

COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE HIDROGÉIS NANOCOMPÓSITOS DE NANOCELULOSE E PECTINA COM FOCO EM IMPRESSÃO TRIDIMENSIONAL

Rafael Abboud Azoubel

UNICAMP, BRAZIL, rafaazoubel@gmail.com

Marcos Akira d'Ávila

UNICAMP, BRAZIL, madavila@fem.unicamp.br

INTRODUÇÃO

Hidrogéis são estruturas tridimensionais formados por polímeros hidrofílicos, reticulados ou não, e que são capazes de absorver uma grande quantidade de água em sua estrutura. A capacidade da celulose de formar hidrogel, sua alta disponibilidade na natureza e possibilidade de utilização em medicina regenerativa fizeram com que esse polímero recebesse bastante atenção nos últimos anos. A pectina, que já era um polímero natural muito usado na indústria alimentícia, se mostrou uma ótima alternativa para uso em hidrogéis com foco em medicina regenerativa, já que é um material proveniente de plantas. No presente trabalho, hidrogéis nanocompósitos de cristais de nanocelulose (CNC) e pectina foram formulados, estudados quanto seu comportamento reológico e printabilidade em uma impressora tridimensional visando aplicação em engenharia tecidual e medicina regenerativa. Primeiramente, os comportamentos reológicos das soluções separadas de pectina e CNC foram analisados para que se pudesse, posteriormente, ver as mudanças ocorridas pela combinação dos dois materiais como um hidrogel. Os hidrogéis de CNC com pectina foram preparados em água com diferentes concentrações, tanto de pectina quanto de CNC, caracterizados reologicamente e, após análise do comportamento reológico, foram definidas as tintas mais promissoras. Elas foram submetidas a testes de impressão tridimensional para definir a printabilidade de cada uma. Os testes reológicos das tintas mostraram comportamento pseudoplástico (*shear thinning*) na varredura de viscosidade e, também, apresentaram comportamento predominantemente elástico ($G' > G''$), comportamento desejável para impressão tridimensional. A capacidade da tinta de gerar filamentos foi avaliada e fotos tiradas com a ajuda de um microscópio acoplado à impressora. As tintas ideais foram testadas a partir da formação de *scaffolds* com 10, 20 e 50 camadas. Ao final a tinta 3:10 wt.% pectina/CNC foi definida como a tinta ideal, comprovando os valores numéricos obtidos experimentalmente. Após a definição da tinta ideal, a reticulação do material foi testada quanto ao tempo de reticulação e propriedades reológicas usando uma tinta não reticulada como controle. O tempo de reticulação não mostrou influência significativa nos testes reológicos. A estrutura impressa da tinta ideal se mostrou com boa

resolução, até com 50 camadas, o que confirma a printabilidade da tinta de pectina/CNC.

METODOLOGIA

Os polímeros utilizados foram a pectina de baixa esterificação (Sigma-Aldrich, Lote SLBS8828, GA 83%, DE 7.7%) e nanocristais de celulose (CNC) (CelluForce, Lote C1A20003). Além disso, foi usada uma solução de CaCl_2 2% wt.% para reticulação pós impressão e uma solução de NaOH 1M para ajuste do pH da solução de pectina.

Pectina em diferentes concentrações, 1, 3 e 5 wt% e nanocristais de celulose 5, 10 e 15 wt% foram colocados, separadamente, para agitar usando agitadores magnéticos até completa dissolução em água deionizada. No caso da nanocelulose, um vortex foi utilizado para realizar a completa dissolução do pó. NaOH 1M é usado para regular o pH da solução de pectina até chegar em aproximadamente 7. Após ambos estarem completamente homogêneos, a solução de pectina é adicionada à de nanocelulose e a mistura é feita por meio do vortex e, também, manualmente, até completa homogeneização.

As caracterizações reológicas das tintas formuladas foram realizadas utilizando um Reômetro Compacto Modular Anton-Paar MCR-102 (Figura 3.2), usando a geometria cone-placa (CP50-1) com 50mm de diâmetro, ângulo de 0.9815 e truncamento de $97 \mu\text{m}$. Os ensaios de viscosidade foram realizados com taxas de cisalhamento variando de 0.1 a 10.000 s^{-1} . Os testes de amplitude foram realizados a uma frequência angular de 10 rad.s^{-1} com uma tensão de cisalhamento de 0.01 a 100% para obtenção da faixa de viscosidade linear (LVE), tendo um resultado de $\gamma_0 = 1\%$ para todas as amostras. A varredura de frequência foi realizada com uma faixa de frequência angular de 0.1 a 1.000 rad.s^{-1} para amostras sem a reticulação, e de 0.1 a 100 rad.s^{-1} para as amostras reticuladas. Como último teste, a tixotropia de três intervalos (3ITT) foi realizada a fim de analisar a recuperação da viscosidade da tinta, durante o intervalo de descanso inicial, uma baixa taxa de cisalhamento de 1 s^{-1} foi aplicada por um período de 25 s, seguido por um súbito aumento da taxa para 100 s^{-1} por 50 s e, por fim, de volta a 1 rad.s^{-1} por 200 s. Todos os ensaios foram feitos em triplicata para assegurar que os dados obtidos eram

confiáveis. Não foi necessário pré-cisalhamento para a realização dos testes mencionados acima.

Os testes de impressão da tinta foram realizados usando a impressora 3DCloner Lab. Para os parâmetros de impressão, foi usado o software Repetier-Host V2.1.3. Foram feitos filamentos em diferentes velocidades de impressão e diferentes fatores de extrusão, bem como altura de camadas e tamanho dos *scaffolds*, para que assim se pudesse chegar nos parâmetros ideais para a tinta. A formação de filamentos foi analisada usando um microscópio óptico acoplado à impressora. Os filamentos foram produzidos através de uma agulha de precisão cônica 20G com tamanho da ponta da agulha de 0,61mm, adquiridas pela Nordson EFD, acoplada a uma seringa descartável de 10 mL. Antes de realizar a impressão, a seringa é centrifugada a 4000 rpm por um período de 5 minutos em uma centrífuga Kasvi K14-4000 para eliminar bolhas que possam atrapalhar durante o percurso da agulha. Após o acoplamento da seringa ao cabeçote, é feita uma extrusão prévia para garantir a presença de material na ponta da agulha.

REFERENCIAL TEÓRICO

Atualmente, a manufatura aditiva vem obtendo grande destaque devido à sua extensa gama de possibilidades, inclusive na engenharia de tecidos. Dentre as técnicas de impressão 3D aplicadas em engenharia de tecidos e bioimpressão, destaca-se a impressão por extrusão. Na bioimpressão por extrusão, tintas são colocadas em seringas plásticas descartáveis e, então, administradas pneumática ou mecanicamente em substratos estéreis. Ao aplicar pressão, biotintas viscosas saem como filamentos cilíndricos com diâmetros dependentes da agulha (MATAI et al., 2020). Para que sejam aptos à impressão por extrusão, os hidrogéis devem ter propriedades reológicas específicas para garantir o processo de deposição do material e garantir a integridade do *scaffold* após a impressão. Especificamente, esses devem apresentar comportamento viscoso altamente pseudoplástico e características viscoelásticas semissólidas, para que possam manter a estrutura tridimensional durante e após a impressão (MARKSTEDT et al., 2015). Hidrogéis nanocompósitos são estruturas poliméricas tridimensionais incorporadas com

nanopartículas ou nanoestruturas que ajudam a reforçar a estrutura do hidrogel e fornecer funções bioativas desejáveis (YUAN et al., 2020). Na impressão por extrusão, a associação de polímeros com nanopartículas permite o desenvolvimento de formulações de tintas com propriedades reológicas adequadas para impressão.

Em termos gerais, a nanocelulose é definida como material celulósico que possua pelo menos uma de suas dimensões (diâmetro, largura ou comprimento) na escala nanométrica. Nanocristais de celulose (CNCs) são considerados materiais em potencial para solucionar múltiplos problemas de materiais já existentes (ZHOU et al., 2019). Se derivadas de fontes de biomassa, possuem um comprimento de 100-200 nm e seções transversais de 5-10 nm (AZIZI SAMIR; ALLOIN; DUFRESNE, 2005). O termo pectina engloba um número de polímeros que variam de acordo com as respectivas massas molares, configurações químicas e teor de açúcares neutros. Ela, juntamente com a celulose, são os principais polissacarídeos estruturais que compõem células de plantas, sendo que a pectina é o fator determinante na flexibilidade da parede celular, uma vez que pode ser altamente hidratada. Além da biodegradabilidade e citocompatibilidade, ela possui uma capacidade de reticulação relativamente fácil, a depender do grau de esterificação. Hidrogéis de pectinas com baixo grau de esterificação (abaixo de 50%) possuem um mecanismo de reticulação similar ao do alginato, formando hidrogéis iônicos na presença de cátions bivalentes ou multivalentes quem podem ter aplicação na engenharia de tecidos (BANKS et al., 2017; RADHAKRISHNAN et al., 2017; WILLATS; KNOX; MIKKELSEN, 2006).

Nesse trabalho, hidrogéis compostos de pectina e CNC serão fabricados, testados reologicamente, impressos tridimensionalmente e reticulados para avaliação de suas propriedades pré e pós impressão e reticulação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho foram promissores. As curvas de viscosidade obtidas no reômetro foram modeladas de acordo com o modelo de viscosidade de Ostwald-de Waele (lei de potência) e, assim, os ajustes numéricos nos deram uma prévia de quais seriam as tintas ideais para usar na impressão. Nos testes de frequência,

todas as amostras mostraram comportamento do tipo sólido ($G' > G''$). Por fim, o último ensaio reológico, a tixotropia em 3 intervalos, mostrou que há recuperação do gel após uma alta taxa de cisalhamento, mas que essa recuperação não é de 100%. As impressões das tintas afirmou como ideal a tinta contendo 3% de pectina e 10% de CNC, que já era esperado pelo cálculo da lei de potência. Sua impressão se mostrou com uma ótima definição e não houve colapso nem com a impressão de 50 camadas de tinta. A reticulação do material mostrou melhoria nas propriedades do material e o processo de reticulação se mostrou independente do tempo, tendo o mesmo resultado com 30s de reticulação e com 10 minutos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir de todas as análises reológicas e de impressão tridimensional, tanto das soluções de pectina/CNC separadas quanto das tintas, permitiu uma análise interessante sobre como há interação entre os dois materiais. A pectina sozinha se comporta de um modo diferente de quando está junto com o CNC e, na mesma linha, o CNC junto com a pectina mostra comportamentos um pouco distintos do que quando está em solução. A pectina em solução, quando falamos em viscosidade, possui, claramente, um *plateau* Newtoniano considerável, o que não é visto nas análises reológicas das tintas. Além disso, nas varreduras de frequência, a tinta se mostra totalmente no aspecto de comportamento tipo sólido ($G' > G''$), resultado desejado para a impressão tridimensional. Quanto à reticulação da tinta, foi identificada uma independência dos resultados obtidos em relação ao tempo de reticulação, um ponto positivo para o caso de uso de células na tinta.

No quesito de printabilidade, os testes mostraram que há a formação de filamento nas tintas testadas porém, nem todas conseguem ter uma fidelidade de impressão durante todo o procedimento, sendo assim, a tinta P3C10 foi definida como a tinta ideal, comprovando os valores obtidos experimentalmente. Conforme os testes de impressão foram sendo realizados, as velocidades de impressão de extrusão mostraram ter grande influência em todo o processo e na fidelidade de impressão. As estruturas impressas, *scaffolds*, mantiveram sua estrutura, quando imersas em PBS, por mais de 7 dias,

mesmo com grande número de camadas confirmando, portanto, a printabilidade das tintas de pectina e CNC.

Para trabalhos futuros, recomenda-se a inclusão de células na tinta, formando uma biotinta para testar os parâmetros de impressão e viabilidade celular. Além disso, fazer os estudos com PBS ao invés de água é uma mudança interessante, uma vez que o PBS é usado para as células.

Palavras-chave: Hidrogéis nanocompósitos, biopolímeros, impressão tridimensional, reologia, nanocristais de celulose, pectina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP, ao meu orientador Marcos Akira d'Ávila, às minhas companheiras de laboratório e grandes amigas Jéssica e Ingri e à CAPES pelo financiamento dessa pesquisa e possibilidade de contribuir com a ciência do país.

REFERÊNCIAS

AZIZI SAMIR, M. A. S.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 612–626, 2005.

BANKS, A. et al. Novel bioprinting method using a pectin based bioink. **Technology and Health Care**, v. 25, n. 4, p. 651–655, 2017.

MARKSTEDT, K. et al. 3D bioprinting human chondrocytes with nanocellulose-alginate bioink for cartilage tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 5, p. 1489–1496, 2015.

MATAI, I. et al. Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. **Biomaterials**, v. 226, n. June 2019, p. 119536, 2020.

RADHAKRISHNAN, J. et al. Injectable and 3D Bioprinted Polysaccharide Hydrogels: From Cartilage to Osteochondral Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 1, p. 1–26, 2017.

WILLATS, W. G. T.; KNOX, J. P.; MIKKELSEN, J. D. Pectin: New insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 17, n. 3, p. 97–104, 2006.

YUAN, W. et al. Bisphosphonate-based nanocomposite hydrogels for biomedical applications. **Bioactive Materials**, v. 5, n. 4, p. 819–831, 2020.

ZHOU, S. et al. Decahedral nanocrystals of noble metals: Synthesis, characterization, and applications. **Materials Today**, v. 22, n. February, p. 108–131, 2019.