
| <b>Tabela 8:</b> Dimensões e razão de aspecto dos BCNC .....                                                                                                                                                                                   | 54 |
| <b>Tabela 9.</b> Números de onda da amida e estrutura secundária das proteínas .....                                                                                                                                                           | 57 |
| <b>Tabela 10:</b> Tamanho médio dos filamentos e poros antes e depois da liofilização. ....                                                                                                                                                    | 64 |
| <b>Tabela 11.</b> Tamanho dos Filamentos e Poros de acordo com a literatura .....                                                                                                                                                              | 65 |
| <b>Tabela 12:</b> Valores de porcentagem acumulativa de fármaco liberado pelos hidrogéis utilizando o dissolutor modelo 299 da <i>Ethik technology</i> .....                                                                                   | 69 |
| <b>Tabela 13:</b> Descrição do mecanismo em função do expoente.....                                                                                                                                                                            | 72 |
| <b>Tabela 14:</b> Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de <i>Salmonella Typhimurium</i> após os tratamentos..... | 88 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |                                                                 |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>3D</b>     | Tridimensional                                                  |
| <b>AFM</b>    | Microscopia de força Atômica                                    |
| <b>AINEs</b>  | Anti-inflamatórios não esteroides                               |
| <b>ANOVA</b>  | Análise de Variância                                            |
| <b>ANVISA</b> | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                        |
| <b>BC</b>     | Celulose bacteriana                                             |
| <b>BCNC</b>   | Nanocristais de celulose bacteriana                             |
| <b>BEPE</b>   | Bolsa Estágio Pesquisa no Exterior                              |
| <b>CNC</b>    | Nanocristais de celulose                                        |
| <b>CNF</b>    | Nanofibras de celulose                                          |
| <b>CTT</b>    | Citotoxicidade                                                  |
| <b>DNA</b>    | Ácido desoxirribonucleico                                       |
| <b>DP</b>     | Desvio Padrão                                                   |
| <b>DS</b>     | Diclofenaco de Sódio                                            |
| <b>EDS</b>    | Energia Dissipativa                                             |
| <b>EMPA</b>   | Swiss Federal Laboratories For Material Science and Technologie |
| <b>FAPESP</b> | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo            |
| <b>FB</b>     | Fibroína da Seda                                                |
| <b>FDA</b>    | Food and Drug Administration                                    |
| <b>FTIR</b>   | Espectroscopia no Infravermelho                                 |
| <b>GG</b>     | Goma Gelana                                                     |
| <b>IM</b>     | Índice de mutagenicidade                                        |
| <b>ISO</b>    | International Standard Organization                             |
| <b>M</b>      | Média do número de revertentes/placa                            |
| <b>MEV</b>    | Microscopia Eletrônica de Varredura                             |
| <b>MTT</b>    | Mutagenicidade                                                  |
| <b>NPM</b>    | Nanopartículas Magnéticas                                       |
| <b>RA</b>     | Razão de Aspecto                                                |
| <b>STL</b>    | Estereolitografia                                               |
| <b>TEM</b>    | Microscopia Eletrônica de Transmissão                           |
| <b>TGA</b>    | Análise Termogravimétrica                                       |
| <b>UNESP</b>  | Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”        |
| <b>UNIARA</b> | Universidade de Araraquara                                      |

## SUMÁRIO

|              |                                                                                                       |           |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                               | <b>19</b> |
| <b>1.1</b>   | <b>BIOMATERIAIS.....</b>                                                                              | <b>19</b> |
| <b>1.2</b>   | <b>NANOCRISTAIS DE CELULOSE (CNC).....</b>                                                            | <b>19</b> |
| <b>1.3</b>   | <b>FIBROÍNA DA SEDA (FB).....</b>                                                                     | <b>22</b> |
| <b>1.4</b>   | <b>GOMA GELANA (GG) .....</b>                                                                         | <b>24</b> |
| <b>1.5</b>   | <b>NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPM).....</b>                                                           | <b>27</b> |
| <b>1.6</b>   | <b>DICLOFENACO DE SÓDIO (DS).....</b>                                                                 | <b>30</b> |
| <b>1.7</b>   | <b>IMPRESSÃO 3D .....</b>                                                                             | <b>31</b> |
| <b>1.8</b>   | <b>CITOTOXICIDADE (CTT).....</b>                                                                      | <b>33</b> |
| <b>1.9</b>   | <b>MUTAGENICIDADE (MTT).....</b>                                                                      | <b>35</b> |
| <b>2</b>     | <b>OBJETIVOS .....</b>                                                                                | <b>37</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>                                                                     | <b>37</b> |
| <b>3</b>     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                       | <b>38</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>OBTENÇÃO DO HIDROGEL DE FB/CNC/GG .....</b>                                                        | <b>38</b> |
| <b>3.1.1</b> | <b>Extração de BCNC .....</b>                                                                         | <b>38</b> |
| <b>3.1.2</b> | <b>Extração da FB .....</b>                                                                           | <b>39</b> |
| <b>3.1.3</b> | <b>Obtenção do hidrogel de CNC/FB/GG.....</b>                                                         | <b>40</b> |
| <b>3.1.4</b> | <b>Liofilização e Determinação da Massa Seca .....</b>                                                | <b>40</b> |
| <b>3.1.5</b> | <b>Caracterização dos hidrogéis de CNC/FB/GG .....</b>                                                | <b>41</b> |
| <b>3.1.6</b> | <b>Impressão 3D .....</b>                                                                             | <b>42</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>OBTENÇÃO DO HIDROGEL GG/BCNC/FB/NPM/DS.....</b>                                                    | <b>42</b> |
| <b>3.2.1</b> | <b>Síntese das NPM .....</b>                                                                          | <b>42</b> |
| <b>3.2.2</b> | <b>Obtenção da curva analítica do DS.....</b>                                                         | <b>42</b> |
| <b>3.2.3</b> | <b>Obtenção do hidrogel de GG/BCNC/FB/NPM/DS.....</b>                                                 | <b>43</b> |
| <b>3.2.4</b> | <b>Liofilização e determinação da massa seca .....</b>                                                | <b>43</b> |
| <b>3.2.5</b> | <b>Caracterização dos hidrogéis de GG/BCNC/FB/NPM/DS.....</b>                                         | <b>44</b> |
| <b>3.2.6</b> | <b>Ensaio de citotoxicidade e mutagenicidade .....</b>                                                | <b>45</b> |
| <b>3.2.7</b> | <b>Liofilização .....</b>                                                                             | <b>46</b> |
| <b>3.2.8</b> | <b>Caracterização da citotoxicidade celular e mutagenicidade dos hidrogéis de GG/BCNC/FB/NPM.....</b> | <b>46</b> |
| <b>4</b>     | <b>RESULTADOS .....</b>                                                                               | <b>49</b> |
| <b>4.1</b>   | <b>RESULTADOS OBTIDOS PARA O HIDROGEL DE CNC/FB/GG.....</b>                                           | <b>49</b> |

|       |                                                                                     |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.1 | Birrefringência dos BCNC.....                                                       | 49 |
| 4.1.2 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM) 51 |    |
| 4.1.3 | Uso dos CNC (Origem vegetal) para obtenção do hidrogel CNC/FB/GG .....              | 54 |
| 4.1.4 | Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR).....                           | 55 |
| 4.1.5 | Reologia do hidrogel de CNC/FB/GG.....                                              | 58 |
| 4.1.6 | Impressão 3D .....                                                                  | 61 |
| 4.1.7 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Óptica .....                | 62 |
| 4.2   | RESULTADOS OBTIDOS PARA O HIDROGEL FB/BCNC/GG/NPM/DS ....                           | 66 |
| 4.2.1 | Reologia dos hidrogéis de BCNC/FB/GG/NPM.....                                       | 66 |
| 4.2.2 | Ensaio de liberação de fármaco nos hidrogéis .....                                  | 68 |
| 4.2.3 | Análise Termogravimétrica (TGA).....                                                | 75 |
| 4.2.4 | Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....                              | 79 |
| 4.2.5 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....                                    | 82 |
| 4.2.6 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....                                      | 83 |
| 4.2.7 | Ensaio de Mutagenicidade e Citotoxicidade .....                                     | 86 |
| 5     | CONCLUSÃO.....                                                                      | 90 |
| 6     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                    | 92 |

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Biomateriais**

Biomateriais podem ser definidos como qualquer material utilizado para produzir dispositivos. Biomateriais podem ser designados seja como qualquer material seja natural ou sintético que tem a capacidade de interagir com o organismo/fluidos biológicos. Na área médica, esses materiais se destacam-se principalmente pela reduzida taxa de rejeição e efeitos adversos ocasionados por suas aplicações. Além disso, pode-se ressaltar a vasta utilização dos mesmos no desenvolvimento de diversas alternativas como próteses, lentes, scaffolds e enxertos já presentes comercialmente (PARKHAM *et al.*, 2020). Quando referido à utilização de biomateriais aplicados a estudos para seres humanos, podemos citar uma das maiores áreas de estudos na saúde, a engenharia de tecidos. A engenharia de tecidos, por sua vez, é um campo interdisciplinar entre a engenharia e ciências da vida, a qual busca o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem ou melhorem tecidos ou função de um órgão (LANGER; VACANTI, 1993).

A celulose bacteriana (BC) e a vegetal possuem a mesma fórmula química e estrutural; no entanto, apresentam propriedades mecânicas e físicas que diferem entre si, como resistência à tração, elasticidade, durabilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (LAHIRI *et al.*, 2021). Além disso, é possível realizar modificações estruturais na celulose com o objetivo de melhorar suas propriedades físico-químicas e ampliar seu potencial de aplicação. A celulose bacteriana, por sua elevada pureza e cristalinidade, é amplamente utilizada na extração de nanocristais de celulose (CNC), por meio de ataques químicos como hidrólise ácida e oxidação (ex.: TEMPO), ou físicos, como ultrassom e homogeneização de alta pressão. Esses processos permitem a obtenção de nanocelulose com alta área superficial, excelente estabilidade mecânica e versatilidade para funcionalizações, sendo particularmente promissora em aplicações biomédicas, como engenharia de tecidos, sistemas de liberação controlada e curativos avançados.

## **1.2 Nanocristais de Celulose (CNC)**

A celulose é o biopolímero mais abundante na Terra, presente em uma ampla variedade de fontes naturais, como madeira, algodão, linho, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos agrícolas e até mesmo sintetizada por bactérias, como a *Gluconacetobacter xylinus*. Essa diversidade de origens faz da celulose um material versátil, utilizado em diversas aplicações devido às suas propriedades físico-químicas, como alta cristalinidade, estabilidade térmica, resistência

mecânica e biocompatibilidade (MISRA et al., 2011; KOGEL-KNABNER & AMELUNG, 2014; ABERA, THOTHADRI & TAFETE, 2022). A celulose é composta por unidades de D-glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas, organizadas em regiões cristalinas e amorfas, mantidas por ligações de hidrogênio e de Van der Waals. A partir dessa estrutura básica, é possível obter a nanocelulose, termo que se refere a formas de celulose com pelo menos uma dimensão em escala nanométrica (<100 nm). A nanocelulose é geralmente classificada em três tipos principais: nanofibras de celulose (CNF), CNC e celulose bacteriana (BC). As CNF, também chamadas de microfibrilas, são estruturas longas e flexíveis, compostas por regiões cristalinas e amorfas, obtidas geralmente por trituração mecânica, muitas vezes combinada com pré-tratamentos químicos ou enzimáticos. Já os CNC são partículas curtas, rígidas e altamente cristalinas, geralmente obtidas por hidrólise ácida, que remove seletivamente as regiões amorfas da celulose. Os CNC podem ser extraídos de diversas fontes vegetais, como madeira, algodão, linho, bagaço de cana, celulose bacteriana e resíduos agrícolas (GRUNERT & WINTER, 2002; ARAKI et al., 1998; DONG et al., 2005; HEUX, CHAUVE & BONINI, 2000; CALVINO et al., 2020). A Tabela 1 apresenta as diferentes fontes em que podem ser extraídos os CNCs

**Tabela 1:** Comparativo entre os principais tipos de nanocelulose

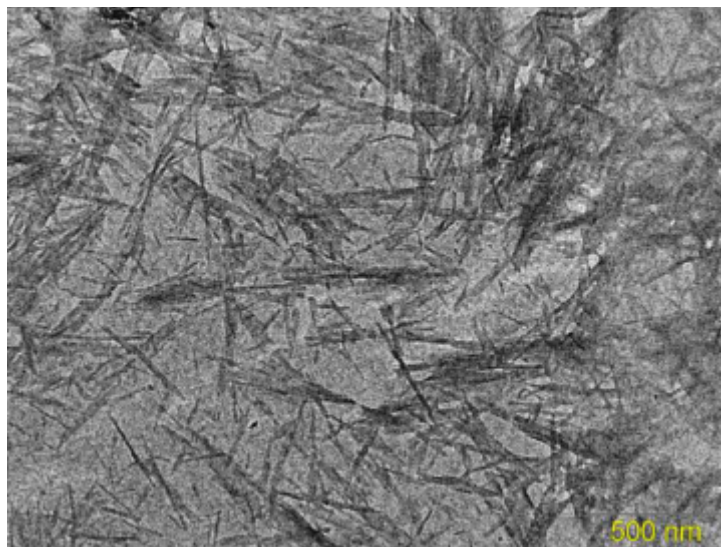
| TIPO DE NANOCELULOSE                              | FONTE DE EXTRAÇÃO                                           | MORFOLOGIA                             | MÉTODOS DE EXTRAÇÃO                                                                             | CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>NANOFIBRAS DE CELULOSE (CNF)</b>               | Madeira, algodão, bagaço de cana, linho, resíduos agrícolas | Fibrilas longas e flexíveis            | Trituração mecânica, homogeneização, moagem, com ou sem pré-tratamentos químicos ou enzimáticos | Composta por regiões cristalinas e amorfas; alta resistência mecânica e flexibilidade; pode formar redes tridimensionais                                     |
| <b>CNC</b>                                        | Madeira, algodão, linho, bagaço de cana, resíduos vegetais  | Bastonetes curtos e rígidos (whiskers) | Hidrólise ácida (geralmente com ácido sulfúrico), hidrólise enzimática                          | Alta cristalinidade, elevada rigidez, boa estabilidade em suspensão aquosa (com sulfatos); requer pré-tratamento devido à presença de lignina e hemicelulose |
| <b>BC</b>                                         | Produção microbiana (Gluconacetobacter xylinus)             | Rede tridimensional (gel fibroso)      | Fermentação aeróbica em meio nutritivo contendo glicose ou outros açúcares                      | Alta pureza (livre de lignina e hemicelulose), alta capacidade de retenção de água, excelente estabilidade térmica e mecânica                                |
| <b>NANOCRISTAIS DE CELULOSE BACTERIANA (BCNC)</b> | Celulose bacteriana (BC)                                    | Bastonetes rígidos e curtos (whiskers) | Hidrólise ácida, ultrassom, enzimática                                                          | Cristalinidade elevada (~85%), alta área superficial, módulo de Young elevado (~150 GPa), excelente potencial como reforço e para aplicações biomédicas      |

**Fonte:** Autoria Própria, 2023

Por fim, a celulose bacteriana (BC), sintetizada por bactérias como a *Gluconacetobacter xylinus*, é um material puro, livre de lignina e hemicelulose, o que dispensa os pré-tratamentos agressivos necessários à celulose vegetal. A BC apresenta alta cristalinidade, capacidade de retenção de água, e excelente pureza, sendo especialmente adequada para aplicações biomédicas (SVENSSON *et al.*, 2005; KLEMM *et al.*, 2005; BARUD *et al.*, 2011). A partir da BC é possível obter BCNC, utilizando métodos como hidrólise ácida, enzimática ou ultrassonicação (FILSON *et al.*, 2009). Dentre esses, a hidrólise ácida com ácido sulfúrico é o método mais comum, no qual o ataque seletivo às regiões amorfas gera nanocristais com alto grau de cristalinidade (aproximadamente 85%) e formato de haste ou "whiskers", com comprimentos entre 5 e 200 nm (MESQUITA, 2012). Durante esse processo, ocorrem reações com os grupos hidroxila, formando ésteresulfatos carregados negativamente ( $\text{CNC-SO}_3^-$ ), o que facilita a dispersão aquosa, porém pode reduzir a estabilidade térmica. Os BCNC (Figura 1) combinam propriedades vantajosas como elevado módulo de Young ( $\sim 150$  GPa), alta resistência à tração ( $\sim 10$  GPa), densidade de  $1,5 \text{ g.cm}^{-3}$ , alta área superficial e reatividade, devido à presença de numerosos grupos hidroxila em sua superfície (YANG *et al.*, 2023; CALVINO, MACKE & ROWAN, 2020). Estas características fazem dos BCNC um excelente reforço para compósitos e uma alternativa sustentável frente a materiais comerciais como nanofibras de carbono e nanoargilas (AL-SALEH & SUNDARARAJ, 2011; ALBDIRY *et al.*, 2012). Além disso, sua elevada razão entre comprimento e diâmetro favorece a formação de redes percolantes em baixas concentrações, o que é útil em aplicações estruturais (CALVINO *et al.*, 2020). A descoberta dos CNC é atribuída a Rånby (1949-1951), e posteriormente Mukherjee *et al.* (1952-1953), que observaram pela Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) as estruturas alongadas em forma de bastonetes. Dada a sua rigidez, distribuição geométrica e possibilidade de alinhamento, os CNC, e em especial os BCNC, tornam-se promissores para aplicações avançadas, como biomateriais, engenharia de tecidos e liberação controlada de fármacos. Por fim, os bionanocompósitos baseados em nanocelulose vêm despertando crescente interesse por aliam biodegradabilidade, biocompatibilidade, custo reduzido e boas propriedades físico-químicas (PIELAK, 2019). No entanto, o desafio da aglomeração de partículas devido à forte interação por ligações de hidrogênio ainda é um obstáculo. A funcionalização da superfície, como a introdução de grupos sulfatos, tem sido uma estratégia para melhorar a dispersão e a compatibilidade em diferentes matrizes. Assim, o presente trabalho foca nos BCNC, visando explorar suas propriedades únicas, como

atoxicidade, para o desenvolvimento de hidrogéis com potencial para impressão 3D e liberação controlada de fármacos.

**Figura 1:** Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) evidenciando a morfologia típica dos CNCs obtidos por hidrólise ácida. Observa-se uma distribuição aleatória dos cristais, com regiões de sobreposição, característica comum a amostras secas sobre a grade. A morfologia alongada, com aspecto de bastonetes, é compatível com a estrutura altamente cristalina dos CNCs e condiz com o padrão observado em materiais obtidos a partir da degradação seletiva das regiões amorphas da celulose.



Fonte: Autoria Própria, 2023

### 1.3 Fibroína da Seda (FB)

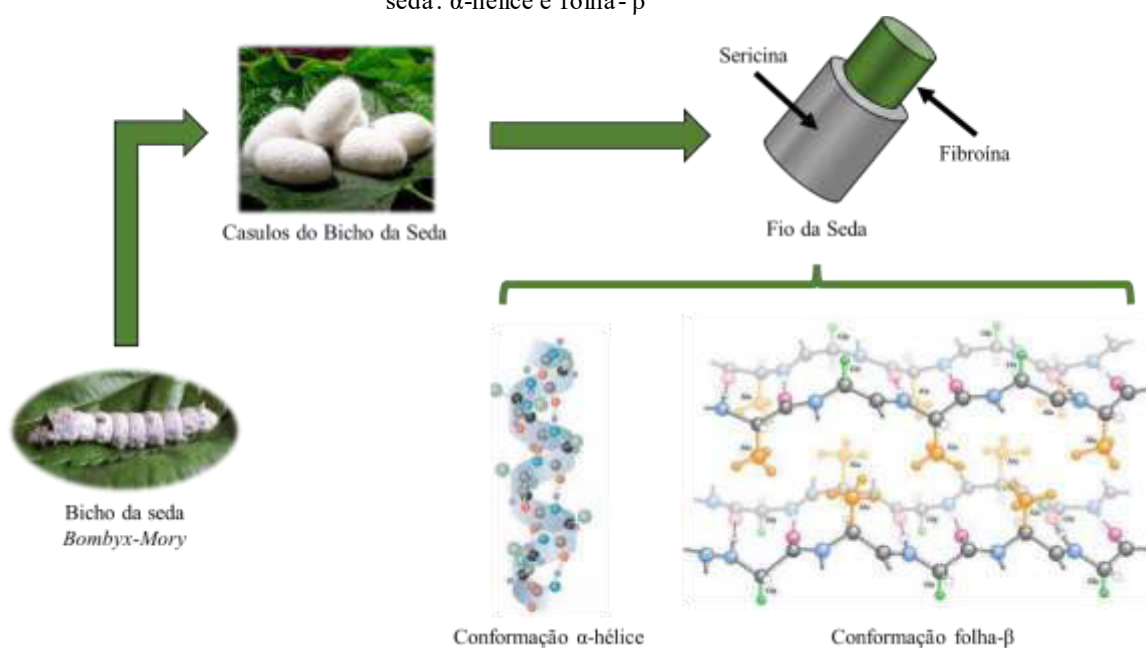
A FB é uma proteína natural extraída do casulo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), amplamente estudada devido às suas propriedades físico-químicas favoráveis. Apresenta estabilidade térmica em torno de 200 °C, além de ser biocompatível, biodegradável e suscetível a modificações químicas. Essa reatividade decorre da presença de resíduos de aminoácidos com grupos funcionais, como hidroxilas, carboxilas e aminas que possibilitam a conjugação de biomoléculas ou a funcionalização da matriz proteica para aplicações específicas. ((NGUYEN *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2021, TSUKADA *et al.*, 1994, HU *et al.*, 2012). A fibra que constitui os casulos é excretada das glândulas salivares do bicho da seda, sendo que essas são constituídas por 70 a 80% de FB e de 20 a 25% de sericina (ASAKURA, OKUSHITA, WILLIAMSON, 2015; CHEN *et al.*, 2019; REIZABAL *et al.*, 2023; LALIT, 2015, WHANG, ZANG, 2015).

A cadeia molecular da FB é composta de três unidades, a cadeia pesada (H, 390 kDa), cadeia leve (L, 26 kDa), que são unidas por uma ligação bissulfeto para formar o complexo H-L, e a proteína P25 (ZHENG, ZUO, 2021). P25 é uma glicoproteína que é hidrofóbica que está ligada ao complexo H-L. As cadeias H, L e P25 são os três peptídeos que formam o casulo

obtido do *bombix mory* (SUN, 2021). Além disso, a estrutura da FB é composta por regiões cristalinas e amorfas. As regiões cristalinas, formadas principalmente por folhas  $\beta$  (Figura 2), conferem alta resistência mecânica devido ao elevado grau de organização molecular. Já as regiões amorfas são menos organizadas e desempenham papel fundamental na absorção de energia durante a deformação, contribuindo para a tenacidade do material. A elasticidade da seda, por sua vez, está relacionada à presença e mobilidade das cadeias na fase amorfa, que permite que o material retorne à sua forma original após o estiramento. A composição da FB inclui predominantemente os aminoácidos glicina (45,9%), alanina (30,3%), serina (5,3%) e valina (1,8%), além de outros aminoácidos em menor proporção (NOGUEIRA, 2009; SUN, 2021).

A FB é composta por duas estruturas secundárias, com dois domínios, um amorfo chamado de seda I e outro cristalino, a seda II. A seda I é dada pelo envelopamento estrutural aleatório em alfa hélice, dessa forma, o polipeptídeo é constituído por uma hélice orientada para a direita, estruturado por ligações de hidrogênio, apresentando estruturas secundárias até cristais ordenados. A Seda II é dada pela sua forma hidrofóbica, caracterizada por uma rede altamente cristalina de folhas  $\beta$ , que também se relaciona com sua estabilidade termodinâmica, cuja formação é resultante de ligações de hidrogênio entre dois ou mais polipeptídios (BEXIGA, 2014; MORAES, 2014).

**Figura 2:** Bicho da seda domesticado; casulos com FB e a sericina. Estruturas secundárias da FB da seda:  $\alpha$ -hélice e folha- $\beta$



**Fonte:** Adaptado de BEXIGA (2014).

A sericina é uma proteína amorfa com propriedades adesivas, responsável por manter os fios de FB unidos e garantir a integridade dos casulos. Além disso, está relacionada à resposta imunológica do bicho-da-seda, desempenhando uma função protetiva durante o período de crescimento. A FB e sericina se mantêm conectadas pelas interações de Van der Waals, sendo que essas são facilmente rompidas, o que permite a utilização das proteínas separadas. Um processo de separação das proteínas é chamado de gомagem, processo no qual há um tratamento dos casulos com carbonato de sódio, removendo a sericina e em seguida, para a obtenção de dispersões de FB, são normalmente utilizados diferentes solventes como brometo de lítio-água, cloreto de cálcio-etanol-água, brometo de lítio-etanol-água, entre outros (HIRABAYASHI, 1990; MATHUR *et al*, 1997; MATSUMOTO *et al*, 1997).

O padrão estrutural da FB resulta de seu polimorfismo cristalino, caracterizado pela presença de regiões altamente organizadas (folhas  $\beta$ ) intercaladas por fases amorfas. Essa combinação confere à FB propriedades mecânicas notáveis, como alta resistência, tenacidade e elasticidade, superando muitos outros biomateriais naturais (ALTMAN *et al.*, 2003). Estudos na literatura indicam que a utilização da FB em diversos ramos da química é promissor, principalmente na área de ciências da saúde, como exemplo, Shi, *et al.* (2017) desenvolveu um compósito de FB-gelatina que pode reparar ferimentos de cartilagem, utilizando a impressão 3D. Além disso, Vepari & Kaplan (2007) mostraram a aderência dos fibroblastos em filmes de FB indicando sua citocompatibilidade celular, também, outras áreas como tecido, alimento, cosméticos, biosensores e etc (CANDIDO, SILVA, 2023; SUN, 2021). Em outros trabalhos, a FB apresentou a maior resistência à tração dentre os materiais naturais como lã, algodão, elastina e resilina, sendo assim, muitos pesquisadores utilizam a FB como scaffolds para a engenharia de tecidos (SUN, 2021; SHAO, 2002; TANAKA *et al*, 1999; INOUE *et al*, 2000). Além disso, a capacidade de regeneração da fibroína pode ser controlada, permitindo ajustes na morfologia final do material e, conseqüentemente, a modulação de suas propriedades físico-químicas. Essa versatilidade possibilita sua aplicação em diferentes áreas, como demonstrado neste trabalho, que empregou a FB na formulação de um hidrogel destinado à impressão 3D.

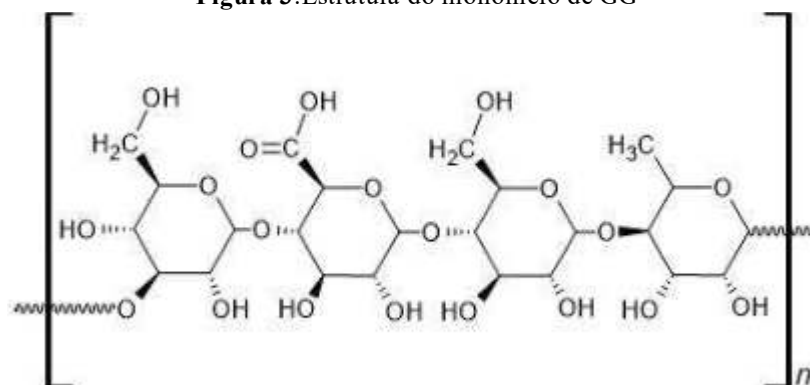
#### **1.4 Goma Gelana (GG)**

Alguns microrganismos possuem a habilidade de produzir biopolímeros através da fermentação, sendo uma ótima fonte de materiais que possuem excelentes propriedades tecnológicas (JINDAL, SINGH KHATTAR, 2018; FEKETSHANE *et al*, 2022).

Exopolissacarídeos vêm se destacando como componentes importantes para uso em produtos químicos, farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, devido à sua praticidade, processabilidade, sustentabilidade e biodegradabilidade (BANERJEE; BHATTACHARYA, 2012; GOMES et al., 2023). O termo “goma” refere-se a um grupo de polímeros naturais capazes de formar soluções viscosas ou géis, sendo materiais de baixo custo para produção em escala industrial e com alta reprodutibilidade em suas propriedades físico-químicas. Por isso, neste trabalho, utilizou-se a GG para aprimorar as propriedades reológicas do hidrogel preparado, visando sua aplicação em impressão 3D.

GG é o nome dado ao exopolissacarídeo hidrofílico linear aniônico, produzido pela bactéria *Sphingomonas elodea* através da fermentação (MORRIS et al, 2012), sendo a GG um polissacarídeo solúvel em água, usado como estabilizante, espessante, viscosificante ou agente gelificante. A GG foi descoberta em 1978 pela antiga Kelco, divisão da Merck & Company, inc (PALUMBO et al, 2020). Começou a ser utilizada como aditivo alimentar no Japão em 1988, sendo aprovada pela FDA em 1992, o que levou ao aumento de sua aplicação também em áreas médicas, devido à sua biocompatibilidade (FEKETSHANE et al., 2022). A estrutura da GG é constituída de unidades repetidas de tetrassacarídeo ( $\beta$ -1,3-D-glicose,  $\beta$ -1,4-D-ácido glucorónico,  $\beta$ -1,4-D-glicose e  $\alpha$ -1,4-L-ramnose) (**Figura 3**). Contendo duas formas: a primeira, com elevado grau de acilação (forma nativa), produz géis macios, elásticos, transparentes e flexíveis, que não apresentam histerese térmica significativa. A segunda forma, com baixo grau de acilação (forma modificada), gera géis duros e quebradiços (FADINI et al., 2013). A forma nativa é composta pela ligação de dois grupamentos acila a um único resíduo de glicose, de modo que o acetil se encontra na posição 2, enquanto um gliceril na posição 6, podendo ser removido através da hidrólise alcalina para produzir sua forma comercial, geralmente disponíveis com alto ou baixo teor de acilação (CHANDRASEKARAN et al., 1988; GIAVASIS et al., 2000; PICONE, 2008).

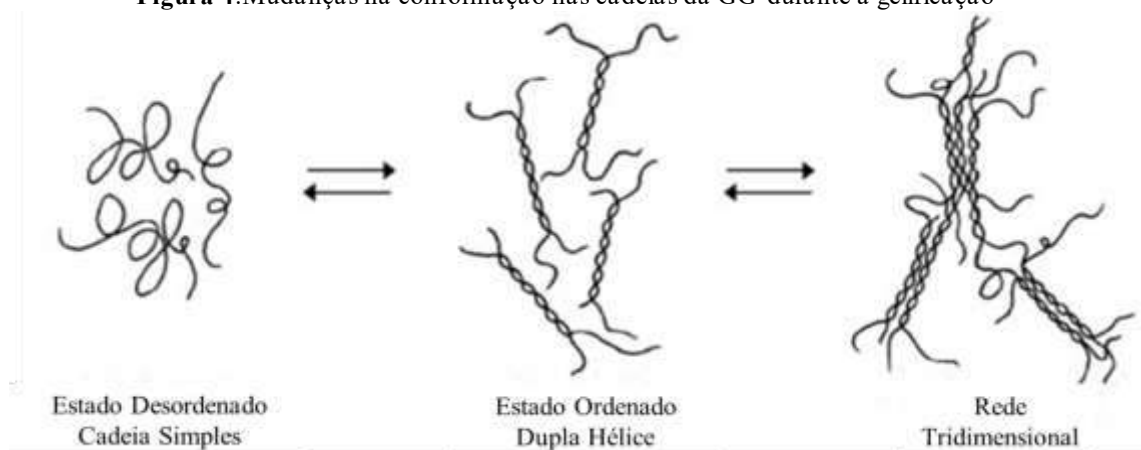
**Figura 3:** Estrutura do monômero de GG



Fonte: MORRIS *et al.*, 2012

A conformação e estrutura da GG são dadas de acordo com a temperatura, concentração, presença de água e a presença de cátions mono e/ou divalentes na solução (YUGUCHI *et al.*, 1993). Em temperaturas baixas, a GG tende a formar uma hélice ordenada de cadeias duplas, enquanto para altas temperaturas, forma-se uma cadeia única, reduzindo significativamente a sua viscosidade (GIAVASIS *et al.*, 2000). Em soluções com altas temperaturas, é possível observar cadeias simples e enoveladas, ou seja, estado desordenado. Ao serem resfriadas passam para o estado de dupla hélice, as moléculas se agregam e formam junções, que por fim, ao se complexarem com cátions e formarem ligações de hidrogênio com a água, originam uma rede tridimensional (Figura 4) (PREZOTTI, 2013) (YUGUCHI *et al.*, 1993).

**Figura 4:** Mudanças na conformação nas cadeias da GG durante a gelificação



Fonte: PREZOTTI, 2013.

Adicionalmente, a GG apresenta baixa toxicidade, dessa forma, na literatura é possível encontrar diversos trabalhos utilizando GG em formas farmacêuticas controladas de liberação de fármaco, como administrações do tipo oral (MIYAZAKI *et al.*, 1999; KUBO *et al.*, 2003), nasal (CAO *et al.*, 2009; MAHAJAN; GATTANI, 2009) e oftálmica (CARLFORS *et al.*, 1998;

DICKSTEIN *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2010; KESAVAN *et al.*, 2010). Além disso, o estudo realizado por Giavasis e colaboradores (2000) indicou a atoxicidade oral e ocular em murinos.

Ademais, pesquisas têm se dedicado ao desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos mais precisos e direcionados a determinado órgão, promovendo redução na rejeição imunológica e minimização da toxicidade ao paciente. Nesse contexto, a GG destaca-se como um material promissor para incorporação em hidrogéis, devido à sua capacidade de modular propriedades reológicas, aliada às suas propriedades biológicas.

### **1.5 Nanopartículas Magnéticas (NPM)**

As NPM apresentam potencial para aplicação em diferentes áreas tecnológicas como biomedicina, bioengenharia, carregamento de drogas magneticamente assistido, purificação biomacrocélular, biosensores e melhoria na qualidade das imagens por ressonância magnética nuclear. A utilização de materiais em escala nanométrica vem crescendo, particularmente materiais que possuem propriedades melhoradas, dadas suas características únicas em escala nanométrica. As NPM de óxido de ferro representam um comportamento químico estável, atóxico, elevando por tanto, o interesse da utilização das NPM na área biomédica (DO CARMO PARESQUE *et al.*, 2019; SHAH RR *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SHAH *et al.* 2015). Nanopartículas de magnetita,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , são denominadas nanopartículas magnéticas e apresentam comportamento único como o superparamagnetismo, alta coercitividade, baixa temperatura de Curie e elevada susceptibilidade magnética (DO CARMO PARESQUE *et al.*, 2019; LYUTYY *et al.*, 2019).

As NPM possuem uma propriedade chamada de superparamagnetismo, que tem a capacidade de fazer com que elas sejam atraídas por um campo magnético externo, não apresentando magnetismo remanescente após a remoção do campo (HARRIS, 2002). Adicionalmente, seu tamanho também auxilia em sua aplicação, ou seja, diminuindo o tamanho de partículas de materiais ferromagnéticos para escala de nanômetros, as partículas passam a apresentar um único domínio magnético, quando aplicado um campo magnético externo, os spins deste domínio se orientam na direção do campo. Removendo-se o campo magnético externo, os spins desalinham-se e o material passa a apresentar comportamento paramagnético (HARRIS, 2002; SUH *et al.*, 2009). Dessa forma, nanopartículas superparamagnéticas em uma determinada solução podem ser removidas com um ímã externo sem apresentar problemas de aglomeração, após a remoção do campo magnético externo. Além disso, partículas magnéticas que formam dispersões superparamagnéticas são geralmente compostas por metais ou óxidos

metálicos, como níquel (Ni), cobalto (Co), ferro (Fe) e óxidos de ferro, especialmente a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Os metais puros possuem alta suscetibilidade magnética, porém oxidam-se facilmente e podem liberar íons tóxicos, sendo por isso menos indicados para aplicações biológicas. A oxidação não leva necessariamente à formação de materiais antiferromagnéticos, mas pode resultar em óxidos com diferentes comportamentos magnéticos (HARRIS, 2002).

Materiais ferromagnéticos possuem momentos magnéticos alinhados na mesma direção, resultando em forte magnetização mesmo na ausência de campo externo (ex.: Fe, Ni, Co). Os ferrimagnéticos apresentam momentos alinhados em direções opostas, mas com magnitudes diferentes, gerando um momento líquido distinto de zero (ex.:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ferritas). Já os antiferromagnéticos possuem momentos opostos com magnitudes iguais, cancelando-se mutuamente e apresentando magnetização nula (ex.: MnO, NiO) (HARRIS, 2002).

Para aplicações em biotecnologia e biomedicina, o núcleo magnético mais empregado é a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), devido à sua biocompatibilidade, estabilidade química e comportamento superparamagnético em escala nanométrica, o que impede a aglomeração permanente das partículas (GOMES, 2022; BALDINI, 2023).

A magnetita ou ferrita de ferro, é um mineral de cor preta metálica e brilhoso, se encontrando na classe de óxidos metálicos magnéticos, considerado um mineral ferrimagnético que contém ferro em dois estados de oxidação o ferro II ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e ferro III ( $\text{Fe}^{3+}$ ), considerada, portanto, um óxido de ferro misto,  $\text{FeO}$  e  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (GOMES, 2022; BALDINI, 2023). A magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) possui uma estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio invertido, composta por uma célula unitária na qual os íons  $\text{Fe}^{2+}$  ocupam exclusivamente sítios octaédricos, enquanto os íons  $\text{Fe}^{3+}$  estão distribuídos entre sítios octaédricos e tetraédricos. Os ânions  $\text{O}^{2-}$  estão organizados em uma sub-rede cúbica compacta, coordenados tanto por íons  $\text{Fe}^{2+}$  quanto  $\text{Fe}^{3+}$ . O comportamento magnético da magnetita é resultado da interação entre os momentos magnéticos dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , principalmente nos sítios octaédricos, sendo essa configuração responsável pelo caráter ferrimagnético do material (BALDINI, 2023; SAMUEL, IRENE, 2013; SANTANA, RAMOS, FABRIS, 2008).

As NPM podem ser obtidas por diversos meios como a coprecipitação química, síntese hidrotérmica, decomposição térmica, micro-ondas, dentre outras. A utilizada nesse trabalho é o método de coprecipitação química de sais de ferro, que é a mais utilizada dada sua simplicidade e baixo custo. A co-precipitação homogênea de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  hidratados na presença de uma base forte, consiste na reação estequiométrica de hidróxidos férricos e ferrosos em um

meio aquoso, tendo como produto a magnetita ou maghemita. Através deste método é possível controlar o tamanho das NPM em uma faixa entre 2 e 15nm pelo manuseio do pH e força iônica do meio (TARTAJ *et al.*, 2005).

A relação superfície/volume das NPM é alta, ocasionando uma alta energia de superfície, favorecendo sua agregação quando em solução e uma alta reatividade química, levando a uma oxidação rápida das NPM, transformando a magnetita e maghemita em formas não magnéticas (WU, HE e JIANG, 2008). Sendo assim, devido a sua grande área superficial e fortes interações dipolo-dipolo apresentadas pelas NPM, tornam-se imprescindíveis que suas superfícies sejam funcionalizadas, para que exista uma melhor estabilização, para evitar aglomeração e aumentar o tempo de circulação no sistema, além disso, o núcleo de magnetita pode ser revestido com uma camada de surfactantes e polímeros, o que torna as NPM hidrossolúveis e biocompatíveis (DO CARMO PARESQUE *et al.*, 2019; PATSULA *et al.*, 2016; DAS P *et al.*, 2019).

Para sua utilização na área médica, também é de grande interesse características morfológicas, como o tamanho, distribuição, magnetização e granulometria, tais formas são obtidas de acordo com o processo de síntese das NPM, pelo controle das condições de temperatura, atmosfera, pH e sais utilizados. Vale ressaltar que quando em solução aquosa e submetidos ao campo magnéticos, as NPM se alinham, sofrendo rotação física e alinhando seus momentos magnéticos ao campo, fenômeno conhecido como relaxação Browniano, simultaneamente a esse fenômeno, sofrem rotação dos seus momentos magnéticos dentro dos cristais em uma dada direção, mecanismo chamado de relaxação de Néel. Tais mecanismos são responsáveis por aquecer as NPM quando essas são sujeitas a um campo magnético que oscila (DO CARMO PARESQUE *et al.*, 2019).

Neste estudo, busca-se explorar o efeito da incorporação de NPM ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) em hidrogéis voltados para a liberação de fármacos. A presença dessas NPM confere responsividade magnética ao sistema, o que permite investigar como a aplicação de um campo magnético externo pode interferir no processo de liberação, seja por meio da indução de alterações estruturais na matriz do hidrogel, seja pela possível restrição ou facilitação da difusão do fármaco. Com isso, pretende-se compreender o papel da magnetita nesse tipo de sistema, avaliando se sua inclusão contribui para um controle mais eficiente ou, eventualmente, compromete a liberação do agente terapêutico.

## 1.6 Diclofenaco de sódio (DS)

O diclofenaco de sódio, 2-[(2,6-diclorofenil) amino] benzenoacetato é um fármaco não esteroideal, anti-inflamatória, antitérmica e analgésica, derivada do ácido arilacético, normalmente utilizada para tratamento de dores, inflamação, dismenorreia e artrite reumatoide (LARA-PÉREZ *et al*, 2020; SHARMA *et al*, 2023). Os derivados do ácido arilacético possuem em sua estrutura grupo carboxílico, separado por um átomo de carbono de um núcleo aromático e a estes grupos podem ou não estar ligados grupos lipofílicos volumosos (KOROLKOVAS, FRAÇA, 2004; SANTOS, 2005). Em relação ao seu mecanismo de ação, o DS inibe a atividade da ciclo-oxigenase, enzima responsável em converter ácido araquidônico e enoperóxidos cíclicos precursores de prostaglandinas. Prostaglandinas E2 e PG12 são vasodilatadores, aumentam a permeabilidade vascular, causando reações inflamatórias (ADEYEYE, LI, 1990; PARFITT, 1999; GENARO, 2000; SANTOS, 2005). Os efeitos terapêuticos dos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), pode estar relacionado a síntese de prostaglandinas (SANTOS, 2005). O diclofenaco de sódio possui ação similar aos anti-inflamatórios não esteroides, sendo que possui uma potência 2,5 vezes e 8 a 16 vezes maior que a da indometacina e ibuprofeno, respectivamente. Este medicamento pode ser utilizado para aliviar sintomas de artrite reumatoide crônica e aguda, osteoartrite e espondilite anquilosante. Ademais, pode ser usado para amenizar sintomas de procedimentos operatórios odontológicos, ortopédicos, dores viscerais e pós-parto. A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo a principal proteção externa do corpo contra microrganismos como fungos, bactérias, prover proteção mecânica contra impactos e, possui importante papel na regulação da temperatura do corpo humano. No entanto, mesmo que a pele exerça excelente características, ferimentos podem ocorrer, levando a utilização de curativos, como ataduras e gazes, que protegem contra infecções, ajudam na recuperação e funcionam como barreiras físicas. A principal função desses curativos é manter a lesão limpa e seca; entretanto, a necessidade de trocas frequentes pode causar danos ao tecido, provocar dor durante a remoção e comprometer o processo de cicatrização, devido às propriedades adesivas desses materiais (AZAM *et al*, 2023). Além disso, conforme concluído por Zahedi *et al*. (2010), ambientes quentes e úmidos favorecem a aceleração do processo de cicatrização. De acordo com Zhao *et al*. (2017), um curativo ideal deve reunir inúmeras funcionalidades, como permitir a troca gasosa (especialmente oxigênio), atuar como barreira física contra microrganismos, promover a absorção eficiente do exsudato, manter a ferida em ambiente úmido, e não induzir inflamação ou rejeição no local aplicado. Além disso, os AINEs,

são os fármacos mais prescritos no mundo para o tratamento de dor, inflamação e edema, podem ser aplicada em ferimentos cutâneos por possuírem propriedades analgésica, antitérmica, anti-inflamatória e antitrombótica (BATLOUNI, 2010) . No intuito de obter novos curativos, são desenvolvidos novos materiais para essa aplicação, como os hidrogéis, que podem ser sistemas carreadores de fármacos (BOATENG *et al*, 2008; AZAM *et al*, 2023). Curativos baseados em hidrogéis são adequados pelo fato de possuírem a capacidade de reter uma grande capacidade de fluídos, permitirem a troca de oxigênio, podem ser obtidos a partir de biomateriais (MARSCHNER, 2015; AZAM *et al*, 2023). Neste contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um hidrogel composto FB, BCNC, GG, NPM e DS, com foco na aplicação em ferimentos cutâneos. As NPM foram incorporadas com o objetivo de avaliar se a presença dessas partículas, sob a ação de um campo magnético externo, influência positiva ou negativamente a capacidade do hidrogel em liberar fármacos. Já o diclofenaco de sódio foi utilizado como fármaco modelo, permitindo analisar a interação entre o sistema polimérico e compostos bioativos, além de possibilitar a investigação dos modelos cinéticos envolvidos na liberação. Considerando a demanda global por curativos inteligentes, a compatibilidade desse sistema com técnicas de impressão 3D representa uma estratégia promissora, com potencial de atrair interesse industrial devido à sua viabilidade técnica e econômica. (RADENKOVIC *et al*, 2016; NUFANG *et al*, 2016; AZAM *et al*, 2023).

### **1.7 Impressão 3D**

Uma perspectiva do aumento da utilização da Impressão 3D, dada as suas características como fabricação livre e pedidos sobre medida que atendem diversas áreas, como dito anteriormente, pode ser visto no crescimento substancial, com um aumento de 6 bilhões em 2016 para 21 bilhões em 2021 na área da impressão 3D (CHIULAN *et al*, 2017). Para a realização da Impressão 3D, é necessário passar por alguns passos, no primeiro passo, é preciso criar um objeto 3D em um software adequado e convertê-lo para um formato padrão de STL (Linguagem padrão de mosaico), em seguida, esse arquivo pode ser utilizado em um software de “fatiamento”, que é capaz de fatiar o objeto em diferentes camadas. Por fim, o arquivo obtido do software de “fatiamento” é utilizado para a impressão do objeto desejado, além disso, é possível mudar parâmetros durante a impressão, como o plano de deposição e a espessura (SANJITA; SUSHIL, 2020). Tendo em vista os avanços da impressão 3D, desenvolveu-se um novo tipo de impressão, chamada bioimpressão 3D. A bioimpressão 3D surgiu como uma tecnologia promissora no campo biomédico, permitindo a deposição controlada de células vivas

e biomoléculas em uma matriz, incluindo os hidrogéis, para a construção de estruturas tridimensionais que mimetizam a arquitetura e o microambiente de tecidos biológicos. O sucesso do processo de bioimpressão depende de diversos parâmetros, como a escolha adequada da biotinta, que deve apresentar propriedades reológicas, mecânicas e biológicas compatíveis com o tipo celular e a aplicação pretendida, além da seleção do tipo de bioimpressora e das condições operacionais (temperatura, pressão de extrusão, velocidade de impressão), os quais impactam diretamente a viabilidade celular e a fidelidade estrutural do tecido bioimpresso. Além disso, na bioimpressão são utilizadas as biotintas que são compostas de células vivas, o que permite o cultivo de tecidos. As biotintas são as partes mais importantes da bioimpressão, pois, intermediam as ligações das células e suas matrizes, podendo levar ao desenvolvimento de um órgão. As biotintas podem ser utilizadas com diferentes células, possibilitando a impressão de estruturas funcionais e, dessa forma, a bioimpressão pode atingir as diversas áreas da medicina, utilizando biotintas que sejam adequadas para cada situação (AGARWAL *et al*, 2022). Biopolímeros utilizados para o desenvolvimento de biotintas podem ser naturais ou sintéticos. Os sintéticos possuem força mecânica adequada para a impressão, enquanto polímeros naturais possuem maior reconhecimento celular, devido aos receptores celulares e ainda, alguns biopolímero apresentam maior biocompatibilidade, rápida degradação e boas propriedades mecânicas. Vale ressaltar que existem padrões que devem ser considerados no desenvolvimento de biotintas, para que haja uma capacidade de impressão adequada, como a solubilidade, concentração, viscosidade, tempo de gelificação e imunogenicidade (AGARWAL *et al*, 2022). Sendo assim, sabendo que polímeros naturais se demonstram adequados para a bioimpressão, e que hidrogéis, feitos de proteínas e polissacarídeos, representam uma classe promissora de biomateriais para a impressão 3D, devido a sua plataforma versátil para a fabricação de scaffolds biologicamente ativos, a utilização da GG (agente gelificante), da FB (carreadora de fármaco) e dos BCNC, que podem ser utilizadas como reforço mecânico para a estrutura da tinta, se mostra interessante para a preparação de um hidrogel que contenha os três materiais, através de uma associação polimérica, levando a uma soma de qualidade dos biopolímeros. Além disso, as NPM foram incluídas com o intuito de investigar se a presença dessas nanopartículas, quando submetidas a um campo magnético externo, pode modular a taxa de liberação do princípio ativo, seja facilitando a difusão por meio da geração de calor local (efeito magnetotérmico), promovendo alterações estruturais no hidrogel, ou, ao contrário, restringindo o transporte do fármaco em razão de interações físico-químicas entre o material

magnético e a matriz polimérica. Assim, busca-se compreender se a adição de magnetita atua como um agente facilitador ou inibidor na liberação do fármaco, contribuindo para o desenvolvimento de sistemas inteligentes e responsivos com potencial aplicação na área biomédica.

## 1.8 Citotoxicidade (CTT)

A citotoxicidade se refere à capacidade de um material provocar efeitos deletérios em células vivas, como a morte celular ou interferências em suas funções metabólicas (MALMONGE *et al.*, 2011). Ou seja, a citotoxicidade representa um dos primeiros parâmetros a serem avaliados dentro do escopo da biocompatibilidade. Já a biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material exercer suas funções específicas quando aplicado em tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem causar danos ou prejuízos ao mesmo (JORGE *et al.*, 2004; COSTA CAS, 2001). A Tabela 2, apresenta as principais diferenças entre citotoxicidade e biocompatibilidade.

**Tabela 2.** Principais diferenças entre citotoxicidade e biocompatibilidade

| <b>Critério</b>        | <b>Biocompatibilidade</b>                                             | <b>Citotoxicidade</b>                                                |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Definição              | Capacidade do material de interagir com o organismo sem causar danos. | Capacidade do material causar morte celular ou prejuízos funcionais. |
| Objetivo do Teste      | Avaliar o comportamento do material no ambiente biológico.            | Verificar toxicidade celular direta.                                 |
| Método de Análise      | In vitro, in vivo, pré-clínico, clínico.                              | Principalmente in vitro (cultura de células).                        |
| Etapas de Avaliação    | Etapas avançadas de análise de segurança.                             | Etapas iniciais de triagem de materiais.                             |
| Norma Técnica          | ISO 10993 (série completa), ANVISA RDC nº 185/2001.                   | ISO 10993-5 (especificamente para citotoxicidade).                   |
| Importância na Triagem | Avaliação final e holística do material.                              | Avaliação preliminar e essencial para exclusão de materiais tóxicos. |
| Resultados Esperados   | Ausência de reações adversas como inflamações, rejeições etc.         | Alta viabilidade celular e manutenção da função metabólica.          |

Fonte: Autoria Própria, 2023

Os biomateriais são classificados como produtos para saúde ou correlatos, e o seu registro no Ministério da Saúde, assim como sua regulamentação, são coordenados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. A ANVISA estabeleceu, sob a Resolução RDC n.º 185 de 22 de outubro de 2001, os parâmetros para que as empresas pudessem

apresentar todas as informações necessárias sobre os produtos para saúde, definidos como correlatos, para obtenção do registro (SEHNEM *et al.*, 2012).

Substâncias tóxicas e seus efeitos sobre os tecidos têm sido observados por meio de estudos em animais, observações clínicas e cultura de células *in vitro*. Os testes se dividem em testes iniciais, que envolvem o método de cultura de células; testes secundários, que incluem estudos com implantação dos materiais em tecidos subcutâneos; testes de sensibilidade e irritação, realizados na mucosa e testes pré-clínicos, que verificam a irritação pulpar e de implantes (HENSTEN PETTERSEN, 1988; WENNBERG, 1986; JORGE *et al.*, 2004).

Seguindo a norma do Órgão Internacional de Padronização (ISO – International Standard Organization), a ISO 10993, o primeiro teste a ser realizado para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos médicos é o ensaio de citotoxicidade (CTT). Os testes de CTT consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos. Podem ser realizados por diferentes mecanismos, como a incorporação de corantes vitais (por exemplo, azul de tripano ou MTT) ou a inibição da formação de colônias celulares (CRUZ *et al.*, 1987; GUSS *et al.*, 1965; ROGERO *et al.*, 2000; ROGERO *et al.*, 2003). Esses testes constituem a fase inicial da avaliação da biocompatibilidade de um material com potencial aplicação médica. Eles são essenciais para uma pré-seleção, detectando se o material em questão provoca morte celular (citólise), inibição do crescimento ou alterações nas funções celulares (MALMONGE *et al.*, 2011; BLACK, 1992; FRESHNEY, 1989). As técnicas *in vitro* são amplamente utilizadas para identificar os efeitos adversos que biomateriais ou dispositivos médicos possam acarretar às células, como forma de prever sua adequação ao uso humano. Para ser aprovado em um ensaio de citotoxicidade *in vitro*, o material não deve causar morte celular nem comprometer funções essenciais, como adesão, proliferação ou metabolismo. Esses testes permitem detectar eventos como lise celular, inibição da proliferação ou efeitos deletérios induzidos por substâncias presentes no material ou liberadas por ele. Os dois principais tipos de ensaio *in vitro* são o de contato direto, no qual o material é colocado em contato físico com uma monocamada de células aderidas previamente cultivadas, e o de contato indireto, que pode ser realizado por duas abordagens distintas: na primeira, o material é separado das células por uma barreira de difusão, geralmente composta por gel de ágar ou agarose, permitindo apenas a passagem de substâncias solúveis; na segunda, as substâncias são extraídas do material por meio de incubação em solventes apropriados, como o meio de cultura, e os extratos obtidos são então aplicados às

células para avaliação de possíveis efeitos citotóxicos (MALMONGE *et al.*, 2011). É importante ressaltar que os resultados dos testes *in vitro* não podem ser extrapolados imediatamente para condições clínicas em humanos. No entanto, esses ensaios são de extrema importância, pois ajudam a prever o comportamento biológico dos materiais e/ou de seus componentes, garantindo maior segurança no desenvolvimento e aplicação de biomateriais.

### **1.9 Mutagenicidade (MTT)**

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é encontrado em todo ser vivo, sendo a sequência de bases nitrogenadas a forma na qual a informação genética se armazena (LEWIN, 2001; LEHNINGER *et al.*, 1995; SANTOS, 2006). Por essa função essencial, o DNA é protegido, possuindo mecanismos próprios para prevenção e reparo de falhas no metabolismo. Contudo, ainda podem ocorrer mutações, que ocasionam alterações súbitas no conjunto gênico de um organismo que não são explicáveis pela recombinação da variabilidade genética pré-existente. As mutações podem ocorrer por processos normais, mutações espontâneas, ou ocasionada pela exposição dos organismos a agentes químicos ou físicos, mutações induzidas (LEWIN, 2001; LEHNINGER *et al.*, 1995; SANTOS, 2006). No dia a dia, estamos em contato com inúmeros agentes mutagênicos como a radiação solar, poluentes presentes no ar (o que se agrava cada vez mais, uma vez que os focos de queimadas pelo país se espalham), água e alimentos. Estima-se que milhões de trabalhadores estão expostos a agentes químicos mutagênicos, em seu dia a dia. Um exemplo são os agricultores expostos a pesticidas, agentes químicos que muitas vezes demonstram citotoxicidade e genotoxicidade em células (ONG *et al.*, 1986, HONGPING *et al.*, 2006; SANTOS, 2006). A avaliação da genotoxicidade pode ser feita analisando a interação do agente mutagênico com o DNA ou de seus efeitos. A capacidade de um composto se ligar no material genético pode ser avaliada observando os aductos no DNA, a capacidade de quebra do DNA determinada pela eluição alcalina ou teste cometa e além disso, as mutações cromossômicas e/ou genômicas podem ser quantificadas pelos testes do micronúcleo ou aberrações cromossômicas (SANTOS, 2006; VAN GOETHEM *et al.*, 1997). Alguns testes que são utilizados para avaliar a mutagenicidade são o teste de Ames e teste do Micronúcleo. O teste de Ames é amplamente utilizado para identificar mutágenos entre substâncias puras, misturas complexas e amostras ambientais. As linhagens utilizadas geralmente são a de *Salmonella typhimurium* que quando na presença de agentes mutagênicos, revertem seu caráter de auxotrofia para a síntese de histidina, formando colônias menos desprovida de aminoácidos (ZEIGER, 2001; SANTOS, 2006). Neste caso, através da contagem de colônias é possível

estabelecer a ação mutagênica de um composto em função de sua concentração. O teste de micronúcleo permite quantificar a exposição a agentes químicos ou à radiação, mesmo que os micronúcleos possam ser originados espontaneamente, a sua indução é usada para detectar danos genotóxicos resultantes de exposição a agentes mutagênicos (TUCKER e PRESTON, 1996; MAJER et al; 2001)

## 2

## OBJETIVOS

O objetivo desse projeto foi obter um hidrogel de FB/BCNC/GG/DS, funcionalizadas com NPM, aplicável na impressão 3D, visando a liberação controlada de fármacos.

### 2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a obtenção de CNC por hidrólise ácida, com monitoramento em diferentes tempos reacionais, visando identificar a condição que garantisse maior rendimento e a presença de birrefringência como indicativo da formação de estruturas cristalinas.
- Avaliar a influência da adição de FB e GG nas propriedades estruturais e biológicas de hidrogéis de CNC, considerando sua potencial aplicação na printabilidade.
- Desenvolver e caracterizar hidrogéis híbridos contendo CNC/FB/GG, e GG/BCNC/FB/NPM incorporando o diclofenaco de sódio, avaliando suas propriedades morfológicas, reológicas, de printabilidade, liberação controlada e citotoxicidade frente a fibroblastos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento deste trabalho ocorreu em duas etapas, uma realizada na Suíça, no laboratório de madeira e celulose (EMPA), durante o estágio BEPE (Bolsa Estágio Pesquisa no Exterior) da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), para a obtenção das melhores técnicas e composições para o hidrogel de FB/CNC/GG e outra no Brasil, no laboratório de materiais Fotônicos da UNESP e laboratório de biopolímeros e biomateriais da UNIARA, onde foi obtido o hidrogel de BCNC/FB/GG/NPM/DS. Dessa forma, o trabalho será dividido em duas partes, uma o desenvolvimento do hidrogel FB/CNC/GG e outra, do hidrogel FB/BCNC/GG/NPM/DS

#### 3.1 Obtenção do Hidrogel de FB/CNC/GG

##### 3.1.1 Extração de BCNC

Para a preparação dos hidrogéis CNC/FB/GG e GG/BCNC/FB/NPM, foram empregados procedimentos distintos para a extração BCNC. No caso do hidrogel CNC/FB/GG, a celulose bacteriana previamente seca foi fragmentada em um moinho de facas IKA A11 basic, seguida de hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico a 64% (m/m), sob aquecimento a 50 °C e agitação constante por 120 minutos. Visando maximizar a eficiência da obtenção dos BCNC por meio da hidrólise ácida, foram coletadas alíquotas em diferentes intervalos de tempo (10, 20, 30, 40, 50, 60 e 120 minutos) para análise visual, concentração em solução e verificação da presença de birrefringência, uma propriedade típica dos cristais de celulose, conforme apresentado na Tabela 3. Para interromper a reação, pedras de gelo foram adicionadas imediatamente à solução. Posteriormente, os BCNC foram centrifugados em uma centrífuga Ohaus Frontier 518R, a 5000 rpm por 10 minutos, em triplicata, sendo o resíduo descartado. Na etapa final, os BCNC foram submetidos à diálise em membranas de acetato de celulose contra água destilada, até a neutralização completa (pH 7).

**Tabela 3:**Tempo de coleta de cada alíquota

| Nome da amostra | Tempo (min) |
|-----------------|-------------|
| Alíquota 1      | 10          |
| Alíquota 2      | 20          |
| Alíquota 3      | 30          |
| Alíquota 4      | 40          |
| Alíquota 5      | 50          |
| Alíquota 6      | 60          |
| Alíquota 7      | 120         |

**Fonte:** Autoria Própria, 2023.

Para o hidrogel GG/BCNC/FB/NPM, a extração dos BCNC seguiu o método descrito por Lima *et al.* (2015), com algumas modificações. Inicialmente, a celulose bacteriana seca foi triturada no mesmo moinho de facas IKA A11 basic, sendo posteriormente submetida à hidrólise ácida com ácido sulfúrico 64% (m/v), também sob aquecimento a 50 °C e agitação, mas por um tempo reduzido de 30 minutos. Para cessar a reação de hidrólise, adicionou-se imediatamente dez vezes o volume de água gelada, em vez de pedras de gelo. Em seguida, os BCNC foram centrifugados em uma centrífuga Ohaus Frontier 518R, por 10 minutos a 10.000 rpm, também em triplicata, sendo neste caso o corpo de fundo recolhido. A diálise subsequente foi conduzida em membranas de acetato de celulose contra água Milli-Q, porém sem fluxo contínuo, realizando-se trocas constantes da água até atingir pH neutro (pH 7).

As principais diferenças entre os procedimentos referem-se ao estado inicial da celulose bacteriana (com água e sem água), ao tempo de hidrólise (60 minutos para o CNC/FB/GG e 30 minutos para o GG/BCNC/FB/NPM), à forma de interrupção da reação (adição de pedras de gelo no primeiro método e diluição com água gelada em grande volume no segundo) e à estratégia de diálise (em água destilada corrente no primeiro e em água Milli-Q com trocas pontuais no segundo).

### **3.1.2 Extração da FB**

O protocolo de Rockwood *et al.* (2011) foi utilizado para a extração de F. Primeiramente, 10 g de casulos de bicho-da-seda, obtidos de *Anhui Natural Source Impex LTDA*, foram pesados. Os casulos foram cortados e submetidos a degomagem em um béquer de 4 L usando uma solução de carbonato de sódio 0,02 mol/L, sob aquecimento por 30 minutos após a água atingir 85 °C. Em seguida, a FB foi coletada para lavagem, em triplicata, usando 1 L de água ultrapura e agitação mecânica por 30 minutos. Posteriormente, a FB foi mantida em uma estufa a 60 °C durante a noite para remoção do excesso de água. Para o processo de dissolução da FB, em 10 g de FB, foram adicionados 100 mL de CaCl<sub>2</sub>/Etanol/H<sub>2</sub>O (1:2:8 em proporções molares), a 85 °C. A solução obtida, foi então dialisada contra água Milli-Q, utilizando membranas de acetato à temperatura ambiente por 48 horas. Por fim, a FB obtida foi centrifugada a 13.000 rpm por 30 minutos a 5 °C para remoção de impurezas e em seguida, armazenada a 5 °C.

### 3.1.3 Obtenção do hidrogel de CNC/FB/GG

Para a preparação dos hidrogéis, foram primeiramente obtidas misturas com diferentes composições de FB, GG e CNC (origem vegetal). Em seguida, foram realizados testes preliminares na impressora 3D e no reômetro, para avaliar se a reologia era adequada para impressão tridimensional. Esses testes determinaram a melhor concentração de cada componente. Resumidamente, para obter os hidrogéis, os CNC liofilizados foram misturados com FB em um speed mixer *Hauschild* a 2250 rpm por 5 minutos. Após a mistura completa, a amostra foi levada a uma chapa de aquecimento com agitação e sob aquecimento a 90 °C. Ao atingir 70 °C, a GG foi incluída na amostra. Finalmente, após homogeneização completa, o hidrogel foi deixado à temperatura ambiente até esfriar completamente. Diversas concentrações de hidrogéis foram preparados, variando a concentração de CNC, FB e GG, para obter os melhores dados de reologia e as melhores estruturas tridimensionais. A Tabela 4 apresenta as amostras de hidrogéis e suas respectivas composições, destacando exclusivamente as proporções consideradas promissoras para a aplicação proposta. Para que uma formulação fosse classificada como promissora, foram adotados critérios como a capacidade de formar filamentos estáveis ( $G' > G''$ ), comportamento pseudoplástico, ausência de obstrução da agulha durante o processo de impressão e a fidelidade de forma pós impressão 3D. Ao longo de todo o trabalho, a seleção das formulações mais adequadas seguiu rigorosamente esses parâmetros.

**Tabela 4:** Proporções utilizadas em massa (m/m) para obtenção dos hidrogéis desenvolvidos

| Amostra | CNC (%) | FB (%) | GG (%) | Água (%) |
|---------|---------|--------|--------|----------|
| 1       | 6       | 1      | 0.75   | 92,25    |
| 2       | 7       | 1      | 0.75   | 91,25    |
| 3       | 8       | 1      | 0.75   | 90,25    |
| 4       | 10      | 0.5    | 0.5    | 89       |
| 5       | 10      | 1      | 0.5    | 88,5     |
| 6       | 10      | 1      | 1      | 88       |
| 7       | 11      | 0,5    | 0,5    | 88       |

Fonte: Autoria Própria, 2023.

Os resultados da reologia foram determinantes para identificar os géis com propriedades adequadas à impressão tridimensional, permitindo selecionar os materiais mais indicados para esse fim.

### 3.1.4 Liofilização e Determinação da Massa Seca

Para as análises posteriores, FTIR e MEV, os precursores (BCNC e FB), e os hidrogéis, foram liofilizados. A GG já estava liofilizada. Para a liofilização, os materiais foram congelados a -80 °C por 2 dias e depois liofilizados em um liofilizador *Lyovac (SRK system*

*technik GMBH*). A massa seca foi determinada em estufa, obtendo 5% (m/m) de BCNC e 4% (m/m) de FB.

### **3.1.5 Caracterização dos hidrogéis de CNC/FB/GG**

#### **3.1.5.1 Reometria**

As propriedades reológicas das tintas foram determinadas usando um reômetro AR 2000ex (*TA Instruments, New Castle, EUA*) com geometria de placas paralelas de 20 mm. Medições dinâmicas foram realizadas na faixa de frequência de 0,1–100 Hz, a 25 °C. Os módulos elásticos ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) foram medidos com uma varredura oscilatória de tensão logarítmica a 1 Hz.

#### **3.1.5.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)**

Os espectros foram obtidos com um espectrofotômetro *SHIMADZU IRTracer-100*, utilizando módulo de transmissão ATR com cristal de germânio, no EMPA (Swiss Federal Laboratories for Material Science and Technologie). As condições incluíram 64 varreduras de fundo, resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  e faixa de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ . As amostras analisadas foram FB, CNC (origem vegetal), BCNC, GG e o hidrogel composto por 10% CNC, GG e FB. Os dados foram processados utilizando o software OriginPro 9.0.

#### **3.1.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)**

A morfologia dos BCNCs foi caracterizada por TEM (*Jeol JEM-2200FS, USA Inc.*, no EMPA) usando uma voltagem de aceleração de 200 kV. Uma gota de suspensão diluída dos BCNC foi depositada em uma grade revestida com carbono. As amostras foram coradas com solução a 2% m/m de acetato de uranila. O diâmetro e o comprimento médios dos CNCs foram medidos com o software Image J.

#### **3.1.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O MEV foi realizado em amostras de 0,5 cm de comprimento, fixadas com fita adesiva de carbono em suportes de alumínio. Uma camada fina de platina ( $\approx 2\text{ nm}$ ) foi depositada na superfície dos materiais. Um FEI Nova NanoSEM 230 (*FEI, Hillsboro, OR*), que se encontra no EMPA, foi usado a 5 kV e 5 mm de distância de trabalho. As análises determinaram a morfologia da superfície das estruturas impressas à base de água.

#### **3.1.5.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)**

Imagens de altura e fase obtidas por AFM avaliaram os BCNC na solução alcançada. As estruturas foram investigadas com um *Multimode Nanoscope VIII*, em modo tapping,

usando pontas PPP-NCLR-20 (Nanosensors), constante de mola de 21–98 N/m e frequência de ressonância de 146–236 kHz.

### **3.1.6 Impressão 3D**

Antes dos testes de impressão, as tintas foram carregadas em seringas de 5 mL e centrifugadas a 3600–4500 rpm por 3 minutos para remoção de bolhas. As tintas foram montadas em uma impressora 3D (*EnvisionTEC Bioplotter*) com bicos cônicos (diâmetro de 410 µm). A extrusão foi realizada pneumáticamente na faixa de 0,6 – 2,0 bar, com taxa de extrusão de 12–20 mm/s e com agulhas de 0,4 mm a 0,8 mm.

## **3.2 Obtenção do hidrogel GG/BCNC/FB/NPM/DS**

### **3.2.1 Síntese das NPM**

Para a realização da síntese das NPM, foi utilizado o método da coprecipitação dos sais de ferro. Em um Becker a 25 °C, com 100 ml de água sob agitação, foi feita a purga com gás Nitrogênio, para que houvesse a remoção de oxigênio. Em seguida, foi adicionada 1,5 g de Cloreto de Ferro II tetrahidratado, terminada a homogeneização, adicionou-se 2,45 g de Cloreto de Ferro III. Por fim, foi adicionado, gota a gota, uma solução de hidróxido de amônio 1,5 M. Quando pH entorno de 9-10 foi atingido, o procedimento foi encerrado. Para realizar a lavagem das NPM em solução, foi utilizado um ímã de NdFeB, que permitem que as NPM sejam coletadas, a lavagem com água destilada foi realizada em triplicata. Ao final da lavagem, coletou-se as NPM e as armazenou em 50 mL de Acetona.

### **3.2.2 Obtenção da curva analítica do DS**

Para a obtenção da curva analítica do diclofenaco de sódio (DS) utilizou-se o trabalho de Gabriel, Wondu e Dilebo (2021), como referência. Em suma, foram preparadas 8 concentrações diferentes, a partir de uma solução estoque de 100 ug/ml de diclofenaco de sódio em PBS (pH 7,4). As concentrações utilizadas foram de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 ug/ml, sendo que para cada concentração, foi feito uma triplicata, totalizando 24 balões com as respectivas concentrações. Em seguida, foi utilizado um espectrofotômetro UV/VIS Lambda 365 da Perkin Elmer, para a obtenção das medidas de absorção no comprimento de onda de 276 nm. PBS (pH 7,4) foi utilizado como branco. Por fim, foi feita uma média das absorbâncias para cada triplicata realizada e construída uma curva de calibração de absorbância versus concentração em ug/ml.

### 3.2.3 Obtenção do hidrogel de GG/BCNC/FB/NPM/DS

Foram preparados 7 diferentes hidrogéis (Amostra 8 a 14), contendo BCNC, FB, GG, NPM e DS. Para a proporção de BCNC, FB e NPM foi calculado uma proporção de 10%, dividida igualmente entre os três componentes (3,3%), enquanto a GG representava 2,5% e o DS 3% (Tabela 5). As soluções de BCNC, FB, NPM e DS, foram misturadas, sob agitação magnética e com temperatura de 90 °C, para homogeneização e, em seguida, foram adicionados à GG

**Tabela 5:** Proporção das concentrações de teores mássicos (em %) dos hidrogéis desenvolvidos.

| Composição | Amostra 8 | Amostra 9 | Amostra 10 | Amostra 11 | Amostra 12 |
|------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| GG (%)     | 2,5       | 2,5       | 2,5        | 2,5        | 2,5        |
| FB (%)     | 0         | 0         | 3,3        | 3,3        | 0          |
| BCNC (%)   | 0         | 3,3       | 0          | 3,3        | 0          |
| NPM (%)    | 0         | 0         | 0          | 0          | 3,3        |
| DS (%)     | 3         | 3         | 3          | 3          | 3          |
| Água (%)   | 94,5      | 91,2      | 91,2       | 87,9       | 91,2       |

| Composição | Amostra 13 | Amostra 14 | Amostra 15 | Amostra 16 | Amostra 17 | Amostra 18 |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| GG (%)     | 2,5        | 2,5        | 2          | 2,5        | 2          | 2,5        |
| FB (%)     | 3,3        | 3,3        | 0          | 0          | 0,25       | 0,31       |
| BCNC (%)   | 3,3        | 3,3        | 0          | 0          | 1,25       | 1,56       |
| NPM (%)    | 3,3        | 3,3        | 2          | 2,5        | 0,5        | 0,63       |
| DS (%)     | 0          | 3          | 0          | 0          | 0          | 0          |
| Água (%)   | 87,6       | 84,6       | 95,5       | 95         | 95,5       | 95         |

| Composição | Amostra 19 | Amostra 20 |
|------------|------------|------------|
| GG (%)     | 2          | 2,5        |
| FB (%)     | 0,67       | 0,83       |
| BCNC (%)   | 0,67       | 0,83       |
| NPM (%)    | 0,67       | 0,83       |
| DS (%)     | 0          | 0          |
| Água (%)   | 95,5       | 95         |

Fonte: Autoria Própria, 2023.

### 3.2.4 Liofilização e determinação da massa seca

Para a realização das análises, os precursores (BCNC, FB, NPM e GG), juntamente com as amostras 8 a 14, foram liofilizados. O DS e a GG já se encontravam liofilizados. Para a realização da liofilização os materiais foram congelados em -80°C por 2 dias e, em seguida, liofilizados em um liofilizador de bancada *L101 da Alfa Mare*. A determinação da massa seca dos materiais foi obtida utilizando um medidor de umidade *ID-50 da Marte científica*, obtendo 2,5% (m/m) dos BCNC, 4% (m/m) da FB e 3% das NPM

### **3.2.5 Caracterização dos hidrogéis de GG/BCNC/FB/NPM/DS**

#### **3.2.5.1 Reometria**

As análises de reometria foram realizadas utilizando um reômetro modelo *AR1500 EX (TA Instruments)*. Para a coleta dos dados, foi utilizado o modelo proposto por Dávila & D'ávila (2019) com modificações. Utilizou-se uma geometria placa-placa jateada de 40 mm de diâmetro e com GAP, espaço onde se encontra amostra, de 5,5 mm, sob temperatura ambiente. Com o intuito de obter as medidas de viscosidade, primeiro realizou-se o teste de varredura de amplitude, definindo o intervalo de viscoelasticidade linear (LVE) ( $\gamma_0 = 0,25\%$ ). Em seguida, a varredura de frequência foi realizada para os hidrogéis. Por fim, um aumento de estresse foi necessário para simular o processo de extrusão pelo método de fluxo, as medidas de viscosidade foram realizadas na faixa de 0,01 a 700 s<sup>-1</sup>. Para o tratamento estatístico, os dados obtidos foram submetidos a lei de potências para a obtenção do valor de viscosidade média.

#### **3.2.5.2 Análise Termogravimétrica**

A análise termogravimétrica foi realizada para estabelecer as propriedades térmicas das amostras 8 a 14, juntamente com seus controles (FB, BCNC, GG, NPM e DS), avaliando alterações de comportamento do material. Foi utilizado o equipamento da *TA Instruments* usando uma célula *SDT Q600*. O procedimento utilizado foi um intervalo de temperatura de 30 a 600 °C, com uma taxa de 10 °C/min em atmosfera de gás nitrogênio sob vazão de 100 mL/min. As amostras foram submetidas previamente ao processo de liofilização.

#### **3.2.5.3 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)**

Para a obtenção dos espectros, foi utilizado um espectrofotômetro *VERTEX 70 da BRUKER*, com módulo de transmissão ATR com cristal de germânio, no Instituto de Química da UNESP, apresentando background de 64 scan, resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e a faixa de resolução de 4000 cm<sup>-1</sup> a 400 cm<sup>-1</sup>. Os grupos amostrais foram compostos pelas amostras 8 a 14, e seus respectivos controles (FB, BCNC, NPM, GG e DS).

#### **3.2.5.4 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)**

Para a realização do TEM foi utilizada o microscópio *Phillips CM200*, operando a 200 kV, com emissor de filamento de LAB6. As amostras foram preparadas pela dispersão em água e mantidas em banho de ultrassom por 10 min, posteriormente foi gotejado 1 microlitro da suspensão em grid de cobre (TED PELLA, type B, 400 mesh), que foi seca em temperatura e pressão ambiente, para posterior realização da análise.

### **3.2.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

O MEV foi utilizado para avaliar a morfologia da superfície das amostras, utilizando um equipamento JEOL JMF-6700F. Para a realização das análises, o microscópio foi operado na tensão de 2kV e também, as amostras foram depositadas em suportes de cobre e realizado um recobrimento de carbono com espessura de 1-10nm. As amostras utilizadas foram os hidrogéis (amostra 15, amostra 16, amostra 17, amostra 18, amostra 19 e amostra 20), e seus respectivos controles (FB, BCNC, GG e NPM). As amostras foram submetidas previamente ao processo de liofilização para a realização da Microscopia.

### **3.2.5.6 Liberação in vitro do diclofenaco de sódio nos hidrogéis preparados (Espectroscopia UV-VIS)**

Para a realização dos ensaios in vitro de dissolução das amostras 9,11 e 14, foi utilizado um dissolutor modelo 299 da *Ethik technology*, utilizando os cestos (Aparato I) de aço inox *AISI 316*. Em suma, foi colocado 1 g de cada amostras nos cestos, a análise foi feita em triplicata, sob aquecimento de 37 °C, com o intuito de simular a temperatura corporal e sob agitação de 100 rpm. Cada coleta de solução foi realizada com tempo pré-determinado, sendo eles 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos. Coletada as amostras, as absorbâncias foram medidas em um espectrofotômetro UV/VIS Lambda 365 da *Perkin Elmer*, no comprimento de onda de 276 nm. PBS (pH 7,4) foi utilizado como branco

### **3.2.6 Ensaio de citotoxicidade e mutagenicidade**

#### **3.2.6.1 Obtenção do hidrogel de FB/BCNC/GG/NPM para os ensaios de citotoxicidade (CTT) e mutagenicidade (MTT)**

Foram preparados 2 diferentes hidrogéis, amostra 15 e amostra 16, os quais foram utilizados para avaliar a citotoxicidade (CTT) e mutagenicidade (MTT), esses hidrogéis continham BCNC, FB, GG e NPM (Tabela 6). O método de preparo dos hidrogéis foi o mesmo que os hidrogéis de BCNC/FB/GG/NPM/DS, apresentados anteriormente. É importante ressaltar que esses hidrogéis foram selecionados por terem apresentado a melhor composição quando avaliado a sua reologia e também a concentração dos constituintes para a realização do teste e, por isso, essa composição foi selecionada para a realização da análise de CTT e MTT

**Tabela 6:** Proporção das concentrações de teores mássicos (em %) dos hidrogéis desenvolvidos.

| Composição | Amostra 21 | Amostra 22 |
|------------|------------|------------|
| GG (%)     | 0,3        | 0,3        |
| FB (%)     | 0,3        | 0,3        |
| BCNC (%)   | 6          | 6          |
| NPM (%)    | 0,3        | 0          |

Fonte: Autoria Própria, 2023.

### 3.2.7 Liofilização

Para a realização das análises, os precursores (BCNC, FB, NPM e GG), juntamente com as amostras 15 e 16, foram liofilizados. Os materiais foram congelados em -80°C por 2 dias e, em seguida, liofilizados em um liofilizador de bancada L101 da Alfa Mare.

### 3.2.8 Caracterização da citotoxicidade celular e mutagenicidade dos hidrogéis de GG/BCNC/FB/NPM

#### 3.2.8.1 Avaliação de Citotoxicidade celular

Para a realização do ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas duas linhagens celulares: fibroblastos murinos derivados de tecido conjuntivo (L929), obtidos da American Type Culture Collection (ATCC), e células de osteossarcoma humano (Saos-2), fornecidas pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

As culturas celulares foram inicialmente mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich®) e meio McCoy (Sigma-Aldrich®), ambos enriquecidos com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco™) e 1% de ciprofloxacino (Sigma-Aldrich®). As células foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após dois repiques sucessivos, foi iniciado o ensaio, semeando-se  $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços. As placas foram mantidas em incubadora por 24 horas sob as mesmas condições de temperatura e concentração de CO<sub>2</sub>.

Simultaneamente, foram preparados os eluatos das amostras. Para isso, 30 mg de cada amostra foram pesados e transferidos para tubos cônicos de 15 mL, aos quais foram adicionados 2 mL de meio de cultura, resultando em uma concentração de 15 mg/mL. As amostras foram expostas à luz ultravioleta germicida por 30 minutos, com o objetivo de garantir a esterilidade. Em seguida, os tubos foram incubados por 24 horas em agitador orbital a 150 rpm, a 37 °C.

Após a incubação, os eluatos foram testados nas seguintes concentrações: 0,5 mg/mL; 1 mg/mL; 2,5 mg/mL; 5 mg/mL; e 10 mg/mL. As células foram então expostas aos eluatos (100 µL por poço), sendo novamente incubadas por 24 horas. Após esse período, os meios foram removidos, e os poços lavados duas vezes com solução tampão Phosphate Buffered Saline (PBS).

Na sequência, adicionou-se 100 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio brometo) previamente preparada na concentração de 1 mg/mL. As placas foram incubadas por mais 3 horas a 37 °C, protegidas da luz, até que se formassem cristais roxos de formazana. Após esse tempo, a solução de MTT foi descartada e os cristais dissolvidos com a adição de 50 µL de álcool isopropílico absoluto por poço.

Cada condição experimental foi testada em triplicata. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro de microplacas (SoftMax® Pro 5), com comprimento de onda ajustado para 570 nm. Como controle positivo (morte celular), utilizou-se DMSO (Dimetilsulfóxido) a 10%. Para controle negativo (viabilidade celular), foram utilizadas células cultivadas apenas com DMEM + 10% SFB ou McCoy + 10% SFB, conforme o meio específico da linhagem. Poços sem células, contendo apenas os reagentes utilizados, foram utilizados como branco.

Com base nos dados de absorbância (Abs), foi calculada a viabilidade celular percentual em relação ao controle negativo, considerado como 100% de viabilidade, conforme a fórmula recomendada pela norma ISO 10993-5 (Equação 1) (MOSMANN *et al.*, 1983).

$$\frac{(Abs \text{ da amostra} - Abs \text{ branco})}{(Abs \text{ do controle de sobrevivência} - Abs \text{ branco})} \times 100 \quad (1)$$

### **3.2.8.2 Mutagenicidade**

#### **3.2.8.2.1 Teste de Ames**

A avaliação da mutagenicidade foi realizada por meio do teste de Ames, utilizando o protocolo de pré-incubação descrito por Maron e Ames (1983). Foram empregadas as linhagens de *Salmonella Typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a, gentilmente fornecidas pela Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Essas cepas foram originalmente disponibilizadas pelo Dr. Bruce Ames, da Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA.

Para o preparo das culturas, uma pequena alíquota da estirpe congelada foi transferida com auxílio de uma alça de inoculação para 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2). As culturas foram incubadas em agitador orbital a 37 °C, entre 14 e 16 horas, até alcançarem uma densidade bacteriana de aproximadamente  $1-2 \times 10^9$  células/mL.

As amostras foram preparadas na concentração de 0,025 g/mL, utilizando tampão fosfato como veículo. Essa concentração foi determinada com base na capacidade de intumescimento das amostras 1 e 2, já que concentrações superiores resultaram na formação de géis, inviabilizando a análise.

Nos tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M, 0,1 mL da cultura bacteriana e volumes variados dos eluatos das amostras (entre 12,5 e 100 µL por placa). As misturas foram incubadas a 37 °C por 20 a 30 minutos. Após esse período, 2 mL de *top agar* (ágar de superfície) suplementado com traços de L-histidina e D-biotina foram adicionados a cada tubo. O conteúdo foi homogeneizado levemente e vertido sobre placas de ágar mínimo contendo glicose. Após solidificação do meio, as placas foram mantidas em incubação a 37 °C por 48 horas.

Terminada a incubação, realizou-se a contagem manual das colônias revertentes em cada placa. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para validação dos testes, foram utilizados agentes mutagênicos padrão específicos para cada linhagem: 4-nitro-o-fenilenodiamina (10 µg/placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg/placa) para TA100, e mitomicina C (0,5 µg/placa) para TA102. O controle espontâneo foi estabelecido com placas que não receberam nenhum tratamento, representando a taxa basal de reversão espontânea.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram avaliados por análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste post hoc de Dunnett, comparando-se os grupos experimentais ao controle negativo. Além disso, foi calculado o Índice de Mutagenicidade (IM) para cada concentração avaliada, conforme apresentado na Equação 2.

$$IM = \frac{\text{número de revertentes\_placa com o composto teste (revertentes induzida)}}{\text{Número de revertentes\_placa com o com controle espontâneo}} \quad (2)$$

Uma amostra é considerada mutagênica quando apresenta uma diferença estatisticamente significativa segundo a análise de variância (ANOVA), com valor de  $p < 0,05$ , e quando a média do número de colônias revertentes é pelo menos duas vezes superior à observada no controle negativo, em ao menos uma das concentrações testadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados obtidos para o hidrogel de CNC/FB/GG

#### 4.1.1 Birrefringência dos BCNC

BCNC são partículas anisotrópicas, ou seja, possuem orientação aleatória devido ao movimento browniano e, quando submetidos ao cisalhamento, as partículas se alinham em uma direção preferencial, tornando o fluido birrefringente. A birrefringência é uma propriedade relacionada ao comportamento reológico, amplamente explorada em cristais nanocelulósicos, que exibem esse tipo de comportamento quando submetidos a campos magnéticos, elétricos e mecânicos, podendo ser observada sob luz polarizada em diferentes direções (LANE, RODE, ROSGEN, 2022; CHOWDHURY, 2017). Neste trabalho, diferentes extrações de BCNC foram realizadas, buscando a melhor possível, e, para isso, diferentes parâmetros foram testados durante a hidrólise ácida com ácido sulfúrico. A Tabela 7 apresenta os diferentes parâmetros utilizados na extração.

**Tabela 7:** Diferentes parâmetros utilizados na hidrólise ácida da celulose bacteriana para a obtenção dos BCNC

| Testes | Tempo (min) | Temperatura(°C) | Estado da celulose bacteriana (Precursor) |
|--------|-------------|-----------------|-------------------------------------------|
| 1      | 20          | 50              | Seca                                      |
| 2      | 30          | 50              | Seca                                      |
| 3      | 45          | 50              | Seca                                      |
| 4      | 60          | 50              | Seca                                      |
| 5      | 120         | 50              | Seca                                      |
| 6      | 20          | 50              | úmida                                     |
| 7      | 30          | 50              | úmida                                     |
| 8      | 45          | 50              | úmida                                     |
| 9      | 60          | 50              | úmida                                     |
| 10     | 120         | 50              | úmida                                     |

Fonte: Autor, 2023

Para determinar os melhores parâmetros, durante a hidrólise, alíquotas foram coletadas para observar a presença ou ausência de partículas de celulose bacteriana que não sofreram hidrólise. Inicialmente, observou-se que a solução extraída utilizando folhas de celulose bacteriana secas, estavam produzindo uma solução amarronzada, o que não é característico, conforme apresentado na Figura 5.

**Figura 5:** Solução de BCNC extraídas usando folhas de celulose bacteriana secas



**Fonte:** Autor, 2023

Utilizando celulose bacteriana seca, o ácido interage rapidamente com a superfície do material, fazendo com que as partes mais internas demorem a entrar em contato com o ácido. Assim, mesmo após 2 horas de extração, ainda era possível observar que a hidrólise não havia ocorrido 100%. Nesse sentido, decidiu-se utilizar folhas de celulose bacteriana úmidas para realizar a hidrólise, e observou-se que, após 1 hora de extração, a solução já apresentava aspectos mais semelhantes a BCNC, conforme mostrado na Figura 6.

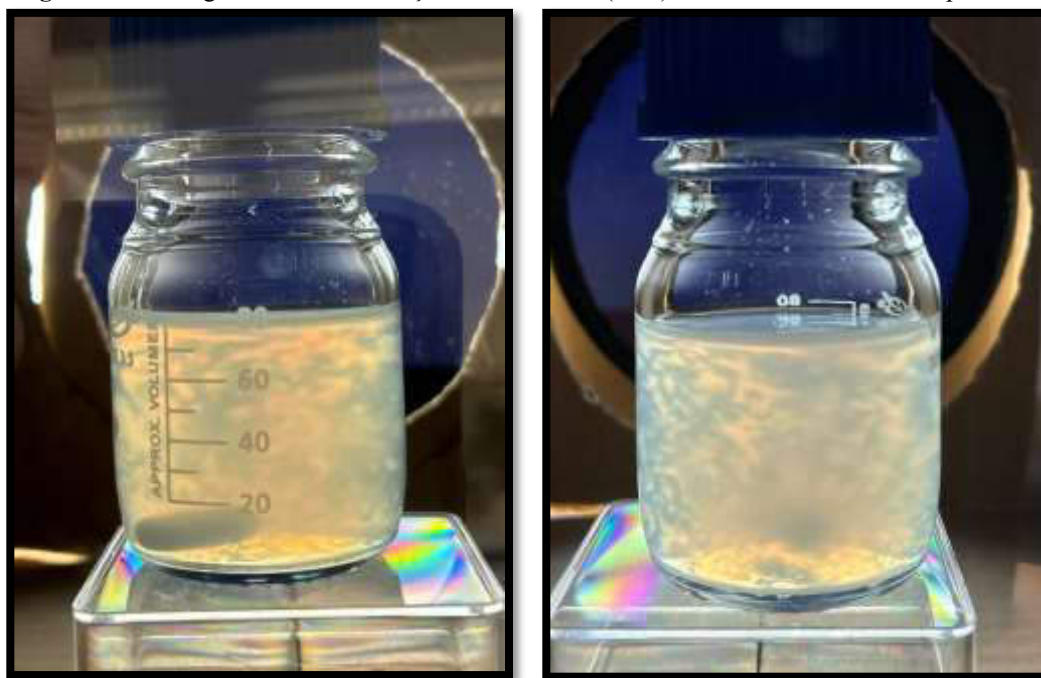
**Figura 6:** Solução de BCNC extraídas usando folhas de celulose bacteriana úmidas



**Fonte:** Autor, 2023

Por fim, para prever se o método de extração estava sendo realmente eficaz, foram realizadas análises de birrefringência nas soluções de BCNC extraídas, utilizando dois polarizadores. Foi possível observar que os BCNC apresentam uma orientação preferencial de suas cadeias de celulose de acordo com a direção da luz, conforme já apresentado na literatura (LANE, RODE, ROSGEN, 2022; CHOWDHURY, 2017). Assim, concluiu-se que o melhor método de extração foi o do teste 9, permitindo avançar para as etapas de análise morfológica dos BCNC. A Figura 7 mostra a birrefringência dos BCNC.

**Figura 7:** Birefringência de uma solução de BCNC 3%(m/V), observadas usando dois polarizadores

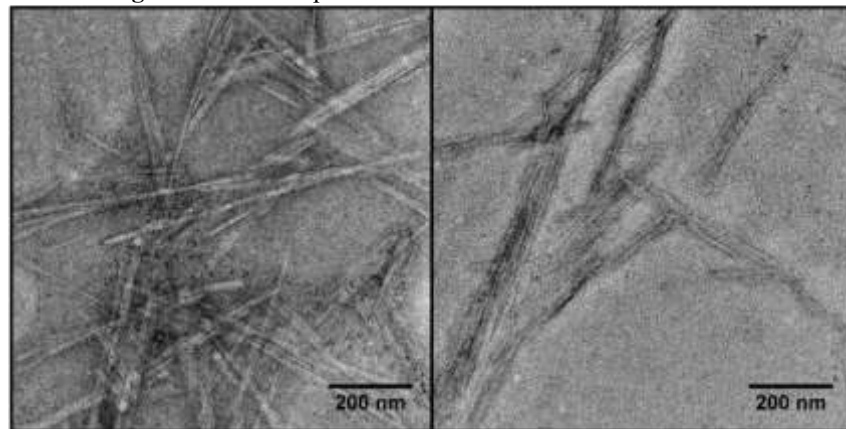


Fonte: Autor, 2024

#### **4.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM)**

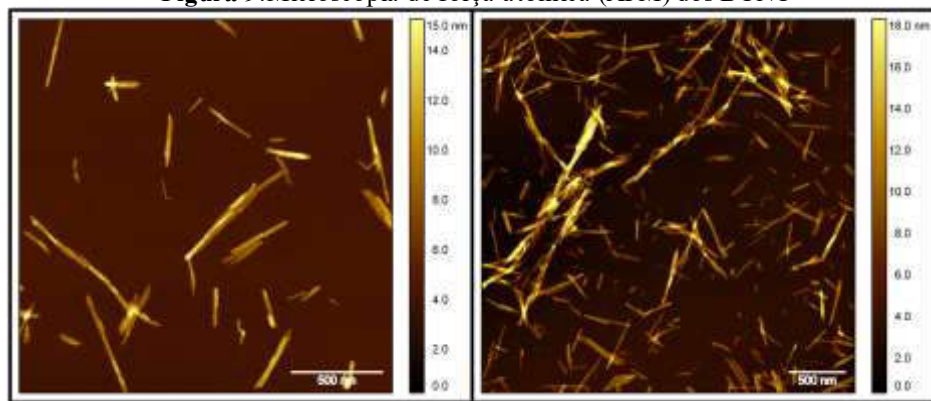
A morfologia e o tamanho dos materiais foram confirmados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM). As Figuras 8 e 9 mostram, respectivamente, as imagens de TEM e AFM dos cristais nanocelulósicos de celulose bacteriana, enquanto a Figura 10 apresenta o histograma da distribuição de comprimento dos BCNC extraídos.

**Figura 8:**Microscopia Eletrônica de Transmissão dos BCNC



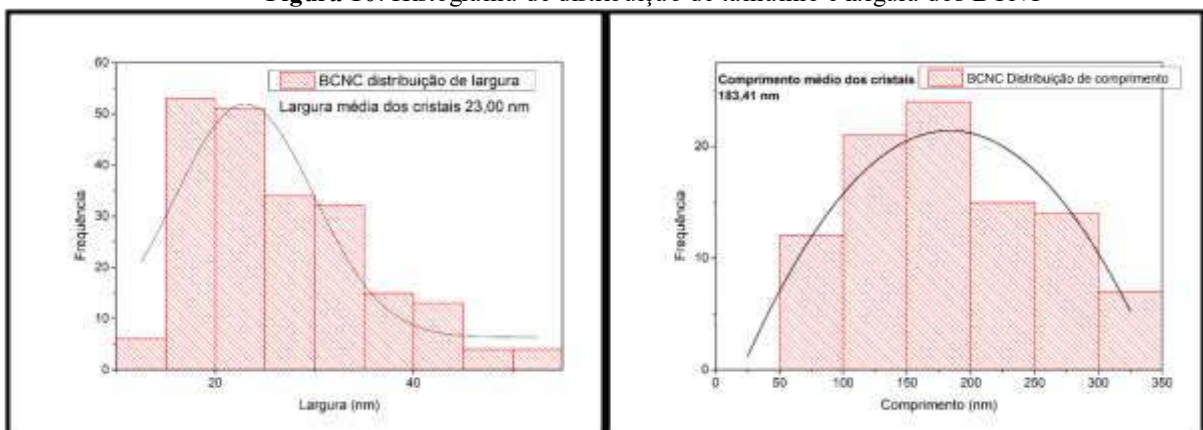
Fonte: Autor, 2023

**Figura 9:**Microscopia de força atômica (AFM) dos BCNC



Fonte: Autor, 2023

**Figura 10:** Histograma de distribuição de tamanho e largura dos BCNC



Fonte: Autor, 2023

Assim, foi possível concluir, de acordo com as Figuras 8 e 9, que os BCNC possuem forma de agulhas (whiskers) e que sua distribuição é polidispersa, com comprimento médio de

$183 \pm 7,28$  nm e espessura média de  $23 \pm 0,61$  nm. Sendo assim, a razão de aspecto é  $7,96 \pm 0,38$  nm.

Vale destacar que os BCNC são definidos por terem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica (1 a 100 nm) e, conforme observado, o diâmetro dos BCNC está na escala nanométrica. A razão de aspecto (RA) dos BCNC é uma das propriedades morfológicas mais relevantes para determinar seu desempenho em diferentes aplicações, como materiais compósitos, hidrogéis, liberação controlada de fármacos, entre outras. A RA, definida como a razão entre o comprimento e a espessura (L/D), afeta diretamente a rigidez, a estabilidade coloidal, o comportamento reológico e a orientação anisotrópica dos BCNC em solução ou matriz sólida. Neste estudo, a razão dos BCNC encontra-se dentro da faixa típica para BCNC, embora esteja mais próxima dos valores inferiores quando comparada a outros relatos da literatura. Por exemplo, Moraes *et al.* (2016) relataram BCNC com comprimentos entre 318 e 490 nm e diâmetros de 3,8 a 16 nm, resultando em razões de aspecto que variam amplamente entre 19 a 64, dependendo das condições de hidrólise e da técnica de dispersão. Já Barud *et al.* (2016) descreveram dimensões menores e mais próximas às do presente trabalho, com comprimentos de 100–200 nm e diâmetros de 15–20 nm, o que resultou em razões de aspecto de 7,5, para 30 minutos de hidrólise, valor condizente com os valores encontrado nesse trabalho. A Tabela 8 apresenta alguns dados da literatura.

A razão de aspecto obtida neste estudo, embora mais modesta, pode ser considerada adequada para determinadas aplicações. Segundo Souza *et al.* (2021), razões de aspecto em torno de 8 a 10 favorecem a estabilidade coloidal de suspensões aquosas e promovem boa interação com matrizes poliméricas hidrofílicas em filmes biodegradáveis. Além disso, razões mais moderadas podem reduzir a agregação excessiva de partículas durante processos de secagem ou impressão 3D, favorecendo uma melhor dispersão dos nanocristais no meio. É importante destacar que a RA dos BCNC depende de diversos fatores, incluindo a cepa bacteriana, o tempo de cultivo, o método de purificação e especialmente o tipo e tempo de hidrólise ácida utilizado. A hidrólise com ácido sulfúrico, por exemplo, tende a produzir nanocristais menores, com maior carga superficial, mas também com menor comprimento, em comparação com outros ácidos como o clorídrico ou a hidrólise enzimática (MORAES *et al.*, 2016; BARUD *et al.*, 2016). Pontuando que, nesse trabalho, foi utilizado ácido sulfúrico o que nos permitiu obter um menor comprimento e razão de aspecto.

**Tabela 8.** Dimensões e razão de aspecto dos BCNC

| Comprimento (nm) | Diâmetro (nm) | Razão de aspecto (L/D)    | Referência                         |
|------------------|---------------|---------------------------|------------------------------------|
| 318 – 490        | 3,8 – 16      | 19 – 64                   | MORAES, A. S. <i>et al.</i> (2016) |
| 100 – 200        | 15 – 20       | 7,5 (30 min de hidrólise) | BARUD, H. S. <i>et al.</i> (2016)  |
| 120 ± 31         | 13 ± 3        | 10±3                      | SOUZA, C. R. <i>et al.</i> (2021)  |
| 183 ± 7,28       | 23 ± 0,61     | 7,96±0,38                 | Este estudo (2025)                 |

Fonte: MORAES *et al.*, 2016; BARUD *et al.* (2016); SOUZA *et al.*, 2021

Portanto, os valores encontrados no presente estudo estão de acordo com a literatura, especialmente quando considerados os métodos de preparação, e indicam que os BCNC obtidos são promissores para aplicações que requerem estabilidade coloidal, boa processabilidade e moderado reforço mecânico, como em filmes biodegradáveis ou materiais inteligentes para liberação controlada de fármacos.

#### 4.1.3 Uso dos CNC (Origem vegetal) para obtenção do hidrogel CNC/FB/GG

Uma das etapas essenciais na extração de BCNC é a sua neutralização. A neutralização é fundamental, já que o objetivo do material preparado é ser aplicado em áreas médicas, onde um pH próximo ao neutro é importante. Após a extração, os BCNC são centrifugados para remover o excesso de ácido e, em seguida, é realizada a diálise para alcançar um pH em torno de 7. No entanto, como é necessário utilizar ácido sulfúrico a 64% (m/m), um ácido forte, na extração, e considerando que para atingir a massa determinada de BCNC em cada amostra de hidrogel, foi necessário produzir grandes volumes de solução (cerca de 8L), a diálise inevitavelmente levou mais tempo do que o esperado. Sabendo que o período de diálise seria muito grande, após esperar um mês de diálise e observar que o pH estava demorando muito para ser neutralizado, decidiu-se continuar essa etapa preliminar, realizada na Suíça, utilizando CNC de origem vegetal, obtidos da *CELLUFORCE®*. Essa decisão foi tomada de forma consciente, pois os BCNC e os de CNC diferem apenas no tamanho e na fonte de extração. Os BCNC são extraídos da celulose bacteriana e são geralmente maiores, enquanto os CNC são extraídos de fontes vegetais e são menores (Souza *et al.*, 2021; MORAES *et al.*, 2016; BARUD *et al.*, 2016)

Também é importante destacar que diversos testes foram realizados na tentativa de acelerar o processo de diálise, como o uso de grandes volumes de água destilada em vez de pequenos, a agitação constante das membranas de diálise e a distribuição do grande volume de

BCNC em volumes menores. Contudo, nenhuma dessas tentativas teve sucesso. A Figura 11 mostra as bolsas de diálise preparadas para a neutralização.

**Figura 11:**Diálise dos BCNC

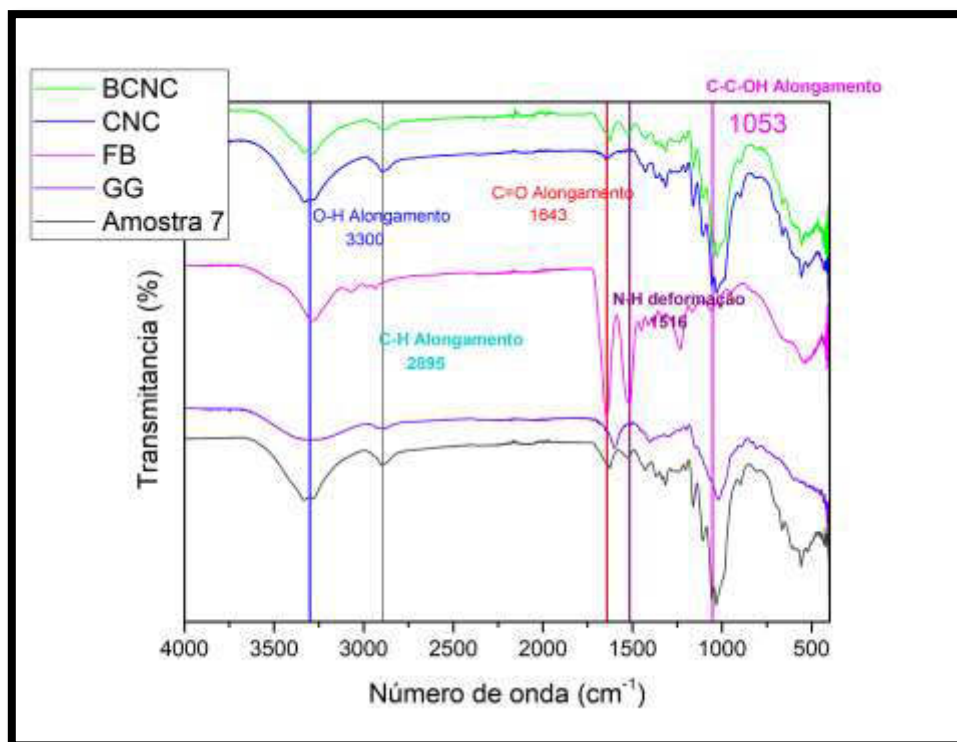


**Fonte:** Autor, 2023

#### **4.1.4            Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR)**

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) foi realizada com o objetivo de observar os picos característicos dos precursores (FB, GG, BCNC e CNC) e avaliar sua presença nos hidrogéis. Os dados obtidos por FTIR-ATR estão apresentados na Figura 12.

**Figura 12:**FTIR-ATR do hidrogel FB/GG/CNC. O hidrogel tinha a composição de 11% de CNC, 0,5% de GG e 0,5% de FB.



Fonte: Autor, 2023

O FTIR dos BCNC e dos CNC liofilizados foram realizados para observar se a hidrólise ácida teve algum efeito no material, bem como para verificar a presença desses materiais no hidrogel e se a combinação dos precursores resultou em deslocamento ou desaparecimento de alguma banda. Tanto nos BCNC quanto nos CNC, foi possível observar bandas na região de **3330  $\text{cm}^{-1}$** , referentes ao estiramento das ligações O-H, em **1635  $\text{cm}^{-1}$** , associados à água absorvida (H-O-H); em **2895  $\text{cm}^{-1}$**  e **1430  $\text{cm}^{-1}$** , relacionados à deformação angular assimétrica das ligações C-H, na região de **1370  $\text{cm}^{-1}$** , devido à deformação angular simétrica das ligações C-H, em **1161  $\text{cm}^{-1}$** , associados ao estiramento assimétrico das ligações glicosídicas C-O-C; em **1105  $\text{cm}^{-1}$** , atribuídos ao estiramento das ligações C-OH (álcool primário); em **1053  $\text{cm}^{-1}$** , relacionados às ligações C-C-OH (álcool secundário); em **897  $\text{cm}^{-1}$** , associados à deformação angular das conexões C-H; e em **665  $\text{cm}^{-1}$** , à flexão fora do plano das ligações C-OH (VASCONCELOS, 2017, ARSERIM-UÇAR, 2021, YAN, 2017)

Nenhuma banda foi observada em **807  $\text{cm}^{-1}$** , onde seriam esperadas vibrações simétricas das ligações C-O-S associadas a C-O-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Essas bandas eram esperadas nos BCNC, devido à hidrólise ácida com ácido sulfúrico, utilizada para sua obtenção. As bandas encontradas também foram relatadas na literatura por Vasconcelos (2017), Arserim-Uçar (2021) e Yan (2017).

Para a FB, foi possível observar picos na região de **1643 cm<sup>-1</sup>**, associados a amida I, devido ao estiramento C=O. A banda de amida I resulta do estiramento C=O, com menor contribuição da flexão no plano do N-H. A amida I é útil para a análise de estruturas secundárias de proteínas, ocorrendo entre **1600 – 1700 cm<sup>-1</sup>**. A amida II apresenta picos em **1516 cm<sup>-1</sup>**, relacionados à flexão no plano N-H e à vibração de estiramento C-N. A amida III apresentou pico em **1234 cm<sup>-1</sup>**, dentro da faixa usual de **1220 – 1330 cm<sup>-1</sup>**, resultante da combinação do estiramento C-N e da flexão vibracional C=O (CHEN *et al.*, 2001; LING *et al.*, 2013; KAMALHA *et al.*, 2013; WILDER *et al.*, 1992; CANTOR e SCHIMMEL, 1980).

Além disso, a posição dos picos indica a conformação da proteína: **1625 – 1660 cm<sup>-1</sup>** e **1640 – 1648 cm<sup>-1</sup>** (estrutura aleatória random coil) e **1625 – 1640 cm<sup>-1</sup>, 1690 cm<sup>-1</sup> (fraco)** (β-sheet) para amida I; **1520 – 1545 cm<sup>-1</sup>** (random coil) e **1520 – 1530 cm<sup>-1</sup>** (β-sheet) para amida II; e **1257 – 1258 cm<sup>-1</sup>** (random coil) e **1219 – 1245 cm<sup>-1</sup>** (β-sheet) para amida III.

Na amostra de FB analisada, a amida I foi encontrado na composição random coil, enquanto a amida II e o amida III foram encontrados na conformação β-sheet (CHEN *et al.*, 2001; LING *et al.*, 2013; KAMALHA *et al.*, 2013; WILDER *et al.*, 1992; CANTOR e SCHIMMEL, 1980). A Tabela 9 apresenta as conformações da FB e as ligações para cada região.

Algumas bandas características da GG também podem ser observadas no espectro, como na faixa de **3000 – 3650 cm<sup>-1</sup>**, devido ao estiramento O-H<sup>-</sup>; em **2882 cm<sup>-1</sup>**, estiramento C-H; em **1600 cm<sup>-1</sup>**, estiramento assimétrico COO<sup>-</sup>; e em **1405 cm<sup>-1</sup>**, estiramento simétrico COO<sup>-</sup>. Além disso, foi identificado o estiramento C-O associado ao carbono primário em **1020 cm<sup>-1</sup>** (COELHO *et al.*, 2019; SALDANHA *et al.*, 2020).

**Tabela 9.** Números de onda da amida e estrutura secundária das proteínas

| Conformação | Amidas e comprimento de onda (cm <sup>-1</sup> ) |                         |                                         |
|-------------|--------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------------|
|             | I – CO (Estiramento)                             | II – NH<br>(Deformação) | III-<br>CN(Estiramento),<br>NH (Flexão) |
| α-hélice    | 1648-1660                                        | 1540-1550               | 1304-1313                               |
| β-folha     | 1625-1640, 1690<br>fraca                         | 1520-1530               | 1219-1245                               |
| Alça β      | 1660-1685                                        |                         | 1265-1291                               |
| Random coil | 1625-1660, 1640-<br>1648                         | 1520-1545               | 1257-1258                               |
| Hélice-310  | 1660-1670                                        |                         | 1265-1291                               |

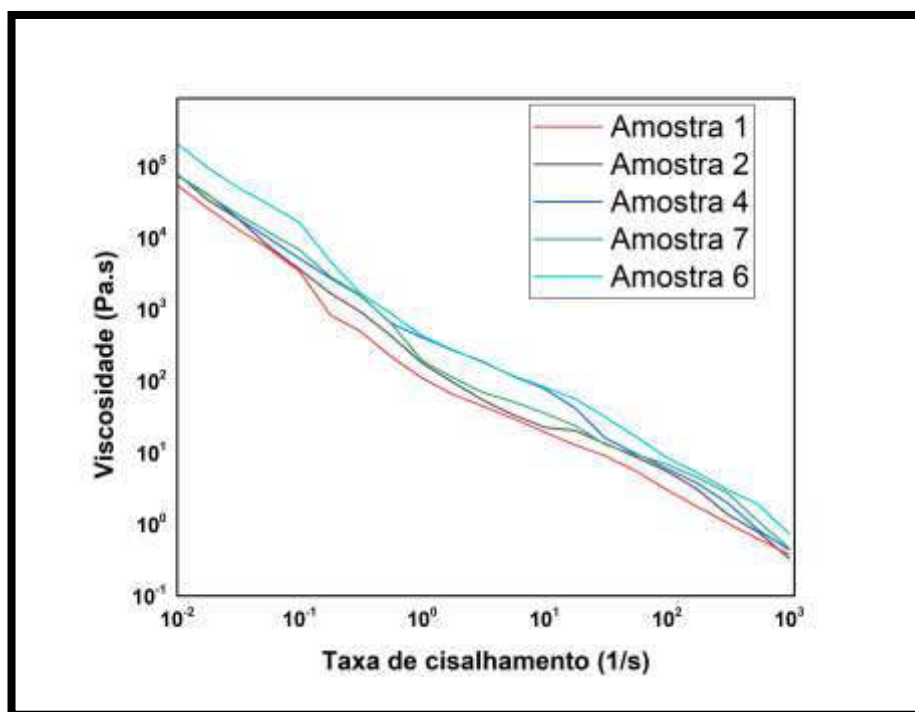
Fonte: KAMALHA *et al.*, 2013; WILDER *et al.*, 1992; CANTOR and SCHIMMEL, 1980. Adaptado

Em relação ao hidrogel de FB,GG e CNC preparados, foi possível observar que seu espectro era semelhante ao espectro do CNC, o que era esperado, já que a proporção de massa seca do hidrogel era de 91,6% (m/m) de CNC, 4,17% (m/m) de GG e 4,17% (m/m) de FB. Além disso, não foi possível observar os picos de GG e FB no hidrogel, pois os picos dos constituintes são muito próximos e suas concentrações são baixas quando comparadas ao CNC. Portanto, é impossível concluir se houve deslocamento, aparecimento ou desaparecimento de um pico.

#### 4.1.5 Reologia do hidrogel de CNC/FB/GG

A reologia é uma técnica de extrema importância para a impressão 3D, pois, permite a definição das características reológicas do material, determinando sua adequação para a impressão. Materiais adequados para esse fim apresentam propriedades tixotrópicas e comportamento não-newtoniano, ou seja, à medida que a tensão aumenta, a viscosidade do material diminui, e posteriormente, o hidrogel é capaz de se reconstituir em um tempo adequado (Dávila & D'Ávila, 2019).

**Figura 13.** Reograma apresentando a viscosidade (Pa.s) em função da taxa de cisalhamento (1/s). Curvas de viscosidade dos hidrogéis. Amostra 1 (6%CNC, 1%FB, 0,75%GG e 92,25% água), Amostra 2 (7%CNC, 1%FB, 0,75%GG e 91,25% água), Amostra 4 (10%CNC, 0,5%FB, 0,5%GG e 89% água), Amostra 6 (10%CNC, 1%FB, 1%GG e 88% água) e Amostra 7 (11%CNC, 0,5%FB, 0,5%GG e 88% água)

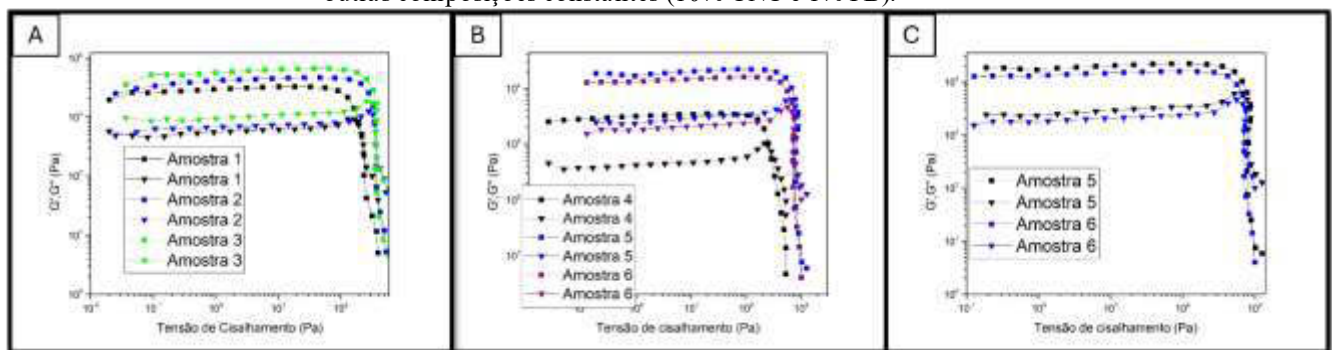


Fonte: Autoria própria, 2023.

A análise dos dados apresentados na Figura 13 permitiu concluir que todos os hidrogéis preparados apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, o aumento da taxa de cisalhamento causou uma diminuição na viscosidade. Além disso, foram realizados testes para avaliar o módulo elástico ( $G'$ ) e o módulo viscoso ( $G''$ ). O módulo elástico ( $G'$ ) pode ser considerado a extensão da formação do gel, a medida da elasticidade do material, ou seja, a capacidade de armazenar energia, enquanto o módulo viscoso ( $G''$ ) é a capacidade do material de dissipar energia. Assim, a Figura 14 mostra os módulos elástico e viscoso dos materiais, variando as concentrações de CNC, FB e GG.

A caracterização reológica dos hidrogéis foi realizada por meio de ensaios oscilatórios de varredura de tensão, a fim de avaliar a influência da variação da concentração de CNC, FB e GG nas propriedades viscoelásticas dos sistemas.

**Figura 14.** Mudanças no módulo elástico ( $G'$ ) e no módulo viscoso ( $G''$ ) em função da tensão de cisalhamento para as amostras de hidrogel. A. Variação da concentração de CNC (6 a 8%), mantendo as outras composições constantes (1%FB e 0,75%GG). B. Variação na concentração de FB (0,5 a 1%), mantendo as outras composições constantes (10% CNC e 0,5% GG). C. Variação na concentração de GG (0,5 A 1%), mantendo as outras composições constantes (10% CNC e 1% FB).



Fonte: Autor, 2023.

Na Figura 14.A, observa-se um comportamento típico de gel viscoelástico, com módulo de armazenamento ( $G'$ ) superior ao módulo de perda ( $G''$ ), indicando predomínio da elasticidade sobre a viscosidade. Com o aumento da concentração de CNC, mantendo-se constante a proporção dos demais constituintes (1%FB e 0.75%GG), houve um aumento progressivo de  $G'$  e  $G''$ , bem como da tensão de escoamento. Esse comportamento é coerente com a literatura, que atribui esse reforço à alta rigidez dos CNC e à sua capacidade de formar redes físicas por meio de interações hidrogênio e efeitos de entrelaçamento com polímeros (Habibi *et al.*, 2010; Lin & Dufresne, 2014). Além disso, os CNC funcionam como agentes de reforço em matrizes poliméricas, contribuindo significativamente para o aumento da rigidez e estabilidade mecânica dos géis.

Já na Figura 14.B, ao se aumentar a concentração de FB, mantendo constantes os teores de CNC (10%) e GG (0.5%), verificou-se um aumento ainda mais pronunciado de  $G'$  e  $G''$  em comparação com a variação da concentração de CNC. Esse comportamento pode ser explicado pela natureza proteica da FB, que possui uma estrutura de  $\beta$ -sheet propensa à formação de redes físicas fortes por meio de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Kasoju & Bora, 2012). A FB atua não apenas como componente estrutural, mas também como elemento interativo que promove a coesão da rede tridimensional, o que justifica o aumento mais expressivo da rigidez do hidrogel.

Por fim, na Figura 14.C, observou-se que a variação da concentração de GG (de 0.5% para 1.0%) não resultou em diferenças significativas nos valores de  $G'$ ,  $G''$  ou tensão de escoamento. Esse resultado pode ser interpretado como uma saturação do efeito estrutural da gelana, uma vez que concentrações relativamente baixas já são suficientes para promover a formação de redes iônicas robustas em presença de cátions, como demonstrado por Miyoshi, Takaya e Nishinari (1996). Assim, variações adicionais de concentração não provocam aumentos relevantes na rigidez da matriz, sugerindo um limite funcional para o papel da GG na rede hidrogel estudada. Além disso, é possível que a presença de CNC e FB limite a capacidade da GG de reorganizar-se estruturalmente, restringindo seu impacto no reforço da rede.

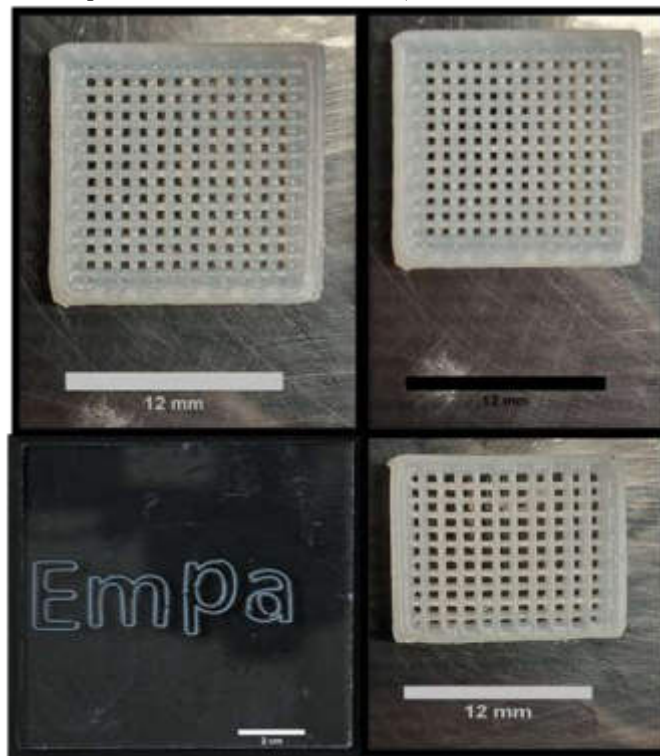
Em conjunto, os resultados demonstram que tanto os CNC quanto a FB são componentes fundamentais para a modulação da rigidez dos hidrogéis, com a FB apresentando maior influência sobre a estrutura reológica quando comparada ao CNC. Por outro lado, o papel da GG parece estar mais relacionado à formação básica do gel do que ao seu reforço mecânico em concentrações superiores.

Importante pontuar que em todos os hidrogéis, é possível observar que o  $G'$  é maior que o  $G''$ , o que significa que as amostras têm comportamento predominantemente do tipo gel, ou seja, a resposta elástica do material é maior que a viscosa. Além disso, é importante destacar que, conforme apresentado na literatura (DE MENEZES *et al.*, 2009; HAUSMANN *et al.*, 2018), materiais adequados para impressão 3D são aqueles que possuem uma tensão de escoamento em torno de 400 Pa,  $G'$  maior que  $G''$  e também  $G'$  e  $G''$  em torno de 1 mil a 10 mil Pascals. Os hidrogéis preparados apresentaram essas características; indicando que esses hidrogéis são adequados para impressão. No entanto, é importante realizar a impressão 3D para avaliar qual é o melhor hidrogel; portanto, é essencial avaliar o reograma, o  $G'$  e  $G''$  e também a impressão 3D, o que foi feito posteriormente neste trabalho.

#### 4.1.6 Impressão 3D

Após a caracterização morfológica dos hidrogéis preparados, foram feitas impressões 3D com os diferentes hidrogéis, com o objetivo de encontrar a amostra com os melhores dados reológicos e também um bom desempenho na impressão, ou seja, aquela em que as estruturas mantiveram uma boa fidelidade à forma e não causaram problemas de entupimento nas agulhas. Para evitar problemas com entupimento, antes da impressão 3D, foi realizada a centrifugação dos hidrogéis, além de uma boa homogeneização através do speed mixer. As amostras 5, 6 e 7 foram impressas, sendo que a amostra 7 (11% CNC, 0,5% FB, 0,5% GG e 88% H<sub>2</sub>O) foi a que melhor se adaptou à impressão, por não obstruir a agulha durante a impressão e por apresentar uma estruturação maior de camadas e, portanto, foi selecionado como o hidrogel mais promissor. Para os testes de impressão da amostra 7, foi utilizada uma extrusora com bico de 0,4 mm, uma pressão de 0,7 bar e uma velocidade de impressão de 20 mm/s. A Figura 15 mostra as estruturas tridimensionais impressas. É importante ressaltar que as estruturas impressas, imediatamente após a impressão, foram imersas em etanol a 90% (v/v) por 30 minutos para que ocorresse a reticulação.

**Figura 15:** Estruturas impressas usando a amostra 7 (11% CNC, 0,5% FB, 0,5% GG e 88% H<sub>2</sub>O)



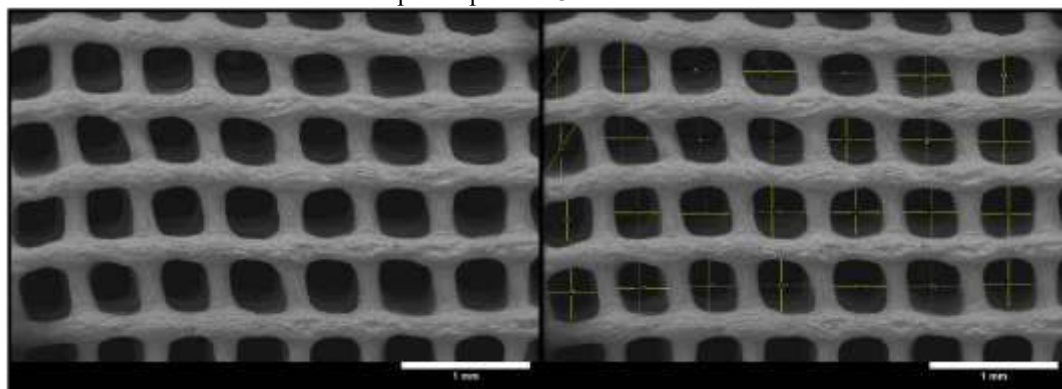
Fonte: Autor, 2023

Após a impressão 3D, foram realizadas a Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia Óptica, apresentadas abaixo, com o objetivo de avaliar se a fidelidade de forma das amostras estava sendo mantida, e como mencionado anteriormente, a amostra 7 foi o que apresentou os melhores resultados.

#### 4.1.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Óptica

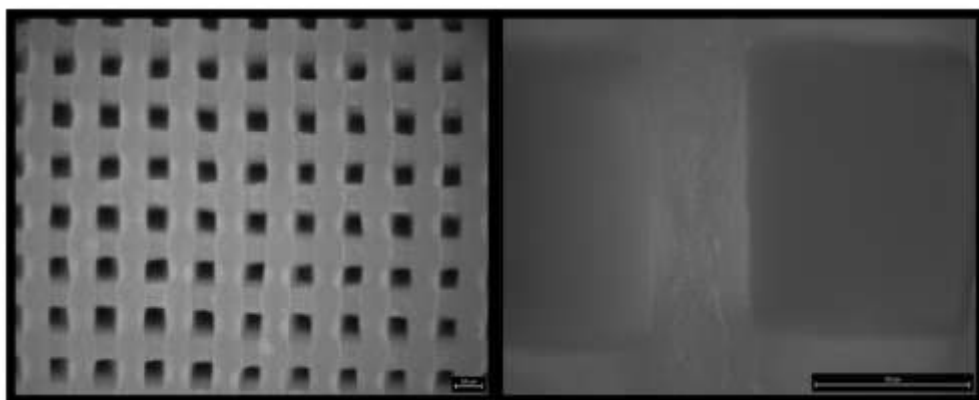
A MEV (Figura 16) e a Microscopia Óptica (Figura 17) foram utilizadas para avaliar a fidelidade de forma dos materiais impressos após impressão 3D. As amostras para MEV foram liofilizadas, enquanto para a microscopia óptica, a secagem não foi necessária. Ambas as análises foram realizadas com um hidrogel composto por 11% CNC, 0,5% GG, 0,5% FB e 88% água, imediatamente após a reticulação.

**Figura 16:**Microscopia Eletrônica de Varredura, hidrogel 11%CNC, 0.5% GG, 0.5%FB e 88% água, pós impressão 3D



Fonte: Autor, 2023

**Figura 17:**Microscopia Óptica do hidrogel 11%CNC, 0.5% GG, 0.5%FB e 88% água, pós impressão 3D



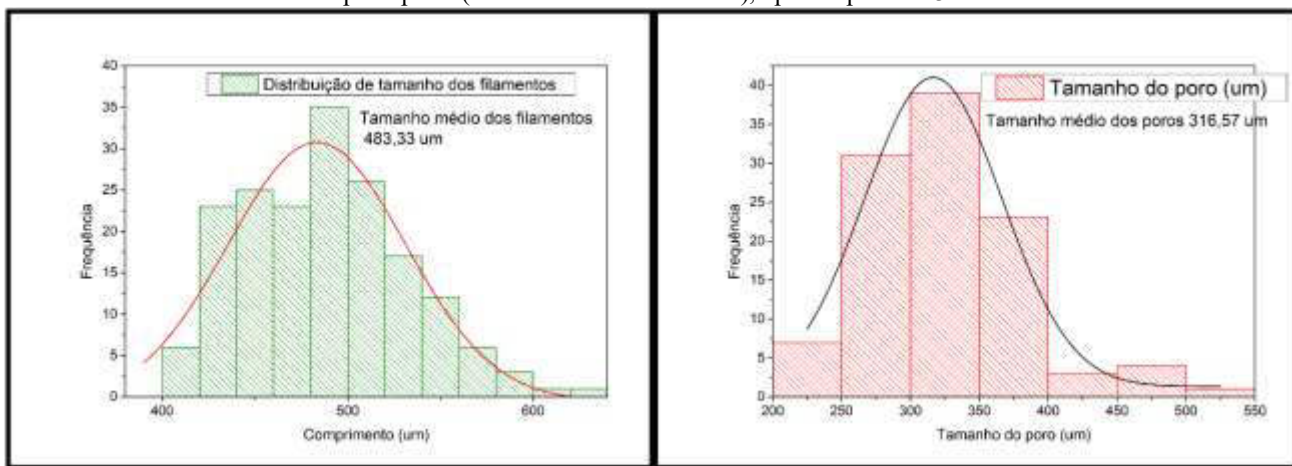
Fonte: Autor, 2023

Nas Figuras 16 e 17, observou-se uma leve retração nas amostras analisadas por MEV, devido ao processo de liofilização necessário para essa técnica, que exige amostras secas para o alto vácuo. A morfologia foi analisada por histogramas de distribuição de comprimento de filamento e tamanho de poros, antes (Figura 18) e após secagem (Figura 19). As amostras não liofilizadas apresentaram filamentos maiores e poros menores, enquanto as liofilizadas mostraram filamentos reduzidos e aumento nos poros, como esperado devido à perda de solventes durante a liofilização.

As Figuras 16 e 17 confirmam que o material mantém a fidelidade de forma, uma característica importante para a impressão 3D. Embora tenha sido observada uma ligeira retração do material na análise MEV, isso se deve ao processo de liofilização da amostra, que deve ser realizado devido à técnica (MEV, com alto vácuo), que exige que os materiais não estejam úmidos. Mesmo assim, os resultados encontrados foram promissores, pois o material conseguiu manter sua forma mesmo após um período e liofilização.

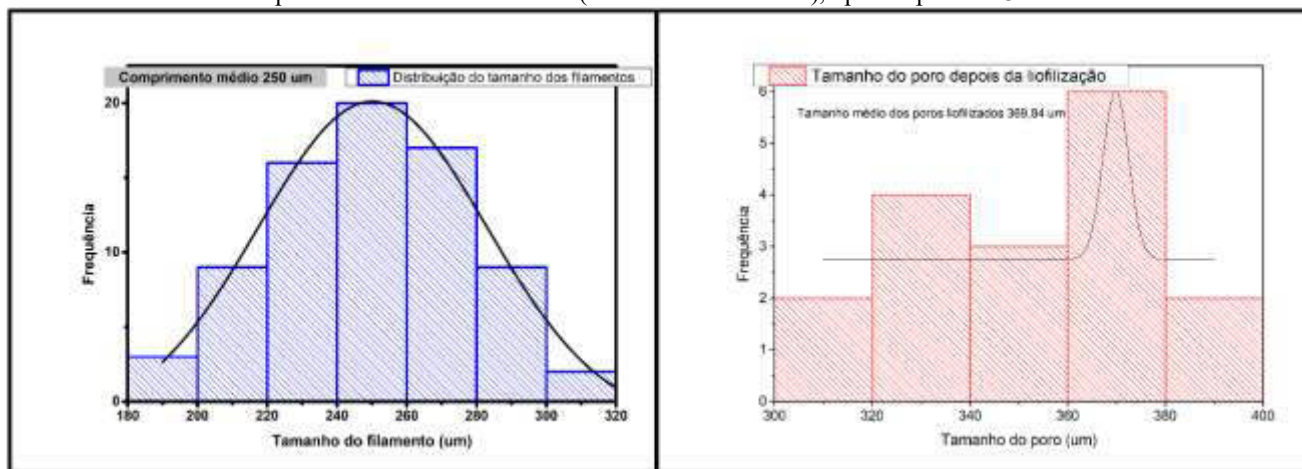
Para analisar a morfologia do material impresso, foi obtido um histograma da distribuição de comprimento de filamento e tamanho de poros antes (Microscópio Óptico) (Figura 18) e após a secagem (MEV) (Figura 19).

**Figura 18:** Histograma da distribuição de comprimento de filamento e tamanho de poros na análise de Microscopia Óptica (amostras não liofilizadas), após impressão 3D.



Fonte: Autor, 2023

**Figura 19:** Histograma da distribuição de comprimento de filamento e tamanho de poros na análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (amostras liofilizadas), após impressão 3D.



Fonte: Autor, 2023

Observou-se que as amostras não liofilizadas apresentaram um comprimento médio do filamento maior do que as amostras secas, enquanto os poros das amostras úmidas são menores do que nas amostras secas. Os resultados são apresentados na Tabela 10. Esse resultado era esperado, pois, o hidrogel preparado possui uma certa absorção dos líquidos (água e etanol); portanto, antes de ser seco, os filamentos são maiores e, após a liofilização, o material perde os solventes absorvidos, aumentando assim o tamanho dos poros e diminuindo o tamanho dos filamentos.

**Tabela 10:** Tamanho médio dos filamentos e poros antes e depois da liofilização.

| Amostras sem secar   |                 | Amostras liofilizadas |                 |
|----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Tamanho do filamento | Tamanho do poro | Tamanho do filamento  | Tamanho do poro |
| 483±3,28 um          | 317±5,26 um     | 250±3,15 um           | 370±5,93 um     |

Fonte: Autor, 2023

A caracterização morfológica dos scaffolds impressos é um aspecto fundamental para avaliar sua aplicabilidade em engenharia de tecidos e em sistemas de liberação controlada de fármacos. Parâmetros como o diâmetro dos filamentos, o tamanho dos poros e a integridade da matriz polimérica influenciam diretamente a adesão, proliferação e migração celular, além da difusão de nutrientes e metabólitos (Zhang *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2022). O diâmetro dos filamentos exerce influência direta sobre a resistência mecânica do scaffold. Filamentos com diâmetros entre 300 e 500 µm são considerados ideais para aplicações em engenharia de tecidos, pois conferem suporte estrutural adequado ao mesmo tempo em que mantêm a porosidade e a permeabilidade da estrutura (Fischer *et al.*, 2017). Filamentos muito finos, como os observados

após a liofilização, podem ser mecanicamente frágeis, sofrer deformações estruturais e comprometer a estabilidade tridimensional do sistema (Wang et al., 2020).

Em relação ao tamanho de poro, valores entre 200 e 400  $\mu\text{m}$  são frequentemente citados na literatura como ideais para favorecer a migração celular, a formação de vasos sanguíneos (angiogênese) e a troca de gases e nutrientes, especialmente em aplicações ósseas e cutâneas (ZHOU *et al.*, 2022; MISHRA *et al.*, 2022). Poros menores podem restringir a infiltração celular, enquanto poros muito grandes, apesar de favorecerem a vascularização, podem comprometer a área de superfície disponível para adesão celular e reduzir a integridade estrutural do scaffold (WU *et al.*, 2019).

Do ponto de vista funcional, o scaffold observado por microscopia óptica, sem liofilização, apresenta morfologia mais adequada às exigências da engenharia de tecidos e da liberação de fármacos, pois possui filamentos e poros dentro das faixas recomendadas pela literatura, além de preservar a integridade da matriz polimérica. Em contrapartida, a amostra liofilizada, apesar de apresentar poros ainda dentro da faixa funcional, apresenta filamentos subdimensionados e matriz deformada, características que podem afetar negativamente sua performance mecânica e biológica.

Esses resultados evidenciam a importância da escolha e otimização dos processos de secagem, como a liofilização, que embora seja eficaz para a preservação estrutural de muitos materiais, pode comprometer a morfologia de scaffolds sensíveis caso não sejam estabelecidas condições apropriadas (HASSANI NAJAFABADI *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2018).

**Tabela 11.** Tamanho dos Filamentos e Poros de acordo com a literatura

| PARÂMETRO                                          | AMOSTRA<br>(MICROSCOPIA<br>ÓPTICA) | AMOSTRA<br>(MEV PÓS-<br>LIOFILIZAÇÃO) | FAIXA IDEAL<br>SEGUNDO A<br>LITERATURA | APLICAÇÃO<br>RELEVANTE                                        | REFERÊNCIA                                   |
|----------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| DIÂMETRO<br>DOS<br>FILAMENTOS<br>( $\mu\text{m}$ ) | 483                                | 250                                   | 300–500                                | Suporte<br>mecânico e<br>manutenção<br>estrutural             | Fischer et al.,<br>2017                      |
| TAMANHO<br>DOS POROS<br>( $\mu\text{m}$ )          | 317                                | 370                                   | 200–400                                | Migração<br>celular,<br>angiogênese,<br>difusão de<br>fármaco | Zhou et al.,<br>2022; Mishra et<br>al., 2022 |
| INTEGRIDADE<br>DA MATRIZ                           | Preservada                         | Deformada                             | Integra, contínua                      | Adesão celular,<br>estabilidade do<br>sistema                 | Zhang et al.,<br>2023                        |
| ADEQUAÇÃO<br>GERAL                                 | Alta                               | Parcial                               | -                                      | Engenharia de<br>tecidos e<br>liberação de<br>fármacos        | Hassani<br>Najafabadi et<br>al., 2021        |

Fonte: Adaptado de FISCHER *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2023; HASSANI *et al.*, 2021.

## 4.2 Resultados obtidos para o hidrogel FB/BCNC/GG/NPM/DS

### 4.2.1 Reologia dos hidrogéis de BCNC/FB/GG/NPM

A reologia é uma técnica extremamente importante para a impressão 3D, pois, a partir desta, é possível definir as características reológicas do material e definir se o material é adequado a impressão. Materiais que são adequados para a impressão 3D são aqueles que apresentam propriedades tixotrópicas, comportamento não newtoniano, ou seja, conforme a tensão aumente, a viscosidade do material diminui e posteriormente, o mesmo hidrogel tenha a capacidade de se reconstituir com tempo adequado (Dávila & D'Ávila, 2019). As curvas de viscosidade obtidas nesta análise (Figura 20) permitiram a aplicação da lei de potência, power law fluid, modelo proposto por Ostwald de Waele (1913). O modelo de Ostwald de Waele é um tipo de generalização do fluido Newtoniano (fluido não newtoniano independente do tempo), para isso a tensão de cisalhamento e a viscosidade aparente são dadas pelas equações 3 e 4, respectivamente.

$$\tau = K \left( \frac{\partial \mu}{\partial y} \right)^n \quad (3) \quad \left| \quad m = K \left( \frac{\partial \mu}{\partial y} \right)^{n-1} \quad (4)$$

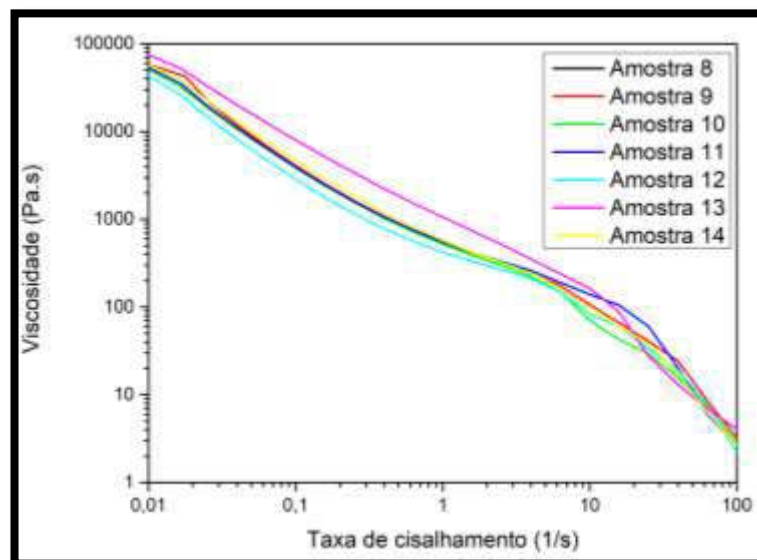
O índice “n” é a lei de potência e define o comportamento de viscosidade e o índice “m” representa a consistência que se relaciona com a viscosidade, conforme pode ser observado na Tabela 12. Uma classificação possível é em que  $n > 1$  o material é dilatante,  $n = 1$ , newtoniano e  $n < 1$  pseudoplástico.

**Tabela 12:** Parâmetros de ajuste do modelo de viscosidade Ostwald-de Waele (1913)

| Amostra    | m (Pa.s) | n (-)   | R <sup>2</sup> | Amostra    | m (Pa.s) | n (-)    | R <sup>2</sup> |
|------------|----------|---------|----------------|------------|----------|----------|----------------|
| Amostra 8  | 606,772  | -0,9356 | 0,98299        | Amostra 12 | 466,203  | -0,9182  | 0,97739        |
| Amostra 9  | 658,237  | -0,8896 | 0,98269        | Amostra 13 | 875,916  | -1,0068  | 0,98299        |
| Amostra 10 | 522,793  | -0,9639 | 0,98850        | Amostra 14 | 601,752  | -0,97427 | 0,98507        |
| Amostra 11 | 612,374  | -0,9272 | 0,96907        | -----      |          |          |                |

Fonte: Autoria Própria, 2023

**Figura 20:** Reograma apresentando Viscosidade ( $\eta$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\gamma$ ). Curvas de viscosidade referente aos hidrogéis. Amostras 8 (2,5%GG, 3% DS e 94,5% água), 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3%DS e 91,2% água), amostra 10 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3%DS e 91,2% água), amostra 11 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3%DS e 87,9% água), amostra 12 (2,5%GG, 3,3%NPM, 3%DS e 91,2% água), amostra 13 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3%NPM e 87,6%) e amostra 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3%NPM, 3,3%DS e 84,6% água)

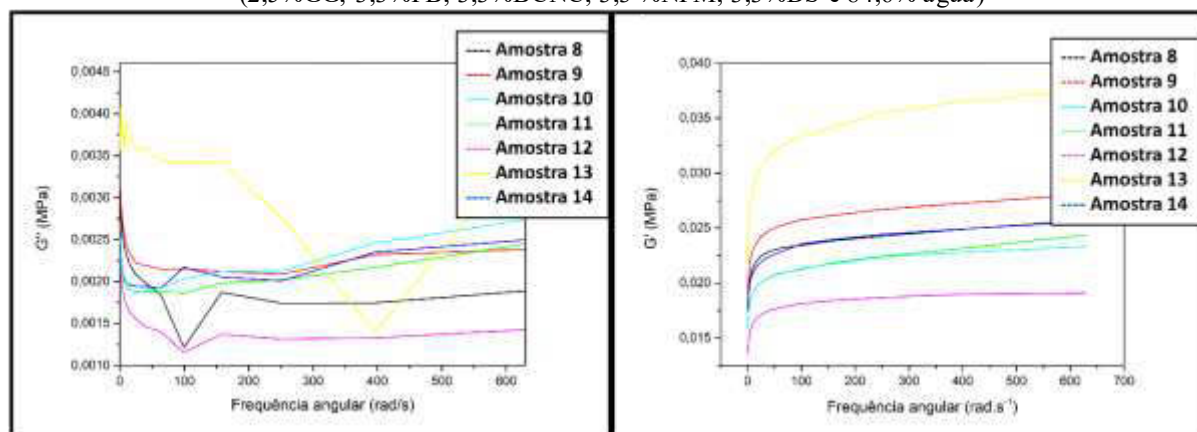


Fonte: Autoria própria, 2023

A análise dos dados apresentados na Figura 20, permitiu concluir que os materiais que continham DS continuam apresentando um comportamento pseudoplástico, ou seja, aumentar a taxa de cisalhamento, ocasionou a diminuição da viscosidade. A afirmação pode ser confirmada comparando a Amostra 13 (não possui DS) com os demais hidrogéis (possuem DS). Vale ressaltar que nessa etapa, que dá continuidade ao trabalho em andamento, foi utilizado a melhor concentração de GG (2,5%), uma vez que novos constituintes foram incluídos ao hidrogel, procurando a melhor reologia possível. Além disso, é possível observar que, conforme há a adição dos precursores aos hidrogéis, sua viscosidade média varia. Neste aspecto, é possível presumir que os BCNC auxiliam na estruturação do hidrogel, o que já havia sido confirmado no trabalho desenvolvido na EMPA, como pode ser visto na Tabela 12, ao compararmos a amostra 8 (606,772 Pa.s) com a amostra 9 (658,237 Pa.s), é evidente o aumento da viscosidade conforme os CNC foram incluídos ao material. Ademais, foi possível determinar, no desenvolvimento do hidrogel de CNC/FB/GG que a FB ajudava na estruturação dos hidrogéis, ou seja, o aumento da concentração da FB aumentava a viscosidade do material. Contudo, nos hidrogéis BCNC/FB/GG/DS foi estabelecido que a adição da FB ao hidrogel com diclofenaco de sódio, acarretou uma diminuição da viscosidade, possivelmente ocasionada pela interação entre os materiais. A afirmação pode ser mensurada ao comparar a amostra 8 (606,772

Pa.s) com a amostra 10 (522,793 Pa.s). Além disso, a adição das NPM diminuíram a viscosidade das amostras, mesmo com a presença do DS, que pode ser vista correlacionando a amostra 12 (406,203 Pa.s), com a amostra 8. Em relação a adição do DS ao hidrogel, é possível inferir, comparando a amostra 13 (875,916 Pa.s), em que não há DS, com a amostra 14 (601,752 Pa.s), há DS, a diminuição da viscosidade. Contudo, mesmo que a viscosidade com o DS seja menor, não é um efeito significativo que impossibilite o material de ser utilizado na Impressão 3D, pois, esse material apresenta um valor de viscosidade adequado e, também, é um pseudoplástico. Além disso, foram realizados testes para avaliar o módulo elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ). Sendo assim, a Figura 21, apresenta o módulo elástico e viscoso dos materiais, possibilitando apontar que a amostra 14 apresenta uma elasticidade intermediária aos hidrogéis preparados, concluindo que esse é adequado a impressão 3D por apresentar uma capacidade de estruturação, terminada o processo de impressão. Além disso, o  $G'$  da amostra 14 é sempre maior que o  $G''$ , característica de amostras com maior capacidade de absorver energia, materiais com comportamento do tipo gel. Em suma, em todos os hidrogéis é possível observar que o  $G'$  é maior que o  $G''$ , o que significa que as amostras são predominantemente do tipo gel, ou seja, a resposta elástica do material é mais forte que a viscosa.

**Figura 21:** Mudanças no módulo elástico ( $G'$ ) e viscoso ( $G''$ ) em função da frequência para as amostras 8 (2,5%GG, 3% DS e 94,5% água), 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), amostra 10 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água), 12 (2,5%GG, 3,3%NPM, 3% DS e 91,2% água), 13 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM e 87,6%) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3,3%DS e 84,6% água)



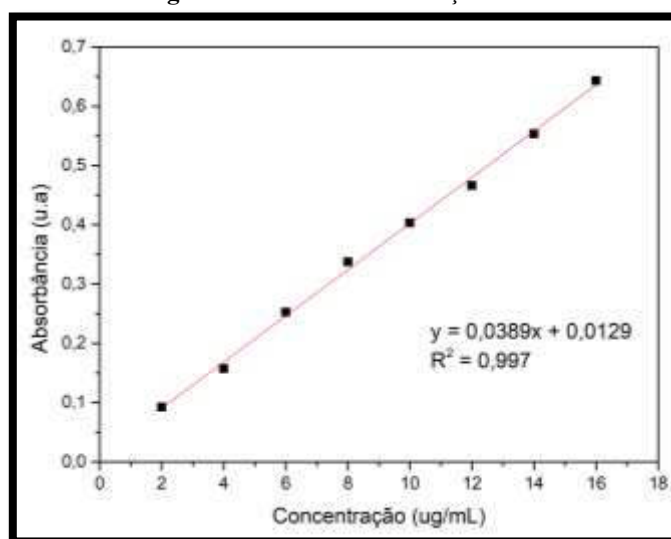
Fonte: Autoria própria, 2023.

#### 4.2.2 Ensaio de liberação de fármaco nos hidrogéis

. O ensaio de liberação de fármaco tem como objetivo determinar a porcentagem da quantidade de princípio ativo, liberado no meio de dissolução, dentro do período especificado, quando esse é submetido à equipamentos e condições específicas (FARMACOPEIA, 2010a;

VENÂNCIO *et al*, 2013). A liberação de fármacos é essencial para determinar informações importante para garantir a qualidade do produto, biodisponibilidade, escolha de excipientes, além de estabelecer correlação in-vitro-in vivo (STORPIRTIS *et al*, 2009; VENÂNCIO *et al*, 2013). Neste trabalho, a velocidade de liberação do DS incorporado aos hidrogéis foi acompanhada por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, comparando as amostras 9, 11 e 14. A Figura 22 mostra a curva de calibração preparada com diferentes concentrações de DS (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 ug/ml) em função da absorbância da molécula.

**Figura 22:** Curva de Calibração do DS



Fonte: Autoria Própria, 2023

A partir da curva de calibração, foi obtido a equação de reta, com ajuste linear de 0,997, que possibilitou avaliar os resultados nos testes de liberação. A princípio, foi determinado a porcentagem acumulativa de fármaco liberado durante os testes (Tabela 13)

**Tabela 12:** Valores de porcentagem acumulativa de fármaco liberado pelos hidrogéis utilizando o dissolutor modelo 299 da *Ethik technology*

| Tempo (min) | % Acumulativa de Fármaco liberado |            |            |             |           |            |            |
|-------------|-----------------------------------|------------|------------|-------------|-----------|------------|------------|
|             | Amostra 9                         | Amostra 11 | Amostra 14 | Tempo (min) | Amostra 9 | Amostra 11 | Amostra 14 |
| 0           | 2,24                              | 1,49       | 6,045      | 60          | 39,01     | 38,06      | 53,43      |
| 5           | 14,03                             | 12,4       | 17,06      | 75          | 41,33     | 41,15      | 50,72      |
| 10          | 19,87                             | 18,52      | 30,28      | 90          | 45,74     | 44,47      | 48,5       |
| 20          | 27,07                             | 26,48      | 36,4       | 120         | 44,18     | 50,17      | 53,02      |
| 30          | 28,12                             | 27,17      | 42,88      | 150         | 46,39     | 47,86      | 54,42      |
| 40          | 31,23                             | 31,95      | 50,38      | 180         | 47,07     | 49,37      | 56,55      |
| 50          | 36,37                             | 35,34      | 47,66      | 210         | 48,98     | 50,01      | 55,45      |

Fonte: Autoria Própria, 2023

Tendo em vista os valores obtidos da tabela, é possível aplicar os modelos cinéticos de liberação de fármaco, que são os modelos matemáticos utilizados para descrever os sistemas de liberação de fármaco, entre eles, os mais usados são: ordem zero, primeira ordem Higuchi e Kosmeyer- Peppas

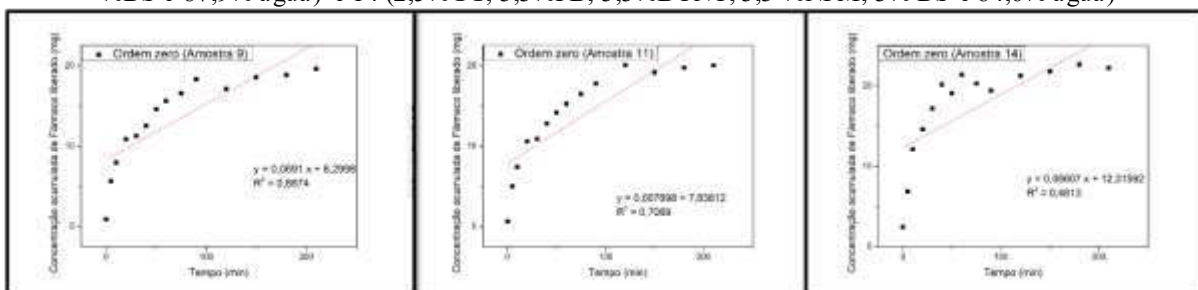
#### 4.2.2.1 Modelo de Ordem Zero

De acordo com os princípios da farmacocinética, a liberação de fármaco pode ser representada pela equação 5

$$C_t = C_0 + K_0 t \quad (5)$$

Onde  $C_t$  é a quantidade de fármaco liberada durante o tempo  $t$ ,  $C_0$  a concentração inicial de fármaco ( $t = 0$ ) e  $K_0$ , a constante de velocidade de dissolução de ordem zero. O modelo de ordem zero define o processo constante de liberação de um fármaco por um sistema de drug delivery, sendo assim, o nível de fármaco permanece constante durante a liberação (MENDES, 2019). Para estudar o modelo de Ordem zero, foi necessário construir um gráfico de massa acumulativa de fármaco liberado pelo tempo. Obteve-se então os perfis observados na Figura 23.

**Figura 23:** Modelo de Ordem zero aplicado para os valores de concentração acumulada de fármaco liberado das amostras 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3% DS e 84,6% água)



Fonte: Autoria Própria, 2023

O modelo que melhor descreve o perfil de liberação é aquele que o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) seja mais próximo de 1. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para esse modelo foi 0,6674 para a amostra 9; 0,7069 para a amostra 11 e 0,4813 para amostra 14, o que permite concluir que o modelo cinético de ordem zero não deve ser considerado para os hidrogéis preparados.

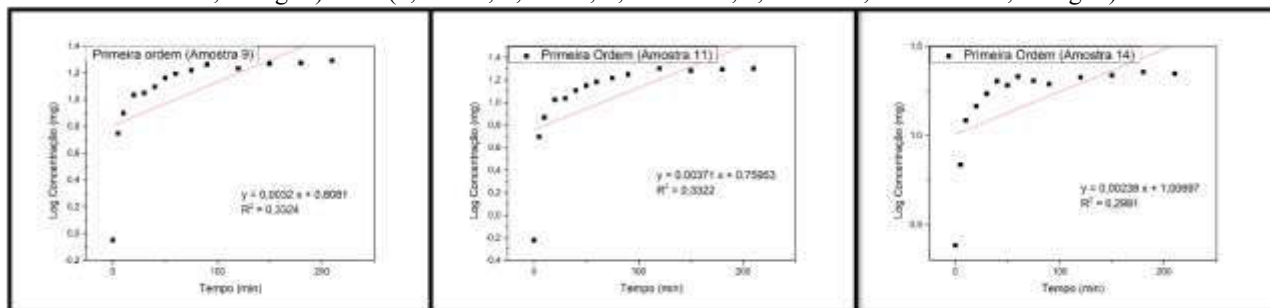
#### 4.2.2.2 Modelo de Primeira Ordem

No caso do modelo de primeira ordem, a equação 6 apresenta como esse modelo se mostra matematicamente

$$\log C = \log C_0 - \frac{K_1 t}{2,303} \quad (6)$$

$K_1$  é a constante de velocidade de reações de primeira ordem,  $C_0$  a concentração inicial de fármaco e  $C$  é a concentração no tempo  $t$ . A equação 6 apresentada é uma função linear, cujo  $K_1 / 2,303$  é o coeficiente angular e o logaritmo da concentração inicial é o coeficiente linear. A equação 6 pode ser considerado de primeira ordem pelo fato de a constante de velocidade ser proporcional à concentração de fármaco liberada. Nesse caso, é possível utilizar essa relação para descrever a absorção e eliminação de diversos fármacos (MENDES, 2019). Para o estudo do modelo de primeira ordem, foi construído um gráfico do logaritmo da concentração de fármaco acumulada pelo tempo das amostras 9, 11 e 14. As curvas obtidas se encontram na Figura 24.

**Figura 24:** Modelo de Primeira ordem aplicado para os valores de concentração acumulada de fármaco liberado das amostras 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3% DS e 84,6% água)



Fonte: Autoria Própria, 2023

Da mesma forma que foi avaliado anteriormente, para indicar se o modelo é adequado para esse tipo de material, é necessário que o coeficiente de correlação seja o mais próximo de 1. Para o modelo de primeira ordem, o coeficiente de correlação é 0,3324 para a amostra 9; 0,3322 amostra 11 e 0,2991 para a amostra 14, mostrando que o  $R^2$  é distante de 1 e, portanto, esse não é o modelo mais adequada para os hidrogéis.

#### 4.2.2.3 Modelo Higuchi

No processo de liberação, é importante considerar tanto o processo de difusão quanto o de dissolução e é nesse aspecto que o modelo de Higuchi se baseia (equação 7).

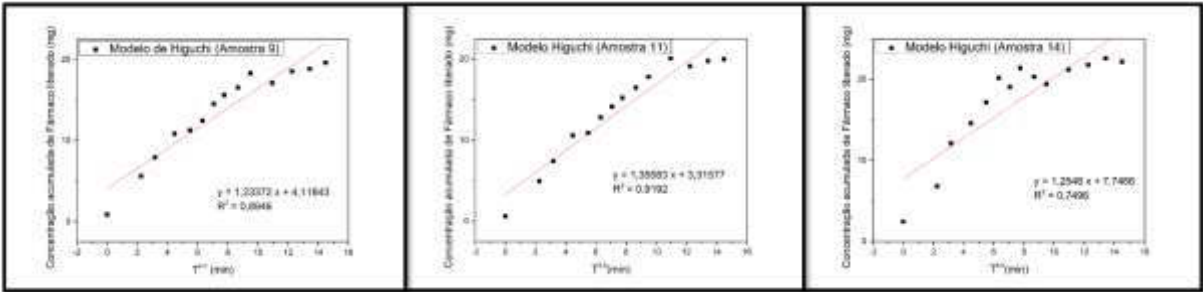
$$Q = A \sqrt{D(2C_0 - C_s)C_s t} \quad (7)$$

$Q$  representa a quantidade acumulada de fármaco liberado no período de tempo por unidade de área,  $C_0$  é a concentração inicial de fármaco e  $C_s$  é a solubilidade do fármaco na matriz e por fim,  $D$  é o coeficiente de difusão da molécula. Fazendo as devidas simplificações, obtemos a equação 8, em que  $K_H$  é a constante de dissolução de Higuchi (MENDES, 2019)

$$Q = K_H \sqrt{t} \quad (8)$$

Da mesma forma que anteriormente, aqui serão apresentadas as curvas construídas para o modelo de Higuchi de liberação de fármaco, de modo que, a diferença em relação aos modelos anteriores, é que nesse modelo, são construídos gráficos de concentração de fármaco acumulada liberado por raiz quadrada do tempo. A Figura 25 apresenta os gráficos idealizados. Nesse modelo, é possível observar que o  $R^2$  está bem mais próximo de 1, do que os modelos anteriores, um indicativo que essa linearização é razoavelmente adequada, sendo o coeficiente de correlação para o modelo de Higuchi 0,8946 para a amostra 9; 0,9192 para a amostra 11 e 0,7496 para a amostra 14. A linearização também permite obter o  $K_H$ , que é o coeficiente angular da reta obtida

**Figura 25:** Modelo de Higuchi aplicado para os valores de concentração acumulada de fármaco liberado das amostras 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3% DS e 84,6% água)



Fonte: Autoria Própria, 2023

#### 4.2.2.4 Modelo Korsmeyer-Peppas

Uma vez que tenha sido confirmado que o mecanismo principal de liberação é controlado por difusão, que é o caso do nosso hidrogel, pois, o modelo de Higuchi apresentou bons coeficientes de correlação, devemos determinar qual é o tipo de difusão que o fármaco obedece. O tipo de difusão pode ser determinado através da equação 9, onde  $\frac{M_t}{M_\infty}$  é a fração da quantidade de fármaco liberado no intervalo de tempo t (MENDES, 2019)

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \log(K_{kp}) + n \log t \quad (9)$$

Na equação 9, n é o expoente difusional, ou expoente de liberação,  $K_{kp}$  é a constante de velocidade de Korsmeyer (MENDES, 2019). Os valores do expoente n são utilizados para caracterizar diferentes mecanismos de liberação, apresentado na Tabela 10

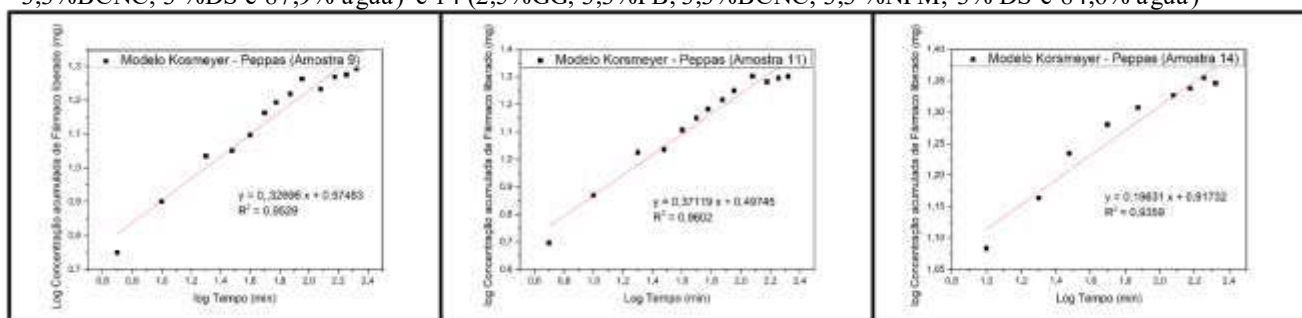
**Tabela 13:** Descrição do mecanismo em função do expoente

| Expoente difusional | Mecanismo de transporte       |
|---------------------|-------------------------------|
| $n = 0,5$           | Modelo Fickiano               |
| $n = 1$             | Modelo não Fickiano           |
| $0,5 < n < 1$       | Modelo não Fickiano anômalo   |
| $n < 0,5$           | Comportamento pseudo Fickiano |

Fonte: MENDES, 2019

Para estudar o modelo proposto por Korsmeyer e Peppas, foi necessário a construção de gráficos de logaritmo da concentração acumulada de fármaco liberada pelo logaritmo do tempo (Figura 26). Avaliando os dados obtidos é possível observar que o modelo testado exibe um bom ajuste aos dados experimentais, confirmado pelos valores do coeficiente de correlação. Desta forma, os dados obtidos indicam que o modelo mais adequado para explicar o mecanismo de liberação do DS incorporado aos hidrogéis é o de Korsmeyer- Peppas.

**Figura 26:** Modelo de Korsmeyer - Peppas aplicado para os valores de concentração acumulada de fármaco liberado das amostras 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC, 3 %DS e 91,2% água), 11(2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3 %DS e 87,9% água) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM, 3% DS e 84,6% água)



Fonte: Autoria Própria, 2023

Os coeficientes de correlação para o modelo de Korsmeyer – Peppas é 0,9529 para a amostra 9; 0,9602 amostra 11 e 0,9359 amostra 14. Os dados de  $R^2$  mostram ser possível estimar o valor do expoente difusional (n), com elevada precisão, permitindo classificar o tipo de liberação. Sendo assim, os valores de n são 0,3269 amostra 9; 0,3712 amostra 11 e 0,1963 amostra 14. Como os valores de n obtidos são menores do que 0,5, o sistema pode ser considerado pseudo-Fickiano, modelo no qual as curvas de sorção são semelhantes às do modelo Fickiano, porém, a aproximação do equilíbrio final é lenta (LI, FU e ZHANG, 2014). No modelo pseudo – Fickiano aproximação do equilíbrio é mais lenta, indicando que outros fatores além da difusão pura (modelo Fickiano, difusão e equilíbrio ocorrem rapidamente) podem estar contribuindo, como interações fracas do fármaco com o material, estrutura do polímero ou limitações internas do sistema.

A análise dos perfis de liberação acumulada do diclofenaco sódico (DS) incorporado aos hidrogéis (amostras 9, 11 e 14) permite avaliar a adequação desses materiais como sistemas de liberação controlada. Considerando os modelos cinéticos aplicados, observou-se que o modelo de Korsmeyer–Peppas foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, com coeficientes de correlação superiores a 0,93 para todas as amostras, indicando um mecanismo de liberação predominantemente controlado por difusão.

Adicionalmente, a análise dos expoentes difusionais ( $n$ ) revelou valores inferiores a 0,5 para todas as amostras, sugerindo um comportamento de liberação classificado como pseudo-Fickiano. Esse tipo de liberação ocorre quando a difusão do fármaco é o mecanismo predominante, mas é influenciada por outras variáveis, como a estrutura da matriz polimérica ou interações fármaco-polímero. Segundo Sui (2023), valores de  $n$  abaixo de 0,5 indicam que o processo de aproximação do equilíbrio é mais lento, o que pode ser benéfico para sistemas que visam liberação prolongada, evitando picos abruptos de concentração plasmática.

Entretanto, para uma avaliação completa da viabilidade desses hidrogéis como sistemas de liberação, é essencial considerar o fenômeno do burst release, caracterizado por uma liberação rápida e intensa do fármaco nos primeiros instantes da exposição ao meio de dissolução. Segundo Ahmed (2015), essa liberação inicial acelerada ocorre, geralmente, quando há uma grande quantidade de fármaco adsorvido superficialmente na matriz, o que pode resultar em concentrações plasmáticas indesejadas e efeitos adversos.

O burst release é caracterizado por uma liberação rápida de grandes quantidades de fármaco nos primeiros minutos ou horas após a administração, sendo frequentemente atribuído à presença de fármaco adsorvido na superfície do hidrogel ou distribuído em regiões próximas à interface com o meio de liberação (Ahmed, 2015). Embora em certos contextos esse efeito possa ser desejável (por exemplo, quando se busca um efeito terapêutico imediato), na maioria das formulações de liberação prolongada o burst é indesejado, pois pode resultar em efeitos colaterais, toxicidade e perda precoce de eficácia do sistema (Liechty e Peppas, 2001).

Ao observar os dados experimentais, nota-se que, em apenas 10 minutos, a amostra 14 libera 30,28% do fármaco total incorporado. Esse comportamento indica a presença de um burst release significativo. Amostras 9 e 11, por sua vez, liberam cerca de 19,87% e 18,52% em 10 minutos. De acordo com Qui e Park (2001), valores superiores a 30% de liberação acumulada nos primeiros 10 minutos já podem ser considerados indicativos de burst, especialmente em formulações destinadas à liberação sustentada.

Apesar da presença de um leve efeito burst (com exceção da amostra 14), a liberação observada rapidamente se estabiliza e passa a ocorrer de forma mais gradual ao longo do tempo, o que é evidenciado pela boa aderência ao modelo de Higuchi e, especialmente, ao modelo de Korsmeyer–Peppas (Peppas e Narasimhan, 2014). Essa transição do burst inicial para uma liberação mais controlada é uma característica compatível com sistemas híbridos de liberação, que combinam um efeito imediato seguido de liberação sustentada (Qui e Park, 2001).

A presença de interações fracas entre o DS e os constituintes do hidrogel pode ser benéfica, pois evita retenções excessivas que comprometeriam a liberação. Segundo Sui (2023), microgéis e hidrogéis com baixa interação química com o fármaco apresentam comportamento mais previsível e reprodutível, especialmente em ambientes fisiológicos variados.

Além disso, a capacidade do hidrogel de inchar em meio aquoso e liberar o fármaco de forma sustentada demonstra sua responsividade a ambientes fisiológicos, uma característica chave para formulações de administração oral, tópica ou injetável.

Apesar dos bons indicadores, algumas limitações devem ser consideradas, o comportamento de liberação foi avaliado in vitro, e não se sabe ainda como o sistema se comportaria in vivo, frente a desafios como presença de enzimas, variabilidade de pH e fluxo sanguíneo. Além disso, análises como citotoxicidade, biocompatibilidade e degradação in vivo ainda são necessárias para validar o uso clínico.

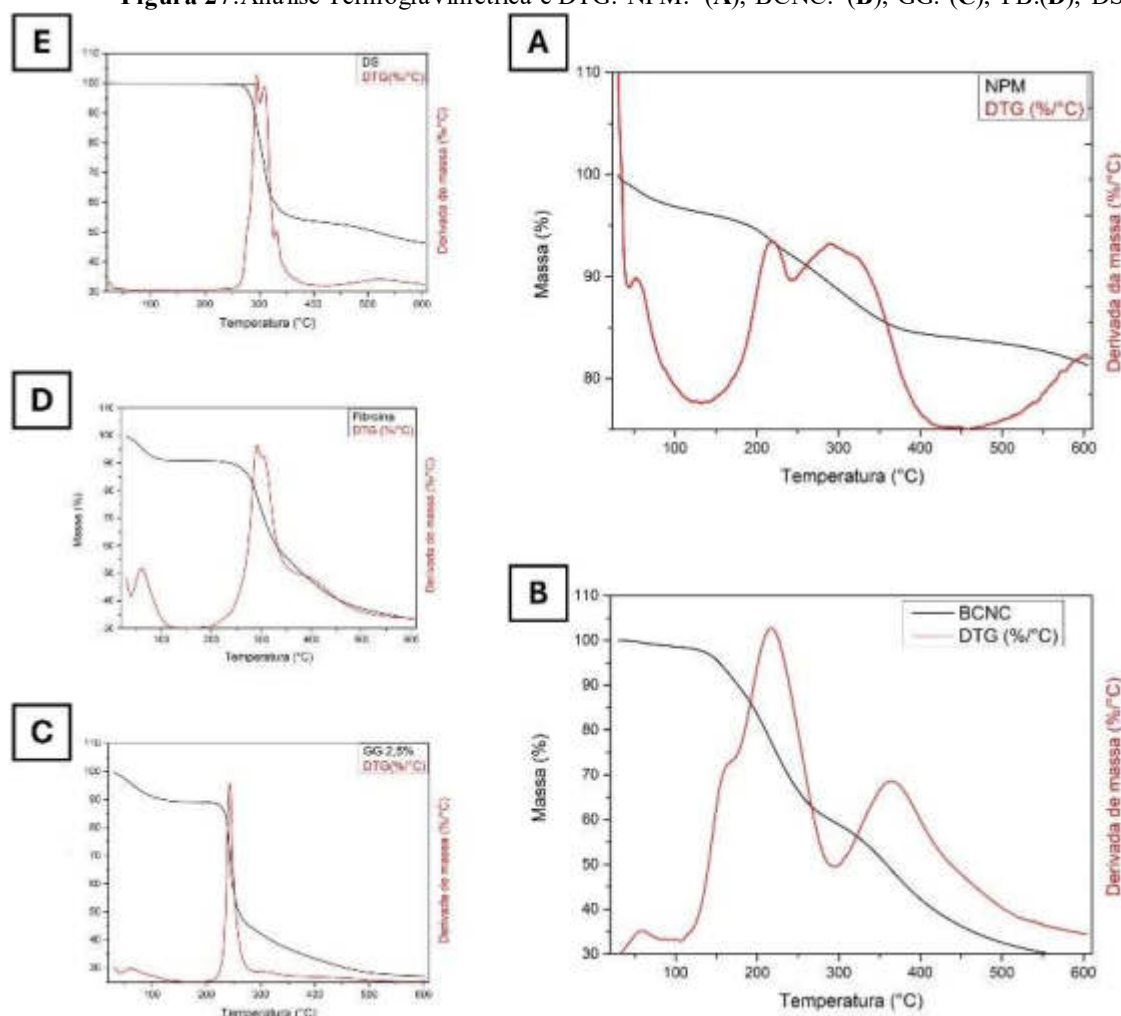
Em relação a amostra 14, a rápida liberação inicial pode ser desejável em casos em que se objetiva um início de ação rápida do fármaco, como no alívio imediato da dor. Contudo, para formulações de liberação prolongada, esse comportamento pode comprometer a eficácia terapêutica a longo prazo e aumentar o risco de toxicidade.

Portanto, conclui-se que os hidrogéis analisados apresentam potencial como sistemas de liberação de fármacos, principalmente pela predominância de um mecanismo controlado por difusão. No entanto, a presença de burst release, na amostra 14, impõe uma limitação que precisa ser cuidadosamente considerada e mitigada para aplicações que requeiram liberação controlada e prolongada.

#### **4.2.3 Análise Termogravimétrica (TGA)**

A análise termogravimétrica foi realizada na GG, FB, BCNC, NPM, DS e nos hidrogéis com o intuito avaliar o comportamento térmico dos materiais. Nessa análise é possível observar a perda percentual de massa de acordo com o aumento de temperatura, além de que, também foi realizada a termogravimetria derivada (DTG) para acompanhar os eventos térmicos ocorridos durante o aquecimento das amostras. A Figura 27 apresenta o TGA e a termogravimetria derivada (DTG) das matérias primas

**Figura 27:** Análise Termogravimétrica e DTG. NPM. (A); BCNC. (B); GG. (C); FB.(D); DS. (E)



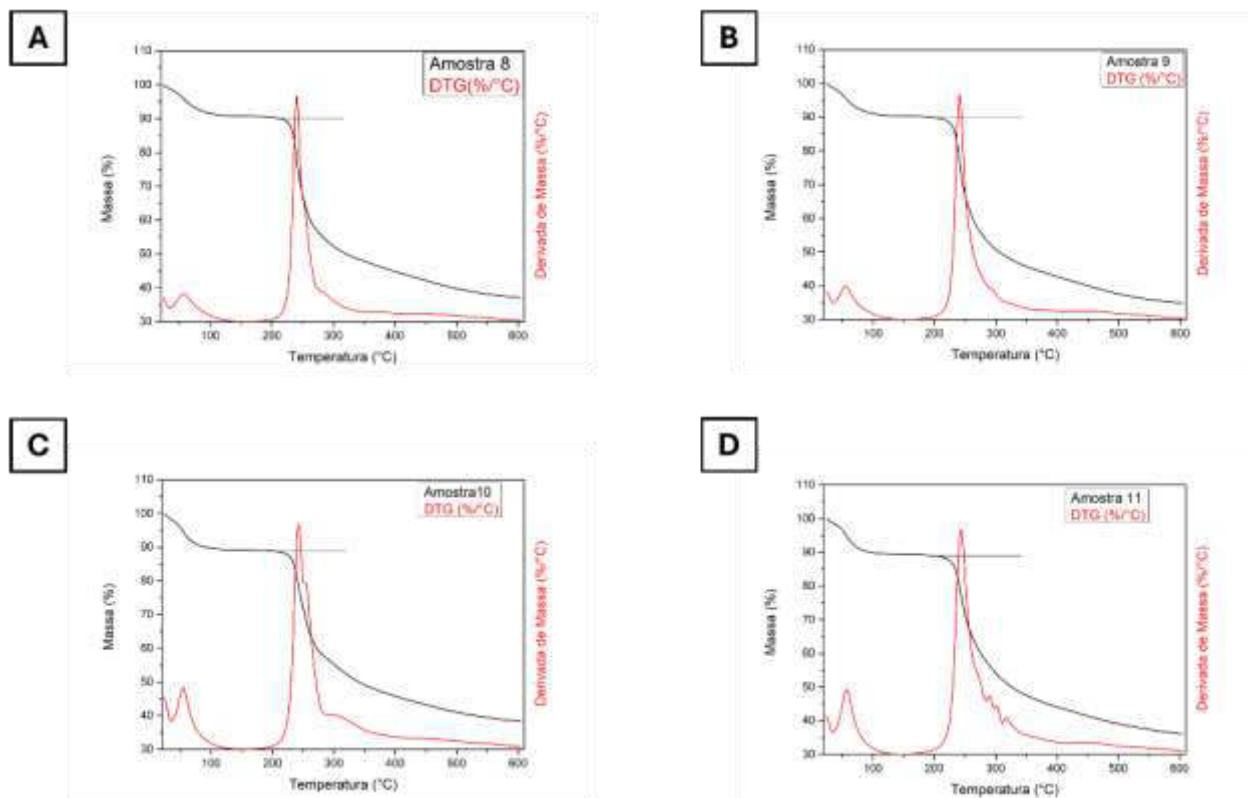
Fonte: Autoria Própria, 2023

Na Figura 27, é possível observar que as matérias primas apresentam perda de umidade em torno de 100 a 220 °C, sendo essas, 5,42% para as NPM, 8,9% FB, 10,9% GG, 2% BCNC e 0,5% DS. A FB mostrou um evento de sua primeira derivada (DTG) em 290 a 300 °C que pode ser associada à degradação com a quebra de grupos de resíduos de aminoácidos laterais e, a clivagem de ligações peptídicas (NOGUEIRA *et al*, 2010; UM *et al*, 2001). Isto significa que a FB está na sua estrutura amorfa, pelo fato de a sua decomposição térmica ser condicionada a características morfológicas e físicas (FREDDI *et al*, 1999), de modo que, as fibras bem orientadas se degradam após 300 °C, a estrutura folha beta de 290 a 295 °C e a estrutura amorfa abaixo de 290 °C (NOGUEIRA, 2005), ou seja, o material possui alta resistência térmica. Além disso, é possível observar que até a temperatura de 610 °C, o material não degradou completamente, deixando como resíduo cerca de 30%. Ainda de acordo com a figura, é possível observar que os BCNC possuem a temperatura inicial de degradação em torno de 220 °C e

temperatura máxima de degradação em 364 °C, as degradações se dão por uma série de reações de degradação da celulose, além disso, sua temperatura final de degradação em torno de 450 °C, apresenta perda de massa em torno de 71%. Provavelmente devido a estrutura cristalina, possui alta resistência térmica. Como apresenta TAIPINA (2012), quanto maior a cristalinidade da amostra, maior é a temperatura de decomposição térmica, devido ao baixo teor de componente amorfo. Contudo, é importante ressaltar que a hidrólise com ácido sulfúrico diminui a estabilidade térmica do material, pelo fato de os grupos sulfatos exercerem efeito catalítico nas reações de desidratação da celulose. É importante observar que o terceiro evento térmico, observados nas curvas de DTG, corresponde as fortes interações dos BCNC com o ácido sulfúrico, favorecendo a degradação termo oxidativa do carbono em altas temperaturas (TAIPINA, 2012; TEIXEIRA *et al*, 2010; COSTA *et al*, 2018). Em relação as NPM, é possível observar a ocorrência de um resíduo de 80%. Na análise, o material apresentou uma perda de massa de 20% até a temperatura de 610 °C, transformando-se em nanohematita, material avermelhado. Foi observado duas regiões de perda de massa. Na primeira, de 31 °C a 220 °C, se relaciona a perda de água de 5,42%, na segunda, de 220 °C a 550 °C, perdeu-se 10,5% de massa. Além disso, uma perda de água adsorvida e/ou de cristalização entre 220°C e 375°C. Os eventos térmicos foram verificados com a literatura, como apresentado no trabalho de Holland, 2014. A GG, como dito anteriormente, possui uma perda de massa em 10,9%, aproximadamente, à 100 °C, atribuída a dessorção de água. A partir de 150 °C é observado o início da decomposição térmica das cadeias poliméricas da GG, apresentando seu principal evento em 243 °C, o que expressa uma perda 60,1% de sua massa. A análise térmica é importante no meio farmacêutico por fornecer informações em relação a qualidade do produto, eficácia terapêutica ou estabilidade ao longo do prazo de validade. Sendo assim, também foi realizada o TGA do DS (RIBEIRO *et al*, 2016). No TGA do DS, é possível observar uma perda de massa (0,5%) de 25 a 270 °C. O quantitativo dessa perda, em massa, sugere não se tratar de água de hidratação, mas sim de água superficial, pois, caso fosse água de hidratação, a porcentagem de perda seria maior (SILVEIRA *et al*, 2014). Caso o DS estivesse em sua forma hidratada, seria possível observar uma diminuição de massa como consequência da perda de moléculas de água de cristalização para a amostra hidrato, o que não ocorre nesse trabalho, pois, a amostra se encontra na forma anidra, conforme apresenta a literatura (AGUIAR, 2009). Na Figura 27, é possível observar a decomposição térmica do DS que ocorre no intervalo de 280 a 330 °C, com principais eventos em 295 °C e 310 °C, confirmado pelo DTG. Sendo assim, como

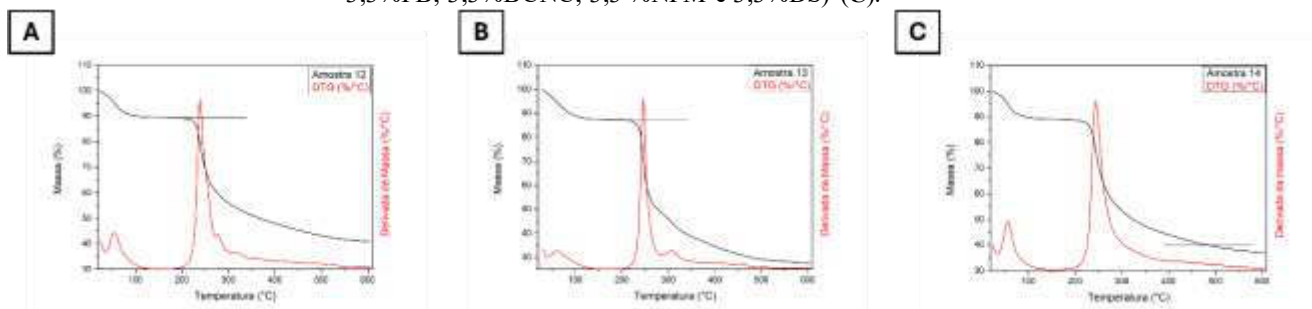
as outras matérias primas estudadas, o diclofenaco de sódio também apresenta uma boa estabilidade térmica. Em seguida, podemos avaliar os resultados dos hidrogéis obtidos nas Figuras 28 e 29.

**Figura 28:** Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG) das amostras 8 ((2,5%GG, 3%DS e 94,5%água) (A), 9 (2,5%GG, 3,3%BCNC e 3% DS) (B), 10(2,5%GG, 3,3%FB e 3% DS) (C) e 11 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC e 3% DS) (D).



Fonte: Autoria Própria, 2023

**Figura 29:** Análise termogravimétrica (TGA) e termogravimetria derivada (DTG) das amostras 12 ((2,5%GG,3,3%NPM e 3% DS) (A), 13 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM) (B) e 14 (2,5%GG, 3,3%FB, 3,3%BCNC, 3,3 %NPM e 3,3%DS) (C).



Fonte: Autoria Própria, 2023

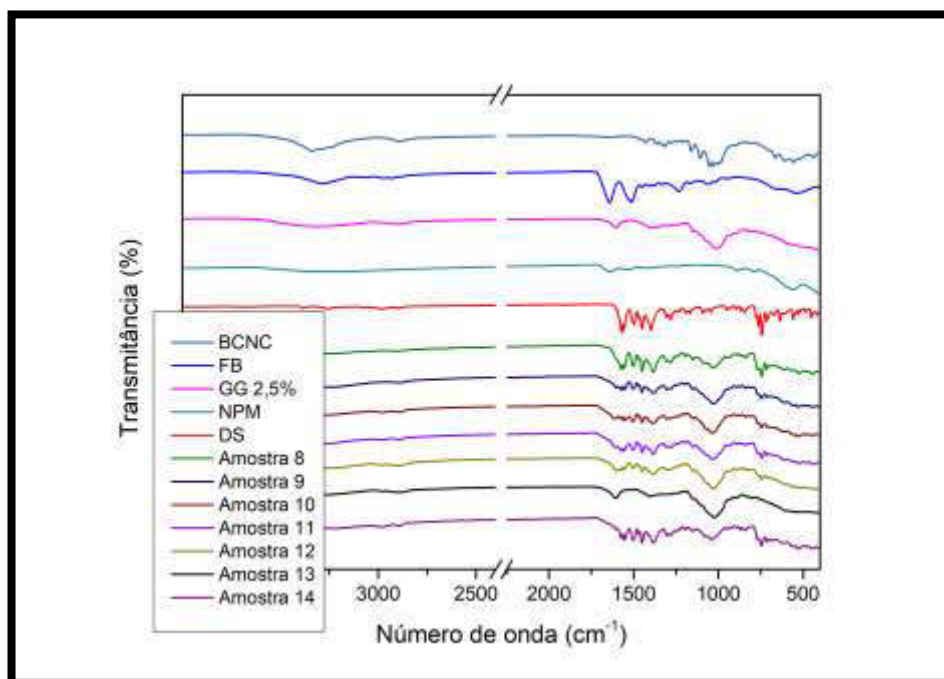
Avaliando o TGA dos hidrogéis preparados, é possível observar que todos mostraram perfis semelhantes, com um evento em torno de 100 a 200 °C, relacionado a perda de umidade

da amostra. Em suma houve uma média de perda de massa, pela umidade, em torno de 10,97%, enquanto é possível observar os principais eventos dos hidrogéis de 230 a 280 °C, com uma perda de massa de 44,1 %. Sendo assim, a inclusão de DS aos hidrogéis não alterou de forma significativa a sua resistência térmica, quando comparamos as matérias primas, com o hidrogel sem DS (amostra 13) e, por todos apresentarem um evento em torno de 240°C. Também, para as amostras em que o diclofenaco de sódio ainda não havia sido incluído, foi obtido uma perda de massa média de 12,5 % por umidade e perda de 45% no evento de 230 °C a 280 °C, corroborando com a afirmação de que o DS não influi sobre a estabilidade térmica do material. Portanto, sabendo que a intenção de uso desse material é na área médica, é necessário que este possua resistência térmica maior que a temperatura corporal de 37 °C. Deste modo, pode-se concluir que o material é promissor para a aplicação visada no atual projeto, pois, a resistência térmica está próxima a 240°C, muito maior que a temperatura corporal.

#### **4.2.4 Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

O infravermelho com transformada de Fourier foi realizado com o intuito de observar os picos característicos dos precursores e avaliar sua presença nos hidrogéis. Os dados obtidos da análise de FTIR-ATR se encontram na Figura 30, de modo que, os espectros foram tratados pelo software OriginPro 9.0.

**Figura 30:** FTIR-ATR dos hidrogéis de FB/BCNC/GG/NPM/DS. **Amostra 8.** 2,5% GG/ 3% DS; **Amostra 9.** 2,5% GG/3% DS/3,3% BCNC; **Amostra 10;** 2,5% GG/3% DS/3,3% FB; **Amostra 11.** 2,5% GG/3% DS/3,3% BCNC/3,3% FB. **Amostra 12.** 2,5% GG/ 3% DS/ 3,3% NPM; **Amostra 13.** 2,5% GG/3,3% BCNC/3,3% FB/ 3,3% NPM. **Amostra 14.** 2,5% GG/3% DS/3,3% BCNC/3,3% FB/ 3,3% NPM



Fonte: Autoria Própria, 2023

Para confirmar a incorporação dos precursores, foi realizado FTIR-ATR nas amostras puras e nos hidrogéis. Como apresenta a Figura 30, o espectro do diclofenaco de sódio puro apresenta bandas em  $3258\text{ cm}^{-1}$ , ocasionadas pelo alongamento N-H da amina secundária. Ademais, bandas em  $1574$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$ , estão relacionados ao alongamento  $\text{C}=\text{O}$  e  $\text{C}=\text{C}$ , do anel aromático, respectivamente. As bandas de alongamento C-N da amina aromática podem ser vistas em  $1283\text{ cm}^{-1}$  e aqueles que se associam as vibrações C-Cl estão na região de  $716\text{ cm}^{-1}$  (SA'ADON S *et al*, 2021). Tratando dos BCNC, é possível observar bandas características na região de  $3333\text{ cm}^{-1}$ ,  $1160\text{ cm}^{-1}$  associados ao estiramento O-H e dobramento C-H, respectivamente (CASTRO *et al* 2012). Bandas em  $1643\text{ cm}^{-1}$ , tratam da absorção de água (H-O-H), enquanto os de  $1030\text{ cm}^{-1}$ ,  $1053\text{ cm}^{-1}$ ,  $1336\text{ cm}^{-1}$ ,  $1427\text{ cm}^{-1}$ , estão associados aos dobramentos simétricos  $\text{CH}_2$  e dobramento O-H. As bandas  $1107\text{ cm}^{-1}$ ,  $663\text{ cm}^{-1}$ ,  $900\text{ cm}^{-1}$  relacionam-se, respectivamente, ao alongamento C-C, dobramento C-OH e alongamento CH (GEA *et al*, 2011; KHAN *et al*, 2020; KUMAR *et al*, 2014; NALOKA *et al*, 2020; ARSERIM-UÇAR *et al*, 2021). Na FB é possível avaliar que na região de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , há uma banda ampla, ligeiramente assimétrica, que se associa a amida I (estiramento  $\text{C}=\text{O}$ ). Enquanto na região de  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1230\text{ cm}^{-1}$ , relacionam-se a amida II e III (deformação NH, estiramento C-N),

respectivamente (BEXIGA, 2014; CHEN *et al*, 2001). Algumas bandas características da GG que podemos observar no espectro foram as bandas de estiramento da ligação O-H em  $3331\text{ cm}^{-1}$ , essa se mostra pouco intensa pelo fato de as amostras estarem liofilizadas. Estiramento C-H dos carbonos  $\text{sp}^3$ , em  $2918\text{ cm}^{-1}$ . Vibrações assimétrica e simétrica [(C=O)-O] em  $1605\text{ cm}^{-1}$  e  $1404\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente, além disso, estiramento O-H associado ao carbono primário em  $1014\text{ cm}^{-1}$  (COELHO *et al*, 2019; SALDANHA *et al*, 2020). No espectro das NPM é possível observar os picos referentes as ligações Fe-O em  $560\text{ cm}^{-1}$  (BEASLEY *et al*, 2014; KHOZA *et al*, 2012; HERYANTO *et al*, 2021). As bandas de  $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  são referentes a água contida na síntese (RAHMAYANTI, 2020). Por fim, em relação aos hidrogéis preparados, primeiro podemos avaliar a amostra 8. Neste hidrogel, em que sua constituição é GG e DS, é possível observar os picos característicos do diclofenaco de sódio em  $1574\text{ cm}^{-1}$ ,  $716\text{ cm}^{-1}$  e, também em  $1503\text{ cm}^{-1}$ ,  $1280\text{ cm}^{-1}$ , esses dois últimos apresentam um leve deslocamento quando comparado ao espectro de DS, o que possivelmente foi acarretado devido a uma interação entre os materiais. Quanto aos picos de GG, é possível observar que os valores se mantiveram em  $3331\text{ cm}^{-1}$ ,  $2918\text{ cm}^{-1}$ ,  $1014\text{ cm}^{-1}$ , enquanto no pico de  $1605\text{ cm}^{-1}$ , é possível notar uma redução na intensidade, e o desaparecimento em  $1404\text{ cm}^{-1}$ . Na amostra 9, dado que seus constituintes são GG, DS e BCNC, os picos de GG e DS são os mesmos observados na amostra 8, ao passo que os picos de  $1160\text{ cm}^{-1}$ ,  $900\text{ cm}^{-1}$  e  $663\text{ cm}^{-1}$  dos BCNC sofreram um deslocamento e os de  $1643\text{ cm}^{-1}$ ,  $1336\text{ cm}^{-1}$ ,  $1427\text{ cm}^{-1}$ ,  $1107\text{ cm}^{-1}$  desapareceram. A amostra 10, mostrou um desaparecimento do pico de FB em  $1640\text{ cm}^{-1}$ , deslocamento em  $1514\text{ cm}^{-1}$  e manteve o de  $1230\text{ cm}^{-1}$ , além de preservar as mesmas bandas de GG e DS que os hidrogéis apresentados. A amostra 11, em que há GG, DS, FB e BCNC, não é possível afirmar que houve uma interação entre os constituintes, pois, os seus picos característicos se sobrepõem e/ou desaparecem, porém, é evidente a presença dos precursores no hidrogel. A amostra 12, diferentemente dos outros hidrogéis apresentados, há a inclusão das NPM. A banda característica das NPM se encontra em  $560\text{ cm}^{-1}$ , contudo, não é possível verificar essa banda nos hidrogéis, possivelmente por uma interação entre a mesma e um pico do diclofenaco de sódio que também se apresenta no valor de  $560\text{ cm}^{-1}$ . A amostra 13 é importante para essa análise, pois, este não possui DS em sua constituição, apenas GG, FB, BCNC e NPM, sendo assim, em seu espectro é possível contemplar que não há nenhum pico característico referente ao fármaco e, dessa forma, ao comparar com os outros hidrogéis, fica evidente a incorporação do diclofenaco de sódio nas amostras 8, 9, 10, 11, 12 e 13. A amostra 14 apresentou todos os picos característicos aqui já

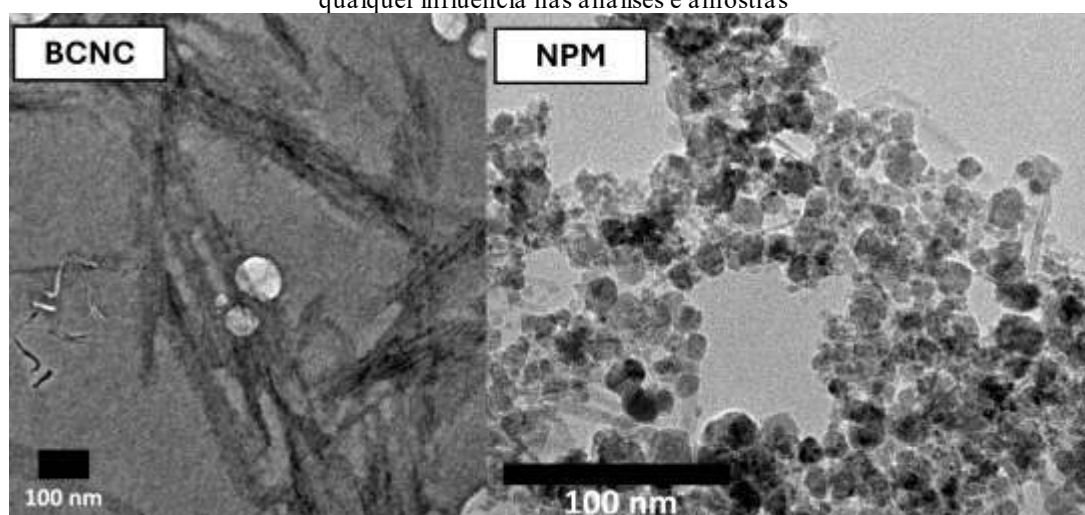
apresentados, com exceção da banda das NPM, que como já visto, não se apresentou em nenhum hidrogel. Vale ressaltar que a sobreposição de bandas não permite concluir se houve ou não a formação de um composto que se encontre a nível intermolecular, porém, houve um surgimento e/ou bandas características dos precursores nos hidrogéis conforme esses materiais eram incluídos nas amostras, sendo assim, possivelmente indicando que o material é uma associação polimérica.

#### 4.2.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A morfologia e dimensões dos BCNC e NPM, foram confirmadas através da Microscopia eletrônica de Transmissão.

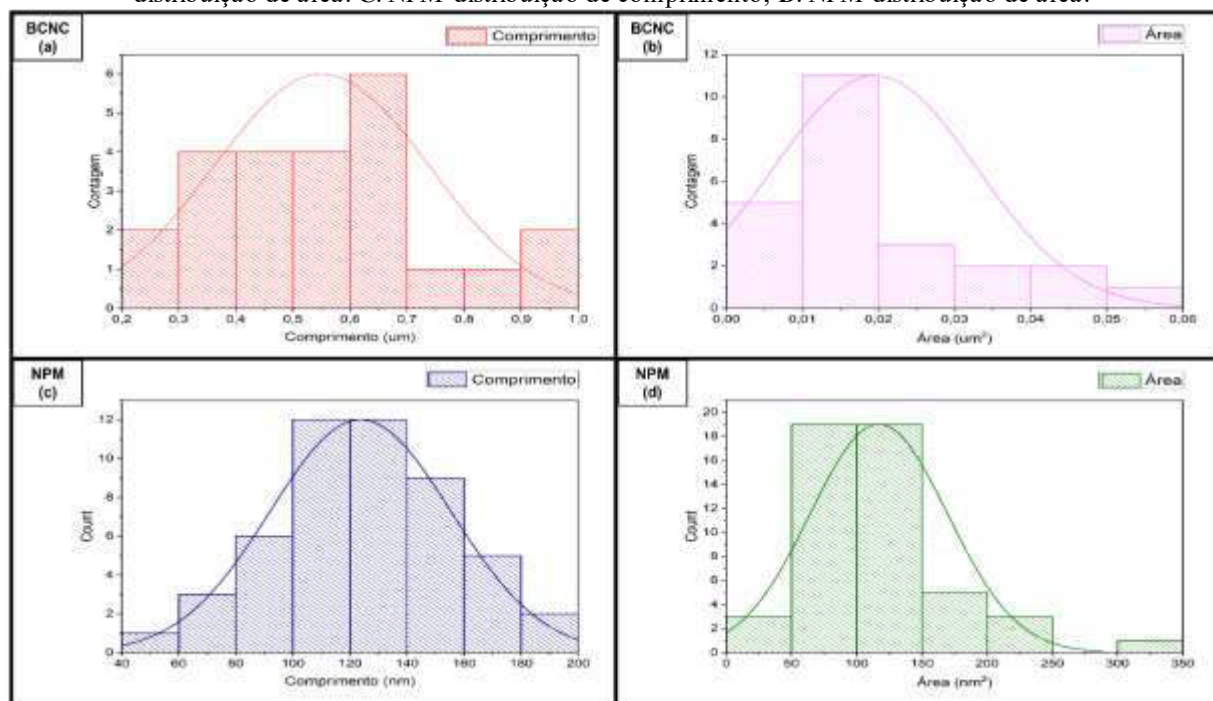
A Figura 31 apresenta a TEM dos BCNC e NPM e a Figura 32 seus respectivos histogramas de comprimento e área.

**Figura 31:**Microscopia eletrônica de Transmissão dos BCNC e das NPM. As formas circulares da imagem dos BCNC são referentes aos “furos” da camada de carbono do grid e podem ser desconsiderados de qualquer influência nas análises e amostras



Fonte: Autoria Própria, 2023

**Figura 32:** Histogramas dos BCNC e NPM; **A.** BCNC distribuição de comprimento; **B.** BCNC distribuição de área. **C.** NPM distribuição de comprimento; **D.** NPM distribuição de área.



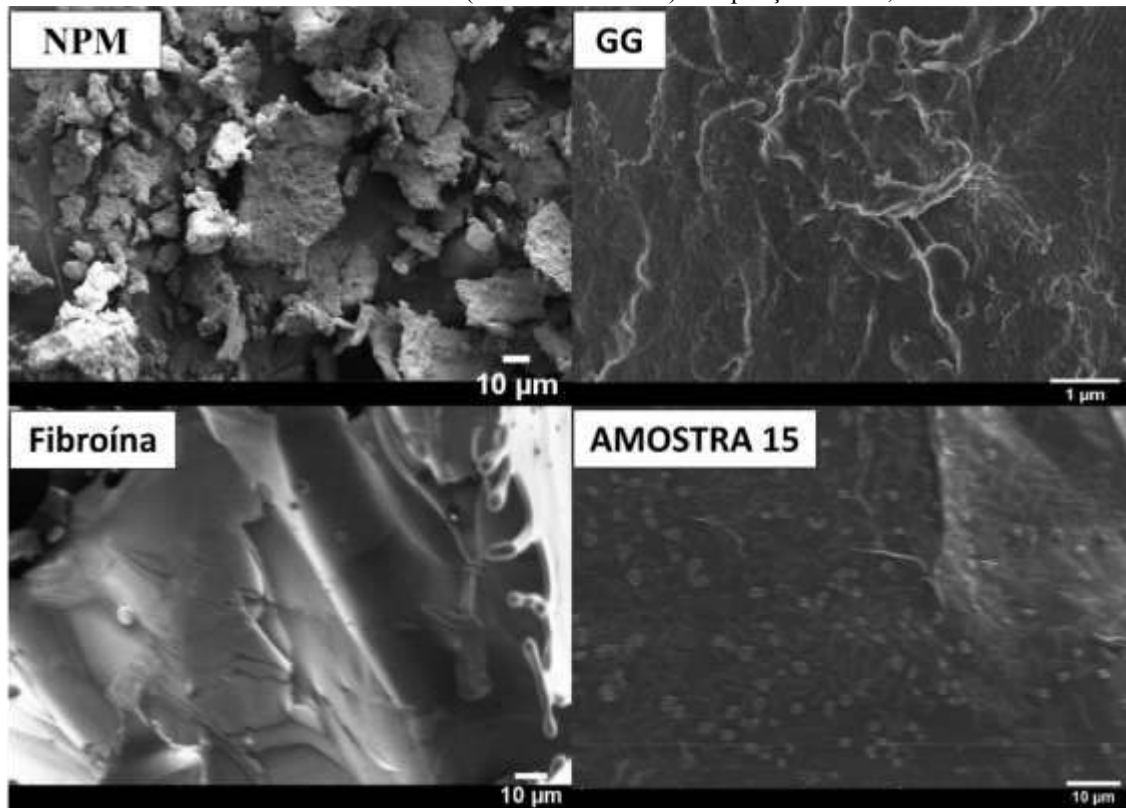
Fonte: Autoria Própria, 2023

Tendo em vista os dados obtidos, foi possível confirmar que os BCNC apresentam formato uniforme e de agulhas, chamado Whiskers, também encontrado na literatura por Roman (2004) e Hirai (2009). Além disso, podemos concluir pelos histogramas que os nanocristais variam seu comprimento de 0,2 um até 1 um, e sua área varia até 0,06 um<sup>2</sup>. Enquanto o comprimento das NPM varia de 40nm até 200nm, e sua área até 350 nm<sup>2</sup>.

#### 4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

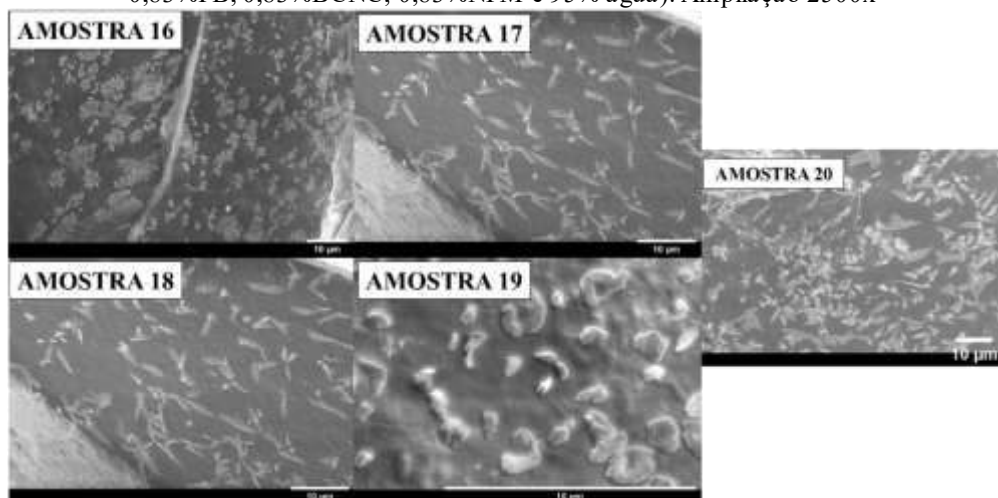
A Figura 33 e 34, apresentam os dados obtidos por MEV dos controles (FB, GG e NPM) e também as amostras 15 a 20. Não é apresentado a micrografia dos BCNC pelo fato de este não aparecerem na microscopia utilizada, sendo os dados inconclusivos.

**Figura 33:** Microscopia eletrônica de Varredura das NPM. Ampliação 1000x. GG. Ampliação 1200x. Amostras 15 (2%GG e 2%NPM). Ampliação 2000x;



Fonte: Autoria Própria,2023

**Figura 34:**Microscopia eletrônica de Varredura das **Amostras 16** (2,5%GG, 2,5%NPM e 95% água). Ampliação 2500x. **Amostra 17** (2%GG, 0,25%FB, 1,25%BCNC, 0,5%NPM e 95,5% água). Ampliação 3500x. **Amostra 18** (2,5%GG, 0,31%FB, 1,56%BCNC, 0,63%NPM e 95%água). Ampliação 5000x. **Amostra 19.** (2%GG, 0,67%FB, 0,67%BCNC, 0,67%NPM, 95,5%água) Ampliação 15000x. **Amostra 20** (2,5%GG, 0,83%FB, 0,83%BCNC, 0,83%NPM e 95% água). Ampliação 2500x



Fonte: Autoria Própria,2023

Obtidos os dados, de acordo com o MEV de FB, é possível concluir que o material possui poucas rugosidades, como também foi afirmado por Cavicchioli (2017). Além disso, a FB e o hidrogel de GG apresentaram grumos em sua superfície, possivelmente dada a contração do material durante a secagem na liofilização e também, sem presença de materiais particulados. Enquanto o MEV das NPM apresentam um aglomerado de partículas com morfologia heterogênea, sem porosidade e com área média de  $2 \text{ um}^2$  e comprimento médio de 30 um, valores obtidos com o software ImageJ. Além disso, os valores ficaram muito próximo aos obtidos com TEM. Também, vale ressaltar que não foram feitas medidas de propriedades magnéticas das partículas de magnetita, contudo, na presença de campo magnético os materiais foram atraídos pelo campo e, na sua ausência, foram facilmente resuspenso na solução, o que indica nenhuma magnetização remanescente, caracterizando o material como superparamagnético (Figura 35) (LIMA DE ANDRADE *et al*, 2009).

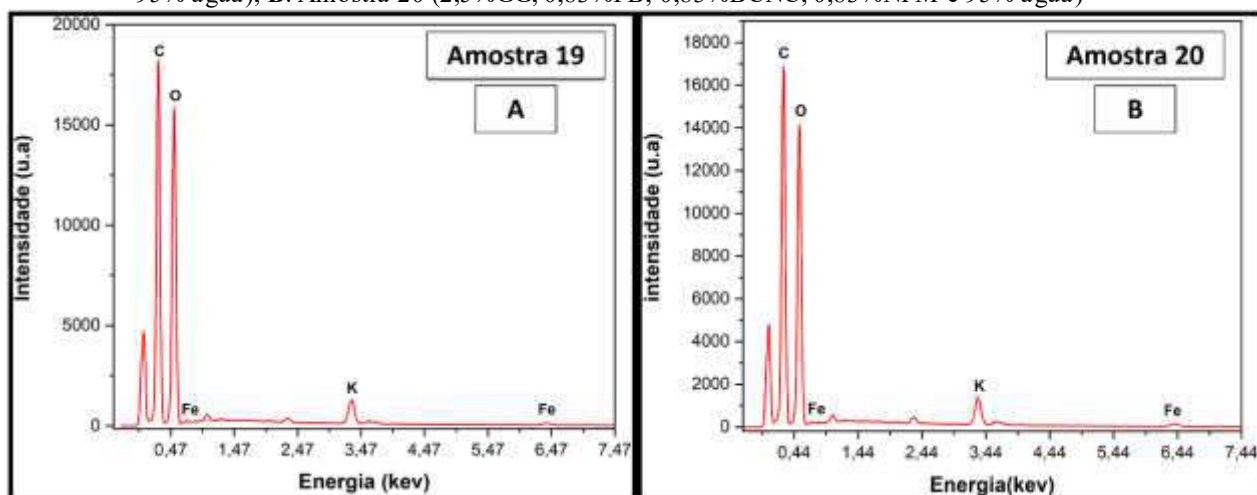
**Figura 35:** NPM em solução aquosa respondendo ao campo magnético do ímã, confirmando suas propriedades magnéticas



**Fonte:** Autoria Propria, 2023.

Tratando-se das amostras amostra 15 a 20, foi possível observar em suas superfícies particulados, que são referentes as NPM, concluindo então a adesão das NPM à superfície do hidrogel, vale ressaltar que é possível também observar cristais, que se dá pela cristalização da goethita e magnetita, ambas apresentam propriedades magnéticas (AHN *et al*, 2012). A Espectroscopia de raios X por energia dissipativa (EDS) realizada juntamente com o MEV é apresentado na Figura 36.

**Figura 36:** Análise EDS dos hidrogéis. **A.** Amostra 19 (2%GG, 0,67%FB, 0,67%BCNC, 0,67%NPM e 95% água); **B.** Amostra 20 (2,5%GG, 0,83%FB, 0,83%BCNC, 0,83%NPM e 95% água)



Fonte: Autoria Própria, 2023

A espectroscopia por dispersão de energia (EDS) foi utilizada para avaliar a composição elemental superficial das amostras 19 e 20. Conforme mostra a Figura 36, foram detectados os elementos carbono (C), oxigênio (O), potássio (K) e ferro (Fe). Os sinais intensos de C e O são atribuídos à presença dos biopolímeros utilizados na formulação, como GG, FB e BCNC, todos compostos predominantemente por grupos orgânicos oxigenados.

A detecção de ferro (Fe) em ambas as amostras confirma a incorporação bem-sucedida das nanopartículas magnéticas (NPM) de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

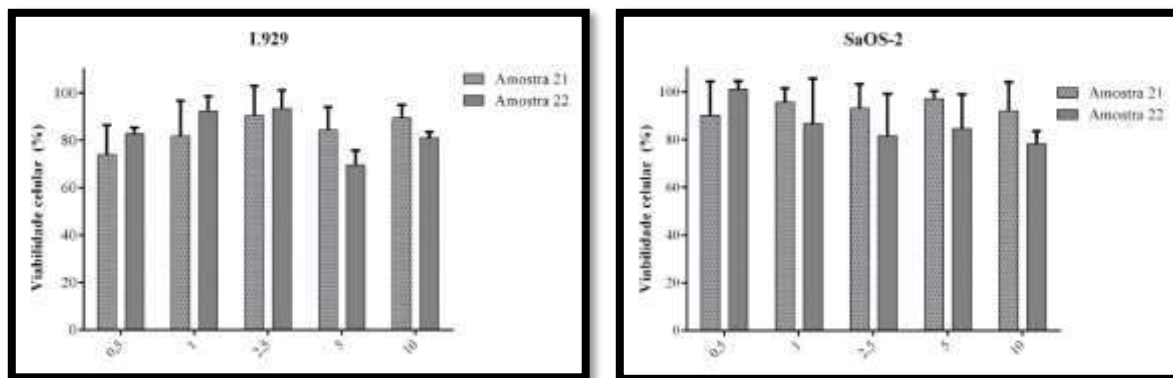
Os dados de EDS, portanto, validam qualitativamente a composição esperada dos sistemas híbridos orgânico-inorgânicos, evidenciando tanto a natureza polimérica da matriz quanto a presença do agente funcional magnético, essencial para aplicações visadas em dispositivos responsivos ou sistemas de liberação controlada.

#### 4.2.7 Ensaio de Mutagenicidade e Citotoxicidade

##### 4.2.7.1 Citotoxicidade

Conforme apresentado na Figura 37 abaixo, pode-se constatar que as amostras 21 e 22 não apresentaram efeito citotóxico para ambas as linhagens celulares empregadas, tendo em vista que para todas as concentrações testadas a viabilidade celular se manteve superior a 70%, evidenciando a citocompatibilidade dos materiais. 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

**Figura 37:** Avaliação da citotoxicidade das amostras 21 (0,3% GG, 0,3%FB, 6% BCNC, 0,3%NPM) e 22 (0,3%GG, 0,3%FB e 6%BCNC) frente as linhagens de (A) fibroblasto murino e (B) osteoblasto humano, respectivamente. O MTT foi utilizado como reagente colorimétrico.



Fonte: Autoria Própria, 2024

Esses achados estão de acordo com outros estudos que avaliaram citocompatibilidade de hidrogéis baseados em biopolímeros. Por exemplo, Malmonge *et al.* (2011) destacam que a viabilidade celular superior a 70% é um indicativo de citocompatibilidade, conforme estabelecido pela norma ISO 10993-5. A ausência de citotoxicidade observada pode ser atribuída à natureza atóxica dos componentes do hidrogel (Um *et al.*, 2001).

A ausência de citotoxicidade observada nos hidrogéis desenvolvidos neste estudo confirma as expectativas baseadas na literatura existente. A combinação de FB e CNC resulta em materiais que não apenas oferecem estabilidade e resistência, mas também segurança para uso em dispositivos médicos. Isso reforça o potencial desses hidrogéis para futuras aplicações terapêuticas.

#### 4.2.7.2 Mutagenicidade

Os resultados com relação ao potencial mutagênico avaliado pelo teste de Ames estão apresentados nas Tabelas abaixo. A Tabela 15 mostra a média do número de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) dos diferentes tratamentos.

De acordo com os resultados obtidos, as amostras-teste não provocaram um aumento estatisticamente significativo no número de revertentes em relação ao controle negativo, em nenhuma das concentrações e cepas de *Salmonella Typhimurium* analisadas, demonstrando a ausência de atividade mutagênica, nas condições experimentais utilizadas. O IM foi menor que 2 em todas as análises de dados.

**Tabela 14:**Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/ placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de Salmonella Typhimurium após os tratamentos

|                                    | Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM |                           |                           |                          |
|------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                                    | TA98                                       | TA100                     | TA102                     | TA97a                    |
| <b>CE</b>                          | 22 ± 3                                     | 88 ± 13                   | 306 ± 43                  | 115 ± 21                 |
| <b>C +</b>                         | 934 ± 64 <sup>*,a</sup>                    | 1720 ± 192 <sup>*,b</sup> | 1974 ± 127 <sup>*,c</sup> | 1520 ± 88 <sup>*,a</sup> |
| <b>NPM</b>                         |                                            |                           |                           |                          |
| <b>uL/placa</b>                    |                                            |                           |                           |                          |
| <b>12,5</b>                        | 24 ± 6 (1,09)                              | 119 ± 24 (1,35)           | 303 ± 47 (0,99)           | 122 ± 12 (1,06)          |
| <b>25</b>                          | 28 ± 5 (1,25)                              | 98 ± 8 (1,11)             | 308 ± 11 (1,01)           | 133 ± 9 (1,16)           |
| <b>50</b>                          | 24 ± 5 (1,07)                              | 104 ± 13 (1,18)           | 253 ± 24 (0,83)           | 107 ± 21 (0,93)          |
| <b>75</b>                          | 25 ± 1 (1,14)                              | 93 ± 16 (1,06)            | 264 ± 39 (0,86)           | 126 ± 28 (1,10)          |
| <b>100</b>                         | 25 ± 4 (1,14)                              | 79 ± 10 (0,90)            | 269 ± 18 (0,88)           | 106 ± 18 (0,92)          |
| <b>GG</b>                          |                                            |                           |                           |                          |
| <b>uL/placa</b>                    |                                            |                           |                           |                          |
| <b>12,5</b>                        | 25 ± 6 (1,11)                              | 103 ± 21 (1,17)           | 316 ± 42 (1,03)           | 131 ± 24 (1,14)          |
| <b>25</b>                          | 27 ± 7 (1,23)                              | 91 ± 17 (1,03)            | 293 ± 18 (0,96)           | 140 ± 11 (1,22)          |
| <b>50</b>                          | 24 ± 6 (1,09)                              | 94 ± 14 (1,07)            | 266 ± 50 (0,87)           | 101 ± 18 (0,88)          |
| <b>75</b>                          | 22 ± 3 (1,00)                              | 106 ± 28 (1,20)           | 293 ± 23 (0,96)           | 90 ± 10 (0,78)           |
| <b>100</b>                         | 24 ± 1 (1,09)                              | 86 ± 17 (0,98)            | 214 ± 39 (0,70)           | 96 ± 13 (0,83)           |
| <b>Amostra 22 – GG+FB+BCNC</b>     |                                            |                           |                           |                          |
| <b>uL/placa</b>                    |                                            |                           |                           |                          |
| <b>12,5</b>                        | 26 ± 6 (1,18)                              | 99 ± 7 (1,13)             | 296 ± 40 (0,97)           | 137 ± 14 (1,19)          |
| <b>25</b>                          | 20 ± 8 (0,91)                              | 96 ± 13 (1,09)            | 286 ± 31 (0,93)           | 131 ± 11 (1,14)          |
| <b>50</b>                          | 22 ± 3 (1,00)                              | 94 ± 14 (1,07)            | 299 ± 24 (0,98)           | 147 ± 18 (1,28)          |
| <b>75</b>                          | 21 ± 6 (0,93)                              | 101 ± 4 (1,15)            | 287 ± 33 (0,94)           | 136 ± 6 (1,18)           |
| <b>100</b>                         | 18 ± 3 (0,81)                              | 107 ± 10 (1,22)           | 292 ± 47 (0,95)           | 125 ± 10 (1,09)          |
| <b>FB</b>                          |                                            |                           |                           |                          |
| <b>uL/placa</b>                    |                                            |                           |                           |                          |
| <b>12,5</b>                        | 29 ± 4 (1,32)                              | 103 ± 14 (1,17)           | 332 ± 43 (1,08)           | 121 ± 18 (1,05)          |
| <b>25</b>                          | 26 ± 5 (1,16)                              | 100 ± 18 (1,14)           | 361 ± 41 (1,18)           | 130 ± 18 (1,13)          |
| <b>50</b>                          | 26 ± 2 (1,18)                              | 119 ± 10 (1,35)           | 282 ± 38 (0,92)           | 126 ± 25 (1,10)          |
| <b>75</b>                          | 25 ± 7 (1,14)                              | 102 ± 16 (1,16)           | 311 ± 30 (1,02)           | 107 ± 19 (0,93)          |
| <b>100</b>                         | 27 ± 8 (1,20)                              | 109 ± 10 (1,24)           | 298 ± 23 (0,97)           | 106 ± 16 (0,92)          |
| <b>Amostra 21 - GG+FB+BCNC+NPM</b> |                                            |                           |                           |                          |
| <b>uL/placa</b>                    |                                            |                           |                           |                          |
| <b>12,5</b>                        | 27 ± 1 (1,20)                              | 105 ± 21 (1,19)           | 313 ± 36 (1,02)           | 147 ± 14 (1,28)          |

|            |               |                 |                 |                 |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>25</b>  | 23 ± 4 (1,05) | 102 ± 20 (1,16) | 305 ± 31 (1,00) | 141 ± 21 (1,23) |
| <b>50</b>  | 24 ± 3 (1,09) | 92 ± 17 (1,05)  | 263 ± 21 (0,86) | 117 ± 11 (1,02) |
| <b>75</b>  | 23 ± 4 (1,02) | 98 ± 15 (1,11)  | 255 ± 10 (0,83) | 106 ± 11 (0,92) |
| <b>100</b> | 20 ± 6 (0,91) | 74 ± 9 (0,84)   | 212 ± 23 (0,69) | 108 ± 18 (0,94) |

Fonte: Autoria Própria, 2024

\*  $p < 0.05$  (ANOVA);  $M \pm DP$  = média; e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; CE = controle espontâneo: taxa espontânea de reversão das linhagens de *Salmonella* Typhimurium; C + = Controle Positivo: <sup>a</sup>4-nitro-o-fenilenodiamina (10,0 µg/placa – TA98, TA97a); <sup>b</sup>azida sódica (1,25 µg/placa – TA100); <sup>c</sup>mitomicina (0,5 µg/placa – TA102).

Estudos anteriores, como o de Zeiger (2001), reforçam a eficácia do teste de Ames na identificação de compostos mutagênicos. A ausência de atividade mutagênica nas amostras testadas está em concordância com a literatura, que relata que materiais baseados em biopolímeros, como a FB e os CNC, tendem a apresentar baixos índices de mutagenicidade (Mortelmans & Zeiger, 2000)

Os resultados obtidos para os hidrogéis avaliados mostraram-se consistentes com os dados disponíveis na literatura, reforçando o potencial biomédico dos materiais utilizados. A FB é amplamente reconhecida por sua elevada biocompatibilidade, além de ser capaz de formar hidrogéis com boas propriedades mecânicas. Segundo Altman *et al.* (2003), biomateriais à base de FB proporcionam um ambiente favorável à proliferação celular, sem indução de efeitos citotóxicos, sendo eficazes em aplicações como a engenharia de tecidos.

Da mesma forma, os CNC destacam-se por suas propriedades excepcionais, como alta resistência mecânica e compatibilidade com sistemas biológicos. De acordo com o estudo de Habibi *et al.* (2010), a incorporação de CNC em matrizes poliméricas resulta em materiais com desempenho mecânico superior, mantendo a biocompatibilidade celular e apresentando baixos níveis de toxicidade. Esses atributos tornam os na CNC componentes promissores para dispositivos e materiais que demandam contato direto com tecidos humanos

A partir dos ensaios reacionais realizados para extração dos BCNC, verificou-se que a utilização do material úmido, em comparação ao material seco, resultou em maior eficiência de extração, dobrando a concentração de BCNC de cerca de 3% (m/V) para aproximadamente 6% (m/V). O tempo de hidrólise de 60 minutos mostrou-se o mais eficaz, proporcionando uma solução de BCNC com morfologia adequada e evidência de birrefringência, característica dos CNC. A análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM) confirmou que os BCNC obtidos apresentaram comprimento médio de 183 nm e espessura média de 23 nm.

Os hidrogéis CNC/FB/GG desenvolvidos mostraram-se promissores para aplicações em bioimpressão 3D. Dentre eles, a amostra 7, composta por 11% de CNC, 0,5% FB, 0,5% de GG e 88% de água, destacou-se por apresentar comportamento pseudoplástico com módulo elástico ( $G'$ ) e módulo viscoso ( $G''$ ) variando entre 1.000 e 10.000 Pa, além de tensão de escoamento em torno de 400 Pa, parâmetros ideais para extrusão e formação de filamentos estáveis. A caracterização por FTIR evidenciou bandas específicas de cada precursor, sendo que o espectro da amostra 7 se assemelhou ao do CNC isolado, indicando maior concentração de nanocelulose na matriz.

Os testes de impressão 3D confirmaram alta fidelidade dimensional da amostra 7, com estrutura estável e porosidade controlada. A análise pós-impressão revelou filamentos e poros variando de 483  $\mu\text{m}$  (filamentos não secos) e 317  $\mu\text{m}$  (poros não secos) para cerca de 250  $\mu\text{m}$  (filamentos secos) e 370  $\mu\text{m}$  (poros secos), comprovando a manutenção da estrutura após o processamento. Esses resultados indicam elevado potencial de uso como *scaffold* celular e curativos personalizáveis, com possibilidade de moldagem de geometrias complexas via manufatura aditiva. Em função dos desafios de escalonamento e reprodutibilidade, optou-se por substituir a celulose bacteriana pelos nanocristais comerciais (CelluForce) para o desenvolvimento do primeiro grupo de formulações (CNC/FB/GG). Dentre as formulações estudadas, a amostra 14, composta por 2,5% de GG, 3,3% de BCNC, 3,3% de FB, 3,3% de NPM e 3% de DS, apresentou o melhor desempenho. Essa amostra apresentou comportamento pseudoplástico, com módulo elástico ( $G'$ ) superior ao módulo viscoso ( $G''$ ) e tensão de escoamento adequada, além de estabilidade térmica em torno de 240 °C, conforme indicado pela TGA. Contudo, a inclusão das NPM não surtiu efeito no controle de liberação fármaco, porém, revela que sua inclusão influencia na modulação da liberação

Os ensaios de liberação de fármaco evidenciaram comportamento pseudo-Fickiano, sendo o processo governado predominantemente por difusão, com perfil de liberação ajustado ao modelo de Korsmeyer-Peppas e baixo desvio padrão. A análise por TEM revelou que os cristais de BCNC apresentaram comprimento entre 0,2  $\mu\text{m}$  e 1  $\mu\text{m}$ , com área média de 0,06  $\mu\text{m}^2$ , enquanto as NPM variaram entre 40 e 200 nm, com área de até 350 nm<sup>2</sup>. O MEV confirmou a adesão uniforme das NPM à superfície do hidrogel, enquanto a análise EDS comprovou a presença de ferro, atestando a incorporação das nanopartículas magnéticas.

Por fim, os ensaios de citotoxicidade e mutagenicidade demonstraram que os hidrogéis desenvolvidos são seguros, apresentando viabilidade celular superior a 70% e índice de mutagenicidade inferior a 2, evidenciando ausência de toxicidade e potencial para aplicação terapêutica. Diante disso, conclui-se que os hidrogéis formulados, tanto o CNC/FB/GG para impressão 3D de *scaffolds* e curativos personalizados, quanto o GG/BCNC/FB/NPM/DS para liberação sustentada de fármacos, apresentam desempenho técnico satisfatório, segurança biológica e propriedades ajustáveis de acordo com a aplicação. Entretanto, recomenda-se a realização de estudos complementares *in vivo* e validações clínicas para confirmar sua eficácia e viabilidade em sistemas biomédicos avançados.

AGARWAL, K., SRINIVASAN, V., LATHER, V. *et al.* Insights of 3D bioprinting and focusing the paradigm shift towards 4D printing for biomedical applications. **Journal of Materials Research** 38, 112–141 (2023). <https://doi.org/10.1557/s43578-022-00524-2>

ALBDIRY MT, YOUSIF BF, KU H, LAU KT. A critical review on the manufacturing processes in relation to the properties of nanoclay / polymer composites. **J Compos Mater** 2012; 47:1093–115.

A. LI, T. GONG, X. LI, X. LI, X. YANG, Y. GUO, Preparation of thermally stable emulsion gels based on Glucono- $\delta$ -lactone induced gelation of gellan gum, **Int. J. Biol. Macromol.** 156 (2020) 565–575, <https://doi.org/10.1016/J. IJBIOMAC.2020.04.099>.

A.Q. ALMASHHADANI, C.P. LEH, S.-Y. CHAN, C.Y. LEE, C.F. GOH, Nanocrystalline cellulose isolation via acid hydrolysis from non-woody biomass: importance of hydrolysis parameters, **Carbohydr. Polym.** 286 (2022), 119285, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119285>

ADEL, Islam M. *et al.* Gellan gum-based bi-polymeric hydrogel scaffolds loaded with Rosuvastatin calcium: A useful tool for tendon tissue regeneration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 192, p. 106659, 2024.

ADEYEYE, C. M.; LI, P. Diclofenac Sodium. *Analytical Profiles of Drug Substances, Pennsylvania: Academic*, v. 19, p. 123-144, 1990.

AGUIAR, Fernando Armani. **Caracterização das propriedades do estado sólido do diclofenaco de sódio e avaliação destas propriedades no perfil in vitro de dissolução e no efeito farmacológico.** 2009. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos)-Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. Universidade de São Paulo.

AHN, Taebin *et al.* Formation pathways of magnetite nanoparticles by coprecipitation method. **The journal of physical chemistry C**, v. 116, n. 10, p. 6069-6076, 2012.

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

ALBDIRY MT, YOUSIF BF, KU H, LAU KT. A critical review on the manufacturing processes in relation to the properties of nanoclay / polymer composites. **J Compos Mater** 2012; 47:1093–115.

AL-SALEH MH, SUNDARARAJ U. Composites : part A Review of the mechanical properties of carbon nanofiber / polymer composites. **Compos Part A Appl Sci Manuf** 2011; 42:2126–42.

ALTMAN, G. H., DIAZ, F., JAKUBA, C., CALABRO, T., HORAN, R. L., CHEN, J., ... & KAPLAN, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. **Biomaterials**, 24(3), 401-416. doi:10.1016/S0142-9612(02)00353-8.

ARAKI J, WADA M, KUGA S, OKANO T. Flow properties of microcrystalline cellulose suspension prepared by acid treatment of native cellulose. **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp** 1998; 142:75–82.

ARAKI J, WADA M, KUGA S. Steric stabilization of a cellulose microcrystal suspension by poly (ethylene glycol) grafting. **Langmuir** 2001; 17:21–7.  
ARSERIM-UÇAR, Dilhun Keriman *et al.* Characterization of bacterial cellulose nanocrystals: Effect of acid treatments and neutralization. **Food chemistry**, v. 336, p. 127597, 2021.

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.

AZAM, Farooq *et al.* Synthesis and characterization of natural fibers reinforced alginate hydrogel fibers loaded with diclofenac sodium for wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 241, p. 124623, 2023.

B. KUNDU, N. E. KURLAND, S. BANO, C. PATRA, F. B. ENGEL, V. K. YADAVALLI, S. C. Kundu, **Prog. Polym. Sci.** 2014, 39, 251

B. ZHU, H. WANG, W. R. LEOW, Y. CAI, X. J. LOH, M.-Y. HAN, X. CHEN, **Adv. Mater.** 2016, 28, 4250.

B.B. MANDAL, B. GHOSH, S.C. KUNDU, Non-mulberry silk sericin/poly (vinyl alcohol) hydrogel matrices for potential biotechnological applications, **Int. J. Biol. Macromol.** 49 (2) (2011) 125–133, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.03.015>.

BAJAJ, I. B., SURVASE, S. A., SAUDAGAR, P. S., & SINGHAL, R. S. (2007). Gellan gum: Fermentative production, downstream processing and applications. **Food Technology and Biotechnology**, 45(4), 341–354.

BALDINI FUMIS, Daniel. **Estudo do comportamento térmico das nanopartículas de Fe3O4 funcionalizadas. Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Bauru. 2023.

BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Food Gels: Gelling Process and New Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 52, 334-346.

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

BECK-CANDANEDO S, ROMAN M, GRAY DG. Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. **Biomacromolecules** 2005; 6:1048–54.

BEXIGA, NATÁLIA MARCHESAN. **Preparo e avaliação comparativa das propriedades físico-químicas de hidrogéis de fibroína de seda com conteúdo variado de sericina obtidos a partir dos cloretos de cálcio e lítio em sistemas distintos de solventes.** 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/D.9.2014.tde-19092014-093819.

BHATTACHARYA, M., MALINEN, M. M., LAUREN, P., LOU, Y. R., KUISMA, S. W., KANNINEN, L. K., ... & URTTI, A. (2012). Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture. **Journal of controlled release**, 164(3), 291-298. doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.039.

BLACK, J. (1992). "Biological performance of material". In: Fundamentals of Biocompatibility, **Marcel Dekker**, NY.

BRITO, E.L. *et al.* Superparamagnetic magnetite/IPEC particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 560, n. August 2018, p. 376–383, jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.067>

BROWN, A. J. (1886). On an acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, 49, 432–439.

C. AI, L. LIU, J.C.H. GOH, Pore size modulates in vitro osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in fibronectin/gelatin coated silk fibroin scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C* **124** (November 2020) (2021) 112088, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112088>

C. DENG, J. YANG, H. HE, *et al.*, 3D bio-printed biphasic scaffolds with dual modification of silk fibroin for the integrated repair of osteochondral defects, **Biomater. Sci.** (2021), <https://doi.org/10.1039/d1bm00535a>. Published online.

C. LIU, Z. BAI, J. LIN, *et al.*, 3D printing silk-gelatin-propanediol scaffold with enhanced osteogenesis properties through p-Smad1/5/8 activated Runx2 pathway, **J. Biomater. Sci. Polym.** Ed. 32 (12) (2021) 1515–1529, <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1912977>.

C.L. WILDER, A.D. FRIEDRICH, R.O. PONS, G.O. DAUMY, M.L. Francoeur: **Biochemistry** Vol. 31 (1992), p. 27

C.R. CANTOR AND P.R. SCHIMMEL: *Biophysical Chemistry, part II: Techniques for the study of biological structure and function* (WH Freeman & Co, San Francisco 1980)

C.Z. ZHOU, Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene, **Nucleic Acids Res.** 28 (12) (2000) 2413–2419, <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.2413>.

CALVINO, C., MACKE, N., KATO, R., & ROWAN, S. J. (2020). Development, processing and applications of bio-sourced cellulose nanocrystal composites. **Progress in Polymer Science**, 103.

CASTRO, C. *et al.* Bacterial cellulose produced by a new acid-resistant strain of *Gluconacetobacter* genus. **Carbohydrate Polymers**, 89(4), 1033-1037.

CAVICCHIOLI, M. *et al.* Fabrication of Biocompatible, Functional, and Transparent Hybrid Films Based on Silk Fibroin and Epoxy Silane for Biophotonics. **ACS Applied Materials & Interfaces**, n. 33, v. 9, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b06061>

CHANDRASEKARAN R, RADHA A. Molecular architectures and functional properties of gellan gum and related polysaccharides. **Trends Food Sci Technol** 1995;6.

CHEN, Xin *et al.* Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR. **Polymer**, v. 42, n. 25, p. 09969-09974, 2001.

CHEN, Xin *et al.* Conformation transition kinetics of regenerated Bombyx mori silk fibroin membrane monitored by time-resolved FTIR spectroscopy. **Biophysical chemistry**, v. 89, n. 1, p. 25-34, 2001.

CHIULAN I, FRONE AN, BRANDABUR C, PANAITESCU DM. Recent Advances in 3D Printing of Aliphatic Polyesters. **Bioengineering** (Basel). 2017 Dec 24;5(1):2.

CHOWDHURY, REAZ A.; PENG, SHANE X.; YOUNGBLOOD, JEFFREY. Improved order parameter (alignment) determination in cellulose nanocrystal (CNC) films by a simple optical birefringence method. **Cellulose**, v. 24, p. 1957-1970, 2017.

COELHO, J. *et al.* Biosynthesis and isolation of gellan polysaccharide to formulate microspheres for protein capture. **Carbohydrate Polymer**, v. 220, 236-246, 2019

COSTA CAS. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: **Artes Médicas**; 2001. p.145-60.

COSTA, Juliana Francine da et al. Nanocristais de celulose bacteriana: da obtenção, sob diferentes condições de hidrólise, à incorporação como reforço em poli (L-ácido láctico). **Matéria** (Rio de Janeiro), v. 22, 2018.

D. N. Rockwood, R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett, D. L. Kaplan, **Nat. Protoc.** 2011, 6, 1612

DA SILVA, Rafael Fernandes et al. Ação do diclofenaco de sódio e do celecoxibe na cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas de ratos wistar tratados com óleo de girassol. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 24, n. 2, p. 168-179, 2021.

DAS P, COLOMBO M, PROSPERI D. Recent advances in magnetic fluid hyperthermia for cancer therapy. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**. 2019; 174:42-55.

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 MENEZES, Aparecido Junior *et al.* Extrusion and characterization of functionalized cellulose whiskers reinforced polyethylene nanocomposites. **Polymer**, v. 50, n. 19, p. 4552-4563, 2009.

DO CARMO PARESQUE, Mara Carolina; DE OLIVEIRA, Elizabeth Mendes; DE CASTRO, José Adilson. Influência do tempo de revestimento no tamanho e estabilidade de nanopartículas de magnetita para tratamentos de hipertermia magnética. **Tecnologia em Metalurgia, Materiais e Mineração**, v. 16, n. 4, p. 512-517, 2019.

DONG XM, KIMURA T, REVOL JF, GRAY DG. Effects of ionic strength on the isotropic–chiral nematic phase transition of suspensions of cellulose crystallites. **Langmuir** 1996; 12:2076–82.

F.L. MI, S.S. SHYU, C.K. PENG, Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin, **J. Polym. Sci. A Polym. Chem.** 43 (10) (2005) 1985–2000, <https://doi.org/10.1002/pola.20669>.

FEKETSHANE, Z., ALVEN, S., ADERIBIGBE, B.A., 2022. Gellan gum in wound dressing scaffolds. **Polymers** (Basel) 14 (19). <https://doi.org/10.3390/polym14194098>.

FREDDI, G. *et al.* Swelling and dissolution of silk fibroin (*Bombyx mori*) in N-methyl morpholine N-oxide. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 24, n. 2-3, p. 251-263, Mar.1999.

G. KULKARNI, P. GUHA RAY, P.K. BYRAM, M. KAUSHAL, S. DHARA, S. DAS, Tailorable hydrogel of gelatin with silk fibroin and its activation/crosslinking for enhanced proliferation of fibroblast cells, **Int. J. Biol. Macromol.** 164 (2020) 4073–4083, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.016>.

GABRIEL T, WONDU K, DILEBO J (2021) Valorization of khat (*Catha edulis*) waste for the production of cellulose fibers and nanocrystals. **PLoS ONE** 16(2): e0246794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246794>

GE *et al.* (2018). Fabrication of antibacterial collagen-based composite wound dressing. **AVS Sustainable Chemistry & Engineering**, 6(7), 9153-9166

GEA, S. *et al.* (2011). Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behavior of bacterial cellulose after a two-step purification process. **Bioresource Technology**, 102(19), 9105-9110.

GENNARO, A. R. Remington: the Science and practice of pharmacy. 20 ed. **Philadelphia: Lippincott, Williams e Wilkins**, 2000. 2076 p.

GIAVASIS, I., HARVEY, L. M., & MCNEIL, B. (2000). Gellan gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, 20(3), 177–211. <https://doi.org/10.1080/07388550008984169>

GOMES, Aline Alexandrina. **Síntese, caracterização físico-química e avaliação da hematocompatibilidade, in vitro, de nanopartículas de magnetita**. 2022. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2022.

GOMES, D. *et al.* Progress and opportunities in gellan gum-based materials: A review of preparation, characterization and emerging applications. **Carbohydrate Polymers**, p. 120782, 2023.

GRUNERT M, WINTER WT. Nanocomposites of cellulose acetate butyrate reinforced with cellulose nanocrystals. **J Polym Environ** 2002; 10:27–30.

GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHIMIDT, B.; AUTIAN, J. J.PHARM SCI, v. 54, p. 1545-1547, 1965.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.

H. Y. WANG AND Y. Q. ZHANG, **Biotechnol. Prog.**, 2015, 31, 630–640.

HABIBI, Y., LUCIA, L. A., & ROJAS, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, 110(6), 3479-3500. doi:10.1021/cr900339w.  
HAO, Y. *et al.* In vitro blood compatibility evaluation of silk fibroin by chemical crosslinking. **Materials Technology**, v. 30, n. 6, p. 327-331, 2015.

HAUSMANN, Michael K. *et al.* Dynamics of cellulose nanocrystal alignment during 3D printing. **ACS nano**, v. 12, n. 7, p. 6926-6937, 2018.

HENSTEN-PETTERSEN A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. **Int Endod J**. 1988; 21: 89-99.

HERYANTO, HERYANTO; TAHIR, DAHLANG. The correlations between structural and optical properties of magnetite nanoparticles synthesised from natural iron sand. **Ceramics International**, v. 47, n. 12, p. 16820-16827, 2021.

HEUX L, CHAUVE G, BONINI C. Nonflocculating and chiral-nematic self-ordering of cellulose microcrystals suspensions in nonpolar solvents. **Langmuir** 2000; 16:8210–2.

HIRAI, A.; INUI, O.; HORII, F.; Tsuji, M.; **Langmuir** 2009, 25, 497.

HOLLAND, Helber. **Síntese e caracterização de nanopartículas de magnetita e aplicação na obtenção do <sup>99</sup>Mo de fissão**. 2014. 140 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

HONGPING, D.; JIANLIN, L.; MEIBIAN, Z.; WEIC, W.; LIFEN, J.; SHIJIE, C.; WEI, Z.; BAOHONGA, W.; JILIANG, H. Detecting the cytogenetic effects in workers occupationally exposed to Vincristine with four genetic tests. **Mutation Research**, 2006. No Prelo.

I. KOGEL-KNABNER, " W. AMELUNG, 12.7 - Dynamics, Chemistry, and Preservation of Organic Matter in Soils, 2nd E.eds., **Elsevier, Turekian**, 2014, pp. 157–215 (H. D. Holland & K. K. B. T.-T. on Ghttps://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0- 08-095975-7.01012-3

INOUE, S.; TANAKA, K.; ARISAKA, F.; KIMURA, S.; OHTOMO, K.; MIZUNO, S. Silk fibroin of Bombyx mori is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. **J. Biol. Chem.** 2000, 275, 40517–40528.

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

IURI C.M. CANDIDO; LUYGUI G. SILVA *et al.* PVA-silk fibroin bio-based triboelectric nanogenerator, **Nano Energy**, v. 105, 2023, 108035, ISSN 2211-2855, <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2022.108035>.

J. ZHANG, R. RAJKHOWA, J. L. LI, X. Y. LIU, X. G. WANG, **Mater. Des.** 2013, 49, 842  
J.A.P. VILELA, A.L.F. ^ CAVALLIERI, R. LOPES DA CUNHA, The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate–gellan gum, **Food Hydrocoll.** 25 (2011) 1710–1718, <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2011.03.012>.

J.S. BOATENG, K.H. MATTHEWS, H.N.E. STEVENS, G.M. ECCLESTON, Wound healing dressings and drug delivery systems: a review, **J. Pharm. Sci.** 97 (2008) 2892–2923, <https://doi.org/10.1002/jps.21210>.

JEEVAHAN, J. J., CHANDRASEKARAN, M., VENKATESAN, S. P., SRIRAM, V., JOSEPH, G. B., MAGESHWARAN, G., *et al.* (2020). Scaling up difficulties and commercial aspects of edible films for food packaging: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 100, 210–222. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.014>

JORGE, J. H.; GIAMPAOLO, E. T.; PAVARINA, A. C. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. **Rev Odontol UNESP**, v. 33, n. 2, p. 65-8, 2004.

K. MIN, S. KIM, S. KIM, *Sci. Rep.* 2018, 8, 9598.

KAMALHA, Edwin *et al.* FTIR and WAXD study of regenerated silk fibroin. **Advanced Materials Research**, v. 677, p. 211-215, 2013.

KHAN, H.; KADAM, A.; DUTT, D. (2020). Studies on bacterial cellulose produced by strain of Lactobacillus genus. **Carbohydrate Polymers**, 229, Article 115513

KLEMM, D., HEUBLEIN, B., FINK, H. P., & BOHN, A. (2005). Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angew Chem Int Ed Engl**, 44(22), 3358-3393.  
KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. Dicionário Terapêutico Guanabara. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KUMAR, A. *et al.* 2014. Characterization of cellulose nanocrystals produced by acid-hydrolysis from sugarcane bagasse as agro-waste. **Journal of Material Physics and Chemistry**, 2(1), 1-8

L.-D. Koh, Y. Cheng, C.-P. Teng, Y.-W. Khin, X.-J. Loh, S.-Y. Tee, M. Low, E. Ye, H.-D. Yu, Y.-W. Zhang, M.-Y. Han, *Prog. Polym. Sci.* 2015, 46, 86.

L.S. MOREIRA TEIXEIRA, J. FEIJEN, C.A. VAN BLITTERSWIJK, P.J. DIJKSTRA, M. KARPERIEN, Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: emerging strategies for tissue engineering, **Biomaterials** 33 (5) (2012), <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.067>.

LANE, CONNOR; RODE, DAVID; RÖSGEN, THOMAS. Birefringent properties of aqueous cellulose nanocrystal suspensions. **Cellulose**, v. 29, n. 11, p. 6093-6107, 2022.

LARA-PÉREZ, C., LEYVA, E., ZERMENO, B., OSORIO, I., MONTALVO, C., MOCTEZUMA, E., 2020. Photocatalytic degradation of diclofenac sodium salt: adsorption and reaction kinetic studies. **Environ. Earth Sci.** 79 <https://doi.org/10.1007/s12665-020-09017-z>.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. E.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. **Porto Alegre: ArtMed**, 1995.

LEWIN, B. Genes VII. Porto Alegre: Artmed, 2001.

LI, N. N.; FU, C. P. & ZHANG, L. M. "Using casein and oxidized hyaluronic acid to form biocompatible composite hydrogels for controlled drug release". **Mater. Sci. Eng. C**, 36: 287, 2014.

LI, ZHE *et al.* Extraction of cellulose nanocrystalline from Camellia oleifera Abel waste shell: Study of critical processes, properties and enhanced emulsion performance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, p. 127890, 2024.

LIMA DE ANDRADE, PRISCYLA; ALBINO OLIVEIRA DE AGUIAR, JOSE. **Síntese e caracterização da magnetita revestida por polímeros naturais (fucana e levana) para imobilização de enzimas**. 2009. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

LIMA, LAIS R. *et al.* Nanocristsais de Celulose a partir de Celulose Bacteriana. **Química Nova** [online]. 2015, v. 38, n. 9 [Acessado 8 Fevereiro 2022], pp. 1140-1147.

LING, Shengjie *et al.* FTIR imaging, a useful method for studying the compatibility of silk fibroin-based polymer blends. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 21, p. 5401-5406, 2013.

LYUTYY TV, HRYSHKO OM, YAKOVENKO MY. Uniform and nonuniform precession of a nanoparticle with finite anisotropy in a liquid: opportunities and limitations for magnetic fluid hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2019; 473:198-204.

M. AI, C. GUO, L. WANG, *et al.*, Modulating surface charge of dexamethasone nonspherical microcrystals for improved inner ear delivery, **Colloids Surf. B: Biointerfaces** 204 (February) (2021) 111806, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111806>.

M. MISRA, S. VIVEKANANDHAN, A.K. MOHANTY, J. DENAULT, 4.10 - Nanotechnologies for Agricultural Bioproducts, 3rd Ed., Pergamon, Moo-Young, 2011, pp. 119–127. M. B. T.-C. B.ed.

M.M. BEASLEY, E.J. BARTELINK, L. TAYLOR, R.M. MILLER. Comparison of transmission FTIR, ATR, and DRIFT spectra: implications for assessment of bone bioapatite diagenesis, **J. Archaeol. Sci.** 46 (2014) 16–22, <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.03.008>.  
MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the Micronucleus Assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mutation Research**, v. 489, p. 147-172, 2001.

MALMONGE, S. M. et al. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo in vitro. **Research on Biomedical Engineering**, v. 15, n. 1-2, p. 49-54, 2011.

Maron DM, Ames BN: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutat Res** 1983, 113:173–215.

MARSCHNER, R. G. **Síntese e funcionalização de hidrogéis de poli (álcool vinílico)**.2015. Dissertação (Mestrado em ciência dos materiais) - Instituto de química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MARTÍNEZ-SANZ, M., LOPEZ-RUBIO, A., & LAGARON, J. M. (2011). Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. **Carbohydrate Polymers**, 85, 228–236.

MENDES, A. P. **Cinética de Liberação de clorexidina em Nanocompósito de Magnetita e Quitosana**. Dissertação (Mestrado em Química)- Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, São Carlos. Universidade Federal de São Carlos. 2019.

MESQUITA, J. P. **Nanocristais de celulose para preparação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicações tecnológicas e ambientais**. 2012. Tese de doutorado- Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

MORAES, M. A. **Obtenção e caracterização de materiais micro e nanoestruturados contendo fibroína de seda combinada a outros polímeros biocompatíveis para contato com células**. 2014. Tese de doutorado-Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2014.

MORRIS, E. R.; NISHINARI, K.; RINAUDO, M. Gelation of gellan – A review. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 2, p. 373-411, 2012.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, 455(1-2), 29 – 60, 2000. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00064-6

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.

N. LIN, X.Y. LIU, Correction: correlation between hierarchical structure of crystal networks and macroscopic performance of mesoscopic soft materials and engineering principles, **Chem. Soc. Rev.** 44 (21) (2015) 7917, <https://doi.org/10.1039/C5CS90084K>.

N. WANG, E. DING, R. CHENG, Thermal degradation behaviors of spherical cellulose nanocrystals with sulfate groups, **Polymer** 48 (2007) 3486–3493, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.03.062>

NALOKA, K.; MATSUSHITA, K.; THEERAGOO, G. (2020). Enhanced ultrafine nanofibril biosynthesis of bacterial nanocellulose using a low-cost material by the adapted strain of *Komagataeibacter xylinus* MSKU 12. **International Journal of Biological Macromolecules**, 150, 1113-1120.

NAMITA JINDAL, JASVIRINDER SINGH KHATTAR. Chapter 4 - Microbial Polysaccharides in Food Industry. **Academic Press**. 2018, p. 95-123.

NOGUEIRA, G. M. **Obtenção e caracterização de membranas de fibroína de seda para aplicação como biomaterial**. 2005. 78 p. (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005

NOGUEIRA, G. M.; RODAS, A. C.D.; LEITE, C. A.P.; GILES, C.; HIGA, O. Z.; POLAKIEWICZ, B.; BEPPU, M. M. Preparation and characterization of ethanol-treated silk fibroin dense membranes for biomaterials application using waste silk fibers as raw material. **Bioresource Technology** 101 (2010) 8446–8451

NOVAL, Virginia E.; OCHOA PUENTES, Cristian; CARRIAZO, Jose G. Magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): Una estructura inorgánica con múltiples aplicaciones en catálisis heterogénea. **Rev.Colomb.Quim.**, Bogotá, v. 46, n. 1, p. 42-59, Apr. 2017.

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

OLIVEIRA EM, PARESQUE MCC, SILVA LM, LOPES LCR, CASTRO JA. Study of the effects of SiO<sub>2</sub> nanoparticles concentration on the TiO<sub>2</sub> nanoparticles suspensions stabilization. **Materials Science Forum**. 2016; 899:232-236.

ONG, T.; WHONG, W.; STEWART, J.; BROCKMAN, H. E. Chlorophyllin: A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. **Mutation Research**, v. 173, p. 111-115, 1986.

OSMAŁEK T, FROELICH A, TASAREK S. Application of gellan gum in pharmacy and medicine. **Int J Pharm** 2014;466:328e40. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.03.038>.

- P. ZAHEDI, I. REZAEIAN, S.O. RANAEI-SIADAT, et al., A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages, **Polym. Adv. Technol.** 21 (2010) 77–95, <https://doi.org/10.1002/pat.1625>.
- P.B. KHOZA, M.J. MOLOTO, L.M. SIKHWIVHILU. The effect of solvents, acetone, water, and ethanol, on the morphological and optical properties of ZnO nanoparticles prepared by microwave, **Journal of Nanotechnology** (2012) 195106, <https://doi.org/10.1155/2012/195106>.
- PALUMBO, Fabio Salvatore *et al.* Gellan gum-based delivery systems of therapeutic agents and cells. **Carbohydrate polymers**, v. 229, p. 115430, 2020.
- PARFITT, K. Martindale: the complete drug reference. 32 ed. **London: Pharmaceutical**, 1999.
- PASQUALOTTO, Arila Ladeia; SILVA, Ursulla Igi Rodrigues de Souza Salles da; BIDIN, Leandro Macedo Moni. Preparo e caracterização de membranas multicamadas de polímeros naturais: alginato, fibroína e quitosana. 2017.
- PATSULA V, MOSKVIN M, DUTZ S, HORÁK D. Size-dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. 2016; 88:24-30.
- PECORARO, E., MANZANI, D., MESSADDEQ, Y., & RIBEIRO, S. J. L. (2008). Monomers, polymers and composites from renewable resources (1st ed.). **Oxford: Elsevier**
- PRAJAPATI, V. D., JANI, G. K., ZALA, B. S., & KHUTLIWALA, T. A. (2013). An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, 93(2), 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.030>
- PRAMOD DORISHETTY. *et al.* Tunable Biomimetic Hydrogels from Silk Fibroin and Nanocellulose. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering** 2020 8 (6), 2375-2389
- PREZOTTI, Fabíola Garavello. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. 2013. 111 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2013.
- RADENKOVIC D.; SOLOUK A.; SEIFALIAN A. Personalized development of human organs using 3D printing technology. **Med Hypotheses**, v. 87, p. 30-33, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2015.12.017>
- RAHMAYANTI, Maya. Synthesis of Magnetite Nanoparticles Using The Reverse Co-precipitation method with NH<sub>4</sub>OH as precipitating agent and its stability test at various pH. **Natural Science: Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 3, p. 54-58, 2020.
- RANI S, VARMA GD. Superparamagnetism and metamagnetic transition in Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized via co-precipitation method at different pH. **Physica B, Condensed Matter**. 2015; 472:66-77.

RECOUVREUX, D. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**.2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis,2008

REIZABAL, A., COSTA, C. M., PÉREZ-ÁLVAREZ, L., VILAS-VILELA, J. L., LANCEROS-MÉNDEZ, S., Silk Fibroin as Sustainable Advanced Material: Material Properties and Characteristics, Processing, and Applications. **Adv. Funct. Mater.** 2023, 33, <https://doi.org/10.1002/adfm.202210764>

RIBEIRO, Sabrina Dias. **Obtenção de triacetato de celulose a partir do bagaço de cana-de-açúcar para revestimento de micropartículas de goma gelana e avaliação do seu perfil de liberação in vitro e da mucoadesão ex vivo**. 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016. DOI <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2016.105>

ROCKWOOD, Danielle N. *et al.* Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. **Nature protocols**, v. 6, n. 10, p. 1612-1631, 2011.

ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. Toxicology in Vitro, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROGERO, SIZUE OTA *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.

ROMAN, M.; WINTER, W. T.; **Biomacromolecules** 2004, 5, 1671.

ROSS, P., MAYER, R., & BENZIMAN, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiology Reviews**, 55, 35–58.

ROUHI, MILAD *et al.* Fabrication of novel antimicrobial nanocomposite films based on polyvinyl alcohol, bacterial cellulose nanocrystals, and boric acid for food packaging. **Journal of Food Measurement and Characterization**, p. 1-16, 2024.

RYOO, J.; CHOI, J.; KI, C. S. Effect of ethanol treatment on physical property of photopolymerized hyaluronic acid/silk fibroin hybrid hydrogel. **Polymer**, v. 202, p. 122733, 2020.

S. CHEN, M. LIU, H. HUANG, L. CHENG, H.-P. ZHAO, Mater. Des. 2019, 181, 108077  
S. SAKAI, A. YOSHII, S. SAKURAI, K. HORII, O. Nagasuna, Silk fibroin nanofibers: a promising ink additive for extrusion three-dimensional bioprinting, Mater. **Today Bio** 8 (2020) 100078, <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100078>.

S.H. JAHROMI, L.M. GROVER, J.Z. PAXTON, A.M. SMITH, Degradation of polysaccharide hydrogels seeded with bone marrow stromal cells, J. Mech. Behav. **Biomed. Mater.** 4 (2011) 1157–1166, <https://doi.org/10.1016/J.JMBBM.2011.03.025>.

SA'ADON S, ANSARI MNM, RAZAK SIA, ANAND JS, NAYAN NHM, ISMAIL AE, KHAN MUA, HAIDER A. Preparation and Physicochemical Characterization of a Diclofenac Sodium-Dual Layer Polyvinyl Alcohol Patch. **Polymers**. 2021; 13(15):2459. <https://doi.org/10.3390/polym13152459>

SALDANHA, L. F. *et al.* **Conversão fermentativa de microalga *Chlorella sp.* em goma gelana por *Sphingomonas paucimobilis***. 2020. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, 2020.

SAMUEL, C. N.; IRENE, M. C. LO. Magnetic nanoparticle: Essential factors for sustainable environmental applications. **Water Research**, v. 47, p. 2613-2632, 2013.

SANTANA, G. P.; RAMOS, A. M.; FABRIS, J. D. Uma estratégia adaptada para síntese de magnetita. **Química nova**, v. 31, n. 2, p. 430-432, 2008.

SANTOS, Fabio Vieira dos. Avaliação da mutagenicidade in vivo e in vitro de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado. 2006.  
SANTOS, Lidiane dos. Preparação e avaliação de cápsulas gastro-resistentes de diclofenaco de sódio. 2005.

SEHNEM, Dayany Pereira *et al.* Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 6, n. 2, 2012.

SHAH RR, DAVIS TP, GLOVER AL, NIKLES DE, BRAZEL CS. Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2015; 387:96-106.

SHAO, Z.; VOLLRATH, F. Surprising strength of silkworm silk. **Nature** 2002, 418, 741.  
SHARMA, Jyoti *et al.* Metabolomic response of microalgae towards diclofenac sodium during its removal from water and concomitant recovery of pigments and lipids. **Bioresource Technology**, v. 371, p. 128617, 2023.

SHOJAEIARANI, J., BAJWA, D. S., & CHANDA, S. (2021). Cellulose nanocrystal based composites: A review. *Composites Part C: Open Access*, 5, 100164. <https://doi.org/10.1016/j.jcomc.2021.100164>

SHOJAEIARANI, Jamileh; BAJWA, Dilpreet; SHIRZADIFAR, Alimohammad. A review on cellulose nanocrystals as promising biocompounds for the synthesis of nanocomposite hydrogels. **Carbohydrate polymers**, v. 216, p. 247-259, 2019.

SILVA FILHO, Ernani Dias da. **Géis superparamagnéticos baseados em poliacrilamida e magnetita**. 2020. Dissertação de Mestrado. Brasil.

SILVA, F. G. *et al.* Interactions between pea protein and gellan gum for the development of plant-based structures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 255, p. 128113, 2024.

- SILVEIRA, Larissa dos Santos da *et al.* **Alteração do processo de fabricação de comprimidos de diclofenaco sódico-foco na granulação úmida**. 2014. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Tecnologia em Fármacos- Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, Rio de Janeiro, 2014.
- SOUZA, JOÃO PEDRO BESSA DE. Produção e caracterização de celulose bacteriana em cultivo estático e agitado. 2019.
- STOEF, Paulo Roberto *et al.* Caracterização e qualificação de diclofenaco de sódio como padrão secundário. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 1, p. 89-95, 2012.
- SUN, Weizhen *et al.* Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 1499, 2021.
- SVENSSON, A. *et al.* (2005). Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, 26(4), 419-431.
- T. ASAKURA, K. OKUSHITA, M. P. WILLIAMSON, **Macromolecules** 2015, 48, 2345.
- T. H. Wideman, A. J. Zautra, R. R. Edwards, Pain 2014, 154, 2262.
- TAFETE, G. A., ABERA, M. K., & THOTHADRI, G. (2022). Review on nanocellulose-based materials for supercapacitors applications. **Journal of Energy Storage**, 48. <https://doi.org/10.1016/j.est.2021.103938>
- TAIPINA, M.O., **Nanocrstais de celulose: obtenção, caracterização e modificação de superfícies**, Dissertação de M.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 2012.
- TANAKA, K.; INOUE, S.; MIZUNO, S. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by Bombyx mori. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 1999, 29, 269–276.
- TEIXEIRA, E.M., OLIVEIRA, C.R., MATTOSO, L.H.C., *et al.*, “Nanofibras de algodão obtidas sob diferentes condições de hidrólise ácida”, **Polímeros**, v. 20, n. 4, pp. 264-268, 2010.
- TOMEH, M.A.; HADIANAMREI, R.; ZHAO, X. Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Drug and Gene Delivery. **Pharmaceutics** 2019, 11, 494.
- TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.
- UM, I. C.; KWEON, H.Y.; PARK, Y. H.; HUDSON, S. Structural characteristics and properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. **International Journal of Biological Macromolecules** 29 (2001) 91–97
- VALDES, A., & GARRIGOS, M. C. (2016). Carbohydrate-based advanced biomaterials for food sustainability: A review. **Paper presented at the Materials Science Forum**.

VAN GOETHEM, F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro Micronucleus Test and the Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis Assay for the detection of DNA damaging agents: Genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Research**, v. 391, p. 31-43, 1997.

VARTAK NB, LIN CC, CLEARY JM, FAGAN MJ, SAIER MH. Glucose metabolism in “*Sphingomonas elodea*”: pathway engineering via construction of a glucose-6-phosphate dehydrogenase insertion mutant. **Microbiology (N Y)** 1995;141.  
<https://doi.org/10.1099/13500872-141-9-2339>.

VASCONCELOS, Niédja Fittipaldi *et al.* Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. **Carbohydrate polymers**, v. 155, p. 425-431, 2017.

VENÂNCIO, Lilian de Figueiredo *et al.* **Estudo da viabilidade de desenvolvimento de um padrão de referência: comprimido de prednisona para qualificação da performance do dissolutor**. 2013. Tese de Doutorado.

WANG, Hai-Yan *et al.* Functional modification of silk fibroin from silkworms and its application to medical biomaterials: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 129099, 2024.

WANG, Yuan *et al.* Silk fibroin hydrogel membranes prepared by a sequential cross-linking strategy for guided bone regeneration. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 147, p. 106133, 2023.

WASTI SANJITA, ADHIKARI SUSHIL. Use of Biomaterials for 3D Printing by Fused Deposition Modeling Technique: A Review. **Frontiers in Chemistry**. 2020. v. 8.

WENBERG A. Cell culture in the biological evaluation of dental materials: a review. **ATLA**. 1986; 13: 194-202.

XU, NANFANG MD; WEI, FENG MD; LIU, XIAOGUANG MD; JIANG, LIANG MD; CAI, HONG MD; LI, ZIHE MD; YU, MIAO MD; WU, FENGLIANG MD; LIU, ZHONGJUN MD. Reconstruction of the Upper Cervical Spine Using a Personalized 3DPrinted Vertebral Body in an Adolescent With Ewing Sarcoma. **SPINE**, v. 41, n. 1, p. E50-E54, 2016. Doi: 10.1097/BRS.0000000000001179.

YAMAURA, M., CAMILO, R., MOURA, E., SANTOS, B. **International nuclear atlantic conference; national meeting on nuclear applications**, 6. (2014). Preparacao de nanoparticulas magneticas silanizadas para utilizacao em tecnicas de separacao magnetica.

YAN, Huiqiong *et al.* Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 127-135, 2017.

YANG, Jinshu *et al.* Bacterial cellulose nanocrystals with a great difference in aspect ratios: A comparison study of their reinforcing effects on properties of the sodium alginate film. **Food Hydrocolloids**, v. 141, p. 108676, 2023.

- YANG, X., LU., *et al.* (2018). Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, 83, 195-201
- YUGUCHI, Y ., MIMURA, M., KITAMURA, S., URAKAWA, H., AND KAJIWARA, K. 1993. Structural characteristics of gellan in aqueous solutions. **Food Hydrocoll.**, 7: 373-385.
- Z. KASSAB, Y. ABDELLAOUI, M.H. SALIM, R. BOUHFID, A.E.K. QAISS, M. EL ACHABY, Micro- and nano-celluloses derived from hemp stalks and their effect as polymer reinforcing materials, **Carbohydr. Polym.** 245 (2020), 116506, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116937>
- ZANOTI, M. **Membranas de Celulose Bacteriana com anti-inflamatório Ibuprofeno para o tratamento de feridas crônicas.** 2017. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2017.
- ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: Faulty theory or fault tests? *Mutation Research*, v. 492, p. 29-38, 2001. A. R. LALIT JAJPURA, J. TEXT. **Sci. Eng.** 2015, <https://doi.org/10.4172/2165-8064.1000188>.
- ZHENG, Haiyan; ZUO, Baoqi. Functional silk fibroin hydrogels: preparation, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 5, p. 1238-1258, 2021.
- ZHU, JIEYU *et al.* In situ gel based on gellan gum. Polysaccharide Hydrogels for Drug Delivery and Regenerative Medicine, p. 261-272, 2024.
- CALVINO, J.J., MACKE, N., ROWAN, S.J. (2020). "Processing and properties of nanocellulose-based materials". **Advanced Materials**, 32(15), 1907394.
- YANG, H., ZHAO, X., LIU, Y. ET AL. (2023). "Advances in cellulose nanocrystals: structure, preparation, and applications". **Carbohydrate Polymers**, 299, 120190.
- PIELAK, R. (2019). "Bionanocomposites: green materials for a sustainable future". **Green Chemistry Letters and Reviews**, 12(3), 235–252.
- BLACK, J. Biological performance of materials. Fundamentals of biocompatibility. New York: Marcel Dekker, 1992.
- FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells. 3rd ed. **Wiley-Liss**, 1989.
- MALMONGE, S. M.; ZUCOLOTO, V.; BRITO, A. M. M. Estudo da toxicidade de nanomateriais em culturas celulares. **Química Nova**, 34(4), 2011.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, 20(2), 86–100, 2008.

RATNER, B. D. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. **Elsevier**, 3<sup>a</sup> ed., 2013.

BARUD, H. S. *et al.* Bacterial cellulose and its nanocomposites: preparation, properties and applications. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 4, p. 538–552, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150131>

MORAES, A. S. *et al.* Caracterização morfológica de nanocristais de celulose por microscopia de força atômica. **Revista Matéria**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, p. 5136, 2016. Disponível em: <https://revistas.ufrj.br/index.php/rm/article/view/5136>. Acesso em: 12 abr. 2025.

SOUZA, C. R. *et al.* Nanocristais obtidos de resíduos industriais de celulose bacteriana aplicados como agente de reforço em filmes biopoliméricos. **Repositório Institucional UNESP**, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/a260c819-8368-430c-a834-309c70b9428f/full>. Acesso em: 12 abr. 2025.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479–3500, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr900339w>

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302–325, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>

KASOJU, N.; BORA, U. Silk fibroin in tissue engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 1, n. 4, p. 393–412, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/adhm.201200097>.

DRAGET, K. I.; SKJÅK-BRÆK, G.; SMIDSRØD, O. Alginic acid gels: The effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, n. 4, p. 209–215, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90159-7)

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Rheological and thermal studies of gelation of gellan gum aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 30, n. 2–3, p. 109–119, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(96\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(96)00093-8)

FISCHER, M. C.; MOZDZEN, L. C.; CHU, T. M. G.; McGOWAN, K. B. Fabrication parameters influencing scaffold architecture and mechanical properties in extrusion-based bioprinting. **Biofabrication**, Bristol, v. 9, n. 1, p. 015016, 2017.

HASSANI NAJAFABADI, A.; ZENG, H.; GAHARWAR, A. K.; SCHIAVI, J. Biomedical applications of bioinks based on natural polymers. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, Washington, v. 7, n. 7, p. 2601–2621, 2021.

LIU, X.; HE, J.; ZHANG, Z. **Engineering porous biomaterials for controlled drug delivery**. Journal of Materials Chemistry B, London, v. 6, n. 26, p. 4326–4340, 2018.

MISHRA, R. *et al.* **Scaffold pore size regulates bone regeneration through enhanced vascularization and osteogenesis.** *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Hoboken, v. 110, n. 3, p. 655–668, 2022.

WANG, Z. *et al.* **Influence of printing parameters on 3D printed scaffold structure and mechanical properties.** *Biomedical Engineering Advances*, [S.l.], v. 1, p. 100003, 2020.

WU, Y. *et al.* **Bioinspired porous materials: Templating strategies and structure design.** *Chemistry of Materials*, Washington, v. 31, n. 4, p. 1219–1241, 2019.

ZHANG, X. *et al.* **Design strategies and functions of tissue-engineered scaffolds for bone repair.** *Materials Today Bio*, [S.l.], v. 20, p. 100616, 2023.

ZHOU, J. *et al.* **Influence of scaffold pore structure on osteogenesis: From mesenchymal stem cells to bone tissue.** *Advanced Healthcare Materials*, Weinheim, v. 11, n. 4, p. 2101321, 2022.

AHMED, E. M. **Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review.** *Journal of Advanced Research*, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006.

LIECHTY, W. B.; PEPPAS, N. A. **On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems.** *Journal of Controlled Release*, v. 73, n. 2-3, p. 137–145 2001. DOI: 10.1016/S0168-3659(01)00248-6.

PEPPAS, N. A.; NARASIMHAN, B. **Mathematical models in drug delivery: How modeling has shaped the way we design new drug delivery systems.** *Journal of Controlled Release*, v. 190, p. 75–81, 2014. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.06.041.

QIU, Y.; PARK, K. **Environment-sensitive hydrogels for drug delivery.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, n. 3, p. 321–339, 2001. DOI: 10.1016/S0169-409X(01)00203-4.  
SUI, J. **Osmotic release of drugs via deswelling dynamics of microgels: modeling of collaborative flow and diffusions.** *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 25, p. 410–418, 2023. DOI: 10.1039/D2CP02668F.

KLEMM, D. *et al.* **Nanocelluloses: A new family of nature-based materials.** *Angewandte Chemie International Edition*, v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011. DOI: 10.1002/anie.201001273.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. **Tissue engineering.** *Science*, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993. DOI: 10.1126/science.8493529

PARHAM, S. *et al.* **Electrospun Nano-Fibers for Biomedical and Tissue Engineering Applications: A Comprehensive Review.** *Materials* (Basel). 2020 May 6;13(9):2153. doi: 10.3390/ma13092153.

LAHIRI D *et al.* **Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent.** *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 30;22(23):12984. doi: 10.3390/ijms222312984.

SAGAN, Carl. **O mundo assombrado pelos demônios: a ciência vista como uma vela no escuro**. São Paulo: Companhia das Letras, 1997.

NGUYEN, Thang Phan *et al.* Silk fibroin-based biomaterials for biomedical applications: a review. *Polymers*, v. 11, n. 12, p. 1933, 2019.

SUN, Weizhen *et al.* Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 3, p. 1499, 2021.

HU, Yongpei *et al.* The relationship between secondary structure and biodegradation behavior of silk fibroin scaffolds. *Advances in Materials Science and Engineering*, v. 2012, n. 1, p. 185905, 2012.