

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA

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

MACKSON HENRIQUE FERRARES

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL BASEADO EM PECTINA,
MICROCELULOSE DA MANGA E EM MICROCELULOSE VEGETAL PARA
APLICAÇÕES MÉDICAS.

Araraquara, SP

2023



MACKSON HENRIQUE FERRARESÍ

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL BASEADO EM PECTINA,
MICROCELULOSE DA MANGA E EM MICROCELULOSE VEGETAL PARA
APLICAÇÕES MÉDICAS.

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

Prof. Dr. Rodrigo Alvarenga Rezende
Orientador

Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
Co-Orientador

Araraquara, SP
2023



F426d Ferraresi, Mackson Henrique

Desenvolvimento de biomaterial baseado em pectina, microcelulose da manga e em microcelulose vegetal para aplicações médicas/Mackson Henrique Ferraresi. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2023. 95f.

Dissertação (Mestrado) - Mestrado em Biotecnologia, Medicina Regenerativa e Química Medicinal - UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alvarenga Rezende

1. Pectina. 2. Microlelulose. 3. Scaffold. 4. Bioimpressão 3D. I. Título.

CDU - 57.089

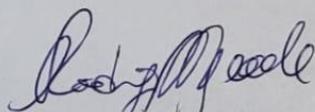


MACKSON HENRIQUE FERRARESÍ

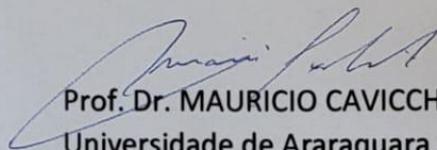
Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023

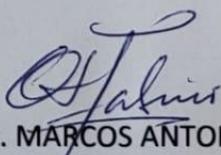
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. RODRIGO ALVARENGA REZENDE (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. MAURICIO CAVICCHIOLI
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. MARCOS ANTONIO SABINO GUTIERREZ
Universidade Simon Bolívar/Caracas/Venezuela



AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pela educação e todo apoio concedidos a mim;

Ao professor Dr. Rodrigo Rezende, pela orientação, suporte, paciência e compreensão na elaboração deste trabalho.

Agradeço ao coorientador Prof. Dr. Hernane Barud e a Dra. Alessandra Dametto, por toda ajuda e contribuição nesta pesquisa.

Aos colegas do laboratório, Marina, Vitória, Lucas e a Kessily que sempre me ajudaram, me ensinaram e contribuíram muito com o desenvolvimento prático deste trabalho.

Agradeço ao Professor Dr. Marcos Antônio Sabino (Universidad Simón Bolívar, Venezuela e CTI Renato Archer, Brasil), pela paciência, ajuda e ensinamentos a mim concedidos.

Aos professores, Prof. Dr. Wilton Rogério Lustre, a Prof. Dra. Rosana Assunção, a Prof. Dra. Mônica Rosas da Costa Lemma e aos discentes Benedito Neto e Matheus Celestino pela contribuição e ajuda neste trabalho.

Às empresas NATCROM P&D (Isabel Duarte Coutinho e Luiz Antônio Dutra) e BIOSMART Nanotechnology LDTA pela parceria e auxílio no desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço as amigas que fiz durante esta jornada, em especial minha amiga Jessica Novais, Adriana Tonon e Wesley Luiz, e a Daniela e Paula Wetterich que sempre escutam meus desabafos.

Agradeço a Sandra e Rosana da secretaria pela ajuda e apoio em todos os momentos necessários.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de taxa de fomento que possibilitou a possibilidade de cursar a pós graduação;

À Universidade de Araraquara – UNIARA por me possibilitar este avanço profissional.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha defesa de mestrado, meus sinceros agradecimentos.



“Si censuran tus ideas ten valor, no te rindas nunca, siempre alza la voz, lucha fuerte, sin medida, no dejes de creer, no te quedes con tu nombre escrito en la pared, no pares, no pares, no pares nunca de soñar”.

Dulce María



DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL BASEADO EM PECTINA, MICROCELULOSE DA MANGA E EM MICROCELULOSE VEGETAL PARA APLICAÇÕES MÉDICAS.

Resumo

Milhões de pacientes lutam anualmente pela vida recorrendo a tratamentos alternativos, não há descrito na literatura tratamentos definitivos na cura dessas lesões. Neste sentido, a engenharia de tecidos vem se destacando por oferecer novas aplicações médicas corretivas e/ou substitutivas por meio do desenvolvimento de estruturas capazes de atuar na regeneração de órgãos e tecidos lesionados por meio de estruturas tridimensionais de suporte (*scaffolds*). Esses *scaffolds* são fabricados com materiais biodegradáveis e biocompatíveis com o organismo com utilização da manufatura aditiva e bioimpressão 3D. Partindo-se do conceito da economia circular, resíduos de fonte vegetal, particularmente, da manga, podem ser aproveitados e deles feita a extração da pectina e de microfibras de celulose a fim de serem utilizados como biomateriais. Neste contexto, realizou-se a caracterização térmica, morfológica e reológica dos biopolímeros puros com o objetivo de analisar o seu potencial para a produção de *scaffolds* e estruturas bioimpressa. Outra análise realizada foi o FTIR demonstrando comportamentos e agrupamentos parecidos entre os materiais estudados. O índice de cristalinidade e áreas amorfas obtidas por ensaio de DRX. Outra análise realizada foi o grau de polimerização de acordo com a viscosidade das amostras demonstrando o tempo de escoamento dos polímeros. Após a caracterização dos polímeros foram produzidos géis combinados de pectina da manga, microcelulose da manga e microcelulose vegetal com fontes da madeira através das análises de calorimetria, MEV e reologia. Concluímos através da caracterização dos materiais a viabilidade na produção de *scaffolds* aplicáveis nas áreas médicas.

Palavras-chave: Pectina, microcelulose, *Scaffold*, Bioimpressão 3D.



Abstract

Millions of patients annually fight for their lives resorting to alternative treatments, there are no definitive treatments described in the literature to cure these injuries. In this sense, tissue engineering has stood out for offering new corrective and/or substitutive medical applications through the development of structures capable of acting in the regeneration of injured organs and tissues through three-dimensional support structures (scaffolds). These scaffolds are manufactured with biodegradable and biocompatible materials with the organism using additive manufacturing and 3D bioprinting. Based on the concept of circular economy, residues from vegetable sources, particularly from mangoes, can be used and pectin and cellulose microfibrils can be extracted to be used as biomaterials. In this context, the thermal, morphological and rheological characterization of pure biopolymers was carried out in order to analyze their potential for the production of scaffolds and bioprinted structures. Another analysis carried out was the FTIR demonstrating similar behaviors and groupings between the studied materials. The crystallinity index and amorphous areas obtained by XRD assay. Another analysis performed was the degree of polymerization according to the viscosity of the samples demonstrating the flow time of the polymers. After characterizing the polymers, combined gels of mango pectin, mango microcellulose and vegetable microcellulose with wood sources were produced through calorimetry, SEM and rheology analyses. We conclude through the characterization of the materials the viability in the production of scaffolds applicable in the medical areas.

Keywords: Pectin, microcellulose, *Scaffold*, 3D Bioprinting.



Lista de figuras

Figura 1: Conceito de economia circular..	19
Figura 2: Evolução da Indústria .	21
Figura 3. Fórmula estrutural da celulose	25
Figura 4. Representação da microcelulose por MEV.	25
Figura 5. Mangifera indica – manga e suas estruturas da manga.	26
Figura 6. Fórmula estrutural da pectina.	29
Figura 7. Representação da Pectina por MEV	29
Figura 8. Articulação do Quadril saudável e com artrose	29
Figura 9. Deterioração da cartilagem do joelho.	29
Figura 10. Lesão traqueal em TC de tórax.	29
Figura 11. Modelo digital e tridimensional de traqueia	29
Figura 12. Traqueia Descelularizada	28
Figura 13. Impressão de Orelha	28
Figura 14. Impressão de Nariz	28
Figura 15. Menisco produzido por impressão 3D	29
Figura 16. Espectroscopia Infravermelho por transformada de Fourier	40
Figura 17. TGA dos materiais puros	41
Figura 18. DTG dos materiais Puros	42
Figura 19. DSC dos materiais puros	45
Figura 20. DRX dos materiais puros	46
Figura 21. Microscopia Óptica da microfibras de celulose	50
Figura 22. Microscopia Óptica da Pectina da manga	51
Figura 23. MEV da Pectina em 5µm	53
Figura 24. MEV da Pectina em 10µm	54
Figura 25. MEV da Pectina em 50µm	55
Figura 26. MEV da Pectina em 500µm	56
Figura 27. MEV da microcelulose vegetal 5µm	57
Figura 28. MEV da microcelulose vegetal 20µm	58
Figura 29. MEV da microcelulose vegetal 100µm	59
Figura 30. MEV da microcelulose vegetal 200µm	60



Figura 31. MEV da microcelulose da manga 5 μ m.....	61
Figura 32. MEV da microcelulose vegetal 50 μ m	62
Figura 33. MEV da microcelulose vegetal 20 μ m	63
Figura 34. MEV da microcelulose vegetal 100 μ m	64
Figura 35. Placas de 24 poços - citotoxicidade	66
Figura 36. Resultados da análise de citotoxicidade	66
Figura 37. FTIR dos Géis	66
Figura 38. TGA e DTG dos Géis	69
Figura 39. Resultados do G' dos Géis	71
Figura 40. Resultados do G'' dos Géis	73
Figura 41. MEV dos géis de PMCM 1% + PEG	74
Figura 42. MEV dos géis de PMCM 1%.....	76
Figura 43. MEV dos géis de PMCM 2%.....	77
Figura 44. MEV dos géis de PMCV 1%	78
Figura 45. MEV dos géis de PMCV 2%	79
Figura 46. MEV dos géis de PMCV 1% + PEG	80



Lista de tabelas

Tabela 1- Marco da História da Manufatura aditiva e bioimpressão.....	19
Tabela 2 - Concentrações dos géis.....	35
Tabela 3 – Grupos Funcionais da Pectina.....	38
Tabela 4 – Grupos Funcionais da Celulose.....	39
Tabela 5 – Cálculo da Cristalinidade.....	47
Tabela 6 – Grau de Polimerização.....	49

Lista de Equações

Equação 1- Cálculo de Cristalinidade	48
Equação 2- Cálculo de Cristalinidade	48
Equação 3- Cálculo de Cristalinidade	48

Apêndices

Apêndice A- Cálculo da porcentagem de cristalinidade e Difractogramas.....	82
Apêndice B – Cálculos do Grau de polimerização.....	94



Sumário

APRESENTAÇÃO	13
Fluxograma	14
CAPÍTULO 1 - Introdução	15
1.1.4 – Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa	16
1.1.5 – Manufatura Aditiva (Impressão 3D) e Bioimpressão 3D	18
1.1.6 – Biomateriais: celulose e pectina	20
1.1.7 - Aplicações	25
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	30
2.1 – Objetivo Geral	30
2.1 – Objetivos Específicos	30
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 – Materiais Puros	31
3.1.1 – Obtenções da Pectina da Manga	31
3.1.2 – Obtenção da microcelulose da Manga e McV	31
3.1.3 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	31
3.1.4 - Análise térmica TGA/DTG e DSC	32
3.1.5 - Grau de polimerização (DP)	32
3.1.6 - Microscopia Ótica	33
3.1.7 – Microscopia Eletrônica de Varredura	33
3.1.8 – Difração de Raios-X	33
3.1.9 – Citotoxicidade	34
3.2 – Géis	35
3.2.1 – Produção dos Géis	35
3.2.2 – FTIR	36
3.2.3 – TGA-DTG	36
3.2.4 – Reômetria dos géis	36
3.2.5 – MEV	36
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS e DISCUSSÃO	37
4.1 – Materiais Puros	37
4.1.1 – FTIR	37
4.1.2 – Análise Térmica TGA - DTG	40
4.1.3 – Calorimetria Exploratória Diferencial	44
4.1.4 - Difração de Raios-X	45
4.1.5 - Grau de polimerização (DP)	47
4.1.6 – Microscopia Ótica	50
4.1.7 – Microscopia Eletrônica de Varredura	52
4.1.8 – Ensaio de Citotoxicidade	65
4.2 – Caracterização dos Géis	67
4.2.1 – FTIR	67
4.2.2 – TGA-DTG	68
4.2.3 – Reômetria dos géis	69



4.2.4 – MEV	74
CAPÍTULO 5 - Conclusões	82
Trabalhos Futuros	83
Referências Bibliográficas	84
Apêndices	89



Apresentação

A engenharia de tecidos vem ganhando espaço em diversas aplicações na medicina regenerativa, muitas vezes, fazendo uso do conceito de economia circular com o uso de resíduos vegetais. Neste contexto, a microcelulose da manga, microfibras da manga, pectina da manga e microcelulose vegetal de fontes da madeira, se mostram em potencial aplicação na manufatura aditiva (impressão 3D) em *scaffolds*.

Estes materiais foram estudados neste trabalho, sobretudo, sua caracterização com objetivo em analisar sua potencialidade no uso em aplicações médicas.

O capítulo 1 apresenta uma breve contextualização e introdução incluindo a história da engenharia de tecidos e impressão 3D, engenharia de tecidos, bioimpressão e aplicações em regeneração de cartilagem, além de abordar sobre a pectina, microcelulose da manga.

O capítulo 2 aborda os objetivos do trabalho.

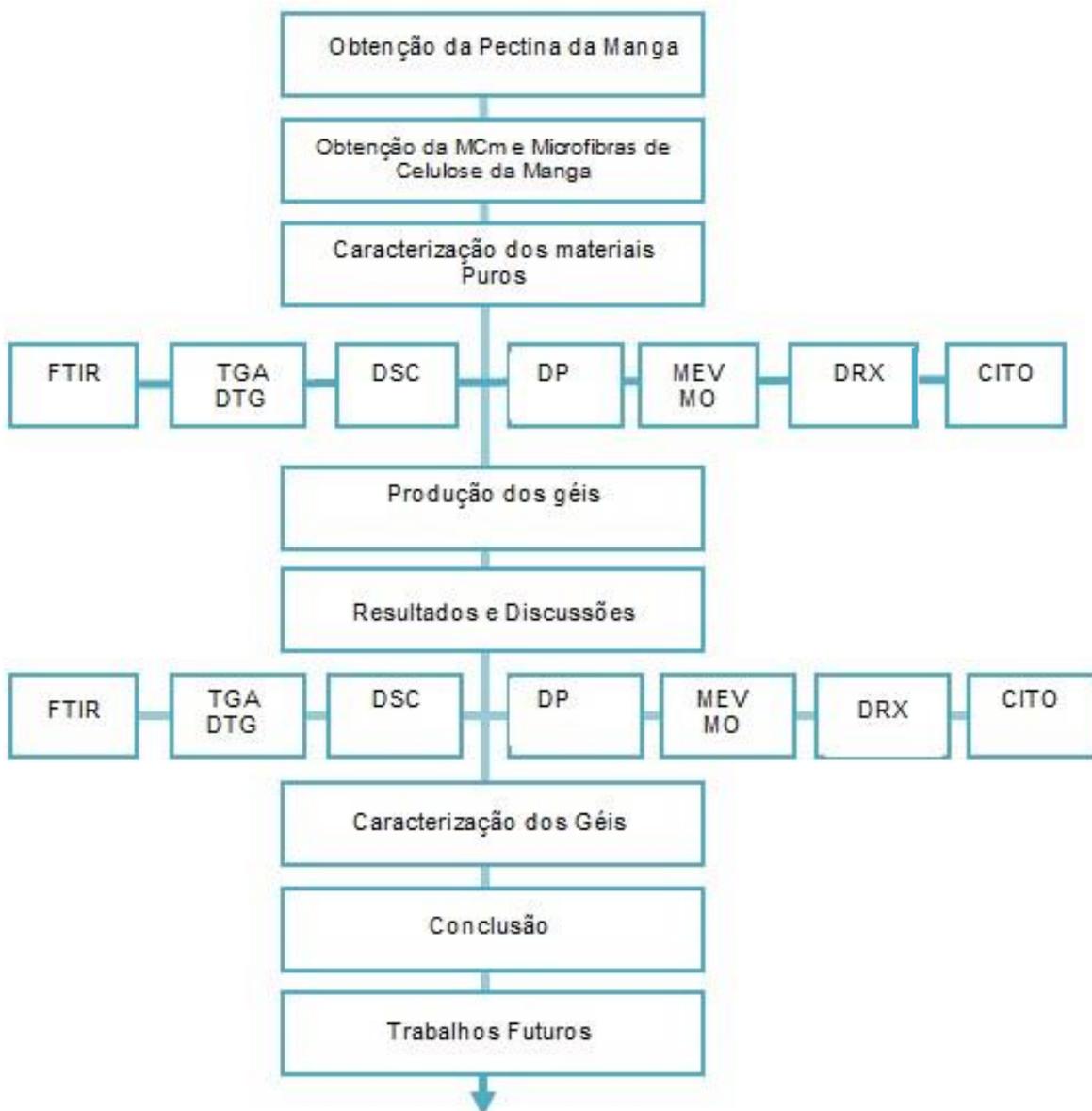
O capítulo 3 apresenta os materiais e métodos da obtenção e caracterização dos materiais.

O capítulo 4 aborda os resultados e discussões da caracterização realizada com os ensaios TGA-DSC, FTIR, DRX, DP, MEV, Microscopia ótica e ensaio de citotoxicidade, além das caracterizações dos géis produzidos.

O capítulo 5 apresenta as conclusões do trabalho e possibilidades de trabalhos futuros.



Fluxograma





Capítulo 1 - Introdução

A engenharia de tecidos vem emergindo gradativamente com a aplicação da manufatura aditiva ou impressão 3D criando construções tridimensionais chamadas de *scaffolds* que são capazes de receber células, favorecer sua adesão e proliferação e o crescimento de um novo tecido ou órgão (PINHEIRO, 2019).

Para obter sucesso na construção de *scaffolds*, polímeros naturais ou sintéticos vêm sendo usados como materiais de suporte. Deste modo, esses polímeros devem possuir propriedades, como por exemplo, ser biodegradável e biocompatível, além de conter propriedades mecânicas favoráveis para tal aplicação como a microcelulose e a pectina (EVARISTO, 2015).

No Brasil, a celulose, que é utilizada desde o século XIX na produção do papel, é considerada um dos principais constituintes da parede celular das plantas e o material orgânico mais abundante na terra. Atualmente, a celulose vem se destacando na utilização em diversas áreas de aplicação principalmente pelo fato de conter variações de dimensões micrométricas e por serem oriundas de diferentes fontes. Microcelulose Microfibrilada (MFC) e cristais de celulose podem ser obtidos de fonte bacteriana ou vegetal e vêm sendo aplicadas, por exemplo, na área da saúde regenerando lesões de pele (QUINTELA *et al.*, 2018); (NAGAHARA, 2019).

Destaca-se neste contexto, como alternativa, a microcelulose derivada da manga. A manga é composta pela polpa, caroço e tegumento, sendo que apenas é utilizada pela indústria para a produção de suco e outros alimentos, descartando o caroço e tegumento que são considerados uma volumosa parte da fruta. Pensando no reaproveitamento dessas estruturas de descarte, estudos utilizaram o tegumento (camada externa do caroço) como fonte de celulose, lignina e hemicelulose aumentando o interesse nesse material. A microcelulose da manga apresenta características favoráveis para a utilização na engenharia de tecidos, pois, além de ter uma mecânica apropriada fornece também compatibilidade com agentes ativos, baixa toxicidade, boa estabilidade, alta permeabilidade, temperatura adequada, porosidade, além da viabilidade celular (COSTA, 2010).

Paralelo à microcelulose, a pectina com seu alto poder de gelificação ganha visibilidade na engenharia de tecidos, considerada como um polissacarídeo extraído



da parede celular das plantas ou das cascas de frutas cítricas. A pectina é essencialmente linear e facilmente ajustada à sua aplicação. Sua classificação varia de acordo com o grau de esterificação com metanol (metoxilação), que representa o processo de gelificação em meio ácido acima de 50% e gelificação na presença de íon multivalentes como o cálcio. Deste modo, a pectina possui propriedades físico-químicas favoráveis, alta permeabilidade líquida e facilidade em carregar proteínas, fármacos e células (SOUZA, 2018).

1.1.4 – Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa

Relatos da história da engenharia de tecidos mostram que a primeira tentativa de regeneração de tecidos ainda sem sucesso, surgiu no ano de 1970, quando os pesquisadores tentaram reproduzir uma neocartilagem em camundongo através de uma matriz óssea com células cartilaginosas cultivadas. (LEVIN et al., 2019)

Já em 1980, no EUA, os pesquisadores desenvolveram estruturas naturais biocompatíveis e biodegradáveis chamadas de arcabouços ideais para as células. Somente em 1991 a engenharia de tecidos tornou-se mundialmente reconhecida, quando o primeiro implante de esterno biológico cultivado por células do próprio receptor humano foi implantado com sucesso em sua caixa torácica. Após isso, outro marco na história da engenharia de tecidos foi o crescimento de uma orelha engunhada no dorso de um camundongo (LEVIN et al., 2019).

Neste sentido, o objetivo da engenharia de tecidos como ramo da biotecnologia é reparar tecidos e órgãos danificados com os preceitos da sustentabilidade ou economia circular (figura 1) (BAZÁN BARBA; DOS SANTOS, 2020)



Figura 1 - Conceito de economia circular. Fonte: GAUCHAZH, 2020

Desta forma, para que haja a regeneração dos tecidos ou o desenvolvimento de órgãos é indispensável a utilização de células em suportes que mimetizam uma matriz extracelular. Deste modo, pesquisas com células-tronco vêm emergindo drasticamente embarcando a engenharia de tecidos nesta direção (PINHEIRO, 2019)

Existem três tipos de células utilizadas para esta finalidade, as chamadas células embrionárias, células adultas e as já utilizadas células mesenquimais, que são oriundas do cordão umbilical de recém-nascidos (CURVELLO; RAGHUWANSHI; GARNIER, 2019) Em adição aos estudos com células-tronco, a engenharia de tecidos tem recorrido à aplicação de um método de suporte para estas células, chamados de *scaffolds*, os quais são estruturas tridimensionais, porosas, interconectadas, de diferentes topologias, no caso deste projeto, fabricadas por (bio)impressão 3D e com a finalidade de receber e manter as células que serão semeadas e mantidas em condições adequadas para a formação do novo tecido. Essas estruturas geralmente são geradas por impressoras 3D construídas camada por camada utilizando polímeros naturais ou sintéticos viabilizando o desenvolvimento destas células. Assim, para que haja sucesso neste processo, é preciso que essas estruturas sejam principalmente biodegradáveis, biocompatíveis, porosas e atóxicas (PINHEIRO, 2019).



1.1.5 – Manufatura Aditiva (Impressão 3D) e Bioimpressão 3D

No passado distante, produtos eram criados por meio de projetos realizados com pouca ou nenhuma tecnologia que facilitasse o seu desenvolvimento. As criações eram feitas à mão e os ajustes realizados diretamente sem testes e ensaios prévios. Deste modo, foi sendo observada a necessidade de um protótipo que possibilitasse realizar ajustes durante o seu desenvolvimento, já que o produto final era decorrente de inúmeros erros e acertos influenciando diretamente na reprodução e qualidade do objeto desenvolvido, além de embutir altos custos e desperdícios de material e mão de obra. Com a introdução de recursos computacionais, anos mais tarde, os processos começaram a sofrer um impacto positivo na velocidade de concepção dos projetos e na sua execução, incluindo a fabricação dos produtos. Protótipos puderam ser exaustivamente testados antes de um avanço definitivo para se alcançar o produto final. Ainda no âmbito dos protótipos, surgiu nos anos 1980 a tecnologia de prototipagem rápida – cuja designação encontra-se em desuso – e atualmente é mais conhecida por manufatura aditiva (nome técnico) ou por impressão 3D. Na figura 2 podemos observar cronologicamente a evolução da indústria. Em 1981, Hideo Kodama, desenvolveu o primeiro equipamento de manufatura aditiva em Nagoya, Japão, o qual curava polímeros fotossensíveis utilizando raios ultravioletas para produzir, camada a camada, objetos em 3D. (AIRES et al., 2019)

Anos mais tarde, o engenheiro norte-americano Charles Chuck Hull, dando continuidade aos trabalhos de Kodama, desenvolveu e comercializou uma impressora 3D cuja técnica foi denominada por Estereolitografia. Esta técnica utiliza um feixe de laser ultravioleta para irradiar uma resina fotossensível para a construção de protótipos camada por camada de baixo custo, em menor tempo e com reprodutibilidade exata. (WILTGEN, 2019)

Em 1986, Hull fundou a 3D Systems, a primeira empresa de manufatura aditiva. Subsequentemente, a manufatura aditiva foi crescendo gradativamente como mostra a tabela 1 logo abaixo. (ARAÚJO, 2021).



EVOLUÇÃO DA INDÚSTRIA

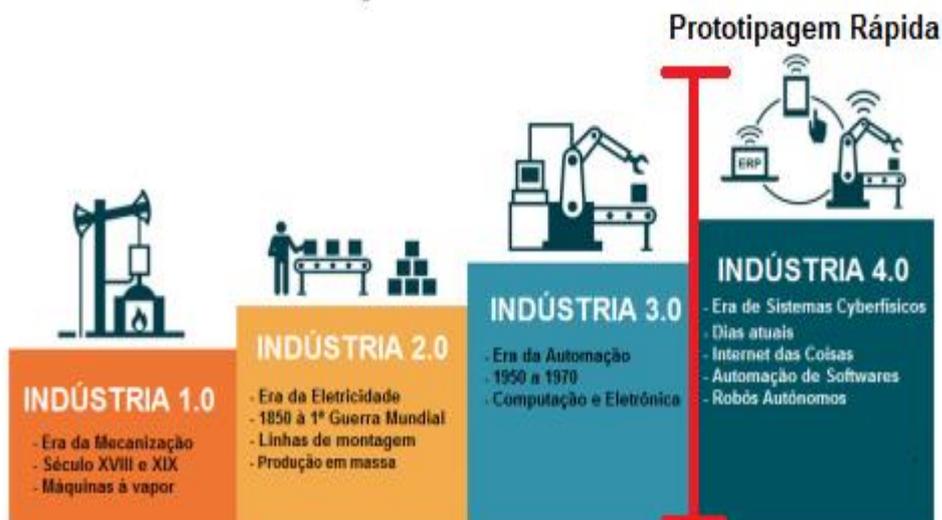


Figura 2 – Evolução da Indústria. Adaptado de (AIRES et al., 2019)

Década de 1980	<ul style="list-style-type: none"> > Hideo Kodama desenvolve o primeiro modelo de Manufatura Aditiva, utilizaram-se raios UV para alterar polímeros fotossensíveis. > Charles Hull desenvolve a Estereolitografia, e participa da Fundação da empresa 3D Systems. > A SLA-1 se torna a primeira máquina de MA comercializada no mundo – 3D Systems. > Surgimento de novas empresas no ramo da manufatura aditiva graças à tecnologia SLA.*
Década de 1990	<ul style="list-style-type: none"> > Três tecnologias de MA comercializadas: FDM pela Stratasys, SGC pela Cubital LTD e LOM pela Helisys. > Surge no Mercado Sintetização Seletiva a laser (SLS) pela DTM. > O MIT (Massachusetts) desenvolve e patenteia novas técnicas de impressão 3D. <p>O instituto de Medicina Regenerativa Wake Forest reproduz órgãos humanos por manufatura aditiva.</p>
Década de 2000	<ul style="list-style-type: none"> > Surge a primeira impressora 3D de mesa (Solidmension). > Impressão de um rim funcional (Wake Forest). > Primeira perna protética funcional (2008) e o primeiro vaso sanguíneo em 2009 criado pela Organovo.
2010	<p>Urbee – Primeiro carro impresso do mundo, seguido pela primeira arma e primeira casa impressa.</p> <p>NASA – imprime roupas e alimentos.</p> <p>MIT – imprime Vidro.</p>

Tabela 1 – Marco da História da Manufatura aditiva e Bioimpressão.

Fonte: Adaptada de (ARAÚJO, 2021)



A manufatura aditiva ou impressão 3D aplicada à saúde vem ganhando espaço nas últimas décadas. É notório o crescimento anual de publicações científicas com estudos voltados ao desenvolvimento e ao uso de *scaffolds* para a medicina regenerativa.

O que é bioimpressão?

Em termos, a bioimpressão, compõe três tecnologias mais utilizadas: bioimpressão por extrusão, por jato de tinta e a laser. A impressão por extrusão é a mais aplicada, sendo realizada por meio da deposição do material conduzida por seringas. A escolha do polímero é de suma importância para a combinação com as determinadas células, na composição da chamada biotinta (MONTERO et al. 2019). A impressão por jato de tinta é realizada por impressoras que utilizam células combinadas com hidrogel depositadas em jato de pequenas partículas, permitindo a deposição de células através de um bico dispensador. A impressão a *laser*, umas das mais complexas e de custo elevado, é aplicada pelo uso de *laser* combinado com utilização de células e biomateriais específicos para este método. (WOODFIELD et al., 2017).

1.1.6 – Biomateriais: celulose e pectina

Segundo Embrapa (2014), polímeros são macromoléculas formadas por unidades de repetição e unidas por ligações formadas por monômeros. Moléculas que possuem uma única repetição são divididas entre polímeros sintéticos e naturais. Neste sentido, encontramos os biomateriais, estruturas formadas ou combinadas de polímeros naturais, sintéticos, metais ou cerâmicas de fontes renováveis retirados da natureza para uso em diversas aplicações, principalmente nas áreas médicas.

De acordo com (FARIAS et al., 2016), polímeros adquiridos de fontes renováveis são chamados de polímeros verdes e são encontrados em demasia na natureza e reutilizados para consumo em diversas áreas. Um biomaterial promissor e abundante na natureza é a celulose, cuja estrutura molecular pode ser vista na



Figura 3. Da celulose, por sua vez, podem ser extraídos microfibras de microcelulose demonstradas na Figura 4, sendo comumente encontradas na madeira, na beterraba e na batata, e formada através de procedimento mecânico que a torna de baixo custo.

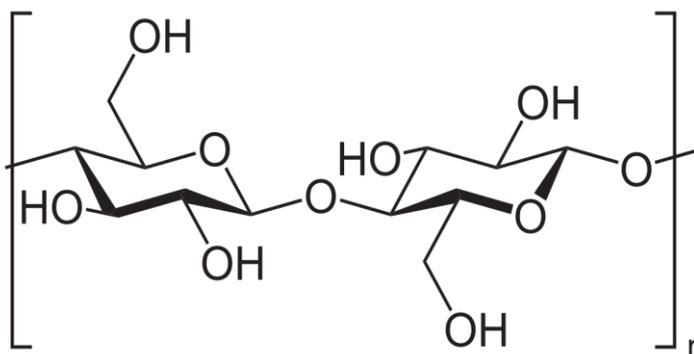


Figura 3. Estrutura base da celulose.

Fonte: (COSTA, 2010)

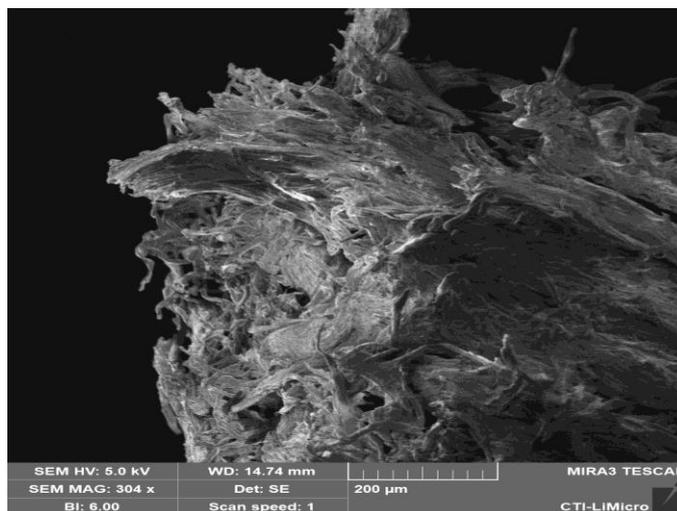


Figura 4. Representação da microcelulose vegetal por MEV em 200µm.

Fonte: Próprio Autor

Em especial, destaca-se a microcelulose extraída da espécie *Mangifera indica*, popularmente conhecida como manga. A manga tem sua origem no sul asiático e é cultivada predominantemente em locais de climas subtropical e tropical. A manga é composta pela polpa, caroço e tegumento como mostra a Figura 5.

Inicialmente, a manga era utilizada pela indústria apenas para a exploração da polpa para a produção de suco e outros alimentos, sendo descartados o caroço e o



tegumento. É fato que esses resíduos representam um considerável volume da fruta, o que, do ponto de vista de benefícios socioambientais e de economia circular, os mesmos podem ser reaproveitados, de forma que, além de outras aplicações, a medicina regenerativa e engenharia de tecidos podem ser amplamente beneficiadas com insumos de alto valor agregado. O tegumento, por exemplo, pode ser utilizado como fonte de celulose, pois, apresenta características favoráveis para a regeneração de tecidos em aspectos de reforço mecânico, compatibilidade com agentes ativos, baixa toxicidade, boa estabilidade, alta permeabilidade, temperatura adequada, porosidade, além da viabilidade celular (COSTA, 2010)



Figura 5. (a) *Mangifera indica* – manga. Fonte: each.usp.br ; (b) Estruturas da manga. Adaptado de (ALVES, 2015)

Como já mencionado, a indústria utiliza em grande escala apenas a polpa das frutas para extração de suco e comercialização na indústria de alimentos. Com o avanço da tecnologia, outros componentes das frutas, em especial aquelas da manga, vêm sendo estudados e utilizados em diferentes aplicações como, produção de alimentos, medicamentos, fungicidas, veterinárias, indústrias de embalagens e também para a saúde humana, diversificando assim, a sua utilização (COSTA, 2010).

Outro polímero natural em destaque é a pectina, cuja formulação é apresentada na figura 6 e representada pela figura 7. Com seu alto poder de gelificação, a pectina passa a ser um material de interesse na engenharia de tecidos. Como um polissacarídeo extraído da parede celular das plantas ou das cascas de frutas cítricas, a pectina é linear e facilmente usada. Sua classificação varia de acordo com o grau de metoxilação, que representa o poder de gelificação em meio ácido maior



que 50% e com menor poder de gelificação em meio ácido abaixo de 50%. Além de gelificação na presença de íons multivalentes como o cálcio, a pectina possui propriedades físico-químicas favoráveis, alta permeabilidade líquida e facilidade em carregar proteínas, fármacos e células, além de ser biocompatível, biodegradável e atóxica (SOUZA, 2018)

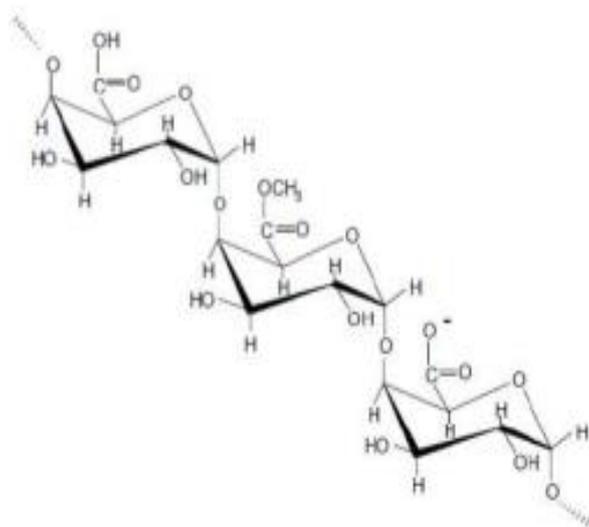


Figura 6. Formulação da pectina. Fonte: Adaptado de (SOUZA, 2018)

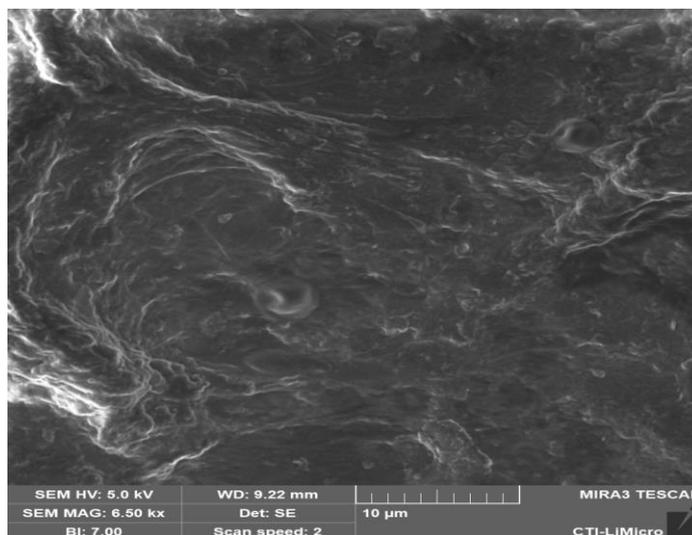


Figura 7. Representação da pectina da manga por MEV em 10µm.

Fonte: Próprio Autor

Estudos recentes mostram que as aplicações da pectina são inúmeras, desde aplicação em formulações de alimentos e, mais recentemente, o uso em aplicações



médicas. O setor de alimentos já utiliza a pectina muito antes da engenharia de tecidos. A pectina é usada em doces, geleias, iogurtes, bebidas, sucos, sobremesas, confeitarias, bolos, panificação, utilizada para proporcionar maciez, proporciona melhora da textura e aumento do volume em determinados produtos. (CANTERI *et al.*, 2012)

Devido ao seu poder de gelificação e degradação por microorganismos presentes na flora intestinal, o interesse pelas empresas farmacêuticas tem aumentado anualmente, devido à produção e estudos para entrega de fármacos de absorção intestinal (cólon).

Outra aplicação farmacêutica ou nutricional abrange o uso da pectina como fibra dietética, influenciando na microbiota e motilidade intestinal. Além dessas aplicações, CANTERI *et al.*, (2012) citam benefícios da pectina no combate a diversas alterações causadoras de enfermidades no organismo humano, tais como:

- Redução do colesterol total;
- Aumento da excreção de ácidos biliares;
- Diminuição do mau colesterol (LDL);
- Prevenção à aterosclerose;
- Redução da absorção de glucose;
- Redução do peso corporal;
- Aumento da sensação de saciedade;

Por fim, outra comprovação científica de novos benefícios da pectina foi destacada por (CANTERI *et al.*, 2012) e (BATISTA, 2013) que cita a ação anticarcinogênica e antiinflamatória no organismo humano, demonstrando mais uma vez a eficiência deste biopolímero.



1.1.7 – Aplicações

Pensando em aplicações futuras dos materiais considerados neste trabalho para fins de regeneração ou substituição de cartilagem, seguem alguns trabalhos encontrados na literatura.

Osteoartrite, osteoartrose, Artrose ou doenças degenerativas das articulações (figura 8 e 9) são termos usados para nomear doenças ou lesões nas cartilagens das articulações popularmente chamadas de desgastes. Afetam homens e mulheres na fase adulta com prevalência média acima dos 40 anos de idade e prevalência maior acima dos 70 anos de idade. Cerca de 85% da população idosa acima dos 75 anos de idade apresentam algum quadro de desgaste das articulações principalmente nos joelhos, quadris (maior prevalência), mãos e dedos, causando alterações incapacitantes em suas funções essenciais, (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2011).

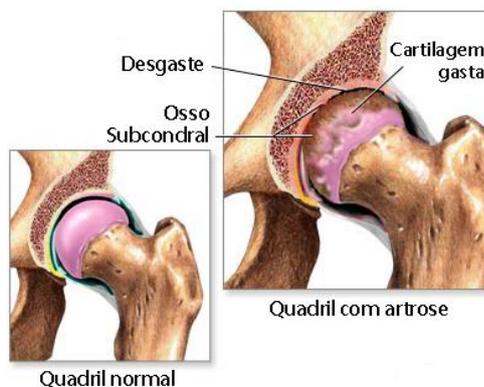


Figura 8. Articulação do quadril normal e com artrose. Fonte: Boschin



Figura 9. Deterioração da cartilagem do joelho. Fonte: Cmrbjf



Outras lesões comuns em cartilagens são encontradas em regiões proximais do corpo, traqueomalácia, estenose traqueal como, por exemplo, são lesões altas graves que requerem atenção (figura 10). Os sintomas são preocupantes como dificuldade respiratória, taquipnéia, alterações de padrão respiratório, diminuição da Saturação de oxigênio e em casos mais severos insuficiência respiratória. (Jornal Brasil de Pneumologia, 2008).

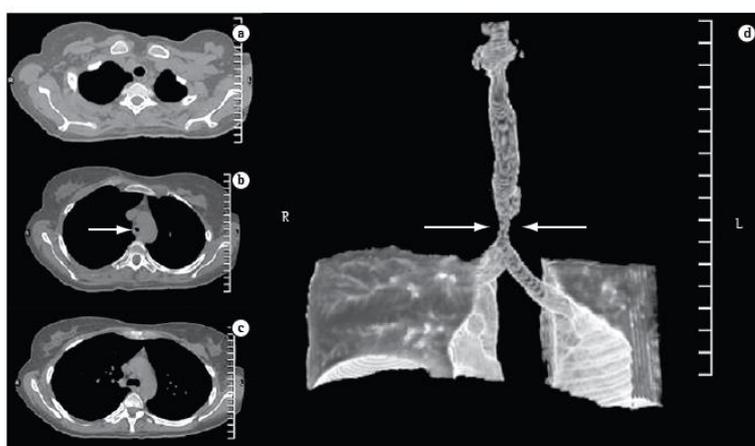


Figura 10: Lesão Traqueal mostrada em TC de tórax. Vistas axiais e reconstrução 3D. Fonte: Jornal Brasil de Pneumologia.

Em seu estudo, NASCIMENTO e LOMBELLO (2016), verificaram a viabilidade de hidrogéis naturais compostos por ácido hialurônico e quitosana na produção de *scaffolds* semeados com condrócitos (células de cartilagem) em regeneração de tecido cartilagenoso. Os autores obtiveram resultados positivos e promissores, visto que, os *scaffolds* demonstraram respostas satisfatórias no crescimento celular, desenvolvimentos e diferenciação de células graças às propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e de não citotoxicidade devido à sua existência na matriz extracelular das células.

ALESSI, 2020 desenvolveram em sua pesquisa *scaffolds* à base de fibras de PLGA produzidos por eletrospinning (*electrospinning*), cultivadas com células-tronco mesenquimais para a regeneração de neocartilagem de tireóide em suínos avaliadas em 30 e 90 dias. Como resultado, a pesquisa mostrou resultados satisfatórios, sendo



que, em 90 dias após o implante do *scaffold*, houve formação de neocartilagem satisfatória comprovados por microscopia óptica.

DUARTE, (2018), desenvolveu um composto polimérico (figura 11) utilizando polímeros biodegradáveis para construção anatômica tridimensional igual a uma traqueia humana. Usou os polímeros PVDF (Fluoreto de polivinilideno) com DMF (Dimetilformamida) e combinado ou não com o tricálcio fosfato na fase beta (β -TCP) impressos por extrusão em impressora específica. O estudo mostrou a reprodução de uma prótese de traqueia viável de acordo com testes mecânicos e viabilidade celular baseados em uma tomografia computadorizada de paciente e modelo digital de traqueia em arquivo stl.

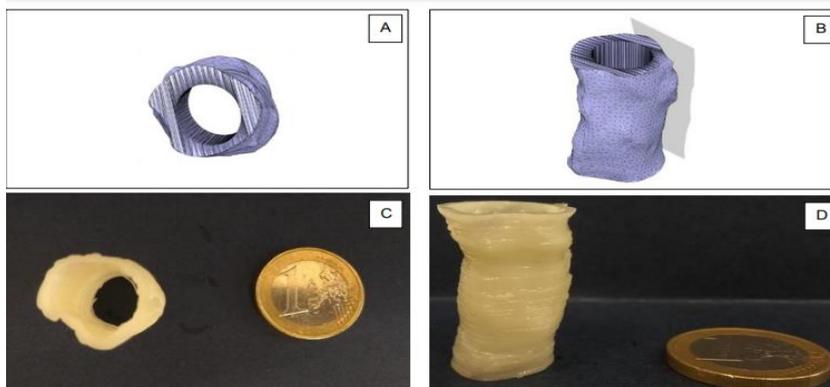


Figura 11. A e B – Modelo digital de traquéia em arquivo stl. C e D – modelo de traquéia tridimensional comparado com tamanho de uma moeda.

Fonte: Duarte, 2018.

Outro estudo realizado na área de engenharia de tecidos, EVARISTO (2015) desenvolveu um *scaffold* de traqueia (figura 12) autóloga de coelho descelularizada e recelularizada utilizando células tronco mesenquimais para diferenciação em condrócitos e células musculares lisas para posteriormente transplantar em coelhos. A pesquisa foi conduzida positivamente sem haver rejeição dos órgãos transplantados nos animais.

Segundo Pinheiro (2019), em 2015, os autores Markstedt *et al.* e Muller *et al.* desenvolveram uma orelha (figura 13) utilizando hidrogel de fibras de celulose, alginato e condrócitos humanos com impressão 3D, por meio de análise de viabilidade celular, obtiveram resultados com aproximadamente 73% e 86% de viabilidade após sete dias de cultura.



Segundo PINHEIRO (2019) os autores Kesti *et al.* (2015) desenvolveram um hidrogel contendo gelatina e alginato combinados com CME de cartilagem para impressão 3D de prótese de nariz (figura 14). Através dos testes mecânicos obtiveram resultados viáveis para impressão 3D, além disso, realizaram análises de tração resultando em um material resistente.

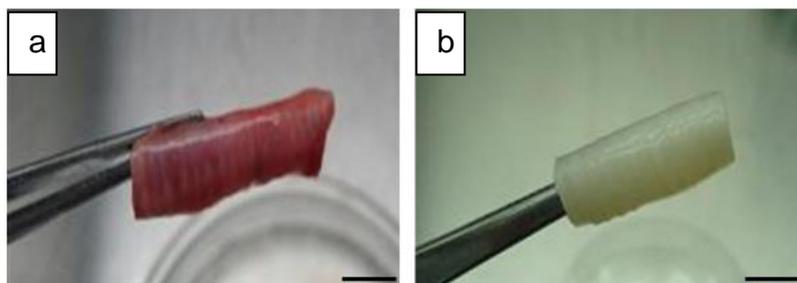


Figura 12. (A) traqueia pré descelularização; (B) traqueia descelularizada.

Fonte: Evaristo, 2015

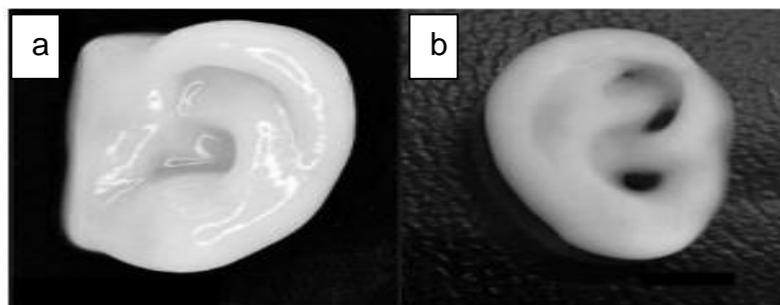
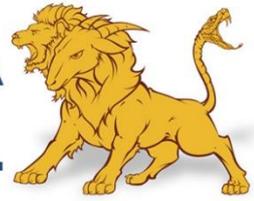


Figura 13. a) Orelha impressa por Markstedt *et al* ; (b) orelha impressa por Muller *et al.* Fonte: Pinheiro, 2019



Figura 14. Impressão de Nariz. Fonte: Pinheiro, 2019

Vázquez (2022), em sua pesquisa, desenvolveu um menisco de joelho bioimpresso utilizando hidrogel de ácido hialurônico, colágeno e quitosana com nanopartículas de



prata (figura 15), obtiveram resultados satisfatório nos testes reológicos e mecânicos, além de verificar propriedades bactericidas.

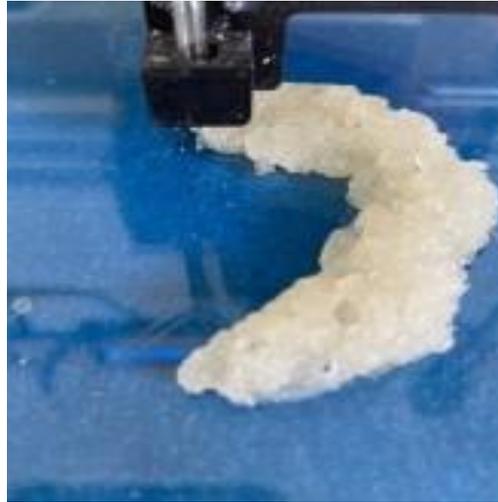


Figura 15. Menisco produzido por impressão 3D.

Fonte: VÁZQUEZ, 2020



CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Desenvolver e obter uma formulação de um gel com propriedades biológicas para gerar estruturas 3D por bio-impressão.

2.2 - Específicos

- Caracterização reológica da pectina e microcelulose extraídas da manga;
- Caracterização térmica desses biomateriais;
- Avaliação da citotoxicidade da pectina e microcelulose da manga, por meio do teste MTT;
- Formação e caracterização de géis de pectina e celulose.



CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 – Obtenção da Pectina da Manga (PECM)

As amostras de (PECM) foram fornecidas pela empresa NATCROM P&D ([“https://natcrom.com/”](https://natcrom.com/)) e dimensionadas através do moinho de bolas Polymix® PX-IG 2000 Impact Grinder Kinematica disponível na empresa BIOSMART Nanotechnology LDTA ([“https://www.biosmartnano.com/”](https://www.biosmartnano.com/)) por 5 minutos nas frequências de 20 Hz, resultando em partículas de (PECM) em pó. As dissoluções e géis de (PECM) e água foram feitos utilizando a proporção de 5g de (PECM) e 45ml de água destilada para dissolução de 10% de (PECM) e para o gel na proporção de 15% de (PECM), utilizou-se 7,5 g de pectina e 42,5 ml de água destilada e 10 g de pectina para 40ml de água para o gel de 20 % de (PECM), mantendo-se na agitação durante 30 minutos para completa homogeneização.

3.1.2 – Obtenção da Microcelulose da Manga (MCM) e microcelulose vegetal (MCV)

As amostras de (MCM) foram cedidas pela empresa NATCROM P&D ([“https://www.natcrom.com/”](https://www.natcrom.com/)). Foram extraídas por meio da hidrólise do AHP (Peróxido de hidrogênio alcalino) com objetivo de eliminar hemicelulose e lignina das amostras. Após realizada a hidrólise, as amostras foram ultrassonificadas durante 1, 2, 3 horas em solução de H₂O₂ a 1% com um processador de ultrassom de baixa frequência (20 kHz).

Gotas de H₂SO₄ foram adicionadas à suspensão (pH 5,0) e misturadas vigorosamente usando vórtice por 2 min para evitar a aglomeração de fibras desintegradas evitando a possível corrosão do equipamento – posteriormente liofilizadas. (SHAHI et al., 2020)

As amostras de (MCV) foram cedidas pelo laboratório Biopolmat da Universidade de Araraquara – UNIARA. A microcelulose vegetal é obtida através de bases renováveis e sustentáveis com reaproveitamento de fibras da madeira. Esse material foi produzido pela empresa Suzano.



3.1.3 - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Realizou-se a análise utilizando um Espectrômetro de bancada Agilent Cary 630 FTIR-ATR com 64 varreduras (500 cm^{-1} a 4500 cm^{-1}), presente no laboratório LABQUIM localizado na Universidade de Araraquara – UNIARA. Os difratogramas obtidos foram mostrados e salvos pelo software Agilent MicroLab. As amostras de pectina, microcelulose da manga, fibras de celulose da manga, foram submetidos à análise de FTIR.

3.1.4 - Análise térmica e Calorimetria exploratória Diferencial

Utilizou-se o equipamento SDT Q600 da empresa TA Instruments presente no laboratório Biopolmat da Universidade de Araraquara – UNIARA, para a realização das análises térmicas, termogravimétrica (TGA), derivada termogravimétrica (DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). As amostras de pectina, microcelulose da manga, fibras de celulose da manga, foram aquecidas em um cadinho de alumina de 0 a 700 $^{\circ}\text{C}$, mais especificamente a análise se iniciou a partir de 30 $^{\circ}\text{C}$, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 ml/min e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.1.5 - Grau de polimerização (DP)

O grau de polimerização da microcelulose, das microfibras de celulose e da pectina, foi obtido de acordo com a norma TAPPI T 230om-94: Viscosity of pulp (capillary viscometer method, 2013) utilizando o viscosímetro Cannon-Fenske transparente n $^{\circ}$ 150. Para o preparo do teste foram utilizados 500 g de pectina adicionados a 50 ml de água destilada, seguindo para homegenização em agitação magnética com 400 rpm/min durante 5-min. Após esse tempo, foram adicionados 50 ml da solução de Etilenodiamina Cúprica com banho de hidrogênio e levados novamente para agitação magnética durante 2 horas a 400 rpm/min . Após o tempo de agitação, 7 ml da mistura foram colocados no viscosímetro e inserido em banho de água sob temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 5-min. Realizaram as medições dos tempos de escoamento em triplicata e a média obtida foi utilizada para calcular o grau de polimerização de acordo os cálculos proposto por (ANDRITSOU *et al.*, 2018)



3.1.6 – Microscopia Ótica

A análise de microscopia ótica foi realizada utilizando o microscópio biológico binocular convencional de quatro lentes da marca Olen. Foram submetidas à análise, as amostras de pectina, microcelulose da manga e microfibras de celulose da manga com aumento de 40x e 100x. Os resultados foram fotografados com câmera do microscópio e submetidos à análise de imagem.

3.1.7 – Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) foram obtidas utilizando "Microscópio eletrônico com pistola de emissão de campo - FEG-SEM Tescan modelo Mira 3 XMU com litografia e-beam e com EDS 60mm Bruker". QUANTAX EDS Bruker 60 mm com detector de raios X dispersivo de energia XFlash® e software Espirit. Localizado no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer, em Campinas, SP.

3.1.8 – Difração de Raio X

Realizou-se a difração de raio-X (DRX) utilizando um difratômetro Shimadzu modelo XRD-6000, operando a uma potência de 40 kV com 40 mA de corrente e radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,54148 \text{ \AA}$), no intervalo angular de 2θ de 5 a 40° , velocidade de varredura de $2^\circ/\text{min}$ e passo angular de $0,02^\circ$. As amostras submetidas ao DRX foram: pectina, microcelulose da manga e microfibras de celulose da manga. Outrossim, as áreas de cristalinidade e áreas amorfa das amostras nos difratogramas estão demonstradas na figura 25. Os cálculos estão elencados na figura 1 presente no apêndice B, e seus resultados demonstrados na tabela 7. O experimento foi realizado no Instituto de Ciências Exatas e Naturais na Universidade Federal de Uberlândia, Campus Pontal, em Ituiutaba, MG.



3.1.9 – Citotoxicidade

O teste de viabilidade celular foi realizado no laboratório Lecer presente na Universidade de Araraquara. Foi utilizado o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina). O MTT, quando incubado com células, seu substrato é quebrado por mitocôndrias, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). Os ensaios foram realizados no Laboratório LECER, da Uniara.



3.2 - Géis.

3.2.1 – Produção dos géis.

Os géis foram preparados pelas combinações de pectina da manga (PECT^m), microcelulose vegetal (MC^v), microcelulose da manga (MC^m) e água com concentrações específicas de cada material (tabela 2). As amostras foram incorporadas utilizando misturador presente no laboratório Biopolmat – UNIARA, por 5-min e 500-rpm. Duas amostras de gel foram preparadas com uma porcentagem de polietilenoglicol para bioconjugação e funcionalização de superfície, aprimorando a biocompatibilidade com água e solubilidade das amostras.

Gel (Pect/MC)	% Pect ^m	% MC ^m	%MC ^v	% PEG
Pect ^m /MC ^m	15	1	0	0
	15	2	0	0
Pect ^m /MC ^v	15	0	1	0
	15	0	2	0
Pect ^m /MC ^m /PEG	15	1	0	5
Pect ^m /MC ^v /PEG	15	0	1	5

Tabela 2 – Concentrações de géis. Fonte: Próprio autor.

3.2.2 – FTIR

Os componentes do grupo químico dos géis foram identificados por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no modo Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) localizado no Centro de tecnologia da Informação Renato Archer, em Campinas, SP. Os espectros FTIR foram medidos na faixa de 4000–400 cm⁻¹ com uma resolução de 4 cm⁻¹ em um espectrômetro (PerkinElmer, Spectrum GX, EUA). As medições foram realizadas em triplicata.



3.2.3 – TGA-DTG

Utilizou-se o equipamento SDT Q600 da empresa TA Instruments presente no laboratório Biopolmat da Universidade de Araraquara – UNIARA, para a realização das análises térmicas, termogravimétrica (TGA), derivada termogravimétrica (DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). As amostras de pectina, microcelulose da manga, microfibras de celulose da manga, foram aquecidas em um cadinho de alumina de 0 a 700 °C, mais especificamente a análise se iniciou a partir de 30° C, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 30 ml/min e razão de aquecimento de 10°C/min.

3.2.4 – Análises de Reometria

As análises de reometria foram realizadas no laboratório Biopolmat da Universidade de Araraquara – UNIARA, utilizando o reômetro da TA Instruments AR1500ex 8B3689 em temperatura ambiente 25°C, 10,0rad/s; 0,01 to 100%. Shear rate 0,01 to 100,0. A geometria utilizada foi de placa paralela de 40,0mm Peltier plate Sandblasted. 25°C.

3.2.5 – MEV

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) foram obtidas utilizando "Microscópio eletrônico com pistola de emissão de campo - FEG-SEM Tescan modelo Mira 3 XMU com litografia e-beam e com EDS 60mm Bruker". QUANTAX EDS Bruker 60 mm com detector de raios X dispersivo de energia XFlash® e software Espirit. Equipamento localizado no Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer, em Campinas, SP.

Capítulo 4 – Resultados e Discussões

4.1 - FTIR-ATR

As amostras de (PECM), (MCM) e (MFCM) foram submetidas à análise de FTIR-ATR, com objetivo de identificar as possíveis vibrações das moléculas e seus possíveis grupamentos químicos funcionais de interações entre materiais. Desta forma pode-se observar na Figura 16 as principais bandas da pectina, microfibras e



microcelulose da manga. Em especial, a (PECM) mostra sua banda inicial em 1000cm^{-1} correspondente aos grupos funcionais de COC. Outro comportamento de banda entre 2800cm^{-1} e 3000cm^{-1} correspondente ao grupo C-H. Outra banda em 3300cm^{-1} correspondente ao grupo O-H, corroborando com a fórmula estrutural da pectina apresentada na figura 6. Na análise da (MCM) obteve-se número de onda em 1000cm^{-1} correspondente ao grupo C-O-C, e a banda em 1300cm^{-1} correspondendo ao grupo C-H, a banda em 1500cm^{-1} correspondendo ao grupo C=C.. Outra banda em 2800cm^{-1} correspondendo o grupo C-H e a banda em 3300cm^{-1} correspondente às ligações de hidrogênio intramoleculares na celulose O-H. A análise da (MFCM) demonstrou comportamento similar com à microcelulose, inicialmente referindo-se ao grupo C-O-C pela banda entre 1000cm^{-1} . A banda em 1750cm^{-1} aproximadamente correspondendo às vibrações dos grupos acetil e éster de hemicelulose ou grupo carboxílico. A banda em 2800cm^{-1} correspondendo o grupo C-H e a banda em 3300cm^{-1} correspondente às ligações de hidrogênio intramoleculares na celulose O-H, corroborando também com a formulação da celulose apresentada na figura 3.

MACHINSKI *et al.*, (2018) em sua pesquisa obtiveram os grupos funcionais da celulose similares e observaram grupos de C=O em ésteres, C-O em éteres, grupos funcionais de CH_3 e grupos hidroxilas OH.

CORDEIRO *et al.*, (2010), obtiveram picos em torno da faixa 1505cm^{-1} e 1512cm^{-1} , atribuído ao estiramento de C-C, tendo sido observada também a banda de 1737cm^{-1} associada ao estiramento de C=O, os picos na região de $2900\text{-}2800\text{cm}^{-1}$ associados ao estiramento de C-H. A banda na região de 3900cm^{-1} a 3300cm^{-1} atribuídas ao grupo O-H corroborando assim, com as bandas encontradas nesta pesquisa e comparadas com as bandas citadas por Sousa et al (2017) e Souza (2021) mostrados nas tabelas 3 e 4.



Nº DE ONDA (CM ⁻¹)	ATRIBUIÇÕES	Nº DE ONDA (CM ⁻¹)
LITERATURA		
3600-2500	v(O-H)- forte, extensa	3400
3000-2800	v(C-H) – curta, ocasional	2900
1744	v(C=O éster), forte	1736
1617	v(COO ⁻), forte	1637
1441	v(COO ⁻), fraca	1426
1210	v(S=O)	1251
1200-1100	v(COC) éter do anel glicosídico; (C-C)	1147
956	C-H em configuração α	966
906	C-H em configuração β	921
810	v(C-O-S)	833

Tabela 3– Grupos funcionais da pectina e seus números de ondas.
Fonte: Sousa *et al*, 2017



Tabela 4 – Grupos funcionais da celulose e seus números de ondas.

Fonte: Souza, 2021

Nº DE ONDA (CM ⁻¹)	Grupos Funcionais	ATRIBUIÇÕES	Nº DE ONDA (CM ⁻¹)
3325	O-H	O-HO(3)H....O(5) ligações de hidrogênio intramoleculares na celulose	(adel <i>et al.</i> , 2018; Junior <i>et al.</i> , 2018)
3285	O-H	O(6) H...O(3) Ligações de hidrogênio intermoleculares em celulose	(adel <i>et al.</i> , 2018; Junior <i>et al.</i> , 2018)
2922	C-H	Alongamento assimétrico de =CH ₃ alifático em ácido graxo	(Che Man <i>et al.</i> , 2005; Gomez Hoyos <i>et al.</i> , 2020)
2853	C-H	Alongamento simétrico de =CH ₂ alifático em ácido graxo	(Che Man <i>et al.</i> , 2005; Gomez Hoyos <i>et al.</i> , 2020)
1743	C-H	Vibrações de grupos acetil e éster urônico de hemicelulose ou grupo carboxílico dos ácidosferúlico e p-cumárico de lignina	Gabriel <i>et al.</i> , 2020)
1640	Fibra-OH adsorvida	Água absorvida	(Junior <i>et al.</i> , 2018)
1590	C=C	C=C alongamento do anel aromático(s)	Gabriel <i>et al.</i> , 2020)
1462	C-H	Alongamento =CH ₂ alifático em ácido graxo	(Che Man <i>et al.</i> , 2005; Gomez Hoyos <i>et al.</i> , 2020)
1377	C-H	Deformação simétrica de -CH ₃ alifático em ácidos graxos	(Gomez Hoyos <i>et al.</i> , 2020)
1235	C-O	Alongamento C-O em lignina e xilana	(Gabrielet al., 2020; Junior <i>et al.</i> , 2018))
1162	C-O-C	Alongamento assimétrico C-O-C em celulose I e celulose II	Gabriel <i>et al.</i> , 2020)
900		Celulose I β	Gabrielet al., 2020; Gomez Hoyos <i>et al.</i> , 2020; Junior <i>et al.</i> , 2018)

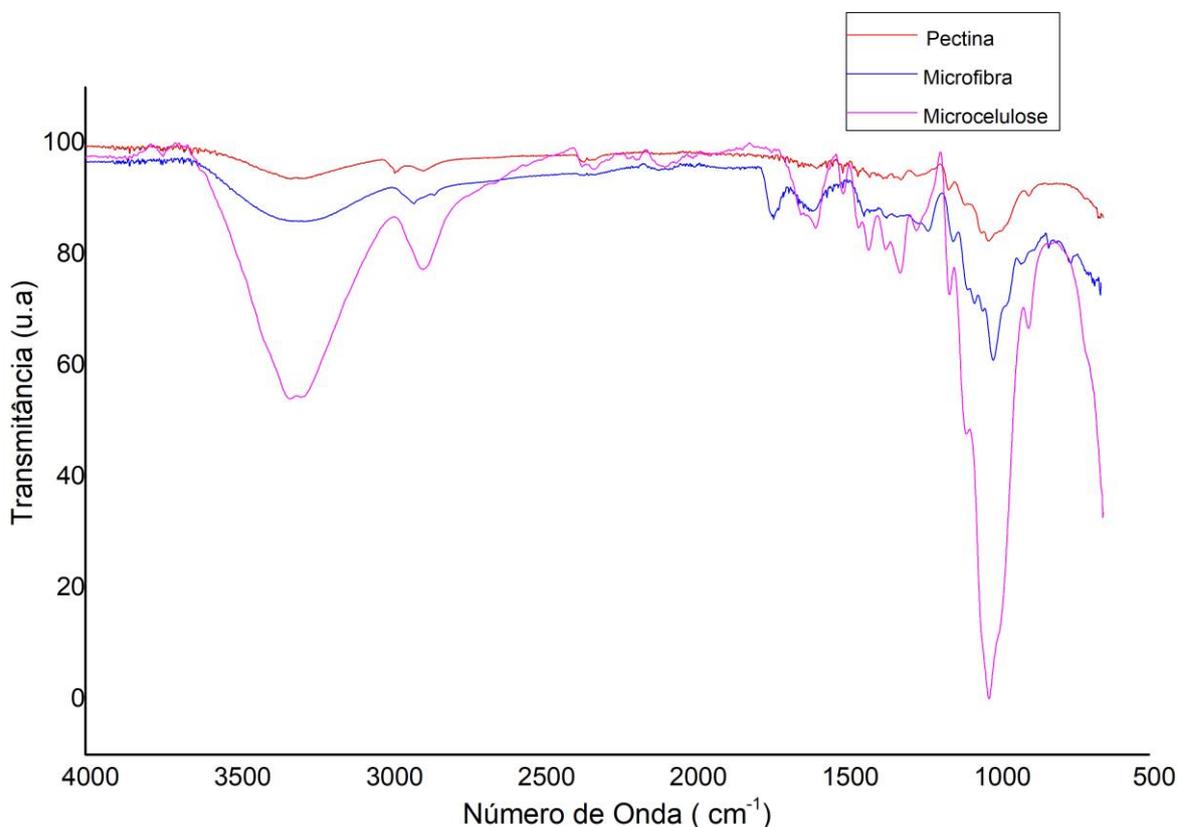


Figura 16 – FTIR das Microfibras de celulose, microcelulose e Pectina da manga.

Fonte: Próprio autor.

4.1.2 – Análise Térmica (TGA – DTG)

Diante da análise termogravimétrica das amostras e de suas derivadas foi possível observar as temperaturas determinantes para a degradação de massa dos materiais submetidos à análise. A figura 17 mostra a análise termogravimétrica da (McM), (MFCM) e da (PECM) isoladamente. Podemos observar especificamente o termograma da (MCM), sua temperatura de degradação se inicia em torno dos 201°C e seu pico maior de degradação varia em torno de 342°C até a sua total degradação. Já a análise das (MFCM), sua degradação se inicia cerca de 202°C com pico de degradação em 339°C e a pectina, 147°C e 324°C respectivamente, destaca-se que até o início de degradação os materiais apresentam perda de aproximadamente 7%, 6% e 10% de umidade respectivamente. Para maior



detalhamento dos eventos de degradação ocorridos em cada amostra, a figura 17 e 18 mostram as curvas de TGA-DTG (Derivada) exemplificando seus resultados.

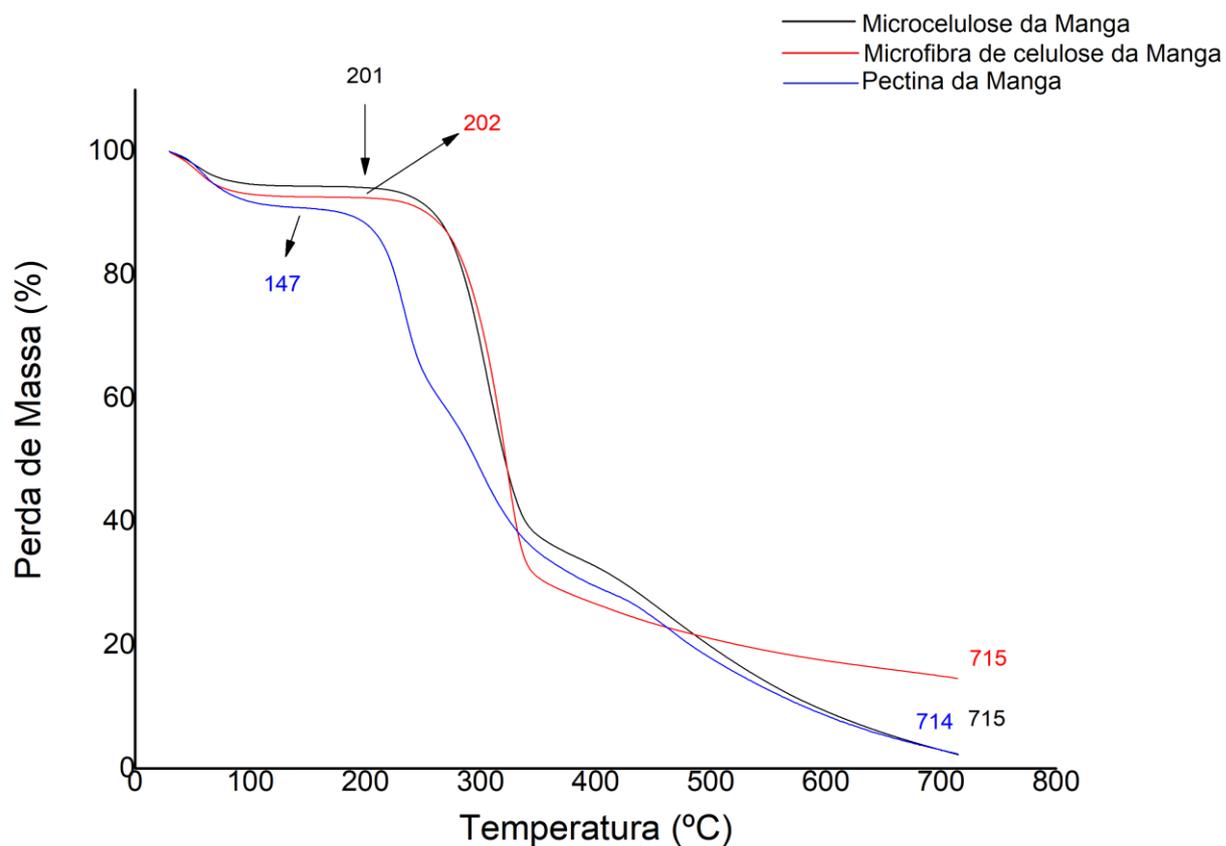


Figura 17 – Análise Termogravimétrica (TGA) da (MCM), (MFCM) e (PECM)

. Fonte: Próprio autor

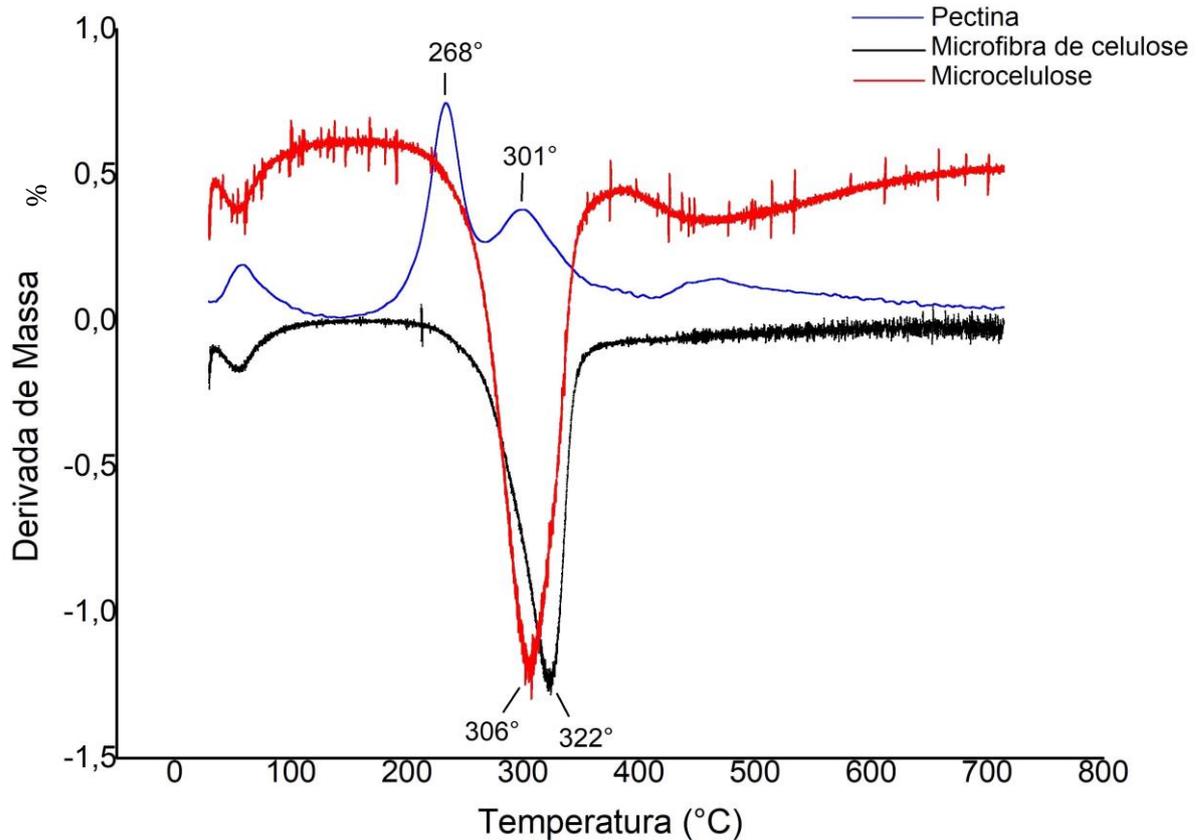


Figura 18 - Derivada termogravimétrica (DTG) da Celulose, microfibra de celulose e pectina da Manga. Fonte: Próprio autor

Por meio da derivada termogravimétrica é possível analisar o índice de temperatura onde ocorrem perdas de massa significativas observando o início dos eventos de degradação, o início da degradação extrapolada, o final da degradação e as temperaturas máximas de pico. Ao analisar a análise termogravimétrica e derivada (DTG) da (McM), observa-se um único evento térmico com início da degradação da amostra na temperatura aproximada de 190°C e degradação extrapolada na temperatura aproximada de 260°C, seu pico alcançando aproximadamente 306° demonstrando perda de massa considerável da amostra.

MACHADO *et al.*, (2014) analisaram em sua pesquisa comportamento similar com a microcelulose de fibras de coco verde, em que mostra que entre as temperaturas de 50°C e 180°C a massa se mantém estável e a decomposição térmica inicia-se entre 330°C a 380°C.



Já a TGA-DTG das (MCM) demonstrou comportamento próximo com a microcelulose, sendo que o início do comportamento de degradação foi aproximadamente em 196°C com a degradação extrapolada em 279°C, seu T_{pico} alcançou a marca em 322°C mantendo seu aquecimento até o resíduo de combustão total chegando próximo dos 700°C.

Por fim, a (PECM), em sua análise TGA-DTG, demonstrou comportamento distinto das demais amostras, nela a DTG mostrou inflexão das curvas com três eventos térmicos, iniciando a perda de água em 50° e 100°, o primeiro evento com pico em 268°C, seu segundo evento entre 300°C e 400°C e seu terceiro evento entre 400°C e 500°C com degradação total em aproximadamente 700°C.

SOUZA *et al.* (2017) compararam a pectina comercial com a pectina extraída da casca do melão, constatando um comportamento no TGA-DTG similar. Os autores destacam que a pectina comercial tem seu primeiro episódio de degradação por volta dos 60°C correspondendo a 10% de perda de água, o segundo evento se inicia em 140°C e corresponde a 5% perda de massa da amostra. Os autores verificaram que nessa etapa ocorre a perda de grupos ácidos da cadeia lateral e carbono do anel piranosídico. O terceiro evento corresponde à etapa de oxidação equivalendo a 22% do total da amostra. Para efeito de comparação, a pectina da manga mostrou comportamento similar à pectina comercial e à pectina do melão caipira.



4.1.3 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Mostrado na figura 19, na DSC da pectina é possível observar três eventos térmicos. O primeiro evento, em aproximadamente 65°C, é um evento endotérmico referente à evaporação da água na cadeia da (PECM). O segundo e terceiro evento em aproximadamente 356°C e 490°C são eventos exotérmicos referentes à degradação e despolimerização da pectina.

Todisco (2022) em sua pesquisa sobre a caracterização da pectina da goiaba observou dois comportamentos exotérmicos por volta de 254°C e outro em 256° C. O autor também relatou em seu levantamento bibliográfico que EinhornStolz *et al.* (2007) e Einhorn-Stoll & Kunzek (2009) analisaram o comportamento térmico de várias amostras de pectina e também obtiveram temperaturas de degradação em torno de 250 °C para a pectina. Desta forma observa-se que a pectina da manga é mais resistente às temperaturas comparadas com a pectina da goiaba.

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) de (McM) apresenta dois eventos consideráveis: o primeiro evento mostra a variação de energia térmica do polímero como um evento exotérmico (fusão) entre 300°C e 400°C e o segundo evento também exotérmico entre 500°C e 600°C responsáveis pela decomposição da celulose (fragmentação dos grupos carbonila e carboxila). A amostra de (MfcM) apresentou eventos endotérmicos entre 50°C e 100°C (evaporação de água) e eventos exotérmicos (liberação de calor) em 300°C com pico maior entre 400°C e 500°C com decomposição da celulose até a sua total combustão.

BRITES (2015), obteve resultados de DSC para a celulose comercial com dois picos endotérmicos a 200°C e 320°C e um pico exotérmico a 340°C. Para a celulose do bagaço de cana-de-açúcar mostrou apenas um pico endotérmico a 190°C.

SANTOS; GRAÇA; CARDOSO (2016) mostrara as curvas de DSC para a celulose de sisal e modificada (xantato) com álcool láurico. Obteve-se um evento endotérmico na temperatura de 100°C atribuído à evaporação de água e um evento exotérmico entre 300°C e 375°C relacionado ao processo de oxidação da celulose, ainda em sua pesquisa este autor refere que Martin *et al.*, (2009) obtiveram os mesmos eventos.

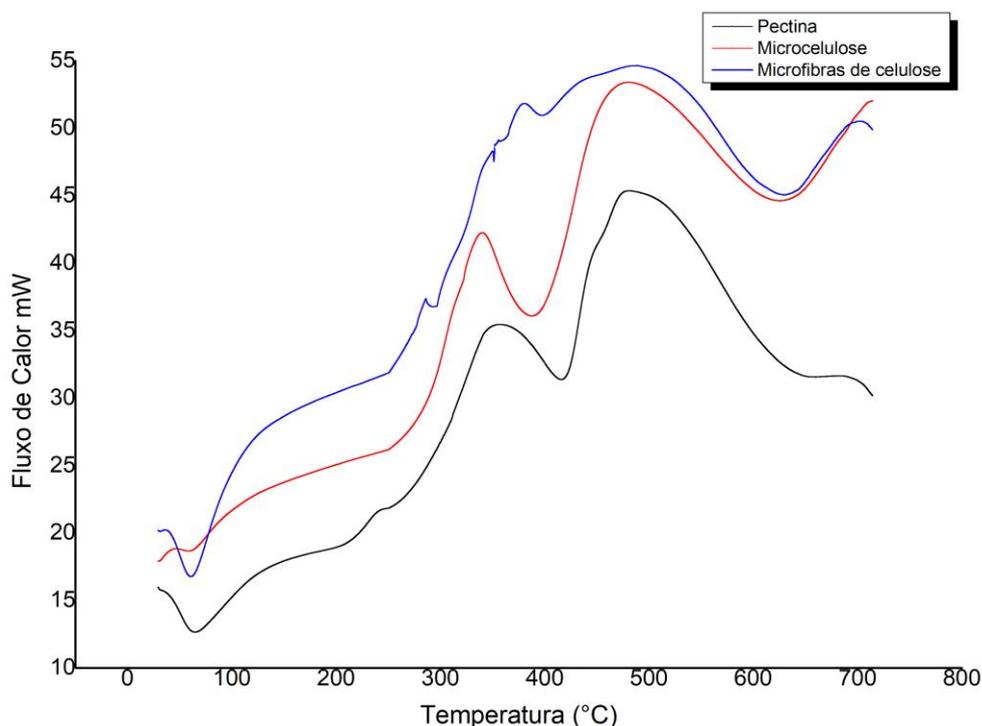


Figura 19: Calorimetria exploratória diferencial (DSC) da Pectina, microfibras e microcelulose da manga. Fonte: Próprio autor

4.1.4 - Difração de Raio X (DRX)

De acordo com CAROLINO, (2017), as análises de difração de raios-X são necessárias para estudos detalhados de polímeros cristalinos e semi-cristalinos, justamente para identificar e poder separar essas classificações dentre os próprios polímeros descobrindo as proporções de cristalinidade e regiões amorfas dentre eles. Além disso, Carolino (2017) ressalta que existem na literatura vários métodos para os cálculos dos índices de cristalinidade duvidando assim de sua certa exatidão. A figura 20 mostra o difratograma dos polímeros com picos de moderada intensidade entre 10°C e 20°C e picos de maior intensidade entre 20°C e 30°C oriundos da celulose da manga elencando comportamento característico deste material e picos de baixa intensidade para pectina demonstrando uma região mais amorfa típica da pectina, os resultados cálculos das áreas cristalinas e amorfas são mostrados na tabela 5 e demonstrados no apêndice A.

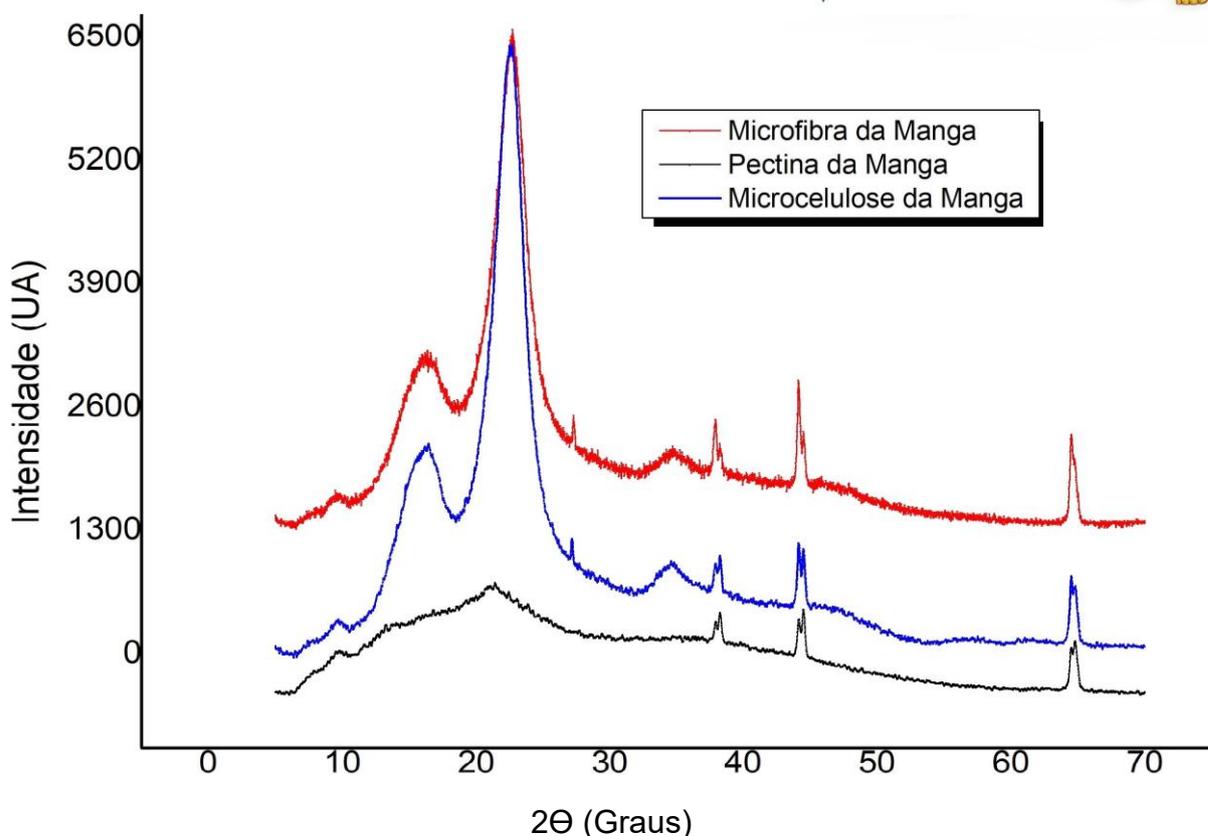


Figura 20 – DRX da microcelulose, microfibras de celulose e pectina da manga.
Fonte: Próprio autor

SOUZA, 2021 mostrou o índice de cristalinidade obtido através de microfibras de celulose da casca do milho, equivalente a 53% e a 47% para a parte amorfa.

TRAVALINI *et al.*, (2016), determinaram o índice de cristalinidade da microcelulose e microfibras de celulose derivada da mandioca em 49% com sua área amorfa em 51%.

RIBEIRO (2014), mostrou o grau de cristalinidade da pectina cítrica comercial equivalente a 17% e sua parte amorfa em 83%.



	Área Total (u.a) (x10 ⁴)	Área Cristalina (u.a)	Área Amorfa (u.a)	Índice de Cristalinidade (%)
		(x10 ⁴)	(x10 ⁴)	
(MCM)	4,24	1,26	2,98	29,71
(MFCM)	4,25	1,33	2,91	31,29
(PECM)	2,81	0,536	2,27	19,21

Tabela 5- Cálculo da cristalinidade de acordo com a área cristalina e total de cada amostra. Fonte: Próprio autor

Desta forma, os resultados (tabela 5) mostram que os materiais são fundamentalmente amorfos, ou seja, microcelulose 70% amorfa, microfibras iguais ± 70 % amorfa, e a pectina 80% amorfa, demonstrando um comportamento mais viável para produção de gel, além de permitir a difusão e compostos, melhorando sua degradabilidade, como observados nas análises de DSC.

4.1.5 - Grau de polimerização (DP)

As amostras de pectina, microcelulose e microfibras de celulose (500 mg) foram dissolvidas em 50 ml de solução de etilenodiamina e 50 ml de água destilada. O grau de polimerização de cada amostra foi medido utilizando um Viscometer de Rotina Cannon-Fenske de 150 ml, imerso em um banho de água a temperatura constante ($25 \pm 0,5$ °C) e depois calculado de acordo com equação 1 e 2, representadas abaixo, e os resultados desses cálculos demonstrados na tabela 6.



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

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

$$\eta = \sqrt{2(\eta_{sp} - \ln \eta_r)/c}$$

Equação 1: Fórmula para cálculo do grau de polimerização.

Fonte: (ANDRITSOU *et al* (2018)

Onde t_0 é o tempo de fluxo do solvente, t é o tempo de fluxo da solução, η é a viscosidade intrínseca e c é 0,5 g/dl. O peso molecular médio (M) foi determinado pela equação empírica de Mark–Houwink.

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

Equação 2: Fórmula para cálculo do grau de polimerização.

Fonte: (ANDRITSOU *et al* (2018)

Onde α é igual a 0,905 e K é igual a $1,33 \times 10^{-4}$ dl/g. Para o sistema polímero-solvente específico, o Mark- Parâmetros de Houwink, α e K . 18 O grau de polimerização (equação 3) foi calculado como M do polímero dividido pelo peso molecular de uma unidade monomérica de anidroglicose.

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

Equação 3: Fórmula para cálculo do grau de polimerização.

Fonte: ANDRITSOU *et al.*, 2018)



Amostra	Triplicata do Tempo de escoamento (s)	Média do Tempo de escoamento (s)	Grau de polimerização (g/mol)
SOLVENTE E ÁGUA	-	31	-
	-		
	-		
(PECM)	174	175	436
	175		
	176		
(MCM)	78	79	194
	79		
	80		
(MFCM)	69	74	176
	76		
	77		
(MCV)	1529	1501	2049
	1507		
	1468		

Tabela 6 – Grau de polimerização das amostras de pectina, microcelulose, microfibras de celulose da Manga e microcelulose vegetal Fonte: Próprio autor.



4.1.6 - Microscopia Ótica

A análise de microscopia ótica foi realizada utilizando o microscópio biológico binocular convencional com quatro lentes (4x, 10x, 40x, 100x) da marca Olen. Foram submetidas à análise, as amostras de pectina, e microfibras de celulose da manga. A figura 21 mostra a microscopia da microfibras de celulose da manga aumentada em 40x, podendo observar a característica da fibra, alongada, longilínea, simétrica com bordas mais uniformes e regulares típico da fibra deste material. Na figura 22, mostra a morfologia externa da pectina aumentada em 40x podendo observar bordas irregulares e formação em grânulos das unidades característicos da pectina.

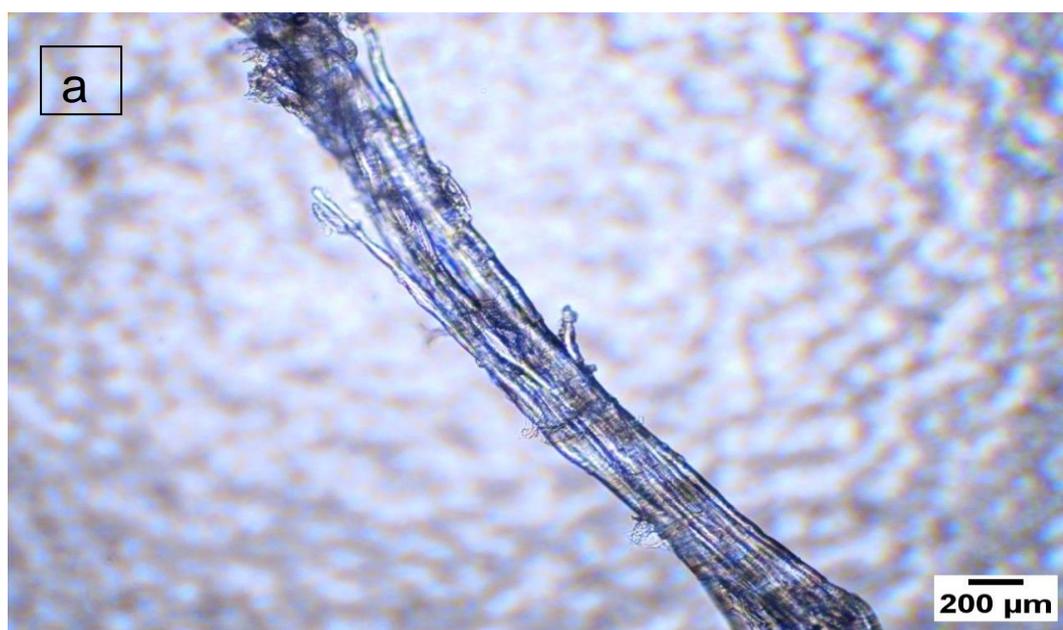


Figura 21 – a) Microscopia ótica da microfibras de Celulose da manga aumentada em 40x. Fonte: Próprio autor

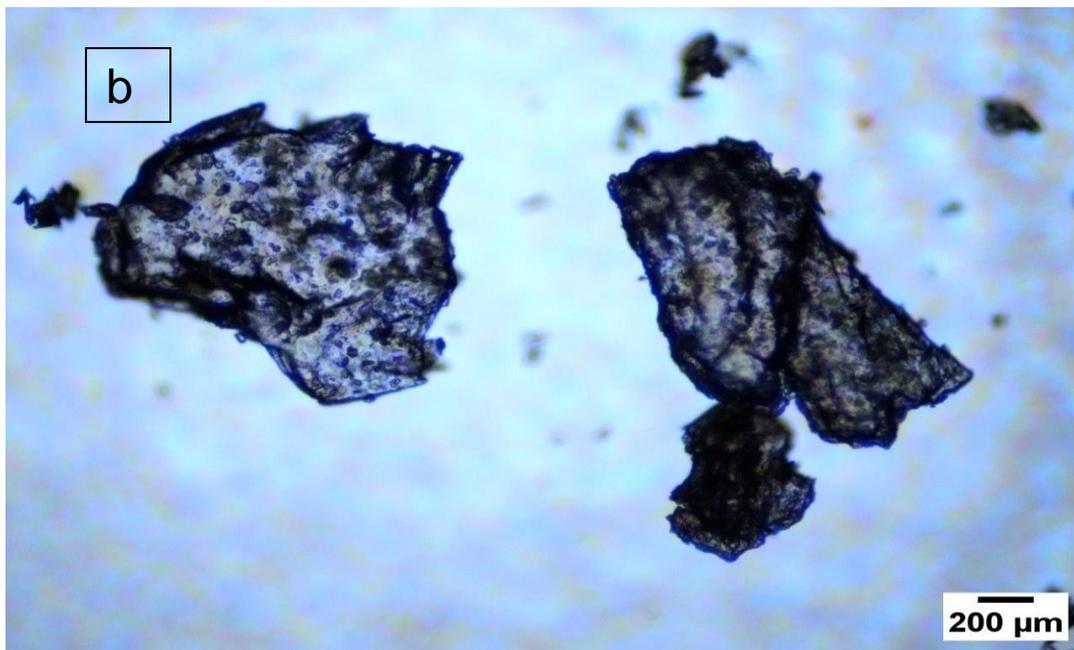
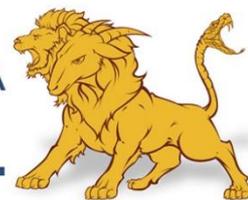


Figura 22 – b) Microscopia ótica da pectina da manga aumentada em 40x Fonte: Próprio autor



4.1.7 – Microscopia Eletrônica de Varredura

As figuras 23, 24, 25 e 26, mostram as imagens da pectina pura em diferentes aumentos. É possível observar superfícies ondulares, irregulares sem presença de porosidades. Em especial a imagem 25, mostra a pectina no aumento de 500um, onde se observa uma superfície lisa com presença de alguns grânulos.

DE SOUSA *et al.*, (2017), encontraram as mesmas características na pectina do melão, a presença de grânulos, irregularidades e também a inexistência de poros. Além disso, os autores afirmaram que a falta de poros é desfavorável para um o uso em encapsulamento de fármacos, visto que, a presença dos poros acabaria escoando o fármaco do material.

As figuras 27, 28, 29, e 30, referem-se à microcelulose vegetal. É possível identificar principalmente nas imagens (28, 29 e 30), a presença de irregularidades e fibras longitudinais em toda a extensão da imagem, característico de fibras de celulose em tamanho micrométrico, além da presença de rugosidades destacadas na imagem 29. CLARO (2017), em sua produção de filmes de cristais e fibras de celulose da madeira de eucalipto e de abacaxi obtiveram resultados similares. Nas imagens de MEV, em relação às fibras de celulose, o autor relatou a presença de rugosidades, e emaranhamento de fibras que se deve às ligações de hidrogênio e emaranhamento mecânico das próprias fibras.

As imagens 31, 32, 33 e 34 referem-se à MEV da microcelulose na manga, demonstrando uma superfície menos irregular e mais homogênea (figura 33) comparado à microcelulose vegetal (figura 29). Conforme a escala das imagens é possível observar as irregularidades fragmentadas da celulose, isso deve-se a oxidação causada pelo hidróxido de hidrogênio mostrando a sensibilidade ao tratamento químico.

KÉRZIA; ARAÚJO (2016), analisou a ação do peróxido de hidrogênio à celulose da casca do coco verde em que houve alterações significativas na superfície da celulose a tornando mais irregular e fragmentada do que a celulose sem tratamento com H₂O₂.



a) Pectina da manga

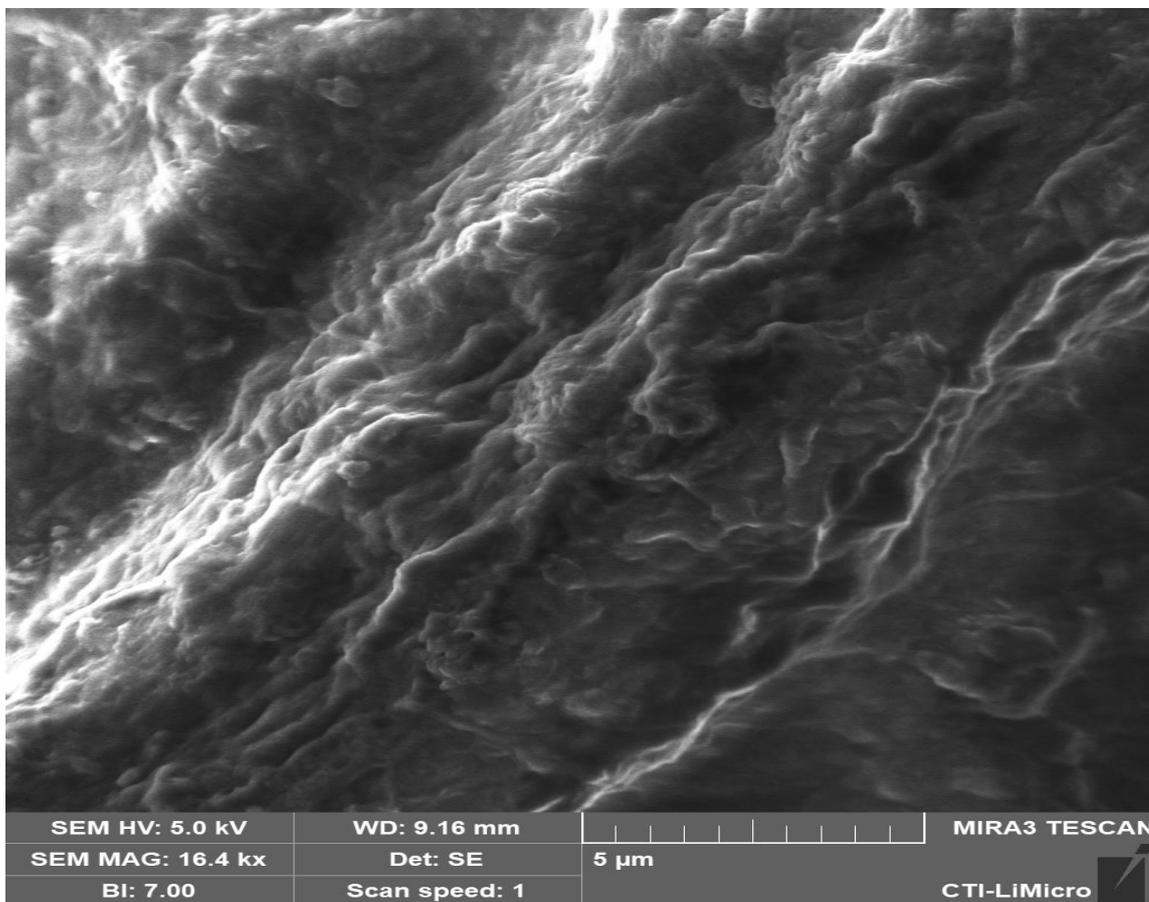


Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura da pectina da manga em 5µm.
Fonte: Próprio autor

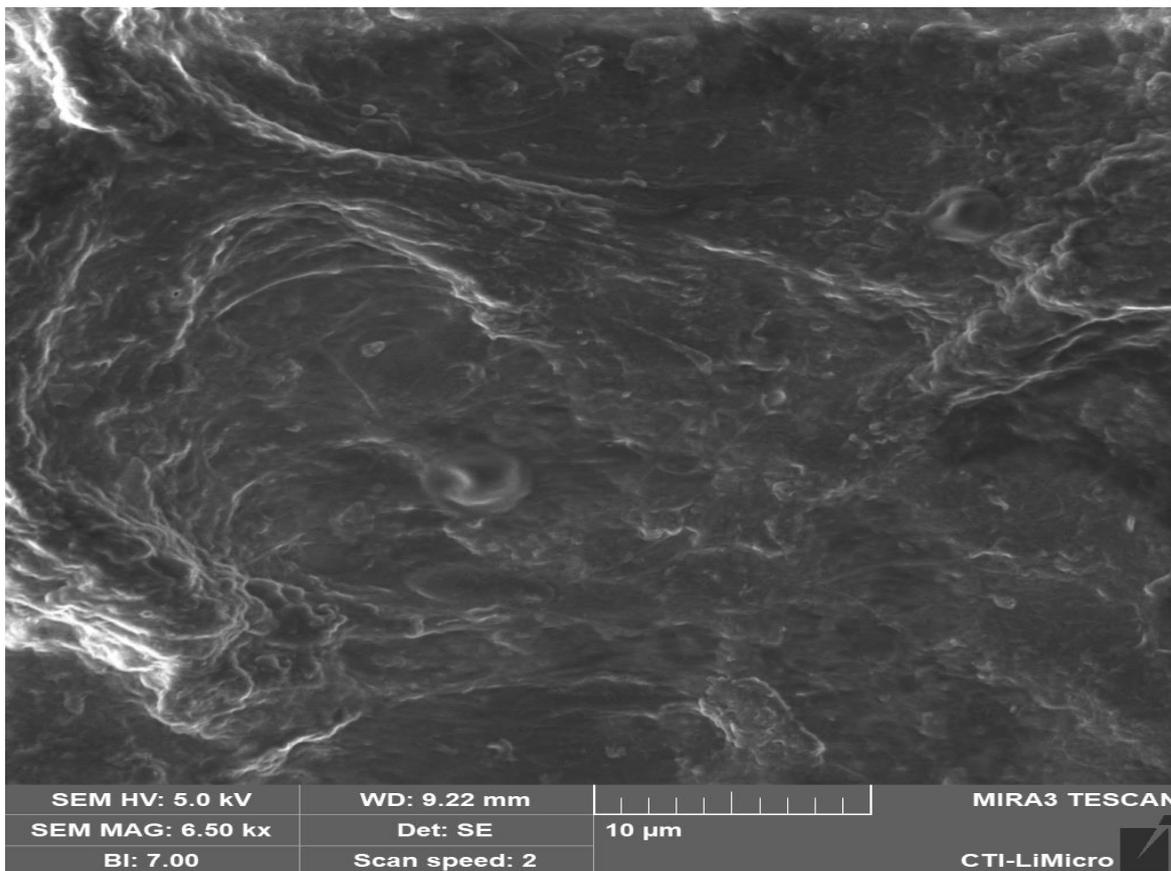


Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura da pectina da manga em 10 μ m.
Fonte: Próprio autor

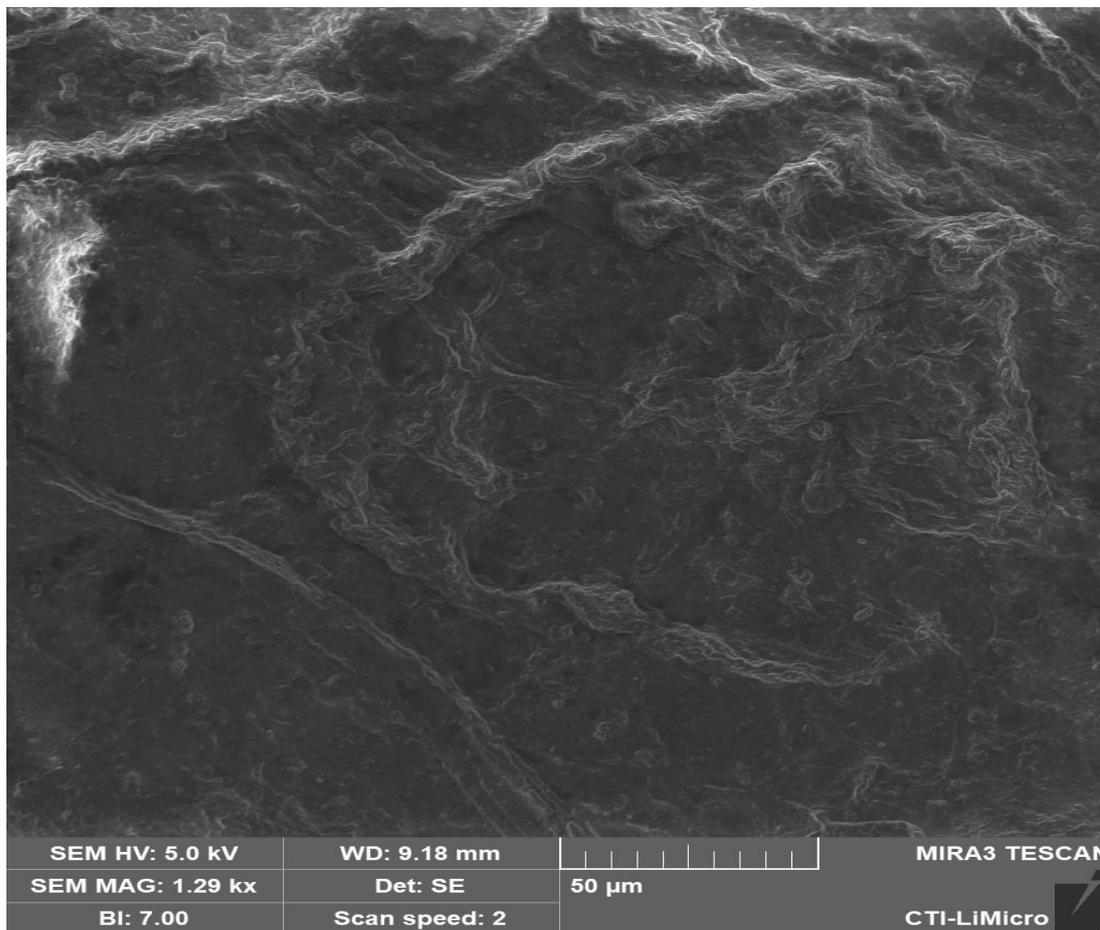


Figura 25 – Microscopia eletrônica de varredura da pectina da manga em 50µm.
 Fonte: Próprio autor

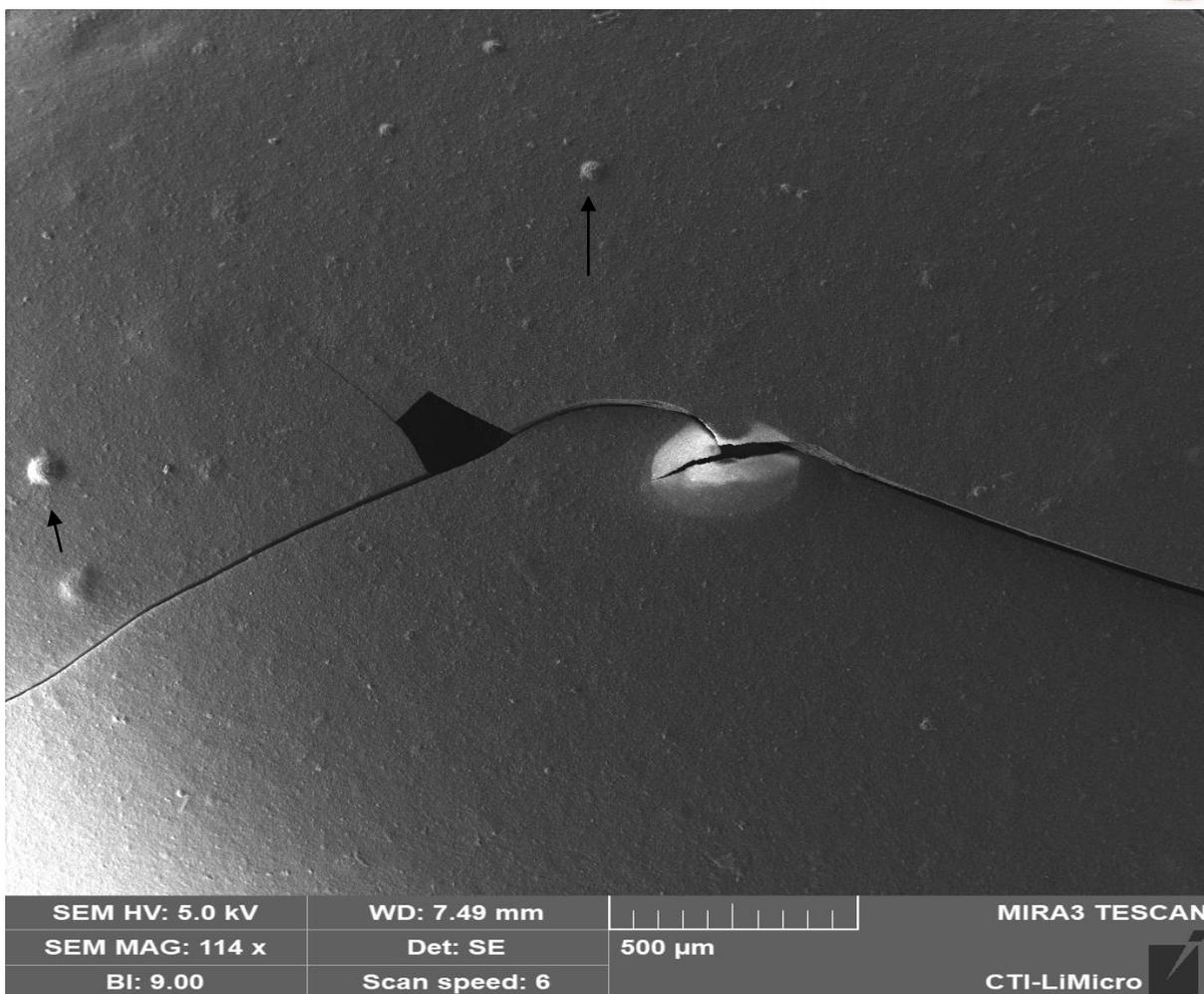


Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura da pectina da manga em 500μm.
 Fonte: Próprio autor



b) Microcelulose vegetal

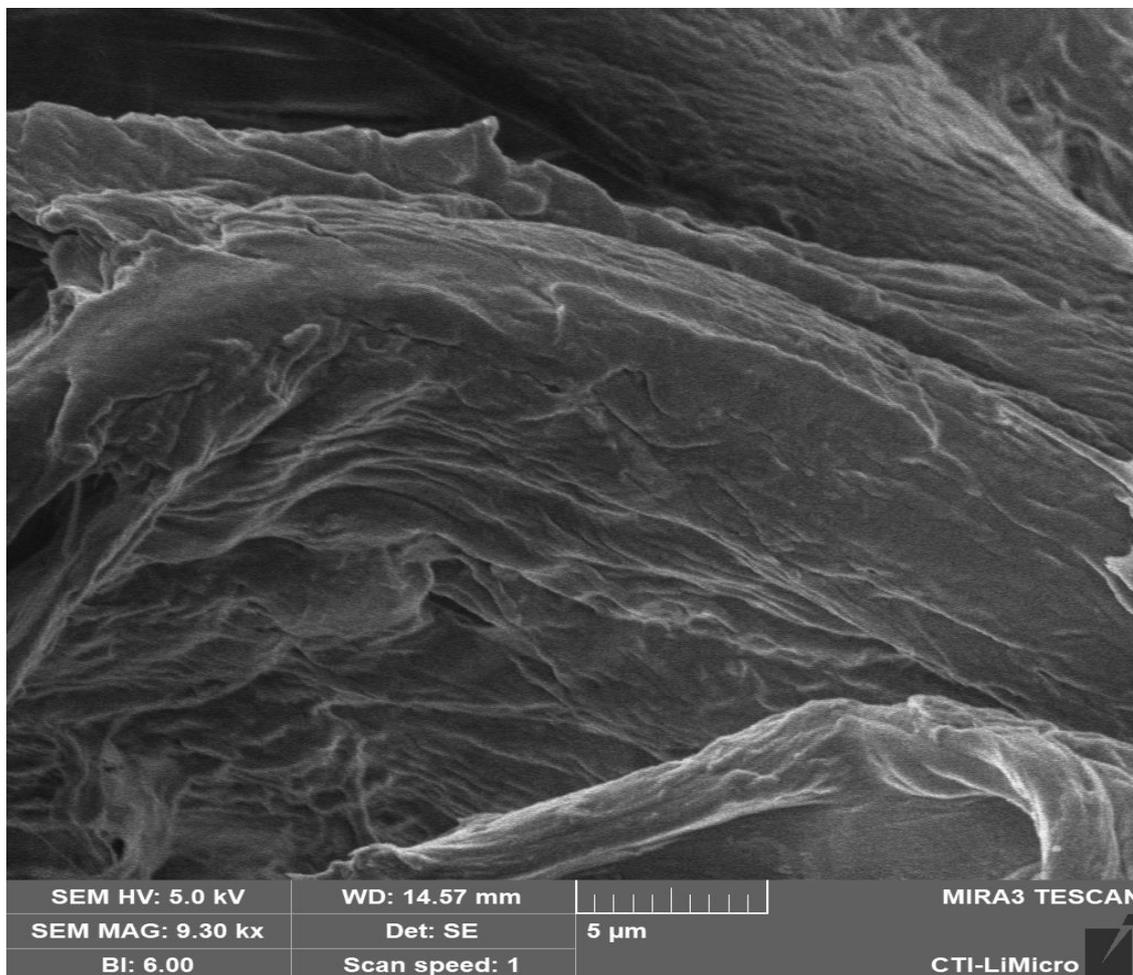


Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura da microcelulose vegetal em 5µm.
 Fonte: Próprio autor.

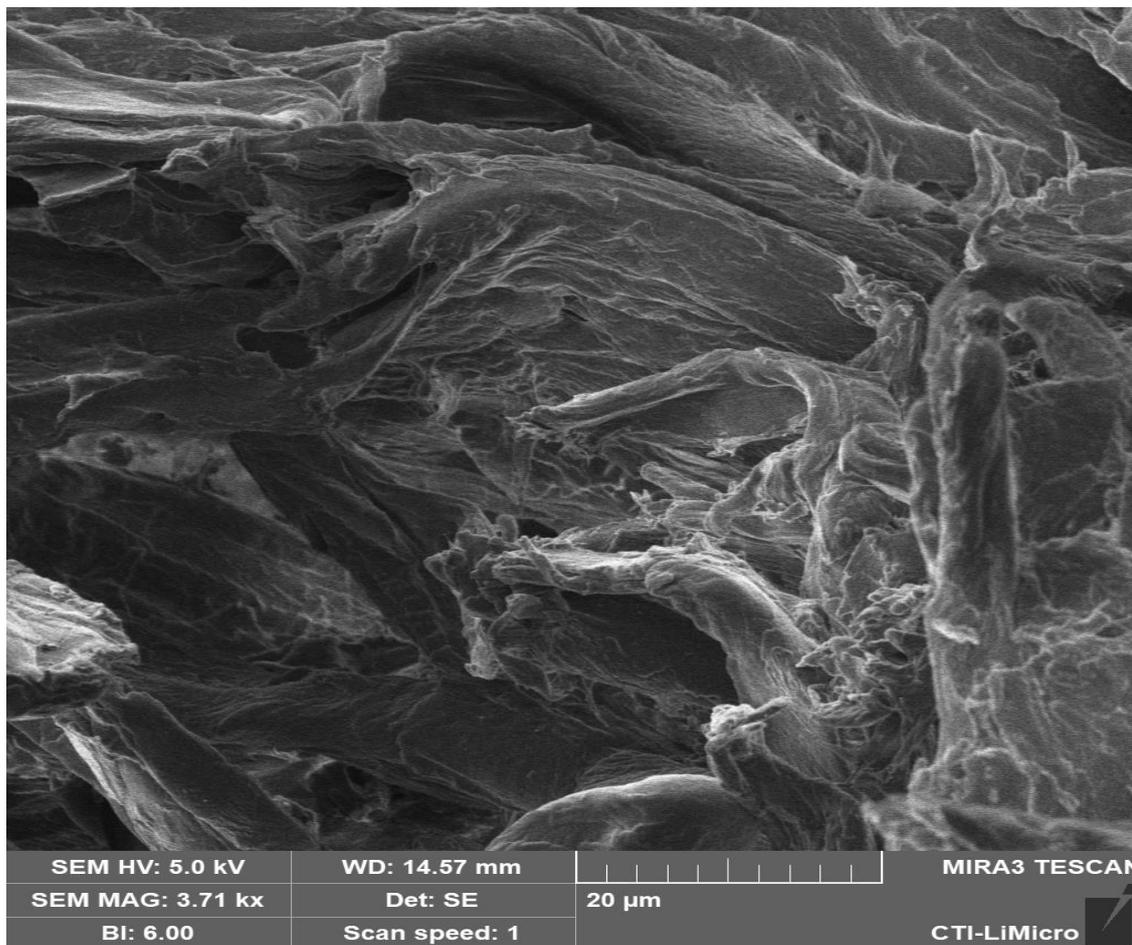


Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura da microcelulose vegetal em 20µm
 Fonte: Próprio autor.

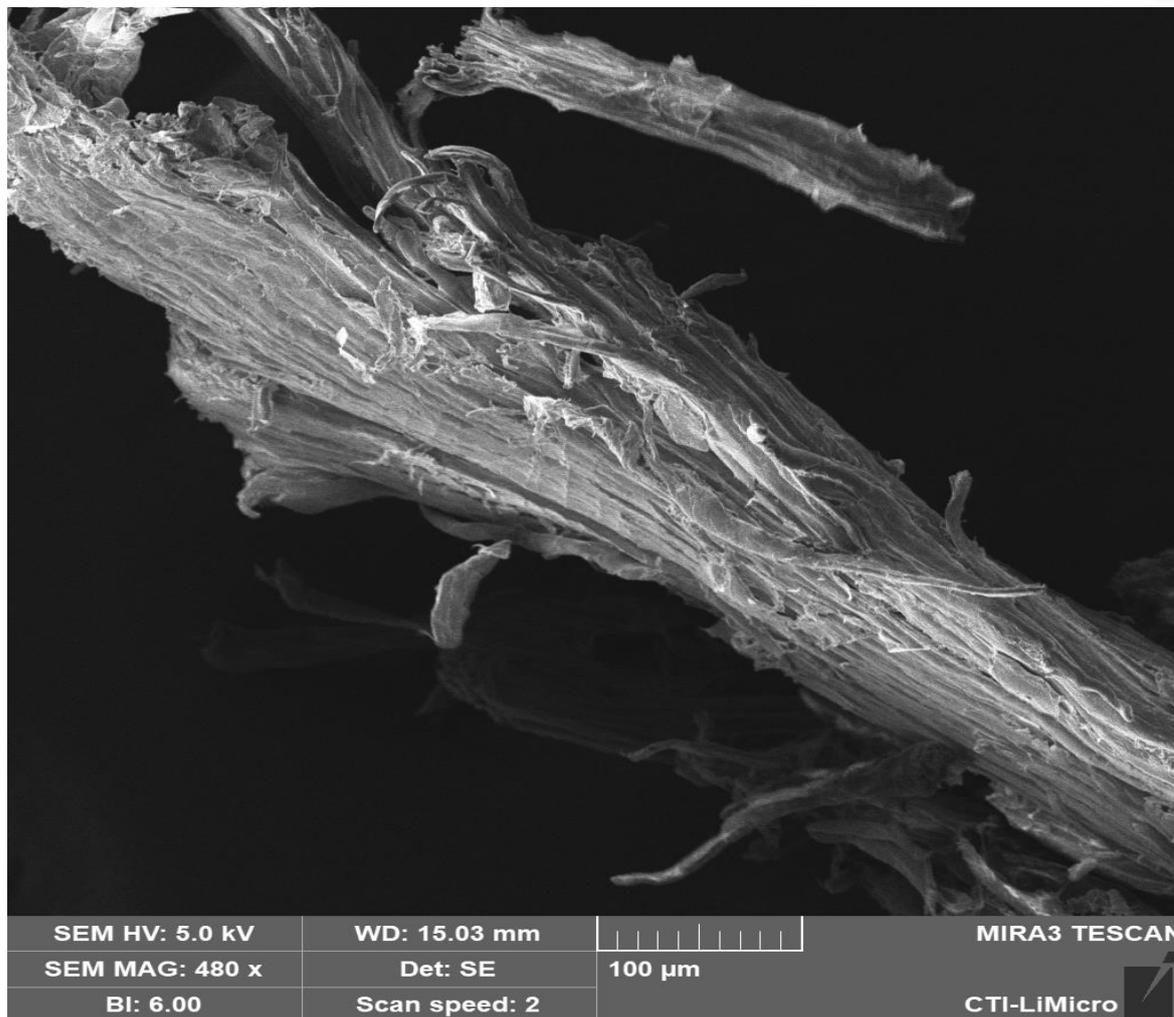


Figura 29 – Microscopia eletrônica de varredura da microcelulose vegetal em 100µm
Fonte: Próprio autor.

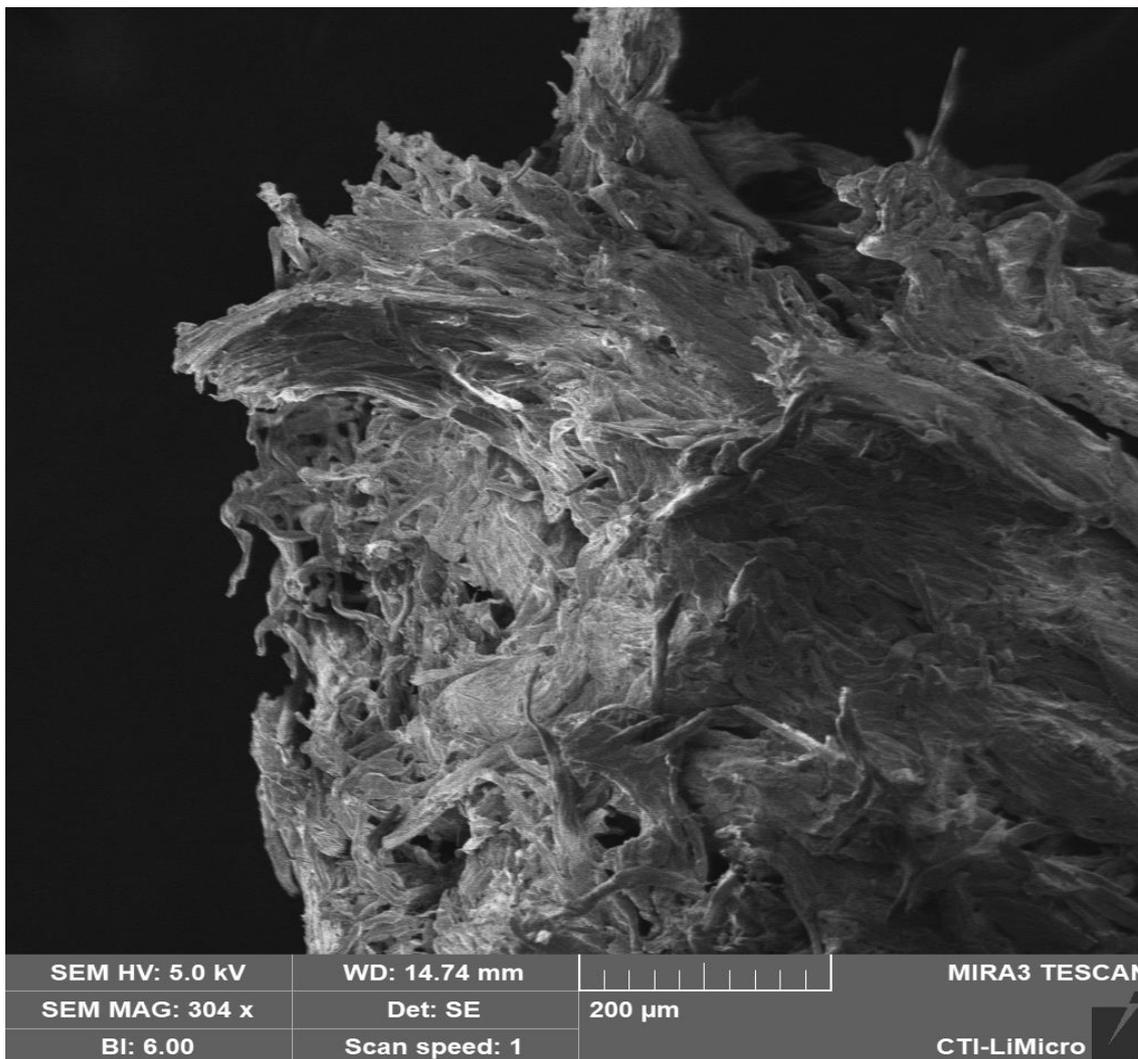


Figura 30 – Microscopia eletrônica de varredura da microcelulose vegetal 200μm.
 Fonte: Próprio autor.



C) Microcelulose da manga

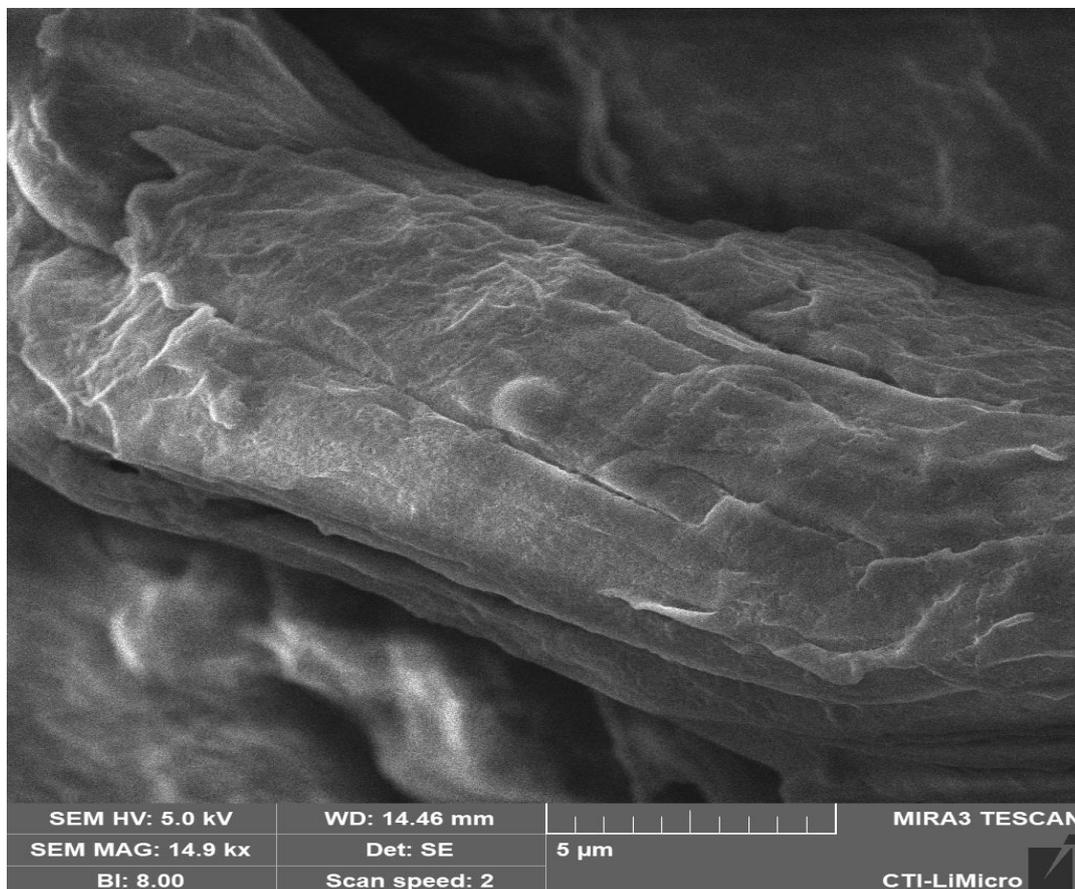


Figura 31 – Microscopia eletrônica de varredura da microcelulose da manga em 5µm. Fonte: Próprio autor.

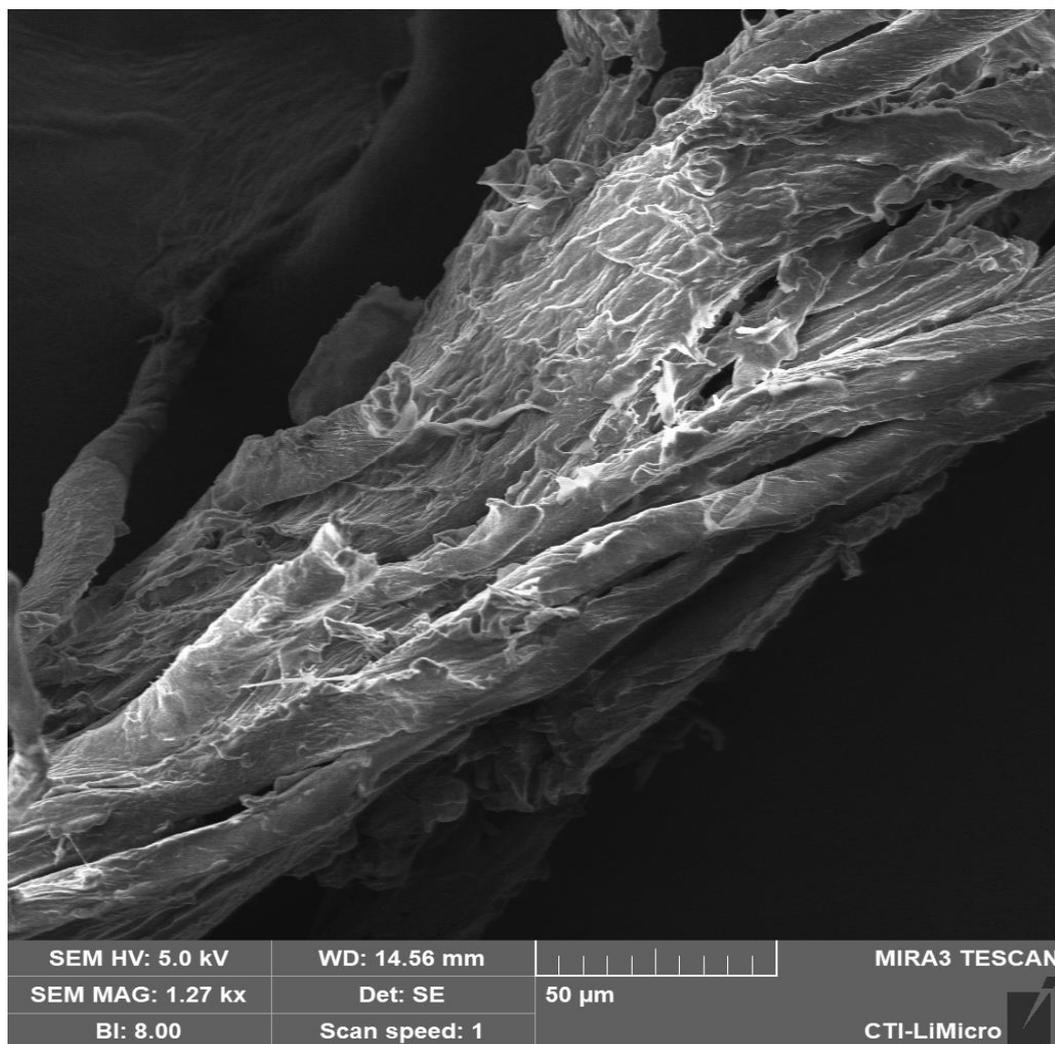


Figura 32 – Microscopia eletrônica de varredura da microcelulose da manga em 50µm. Fonte: Próprio autor.

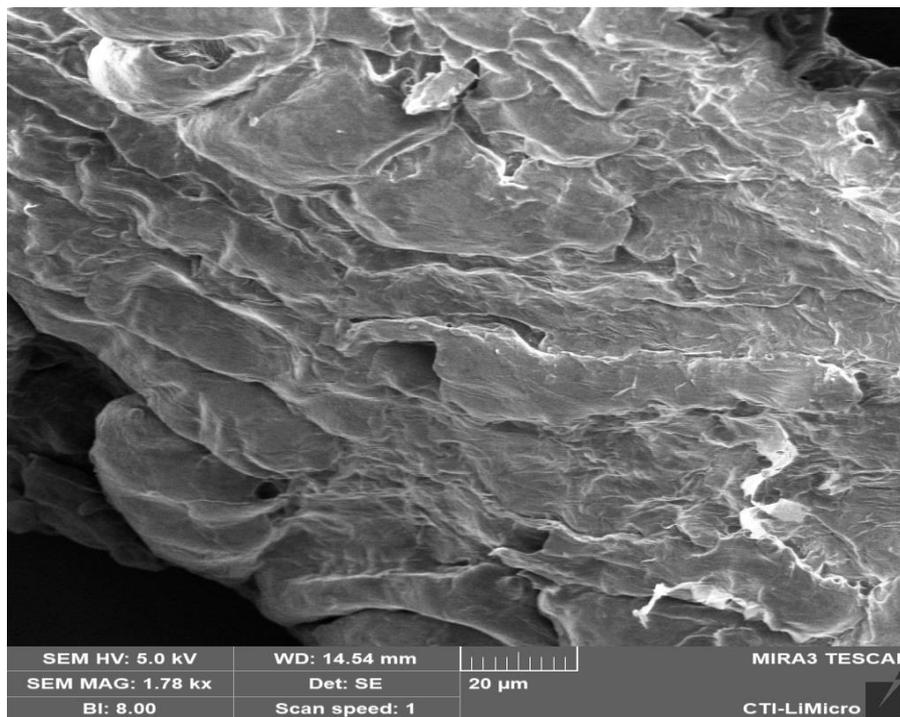


Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura da microcelulose da manga em 20µm. Fonte: Próprio autor.

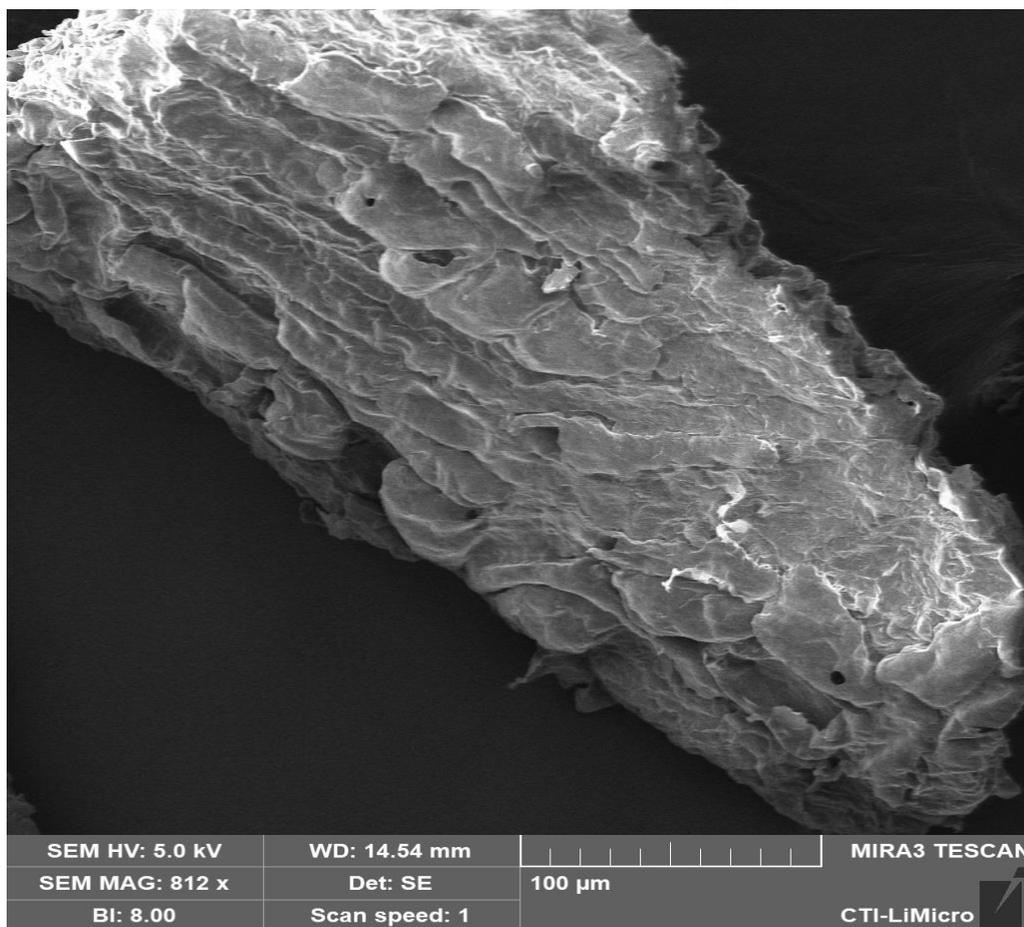


Figura 34– Microscopia eletrônica de varredura da microcelulose da manga em 100µm. Fonte: Próprio autor.



4.1.8 – Ensaio de Citotoxicidade

As amostras para o ensaio foram preparadas nas concentrações de 1%, 2% e 15% apenas para a pectina da manga.

Em uma placa de 24 poços preenchida parcialmente com microcelulose 2%, microcelulose Manga 2%, microfibras de celulose 2% e Pectina 15%, foram adicionados 500µl do meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e a placa mantida em estufa a 37° C com 5% de saturação de CO₂ por 24 horas.

Após o período de incubação, os sobrenadantes de todos os materiais foram removidos, obtendo-se os meios condicionados 100%. Estes foram submetidos a uma diluição seriada ½, obtendo-se mais 2 pontos de concentração (50 e 25%).

Cultivo celular

As células L929 (fibroblasto animal) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% FBS e mantidos em estufa a 37° C com 5% de saturação de CO₂ até apresentaram 90% de confluência. Posteriormente, as células foram cultivadas em placas de 96 poços (1x104/poço), em triplicata, na presença do meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS e a placa mantida em estufa a 37° C com 5% de saturação de CO₂ por 24 horas para permitir a adesão.

Citotoxicidade

O método utilizado foi o de redução do MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5 diphenyltetrazolium bromide*), que consiste na análise da conversão do MTT (solúvel) em cristais de formazan (forma insolúvel) pela ação das enzimas desidrogenases mitocondriais.

Para a avaliação da citotoxicidade, o meio de cultura das células L929 cultivadas em placa de 96 poços (1x104/poço) foi removido e adicionado um volume de 200 µl do meio condicionado. As células foram cultivadas na presença das diferentes concentrações dos meios condicionados de cada material (100, 50 e 25%) e a placa mantida em estufa a 37° C com 5% de saturação de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, meio condicionado foi removido e adicionado 50 µl/poço da solução



de MTT (5mg/ml) em PBS1X. Após a incubação da placa por 4 horas em estufa a 37° C com 5% de saturação de CO₂, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO para leitura da absorbância em um comprimento de onda de 570nm, em leitor de placa Spectra Max Gemini XS (Molecular Devices). Os resultados da absorbância foram representados como porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%), tratados e plotados no programa GraphPad Prism.

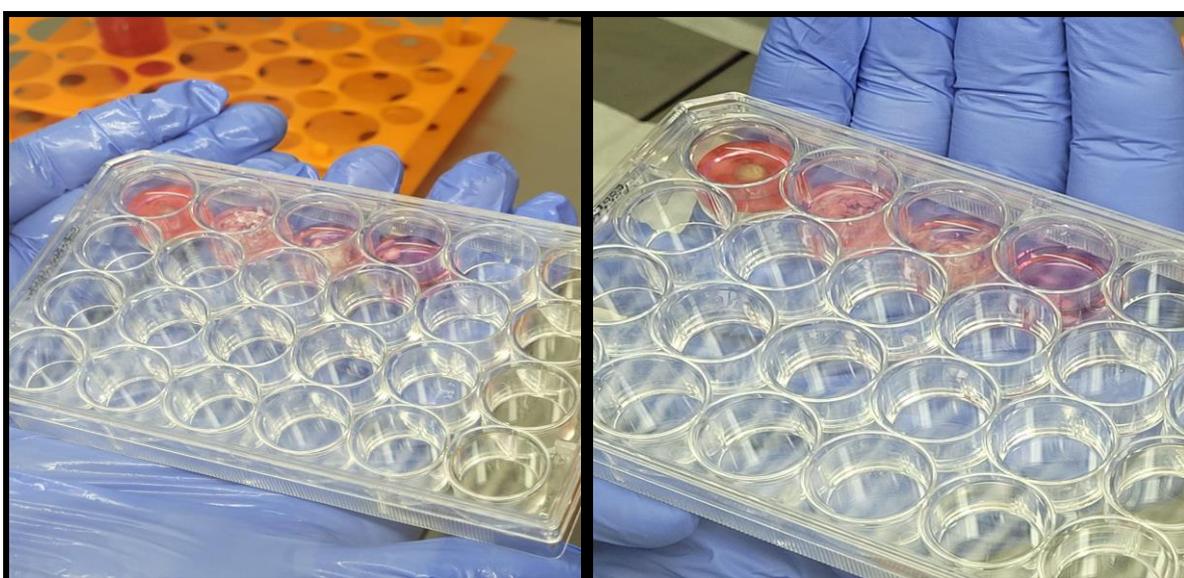


Figura 35 – Placa de 24 poços com amostras de pectina, microcelulose vegetal, microcelulose da manga e microfibras de celulose. Fonte: Próprio autor.

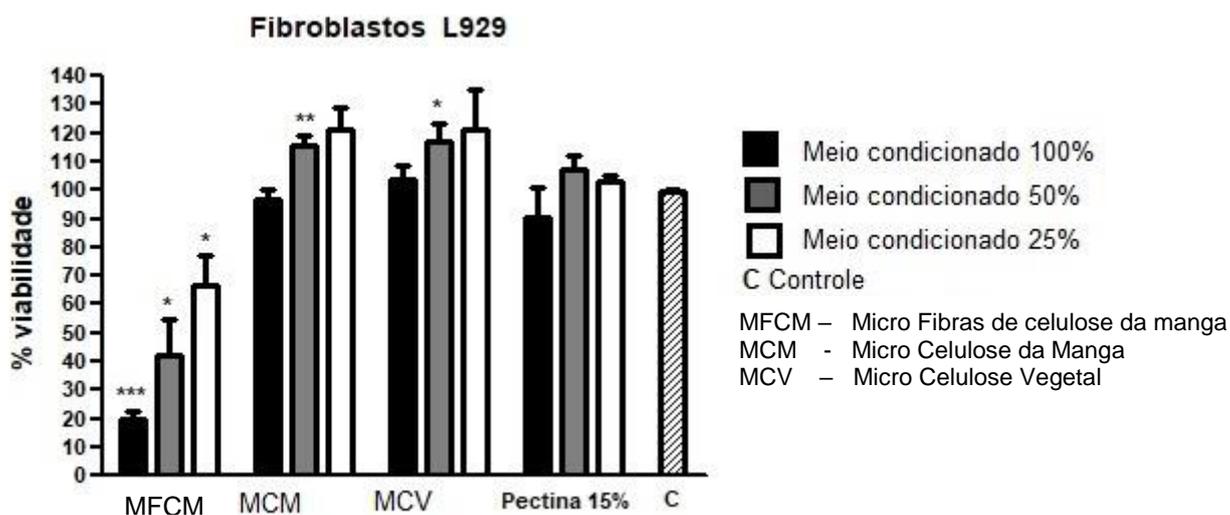


Figura 36 – Resultado da análise de citotoxicidade das amostras. Fonte: Próprio autor



De acordo com os resultados obtidos, podemos observar que todos os materiais demonstraram comportamento não citotóxico em meio condicionado a 25%, 50% e 100%. Apenas as amostras das fibras de celulose apresentaram comportamento citotóxico.

ZANETTE *et al.*, (2017) em seu estudo, analisaram o efeito citotóxico das fibras de celulose do algodão em células tronco da polpa dentária humana. A avaliação da proliferação e viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT em placas de 96 poços, nas concentrações de (0,1; 1; 10; 50; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 e 48 h. Os autores destacam que não houve comportamento citotóxico em nenhuma das concentrações testadas.

SOUZA (2009), analisou o efeito citotóxico da celulose do bagaço da cana de açúcar, Os ensaios de citotoxicidade foram conduzidos com a exposição de 929 células do clone NCTC ao extrato obtido de uma amostra da membrana mantido em contato por 24 horas em um meio de cultura MEM, usando o método de ganho de vermelho neutro que distingue as células mortas pela intensidade de cor do meio de cultura. O autor obteve comportamento não citotóxico em todas as análises mesmo com amostras em 100% do material.

Portanto, pode-se inferir que comportamento citotóxico (MFCM) analisadas nesta pesquisa se deve ao método de extração dessas fibras.

4.2 – Caracterização dos Géis

Após a produção, os géis de pectina da manga, microcelulose vegetal e microcelulose da manga foram caracterizados utilizando análises de FTIR, DRX, TGA-DTG e análises de reometria.

4.2.1 - FTIR

Os géis de pectina da manga, microcelulose vegetal e microcelulose da manga foram caracterizados no ensaio de FTIR. Pode-se observar na figura 37, que todas as curvas apresentaram comportamentos similares. Apenas sete bandas são elencadas nos espectrômetros dos géis, a banda inicial em 1000, 1200, 1500, 1600, 1700, 2900 e 3300cm^{-1} aproximadamente, o que remete às mesmas bandas dos



materiais quando analisados de forma individual. Pode-se observar que os materiais foram incorporados e não houve interação negativa entre eles, já que são encontrados grupos funcionais similares em cada gel.

De acordo com SOUZA (2021), que relatou opiniões de vários outros autores os grupos funcionais encontrados são: C-O-C, C-O, C-H, C=O e O-H.

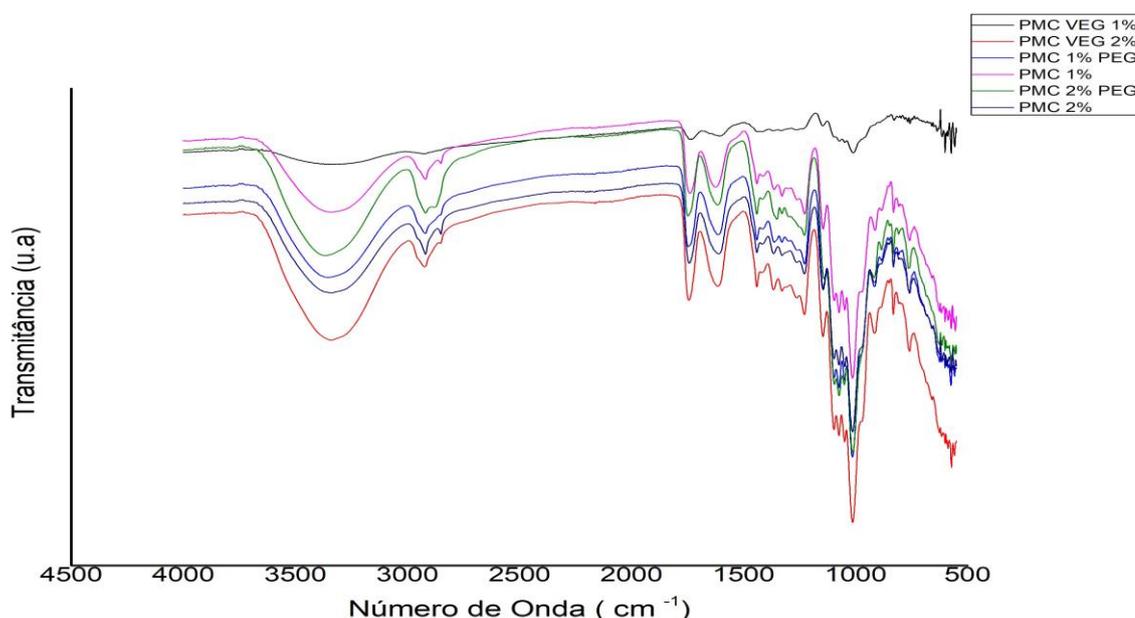


Figura 37 – Ensaio de FTIR dos géis de pectina, microcelulose vegetal e microcelulose da manga.

4.2.2 – TGA – DTG

De acordo com a figura 29, os géis demonstraram comportamentos de degradação similares. O processo se inicia a partir de 100°C através da evaporação da água, seguidos pelo início de degradação dos géis em aproximadamente 201°C com picos máximos de degradação em 350°C até a sua total combustão em 700°C. Na derivada observa-se com mais detalhes três eventos consideráveis de degradação, o início da degradação em 150°C representando a perda de água, o pico de degradação em 250°C e todas as curvas representando de acordo com a literatura a degradação da cadeia



polimérica da pectina e a degradação final com a temperatura em 330°C demonstrando a degradação da celulose segundo a literatura.

CUNHA, (2020), obteve comportamento similar para a celulose do milho (vegetal) referindo a degradação da hemicelulose em 300°C e degradação da celulose na temperatura de 350°C.

ANDRADE(2010) que trabalhou géis de pectina reporta a temperatura de degradação da pectina entre 230°C e 250°C com perda de massa aproximada entre 53%.

UTZERI (2018) produziu géis de pectina e quitosana, sendo que a degradação da pectina entre 220°C e 280°C com perda de massa entre 50% e 65% corroborando com os autores citados acima.

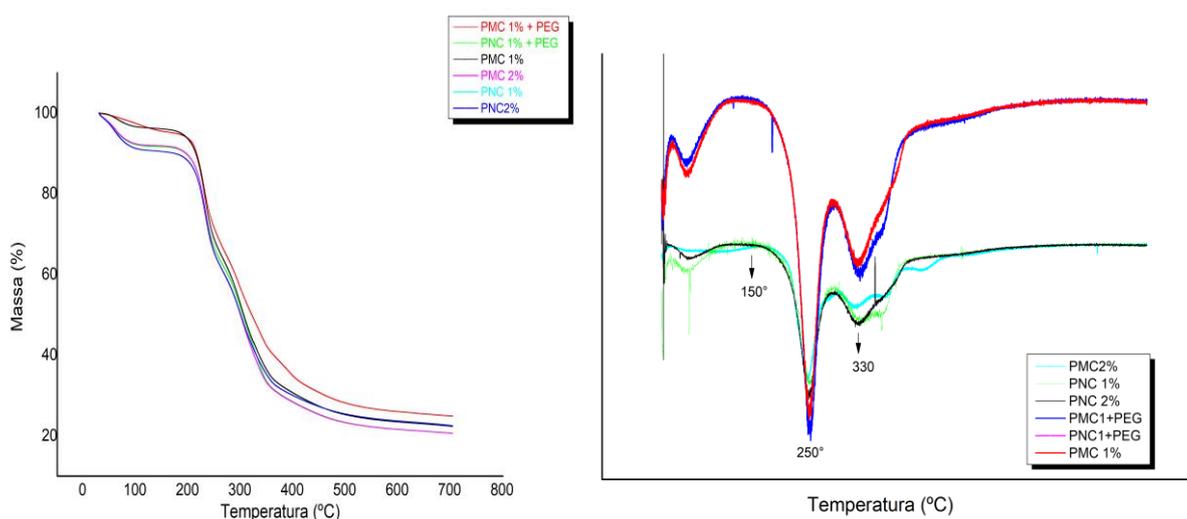


Figura 38 – Curvas de análise Termogravimétrica e suas Derivadas dos géis. Fonte:

Próprio Autor



4.2.3 – Análises de Reometria dos Géis

Segundo CANEVAROLO JR, S, (2006) a definição de viscoelasticidade é quando o polímero apresenta características de um fluido e de um sólido elástico ao mesmo tempo. A fração elástica da deformação aparece devido a variações do ângulo e a distância de ligação entre os átomos da cadeia polimérica. Já a fração plástica ocorre devido ao atrito entre as cadeias poliméricas. Assim, as amostras foram submetidas à reometria para analisar a capacidade viscoelástica dos géis produzidos em diferentes formas, tais como: Fase elástica (G') com o módulo de armazenamento versus tensão de oscilação, Viscosidade versus taxa de cisalhamento e módulo de armazenamento versus frequência angular. Da mesma forma, a fase viscosa (G'') dos géis também foi analisada com o módulo de perda versus tensão de oscilação, viscosidade versus taxa de cisalhamento e módulo de perda versus frequência angular.

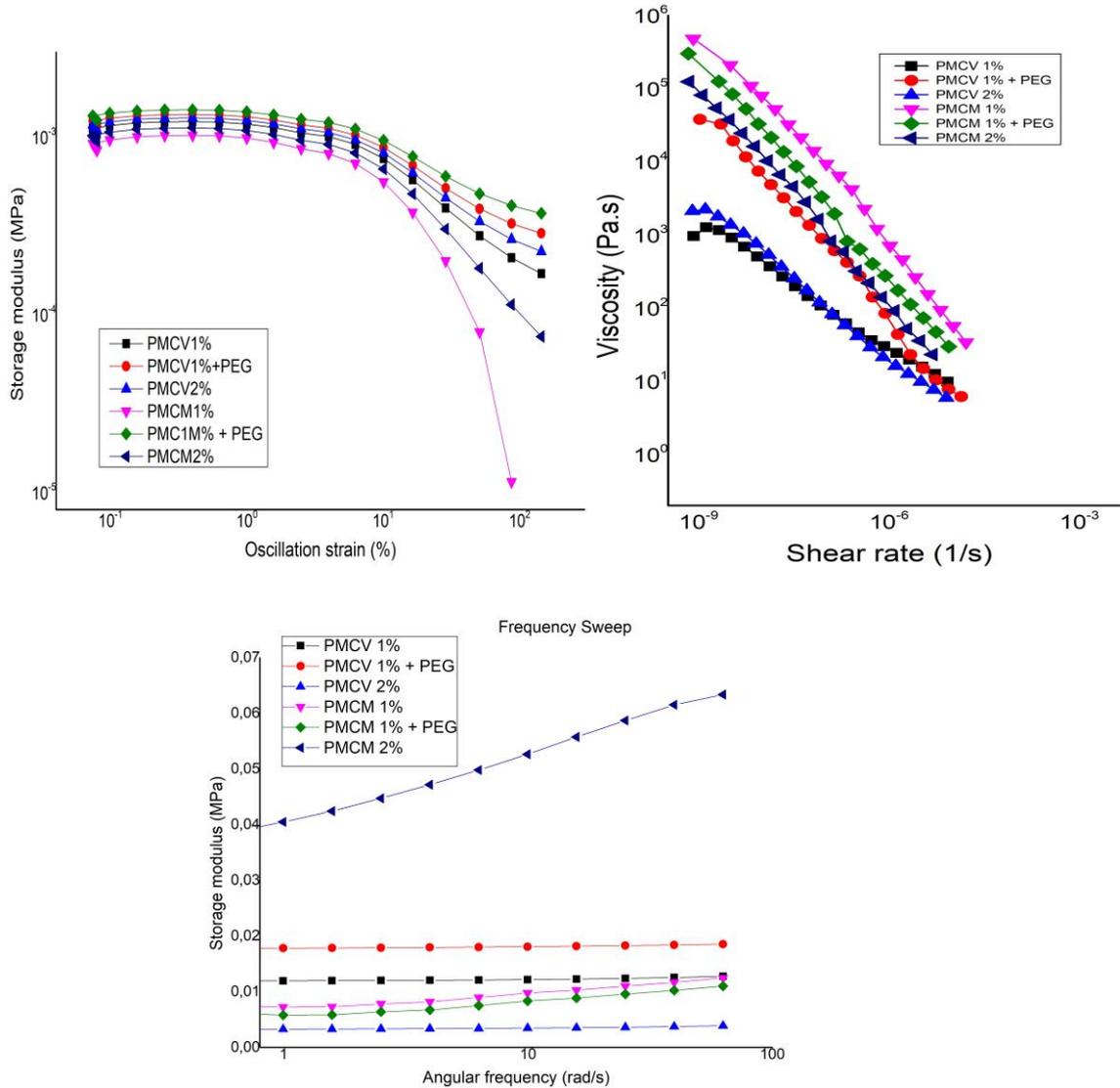
Os resultados dos **módulos de armazenamento por tensão de oscilação** são demonstrados na figura 39. As amostras de Pectm /MCm 1%, Pectm/MCm/PEG, Pectm/MCm 2% mantiveram o mesmo comportamento, ou seja, conforme aumenta a tensão de oscilação diminui-se a elasticidade das amostras. Apenas as amostras de Pectm /MCm 1% e Pectm/MCm 2% demonstraram comportamento distintos das demais, resultando em comportamento elástico menor que as demais.

O resultado da **viscosidade por taxa de cisalhamento** foi realizado nas amostras dos géis para conhecer a natureza fluida dos materiais, pois a viscosidade não é constante e varia conforme a taxa de cisalhamento. A viscosidade é a resistência interna de um material quando ele é submetido ao fluxo. A viscosidade decrescente de todas as amostras em relação à taxa de cisalhamento mostra o comportamento de afinamento de cisalhamento das amostras. À medida que a taxa de cisalhamento aumenta, ocorre a quebra e o desenrolamento das cadeias poliméricas, o que facilita o deslizamento de uma cadeia polimérica sobre a outra. Portanto, a viscosidade do meio diminui com o aumento da taxa de cisalhamento correspondendo a um comportamento não newtoniano pseudoplástico como vistos na figura correspondente. (figura 39)

Já os resultados entre **módulo de armazenamento por frequência angular** na determinação da elasticidade demonstra comportamento linear em quase todos os



géis, já para Pectm/MCm 2% demonstrou uma elevação da elasticidade conforme aumenta a taxa da frequência angular.



. Figura 39 – Resultados das curvas de (G') representando as propriedades elásticas dos géis. Fonte: Próprio Autor

A figura 40 mostra os resultados das análises do módulo de perda dos géis. Iniciando pela análise de **módulos de perda por tensão de oscilação** é destacado que todos os géis mantiveram o mesmo comportamento, isto é, conforme aumenta a tensão de oscilação, aumenta a viscosidade seguida por uma queda brusca, demonstrando também um comportamento elástico, sendo classificado como comportamento viscoelástico.



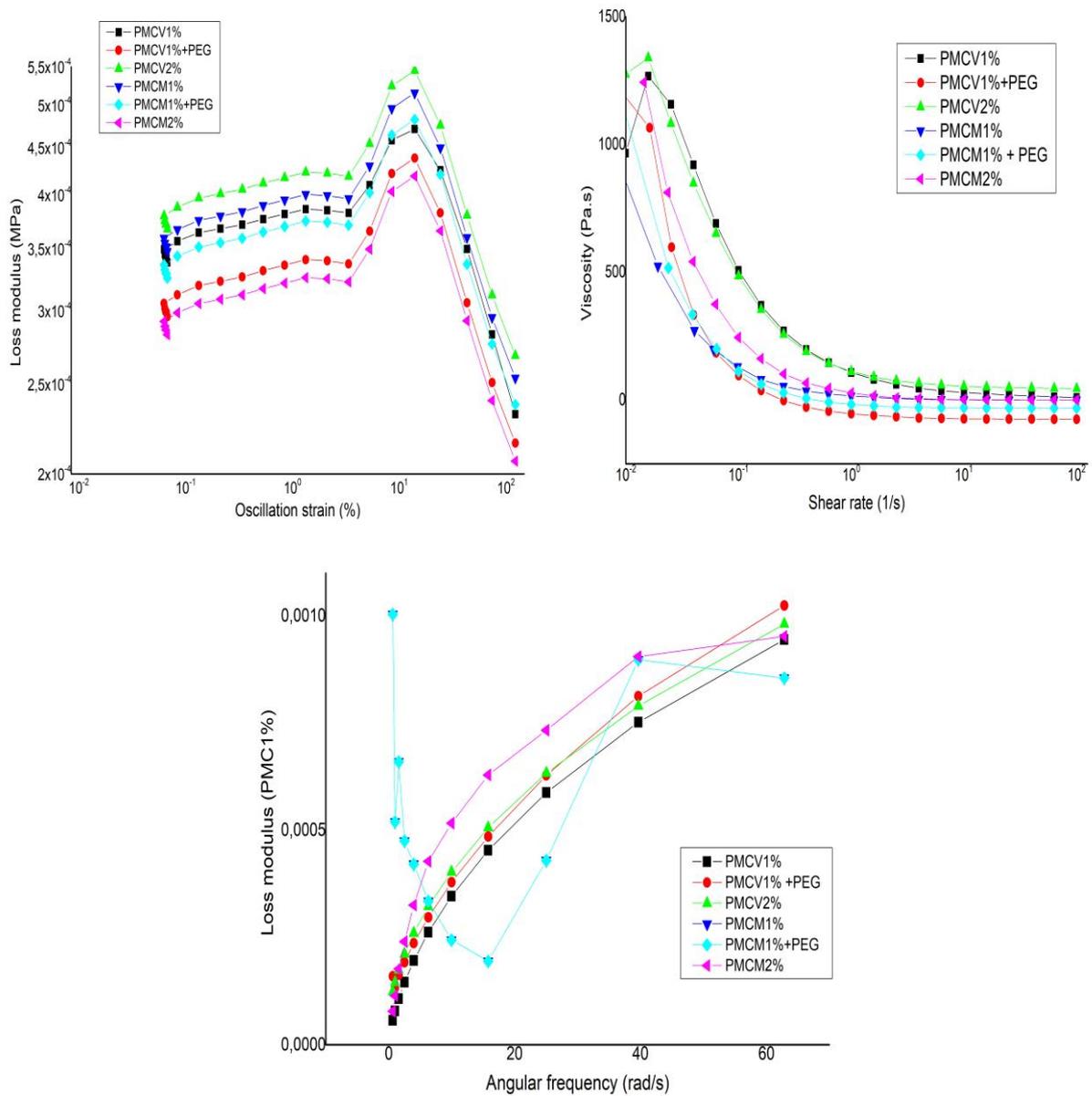
O resultado da **viscosidade por taxa de cisalhamento**, também obteve um comportamento decrescente, a viscosidade do meio diminui com o aumento da taxa de cisalhamento correspondendo a um comportamento não-newtoniano pseudoplástico como visto na figura 40.

Já os resultados entre **módulo de armazenamento por frequência** angular na determinação do caráter viscoelástico demonstra aumento em quase todos os géis, já para Pectm/MCm1% demonstrou uma queda seguida do aumento da curva conforme a taxa da frequência angular aumenta, desta forma, pode-se inferir que a amostra de Pectm/MCm1% possui um comportamento viscoelástico comparado com os demais géis que demonstram comportamento viscoso.

ARAÚJO (2017) reporta em sua pesquisa que a alternância dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') com a frequência oscilatória, fornece informação sobre o caráter viscoelástico das blendas. Géis nos quais $G' > G''$ são caracterizados como géis elásticos e o inverso $G' < G''$ os caracteriza como géis viscosos.

Além disso, os autores referem que os fluidos pseudoplásticos sofrem diminuição de viscosidade quando a taxa de deformação aumenta. Ocorre modificação da estrutura de cadeias longas de moléculas diminuindo a resistência ao escoamento.

Desta forma, Júnior (2019) conclui que o comportamento viscoelástico é importante para a bioimpressão, visto que, este comportamento indica que o escoamento será gerado somente por forças externas fazendo com que o gel flua facilmente pelo bico de extrusão. O autor refere ainda que esse tipo de material é desejável, pois, o objeto deve-se manter a sua forma evitando assim o colapso do material após a impressão.



. Figura 40 – Resultados do módulo de perda (G'') representando as propriedades viscosas dos géis. Fonte: Próprio Autor

4.2.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV – Géis

Para caracterizar a superfície dos géis desenvolvidos á base de pectina, microcelulose da manga e microcelulose vegetal foram realizadas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes tamanhos com o objetivo de visualizar as estruturas e morfologia das blendas.



1) Pectm/MCm1% + PEG

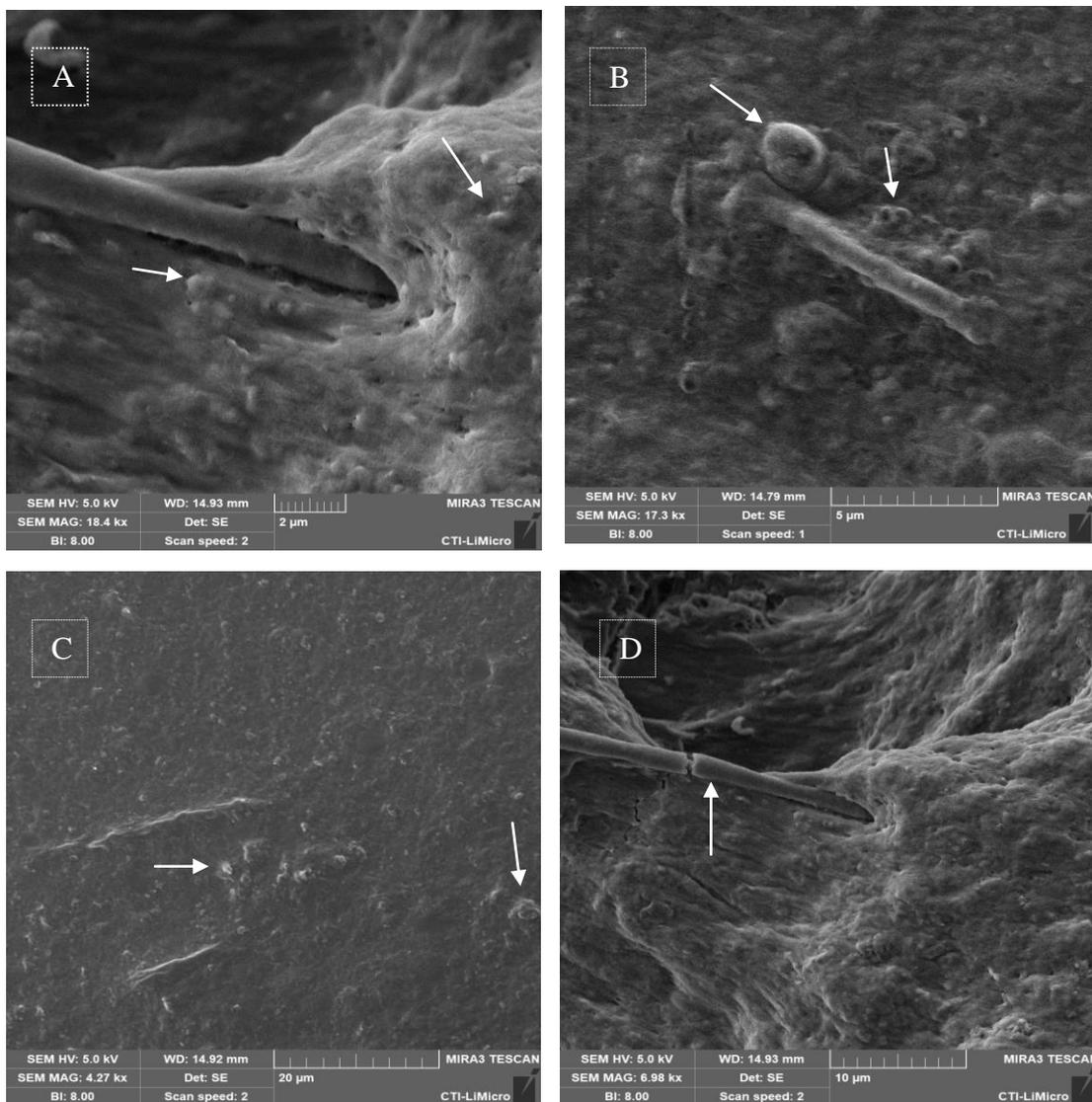


Figura 41 – MEV dos géis de Pectm/MCm1%+PEG em (a) 2µm, (b) 5µm, (c) 10µm e d) 20µm Fonte: Próprio autor.

Na figura 41, pode-se observar a homogeneização do gel, além de alguns fragmentos de grânulos de pectina indicados pelas setas em todas as imagens. Além disso, na figura C (20 µm) observa-se uma estrutura uniforme lisa e compacta sem grandes defeitos. Outrossim, na figura D observa-se uma fibra alongada inferindo uma estrutura da celulose em escala micrométrica, além de uma ordenação mais viscosa devido ao acréscimo de PEG na formulação.



ANDRADE (2010), em sua pesquisa com hidrogéis de pectina, amido e microfibras de celulose, obteve resultados similares em sua microscopia eletrônica de varredura, encontrando grânulos de amido e pectina inferindo-se a destruturação incompleta desses materiais pelo misturador.



2) Pectm/MCm 1%

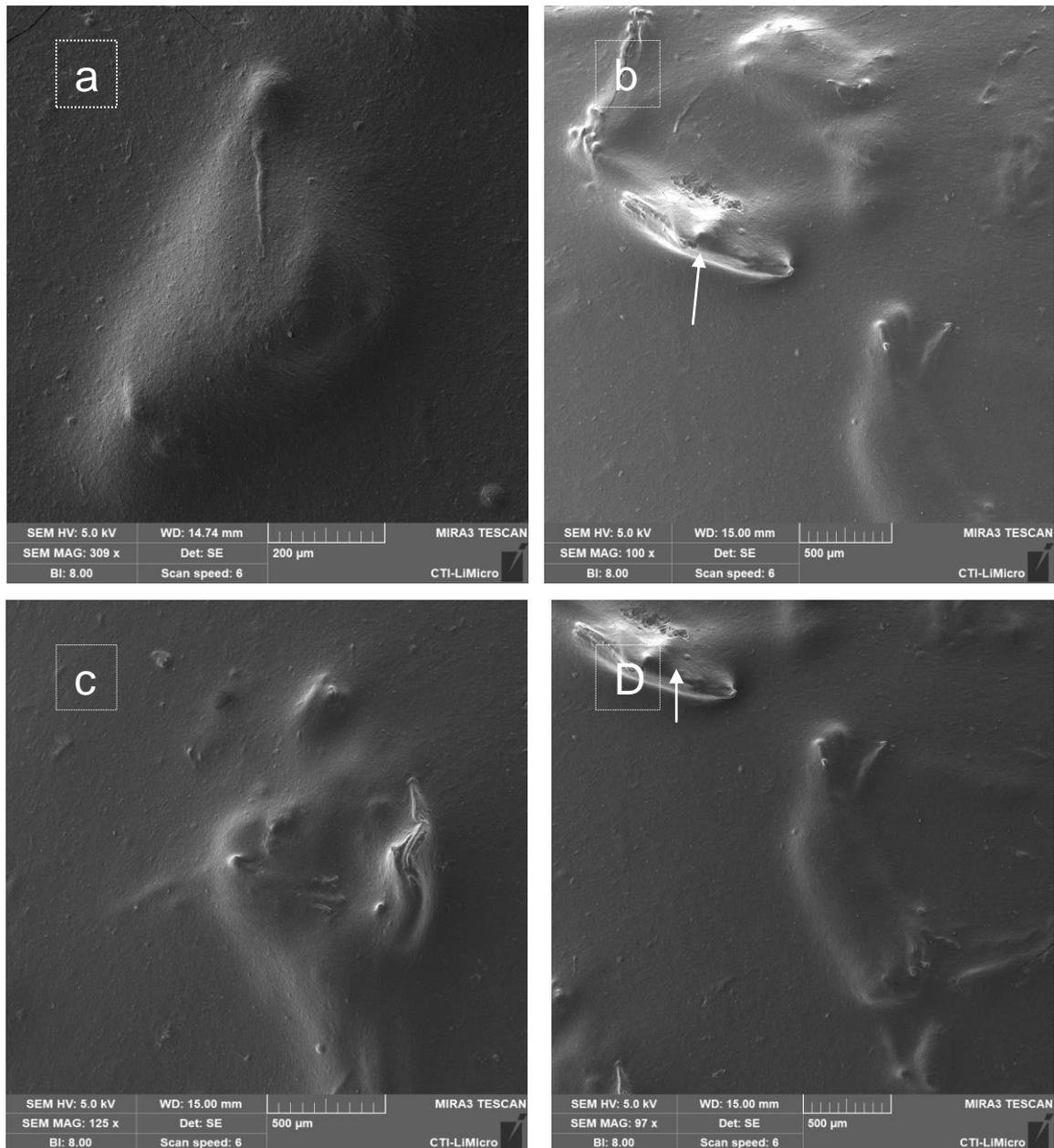


Figura 42 – MEV do gel de Pectm/MCm 1% em (a) 200µm, (b) 500µm, (c) 200µm e (d) 500µm Fonte: Próprio autor.

Na figura 42, a MEV do gel de Pectm/MCm 1%, destaca uma estrutura lisa e homogênea, sem grandes defeitos e assimetrias. Os pontos demarcados pelas setas referem-se a um maior contraste com interação entre átomos mais pesados.



3) Pectm/MCm2%

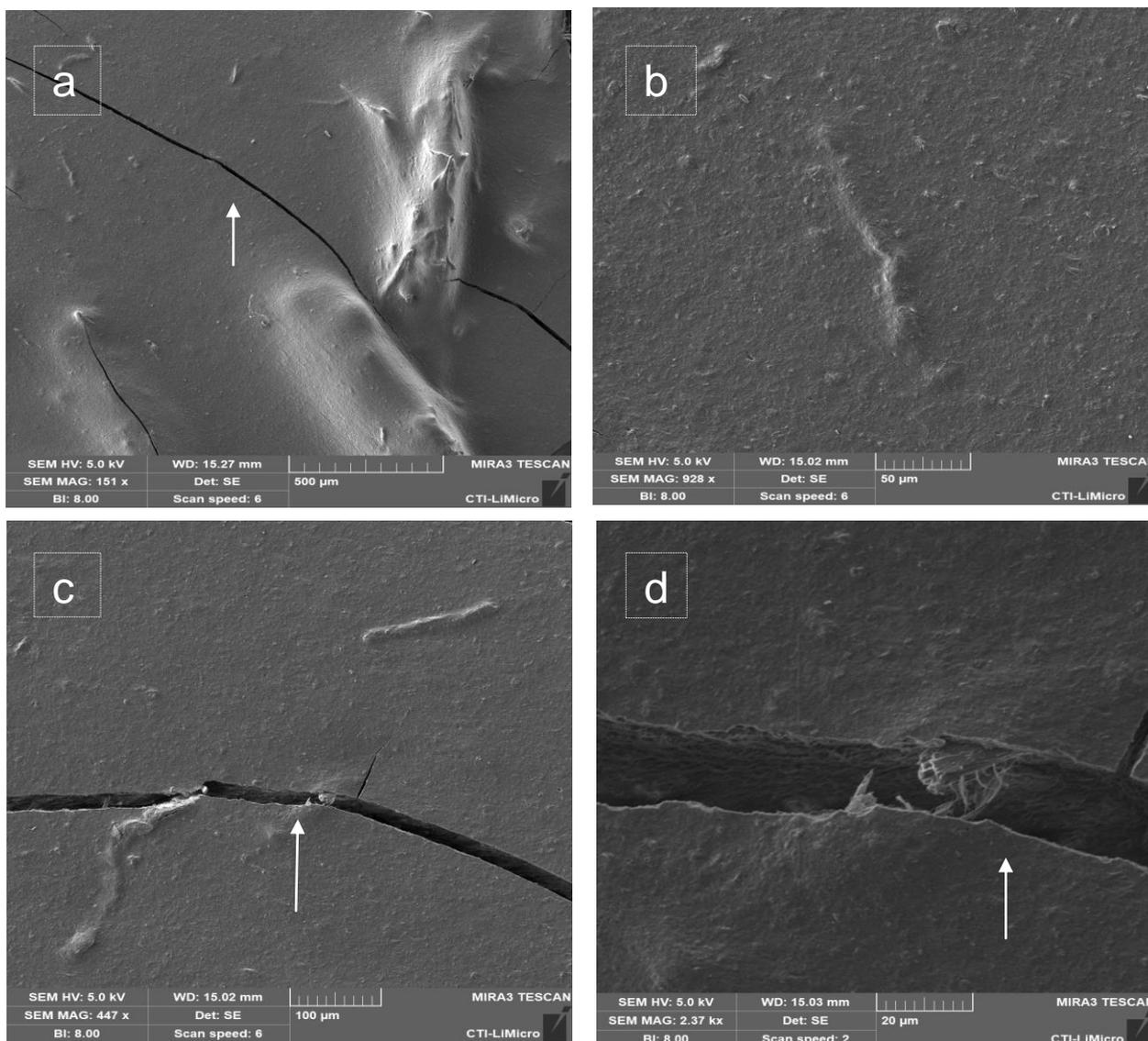


Figura 43 – MEV do gel de Pectm/MCm2% em (a) 20 μ m, (b) 50 μ m, (c) 100 μ m e (d) 500 μ m. Fonte: Próprio autor.

Na figura 43, a MEV do gel de Pectm/MCm2%, destaca-se por uma estrutura lisa e homogênea em diferentes escalas, com presença de fissuras demarcados pelas setas. Importante destacar que essas fissuras não foram observadas em imagens dos outros géis produzidos.



4) Pectm/MCv 1%

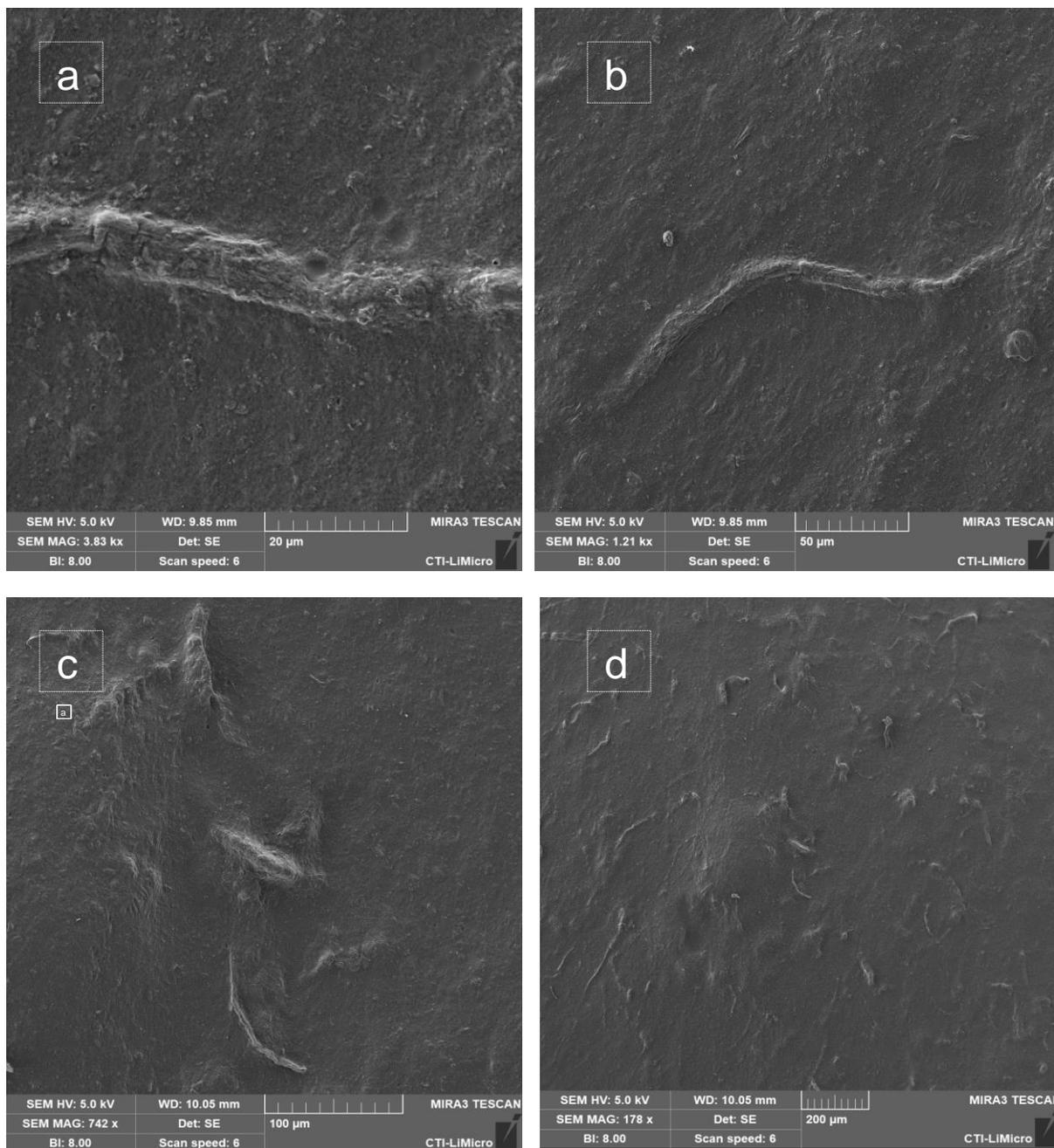


Figura 44 – MEV dos géis de Pectm/MCv 1% em (a) 20µm, (b) 50µm, (c) 100µm e (d) 200µm. Fonte: Próprio autor.



5) Pectm/MCv 2%

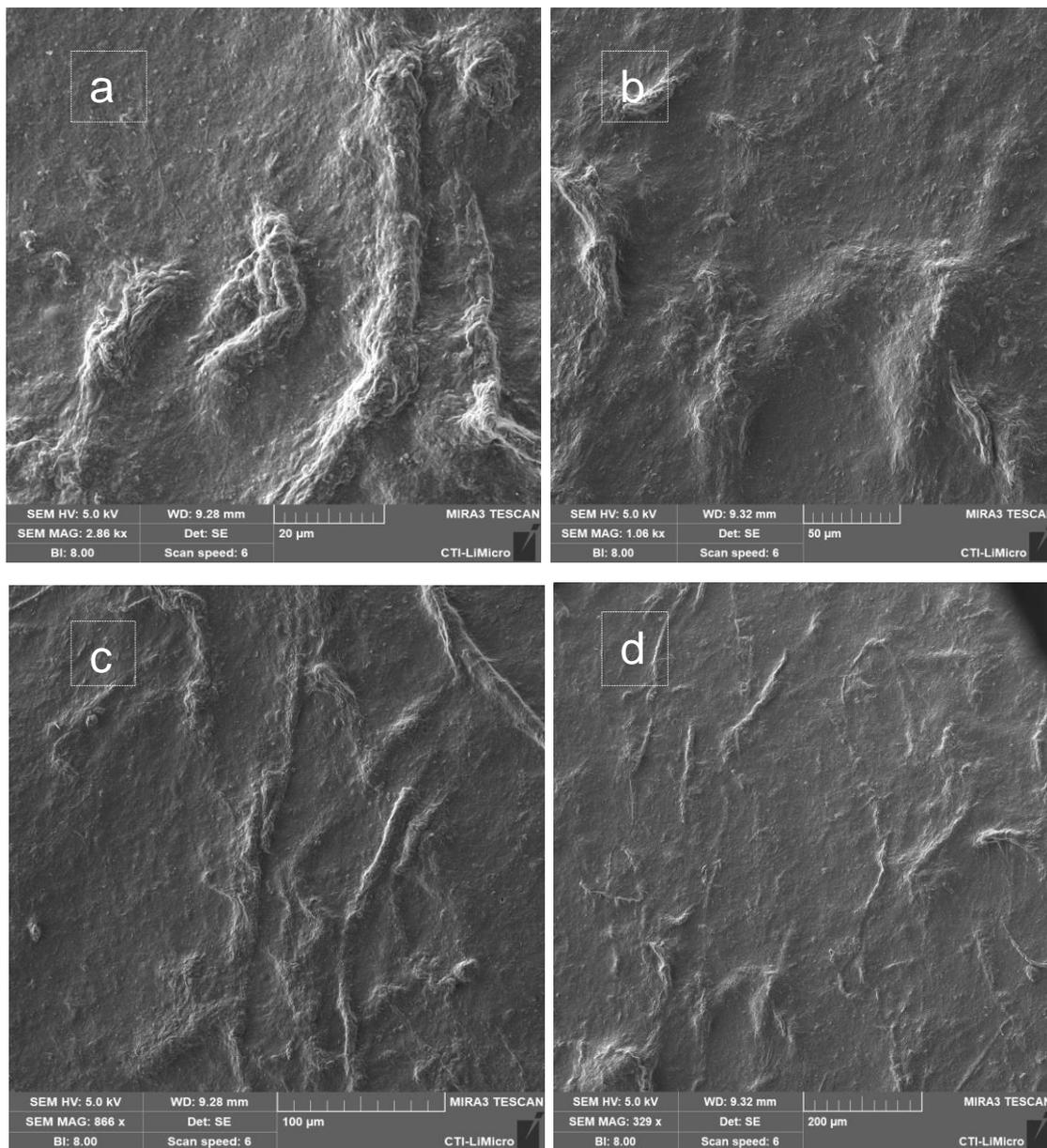


Figura 45 – MEV dos géis de Pectm/MCv 2% em (a) 20 μm , (b) 50 μm , (c) 100 μm e (d) 200 μm . Fonte: Próprio autor.

Na figura 45, é demonstrado a MEV do gel de Pectm/MCv 2%, destaca-se por uma estrutura lisa e homogênea nas diferentes escalas sem muitos defeitos, apresentado poucas irregularidades em sua superfície.



6) Pectm/MCv + PEG

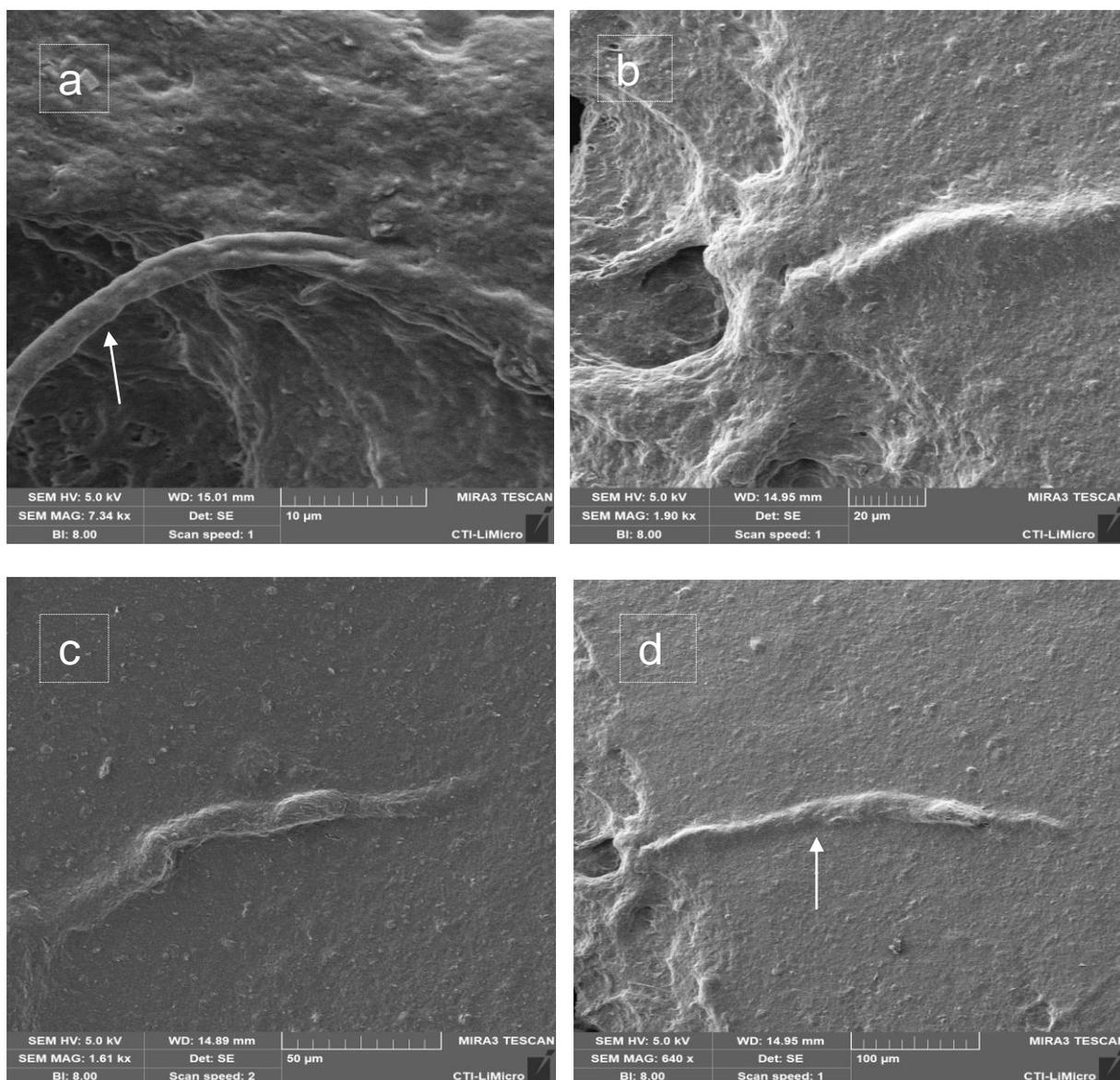


Figura 46 – MEV dos géis de Pectm/MCv + PEG em (a) 10 μm, (b) 20 μm, (c) 50 μm e (d) 100 μm. Fonte: Próprio autor.

Na figura 46, é demonstrada a MEV do gel de Pectm/MCv + PEG, que se caracteriza por uma estrutura lisa e homogênea nas diferentes escalas sem muitos defeitos, com poucas irregularidades. É importante destacar a presença de fibras em sua superfície resultando na alteração do acréscimo de PEG à composição do gel. Vale



ressaltar que apenas os dois géis com PEG em sua composição apresentaram esse comportamento.

Segundo CAPANEMA (2018), essa homogeneidade dos hidrogéis com PEG é resultado do seu poder de miscibilidade, hidrofiliçidade e formação de cadeia polimérica através de ligações de hidrogênio.

VITÓRIA (2020) afirma que o acréscimo de PEG em hidrogéis causa um “relaxamento das tensões decorrentes da longa cadeia” tornando-os mais elásticos e denso.



Capítulo 5 – Conclusões

- As análises dos resultados térmicos mostram valores elevados de deformação sendo possíveis as aplicações médicas, visto que, não são necessárias altas temperaturas para tal aplicação;
- As análises de DRX mostraram um predomínio de regiões mais amorfas em relação às cristalinas.
- O FTIR demonstrou os grupamentos químicos reconhecendo os materiais orgânicos presentes nos géis.
- O ensaio de citotoxicidade dos materiais constatou viabilidade celular adequada para uso combinados com células humanas.
- Pelos resultados de reologia, os hidrogéis produzidos demonstraram ser mais viscosos do que elásticos, demonstrando viabilidade para diversas aplicações.

De acordo com esses resultados, podemos reconhecer esses géis de Microcelulose da manga, microcelulose vegetal e pectina da manga, viáveis para uso em aplicações médicas, como potenciais biomateriais de aplicação na medicina regenerativa e bioimpressão.



Sugestões para Trabalhos futuros

As seguintes sugestões de trabalhos são apresentadas para complementar este trabalho de mestrado:

- Preparação de modelos digitais 3D de *Scaffold*;
- Realizar testes de “printabilidade” dos hidrogéis produzidos;
- Imprimir modelos 3D de *scaffolds*;
- Testar a viabilidade celular dos scaffolds impressos;
- Testes *in vivo* de implantação dos scaffolds celularizados.



REFERÊNCIAS

AIRES et al. Brazilian Journals of Business Indústria 4.0: a manufatura aditiva como ferramenta de inovação e otimização Industry 4.0: additive manufacture as an innovation and optimization tool. n. 3, p. 1821–1833, 2019.

ALESSI, J. 濟無No Title No Title No Title. **Suparyanto dan Rosad (2015)**, v. 5, n. 3, p. 248–253, 2020.

ALVES, A. L. Universidade Federal De Uberlândia Reaproveitamento Do Caroço De Manga : Um Estudo De Viabilidade Da Pirólise Usando Energia Solar Reaproveitamento Do Caroço De Manga : Um Estudo De. 2015.

ANA C. F. DE OLIVEIRA, HÉLIO F. R. FERRETO*, D. F. P. E A. B. L. Estudo Comparativo De Dois Métodos De Análise De Cristalinidade , Raios-X E Dsc , Usando O Polietileno Linear De Baixa Densidade (Pebdl) Injetado , Irradiados Por Radiação. **Anais do 13º Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2015.

ANDRADE, J. R. D. E. Eletrólitos poliméricos géis à base de pectina. p. 157, 2010.
ANDRITSOU, V. et al. Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources. **ACS Omega**, v. 3, n. 8, p. 10365–10373, 2018.

ARAÚJO. MANUFATURA ADITIVA E SUAS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 173–180, 2021.

ARAÚJO, M. V. D. R. E A. M. S. Comportamento reológico e de textura de géis de Fécula de Araruta (*Maranta arundinaceaea L.*) , Mandioca (*Manihote sculenta Crantz*) e Amido Milho (*Zea mays*) Comportamento reológico e de textura de géis de Fécula de Araruta (*Maranta arundinaceaea L.* . 2017.



BATISTA, P. S. P. Nova abordagem terapêutica para a regeneração do Osso. p. 1–136, 2013.

BAZÁN BARBA, R. Y.; DOS SANTOS, N. a Bioeconomia No Século Xxi: Reflexões Sobre Biotecnologia E Sustentabilidade No Brasil. **Revista de Direito e Sustentabilidade**, v. 6, n. 2, p. 26, 2020.

BRITES, M. D. E. M. Desenvolvimento de membranas de nanofibras a base de acetato de celulose do bagaço de cana-de-açúcar produzidas por eletrofiação para a incorporação de enzimas. p. 114, 2015.

CANEVAROLO JR, S, V. la dos. **Artliber**, v. 1, p. 277, 2006.

CANTERI, M. H. G. et al. Pectin: From raw material to the final product. **Polimeros**, v. 22, n. 2, p. 149–157, 2012.

CARLA, F.; SOUZA, B. D. E. Campinas 2018. 2018.

CAROLINO, S. A. Estimativa Do Percentual De Cristalinidade De Polímeros Semicristalinos Derivados da Anilina Através dos padrões de Difração de Raios X. p. 1–64, 2017.

CLARO, P. I. C. FILMES DE NANOCRISTAIS E NANOFIBRILAS DE CELULOSE DE EUCALIPTO E ABACAXI (CURAUÁ) POR CONTINUOUS CASTING. p. 1–14, 2017.

CORDEIRO, E. M. S. et al. APROVEITAMENTO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DA MANGA NA OBTENÇÃO DE COMPÓSITOS E NANOCOMPÓSITOS PROCESSADOS VIA Parte Experimental. p. 10–13, 2010.

COSTA, A. Síntese e caracterização de partículas de acetato de celulose, a partir do caroço de manga, para produção de matrizes de liberação controlada de drogas. p. 1–70, 2010.



CUNHA, I. F. ANÁLISE TÉRMICA E PIRÓLISE ANALÍTICA DE SABUGO DE MILHO. **Kaos GL Dergisi**, v. 8, n. 75, p. 147–154, 2020.

CURVELLO, R.; RAGHUWANSHI, V. S.; GARNIER, G. Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 267, p. 47–61, 2019.

DE SOUSA, A. L. N. et al. Modificação química da pectina do melão caipira (Cucumis melo VAR. acidulus). **Quimica Nova**, v. 40, n. 5, p. 554–560, 2017.

DO NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido cartilaginoso. **Polimeros**, v. 26, n. 4, p. 360–370, 2016.

DUARTE, P. R. DA C. Impressão 3D de Polímeros Biocompatíveis. 2018.

EVARISTO, T. C. Thaiane Cristine Evaristo Avaliação histológica e funcional do enxerto de neotraqueia de coelho desenvolvido por bioengenharia. 2015.

FARIAS, S. S. et al. Biopolímeros: Uma alternativa para promoção do desenvolvimento sustentável. **Revista Geonorte**, v. 7, n. 26, p. 61–77, 2016.

KÉRZIA, C.; ARAÚJO, C. DE. Cynthia Kérzia Costa de Araújo. 2016.

LEVIN, G. et al. Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos. **Genética na Escola**, v. 14, n. 1, p. 26–33, 2019.

MACHADO, B. A. S. et al. Obtenção de nanocelulose da fibra de coco verde e incorporação em filmes biodegradáveis de amido plastificados com glicerol. **Quimica Nova**, v. 37, n. 8, p. 1275–1282, 2014.



MACHINSKI, K. D. V. et al. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO POLÍMERO ACETATO DE CELULOSE A 1 INTRODUÇÃO Atualmente , a busca de alternativas para preservar o meio ambiente e agregar valor aos resíduos industriais e urbanos está aumentando significativamente . A conversão de resíduos lig. n. October, 2018.

NÁDIA SUELI VIEIRA CAPANEMA. Title: Design, Síntese e Caracterização de Hidrogéis e Nanocompósitos de Carboximetil Celulose com incorporação de Nanopartículas de Prata e Fármaco Doxorrubicina para Potencial Aplicação na Regeneração Epitelial: Estudos in vitro de Atividade Antibacteri. **Photosynthetica**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2018.

PINHEIRO, A. P. F. S. Estudo de Cartilagem Impressa em 3D para Próteses. **Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universi- dade NOVA de Lisboa**, 2019.

QUINTELA, L. M. L. et al. Impressão 3D para a Engenharia Tecidual Resultados e Discussão. p. 20396, 2018.

RIBEIRO, K. C. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE POLIPROPILENO COM PECTINA CÍTRICA. Title. **Implementation Science**, v. 39, n. 1, p. 1–24, 2014.

SANTOS, C. M. DO R.; GRAÇA, D. C. S. DA; CARDOSO, G. Obtenção de substância surfactante a partir da modificação de celulose. **Scientia Plena**, v. 12, n. 8, 2016.

SHAHI, N. et al. Eco-friendly cellulose nanofiber extraction from sugarcane bagasse and film fabrication. **Sustainability (Switzerland)**, v. 12, n. 15, p. 1–15, 2020.

SOUZA, E. E. Síntese e caracterização de membranas de celulose regenerada a partir da celulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar para produção de cuprofane. p. 71, 2009.

SOUZA, L. O. Caracterização Reológica E Morfológica De Nanocelulose Da Casca De Cacau Para Aplicação No Desenvolvimento De Filmes **Uesb.Br**, 2021.



TRAVALINI, A. P. et al. Nanocelulose de elevada cristalinidade extraída da fibra do bagaço de mandioca. **O Papel**, v. 77, n. 1, p. 73–80, 2016.

UTZERI, G. Desenvolvimento de biogéis de pectina e quitosano para a sorção de Cymoxanil. **Universidade de Coimbra Departamento de Química**, 2018.

VÁZQUEZ, V. J. U. Maestría en Ciencias Aplicadas. 2020.

VITÓRIA, M. S. Caracterização de géis de ácido hialurônico reticulados com polietileno glicol diglicidil éter e butanodiol diglicidil éter com indicações na odontologia. **Kaos GL Dergisi**, v. 8, n. 75, p. 147–154, 2020.

WILTGEN, F. Protótipos E Prototipagem Rápida Aditiva - Sua Importância No Auxílio Do Desenvolvimento Científico E Tecnológico. n. August 2019, 2019.

ZANETTE, R. et al. ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE IN VITRO DAS NANOFIBRAS DE. p. 681–684, [s.d.].



Apêndices

Apêndice A – Cálculo da porcentagem de cristalinidade e difratogramas com áreas amorfas e cristalinas.

Através dos difratogramas abaixo, foi possível identificar as partes cristalinas e amorfas utilizando o software Origin Pro 9.0 (figuras A, B, C, D, E, F) representado microcelulose, microfibras de celulose e pectina respectivamente. Outrossim, a área de cristalinidade, área amorfa e a porcentagem de cristalinidade foram calculados de acordo com a figura 1 exemplificado abaixo.

$$W (\%) = \frac{(\text{área dos picos cristalinos})}{(\text{área de todo o espectro})} \times 100$$

Fórmula para cálculo da porcentagem de cristalinidade. Fonte: Ana C. F. de Oliveira, Hélio F. R. Ferreto, 2015)

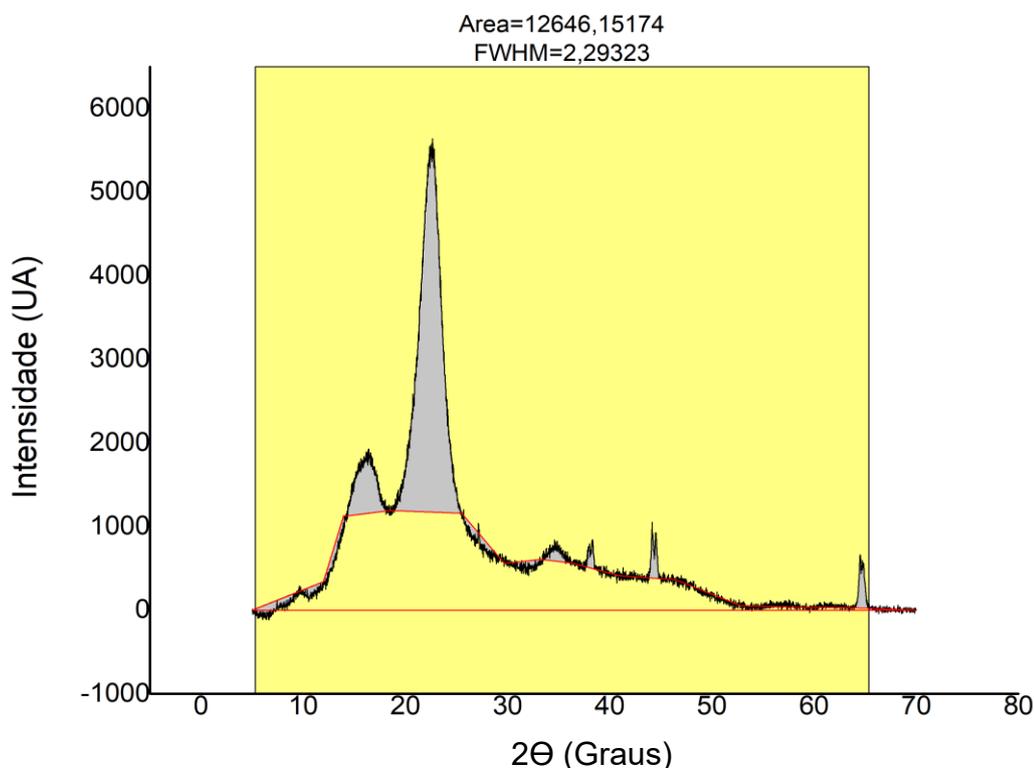


Figura A – Área cristalina da microcelulose representada pela cor cinza nos picos cristalinos e área amorfa demarcada pelo traço vermelho. Fonte: Própria

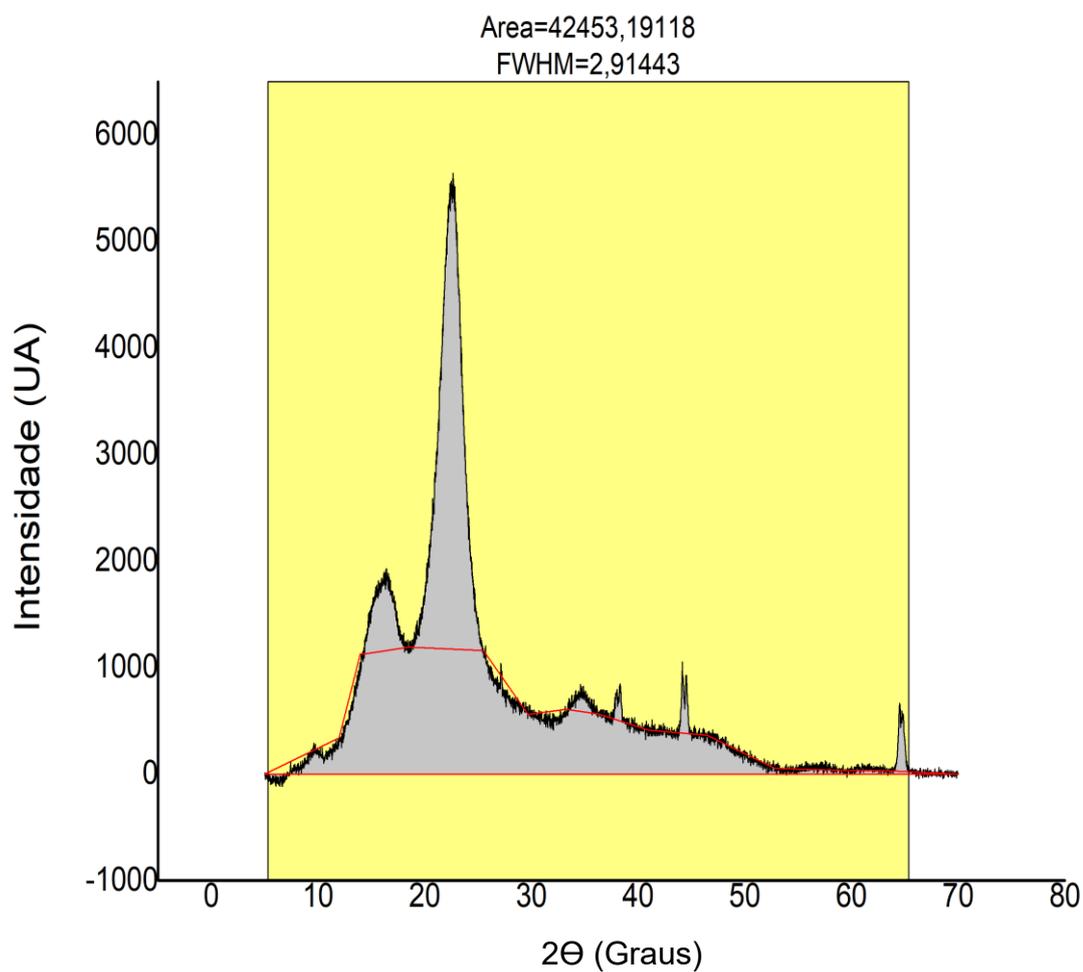


Figura B – Área total do difratograma da microcelulose representada pela cor cinza.
Fonte: Própria.

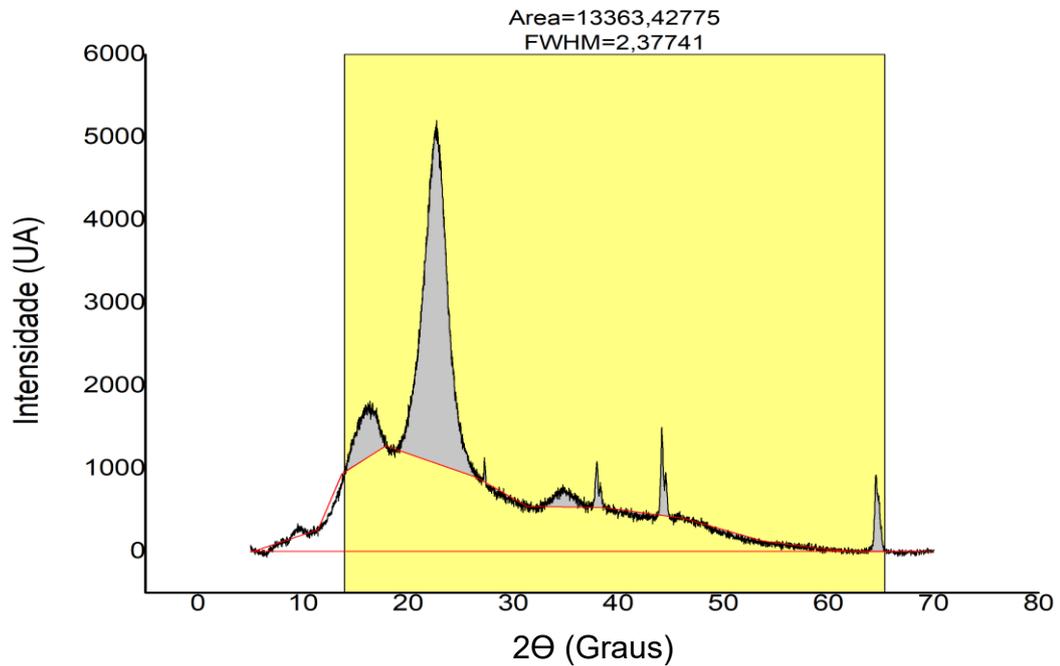


Figura C – Área cristalina das microfibras de celulose representada pela cor cinza nos picos cristalinos e área amorfa amarela demarcada pelo traço vermelho. Fonte: Própria.

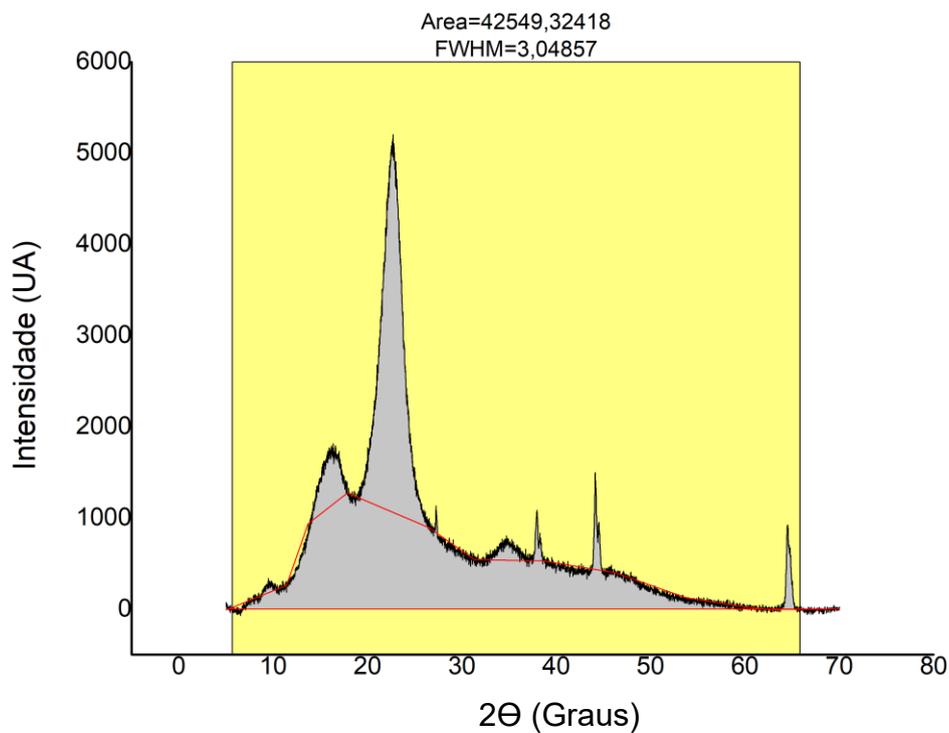


Figura D – Área total do difratograma da microcelulose representada pela cor cinza. Fonte: Própria.

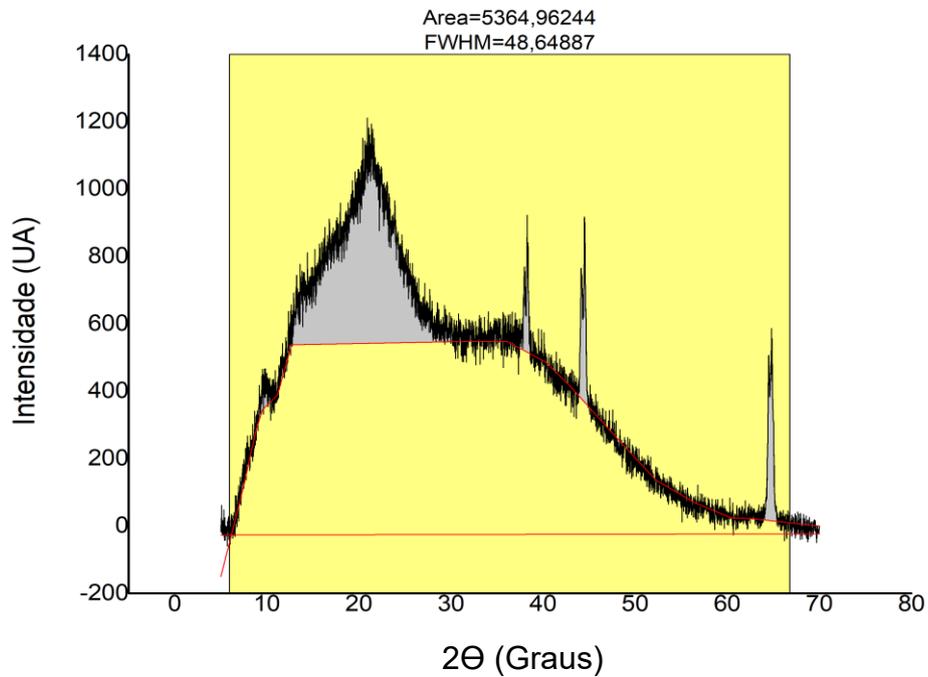


Figura E – Área cristalina pectina representada pela cor cinza nos picos cristalinos e área amorfa amarela demarcada pelo traço vermelho. Fonte: Própria.

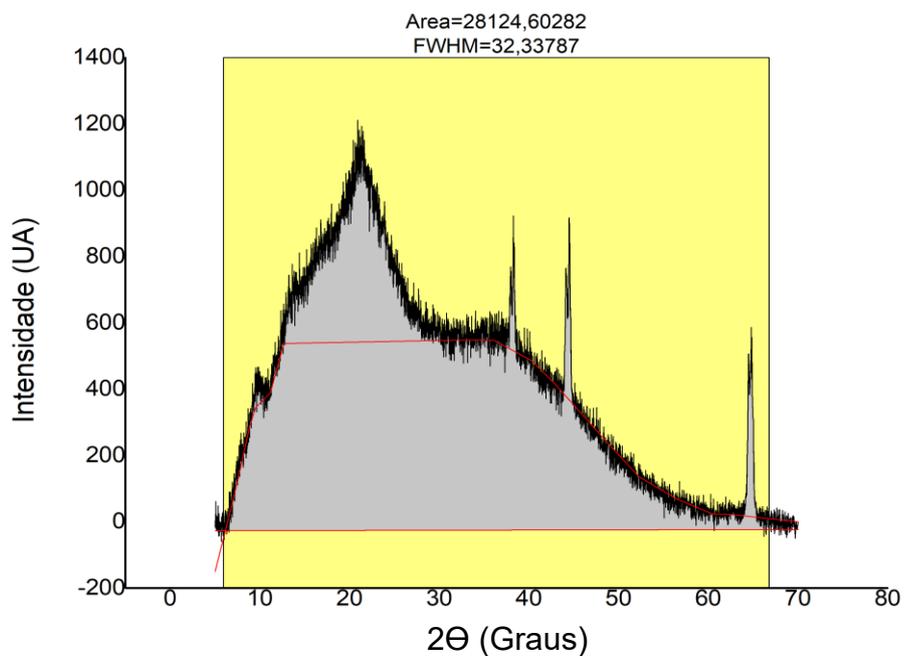


Figura F– Área total do difratograma da microcelulose representada pela cor cinza. Fonte: Própria.



	Área Total	Área Cristalina	Área Amorfa	Índice %
Microcelulose	42.453,19118	12.646,15174	29.807,0394	29,78
Microfibras	42.549,32418	13.363,42775	29.184,8964	31.40
Pectina	28.124,60282	5.364.96244	22.7596404	19,07

Tabela A - Cálculo da cristalinidade de acordo com a área cristalina e área total de cada amostra. Fonte: Própria



Apêndice B – Cálculos do Grau de polimerização

Amostra	Solvente							
Tempo da amostra (s)	42							
Tempo solvente (s)	42							
Concentração (g/mL)	0,005							
Amostra	Sol./água							
Tempo da amostra (s)	31							
Tempo solvente (s)	31							
Concentração (g/mL)	0,005							
Amostra	nanocelulos		η_r	η_{sp}	η	M	DP	
Tempo da amostra (s)	79	nanocelulos	2,5	1,5	1,6	31492,91	194,401	
Tempo solvente (s)	31							
Concentração (g/dL)	0,5							
Amostra	nanofibras		η_r	η_{sp}	η	M	DP	
Tempo da amostra (s)	74	nanofibras	2,4	1,4	1,4	28667,05	176,957	
Tempo solvente (s)	31							
Concentração (g/dL)	0,5							
Amostra	pectina		η_r	η_{sp}	η	M	DP	
Tempo da amostra (s)	165	pectina	5,3	4,3	3,3	70722,98	436,562	
Tempo solvente (s)	31							
Concentração (g/dL)	0,5							
Amostra	Celulose V		η_r	η_{sp}	η	M	DP	
Tempo da amostra (s)	1501	Celulose V	48,4	47,4	13,2	331991,5	2049,33	
Tempo solvente (s)	31							
Concentração (g/dL)	0,5							