Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química

Biocompósitos de goma gelana dopada com Eu^{3+} e nanocristais de celulose para impressão 3D

Francisco Recco Torres

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

Ribeirão Preto
2022

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-graduação em Química

Biocompósitos de goma gelana dopada com Eu^{3+} e nanocristais de celulose para impressão 3D

Francisco Recco Torres

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Almeida Caiut

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Torres, Francisco Recco

"Biocompósitos de goma gelana dopada com Eu^{3+} e nanocristais de celulose para impressão 3D" Ribeirão Preto, 2022.

103 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientador: Caiut, José Maurício Almeida

1. Biomateriais. 2. Lantanídeo. 3. Luminescência

Torres, F. R. **Biocompósitos de goma gelana dopada com Eu^{3+} e nanocristais de celulose para impressão 3D.** 2022. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: Caio Gomide Otoni Instituição: UFSCar
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra.: Molíria Vieira dos Santos Instituição: UNESP
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: José Mauricio Almeida Caiut Instituição: FFCLRP-USP
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho aos meus pais Rosa e Ronaldo por sempre incentivarem os meus estudos e tornarem todo esse caminho possível.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Código Financiamento 001).

Agradeço primeiramente aos meus pais Rosa e Ronaldo, por desde o início incentivarem os estudos e darem todo o suporte em todas as etapas da minha vida, por acreditarem que a educação pode mudar o mundo e por formarem a pessoa que sou hoje, este trabalho é fruto de tudo isso.

Agradeço também ao Prof. Dr. José Maurício Almeida Caiut por ter dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, desde os primeiros anos de graduação. Também pelos ensinamentos, desde aulas até as discussões de laboratório, pela orientação deste trabalho de mestrado e pelas conversas e amizade construídas nesse caminho.

O agradecimento se estende ao Prof. Dr. Hernane S. Barud por colaborar ativamente com este trabalho, desde a discussão de ideias até o suporte com materiais e equipamentos em seu laboratório. Agradeço também o Prof. Dr. Victor Hugo V. Sarmento da Universidade Federal de Sergipe pelo auxílio no tratamento dos dados de reologia.

Muito obrigado aos amigos do grupo NanoLum: Douglas, Elô, Euzane, Fernando, Izabela, João, Larissa, Letícia, Luan, Pedro, Roberta e Tatiana pela companhia e aprendizados durante esse período. De uma maneira especial, Elô, Pedro e Roberta, que além de enriquecer a minha formação no ambiente de pesquisa, também se tornaram grandes amigos, além de ajudarem na revisão deste trabalho.

Aos colegas do grupo BioPolMat da Uniara, Alessandra, Laura, Lucas, Mayte e Vitória por sempre serem receptivos no laboratório parceiro, como também pelo auxílio nas análises de reologia e nos testes de impressão 3D. Ao Renan e ao Cassamo pela assistência nos testes de tensão no Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Unesp de Araraquara.

Aos grandes amigos que fiz nessa universidade Bárbara, Bruna, Cubas, Douglas, Harley, Hiago, Isabela, Lucas, Newton, Osvaldo, Quenon, Shifu e Soneca, com os quais dividi experiências inestimáveis nesse período da minha vida. Aos meus companheiros de apartamento Alex e Rick por me acolherem nesse período.

Àqueles membros das famílias Recco e Torres que incentivaram e apoiaram o estudo em todas as etapas da minha vida e ainda o fazem, assim como todos as professoras e professores que fizeram parte da minha formação.

Aos colegas do laboratório parceiro MaterLumen, além dos técnicos e funcionários do Departamento de Química por manterem em funcionamento o lugar em que trabalhamos.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade de concluir mais essa etapa e à FAPESP pelo apoio em projetos do grupo.

A todos o meu muito obrigado!

However difficult life may seem, there
is always something you can do
and succeed at.

Stephen Hawking

Resumo

Torres, F. R. **Biocompósitos de goma gelana dopada com Eu^{3+} e nanocristais de celulose para impressão 3D.** 2022. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Este trabalho propôs a preparação e o estudo de nanomateriais compósitos de goma gelana (GG) dopada com íons Eu^{3+} e nanocristais de celulose (CNC) com propriedades favoráveis para a obtenção de estruturas tridimensionais por meio da técnica de impressão 3D. A GG é um polissacarídeo natural, resultado da ação de bactérias, que pode ser preparado na forma de gel como um biomaterial versátil e funcional, que se apresenta de duas formas distintas: a acetilada (HAGG) e desacetilada (LAGG), que produzem géis diferentes. Nesta dissertação, os estudos foram conduzidos com ambos os tipos. Devido à lacuna no estudo dessas matrizes associadas aos íons lantanídeos, grupo de elementos conhecidos por suas propriedades luminescentes específicas, as GGs foram dopadas com íons Eu^{3+}, possíveis de serem utilizados como sonda estrutural em análises espectroscópicas. Esse polissacarídeo reticula na presença de cátions pelo mecanismo de gelificação ionotrópica e, por conta disso, os íons Eu^{3+} alteraram gradativamente as propriedades viscoelásticas dos materiais, o que foi confirmado por estudos de reologia oscilatória. Este efeito foi mais pronunciado na forma LAGG, uma vez que o íon pôde manter gradativamente o comportamento de sua estrutura de gel quando um aumento na temperatura foi aplicado, diferente do observado em amostras não dopadas. O estudo espectroscópico dos filmes obtidos a partir dos géis mostrou uma baixa eficiência na transferência de energia entre as matrizes e o íon, contudo, revelou como a interação do íon Eu^{3+} com as GGs ocorre. A fim de se intensificar o processo de emissão nos materiais, o ligante β-dicetona TTA (2-tenoiltrifluoroacetona) foi adicionado aos filmes por meio de uma solução de acetona, formando um complexo com o Eu^{3+} na matriz. Esses resultados mostraram a possibilidade de se obter um material luminescente de alta intensidade de emissão com a GG, além de ter sido realizado um estudo estrutural inédito da matriz. Foi realizado então o reforço mecânico desse material com CNC, domínios cristalinos de fibras celulósicas isoladas por hidrólise ácida, neste caso extraídos de celulose bacteriana. As propriedades espectroscópicas do compósito GG-Eu^{3+} e CNC também foram exploradas e observou-se os íons sendo sensibilizados por excitação direta na matriz e perfis de emissão concordantes com o Eu^{3+} em um ambiente de baixa simetria. O estudo com o ligante TTA foi estendido ao compósito, obtendo-se também materiais com emissões intensificadas. A partir das interações com o íon lantanídeo, as propriedades fotônicas dos sistemas estudados se mostraram interessantes e, combinadas às atuais aplicações desses biomateriais, novos sistemas biocompatíveis podem ser desenvolvidos. As características mecânicas que o gel biocompósito apresentou foram favoráveis para a obtenção de estruturas tridimensionais por meio da impressão por extrusão na manufatura aditiva, visando uma aplicação deste material biocompatível na área de engenharia de tecidos.

Palavras-chave: biomateriais; polissacarídeo; lantanídeo; luminescência

Abstract

Torres, F. R. **Biocompósitos de goma gelana dopada com Eu^{3+} e nanocristais de celulose para impressão 3D.** 2022. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

This work proposed the preparation and study of composite nanomaterials of Eu^{3+}-doped gellan gum (GG) and cellulose nanocrystals (CNC) with favorable properties for obtaining three-dimensional structures through the 3D printing technique. GG is a natural polysaccharide, the result of the action of bacteria, which can be prepared in the form of a gel as a versatile and functional biomaterial, which comes in two different forms: acetylated (HAGG) and deacetylated (LAGG), which produce different gels. In this work, studies were conducted with both types. Due to the gap in the study of these matrices associated with lanthanide ions, a group of elements known for their specific luminescent properties, the GGs were doped with Eu^{3+} ions, which could be used as a structural probe in spectroscopic analyses. This polysaccharide cross-links in the presence of cations by the ionotropic gelation mechanism and, because of this, the Eu^{3+} ions gradually changed the viscoelastic properties of the materials, which was confirmed by oscillatory rheology studies. This effect was more pronounced in the LAGG form, since the ion could gradually maintain the behavior of its gel structure when an increase in temperature was applied, unlike that observed in undoped samples. The spectroscopic study of the films obtained from the gels showed a low efficiency in the energy transfer between the matrices and the ion, however, it revealed how the interaction of the Eu^{3+} ion with the GGs occurs. In order to intensify the emission process in the materials, the ligand β-diketone TTA (2-thenoyltrifluoroacetone) was added to the films through an acetone solution, forming a complex with Eu^{3+} in the matrix. These results showed the possibility of obtaining a luminescent material with high emission intensity with GG, in addition to having carried out an unprecedented structural study of the matrix. The mechanical reinforcement of this material was then carried out with CNC, crystalline domains of cellulosic fibers isolated by acid hydrolysis, in this case extracted from bacterial cellulose. The spectroscopic properties of the GG-Eu^{3+} and CNC composite were also explored, and the ions were observed to be sensitized by direct excitation in the matrix and emission profiles concordant with Eu^{3+} in a low symmetry environment. The study with the TTA ligand was extended to the composite, also obtaining materials with intensified emissions. From the interactions with the lanthanide ion, the photonic properties of the studied systems proved to be interesting and, combined with the current applications of these biomaterials, new biocompatible systems can be developed. The mechanical characteristics that the biocomposite gel presented were favorable for obtaining three-dimensional structures through extrusion printing in additive manufacturing, aiming at an application of this biocompatible material in the area of tissue engineering.

Key words: biomaterials; polysaccharide; lanthanide; luminescence

Lista de Figuras

Figura 1. (a) *Elodea canadensis*; (b) microscopia eletrônica de varredura e (c) microscopia eletrônica de transmissão de células *Sphingomonas elodea* cultivadas; (d) processo de fermentação laboratorial para a GG. Fontes: adaptado de Lee et al. [29] e Fialho et al. [27] 19

Figura 2. (Acima) estrutura química da unidade de repetição da GG nas formas HAGG e (abaixo) LAGG. Fonte: Bacelar et al. [11] 20

Figura 3. Ilustração do processo de gelificação da GG através da aglutinação de suas cadeias poliméricas, em um resfriamento com e sem a adição de cátions (círculos laranjas). Fonte: adaptado de Robinson et al. [32] e Miyoshi, et al. [33]. 21

Figura 4. Comparação esquemática da textura do gel de HAGG e LAGG com outros agentes gelificantes. Fonte: adaptado de Sworn e Stouby [24]. 22

Figura 5. Filmes de GG para regeneração óssea guiada eficaz: ferimentos após dois meses de início dos testes: (a) controle e (b) ferimento coberto com filme 2% GG. Fonte: adaptado de Chang, S-J. et al. [41]. 23

Figura 6. Estrutura química básica da celulose mostrando a sua unidade de repetição. Fonte: Siqueira et al. [50]. 25

Figura 7. Esquema ilustrativo mostrando as regiões cristalinas e amorfas da fibra de celulose. Fonte: adaptado de Silva et al. [52]. 26

Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica de suspensões diluídas mostrando as diferentes morfologias de CNCs de várias fontes de celulose: CNC de (a) madeira macia, (b) fibras de sisal, (c) celulose bacteriana e (d) celulose de tunicado hidrolisadas com ácido sulfúrico; CNCs produzidos por (e) ultrassom de nanofibrilas de celulose oxidada com (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil e (f) hidrólise de ácido fosfórico de algodão (f). Fonte: Vanderfleet e Cranston [47]. 28

Figura 9. (a) CB produzida em cultivo estático, (b) microscopia eletrônica de varredura da CB e (c) microscopia eletrônica de transmissão CNCs produzidos a partir de BC com uma combinação de H_2SO_4 e HCl. Fonte: adaptado de Huang et al. [66] e Vasconcelos et al. [43]. 29

Figura 10. Esquema mostrando as etapas principais da manufatura aditiva, desde a preparação do material, modelamento da geometria e obtenção de uma peça por deposição de camadas sucessivas de material. Fonte: adaptado de Daguano et al. [67] 31

Figura 11. Representação de géis com comportamentos reológicos diferentes entre fortemente elásticos e viscosos e suas consequências esperadas no processo de bioimpressão. Fonte: adaptado de Amorim et al. [75]. 32

Figura 12. Funções de distribuição radial para os orbitais 4f, 5s e 5p, no caso para o íon Nd^{3+} livre, ilustrando a natureza interna dos orbitais 4f. Fonte: Bünzli e Choppin [87]. 36

Figura 13. Níveis de energia calculados de íon lantanídeos trivalentes na faixa de energia até 40.000 cm^{-1}. Fonte: adaptado de Ma et al. [88]. 37

Figura 14. Representação com as principais perturbações que levam ao desdobramento dos níveis de energia dentro de uma configuração $4f^n$ dos lantanídeos. Fonte: adaptado de Sousa Filho et al. [91]..... 39

Figura 15. Níveis de energia do íon Eu^{3+} e suas transições eletrônicas. Fonte: adaptado de Syamchand e Sony [92]. 41

Figura 16. (a) estrutura química do ligante TTA e do (b) complexo hidratado formado com interação com o Európio, $Eu(TTA)_3.2\ H_2O$ e a (c) luminescência vermelha característica do complexo em pó. Fonte: (a) e (b) adaptados de Forster et al. [104] e (c) o autor. 44

Figura 17. Esquema de níveis de energia mostrando a transferência de energia do ligante para o íon lantanídeo. Fonte: adaptado de Binnemans [99]. 45

Figura 18. Bioimpressora EdBioPrinter. 51

Figura 19. Fotos dos géis de LAGG (a) puro e (b) dopado com 1% de Eu^{3+} à luz ambiente e com um feixe laser mostrando o espalhamento da luz. 53

Figura 20. Fotos dos géis de HAGG (a) puro e (b) dopado com 1% de Eu^{3+}. 53

Figura 21. Reograma de teste de varredura de amplitude a (a) 25 °C e (b) 37°C mostrando o G' (círculo preenchido) e G" (círculo delineado) ao longo da análise de **(I)** amostra LAGG_Eu2.0 (vermelho) comparando com o gel LAGG puro (preto) e **(II)** Amostra HAGG_Eu2.0 (azul) com o gel HAGG puro (preto). 56

Figura 22. Reogramas tan δ a (a) 25°C e (b) 37°C de amostras **(I)** LAGG e **(II)** HAGG, sendo elas pura (preto), _Eu0,1 (azul), _Eu0,2 (verde), _Eu0,5 (amarelo), _Eu1,0 (laranja) e _Eu2.0 (vermelho)..... 57

Figura 23. Reograma de teste de varredura de frequência mostrando o G' (círculos preenchidos) e G" (círculos delineados).com as amostras (a) *LAGG_Eu2.0* (25 °C - vermelho e 37 °C - laranja) e *LAGG puro* (25 °C - preto e 37 °C - cinza) e (b) *HAGG_Eu2.0* (25 °C - azul e 37 °C - ciano) e o *HAGG puro* (25 °C - preto e 37 °C - cinza)..... 59

Figura 24. Viscosidades complexas a (a) 25°C e (b) 37°C de amostras **(I)** LAGG e **(II)** HAGG, sendo elas pura (preto), _Eu0.1 (azul), _Eu0.2 (verde), _Eu0.5 (amarelo), _Eu1.0 (laranja) e _Eu2.0 (vermelho). 60

Figura 25. Reograma de teste de varredura de temperatura mostrando G' (pontos preenchidos) e G" (pontos vazios) ao longo da análise de amostras (a) LAGG e (b) HAGG, sendo elas puras (preto), _Eu0.5 (verde), _Eu1.0 (azul) e _Eu2.0 (vermelho)..... 61

Figura 26. Foto dos filmes de LAGG puro dopados com Eu^{3+}. Amostras (a) *LAGG_puro*, (b) *LAGG_Eu0.2*, (c) *LAGG_Eu1.0*, (d) *LAGG_Eu2.0_B* e (e*) LAGG_Eu4.0_B*. 63

Figura 27. Foto dos materiais de LAGG dopados com Eu^{3+} preparados mantendo o volume de água igual a 10 mL. Amostras (a) *LAGG_Eu2.0*, (b) *LAGG_Eu3.0*, (c) *LAGG_Eu4.0* e (d) *LAGG_Eu5.0*. 63

Figura 28. Foto dos filmes de HAGG puro dopados com Eu^{3+}. Amostras (a) *HAGG_puro*, (b) *HAGG_Eu0.2*, (c) *HAGG_Eu1.0*, (d) *HAGG_Eu2*.0 e (e) *HAGG_Eu4.0*..... 64

Figura 29. Espectro de absorção na região do UV-visível das amostras LAGG e HAGG puras (preto e azul) e dessas matrizes dopadas com 1% de Eu^{3+} (vermelho e verde, respectivamente). 65

Figura 30. Espectros de FTIR das amostras dos filmes (a) *LAGG0.5_puro* (preto); *LAGG0.5_Eu0.5* (azul) e *LAGG0.5_Eu2.0* (vermelho). (b) Espectros de FTIR das amostras dos filmes *HAGG0.2_puro* (preto); *HAGG0.2_Eu0.5* (azul) e *HAGG0.2_Eu2.0* (vermelho). 65

Figura 31. (a) Espectros de excitação (λ_{em} 612 nm) e (b) espectros de emissão (λ_{ex} 394 nm) de filmes (**I**) LAGG dopados com Eu^{3+} (% m/m, Eu^{3+}/GG) e (**II**) HAGG dopados com Eu^{3+} (% m/m, Eu^{3+}/GG). 67

Figura 32. (a) Espectros de excitação (λ_{em} 612 nm) e (b) espectros de emissão em λ_{ex} 275 nm (preto), 330 nm (vermelho), 394 nm (azul) e 464 nm (verde) dos filmes **(I)** LAGG_Eu2.0 e **(II)** HAGG_Eu2.0. 68

Figura 33. Curvas de tempo de vida (escala ln) das amostras (a) *LAGG_Eu2.0* e (b) *HAGG_Eu2.0* (linha preta – λ = 330 nm e linha vermelha – λ = 394 nm). 70

Figura 34. Interações entre cadeias de GG intermediada pelo íon Eu^{3+}. Fonte: adaptado de Tako et al. [130]. 72

Figura 35. Imagem do filme *LAGG_Eu1.0_TTA1* ilustrando a luminescência característica da emissão do complexo $Eu(TTA)_3$ no filme quando irradiado com um feixe de luz de comprimento de onda relativo à absorção do complexo. 73

Figura 36. (a) Espectro de excitação do filme *LAGG_Eu2.0_TTA1* monitorando a transição Eu^{3+} $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$. ($\lambda_{em}$ 611 nm) e (b) espectro de emissão em λ_{ex} 280 nm (preto), 320 nm (vermelho), 370 nm (azul) e 394 nm (verde). 74

Figura 37. Curvas de vida (escala ln) das amostras *LAGG_Eu2.0_TTA1* (λ = 280 nm - azul; λ = 370 nm - preto e λ = 394 nm - vermelho). 75

Figura 38. Espectro de emissão em λ_{ex} 370 nm de filmes *LAGG_Eu2.0_TTA0.25* (preto); *_TTA0.5* (vermelho); *_TTA1* (azul); *_TTA1.5* (verde) e *_TTA2* (roxo). 77

Figura 39. Suspensão de CNC a 1,35 mg/mL obtida com a hidrólise com os ácidos sulfúrico e clorídrico a partir de membrana de celulose bacteriana..... 78

Figura 40. Microscopia eletrônica de transmissão de suspensões de CNC nas concentrações de (a) 0,148 mg/mL e (b) 0,074 mg/mL, obtidos a partir da hidrólise ácida de membranas de celulose bacteriana. 79

Figura 41. Distribuição do (a) comprimento e (b) diâmetro dos nanocristais de celulose mensurados por meio da microscopia. 79

Figura 42. Espectros de absorção na região do UV-visível das amostras de *LAGG_pura* (preto), *LAGG_Eu1.0* (vermelho), *LAGG_Eu1_Wh1* (azul) e *LAGG_Eu1_Wh20* (verde). 81

Figura 43. (a) Espectros de excitação (λ_{em} 612 nm) e (b) espectros de emissão (λ_{ex} 394 nm) de filmes LAGG dopados com 1 % de Eu^{3+} e com adição de CNC na matriz (% m/m, CNC/GG) e (c) espectros de emissão da amostra *LAGG_Eu1_Wh1* em diferentes comprimentos de onda de excitação: 275 nm (azul); 317 nm (verde); 330 nm (laranja); 394 nm (vermelho) e 464 nm (rosa). 82

Figura 44. (a) Espectro de excitação (λ_{em} 612 nm) e (b) espectros de emissão com λ_{ex} em 280 nm (preto), 320 nm (azul), 355 nm (verde), 370 nm (roxo), 394 nm (vermelho) e 464 nm (laranja) da amostra LAGG_Eu1_Wh20_TTA e (c) espectros de emissão (λ_{ex} 394 nm) das amostras *LAGG_Eu1_Wh1_TTA* (preto); *_Wh5_TTA* (vermelho); *_Wh10_TTA* (azul) e *_Wh20_TTA* (verde). 84

Figura 45. Visualizações geradas pelo *software* de impressão Simplify3D do objeto modelo a ser impresso e a prévia da impressão dado pelo programa. 87

Figura 46. *Scaffolds* obtidos a partir de géis de LAGG com 1% de Eu^{3+} (m/m), em (a) condições padrão de impressão e (b) com os parâmetros otimizados. Visão superior (esquerda) e lateral (direita). 88

Figura 47. *Scaffolds* obtidos a partir de géis de HAGG com 1% de Eu^{3+} (m/m). Visão superior (a) e lateral (b). 89

Figura 48. *Scaffolds* obtidos a partir de géis de LAGG com 1% de Eu^{3+} e 5% de CNC (m/m) em (a) condições padrão de impressão e (b) com os parâmetros otimizados. Visão superior (esquerda) e lateral (direita). 90

Lista de Tabelas

Tabela 1. Volumes de solução de $EuCl_3$ adicionados para cada amostra, com a quantidade e a massa de Eu^{3+} correspondente e a proporção final em relação a massa de LAGG..... 48

Tabela 2. Volumes de solução de $EuCl_3$ adicionados para cada amostra, com a quantidade e a massa de Eu^{3+} correspondente e a proporção final em relação a massa de HAGG. 48

Tabela 3. Parâmetros calculados a partir dos pontos de interseção das curvas G' e G" das amostras LAGG e HAGG variando as concentrações de Eu^{3+} dos géis na análise de varredura de amplitude a 25,0 e 37,0 ºC. 58

Tabela 4. Atribuições de bandas dos espectros FTIR das amostras de LAGG e HAGG, de acordo com Silva-Correia et al. [8] e Pereira et al. [10]. 66

Tabela 5. Tempo de vida médio dos filmes de GG dopados com Eu^{3+} excitando em λ_{ex} 330 nm e 394 nm e monitorando em λ_{em} 612 nm..... 69

Tabela 6. Coeficiente de emissão espontânea total (A_{total}), coeficiente de decaimento não radiativo (A_{N-rad}), parâmetros de intensidade experimental de Judd-Ofelt (Ω_n), tempo de vida radiativo (τ_{rad}), tempo de vida experimental (τ_{exp}), eficiência quântica (η) e número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação (q) das amostras LAGG e HAGG dopadas com Eu^{3+} excitadas à 394 nm. 71

Tabela 7. Tempo de vida médio dos filmes de GG dopados com Eu^{3+} e ligante TTA na proporção 1:1 excitando em λ_{ex} 280, 370 e 394 nm e monitorando em λ_{em} 611 nm. 75

Tabela 8. Coeficiente de emissão espontânea total (A_{total}), parâmetros de intensidade experimental de Judd-Ofelt (Ω_n), tempo de vida radiativo (τ_{rad}), tempo de vida experimental (τ_{exp}), eficiência quântica (η) e número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação (q) das amostras de LAGG dopadas com Eu^{3+} tratadas com TTA a 394 nm. 76

Tabela 9. Valores de resistência à tração das amostras de filme de LAGG dopadas com 1% de Eu^{3+} e várias proporções de CNC em sua composição. 80

Tabela 10. Coeficiente de emissão espontânea total (A_{total}), parâmetros de intensidade experimental de Judd-Ofelt (Ω_n), tempo de vida radiativo (τ_{rad}), tempo de vida experimental (τ_{exp}), eficiência quântica (η) e número de moléculas de água na primeira esfera de coordenação (q) das amostras de LAGG dopadas com 1% de Eu^{3+} com adição de CNC e também tratadas com TTA. 83

Sumário

1. Introdução 16
1.1. Biopolímeros 17
1.1.1. Goma gelana 18
1.1.2. Nanocristais de celulose 24
1.1.3. Impressão 3D de biomateriais 30
1.2. Lantanídeos 34
1.2.1. Íon Európio 39
1.2.1. Transferência de energia 43
2. Objetivos 46
2.1. Geral 46
2.2. Específicos 46
3. Seção experimental 47
3.1. Materiais 47
3.2. Métodos de preparação 47
3.2.1. Géis de GG dopada com Eu^{3+} 47
3.2.2. Filmes de GG dopada com Eu^{3+} 48
3.2.3. Filmes de GG dopada com Eu^{3+} com ligante TTA 49
3.2.4. CNC a partir de celulose bacteriana 49
3.2.5. Géis e filmes de GG dopada com Eu^{3+} com adição de CNC 50
3.2.6. Impressão de géis compósitos de GG dopada com Eu^{3+} e CNC 50
3.3. Métodos de caracterização 51
4. Resultados e discussão 53
4.1. Géis de GG dopados com Eu^{3+} 53
4.1.1. Reologia 54
4.1.1.1. Varreduras de amplitude 55
4.1.1.2. Varreduras de frequência 59
4.1.1.3. Varreduras de temperatura 61
4.2. Filmes de GG dopados com Eu^{3+} 63
4.2.1. Espectroscopia de absorção na região do UV-visível 64
4.2.2. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho 65
4.2.1. Espectroscopia de Fotoluminescência 66
4.2.1.1. Filmes de GGs dopados com Eu^{3+} 66
4.2.1.2. Filmes de LAGGs dopados com Eu^{3+} com adição do ligante TTA 72

4.3. Filmes de CNC com GG dopada com Eu^{3+} 78
4.3.1. Testes de tração 80
4.3.2. Espectroscopia de absorção na região do UV-visível 81
4.3.1. Espectroscopia de Fotoluminescência 81
4.4. Obtenção de *scaffolds* de GG dopada com Eu^{3+} e CNC via impressão 3D 86
5. Conclusão 92
6. Referências bibliográficas 94

1. Introdução

Este trabalho é resultado dos estudos desenvolvidos no projeto de mestrado "Compósitos para impressão 3D luminescentes: Síntese, estudo estrutural e espectroscópico", desenvolvido no Grupo de Nanomateriais e Sistemas Luminescentes, de fevereiro de 2020 a julho de 2022, em colaboração com o Prof. Dr. Hernane S. Barud da Universidade de Araraquara. Esse projeto almejou inicialmente a obtenção de materiais formados por nanocristais de celulose (CNC), sendo uma matriz com histórico de estudo no grupo, obtidos a partir de membranas de celulose bacteriana e dopados com íons lantanídeos. Esse material então seria inserido em goma gelana (GG) para a formação de géis biocompósitos a ser usado na obtenção de estruturas tridimensionais luminescentes através da impressão 3D.

Já nos primeiros meses de desenvolvimento do projeto houve uma mudança de estratégia. Ao constatar a ausência de relatos na literatura, até aquele momento, acerca do estudo da interação de GG com os íons lantanídeos e de como o processo de gelificação desse interessante biopolímero pode ocorrer envolvendo a ação de cátions, optou-se pela dopagem de dois tipos diferentes de GG com o íon európio (Eu^{3+}). Além disso, devido ao fato deste íon possuir propriedades espectroscópicas que possibilitam seu uso como sonda estrutural, a inserção na matriz de interesse torna-se uma possibilidade ideal para um estudo inicial da estrutura desta. Foram então obtidos géis de GG dopados com íons Eu^{3+}, e, inicialmente, as suas propriedades viscoelásticas foram estudadas por meio de ensaios de reologia realizados no laboratório do Grupo de Biopolímeros e Biomateriais da Uniara. Na sequência, os géis foram secos como filmes autossuportados, e nestes foram realizados estudos espectroscópicos através de análises de fotoluminescência.

Na etapa seguinte dos estudos, os CNC foram adicionados na GG dopada com íons Eu^{3+} visando o reforço mecânico do compósito final, que foram avaliados quanto a sua resistência mecânica. Devida a baixa intensidade de emissão do íon európio na GG e na matriz compósita, uma estratégia adotada foi a inserção do com TTA (2-tenoiltrifluoroacetona), um ligante com alto coeficiente de absorção molar, que através do efeito antena pode aumentar a intensidade da luminescência do íon lantanídeo. Finalmente, os géis de GG dopados com íon európio e CNC, obtidos neste trabalho, foram usados para a impressão de estruturas tridimensionais através da manufatura aditiva, o que habilita o uso desse material em engenharia de tecidos

aproveitando-se das suas interessantes propriedades mecânicas, além das propriedades de fotoluminescência do compósito final.

1.1. Biopolímeros

O desenvolvimento de materiais ópticos têm sido baseado em sistemas envolvendo vidro, semicondutores ou polímeros, no entanto, a ausência da biocompatibilidade e biodegradabilidade desses materiais limitam o seu uso em algumas áreas importantes, como em implantes degradáveis e em sensores bioativos, além de existir o crescente interesse em componentes que não sejam prejudiciais ao meio ambiente [1]. Recentemente, interfaces biológicas têm atraído atenção no desenvolvimento de novos materiais que forneçam um processamento óptico aprimorado, com sensibilidade em meio biológico, possibilitando a união da fotônica à biomedicina [2]. Devido à sua abundância na natureza, processos de fabricação ecologicamente corretos e amplas faixas de aplicações possíveis, os biopolímeros têm sido estudados como matérias-primas renováveis e de baixo custo para o desenvolvimento de uma vasta gama de materiais biodegradáveis à base de polissacarídeos ou proteínas [3].

Dentre as aplicações dos biopolímeros, especificamente na área da biofotônica se concentra o desenvolvimento de guias de onda transparentes baseados em sistemas derivados de plantas e animais, de modo a se obter fibras ópticas biocompatíveis que forneçam luz para detecção ou para indução terapêutica nos tecidos, além de permitir comunicações ópticas por meio de dispositivos fotônicos implantados [4,5]. Nesse sentido, a fluorescência sensível ao ambiente pode permitir o monitoramento contínuo e não invasivo de reações bioquímicas por meio de sensores ópticos [6]. A biocompatibilidade, biodegradabilidade e flexibilidade mecânica inerente a esses materiais, possibilitam seu uso na área da engenharia de tecidos; uma vez que biomateriais podem apresentar semelhanças químicas e biológicas com os tecidos naturais e, então, serem utilizados para repará-los ao fornecer suporte mecânico às células em tempo e condições hábeis para seu crescimento e reparo de um defeito em um determinado tecido [7–9].

Os próximos tópicos deste trabalho apresentam uma descrição das propriedades e aplicações dos biopolímeros estudados, a GG e os CNC, assim como uma abordagem sobre a aplicação de compósitos na técnica de impressão 3D.

1.1.1. Goma gelana

A Goma Gelana (GG) é um polissacarídeo natural derivado de bactérias, que pode ser preparado na forma de gel como um biomaterial versátil, funcional e moldável em diferentes formas de tecido [10,11]. Esse polissacarídeo foi identificado em 1978 pela CP Kelco, na época uma divisão da Merck Co. em San Diego, EUA, se destacando como de grande potencial durante um extenso programa de triagem de bactérias encontradas no solo e na água para identificar polissacarídeos com propriedades mecânicas úteis em busca de alternativas para gelificantes já presentes no mercado de alimentos [12,13]. O Japão foi o primeiro país a aprovar a GG como "aditivo alimentar natural" em 1988, o que provocou um aumento no interesse por empresas e pesquisadores japoneses em seu estudo para aplicações industriais [14,15]. Já em 1992 os EUA e a União Europeia permitiram o seu uso como um gel multifuncional, estabilizante e agente de suspensão nas indústrias alimentícia e cosmética [13,16].

Esse polissacarídeo, conhecido inicialmente como polissacarídeo S-60 [17] (ou PS-60) [18], tornou-se disponível comercialmente pela CP Kelco, que possui patente sobre o produto, o produzindo no Japão e nos EUA com nomes de *Kelcogel* para uso em indústria alimentícia e *Gelrite* para uso como agente gelificante alternativo ao ágar em laboratório, assim como em meios para crescimento biológicos [19,20]. A GG consta na lista geral de aditivos alimentares do Mercosul e recebeu aprovação para uso também no Brasil em 1998 [21] e, desde então, diversos alimentos e cosméticos baseados neste polímero foram introduzidos ao mercado. Recentemente, sua aplicação se estendeu também para usos farmacêuticos, como formulações oftálmicas e administração oral de medicamentos [22].

A GG é resultado da fermentação aeróbica da bactéria *Sphingomonas elodea* (Figura 1 – b, c), uma bactéria Gram-negativa não patogênica [23], antes conhecida como *Pseudomonas elodea* [15], e que vive em algas *Elodea Canadensis* [11] (Figura 1 - a). Durante este processo, uma cultura da bactéria é inoculada em meio de fermentação composto por uma fonte de carbono, como glicose, uma fonte de nitrogênio, oxigênio e vários sais inorgânicos. A literatura [24] mostra que a composição deste meio pode variar quanto às fontes de carbono e nitrogênio, e pode conter amido solúvel e extrato de levedura ou ainda sacarose e peptona, ambos fornecendo um bom rendimento na fermentação. O controle do pH é um fator determinante para produção de GG, já que este influencia significativamente o crescimento celular, devendo ser mantido entre 6,5 e 7,0, já que meios com valores fora dessa faixa reduzem quantitativamente a formação

esperada do produto [25,26]. Além disso, a temperatura, a aeração e a agitação devem permanecer rigorosamente constantes para que a consistência do produto seja garantida.

A produção de GG é um processo crescente com uma produção máxima de 12 g/L, onde a viscosidade do meio aumenta durante as fases exponencial e estacionária [27] à medida que o organismo metaboliza a glicose e secreta a GG, sendo a última o componente predominante da substância polimérica extracelular da bactéria [11] (Figura 1 – d). No final do processo, quando o substrato foi totalmente consumido, a viscosidade atinge um valor muito alto, sendo necessária a diluição do meio de cultura com uma solução salina para a redução de sua viscosidade e tornar possível a recuperação do produto. O meio é submetido a um tratamento térmico para matar as bactérias, e a GG em sua forma nativa é coletada a partir da precipitação com álcool isopropílico. Após repetidas etapas de precipitação, visando a purificação do material, o polímero é ressuspenso em água, dialisado e as fibras obtidas são secas e moídas de onde se obtém um pó branco [27,28].

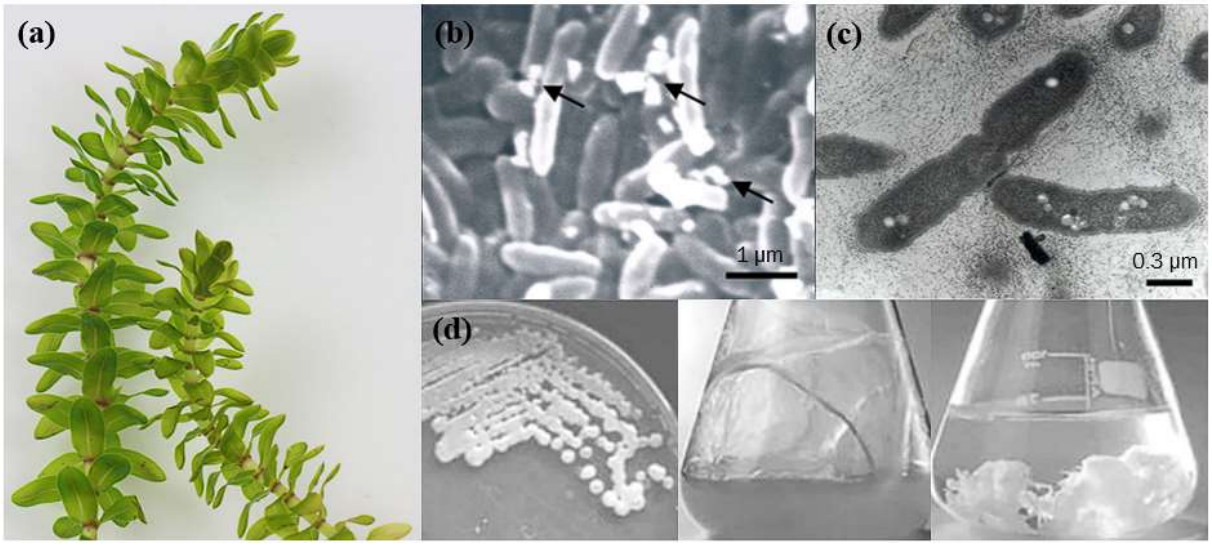

Figura 1. (a) *Elodea canadensis*; (b) microscopia eletrônica de varredura e (c) microscopia eletrônica de transmissão de células *Sphingomonas elodea* cultivadas; (d) processo de fermentação laboratorial para a GG. Fontes: adaptado de Lee et al. [29] e Fialho et al. [27] .

A estrutura da GG é a de um heteropolissacarídeo aniônico linear composto por unidades repetidas de tetrassacarídeos compreendendo monômeros de β-d-glicose, um de ácido β-d-glicurônico e um de α-l-ramnose nas razões molares 2:1:1 (Figura 2). Na forma que é secretado pela bactéria, o polímero possui aproximadamente 1,5 substituinte acil por unidade de repetição do tetrassacarídeo, isso porque os grupos acil O-acetato e L-glicerato ligados ao

mesmo resíduo de glicose adjacente ao ácido glicurônico, aparecem a cada duas e a cada uma unidade de repetição, respectivamente [14,17]. No estado sólido, o polissacarídeo se apresenta como uma dupla hélice coaxial tripla, estabilizada por associações intercadeias que envolvem os grupos glicerato com os substituintes acetil posicionados no exterior da hélice [30].

A GG pode apresentar diferentes graus de acetilação: um, em que a maioria dos grupos acil podem ser preservados em procedimentos de fermentação mais suaves, dando origem à *high acyl gellan gum* ou HAGG [15,27]; e outro, destinado ao seu uso regular na indústria, onde os substituintes podem ser removidos por tratamento alcalino quente no meio de fermentação, resultando na sua forma desacilada que contém poucos ou nenhum grupo acil, chamada de *low acyl gellan gum* ou LAGG.

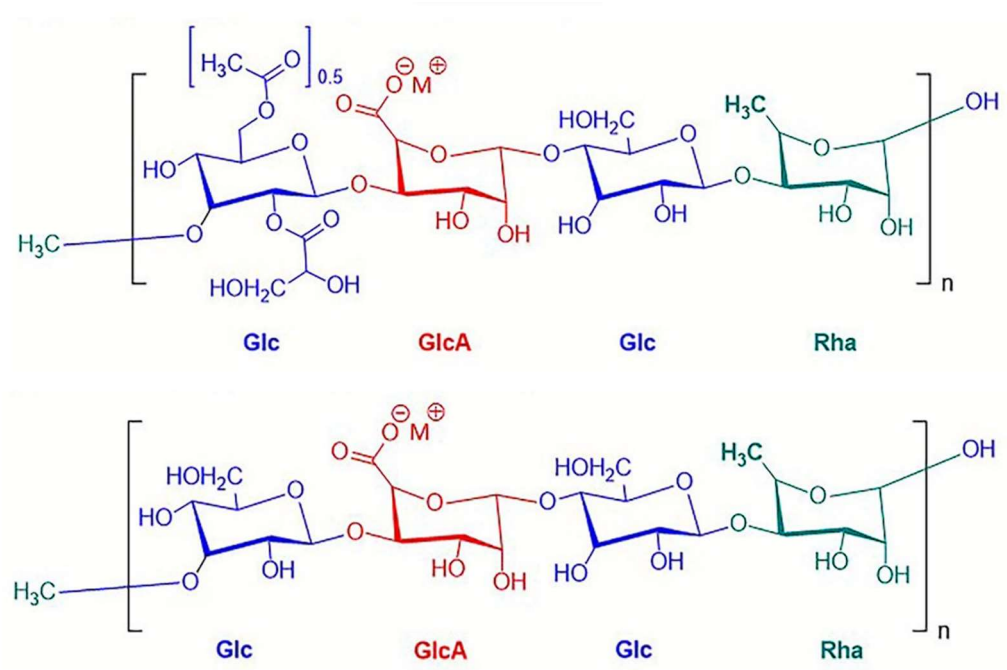

Figura 2. (Acima) estrutura química da unidade de repetição da GG nas formas HAGG e (abaixo) LAGG. Fonte: Bacelar et al. [11] .

Ambas as formas do polissacarídeo formam géis termorreversíveis que diferem em suas propriedades mecânicas. A maneira mais comum para se preparar esses géis é pelo resfriamento de uma solução quente da GG, processo que pode ser mediado ou não pela interação de cátions, como será discutido mais adiante [8,31]. Em altas temperaturas, a GG se apresenta como uma estrutura de uma fita simples, o que reduz significativamente a viscosidade dessa solução, com isto, à medida que ocorre o resfriamento há uma transição de uma espiral termicamente

reversível para cadeias de dupla hélice, que por sua vez se agregam e se ligam umas às outras formando zonas de junção (Figura 3). Interações secundárias, incluindo ligações de hidrogênio, ligam as cadeias poliméricas flexíveis desordenadas conectando zonas de junção adjacentes. Um maior número de cadeias são concentradas nessas zonas à medida que a temperatura diminui abaixo do ponto de gelificação, resultando em uma grande rede molecular na qual as moléculas de água podem ser aprisionadas [11,27].

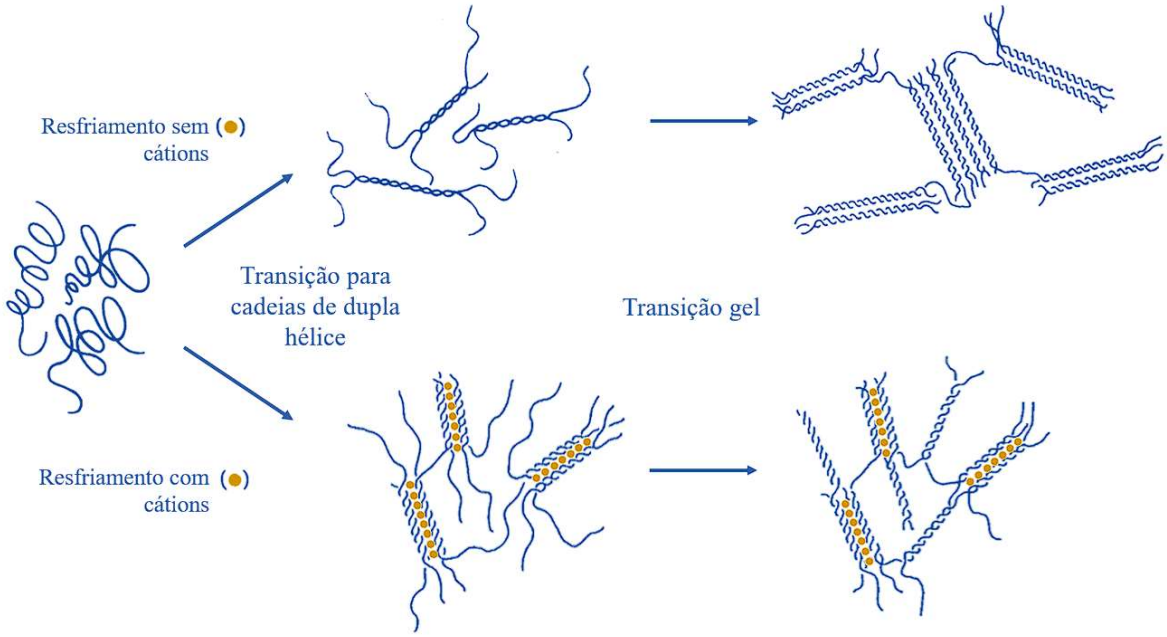

Figura 3. Ilustração do processo de gelificação da GG através da aglutinação de suas cadeias poliméricas, em um resfriamento com e sem a adição de cátions (círculos laranjas). Fonte: adaptado de Robinson et al. [32] e Miyoshi, et al. [33].

Na HAGG, os substituintes acil têm um grande impacto no processo de ordenação e, consequentemente, nas características mecânicas dos géis, sendo que o glicerato estabiliza a dupla hélice à medida que a solução é resfriada enquanto o acetato provoca a agregação entre as hélices, tornando os géis macios, elásticos e não quebradiços. Estes gelificam entre 50 °C e 80 °C, dependendo da concentração de polímero, uma vez que esta GG é capaz de formar géis autossustentáveis em concentrações acima de 0,2% [24,34] .

Já na LAGG, a ausência dos grupos acil resulta em um comportamento de gelificação muito diferente em comparação ao anterior. Nesta, a agregação das duplas hélices para formar uma rede tridimensional é facilitada pelo intermédio de cátions, geralmente monovalentes ou divalentes, em um processo conhecido como gelificação ionotrópica, onde íons, de modo mais notório o sódio, potássio e cálcio, aumentam significativamente o número de zonas de junção,

fazendo com que a gelificação ocorra em temperaturas mais baixas, entre 30 °C e 50 °C [35,36]. Géis auto suportáveis e moldáveis podem ser formados em concentrações acima de 0,05% de GG, sendo eles rígidos, não elásticos e quebradiços, ou seja, com características tão diferentes de géis formados por HAGG que ambos podem ser colocados em extremidades opostas do espectro de textura de géis hidrocoloides (Figura 4) [24]. A consistência dos géis pode ser alterada de acordo com suas aplicações, estes podem ser formulados para endurecer com ou sem aquecimento, permitindo o design e a produção de géis resistentes ao calor e géis que podem liquefazer durante um certo período de tempo [22,37].

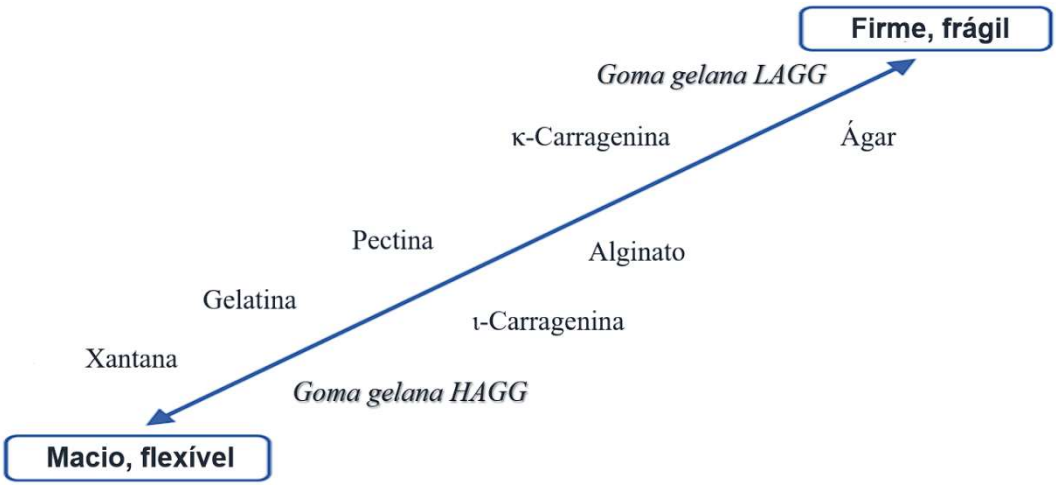

Figura 4. Comparação esquemática da textura do gel de HAGG e LAGG com outros agentes gelificantes. Fonte: adaptado de Sworn e Stouby [24].

Além de ser empregada na indústria de alimentos como estabilizante e espessante, a GG é aplicada em formulações médicas através de hidrogéis utilizados na cultura de tecidos vegetais e na cultura bacteriana, sendo recentes os estudos como um componente de um material compósito para engenharia de tecido em humanos [22,38]. O gel de GG já foi usado de forma eficiente na liberação e no crescimento de condrócitos articulares humanos, devido à similaridade estrutural com glicosaminoglicanos nativos que constituem a matriz extracelular de tecidos animais, compatíveis com os resíduos de ácido glucurônico presentes na estrutura da GG [13,39].

Filmes de GG podem ser usados para regeneração óssea guiada (GBR), onde materiais com características bioabsorvíveis têm sido empregados em procedimentos cirúrgicos isolando regiões com tecidos defeituosos e prevenindo a invasão de tecido conjuntivo fibroso no espaço do defeito, podendo assim promover a cicatrização óssea [40]. Em um estudo relatado por Chang

[41] avaliando esse potencial cicatrizante, defeitos cranianos padronizados de nível crítico foram feitos em ratos, para em seguida aplicar um filme de GG, obtido a partir de um gel preparado em água a uma concentração de 2% (m/v), ao modelo de estudo. A Figura 5 mostra os cortes transversais com corante dos defeitos ósseos experimentais dois meses após a cirurgia. No controle, o tecido conjuntivo (colágeno em azul) cresceu na área do defeito ósseo, fazendo com que as células ósseas, com uma taxa de crescimento muito mais lenta, não pudessem crescer em seu espaço original, impedindo o crescimento ósseo novo natural. Já no grupo experimental, diferentes graus de cicatrização óssea foram observados em filmes de variadas concentrações de GG em comparação com o grupo controle. Nas regiões cobertas pelo filme, a GG impediu o crescimento de colágeno (Figura 5 -b), isolando com sucesso o defeito ósseo da entrada de células do tecido conjuntivo e fornecendo o espaço onde as células do tecido ósseo pudessem crescer.

Figura 5. Filmes de GG para regeneração óssea guiada eficaz: ferimentos após dois meses de início dos testes: (a) controle e (b) ferimento coberto com filme 2% GG. Fonte: adaptado de Chang, S-J. et al. [41].

O defeito ósseo foi reparado em tempo e espaço críticos de cicatrização para ser preenchido por osso recém-formado, tecido esse que pode proliferar em regiões protegidas pelo filme de GG, que impediu que qualquer tecido conjuntivo invadisse o defeito. Portanto, uma estrutura morfológica densa na fase inicial de cicatrização pode impedir a migração apical de fibroblastos para locais de defeitos ósseos, e na fase posterior uma estrutura porosa foi essencial para adaptação celular e permeação suficiente de nutrientes. Na imagem, o filme que cobriu o defeito ainda era visível parcialmente degradado no meio da porção de corte do crânio, assim como em testes de degradação, não se dissolvendo completamente mesmo após 30 dias, o que evidencia uma boa biodegradabilidade do material já que esse deve resistir a um período

suficientemente longo para que o tecido ósseo atinja um estágio de cicatrização ideal, geralmente entre 4 e 6 semanas. Além disso, nenhuma resposta inflamatória foi observada ao redor do filme GG durante o estágio inicial do estudo, confirmando que a utilização das características apresentadas da GG pode torná-la um material promissor para aplicação de GBR.

No entanto, os hidrogéis de GG simples, mesmo sendo estáveis, podem se dissolver sem controle em fluidos fisiológicos levando a um desempenho mecânico pífio. Modificações químicas permitem superar algumas limitações dos géis tradicionais, melhorando a funcionalidade mecânica e a estabilidade a longo prazo [13]. Porém, já é relatado na literatura que modificações físicas também são empregadas para melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas, como na combinação com outros polímeros com a matriz, dependendo do seu método de preparação [11]. Um interessante grupo de materiais que pode ser incorporado às matrizes poliméricas para aplicação como como fase de reforço é o de CNC.

1.1.2. Nanocristais de celulose

Os nanocristais de celulose (CNC), também chamados de celulose nanocristalina ou *nanowhiskers* de celulose, são os domínios cristalinos de fibras celulósicas isolados por meio de hidrólise ácida, e tem atraído grande interesse como um material de reforço funcional no desenvolvimento de biocompósitos, devido ao seu potencial em melhorar as propriedades mecânicas em matrizes poliméricas, que é resultado de sua estrutura altamente ordenada [42]. Esse material é definido como nano por pelo menos uma dimensão da sua estrutura ser observada em nanoescala, ou seja, de 1 a 100 nm [43,44].

A celulose é o polímero natural e biodegradável mais abundante na Terra, podendo ser sintetizada por uma variedade de organismos, incluindo plantas, animais marinhos, fungos e bactérias [45,46]. Isso apresenta uma vantagem em relação a outros materiais por existirem na natureza de forma vasta, uma vez que estão presentes em todas as fibras celulósicas, não havendo a necessidade de síntese, apenas de extração, o que levou um aumento do interesse em sua aplicação nas últimas décadas como um material renovável, visando valores de sustentabilidade e química verde [47,48].

Os CNCs são constituídos por polímeros de celulose, um polissacarídeo formado por uma cadeia de D-glicopiranose que são unidas por ligações β-1,4 glicosídicas, estrutura que

conta com três grupos hidroxilas livres: OH secundário nas posições C2 e C3 e um OH primário em C6 (Figura 6) [48,49]. Estes participam de interações intermoleculares dando origem à compactação da estrutura cristalina e às propriedades físicas da celulose, além das hidroxilas serem suscetíveis a tratamentos químicos para uma funcionalização específica do material.

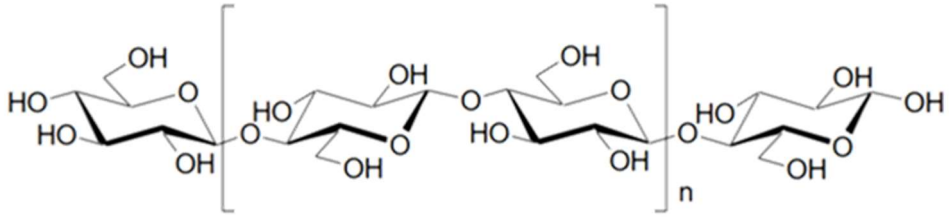

Figura 6. Estrutura química básica da celulose mostrando a sua unidade de repetição. Fonte: Siqueira et al. [50].

Tais fibras de celulose são compostas por microfibrilas de superfície não regular formadas por regiões cristalinas e amorfas (Figura 7). Na primeira, o arranjo das moléculas de celulose é altamente ordenado, resultado da ação combinada da biopolimerização e cristalização da celulose comandada por processos enzimáticos, e mantida por meio de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares [51,52]. Por meio dessas mesmas interações, essa região ordenada se conecta às regiões amorfas, que são orientadas aleatoriamente, resultado da má formação da estrutura devido à alteração no processo de cristalização [53]. O alto ordenamento nas regiões cristalinas, com um arranjo geométrico que se repete nos eixos principais de sua estrutura, confere mudanças significativas em propriedades mecânicas, elétricas, ópticas, magnéticas, ferromagnéticas, dielétricas e de condutividade em materiais em que esses cristais de celulose são inseridos [54], sendo que os CNCs com maior relação comprimento/diâmetro apresentam efeitos de reforço mais eficazes.

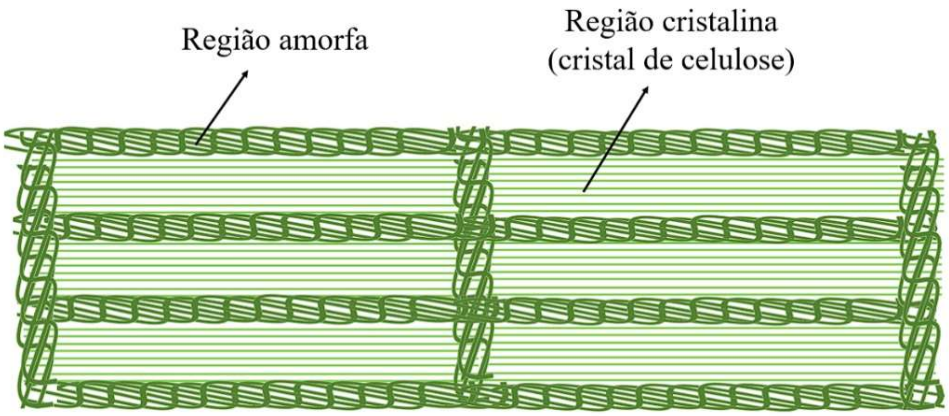

Figura 7. Esquema ilustrativo mostrando as regiões cristalinas e amorfas da fibra de celulose. Fonte: adaptado de Silva et al. [52].

Dentre diversos métodos de extração, o mais eficaz e amplamente estudado é o isolamento dessas regiões cristalinas por meio da hidrólise ácida [55]. Neste processo, os domínios amorfos distribuídos na microfibrila são removidos, uma vez que são suscetíveis ao ataque ácido devido a desorganização natural das moléculas de celulose nessas regiões menos densas, onde os íons H_3O^+ podem penetrar promovendo a clivagem hidrolítica das ligações glicosídicas e liberando cristalitos individuais [52]. As regiões cristalinas são insolúveis em ácidos por conta da inacessibilidade provocada pela elevada organização das moléculas de celulose na microfibrila. Portanto, o isolamento dos CNCs é facilitado pela cinética de hidrólise mais rápida apresentada pelas regiões amorfas em relação às regiões cristalinas [46,56].

Tal processo é realizado com o emprego de ácidos fortes, como o ácido sulfúrico, ocorrendo a esterificação dos grupos hidroxila com a introdução de grupos sulfato ($–OSO_3$) distribuídos aleatoriamente na superfície da celulose, o que leva a suspensões aquosas estáveis de CNCs carregados negativamente que tendem a se dispersar devido à repulsão eletrostática entre as partículas individuais [55,57]. A presença de grupos sulfato residuais na superfície da celulose catalisa a sua degradação por meio da reação de desidratação, diminuindo fortemente a estabilidade térmica do material, o que consequentemente limita a temperatura máxima que um sistema nanocompósito pode ser submetido e restringe a sua aplicação [58]. A extração da celulose também pode ser realizada com ácido clorídrico, resultando em cristais de alta estabilidade térmica, porém sem carga superficial, o que promove a agregação dos CNCs em suspensões aquosas por meio de ligações de hidrogênio [58,59]. Em vista disso, os grupos sulfatos podem ser removidos por diálise ou dessulfatação, porém uma alternativa proposta por

Vasconcelos et al. [43] foi o uso concomitante de ácido sulfúrico e ácido clorídrico combinando as propriedades resultantes de ambos os métodos para produzir suspensões aquosas de CNC estáveis e termicamente resistentes.

O processo de extração se inicia com a forte hidrólise ácida da celulose, controlando-se a concentração de ácido e sua proporção para celulose, assim como o tempo e a temperatura de reação, fatores estes que influenciam diretamente na morfologia e nas propriedades do material final, sendo os CNCs mais finos obtidos com ácido mais concentrado e temperaturas mais altas em reações mais longas [58]. Em seguida, a reação é interrompida com a diluição com água gelada e o ácido é removido por repetidas lavagens e centrifugações, podendo ainda remover o ácido residual por meio de uma diálise. Outro ponto para obter uma suspensão estável de CNC é a sonicação e, caso se queira produzir nanocelulose sólida, ela pode passar por um processo de secagem [49].

A hidrólise ácida preserva os domínios cristalinos e leva à formação de CNC individuais de alta pureza, menores do que em outros métodos de extração, no formato de agulhas de diâmetros de 5 a 50 nm e comprimentos de fibra variando de 100 nm a várias centenas de nanômetros [60], semelhante à um bigode, o que dá então o nome dessas estruturas também de *whiskers* [44]. Em suspensão, eles apresentam tendência em se alinharem devido a sua elevada rigidez e elevada relação de comprimento por diâmetro, o que causa uma tendência a birrefringência.

Mesmo constituídos pelas mesmas moléculas de celulose, os CNCs podem ser obtidos com particularidades nas suas características dimensionais e superficiais, o que afeta diretamente o seu desempenho como partícula de reforço em compósitos. Além das já citadas diferentes condições nos processos de extração, a proporção entre as regiões cristalina e amorfa pode variar dependendo da fonte da fibra celulósica, o que pode resultar em nanocristais de aspectos diferentes [47,61], como os exemplos mostrados na Figura 8, com mudanças na razão entre o comprimento e a espessura, parâmetros decisivos na eficiência que esse material pode ter ao ser utilizado como fase de reforço em uma matriz compósita [62].

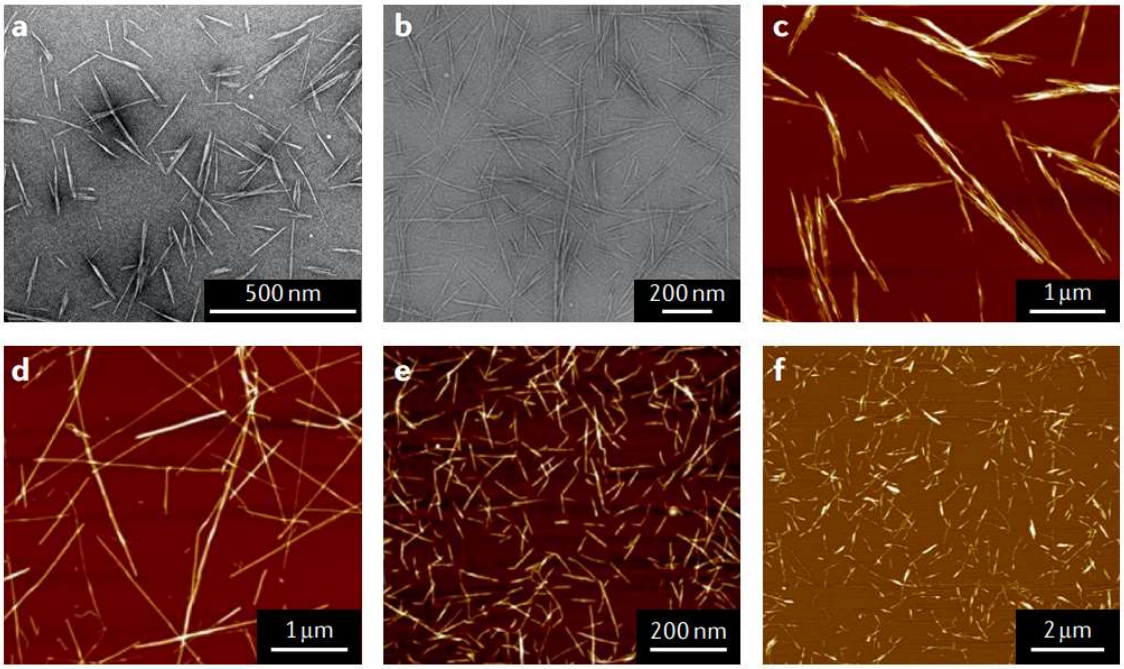

Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão e microscopia de força atômica de suspensões diluídas mostrando as diferentes morfologias de CNCs de várias fontes de celulose: CNC de (a) madeira macia, (b) fibras de sisal, (c) celulose bacteriana e (d) celulose de tunicado hidrolisadas com ácido sulfúrico; CNCs produzidos por (e) ultrassom de nanofibrilas de celulose oxidada com (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxil e (f) hidrólise de ácido fosfórico de algodão (f). Fonte: Vanderfleet e Cranston [47].

O preparo de matrizes de CNCs com outros tipos de polímeros é tema de várias linhas de pesquisas, com casos de resultados de alto desempenho na indústria de plástico (PVC), na preparação de filmes finos e também em matrizes com outros polímeros naturais. No caso da elaboração de filmes, é importante a compatibilização do meio de dispersão dos CNCs com o polímero que será empregado na confecção da matriz, sendo o meio aquoso o mais usual. Porém, o tratamento químico da superfície da fibra pode ser necessário para melhorar a aderência na interface fibra-matriz e aumentar o desempenho delas como elementos de reforço de matrizes poliméricas. A presença de grupos hidroxila na superfície nos CNCs pode permitir modificações adicionais para alterar sua hidrofilicidade, através do uso de surfactantes, agentes de acoplamento ou da acetilação da superfície, por exemplo [46].

Dentre celuloses de diversas fontes, a celulose bacteriana (CB), sintetizada por algumas espécies de bactérias como a *Acetobacter xylinum*, [63] ganhou particular interesse por ser uma excelente matriz para a produção de nanocompósitos para aplicações tecnológicas, em áreas

como de biomedicina e farmacologia e na indústria de papel, sendo ela um produto biocompatível, não toxico e biodegradável. Essas diversas aplicações se dão pelas características citadas e também por possuírem alta pureza, uma alta resistência mecânica no estado úmido, mesmo com sua baixa densidade, e por serem altamente porosas, o que possibilita alta capacidade de retenção de água [43,64].

A CB é obtida por fermentação e foi inicialmente relatada em 1886 por Brown, que já identificava a alta resistência mecânica de sua membrana [65]. Tais bactérias produzem celulose para proteção contra radiação ultravioleta e ambiente químico agressivo, sendo que apenas uma célula da bactéria pode polimerizar até 200.000 moléculas de glicose por segundo em cadeia seguindo em um processo de automontagem [66]. Essa bactéria, em um meio de cultura estático rico em polissacarídeos, produz uma membrana altamente hidratada de CB na interface líquido/ar, contendo até 99% de água e formada por uma estrutura tridimensional que consiste em uma rede altamente reticulada de nanofibras de celulose pura (Figura 9). Por conta disso, apesar da similaridade de estrutura química com celuloses de outras fontes, a organização estrutural da CB proporciona a ela propriedades mecânicas diferentes, e sua alta área superficial tem potencial para aplicações em engenharia de tecidos, por exemplo [64].

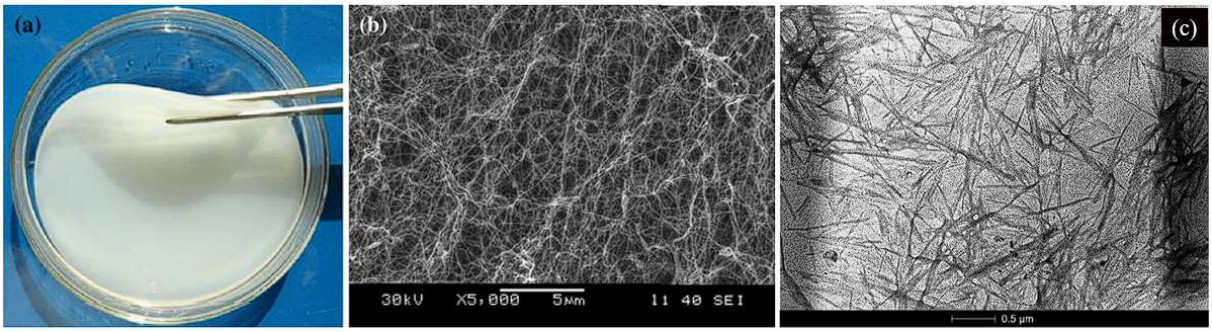

Figura 9. (a) CB produzida em cultivo estático, (b) microscopia eletrônica de varredura da CB e (c) microscopia eletrônica de transmissão CNCs produzidos a partir de BC com uma combinação de H_2SO_4 e HCl. Fonte: adaptado de Huang et al. [66] e Vasconcelos et al. [43].

Enquanto a celulose de origem vegetal é parte da composição da fibra celulósica (bagaço de cana entre 40 e 50%, madeira 50% e algodão 90 % de celulose), estando associada a outros tipos de biopolímeros como lignina, hemiceluloses, pectina [49,66], a CB é composta praticamente apenas de celulose, sendo purificada somente com processos leves envolvendo solução de hidróxido de sódio [43]. A alta pureza da CB a torna ideal para a extração de CNCs, porém sua estrutura de rede altamente cristalina requer fortes condições de hidrólise para que haja a quebra

da morfologia dos feixes de fibrilas e nanofibrilas individuais, resultando em nanocristais de diâmetro variando entre 5 e 50 nm e comprimento entre 100 e 1000 nm [64].

1.1.3. Impressão 3D de biomateriais

A impressão 3D, também conhecida como manufatura aditiva, é uma técnica que envolve a deposição controlada de camadas sucessivas de um material com posicionamento preciso para a formação de uma estrutura tridimensional de forma automatizada, permitindo um melhor controle do formato e da porosidade do objeto em comparação com outros métodos de fabricação [67]. Dentro dessa área está a bioimpressão, que é usada para fabricar estruturas tridimensionais multicamadas a partir de materiais biológicos, geralmente células e biomoléculas, por meio da manufatura aditiva, para a obtenção de materiais com geometrias altamente complexas, alta resolução e tamanhos de poros controlados com precisão e distribuídos uniformemente pelos objetos, podendo ser aplicada em diversas áreas [68]. Esse método é um campo de estudo emergente que faz parte do campo mais amplo da engenharia de tecidos e medicina regenerativa, unindo diversas áreas do conhecimento, como tecnologias de bioengenharia, ciência dos materiais, biologia celular, físico-química e medicina, garantindo grandes inovações para a biotecnologia e a biomedicina [69].

O conceito de engenharia de tecidos surgiu em 1993, com um estudo de Langer e Vacanti [70] que descreve as características e aplicações de *scaffolds* tridimensionais biodegradáveis pela primeira vez [71]. Os *scaffolds* poliméricos 3D são utilizados na engenharia de tecidos para fornecer suporte biomecânico às células até que estas estejam organizadas em um tecido funcional com uma arquitetura que simule as características do tecido nativo [72]. Após o primeiro relato, vários métodos convencionais de fabricação foram aplicados à fabricação desse tipo de estrutura, como ligação de fibras ou moldagem, porém nenhum permitia o controle suficiente da forma do material ou da porosidade, o que resultava em *scaffolds* inconsistentes, não ideais para aplicação [71]. Contudo, a partir de 2003, pesquisadores iniciaram o uso de métodos de impressão 3D para a fabricação dessas estruturas de formatos personalizados com distribuição de poros controlados. Com a popularização dessa técnica, cada vez mais estudos abrangeram a otimização dos processos envolvidos, as comparações de métodos, a caracterização e aplicações *in vitro* e *in vivo* de *scaffolds* obtidos por impressão 3D [73].

A depender da aplicação do material, diferentes técnicas de impressão podem ser usadas, como impressões a jato de tinta, ou baseadas em laser ou ainda em extrusão. Esta última é um dos métodos mais utilizados nesse campo, onde os biomateriais são extrudados através de um cabeçote de impressão usando seringas com pontas ou bicos específicos que se movem ao longo dos eixos *x* e *y* e, por pressão pneumática ou força mecânica, utilizando-se ou não de aquecimento, são depositados em uma placa de construção que se move continuamente para baixo, permitindo o crescimento da estrutura de baixo para cima [74] (Figura 10).

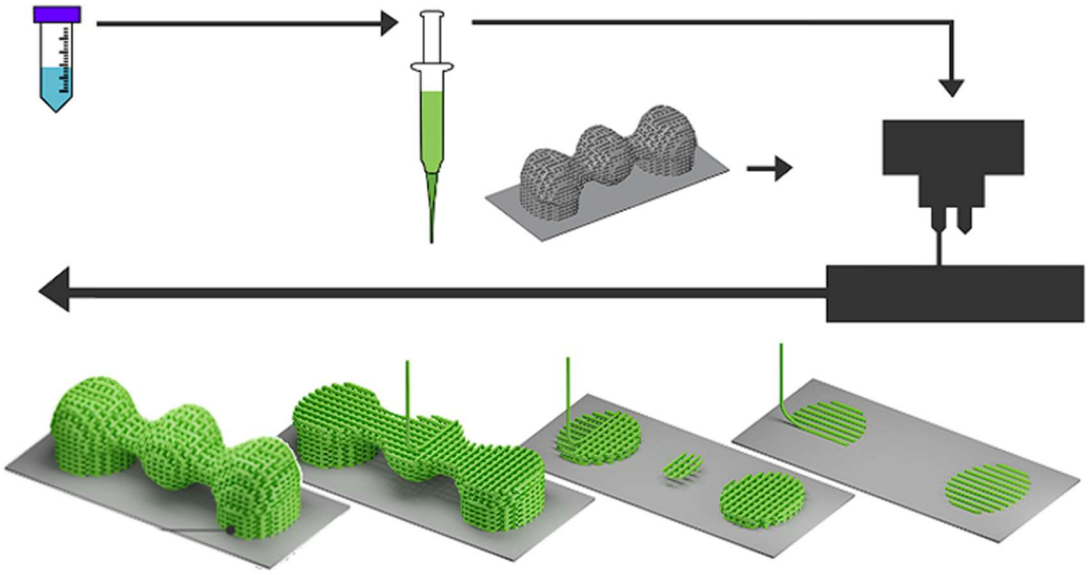

Figura 10. Esquema mostrando as etapas principais da manufatura aditiva, desde a preparação do material, modelamento da geometria e obtenção de uma peça por deposição de camadas sucessivas de material. Fonte: adaptado de Daguano et al. [67].

Para um gel ser impresso dessa forma, ele deve apresentar propriedades reológicas adequadas para que as estruturas tridimensionais pretendidas sejam obtidas e, desse modo, o gel em questão não deve apresentar características nem fortemente viscosas nem elásticas (Figura 11). A alta viscosidade se destaca, pois, com o decorrer do tempo, o material pode não manter sua forma filamentar e se deformar, não sendo possível formar camadas sucessivas de dimensões desejáveis; enquanto propriedades altamente elásticas formariam estruturas muito rígidas e frágeis, passíveis de desestruturação [75]. Portanto, um equilíbrio entre os comportamentos elástico e viscoso deve ser alcançado para um gel ser imprimível, característica que pode ser estudada por meio de testes de amplitude de tensão em análises de reologia oscilatória.

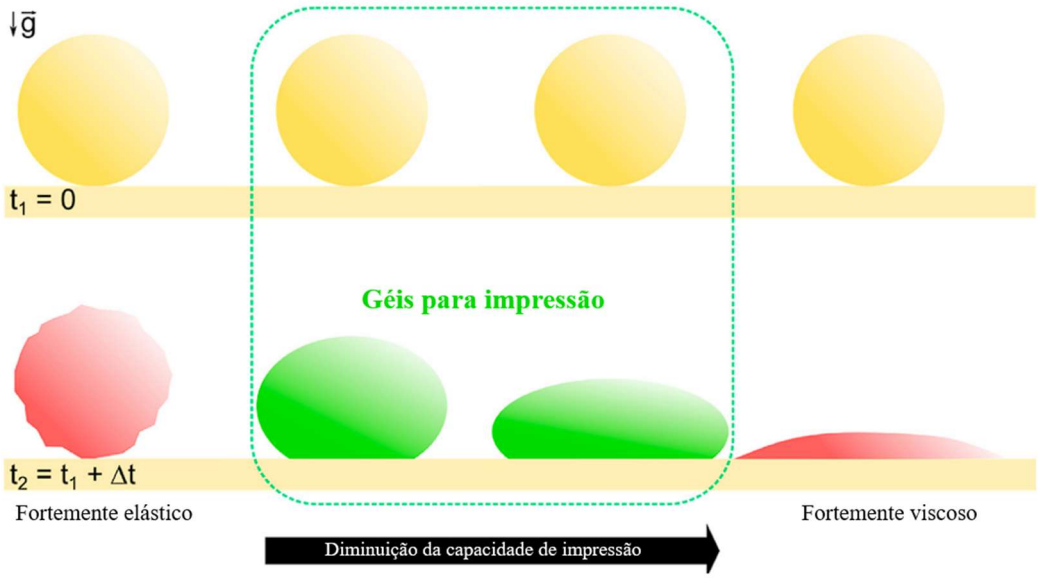

Figura 11. Representação de géis com comportamentos reológicos diferentes entre fortemente elásticos e viscosos e suas consequências esperadas no processo de bioimpressão. Fonte: adaptado de Amorim et al. [75].

As chamadas biotintas podem ser semeadas com células vivas antes ou depois de serem impressas, porém no primeiro caso as propriedades reológicas do material de suporte devem ser adequadas de modo que a força de cisalhamento associada à extrusão não cause danos mecânicos às células [73]. O atual esforço nessa área busca biomateriais, ou misturas, com propriedades mecânicas que reduzam a força necessária para impulsionar a extrusão do material, para que assim , as células vivas permaneçam protegidas e não sejam alteradas durante a impressão. Biomateriais com a adição de CNCs geralmente exibem melhores comportamentos para essa propriedade, sem a adição de outros modificadores reológicos, já que os nanocristais são orientados preferencialmente na direção de impressão. Porém, esse tipo de modificação no material pode ocasionar no aumento da deformação de sua estrutura [76].

Além da já citada "printabilidade", ou seja, a capacidade de um gel ser imprimível, os biomateriais devem apresentar biocompatibilidade, para não causar efeitos indesejáveis no tecido hospedeiro; biodegradabilidade, uma vez que a maior parte dos materiais são usados como substratos provisórios para induzir a regeneração de tecidos recém-desenvolvidos, o que minimiza a presença material residual que possa ser fonte de infecção; absorção de água suficiente, o que facilita a difusão de nutrientes e resíduos; e resistência e estabilidade mecânica adequadas ao tecido original a ser reparado [22,76].

O funcionamento da impressora 3D é auxiliado por um programa de computador, que contém o arquivo da forma que se quer obter em uma plataforma que controla todas as variáveis de todo o trabalho de impressão, desde a velocidade de movimentação do bico, a vazão do material, a temperatura do processo, dentre outros fatores que devem ser cuidadosamente ajustados de acordo com o material inicial para que se possa obter a estrutura com as características desejadas [74].

A estrutura dos *scaffolds* também deve cumprir alguns requisitos para o seu uso em engenharia de tecido, um deles é o controle rigoroso da porosidade do material a depender de sua aplicação, o que pode ser alcançado pelo uso da impressão 3D nessa área. Com essa técnica, é possível se obter estruturas com porosidade gradiente, onde se varia o tamanho dos poros ao longo do *scaffold*, mantendo a interconectividade entre eles, a fim de imitar melhor a estrutura dos tecidos desejados. A utilização desse tipo de preenchimento é interessante, uma vez que a presença de poros grandes facilitam o crescimento de tecidos, o suprimento de nutrientes e a remoção de resíduos, e os pequenos facilitam a ligação celular [72,77]. O controle da geometria do objeto também é importante pois permite a presença de uma alta área superficial interna na estrutura em relação ao volume. Isso gera não só interações espaciais entre as células, o que promove uma melhor proliferação, migração e adesão entre elas, como também o controle da taxa de degradação do material ou até mesmo a taxa de liberação de um fármaco [7].

O desafio atual se concentra no desenvolvimento de novos materiais com tamanhos clinicamente relevantes com o uso de compósitos de base biológica com a capacidade de fabricação de tecidos biomiméticos, com a otimização dessa tecnologia para atender a necessidades relacionadas a casos médicos específicos na chamada medicina personalizada, com um aperfeiçoamento almejando no futuro a impressão de órgãos funcionais, além do aumento da acessibilidade dessa técnica para que ela esteja difundida em ambientes médicos e, consequentemente, disponível para a sociedade [71].

Atualmente os estudos de GG nessa área tem sido em aplicações como curativos, cartilagem artificial e osteogênese óssea [39]. Apesar de suas propriedades favoráveis, a dificuldade no uso de GG na engenharia tecidual se encontra em sua fragilidade estrutural e em suas propriedades sensíveis à temperatura, o que pode limitar suas aplicações específicas [69]. É importante saber como o gel responde ao corpo humano já que este pode apresentar propriedades diferentes ao longo do tempo com a estrutura se tornando mais forte ou mais fraca

in vivo, devido à interação com sais inerentes aos tecidos vivos e do contato prolongado à temperatura corporal, o que é decisivo para fins de curativo de feridas ou substituição de cartilagem.

A combinação com outro polímero é válida para que os requisitos de impressão do biomaterial possam ser alcançados, portanto, neste trabalho, foi desenvolvido um compósito preparado com GG e CNC. A adição de CNC pode influenciar positivamente as propriedades mecânicas do material, atingindo características mais satisfatórias ao esperado para a obtenção de uma estrutura por impressão 3D com uma aplicação como *scaffolds* nanofibrosos para engenharia de tecidos moles, permitindo obtenção de estruturas mais complexas em geometrias específicas.

A interação inédita da GG com o íon Eu^{3+} pode melhorar as suas propriedades mecânicas, mantendo a estrutura do gel mesmo com variação de temperatura, por agir como um forte agente gelificante para o polímero. Além disso, as propriedades espectroscópicas do íon tornam possível entender a cinética da degradação de um *scaffold* formado por essa matriz compósita em um fluido biológico, identificando o tempo em que ele será reabsorvido em um uso em engenharia de tecidos, por meio de uma resposta de variação da luminescência em relação ao tempo. Além disso, as propriedades resultantes da interação entre GG, CNC e Eu^{3+} podem possibilitar o desenvolvimento de novos materiais para aplicações em sistemas fotônicos biocompatíveis.

1.2. Lantanídeos

Os lantanídeos compreendem os elementos do Lantânio (La, Z = 57) ao Lutécio (Lu, Z = 71) e pertencem ao grupo de elementos de terras raras, nos quais ainda se incluem o Ítrio (Y, Z = 39) e o Escândio (Sc, Z = 21). Esses elementos são agrupados dessa forma pois apresentam propriedades químicas, ópticas e magnéticas particulares que são consequência de sua estrutura eletrônica característica [78,79].

O termo terras-raras para esse grupo não é adequado para denominar tais elementos, já que eles foram assim nomeados, pois, à princípio, eram conhecidos na forma de seus óxidos, ou "terras" em uma nomenclatura mais antiga e, atualmente, sabe-se que não são raros, uma vez que a abundância desses na litosfera é relativamente alta [80,81]. O primeiro deles a ser isolado foi

o ítrio em 1794 por Johan Gadolin, um químico finlandês, a partir de um mineral chamado gadolinita encontrado em um local próximo a Ytterby, na Suécia. Mais de 100 anos se passaram até que que o restante da série de elementos pudesse ser identificada, já que a obtenção de suas espécies puras exige uma separação trabalhosa já que tais elementos apresentam propriedades físicas e químicas muito semelhantes [82,83].

Atualmente, os lantanídeos possuem ampla aplicabilidade, desde catalisadores no tratamento de emissões automotivas e no craqueamento do petróleo ao desenvolvimento de dispositivos fotônicos levando em consideração suas propriedades luminescentes específicas. Também se tem aumentado o interesse na aplicação deles no estudo de sistemas bioquímicos, principalmente como sondas espectroscópicas de biomoléculas [80,84].

Essa semelhança dentro do grupo dos lantanídeos é devida principalmente às suas configurações eletrônicas, que podem ser escritas como [Xe] $4f^n$ $5s^2$ $5p^6$ $5d^{0-1}$ $6s^2$. No sexto período da tabela periódica, após o orbital 6s ser ocupado por dois elétrons, os orbitais 5d e 4f se estabilizam, levando ao preenchimento dos orbitais 4f até sua capacidade de 14 elétrons, enquanto a configuração externa permanece inalterada nos $6s^2$. Desse modo, o grupo que compõe esses elementos pode ser chamado de "série interna de transição" [78,85]. Na forma iônica, eles se apresentam com estado de oxidação +3 como o mais estável, podendo também ser obtidos nos estados +2 (como Sm, Eu, Yb) ou +4 (como Ce, Pr, Tb) a depender do balanço entre as energias de ionização, reticular e de ligação do íon [86]. Uma propriedade que diferencia os lantanídeos de outro íons metálicos é em relação ao seu arranjo espacial, já que, por serem maiores, apresentam alto número de coordenação, geralmente 8 e 9, mas que variam entre 6 e 12, seja em solução ou no estado sólido [79].

Os lantanídeos possuem então orbitais $5s^2$ e $5p^6$ preenchidos que são radialmente mais externos que os orbitais 4f e apresentam extensão radial limitada, não participando de modo efetivo das ligações (Figura 12) [86,87]. Isso causa um efeito de blindagem sobre elétrons 4f, fazendo com que estes interajam fracamente com o ambiente químico externo e por conta disso, os lantanídeos são classificados como ácidos duros de acordo com a classificação de Pearson e interagem com os ligantes predominantemente através de ligações iônicas ou de íon-dipolo, com baixo caráter covalente [85,86].

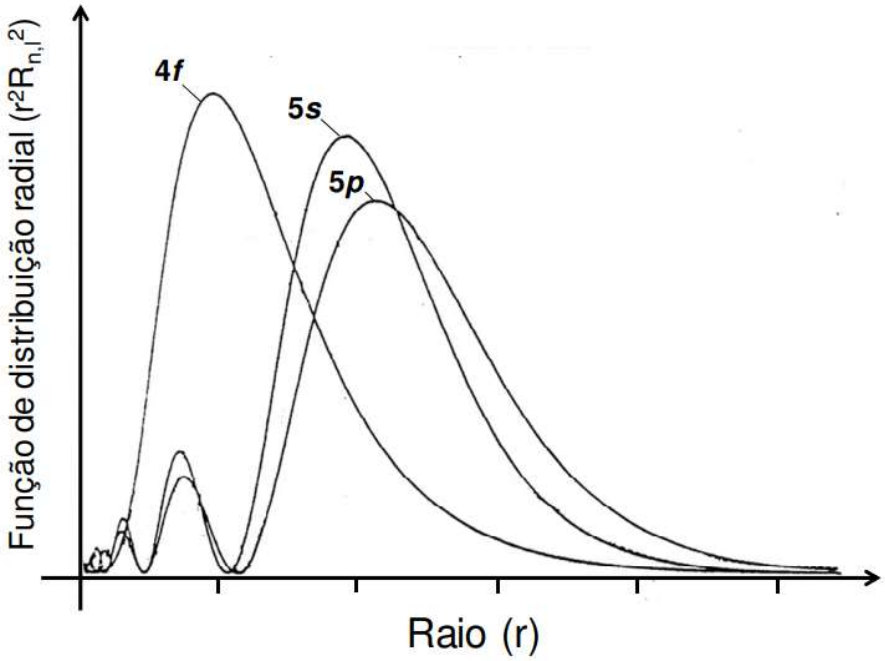

Figura 12. Funções de distribuição radial para os orbitais 4f, 5s e 5p, no caso para o íon Nd^{3+} livre, ilustrando a natureza interna dos orbitais 4f. Fonte: Bünzli e Choppin [87].

Desse modo, esses cátions se coordenam preferencialmente com bases duras, principalmente àquelas contendo como átomos doadores o oxigênio e o nitrogênio, então as estruturas das matrizes utilizadas nesse projeto, como os grupos carboxilato da GG ou as hidroxilas dos CNC, são sítios em potencial para coordenação dos íons lantanídeos.

A partir dessa distribuição eletrônica, pode se entender também a contração lantanídica, que é a diminuição progressiva dos raios atômicos e iônicos devido ao baixo poder de blindagem dos elétrons 4f, o que resulta em um aumento da carga nuclear efetiva sobre os elétrons $5s^2$ e $5p^6$ com o aumento do número atômico no período [79,86]. Como consequência disso, a basicidade dos elementos diminui ao longo da série e, além dessa diferença afetar sutilmente a solubilidade deles, essa mudança química é aproveitada na separação dos lantanídeos por métodos de fracionamento.

Apesar de suas distribuições eletrônicas induzirem propriedades químicas muito semelhantes, o preenchimento progressivo dos orbitais 4f ao longo da série dos lantanídeos resulta em propriedades físicas características ao grupo em relação à espectroscopia e magnetismo [80]. Como visto, suas propriedades eletrônicas são pouco perturbadas pela interação com ligantes, o que resulta em bandas finas de emissão em espectros eletrônicos comparáveis

às de transições atômicas; ademais, as transições apresentam tempos de vidas relativamente longos de seus estados excitados, de microssegundos a milissegundos [78].

A baixa influência que o campo cristalino tem na quebra de degenerescência dos níveis eletrônicos faz com que os níveis 4f dos íons lantanídeos possuam energias específicas, variando pouco em um diagrama de energia (Figura 13). Porém, a interação do campo cristalino influencia diretamente na intensidade das transições f-f, uma vez que a maioria delas acontecem por mecanismo de dipolo elétrico, sendo proibidas pela regra de Laporte [82,86,88]. No entanto, caso o íon lantanídeo esteja em um sítio sem centro de inversão, tal regra é relaxada devido a termos de paridade ímpares no hamiltoniano de campo ligante e, por ser proibida, a transição apresenta um longo tempo de vida para o estado excitado [82].

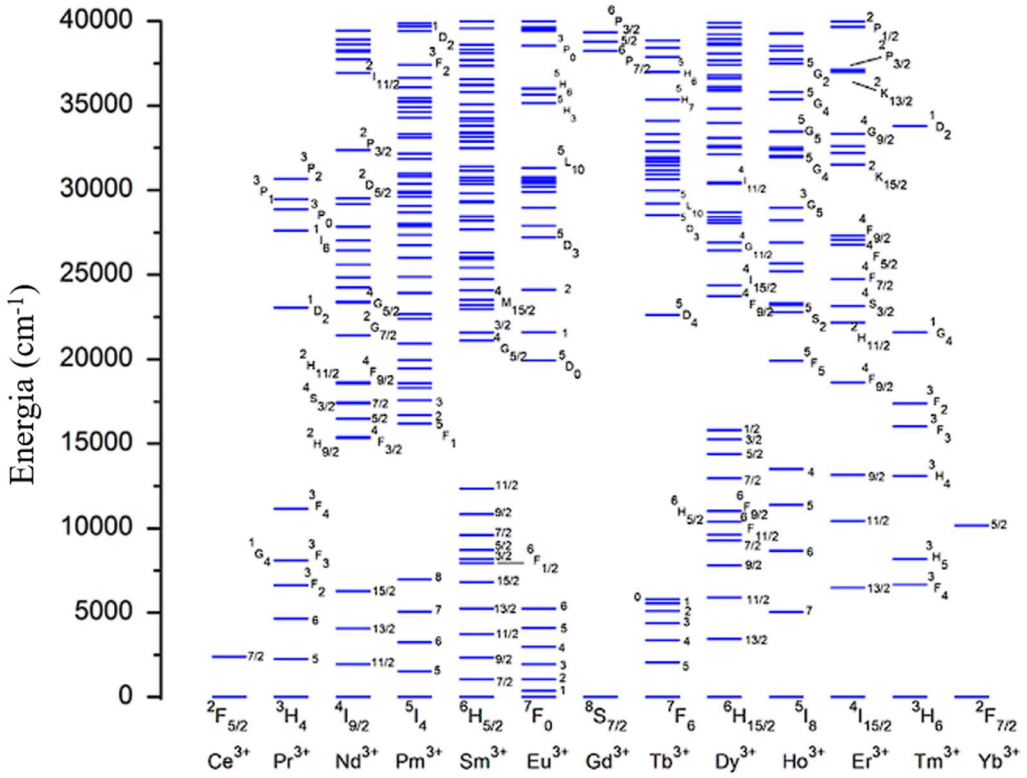

Figura 13. Níveis de energia calculados de íon lantanídeos trivalentes na faixa de energia até 40.000 cm^{-1}. Fonte: adaptado de Ma et al. [88].

Nos íons livres, os níveis de energia dos lantanídeos são descritos por um Hamiltoniano considerando a interação resultante (Figura 14) do campo central (H_0), o acoplamento spin-órbita (H_{SO}) e a repulsão intereletrônica (H_{RE}), de acordo com a equação 1.

$$H_{\text{íon livre}} = H_0 + H_{RE} + H_{SO} \qquad \textit{(Equação 1)}$$

O H_0 depende dos números quânticos principal e de momento angular e separa as diferentes configurações eletrônicas (5p, 4f, 5d) em aproximadamente 10^5 cm^{-1} em energia [89,90]. A degenerescência das configurações 4f é removida pela interação de repulsão intereletrônica (H_{RE}), inerente aos sistemas multieletrônicos, resultando em termos $^{(2S+1)}L$. Esses termos são afetados pelo acoplamento spin-órbita (H_{SO}), que remove a degenerescência dos termos $^{(2S+1)}L$ em relação aos seus componentes 2S + 1 do momento angular total, resultando nos níveis $^{(2S+1)}L_J$.

A perturbação causada pelo ambiente químico ao redor do íon livre diminui a simetria do campo esférico e quebra a degenerescência desses níveis em J dando origem aos níveis Stark, que podem se dividir em um máximo de 2J + 1 a depender da simetria do campo ligante [89,91]. Tal perturbação é descrita pelo Hamiltoniano de campo cristalino (HCC), que somado ao Hamiltoniano de íon livre resulta no Hamiltoniano total, como mostra a equação 2.

$$H = H_{\text{íon livre}} + H_{CC} \qquad \textit{(Equação 2)}$$

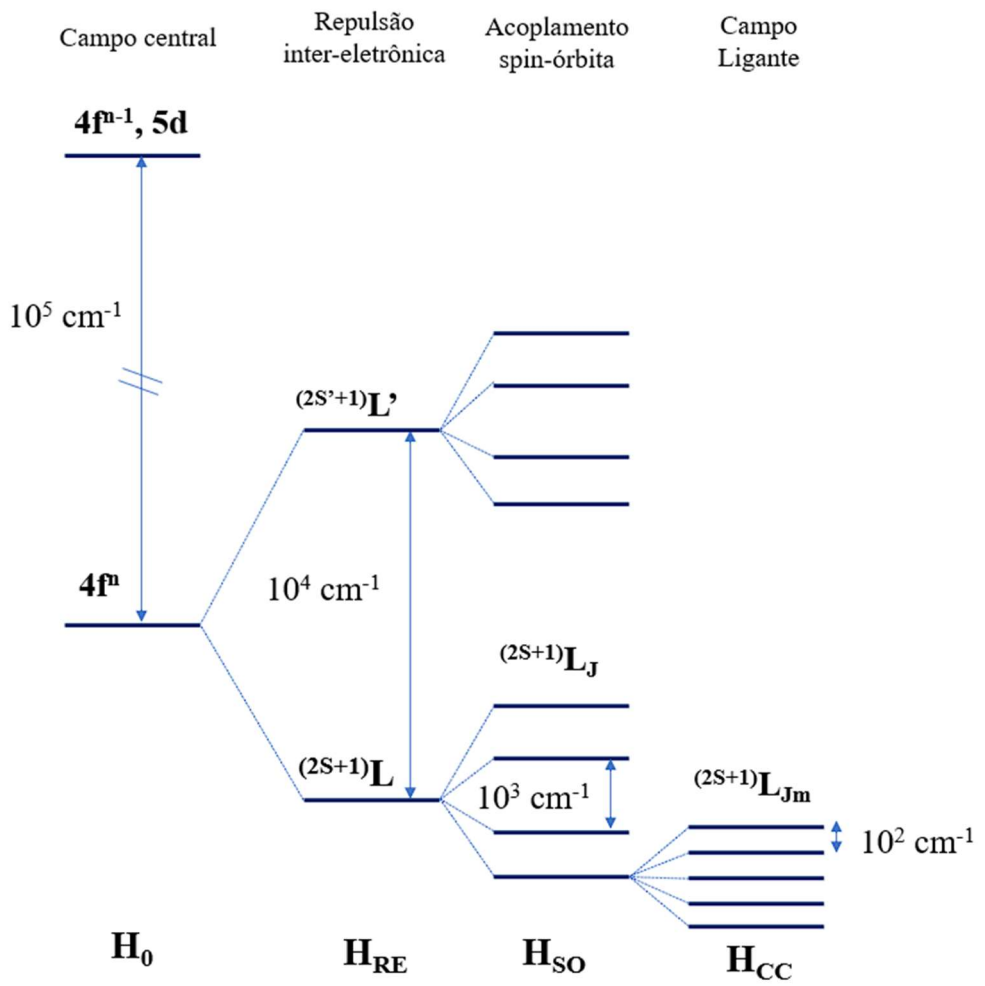

Figura 14. Representação com as principais perturbações que levam ao desdobramento dos níveis de energia dentro de uma configuração $4f^n$ dos lantanídeos. Fonte: adaptado de Sousa Filho et al. [91].

1.2.1. Íon Európio

O Eu^{3+} possui a configuração eletrônica $[Xe]4f^6$, com 54 dos seus 60 elétrons distribuídos nas camadas fechadas do átomo de xenônio e 6 elétrons na camada 4f, sendo estes protegidos do ambiente externo pelos orbitais $5s^2$ e $5p^6$. Os seis elétrons na camada 4f podem ser organizados de 3003 microestados diferentes nos sete orbitais 4f, e distribuídos em 119 multipletos que por conta da interação spin-órbita originam 295 níveis de energia diferentes. Seu termo espectroscópico de menor energia é um septeto (2S + 1) e o momento orbital de menor energia é representado pela letra F (L = 3), assim, tem-se ^7F_J e J podendo assumir valores de $0 < J < 6$ (entre |L + S| e |L – S|), o que resulta no fundamental sendo $^7F_0$ (Figura 15) [92].

A partir da excitação do íon com uma fonte de energia referente ao ultravioleta, os níveis energéticos superiores relaxam não radiativamente e populam o estado $^5D_0$. A partir deste estado excitado então podem ser observadas as emissões atribuídas a transições para os estados ^7F_J de mais baixa energia, exibindo uma luminescência característica de cor vermelha [93,94]. O estado $^5D_0$ não é desdobrado pelo campo cristalino pois possui J = 0 e os valores finais de J para os estados ^7F_J são baixos, propriedades que tornam as análises dessas transições relativamente simples em um espectro eletrônico para a obtenção informações sobre a estrutura em que o íon está ocupando [92]. Desta forma, o uso do Eu^{3+} é muito interessante para o início da caracterização espectroscópica de novos materiais, o que o qualifica como uma sonda estrutural. O preparo de biocompósitos a base de CNC e GG com a presença de íons Eu^{3+}, além de ter o potencial para o desenvolvimento de novos sistemas fotônicos biocompatíveis, permite o estudo da mudança estrutural a nível molecular dessas matrizes através de análises espectroscópicas, via alteração na esfera de coordenação do íon lantanídeo.

A transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ (Figura 15) ocorre por dipolo elétrico e aparece em um espectro entre 570 e 585 nm, com intensidade variando de muito fraca a forte, dependendo da simetria que o íon está inserido, porém apresentando apenas uma banda nessa região já que sua degenerescência é igual a 1 (J = 0 e 2J + 1 = 1). Segundo a regra de seleção para J, essa transição é estritamente proibida pelo J inicial e final serem 0, porém ela ocorre devido a uma relaxação na regra pela mistura de J quando o Eu^{3+} está localizado em um ambiente de ligante não esfericamente simétrico [94].

A transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ é a única que ocorre unicamente por mecanismo de dipolo magnético e, por conta disso, sua intensidade integrada é independente da mudança do campo cristalino [95]. Ela pode então ser considerada como uma constante em um espectro eletrônico e usada como referência para a análise da intensidade das demais transições do Eu^{3+}, como na comparação da razão de intensidades entre as bandas $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$ e $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ de diferentes compostos por exemplo, ou ainda permitindo a realização de cálculos de parâmetros de intensidade e de eficiência de emissão do nível $^5D_0$ [94]. A banda dessa transição ocorre entre 585 e 600 nm, e pode ser desdobrada pelo campo cristalino em até três componentes, além de se apresentar mais intensa que a transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ nos espectros de sólidos com estrutura cristalina de alta simetria.

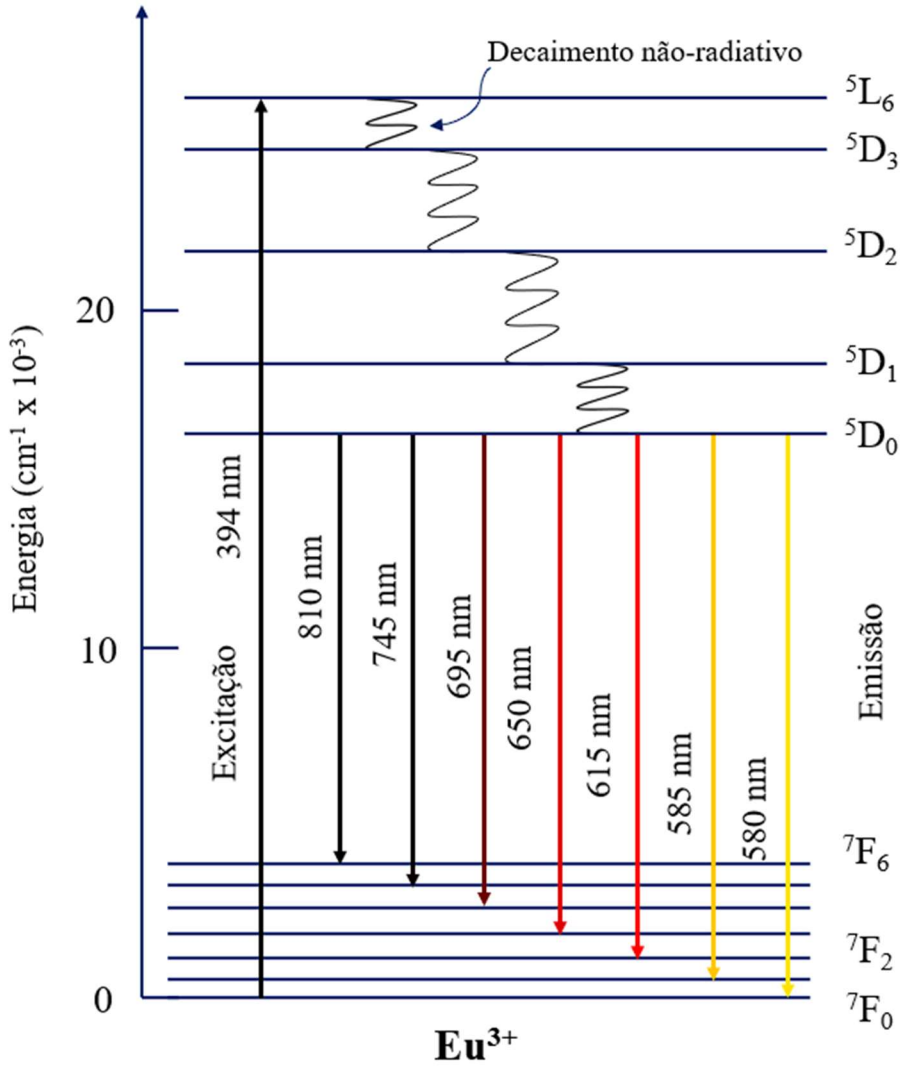

Figura 15. Níveis de energia do íon Eu^{3+} e suas transições eletrônicas. Fonte: adaptado de Syamchand e Sony [92].

A transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ é chamada de hipersensível, já que a intensidade desta é muito influenciada pelo ambiente químico em que íon está inserido e pela natureza dos ligantes. Ocorre entre 610 e 630 nm e é usada, geralmente, para caracterizar o grau de simetria do sítio de coordenação do íon Eu^{3+}, ao passo que não é observada ou apresenta baixa intensidade quando o íon está ambientes de alta simetria, por outro lado, sua intensidade é muito alta em ambientes fortemente assimétricos [92,94].

Com os espectros de emissão do íon Eu^{3+}, e com base na intensidade da transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, é possível obter valores de coeficientes de emissão espontânea ($A_{0\lambda}$), a partir da intensidade integrada das bandas de emissão ($S_{0\lambda}$) e do baricentro da transição f–f ($\nu_{0\lambda}$). Os

cálculos seguem a equação 3 [90,96], utilizando como referência o coeficiente de emissão para a transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$, sendo equivalente à $A_{01} = 15.n^3$, e *n* é o índice de refração do meio em que o íon está inserido.

$$A_{0\lambda} = A_{01}\left(\frac{S_{0\lambda}}{S_{01}}\right)\left(\frac{\upsilon_{01}}{\upsilon_{0\lambda}}\right) \qquad \textit{(Equação 3)}$$

Somando-se os valores calculados para cada uma das transições do espectro, tem-se o coeficiente de emissão espontânea (A_{total}) para o nível $^5D_0$ (equação 4) e o seu inverso é tido como o tempo de vida radioativo (equação 5).

$$A_{total} = \sum A_{0J} = A_{00} + A_{01} + A_{02} + A_{03} + A_{04} \qquad \textit{(Equação 4)}$$

$$\tau_{RAD} = \frac{1}{A_{total}} \qquad \textit{(Equação 5)}$$

Com este valor e os dados de tempo de vida experimental para a amostra, a eficiência quântica da emissão relativa ao nível $^5D_0$ pode ser calculada pela equação 6.

$$\eta = \frac{\tau_{exp}}{\tau_{rad}} \qquad \textit{(Equação 6)}$$

Também a partir desses espectros, podem ser determinados parâmetros de intensidade de Judd-Ofelt experimental Ω_2 e Ω_4 usando a equação 7 onde, $\chi = n(n + 2)^2/9$ é a correção de campo local de Lorentz e n novamente o índice de refração do meio, ω é a frequência angular do campo de radiação incidente, e $\langle 7F_\lambda || U^{(\lambda)} || {}^5D_0 \rangle$ são iguais a 0,0032 e 0,0023 para Ω_2 e Ω_4, respectivamente:

$$\Omega_\lambda = \frac{3\hbar c^3 A_{0\lambda}}{4e^2\omega^3\chi\langle 7F_\lambda || U^{(\lambda)} || {}^5D_0\rangle^2} \qquad \textit{(Equação 7)}$$

Como geralmente a transição $^5D_0 \rightarrow {}^7F_6$ não é detectada nos espectros, o valor experimental de Ω_6 não é considerado. No estudo espectroscópico de amostras dopadas com o íon europio, os parâmetros de Judd-Ofelt podem avaliar de modo comparativo o ambiente de coordenação do íon, em relação a simetria local (Ω_2) e à fatores de covalência (Ω_4) [90].

1.2.1. Transferência de energia

A luminescência por excitação direta do íon lantanídeo é limitada pela baixa capacidade de absorção de luz devido à natureza transição f-f, que é proibida por Laporte, diminuindo a probabilidade de transições f-f, e sendo um ponto a ser superado na preparação de materiais luminescentes. Tal propriedade resulta em coeficientes de absorção molar ε baixos (menores que 10 L mol^{-1} cm^{-1}) para a maioria das transições nos espectros de absorção, ou seja, apenas uma pequena parte de radiação é absorvida por excitação direta nos níveis 4f [97].

O nível emissor $^5D_0$ do Eu^{3+}, por exemplo, pode então ser povoado com maior eficiência pela sensibilização de um ligante orgânico de alto coeficiente de absorção molar, o qual apresenta maior eficiência de excitação pela absorção de luz na região do ultravioleta [98]. A coordenação do íon Eu^{3+} ao ligante pode acarretar bandas de emissão relativamente intensas do íon lantanídeo por meio da transferência de energia intramolecular do ligante ao íon lantanídeo, em um fenômeno conhecido como efeito antena [85].

A eficiência deste processo depende da seleção do ligante adequado para determinado íon lantanídeo, visando a formação de complexos. Os β-dicetonatos fazem parte de um grupo de ligantes comumente estudados em complexos trivalentes de lantanídeos devido à sua grande capacidade de atuar como sensibilizadores, exibindo uma alta eficiência quântica, bandas estreitas de emissão e boa estabilidade termodinâmica [99,100]. Embora complexos de β-dicetonato possam sofrer fotodecomposição sob irradiação UV de longo prazo, esse efeito pode ser atenuado incorporando esses complexos em híbridos orgânicos/inorgânicos ou ainda polímeros, o que permite ampliar o campo de aplicação desses complexos, como exemplo, em materiais emissores em novos tipos de OLEDs [101]. Sua intensa luminescência é também amplamente explorada para aplicações como sondas luminescentes em bioensaios, diagnóstico em análises clínicas por bioimageamento, dispositivos como sensores UV e como laser [102].

O Eu^{3+} é um íon de grande importância para a formação desse tipo de sistema, recebendo grande atenção no estudo de materiais de alta intensidade de luminescência, e a sua interação com ligante β-dicetonato 2-tenoiltrifluoroacetona (TTA) resulta no complexo $(Eu(TTA)_3$, ou Európio (III) tenoiltrifluoroacetonato (Figura 16), já amplamente relatado na literatura [103–105] e, também, utilizado nos estudos desse trabalho. O preparo de materiais de matriz a base de GG e CNC dopados com Eu^{3+} e a sua interação com tal ligante buscou a obtenção desse complexo e,

consequentemente, um material com uma luminescência de emissões intensas, com base na transferência de energia do ligante orgânico para o íon europio.

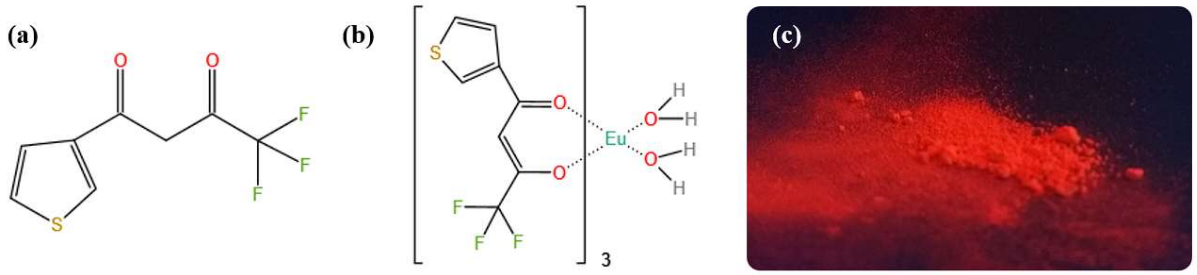

Figura 16. (a) estrutura química do ligante TTA e do (b) complexo hidratado formado com interação com o Europio, $Eu(TTA)_3.2\ H_2O$ e a (c) luminescência vermelha característica do complexo em pó. Fonte: (a) e (b) adaptados de Forster et al. [104] e (c) o autor.

Quando um complexo é irradiado por luz ultravioleta, os seus ligantes orgânicos absorvem fortemente em uma ampla faixa de comprimento de onda e seus elétrons são excitados a um nível vibracional do primeiro estado singleto excitado, que sofre rapidamente conversão interna para níveis vibracionais mais baixos do estado S1 (Figura 17) [106]. Elétrons neste estado excitado podem decair para o estado fundamental (fluorescência) ou ocorrer um cruzamento intersistema (ISC) não radiativamente do estado singleto S1 para o estado tripleto T1 de menor energia. No estado excitado T1, o elétron pode decair radiativamente para o estado fundamental (fosforescência) ou via transferência de energia do estado tripleto do ligante ao estado excitado do íon lantanídeo [99,107].

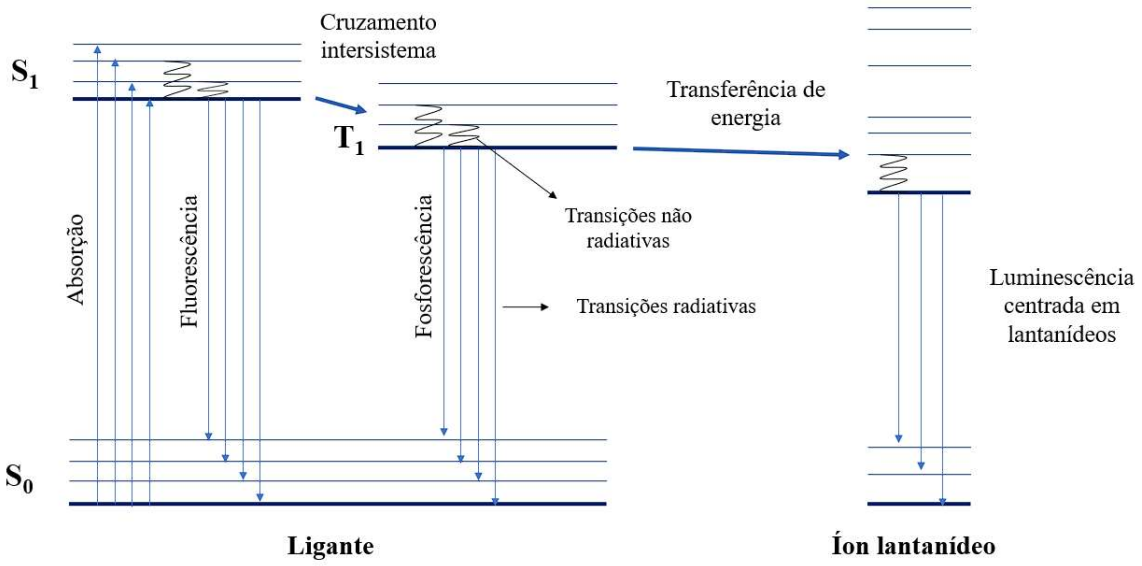

Figura 17. Esquema de níveis de energia mostrando a transferência de energia do ligante para o íon lantanídeo. Fonte: adaptado de Binnemans [99].

Para que isso ocorra, é necessário que a energia do nível T1 esteja em ressonância com o nível excitado do íon lantanídeo. Outro fenômeno que pode também ocorrer é a retrotransferência de energia do íon lantanídeo para o estado tripleto, tendo a eficiência desses processos dependentes da energia dos níveis tripleto do ligante e nível emissor do lantanídeo. No caso do sistema TTA e Eu^{3+}, a energia é transferida para qualquer um dos níveis de ^5D_J, sendo o nível emissor $^5D_0$ (17227 cm^{-1}) [94] o mais provável, porém caso não seja, a energia de excitação é dissipada por processos não radiativos até esse nível [108]. A partir do $^5D_0$ há o decaimento radiativo para qualquer um dos níveis ^7F_J e a emissão ocorre em energias menores (ou seja, em comprimentos de onda maiores) do que aquela absorvida inicialmente pelo ligante.

2. Objetivos

2.1. Geral

Síntese de compósitos de Goma Gelana dopada com íons Eu^{3+} e nanocristais de celulose visando à obtenção de materiais para impressão 3D, seja na construção de *scaffolds* nanofibrosos ou sensores luminescentes.

2.2. Específicos

- Preparação de géis de dois tipos de goma gelana com várias concentrações de íons Eu^{3+};
- Preparação de filmes de dois tipos de goma gelana com apenas íons Eu^{3+} e complexos de íons Eu^{3+};
- Obtenção das nanocristais de celulose partindo de membranas de celulose bacteriana;
- Preparação de compósitos de nanocristais de celulose e goma gelana em diferentes composições;
- Avaliar as propriedades físicas, mecânicas e térmicas dos materiais obtidos;
- Estudos espectroscópicos utilizando os íons Eu^{3+} como sonda estrutural;
- Caracterização morfológica desses materiais;
- Obtenção de *scaffolds* nanofibrosos por impressão 3D.

5. Conclusão

Géis de GG com adição de Eu^{3+} foram obtidos de forma inédita, e os estudos estruturais confirmaram que o íon lantanídeo promoveu a reticulação da cadeia do polissacarídeo, e alterou gradativamente as propriedades viscoelásticas do material, o que foi evidenciado por estudos de reologia oscilatória. Esses testes indicaram que esse efeito foi acentuado na forma desacetilada da GG, provavelmente devido à ausência de grupos acil existentes na outra forma. A presença do íon na rede polimérica reduziu sua resistência reticular, de modo que essas amostras quebraram em tensões mais baixas, mas o comportamento do gel consolidado foi mantido. As concentrações de Eu^{3+} testadas foram capazes de manter gradativamente a estrutura dos géis mesmo com o aumento da variação de temperatura, uma vantagem sobre os géis puros, que pode vir a ser explorada. Tais propriedades podem ser favoráveis para sua utilização em estruturas tridimensionais biocompatíveis, por meio da impressão por extrusão para obtenção de *scaffolds* visando uma possível aplicação deste material.

A análise de luminescência dos filmes de LAGG e HAGG mostrou uma eficiência reduzida na transferência de energia entre as matrizes e o íon lantanídeo. O perfil de emissão indicou que o íon Eu^{3+} se encontrava em um ambiente de baixa simetria e possuía uma luminescência de baixa intensidade, uma vez que a GG apresenta diferentes grupos capazes de promover a desexcitação dos níveis emissores. Apesar disso, os tempos de vida para o estado excitado $^5D_0$ foram relativamente altos quando comparados a matrizes com alta concentração de grupos OH. Esses dados podem indicar que a interação entre Eu^{3+}e a GG foi fraca, mas suficiente para estabilizar o íon Eu^{3+} na matriz, estabilizando a estrutura do gel na forma de uma ponte intermolecular com os oxigênios carboxílicos do polissacarídeo. A emissão do material pôde ser intensificada com a adição do ligante TTA, mesmo abaixo da proporção estequiométrica do complexo formado por ele. Tempos de vida mais longos do estado excitado $^5D_0$ do que os relatados para o complexo hidratado também indicam que o Eu^{3+} foi coordenado em um ambiente com baixa concentração de grupos O-H. Esses resultados mostraram a possibilidade de se obter um material luminescente de alta intensidade com GG, além de realizar um estudo estrutural inédito da matriz, que é biocompatível e possui propriedades luminescentes promissoras. Este trabalho pioneiro abre caminho para o estudo do uso desses materiais obtidos a partir da interação de lantanídeos com essas matrizes.

Os CNC obtidos a partir de celulose bacteriana, utilizando o método de hidrólise com uma mistura de ácidos clorídrico e sulfúrico, permitiram que os compósitos formados por diferentes proporções de celulose em um filme de LAGG dopado com Eu^{3+} mantivesse as propriedades luminescentes anteriormente encontradas para a GG. Esse material pôde ter a sua emissão intensificada através do tratamento com o ligante TTA, que também se mostrou eficiente para essa matriz compósita. Além disso, a CNC agiu de modo satisfatório como fase de reforço, melhorando progressivamente as propriedades mecânicas do material.

Por fim, o gel preparado com LAGG dopado com Eu^{3+} e CNC possuiu propriedades adequadas para impressão baseada em extrusão, sendo capaz de ser aplicado na manufatura aditiva na obtenção de peças tridimensionais com formas e estruturas também satisfatórias. Diferentes aplicações podem ser consideradas para esse material utilizando-se dessa técnica, dentre elas a área de engenharia de tecidos.

6. Referências bibliográficas

1. Lawrence, B. D., Cronin-Golomb, M., Georgakoudi, I., Kaplan, D. L. & Omenetto, F. G. Bioactive silk protein biomaterial systems for optical devices. *Biomacromolecules* **9**, 1214–1220 (2008).

2. Altman, G. H. *et al. Silk-based biomaterials*. *Biomaterials* vol. 24 (2003).

3. John, M. J. & Thomas, S. Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate Polymers* vol. 71 343–364 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.040 (2008).

4. Humar, M. *et al.* Toward biomaterial-based implantable photonic devices. *Nanophotonics* vol. 6 414–434 Preprint at https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0003 (2017).

5. Shabahang, S., Kim, S. & Yun, S. H. Light-Guiding Biomaterials for Biomedical Applications. *Adv Funct Mater* **28**, (2018).

6. Safaee, M. M., Gravely, M. & Roxbury, D. A Wearable Optical Microfibrous Biomaterial with Encapsulated Nanosensors Enables Wireless Monitoring of Oxidative Stress. *Adv Funct Mater* **31**, (2021).

7. Sultan, S. & Mathew, A. P. 3D printed scaffolds with gradient porosity based on a cellulose nanocrystal hydrogel. *Nanoscale* **10**, 4421–4431 (2018).

8. Silva-Correia, J. *et al.* Gellan gum-based hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* **5**, (2011).

9. Dugan, J. M., Gough, J. E. & Eichhorn, S. J. Bacterial cellulose scaffolds and cellulose nanowhiskers for tissue engineering. *Nanomedicine* vol. 8 287–298 Preprint at https://doi.org/10.2217/nnm.12.211 (2013).

10. Pereira, D. R. *et al.* Development of gellan gum-based microparticles/hydrogel matrices for application in the intervertebral disc regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* **17**, 961–972 (2011).

11. Bacelar, A. H., Silva-Correia, J., Oliveira, J. M. & Reis, R. L. Recent progress in gellan gum hydrogels provided by functionalization strategies. *Journal of Materials Chemistry B* vol. 4 6164–6174 Preprint at https://doi.org/10.1039/c6tb01488g (2016).

12. Sanderson, G. R. Gellan Gum. in *Food Gels* (ed. Harris, P.) vol. 1 (Springer Netherlands, 1990).

13. Costa, L., Silva-Correia, J., Oliveira, J. M. & Reis, R. L. Gellan Gum-Based Hydrogels for Osteochondral Repair. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1058 281–304 (Springer New York LLC, 2018).

14. Morris, E. R., Nishinari, K. & Rinaudo, M. Gelation of gellan - A review. *Food Hydrocolloids* vol. 28 373–411 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.004 (2012).

15. Gibson, W. & Sanderson, G. R. Gellan Gum. in *Thickening and Gelling Agents for Food* (ed. Imeson, A.) 119–143 (Springer, 1997).

16. Ferris, C. J., Gilmore, K. J., Wallace, G. G. & Panhuis, M. in het. Modified gellan gum hydrogels for tissue engineering applications. *Soft Matter* **9**, 3705–3711 (2013).

17. Grasdalen, H. & Smidsrod, O. Gelation of Geilan Gum. *Carbohydr Polym* **7**, 371–393 (1987).

18. Moorhouse, R., Colegrove, G. T., Sandford, P. A., Baird, J. K. & Kang, K. S. PS-60: A New Gel-Forming Polysaccharide. in *Solution Properties of Polysaccharides* (ed. Brant, D. A.) (American Chemistry Society, 1981).

19. Bajaj, I. B., Survase, S. A., Saudagar, P. S. & Singhal, R. S. Gellan Gum: Fermentative Production, Downstream Processing and Applications.

20. Tako, M., Teruya, T., Tamaki, Y. & Konishi, T. Molecular origin for rheological characteristics of native gellan gum. *Colloid Polym Sci* **287**, 1445–1454 (2009).

21. Brasil. *Portaria nº 503 de 22/06/1998*. (Secretaria de Vigilância em Saúde, 1998).

22. Yu, I., Kaonis, S. & Chen, R. A Study on Degradation Behavior of 3D Printed Gellan Gum Scaffolds. in *Procedia CIRP* vol. 65 78–83 (Elsevier B.V., 2017).

23. Jaafar, A. M. & Thatchinamoorthi, V. Preparation and Characterisation of Gellan Gum Hydrogel containing Curcumin and Limonene. in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* vol. 440 (Institute of Physics Publishing, 2018).

24. Sworn, G. & Stouby, L. Gellan gum. in *Handbook of Hydrocolloids* 855–885 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/b978-0-12-820104-6.00009-7.

25. Manna, B., Gambhir, A. & Ghosh, P. *Production and rheological characteristics of the microbial polysaccharide gellan*. *Letters in Applied Microbiology* vol. 23 (1996).

26. Dreveton, I., Monot, F., Ballerini, D., Lecourtier, J. & Choplin, L. *Effect of Mixing and Mass Transfer Conditions on Gellan Production by Auromonas elodea*. *JOUgNAI Or F~R~NTATION AND BIO~NGn~E~gIN~* vol. 77 (1994).

27. Fialho, A. M. *et al.* Occurrence, production, and applications of gellan: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 79 889–900 Preprint at https://doi.org/10.1007/s00253-008-1496-0 (2008).

28. Giavasis, I., Harvey, L. M. & McNeil, B. Gellan gum. *Critical Reviews in Biotechnology* vol. 20 177–211 Preprint at https://doi.org/10.1080/07388550008984169 (2000).

29. Lee, S. Y. *et al.* Phenotypic and proteomic analysis of positively regulated gellan biosynthesis pathway in Sphingomonas elodea. *Anim Cells Syst (Seoul)* **21**, 115–123 (2017).

30. Gibson, W. Gellan gum. in *Thickening and Gelling Agents for Food* 227–249 (Springer US, 1992). doi:10.1007/978-1-4615-3552-2_10.

31. Silva-Correia, J. *et al.* Biocompatibility evaluation of ionic- and photo-crosslinked methacrylated gellan gum hydrogels: In vitro and in vivo study. *Adv Healthc Mater* **2**, 568–575 (2013).

32. Robinson, G., Manning, C. E. & Morris, E. R. *Conformation and Physical Properties of the Bacterial Polysaccharides G el Ian, Welan, and Rhamsan*.

33. Miyoshi, E., Takaya, T. & Nishinari, K. Rheological and thermal studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions. *Carbohydr Polym* **30**, 109–119 (1996).

34. Osmałek, T. Z., Froelich, A., Jadach, B. & Krakowski, M. Rheological investigation of high-acyl gellan gum hydrogel and its mixtures with simulated body fluids. *J Biomater Appl* **32**, 1435–1449 (2018).

35. Pereira, D. R. *et al.* Gellan gum-based hydrogel bilayered scaffolds for osteochondral tissue engineering. in *Key Engineering Materials* vol. 587 255–260 (Trans Tech Publications Ltd, 2014).

36. Oliveira, J. T. *et al.* Gellan gum: A new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* **93**, 852–863 (2010).

37. Lee, H., Fisher, S., Kallos, M. S. & Hunter, C. J. Optimizing gelling parameters of gellan gum for fibrocartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **98 B**, 238–245 (2011).

38. Smith, A. M., Shelton, R. M., Perrie, Y. & Harris, J. J. An initial evaluation of gellan gum as a material for tissue engineering applications. *J Biomater Appl* **22**, 241–254 (2007).

39. Razali, M. H., Ismail, N. A., Mohd Zulkafli, M. F. A. & Amin, K. A. M. 3D Nanostructured materials: TiO2 nanoparticles incorporated gellan gum scaffold for photocatalyst and biomedical Applications. *Mater Res Express* **5**, (2018).

40. Wan, J. C. *et al.* Hydrophilized polycaprolactone nanofiber mesh-embedded poly(glycolic-co- lactic acid) membrane for effective guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* **91**, 400–407 (2009).

41. Chang, S.-J. *et al. Gellan Gum Films for Effective Guided Bone Regeneration*. *Article in Journal of Medical and Biological Engineering* vol. 30 https://www.researchgate.net/publication/267224657 (2010).

42. Abdallah, W. & Kamal, M. R. Influence of process variables on physical characteristics of spray freeze dried cellulose nanocrystals. *Cellulose* **25**, 5711–5730 (2018).

43. Vasconcelos, N. F. *et al.* Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. *Carbohydr Polym* **155**, 425–431 (2017).

44. Siaueira, G., Bras, J. & Dufresne, A. Cellulose whiskers versus microfibrils: Influence of the nature of the nanoparticle and its surface functionalization on the thermal and mechanical properties of nanocomposites. *Biomacromolecules* **10**, 425–432 (2009).

45. Taipina, M. O., Ferrarezi, M. M. F. & Gonçalves, M. C. *WHISKERS DE CELULOSE: PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE*.

46. Eyley, S. & Thielemans, W. Surface modification of cellulose nanocrystals. *Nanoscale* **6**, 7764–7779 (2014).

47. Vanderfleet, O. M. & Cranston, E. D. Production routes to tailor the performance of cellulose nanocrystals. *Nature Reviews Materials* vol. 6 124–144 Preprint at https://doi.org/10.1038/s41578-020-00239-y (2021).

48. Ibrahim, M. M., El-Zawawy, W. K. & Nassar, M. A. Synthesis and characterization of polyvinyl alcohol/nanospherical cellulose particle films. *Carbohydr Polym* **79**, 694–699 (2010).

49. Wulandari, W. T., Rochliadi, A. & Arcana, I. M. Nanocellulose prepared by acid hydrolysis of isolated cellulose from sugarcane bagasse. in *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* vol. 107 (Institute of Physics Publishing, 2016).

50. Siqueira, G., Bras, J. & Dufresne, A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. *Polymers* vol. 2 728–765 Preprint at https://doi.org/10.3390/polym2040728 (2010).

51. Jiang, F. & Hsieh, Y. lo. Chemically and mechanically isolated nanocellulose and their self-assembled structures. *Carbohydr Polym* **95**, 32–40 (2013).

52. Silva, D. de J. & D'Almeida, M. L. O. Nanocristais de celulose. *O Papel* **70**, 34–52 (2009).

53. Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A. & Bras, J. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers* vol. 90 735–764 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026 (2012).

54. Yu, H. Y. *et al.* Comparison of the reinforcing effects for cellulose nanocrystals obtained by sulfuric and hydrochloric acid hydrolysis on the mechanical and thermal properties of bacterial polyester. *Compos Sci Technol* **87**, 22–28 (2013).

55. Yu, H. *et al.* Facile extraction of thermally stable cellulose nanocrystals with a high yield of 93% through hydrochloric acid hydrolysis under hydrothermal conditions. *J Mater Chem A Mater* **1**, 3938–3944 (2013).

56. Pandey, J. K., Nakagaito, A. N. & Takagi, H. Fabrication and applications of cellulose nanoparticle-based polymer composites. *Polymer Engineering and Science* vol. 53 1–8 Preprint at https://doi.org/10.1002/pen.23242 (2013).

57. Lin, N. & Dufresne, A. Surface chemistry, morphological analysis and properties of cellulose nanocrystals with gradiented sulfation degrees. *Nanoscale* **6**, 5384–5393 (2014).

58. Cheng, M. *et al.* Efficient Extraction of Cellulose Nanocrystals through Hydrochloric Acid Hydrolysis Catalyzed by Inorganic Chlorides under Hydrothermal Conditions. *ACS Sustain Chem Eng* **5**, 4656–4664 (2017).

59. Lin, K. H., Enomae, T. & Chang, F. C. Cellulose Nanocrystal Isolation from Hardwood Pulp using Various Hydrolysis Conditions. *Molecules* **24**, (2019).

60. Zhang, J., Elder, T. J., Pu, Y. & Ragauskas, A. J. Facile synthesis of spherical cellulose nanoparticles. *Carbohydr Polym* **69**, 607–611 (2007).

61. 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* vol. 6 612–626 Preprint at https://doi.org/10.1021/bm0493685 (2005).

62. Kvien, I., Tanem, B. S. & Oksman, K. Characterization of cellulose whiskers and their nanocomposites by atomic force and electron microscopy. *Biomacromolecules* **6**, 3160–3165 (2005).

63. Eichhorn, S. J. *et al.* Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *Journal of Materials Science* vol. 45 1–33 Preprint at https://doi.org/10.1007/s10853-009-3874-0 (2010).

64. Martínez-Sanz, M., Lopez-Rubio, A. & Lagaron, J. M. Optimization of the nanofabrication by acid hydrolysis of bacterial cellulose nanowhiskers. *Carbohydr Polym* **85**, 228–236 (2011).

65. Iguchi, M., YAMANAKA Ajinomoto Central Research, S. & Budhiono, J. A. *Review Bacterial cellulose-a masterpiece of nature's arts*.

66. Huang, Y. *et al.* Recent advances in bacterial cellulose. *Cellulose* vol. 21 1–30 Preprint at https://doi.org/10.1007/s10570-013-0088-z (2014).

67. Daguano, J. K. M. B. *et al.* State of the art in the use of bioceramics to elaborate 3D structures using robocasting. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB* **2**, 55 (2019).

68. Chen, Y. *et al.* 3D Bioprinting of shear-thinning hybrid bioinks with excellent bioactivity derived from gellan/alginate and thixotropic magnesium phosphate-based gels. *J Mater Chem B* **8**, 5500–5514 (2020).

69. Akkineni, A. *et al.* Highly Concentrated Alginate-Gellan Gum Composites for 3D Plotting of Complex Tissue Engineering Scaffolds. *Polymers (Basel)* **8**, 170 (2016).

70. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue Engineering. *Science (1979)* **260**, 920–926 (1993).

71. An, J., Teoh, J. E. M., Suntornnond, R. & Chua, C. K. Design and 3D Printing of Scaffolds and Tissues. *Engineering* **1**, 261–268 (2015).

72. Millás, A., Lago, J., Vasquez-Pinto, L., Massaguer, P. & Maria-Engler, S. S. Approaches to the development of 3d bioprinted skin models: the case of natura cosmetics. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB* **2**, 03 (2019).

73. Shafiee, A. *et al.* Physics of bioprinting. *Applied Physics Reviews* vol. 6 Preprint at https://doi.org/10.1063/1.5087206 (2019).

74. Loh, Q. L. & Choong, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: Role of porosity and pore size. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* vol. 19 485–502 Preprint at https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437 (2013).

75. Amorim, P. A. *et al.* Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting. *Bioprinting* vol. 22 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00129 (2021).

76. Sultan, S., Siqueira, G., Zimmermann, T. & Mathew, A. P. 3D printing of nano-cellulosic biomaterials for medical applications. *Current Opinion in Biomedical Engineering* vol. 2 29–34 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.06.002 (2017).

77. Boumediene, K., Hammad, M., Dugué, J., Veyssière, A. & Baugé, C. Tissue engineering of different cartilage types: a review of different approaches and recent advances. *International Journal of Advances in Medical Biotechnology - IJAMB* **2**, 14 (2019).

78. Abrão, A. QUíMICA E TECNOLOGIA DAS TERRAS-RARAS.

79. Lucas, J. & Lucas, P. *Rare Earths Science, Technology, Production and Use*. (Elsevier, 2015).

80. Martins, T. S. & Isolani, P. C. Terras raras: aplicações industriais e biológicas. *Quim Nova* **28**, 111–117 (2005).

81. de Sousa Filho, P. C. & Serra, O. A. Terras raras no brasil: Histórico, produção e perspectivas. *Quimica Nova* vol. 37 753–760 Preprint at https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140121 (2014).

82. Bünzli, J.-C. Lanthanides. in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 1–43 (2013).

83. de Sousa Filho, P. C., Galaço, A. R. B. S. & Serra, O. A. Rare earths: Periodic table, discovery, exploration in brazil and applications. *Quimica Nova* vol. 42 1208–1224 Preprint at https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170438 (2019).

84. Gai, S., Li, C., Yang, P. & Lin, J. Recent progress in rare earth micro/nanocrystals: Soft chemical synthesis, luminescent properties, and biomedical applications. *Chemical Reviews* vol. 114 2343–2389 Preprint at https://doi.org/10.1021/cr4001594 (2014).

85. Cotton, S. *Lanthanide and Actinide Chemistry*.

86. Bünzli, J.-C. G. & Eliseeva, S. v. Basics of Lanthanide Photophysics. in 1–45 (2010). doi:10.1007/4243_2010_3.

87. Bünzli, J.-C. G. & Choppin, G. R. *Lanthanide probes in life, chemical, and earth sciences : theory and practice*. (Elsevier, 1989).

88. Ma, C. G. *et al.* Energy level schemes of fN electronic configurations for the di-, tri-, and tetravalent lanthanides and actinides in a free state. *J Lumin* **170**, 369–374 (2016).

89. Malta, O. L. & Carlos, L. D. *INTENSITIES OF 4f-4f TRANSITIONS IN GLASS MATERIALS. Quim. Nova* vol. 26 (2003).

90. Moura, R. T., Carneiro Neto, A. N., Longo, R. L. & Malta, O. L. On the calculation and interpretation of covalency in the intensity parameters of 4f-4f transitions in Eu3+ complexes based on the chemical bond overlap polarizability. *J Lumin* **170**, 420–430 (2016).

91. de Sousa Filho, P. C., Lima, J. F. & Serra, O. A. From lighting to photoprotection: Fundamentals and applications of rare earth materials. *J Braz Chem Soc* **26**, 2471–2495 (2015).

92. Syamchand, S. S. & Sony, G. Europium enabled luminescent nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Luminescence* vol. 165 190–215 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2015.04.042 (2015).

93. Caiut, J. M. A. *et al.* Synthesis and luminescence properties of water dispersible Eu 3+-doped boehmite nanoparticles. *Nanotechnology* **18**, (2007).

94. Binnemans, K. Interpretation of europium(III) spectra. *Coordination Chemistry Reviews* vol. 295 1–45 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.02.015 (2015).

95. Binnemans, K., Herck, K. van & Gisrller-Walrand, C. *Influence of dipicolinate ligands on the spectroscopic properties of europium(III) in solution*. *Chemical Physics Letters* vol. 266 (1997).

96. Jorgensen, C. K. & Reisfeldt, R. *JUDD-OFELT PARAMETERS AND CHEMICAL BONDING*. Journal of the Less-Common Metals* vol. 93 (1983).

97. Malta, O. *et al. Spectroscopic properties of a new light-converting device Eu(thenoyltrifluoroacetonate), 2(dibenzyl sulfoxide). A theoretical analysis based on*

structural data obtained from a sparkle model. *ELSEVIER Journal of Luminescence* vol. 75 (1997).

98. Brito, H. F., Malta, O. L., Souza, L. R., Menezes, J. F. S. & Carvalho, C. A. A. *Luminescence of the ®lms of europium (III) with thenoyltri¯uoroacetonate and macrocyclics*.

99. Binnemans, K. Lanthanide-based luminescent hybrid materials. *Chem Rev* **109**, 4283–4374 (2009).

100. Teotonio, E. E. S. *et al.* Evaluation of intramolecular energy transfer process in the lanthanide(III) bis- and tris-(TTA) complexes: Photoluminescent and triboluminescent behavior. *J Lumin* **128**, 190–198 (2008).

101. Duarte, A. P. *et al.* Structural and luminescence properties of silica-based hybrids containing new silylated-diketonato europium(III) complex. *Journal of Physical Chemistry C* **116**, 505–515 (2012).

102. Nockemann, P. *et al.* Photostability of a highly luminescent europium β-diketonate complex in imidazolium ionic liquids. *Chemical Communications* 4354–4356 (2005) doi:10.1039/b506915g.

103. Liu, Q. *et al.* Synthesis and luminescent properties of Eu(TTA)3·3H2O nanocrystallines. *Luminescence* **25**, 307–310 (2010).

104. Forster, P. L., Lugao, A. B., Brito, H. F. & Parra, D. F. Calorimetric investigations of luminescent films polycarbonate (PC) doped with europium complex [Eu(TTA)3(H2O)2]. *J Therm Anal Calorim* **97**, 497–502 (2009).

105. Lin, J. *et al.* Europium (III) organic complexes in porous boron nitride microfibers: Efficient hybrid luminescent material. *Sci Rep* **6**, (2016).

106. Souza, E. R. & Sigoli, F. A. *PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS E MODELOS DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA INTER E INTRAMOLECULAR*. *Quim. Nova* vol. 35 (2012).

107. Thejo Kalyani, N. & Dhoble, S. J. Organic light emitting diodes: Energy saving lighting technology - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* vol. 16 2696–2723 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.021 (2012).

108. Bünzli, J.-C. G. & Piguet, C. Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chem Soc Rev* **34**, 1048 (2005).

109. Pereira, D. R. *et al.* Nanocellulose reinforced gellan-gum hydrogels as potential biological substitutes for annulus fibrosus tissue regeneration. *Nanomedicine* **14**, 897–908 (2018).

110. Autodesk Tinkercad. *https://www.tinkercad.com* (2021).

111. Simplify3D. *https://www.simplify3d.com/* (2021).

112. Bretas, R. E. S. & D'Ávila, M. A. *Reologia de polímeros fundidos*. (EdUFSCar, 2005).

113. Mezger, T. G. *The Rheology Handbook : 4th Edition.* (Vincentz Network, 2014).

114. Nickerson, M. T., Paulson, A. T. & Speers, R. A. Rheological properties of gellan solutions: Effect of calcium ions and temperature on pre-gel formation. *Food Hydrocoll* **17**, 577–583 (2003).

115. Mazen, F., Milas, M. & Rinaudo, M. *Conformational transition of native and modified gellan*. *International Journal of Biological Macromolecules* vol. 26 www.elsevier.com/locate/ijbiomac (1999).

116. Carlfors, J., Edsman, K., Petersson, R. & Jornving, K. *Rheological evaluation of Gelrite® in situ gels for ophthalmic use*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 6 (1998).

117. Zuidema, J. M., Rivet, C. J., Gilbert, R. J. & Morrison, F. A. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **102**, 1063–1073 (2014).

118. Ismail, N. A., Razali, M. H. & Amin, K. A. M. Mechanical and physicochemical properties study on gellan gum thin film prepared using film casting method. in *AIP Conference Proceedings* vol. 1885 (American Institute of Physics Inc., 2017).

119. Sudhamani, S. R., Prasad, M. S. & Udaya Sankar, K. *DSC and FTIR studies on Gellan and Polyvinyl alcohol (PVA) blend films*. www.elsevier.com/locate/foodhyd.

120. Dixit, R. *et al.* Preparation and Characterization of Gellan-Chitosan Polyelectrolyte Complex Beads. *Am. J. Pharm* **30**, 1186–95 (2011).

121. Horrocks 2002 On the determination of the number of water molecules,q,coordinated to europium(III) ions in solutionfrom luminescence decay lifetimes.

122. Caiut, J. M. A. Estudo de aluminoxanos dopados com íons Eu3+ e preparação de híbridos orgânicos-inorgânicos. (Universidade Estadual Paulista, 2006).

123. Dexpert-Ghys, J., Picard, C. & Taurines, A. *Complexes of Rare Earths and Dipicolinato Ions Encapsulated in X-and Y-zeolites: Luminescence Properties*. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* vol. 39 (2001).

124. Duarte, A. P. *et al.* Organosilylated Complex [Eu(TTA)3(Bpy-Si)]: A Bifunctional Moiety for the Engeneering of Luminescent Silica-Based Nanoparticles for Bioimaging. *Langmuir* **29**, 5878–5888 (2013).

125. Chaussedent, S., Monteil, A. & Ferrari, M. Molecular dynamics simulation of Eu3+ in aqueous solution comparison with experimental luminescence spectra. *J Lumin* **72–74**, 567–569 (1997).

126. Carlos, L. D., Ferreira, R. A. S., de Zea Bermudez, V. & Ribeiro, S. J. L. Lanthanide-containing light-emitting organic-inorganic hybrids: A bet on the future. *Advanced Materials* vol. 21 509–534 Preprint at https://doi.org/10.1002/adma.200801635 (2009).

127. Dutra, J. D. L. & Freire, R. O. Theoretical tools for the calculation of the photoluminescent properties of europium systems - A case study. *J Photochem Photobiol A Chem* **256**, 29–35 (2013).

128. Lima, S. A. M., Sigoli, F. A., Davolos, M. R. & Jafelicci, M. *E uropium(III)-containing zinc oxide from Pechini method*. *Journal of Alloys and Compounds* vol. 344 www.elsevier.com/locate/jallcom (2002).

129. Pugina, R. S., da Rocha, E. G., Ribeiro, S. J. L. & Caiut, J. M. A. Study of the energy transfer process in rare earth-doped silk fibroin for future application in luminescent compounds. *J Lumin* **205**, 423–428 (2019).

130. Tako, M., Sakae, A. & Nakamura, S. Rheological Properties of Gellan Gum in Aqueous Media. *Agric Biol Chem* **53**, 771–776 (1989).

131. Dufresne, A. Nanocellulose: A new ageless bionanomaterial. *Materials Today* vol. 16 220–227 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.004 (2013).

132. Davis, J. R. *Tensile Testing*. (ASM International, 2004).

133. Vieira, S. R. *et al.* Cellulose Nanoparticles Prepared by Ionic Liquid-Assisted Method Improve the Properties of Bionanocomposite Films. *J Polym Environ* (2022) doi:10.1007/s10924-022-02420-6.

134. Zhang, R. & Liu, Y. High energy oxidation and organosolv solubilization for high yield isolation of cellulose nanocrystals (CNC) from Eucalyptus hardwood. *Sci Rep* **8**, (2018).

135. Peng, Y. & Via, B. The effect of cellulose nanocrystal suspension treatment on suspension viscosity and casted film property. *Polymers (Basel)* **13**, (2021).

136. Zhao, T. *et al.* Luminescence properties of Eu (TTA)3(H2O)2 doped with DNA-CTMA and its application in fluorescent inkjet ink. in *Lecture Notes in Electrical Engineering* vol. 417 933–939 (Springer Verlag, 2017).

137. Dávila, J. L. & d'Ávila, M. A. Rheological evaluation of Laponite/alginate inks for 3D extrusion-based printing. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology* **101**, 675–686 (2019).