



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

Beatriz Santos Carvalho

Dissertação de Mestrado

**NANOBIOFABRICAÇÃO DE ESTRUTURAS 3D COM NANOPARTÍCULAS DE
PRATA ANTIMICROBIANAS UTILIZANDO TÉCNICAS MANUAIS E ROBÓTICAS**

Brasília

2019

Beatriz Santos Carvalho

Dissertação de Mestrado

**Nanobiofabricação de estruturas 3D com nanopartículas de prata
antimicrobianas utilizando técnicas manuais e robóticas**

Linha de Pesquisa

Aplicações de materiais nanoestruturados

Orientador: Luciano Paulino da Silva

Co-orientadora: Cíntia Caetano Bonatto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Brasília

2019

À comunidade científica e leiga brasileira,
que este estudo possa inspirar o
desenvolvimento em Ciência e Tecnologia
de forma fascinante, colaborativa e
sustentável.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria possível. Por tornar os sonhos improváveis em realidade. E por me ensinar a ser feliz até nos momentos mais difíceis. Por essa jornada em forma de dissertação ser um milagre diário.

À minha família que me apoiou desde o início, foi meu alicerce para que tudo fosse possível. Agradeço pelos sacrifícios, correções, conselhos, e por tornarem o difícil muito mais fácil.

Aos meus amigos que me deram forças, me ajudaram a chegar mais longe e a concluir esta etapa. Em especial Ana Beatriz, Kelly Cristina, Polyana Paiva, Taís Calado que me acompanharam de perto, mesmo muitas vezes estando longe.

À biotecnologista Ivy Garcez Reis, por me apresentar pessoalmente a esperança na Biotecnologia e na Ciência, o time do Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Aos meus orientadores, Dra. Cíntia Bonatto, pela preocupação, auxílio, e por me aceitar como sobrinha do coração. Ao Dr. Luciano Paulino, por me dar a chance de reinventar hipóteses, e por ser o melhor orientador que já tive. Agradeço pela oportunidade em ser orientada por vocês.

Ao time do LNANO, por ser uma fábrica de sonhos, e um lugar mágico onde existe oportunidade para o aprendizado. Em especial ex-membros e atuais Lívia Viol, Lucio Araujo, Tatiane Pimentel e Thalita Fonseca pela amizade, cafés, risadas, momentos difíceis que compartilhamos juntos, caronas e ajuda fundamental.

À Dra. Liana Chafran pelo apoio e ajuda essenciais para a escrita desta especial Historinha, por ser inspiração e parte importante do meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal. Agradeço por acreditar em mim.

À Dra. Mayasari Lim e à empresa estadunidense SE3D, por me dar a oportunidade e privilégio de realizar uma das experiências mais marcantes da minha vida. Agradeço por confiar em mim.

Ao Sr. José Raimundo da Silva Nunes e ao Núcleo de Tecnologia da Informação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela ajuda tão valiosa.

À Dra. Vera Polez e Dr. Thales Rocha, pelo companheirismo, sorrisos, apoio e ajuda de sempre.

À analista Ana Cristina Gomes pelo cuidado e suporte durante as etapas de microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão, e ao Laboratório de Bioimagem da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

À mestre e técnica Ingrid Gracielle do Laboratório de Microscopia e Microanálise da Universidade de Brasília (UnB), pelo olhar fotográfico nas belas imagens de microscopia eletrônica, pelo apoio e ajuda fundamentais durante as etapas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Agradeço pela amizade desde quando eu nem conhecia a vida acadêmica.

Às instituições, agências e empresas, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Universidade de Brasília, FAP-DF, Capes, CNPq e *Matter and Form* que fomentaram, financiaram e promoveram a execução deste trabalho e de experiências acadêmicas e profissionais.

Agradeço a todos que colaboraram de alguma e qualquer forma para que esta jornada e trabalho acontecessem.

I'll play the game
But I can't stay
I've got my head on straight
And I'm not gonna change
(LAVIGNE, 2011)

Resumo

As nanopartículas metálicas (NPMs) podem ser sintetizadas por rotas químicas, as quais comumente utilizam-se de reagentes tóxicos e geram resíduos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Uma alternativa é a síntese via rotas verdes, as quais utilizam-se reagentes menos tóxicos e biodegradáveis. Entre as NPMs estão as nanopartículas de prata (AgNPs) que entre outras características, apresentam atividade antimicrobiana. Para a síntese verde de AgNPs podem ser utilizados diferentes tipos de recursos biológicos para a biorredução da prata, como plantas, células e biomoléculas. Além disso, a biofabricação 3D consiste na utilização de materiais biológicos como matéria-prima na produção de miméticos de tecidos e estruturas com propriedades específicas. Já a nanobiofabricação é uma vertente que consiste na utilização de nanomateriais - por exemplo AgNPs - e materiais biológicos - como biopolímeros e células - como insumos na produção de estruturas funcionais. Adicionalmente, um dos desafios na engenharia de tecidos é a produção de estruturas 3D a partir de hidrogéis com atividade antimicrobiana para evitar contaminações de microrganismos em cultivo celular 3D. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi a produção de estruturas biopoliméricas contendo AgNPs em sua composição ou imobilizadas em estruturas termoplásticas para avaliação da atividade antibacteriana. As rotas de síntese de AgNPs foram realizadas utilizando extratos de chá preto (CP) e verde (CV) com sachês novos (I) e usados (II). As AgNPs foram caracterizadas por espectrofotometria UV-vis, espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial Zeta e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A AgNP (CV) apresentou maior absorvância, indicando maior formação de AgNPs. As medidas das quatro AgNPs, como o *Z-average* foi entre 80 e 140 nm; o Pdl entre 0,3 e 0,4; e o potencial Zeta negativo, com instabilidade incipiente. Ambas AgNPs dos extratos I e II apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli* em até 50%. No entanto, a AgNP (CP) apresentou concentração inibitória mínima (CIM) em 256 µM. Foram utilizadas as AgNPs de CP e CV do extrato II para a produção de 3 composições de hidrogéis baseados em alginato de sódio. Também foram utilizadas técnicas de escaneamento 3D e fotogrametria para a digitalização 3D de materiais botânicos. Os modelos CAD foram obtidos a partir das técnicas de digitalização 3D para a utilização de um modelo CAD nos processos de fabricação e biofabricação 3D. Posteriormente, utilizou-se técnicas de biofabricação como fiação úmida, gotejamento e bioimpressão 3D e foram produzidas fibras, esferoides e modelos 3D, respectivamente. As estruturas 3D contendo AgNPs apresentaram atividade antibacteriana e foram seccionadas para caracterização de sua estrutura interna por microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As estruturas se demonstraram estáveis, com atividade antibacteriana e estrutura interna favorável à aplicação em cultivo celular 3D. Além disso, as AgNPs de CP e CV do extrato II foram imobilizadas em modelos 3D impressos em termoplástico de ABS. A superfície de termoplástico foi caracterizada utilizando MEV, e apesar das imagens apresentarem indícios de AgNPs imobilizadas, não foi possível observar atividade antibacteriana nos ensaios com os mesmos modelos 3D impressos em termoplástico.

Palavras-chave: síntese verde, nanopartículas, biomateriais, hidrogéis, biofabricação, fabricação 3D, antimicrobiano, engenharia de tecidos.

Abstract

Metal nanoparticles (MNPs) can be synthesized by chemical routes, which commonly use toxic reagents and generate residues that are harmful to health and the environment. An alternative is the synthesis via green routes, which use less toxic and biodegradable reagents. Among the MNPs are silver nanoparticles (AgNPs) that, among other characteristics, have antimicrobial activity. For the green synthesis of AgNPs different types of biological resources can be used for the bioreduction of silver, such as plants, cells and biomolecules. In addition, 3D biofabrication consists of the use of biological materials as raw material in the production of tissue mimetics and structures with specific properties. Nanobiofabrication is a component that consists of the use of nanomaterials - for example AgNPs - and biological materials - as biopolymers and cells - as inputs in the production of functional structures. Additionally, one of the challenges in tissue engineering is the production of 3D structures from hydrogels with antimicrobial activity to avoid contamination of microorganisms in 3D cell culture. Thus, the main objective of this work was the production of biopolymer structures containing AgNPs in their composition or immobilized in thermoplastic structures to evaluate antibacterial activity. AgNP synthesis routes were performed using black (BT) and green (GT) tea extracts with new (I) and used (II) sachets. AgNPs were characterized by UV-vis spectrophotometry, dynamic light scattering (DLS), Zeta potential and transmission electron microscopy (TEM). AgNP (GT) showed higher absorbance, indicating a higher formation of AgNPs. The measurements of the four AgNPs, such as Z-average, were between 80 and 140 nm; the Pdl between 0.3 and 0.4; and the negative Zeta potential, with incipient instability. Both AgNPs from extracts I and II showed antibacterial activity against *E. coli* in up to 50%. However, AgNP (BT) showed minimal inhibitory concentration (MIC) in 256 μ M. The BT and GT AgNPs of extract II were used for the production of 3 hydrogel compositions based on sodium alginate. We also used 3D scanning and photogrammetry techniques for the 3D scanning of botanical materials. The CAD models were obtained from 3D scanning techniques for the use of a CAD model in 3D manufacturing and biofabrication processes. Subsequently, biofabrication techniques such as wet spinning, dripping and 3D bioprinting were used and fibers, spheroids and 3D models were produced, respectively. The 3D structures containing AgNPs showed antibacterial activity and were sectioned to characterize their internal structure by light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). The structures were shown to be stable, with antibacterial activity and internal structure favorable to the application in 3D cell culture. In addition, BT and GT AgNPs from extract II were immobilized in 3D models printed on ABS thermoplastic. The thermoplastic surface was characterized using SEM, and although the images showed signs of immobilized AgNPs, it was not possible to observe antibacterial activity in the assays with the same 3D models printed in thermoplastic.

Key words: green synthesis, nanoparticles, biomaterials, hydrogels, biofabrication, 3D manufacturing, antimicrobial, tissue engineering.

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da metodologia desenvolvida durante este trabalho.	29
Figura 2. Metodologia de digitalização 3D de materiais botânicos para obtenção de modelos CAD.	33
Figura 3. Esquema representativo de técnicas de biofabricação utilizadas neste trabalho: fiação úmida; gotejamento; e bioimpressão 3D.....	35
Figura 4. Curvas de absorção das AgNPs de CP e CV dos sachês I e II. Os comprimentos de onda analisados foram de 350 a 550 nm.	45
Figura 5. Caracterização das AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde a partir de extratos de <i>C. sinensis</i> (CP e CV). Dados referentes à extração com sachês I (primeiro uso) e II (segundo uso): (a) e (d) Cinética de formação de AgNPs durante a síntese de 2,5 horas utilizando a média da absorbância dos 5 lotes de AgNPs; (b) e (e) Distribuição média do diâmetro hidrodinâmico em intensidade de amostras dos extratos e 5 lotes de AgNPs sintetizadas; (c) e (f) Amostras representativas após as reações de síntese.	47
Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão para avaliação do diâmetro seco e da forma das AgNPs produzidas com os extratos de CP e CV de sachês I e II. Imagens e gráficos de histograma de distribuição de classes com número de estruturas e o diâmetro (nm) seco das amostras de AgNP (CP) I (a); AgNP (CV) I (b); AgNP (CP) II (c); e AgNP (CV) II (d).....	51
Figura 7. (a) Tempo de digitalização dos tecidos vegetais de <i>H. brackenridgei</i> (flor e folha de hibisco amarelo), <i>P. rubra</i> (flor e folha de jasmim-manga), <i>M. domestica</i> (maçã) e <i>P. vulgaris</i> (semente de feijão carioca) durante digitalização por escaneamento 3D (E) e com fotogrametria (F) nos dias 0 e 3. (b) Massa dos tecidos vegetais analisados como medida real de morfometria nos dias 0 e 3.	52
Figura 8. Tecidos vegetais de <i>H. brackenridgei</i> , <i>P. rubra</i> , <i>M. domestica</i> e <i>P. vulgaris</i> avaliados após a coleta do material botânico (Dia 0) e após 3 dias da coleta (Dia 3) utilizando as técnicas de digitalização 3D com escaneamento 3D e com fotogrametria.	54
Figura 9. Técnicas e metodologias aplicadas durante período de iniciação em biofabricação. (a) biofabricação por moldagem em formas de silicone, utilizando gelatina e alginato; (b) adaptação de plataforma robótica para semeadura de	

bactérias; (c) biofabricação de fibras de alginato utilizando plataforma robótica adaptada.	56
Figura 10. Estruturas 3D de alginato a 2% (com corantes azul e vermelho em sua composição) com reticulação de CaCl ₂ a 2% produzidas com plataforma robótica adaptada durante otimização de processos de biofabricação. As barras de escala equivalem a 1 cm.	57
Figura 11. Técnicas de biofabricação utilizadas neste trabalho e estruturas 3D biofabricadas: fiação úmida (a) para a produção de fibras (e); gotejamento por injetor de seringa (b) e com pipeta Pasteur (c) para a produção de esferoides (f); e bioimpressão 3D (d) para a produção de modelos de sementes (g). Foram utilizadas as 3 composições sem AgNPs para representação das estruturas. As barras de escala equivalem a 1 cm.	58
Figura 12. Ensaio de CIM de AgNPs e extratos de CP e CV dos sachês I e II testadas em <i>E. coli</i> nas concentrações de 8 µM a 256 µM. (a) Microplacas do ensaio durante os intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas; (b) Viabilidade celular de <i>E. coli</i> ao final do ensaio para as AgNPs testadas.	61
Figura 13. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB líquido com inóculo de <i>E. coli</i> , avaliando fibras (verde), esferoides (laranja) e sementes bioimpressas (azul) com as 3 composições de hidrogéis (1, 2, e 3) contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). Ensaio avaliado durante os intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas.	65
Figura 14. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB sólido com semeadura de <i>E. coli</i> avaliando fibras (verde) e esferoides (laranja) na composição 1 de hidrogel contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). As placas de Petri foram observadas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. As barras de escala equivalem a 1 cm.	66
Figura 15. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB sólido com semeadura de <i>E. coli</i> avaliando fibras (verde) e sementes bioimpressas (azul) na composição 2 de hidrogel contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). As placas de Petri foram observadas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. As barras de escala equivalem a 1 cm.	67
Figura 16. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB sólido com semeadura de <i>E. coli</i> avaliando fibras (verde) e sementes bioimpressas (azul) na composição 3 de hidrogel contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs	

(controle). As placas de Petri foram observadas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. As barras de escala equivalem a 1 cm.	68
Figura 17. Ensaio de atividade antimicrobiana com encapsulados de <i>E. coli</i> em fibras nas 3 composições (1, 2 e 3) de hidrogéis contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle) em meio LB líquido. Crescimento bacteriano avaliado após 24 horas.	69
Figura 18. Modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico ABS durante a imobilização de AgNPs de CP e CV dos sachês I e II.	70
Figura 19. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB líquido com inóculo de <i>E. coli</i> , avaliando sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS contendo AgNP (CP) II ou AgNP (CV) II imobilizadas em sua superfície e sem AgNPs (controle). Ensaio avaliado durante os intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas.	71
Figura 20. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB sólido com semeadura de <i>E. coli</i> avaliando modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS contendo AgNP (CP) II ou AgNP (CV) II imobilizadas em sua superfície e sem AgNPs (controle). As placas de Petri foram observadas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. As barras de escala equivalem a 1 cm.	72
Figura 21. Ensaio de estabilidade térmica em meio LB líquido (sem adição de inóculo de <i>E. coli</i>) de fibras (verde), esferoides (laranja) e sementes bioimpressas (azul) nas 3 composições (1, 2, e 3) de hidrogéis contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). Ensaio avaliado durante os intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas.	74
Figura 22. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções micrométricas de esferoides menores e maiores da composição 1 de hidrogel que permaneceram 24 horas em estufa a 37°C antes do processamento para a microscopia de luz. (a) Esferoides menores e maiores fixados com metil-Carnoy. (b) Esferoides menores e maiores fixados com paraformaldeído.	76
Figura 23. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções micrométricas de fibras e esferoides (menores e maiores) da composição 1 de hidrogel sem AgNPs (controle) e com AgNP (CP) II e AgNP (CV) II que permaneceram 24 horas em estufa a 37°C antes do processamento para a microscopia de luz.	78
Figura 24. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções micrométricas de fibras e esferoides (menores e maiores) da composição 2 de hidrogel sem AgNPs	

(controle) e com AgNP (CP) II e AgNP (CV) II que permaneceram 24 horas em estufa a 37°C antes do processamento para a microscopia de luz.....	79
Figura 25. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções micrométricas de fibras e esferoides (menores e maiores) da composição 3 de hidrogel sem AgNPs (controle) e com AgNP (CP) II e AgNP (CV) II que permaneceram 24 horas em estufa a 37°C antes do processamento para a microscopia de luz.....	80
Figura 26. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos encapsulados de <i>E. coli</i> em fibras da composição 1 de hidrogel, onde (a) sem AgNPs (controle), apenas <i>E. coli</i> ; (b) com AgNP (CP) II e <i>E. coli</i> ; (c) com AgNP (CV) II e <i>E. coli</i>	81
Figura 27. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos encapsulados de <i>E. coli</i> em fibras da composição 2 de hidrogel, onde (a) sem AgNPs (controle), apenas <i>E. coli</i> ; (b) com AgNP (CP) II e <i>E. coli</i> ; (c) com AgNP (CV) II e <i>E. coli</i>	82
Figura 28. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos encapsulados de <i>E. coli</i> em fibras da composição 3 de hidrogel, onde (a) sem AgNPs (controle), apenas <i>E. coli</i> ; (b) com AgNP (CP) II e <i>E. coli</i> ; (c) com AgNP (CV) II e <i>E. coli</i>	83
Figura 29. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS, onde (a) sem AgNPs (controle); (b) com AgNP (CP) II e (c) com AgNP (CV) II immobilizadas nas superfícies.	85

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composições dos hidrogéis, técnicas e estruturas produzidas.	36
Tabela 2. Parâmetros de configuração do <i>software</i> Slic3r para gerar arquivo .gcode.	39
Tabela 3. Características físico-químicas das AgNPs sintetizadas utilizando os extratos da planta <i>C. sinensis</i> de CP e CV. Diâmetro hidrodinâmico médio (<i>Z- average</i>), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta. Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes.	49

Lista de Abreviaturas e Siglas

3D - tridimensional

ABS - acrilonitrila butadieno estireno

Ag⁺ - prata iônica

Ag⁰ - prata reduzida

AgNP (CP) - nanopartícula de prata sintetizada com extrato de chá preto

AgNP (CV) - nanopartícula de prata sintetizada com extrato de chá verde

AgNPs - nanopartículas de prata

AgNO₃ - nitrato de prata

CaCl₂ - cloreto de cálcio

CAD - *Computer Aided Design* (Desenho assistido por computador)

CIM - concentração inibitória mínima

CNC - *Computer Numeric Control* (Controle numérico computadorizado)

CP - chá preto

CT - *Computerized Tomography* (Tomografia computadorizada)

CV - chá verde

DLS - *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento de luz dinâmico)

EDS - *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy* (Espectroscopia de raios X por energia dispersiva)

L1 - lote 1 de síntese de AgNPs

L2 - lote 2 de síntese de AgNPs

L3 - lote 3 de síntese de AgNPs

L4 - lote 4 de síntese de AgNPs

L5 - lote 5 de síntese de AgNPs

LB - meio Luria Bertani

MET - microscopia eletrônica de transmissão

MEV - microscopia eletrônica de varredura

MRI - *Magnetic Resonance Imaging* (Imageamento por ressonância magnética)

NPMs - nanopartículas metálicas

Pdl - *Polydispersity Index* (índice de polidispersividade)

rpm - rotações por minuto

Sumário

1. Introdução.....	18
1.1. Nanociência e Nanobiotecnologia	18
1.2. Biomateriais e hidrogéis	20
1.3. Fabricação, biofabricação e nanobiofabricação 3D.....	21
2. Motivação e Justificativa.....	25
3. Objetivos.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos.....	26
4. Material e Métodos	27
4.1. Materiais.....	27
4.2. Reagentes	27
4.3. Equipamentos.....	28
4.4. Estratégia experimental	29
4.5. Obtenção dos extratos de <i>Camellia sinensis</i>	29
4.6. Síntese verde de nanopartículas de prata com extratos de <i>C. sinensis</i>	30
4.7. Caracterização de nanopartículas de prata produzidas com extratos de <i>C. sinensis</i>	30
4.7.1. Espectrofotometria UV-Vis.....	31
4.7.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e mobilidade eletroforética (potencial Zeta) 31	
4.7.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	32
4.8. Obtenção de modelos 3D.....	32
4.8.1. Escâner 3D	33
4.8.2. Fotogrametria.....	33
4.9. Obtenção dos hidrogéis baseados em alginato de sódio	34
4.10. Biofabricação de estruturas 3D	35

4.10.1. Fiação úmida (<i>wet spinning</i>)	36
4.10.2. Gotejamento	37
4.10.3. Bioimpressão 3D	37
4.11. Fabricação 3D e imobilização de nanopartículas de prata em termoplástico 39	
4.12. Atividade biológica de nanopartículas de prata livres, em hidrogéis e imobilizadas em termoplástico	40
4.12.1. Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM).....	40
4.12.2. Ensaio de difusão em meio LB líquido.....	41
4.12.3. Ensaio de difusão em meio LB sólido	41
4.12.4. Ensaio de cultivo em meio LB líquido das estruturas biofabricadas com encapsulamento de <i>E. coli</i>	42
4.13. Caracterização das estruturas biofabricadas em 3D e modelos 3D de termoplástico	42
4.13.1. Ensaio de estabilidade térmica em meio de cultivo	42
4.13.2. Microscopia de luz	43
4.13.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	44
5. Resultados e Discussão	45
5.1. Síntese verde e caracterização de AgNPs com extratos de <i>C. sinensis</i>	45
5.2. Digitalização 3D de materiais botânicos.....	52
5.3. Biofabricação de estruturas 3D produzidas com hidrogéis e AgNPs.....	56
5.4. Atividade biológica de AgNPs livres	60
5.5. Atividade biológica de estruturas biofabricadas em 3D com hidrogéis e AgNPs em sua composição	62
5.6. Atividade biológica de modelos 3D de termoplástico com AgNPs imobilizadas 69	
5.7. Caracterização das estruturas biofabricadas em 3D	73
5.8. Caracterização da superfície dos modelos 3D de termoplástico	84

6. Conclusões	86
7. Perspectivas	87
8. Referências.....	88

1. Introdução

1.1. Nanociência e Nanobiotecnologia

A Nanociência é o estudo da matéria na escala nanométrica (10^{-9}), onde é possível manipular átomos e moléculas. Richard Feynman foi o precursor nessa área ao proferir a palestra intitulada “*There’s plenty of room at the bottom*” em uma conferência para a Sociedade Americana de Física, em 1959. Feynman apresentou suas ideias sobre o assunto se referindo à miniaturização da informação e ao problema de manipular e controlar a matéria em escala atômica (FEYNMAN, 1960). A Nanotecnologia por sua vez é a aplicação deste conhecimento em nanoescala, onde a manipulação da matéria nesta escala da bilionésima parte do metro, gera estruturas e novos nanomateriais para serem utilizados em diversas áreas como medicina, eletrônica, ciência da computação, física, química, biologia, engenharia dos materiais, etc. Além disso, o que tornam os nanomateriais especiais são as características particulares adquiridas por sua escala nanométrica, tais como propriedades ópticas, elétricas, resistência estrutural, reatividade química, atividade biológica, entre outras.

A Nanobiotecnologia é um campo da nanotecnologia que se utiliza de material biológico como biomoléculas, biopolímeros, tecidos vegetais ou microrganismos para o estudo, produção de nanomateriais e/ou aplicação em sistemas biológicos. Dentre as nanoestruturas mais comuns em nanobiotecnologia estão as nanopartículas metálicas (NPMs). No entanto, as NPMs não são produzidas exclusivamente por rotas nanobiotecnológicas, ou seja, geralmente são sintetizadas por rotas químicas. Neste caso utiliza-se reagentes tóxicos que acabam gerando resíduos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente. Outra possibilidade para a produção de NPMs são rotas de síntese verde, as quais utilizam reagentes menos tóxicos ou atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo. Além disso, em síntese verde utiliza-se recursos biológicos como tecidos, células, biomoléculas e até mesmo resíduos e subprodutos agropecuários para reações de oxirredução durante a síntese de nanomateriais (SILVA et al., 2017b).

Entre as NPMs produzidas por rotas de síntese verde estão as nanopartículas de prata (AgNPs) as quais são nanomateriais que apresentam atividade

antimicrobiana (PANACEK et al., 2006; SILVA et al., 2017a) e apesar do efeito antibiótico ser a propriedade mais explorada, as AgNPs apresentam outras aplicações como o uso em circuitos eletrônicos, diagnósticos, biossensores, processos de catálises, entre outras. Devido ao seu alto potencial antimicrobiano, as AgNPs são largamente utilizadas contra bactérias e fungos, mas também podem apresentar atividade citotóxica contra protozoários, nematoides, vírus, entre outras. Suas aplicações antimicrobianas podem ser utilizadas no tratamento direto de diversas infecções por bactérias e fungos; e até mesmo na esterilização e imobilização em superfícies poliméricas, evitando a presença de bactérias, fungos e outros microrganismos (SILVA, 2015).

Para as reações de oxirredução durante a síntese verde de AgNPs são utilizados diversos tipos de recursos biológicos, entre estes o uso de chás de plantas e seus resíduos tem-se demonstrado eficientes na formação de AgNPs com atividade antibacteriana (ONITSUKA; HAMADA; OKAMURA, 2019; SILVEIRA et al., 2018; SUN et al., 2014). Isso porque os chás são compostos por biomoléculas, de diferentes classes, que atuam promovendo a redução de prata iônica (Ag^+) em prata reduzida (Ag^0) levando a formação de AgNPs. Além disso, as biomoléculas também atuam como agentes estabilizantes e de revestimento (cobertura) de superfície das AgNPs.

O processo de síntese de AgNPs é formado por quatro etapas principais: I) biorredução de prata na presença de agentes redutores presentes no recurso biológico; II) nucleação, em que há a aglomeração dos átomos de Ag^0 ; III) crescimento, em que há incorporação de átomos de Ag^0 ; IV) estabilização das AgNPs, em que há o esgotamento de átomos de Ag^0 e/ou o revestimento com biomoléculas presentes no recurso biológico. No caso de rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos vegetais, geralmente as biomoléculas que participam deste processo de síntese de AgNPs são metabólitos primários e/ou secundários. Os metabólitos primários são polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, vitaminas e ácidos nucleicos. Já os metabólitos secundários são fenóis, alcaloides, terpenos e saponinas. Apesar de ser possível identificar as classes e compostos presentes nos extratos aquosos, é difícil afirmar exatamente quais estão envolvidos em cada etapa de síntese e formação das AgNPs (SILVA; PEREIRA; BONATTO, 2019).

1.2. Biomateriais e hidrogéis

Os biomateriais são substâncias ou uma mistura delas, de origem natural ou sintética, os quais podem ser utilizados em contato com sistemas biológicos para diversas aplicações, como materiais implantáveis, dispositivos biomédicos, curativos, órgãos artificiais, tecidos biomiméticos, entre outros (PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015). Os materiais amplamente utilizados como biomateriais são metais, cerâmicas, polímeros e compósitos. Uma das aplicações recentes de biomateriais poliméricos é na produção de *scaffolds* (arcabouços ou estruturas 3D) em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, dentre os quais se destacam os hidrogéis.

Os hidrogéis são matrizes que contêm em sua composição biomateriais poliméricos naturais ou sintéticos, com propriedades hidrofílicas, o que os torna capazes de reter grande quantidade de água (AHMED, 2015). Devido à sua rede polimérica hidrofílica e biocompatibilidade tem-se utilizado os hidrogéis em áreas como engenharia de tecidos (LEE; MOONEY, 2001), medicina regenerativa (SLAUGHTER et al., 2009) e aplicações biomédicas de forma geral (HOFFMAN, 2012). Uma das aplicações crescentes é o uso de hidrogéis como matrizes biocompatíveis na construção de estruturas 3D com vários tipos de células (NAKAMURA et al., 2010), além de permitir a incorporação de substâncias bioativas, tais como fatores de crescimento, proteínas e células vivas (KHALIL; SUN, 2009).

Entre os hidrogéis de polímeros naturais amplamente utilizados está o hidrogel de alginato, um biomaterial biocompatível, com fácil gelificação e com semelhanças estruturais com as matrizes extracelulares de tecidos. Assim, os hidrogéis de alginato têm sido utilizados para cicatrização de feridas, na veiculação de fármacos e em aplicações na engenharia de tecidos (LEE; MOONEY, 2012). Além disso, o alginato é um biomaterial que já foi e ainda é muito utilizado como matriz de aprisionamento e imobilização de células para processos em biorreatores, micropropagação *in vitro*, produção de anticorpos, entre outros (SMIDSRÖD; SKJAKBRK, 1990; TANAKA; MATSUMURA; VELIKY, 1984). Hidrogéis de alginato também têm sido utilizados na composição de estruturas 3D, em que é possível controlar as propriedades do material tais como viscosidade e densidade para ser aplicado em processos de biofabricação (JIA et al., 2014).

Outros estudos contemplam a utilização de quitosana (NASCIMENTO; DO NASCIMENTO; LOMBELLO, 2016), ácido polilático (NARAYANAN et al., 2016), agarose (ZARRINTAJ et al., 2018), carboximetilcelulose (CHANG; ZHANG, 2011), entre outros materiais, os quais podem ser polimerizados e formar uma estrutura 3D. Geralmente, para a fabricação de estruturas 3D mais complexas são utilizadas misturas de biomateriais na composição de um hidrogel para garantir propriedades complementares como resistência mecânica, viscosidade adequada e biocompatibilidade. Por exemplo, um hidrogel contendo alginato, agarose e metilcelulose pode facilitar o processo de fabricação, devido à sua viscosidade significativa, e simultaneamente permitir a incorporação de células para cultivo dentro da matriz do hidrogel (SEIDEL et al., 2017).

Tem sido discutido também o desenvolvimento de estruturas 3D semelhantes à matriz celular com propriedades antibacterianas, contendo em sua composição hidrogéis com incorporação de antibióticos ou nanopartículas antimicrobianas, como AgNPs (UNNITHAN; ARATHYRAM; KIM, 2015). Neste caso, o principal desafio é criar estruturas 3D que promovam a adesão e proliferação celular, e ao mesmo tempo inibem a colonização bacteriana, evitando a contaminação durante o cultivo celular.

1.3. Fabricação, biofabricação e nanobiofabricação 3D

A fabricação 3D, conhecida também como fabricação digital, consiste na produção e materialização de ideias, objetos e estruturas 3D utilizando máquinas computadorizadas, como impressora 3D, escâner 3D, máquina de corte e máquina de usinagem de controle numérico computadorizado (CNC). Os processos de fabricação digital podem ser aplicados em diversas áreas do conhecimento como arquitetura, computação gráfica, *design*, odontologia, biomedicina, entre outros (CHRYSSOLOURIS et al., 2009). Diferentes tipos de materiais podem ser utilizados em processos de fabricação 3D, incluindo metais, cerâmicas, plásticos, resinas e até mesmo materiais biológicos. Nesse sentido, a biofabricação 3D consiste na utilização de materiais biológicos como a principal matéria-prima para construção de estruturas funcionais tais como miméticos de tecidos e estruturas com propriedades específicas as quais podem ser aplicadas para testes de atividade biológica de substâncias e nanomateriais.

A biofabricação de miméticos de tecidos e órgãos tem sido o principal objetivo de estudos recentes nesta área. Esta abordagem inovadora é cada vez mais utilizada em biomedicina, e tem potencial para criar construções artificiais funcionais para o rastreamento de drogas, nanomateriais e de investigação em toxicologia, bem como transplante de tecidos e órgãos (ARSLAN-YILDIZ et al., 2016). Devido à capacidade de gerar estruturas análogas aos tecidos biológicos (células e matriz extracelular), tais técnicas abriram novas áreas de pesquisa em engenharia de tecidos e medicina regenerativa (DERBY, 2012). Além disso, há a possibilidade de aplicação na área da agricultura, como a produção de sementes artificiais.

Técnicas de biofabricação podem ser executadas muitas vezes de forma manual ou robótica (automatizada), como a bioimpressão 3D, para a produção de estruturas com formas específicas e customizadas a partir de um modelo 3D computacional, conhecido como modelo de desenho assistido por computador (CAD), onde a estrutura é impressa camada a camada (MARKSTEDT et al., 2015); formação de esferoides, utilizando um injetor de seringa ou manualmente onde o biomaterial é depositado em solução reticulante gota a gota (LU; YAN; LEHE, 2007); eletrofição também conhecida como *electrospinning*, para a formação de fibras a partir da aplicação de um campo elétrico (MEIRELES et al., 2018); fição úmida também conhecida como *wet-spinning*, para a produção de fibras em solução aquosa a qual solidifica a fibra (PUPPI; CHIELLINI, 2017); microfluídica, para a fabricação de canais microfluídicos de biomaterial (CHOI et al., 2007); fabricação por moldagem, para a produção de estruturas personalizadas utilizando um molde (HE; XUE; FU, 2014); estereolitografia, também para a fabricação de estruturas a partir de um modelo CAD com resinas sensíveis à luz UV (CVETKOVIC et al., 2014); entre outras técnicas (MORONI et al., 2018).

Segundo um relatório publicado em 2018 pela *Grand View Research*, o mercado mundial de bioimpressão 3D, uma das técnicas mais populares de biofabricação, deve atingir 2,6 bilhões dólares até 2024 e é esperado um crescimento significativo principalmente na área da saúde devido ao aumento da incidência de doenças crônicas que levam à necessidade de realização de transplantes de órgãos e tecidos; além do aumento da expectativa de vida e do número limitado de doadores de órgãos. Dentre as principais aplicações analisadas no relatório incluem os segmentos médico, odontológico, biossensores, biotintas, alimentos e animais. O segmento dominante esperado é a área médica, com mais

de 30% de participação em 2022, utilizando-se a regeneração de órgãos, tecidos, implantes e próteses juntamente com o uso de bioimpressos como miméticos para testes de atividade na produção de medicamentos (*screening*).

Apesar da existência de um mercado em ascensão, existem grandes desafios relacionados à biofabricação 3D, tais como a escolha dos tipos de células e biomateriais (incluindo hidrogéis) que podem ser utilizados; técnica de biofabricação; fatores de crescimento, diferenciação e difusão/vascularização a serem utilizados em biomiméticos; bem como as dificuldades técnicas relacionadas com a viabilidade do material biológico, incluindo o crescimento indesejado de microrganismos (MURPHY; ATALA, 2014). Além da possibilidade de aplicação para o *screening* da atividade biológica de nanomateriais em miméticos biofabricados, mais recentemente tem sido sugerida a possibilidade de utilização de nanomateriais também como blocos essenciais para estruturação e funcionalização de biofabricados (BUYUKHATIPOGLU et al., 2010), assim como para aprisionamento por meio de nanoencapsulamento para liberação sustentada de materiais necessários aos biomiméticos como nutrientes, fatores de crescimento, reguladores de crescimento, entre outros.

Assim, a vertente denominada nanobiofabricação consiste na utilização de nanomateriais e materiais biológicos como insumos para construção de estruturas funcionais, ou até mesmo a utilização de organismos vivos para processos de fabricação de estruturas, nanomateriais ou biomoléculas (GUANG, 2016; SILVA, 2018). Estas estruturas podem ser construídas utilizando técnicas de biofabricação e empregadas como biomiméticos em testes de atividade biológica de princípios ativos (ARSLAN-YILDIZ et al., 2016) e na incorporação de nanomateriais com propriedades únicas (BUYUKHATIPOGLU et al., 2010). Os nanomateriais podem conferir reforço mecânico ou mesmo contribuir com propriedades antimicrobianas, como as AgNPs. Assim, nanomateriais podem ser empregados em estudos de biofabricação 3D, não apenas no intuito de investigar possíveis toxicidades em miméticos de tecidos, mas também como constituintes de estruturas biofabricadas (MIRONOV; KASYANOV; MARKWALD, 2008).

Avanços no desenvolvimento e aprimoramento das técnicas na área de biofabricação 3D viabilizam o sucesso das aplicações de estruturas biofabricadas, tais como o uso de um sistema de CAD que seja eficaz no *design* e fabricação de estruturas 3D complexas (JUNG; LEE; CHO, 2016), além de bioinspiração em

estruturas com características arquitetônicas que são encontradas em vários biomateriais naturais (MEZA et al., 2015). Tem-se também, impressoras 3D com geração contínua de peças poliméricas com alta velocidade de impressão (TUMBLESTON et al., 2015), permitindo a produção de estruturas em uma interface líquida e em menor tempo que a abordagem camada por camada.

2. Motivação e Justificativa

Devido à expansão, desafios e avanços em biofabricação 3D e considerando a contribuição que a nanobiotecnologia pode oferecer nesse campo emergente da nanobiofabricação 3D, faz-se necessário cada vez mais um melhor entendimento das tecnologias para o desenvolvimento de novas metodologias, serviços e produtos que agreguem finalidade e conhecimento científico.

Sabendo da possibilidade de produzir AgNPs de forma simples, sustentável e com custo baixo utilizando recursos biológicos, uma das propostas deste estudo foi sintetizar AgNPs com atividade antimicrobiana a partir de rota de síntese verde utilizando extratos aquosos de chás. Além disso, tendo em vista a oportunidade e necessidade de avaliar o efeito antibiótico de estruturas 3D em processos de fabricação e biofabricação, também foi proposto produzir, utilizando 3 técnicas diferentes, estruturas biofabricadas com hidrogéis baseados em alginato contendo AgNPs; e imobilização de AgNPs em superfícies de termoplástico acrilonitrila butadieno estireno (ABS), comumente utilizado em processo de fabricação 3D.

De forma complementar, avaliar e caracterizar a organização da estrutura interna dos biofabricados é fundamental para entender e escolher os biomateriais e técnicas de biofabricação de acordo com o objetivo e tipo celular para a aplicação em cultivo 3D nas estruturas para o avanço efetivo nas áreas de engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Explorar a fabricação e biofabricação 3D de estruturas biopoliméricas contendo nanopartículas de prata (AgNPs) em sua composição ou imobilizadas em estruturas termoplásticas e avaliar a possível atividade das estruturas produzidas contra o crescimento de bactérias.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar AgNPs produzidas via rota verde utilizando extratos aquosos dos chás (preto e verde) de *Camellia sinensis*;
- Produzir hidrogéis aplicáveis em técnicas de biofabricação 3D e na incorporação de AgNPs;
- Obter modelos 3D a partir de materiais orgânicos;
- Imobilizar AgNPs em objetos impressos em 3D com termoplástico de ABS;
- Avaliar a eficácia antibiótica da presença de AgNPs nas estruturas biofabricadas com biopolímeros e nas impressas em 3D com termoplástico de ABS;
- Caracterizar a organização estrutural interna dos biofabricados e superfície de objetos de termoplástico de ABS;
- Comparar técnicas manuais e robóticas de fabricação e biofabricação 3D.

4. Material e Métodos

4.1. Materiais

Agulhas hipodérmicas descartáveis (Descarpack, Brasil); Bisturi (ABC instrumentos cirúrgicos, Brasil); Caixa de polipropileno para microtubos; Canetas permanentes coloridas (Sharpie, EUA); Célula capilar descartável de policarbonato (modelo DTS1070, Malvern, Reino Unido); Cuba de vidro com tampa para coloração (100 × 80 × 85 mm) (Única Científica, Brasil); Cubeta de poliestireno descartável de 1,5 mL (modelo 1948, Kartell, Itália); Estantes para tubos de 1,5 e 50 mL; Estilete (DSC, Brasil); Filme de laboratório (Parafilm M[®], American National Can, EUA); Fita adesiva durex (3M, EUA); Fita adesiva crepe (3M, EUA); Frasco de vidro tipo Béquer com capacidade para 5, 50 e 200 mL; Grades de cobre com 150 malhas vazadas (Electron Microscopy Sciences, EUA); Lâmina de bisturi; Lâmina de vidro ponta fosca 26 × 76 mm espessura 1-1,2 mm (Carvalhaes, Brasil); Microplacas de 24 poços de fundo chato (KASVI, Brasil); Microplacas de 96 poços de fundo chato (TPP, Alemanha); Placas de Petri 90 × 15 mm descartável (TPP, Alemanha); Mica muscovita; Papel branco (Chamex, Brasil); Papel alumínio; Papel filtro (11 µm, Whatman[®], EUA); Seringas 1, 5 e 10 mL; Microtubos de polipropileno do tipo Eppendorf de 1,5 e 2,0 mL (Axygen, EUA); Navalha de aço (MC818, Leica, Alemanha); Papel pardo; Pinça clínica; Ponteiras de polipropileno brancas (0,1-10 µL), amarelas (20-200 µL) e azuis (100-1000 µL); Provetas de vidro com capacidade de 10, 100, 200 e 1000 mL (Pyrex, EUA); Tubos tipo Falcon de 15 e 50 mL (TPP, Alemanha).

4.2. Reagentes

Acetona PA (CRK, Brasil); Ácido acético (Merck, Alemanha); Ágar Luria Bertani - LB (Sigma-Aldrich Co., EUA); Agarose ultrapura (Invitrogen, EUA); Água destilada (Millipore Corporation); Água ultrapura tipo I (Millipore Corporation); Álcool etílico absoluto PA (Dinâmica, Brasil); Álcool etílico absoluto PA (Cinética, Brasil); Álcool metílico (JTBaker, EUA); Alginato de sódio (Dinâmica, Brasil); Alginato de sódio (Sigma-Aldrich Co, EUA); Antibiótico Penicilina e Estreptomicina (Gibco, EUA); Cacodilato de sódio (Sigma-Aldrich Co., EUA); Carboximetilcelulose 5000 (Chemco, Brasil); Chá preto (Dr. Oetker, Brasil); Chá verde (Leão Fuze, Brasil); Cloreto de cálcio (Vetec, Brasil); Clorofórmio (CRQ, Brasil); Eosina amarelada (Dinâmica,

Brasil); Extran (Merck, Alemanha); Hematoxilina (Dinâmica, Brasil); Meio de cultura básico LB (Sigma, Alemanha); Nitrato de prata (Plat-Lab, Brasil); Paraplast (Sigma-Aldrich Co, EUA); Verniz vitral incolor (Acrilex, Brasil); Xileno (Dinâmica, Brasil).

4.3. Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento (modelo Q261, Quimis, Brasil); Agitador magnético com aquecimento (modelo LUCA-01/09-E, Lucadema, Brasil); Agitador de Tubos tipo Vortex (modelo Genie 2, Genie, EUA); Autoclave vertical (modelo Idealclave, Stermax, Brasil); Balança eletrônica de precisão (modelo Q520-3, Quimis, Brasil); Balança analítica (modelo AG200, Gehaka, Brasil); Biofotômetro (Eppendorf, Alemanha); Bioimpressora 3D (modelo r3bEL, SE3D, EUA); Câmara de ponto crítico (modelo CPD 030, Balzers, Suíça); Câmara fotográfica DSLR (modelo EOS Rebel SL1, Canon, Japão); Escâner 3D (modelo Scanner V1, Matter and Form, Canadá); Estufa de secagem e esterilização (Lucadema, Brasil); Fluxo unidirecional horizontal (modelo CFLV12, Veco, Brasil); Freezer (modelo CVU26EBBNA, Consul, Brasil); Geladeira (modelo DC499A, Electrolux, Brasil); Impressora 3D (modelo MP Select Mini V2, Monoprice, EUA); Incubadora de bancada com agitação orbital (modelo Q816M20, Quimis, Brasil); Injetor de seringa (KD Scientific, EUA); Leitora de microplacas (modelo ELx808 IU, Biotek, EUA); Lente (modelo EF-S 18-55mm f/3.5-5.6 IS STM, Canon, Japão); Metalizador (modelo EM SCD500, Leica, Alemanha); Micropipetas monocanais com capacidade máxima de 10 µL, 200 µL e 1000 µL (modelo LabMate Soft, HTL, Polônia); Micropipeta multicanal com capacidade máxima de 200 µL (modelo DV8-200, modelo LabMate Soft, HTL); Microscópio de luz (modelo Axiophot, Zeiss, Alemanha); Microscópio eletrônico de transmissão (modelo JEM-1011, Jeol, Japão); Microscópio eletrônico de varredura (modelo JSM-7000F, Jeol, Japão); Micrótopo (modelo 1512, Leitz, Alemanha); Nano ZetaSizer (modelo Nano ZS, Malvern, Reino Unido); Paquímetro digital High Speed 0-150 0,01 mm (modelo 1108, Insize, Brasil); Plataforma robótica (modelo Proteineer fc, Bruker, EUA); Sistema Milli-Q (modelo Advantage A10, Millipore Corporation, EUA); Smartphone (modelo SIII, Samsung, Coreia do Sul); Timer digital (Cronobio); Notebook (modelo Aspire R15, Acer, Taiwan).

4.4. Estratégia experimental

O delineamento deste trabalho se deu a partir da prospecção de nanomaterial; biomateriais para produção de hidrogéis; e técnicas de biofabricação. Posteriormente, testes iniciais com os materiais e técnicas disponíveis foram realizados e em seguida seguiu-se uma metodologia para todo o trabalho. Foram realizadas a síntese de AgNPs via rota verde e caracterizações físico-químicas e de atividade antimicrobiana. Estruturas 3D contendo AgNPs foram biofabricadas e modelos de termoplástico de ABS foram fabricados para imobilização de AgNPs; depois foram caracterizados quanto ao efeito antibiótico contra bactéria modelo *E. coli*, e quanto a estrutura interna e superfície. Sendo assim, a metodologia para o desenvolvimento deste estudo foi definida como descrito no fluxograma abaixo:



Figura 1. Representação esquemática da metodologia desenvolvida durante este trabalho.

4.5. Obtenção dos extratos de *Camellia sinensis*

Os extratos para a síntese verde de AgNPs foram obtidos a partir da infusão de chás preto (CP) e verde (CV). Os chás utilizados foram sachês comerciais

contendo folhas e talos de *C. sinensis*. Cada sachê foi pesado para o cálculo da concentração final de 0,1 g/mL de pulverizado de *C. sinensis* no extrato bruto.

As infusões foram produzidas utilizando um sachê de cada chá separadamente e água ultrapura em ebulição em chapa aquecedora durante 2 minutos. Cada sachê foi utilizado duas vezes independentes para comparação e avaliação das AgNPs sintetizadas com o sachê de primeiro (I) e segundo (II) uso. As extrações aquosas dos chás preto e verde foram separadas para a síntese de AgNPs logo em seguida.

4.6. Síntese verde de nanopartículas de prata com extratos de *C. sinensis*

As sínteses verde de AgNPs foram realizadas em tubos de ensaio de vidro de 10 mL, um para cada amostra: AgNP (CP) I e II - síntese com chá preto; AgNP (CV) I e II - síntese com chá verde; CP I e II - controle de chá preto (extrato); CV I e II - controle de chá verde (extrato); Ag⁺ - controle de íons prata. Para as reações de síntese foi utilizado nitrato de prata (AgNO₃) na concentração final de 1 mM.

Para as sínteses das AgNPs, 50 µL de extrato (100 mg/mL) foram adicionados à 4,950 mL de AgNO₃ 1 mM (proporção de 1:100); para os respectivos controles, as soluções de extrato ou AgNO₃ foram substituídos por água ultrapura. Os tubos de ensaio permaneceram sobre a bancada e recobertos por papel alumínio. As reações ocorreram à temperatura ambiente durante 2,5 horas e foram monitoradas a cada 30 minutos sendo realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm. Foram produzidos 5 lotes de síntese (L1, L2, L3, L4 e L5) e para os dados de absorbância das amostras de AgNPs foi obtida uma média aritmética para representação gráfica. As sínteses de AgNPs com extratos dos sachês de primeiro (I) e segundo (II) uso foram realizadas com a mesma metodologia e no mesmo dia. Todas as amostras foram armazenadas a 4°C até o uso.

4.7. Caracterização de nanopartículas de prata produzidas com extratos de *C. sinensis*

4.7.1. Espectrofotometria UV-Vis

Além do monitoramento espectrofotométrico durante a síntese de AgNPs, também foram obtidas as curvas de absorção das amostras de AgNPs I e II utilizando um espectrofotômetro UV-Vis na faixa de comprimentos de onda de 350 a 550 nm. Para as análises, as amostras foram diluídas 10 vezes em água ultrapura.

4.7.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e mobilidade eletroforética (potencial Zeta)

As amostras de AgNPs foram caracterizadas por DLS para determinar o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade (Pdl) e por mobilidade eletroforética para determinar o potencial Zeta de superfície das suspensões coloidais. A técnica de DLS mede a distribuição de diâmetro hidrodinâmico de partículas e moléculas em suspensão, e utiliza-se da luz de um *laser* que atinge o material analisado. A luz é espalhada com diferentes intensidades devido ao movimento browniano e aos tamanhos diferentes das partículas ou moléculas. A luz é detectada com o ângulo e o volume de espalhamento auxiliando no cálculo do tamanho da partícula ou molécula. Já o potencial Zeta, utiliza-se da diferença de tensão elétrica aplicada na suspensão analisada. A partir da mobilidade eletroforética as cargas de superfície são medidas de forma indireta. Esta medida da magnitude de repulsão ou atração eletrostática auxilia na análise da estabilidade coloidal do sistema. As análises de DLS foram realizadas em equipamento ZetaSizer Nano ZS utilizando laser He-Ne (4 mW) operando a 633 nm e detecção de dispersão de luz em ângulo de 173°. O tamanho das partículas (diâmetro hidrodinâmico), o Pdl e o potencial Zeta das AgNPs foram obtidos a partir de três medições independentes para cada parâmetro, à temperatura de 25°C, em meio reacional aquoso utilizando célula capilar de policarbonato com eletrodos revestidos a ouro. Para as análises, as amostras foram diluídas 10 vezes em água ultrapura. Sempre foram determinados primeiramente o diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersividade por se tratarem de abordagens não destrutivas, e posteriormente foi avaliado o potencial Zeta das amostras. As análises foram realizadas utilizando o *software* ZetaSizer versão 7.04 que acompanha o equipamento. Para os dados de cada uma das amostras de AgNPs foi obtida uma média aritmética dos 5 lotes (L1, L2, L3, L4 e L5) para a representação gráfica do diâmetro hidrodinâmico.

4.7.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As AgNPs sintetizadas também foram avaliadas por MET para determinar o diâmetro seco e a ultraestrutura das nanopartículas. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão operado a 80 kV e as imagens foram obtidas com uma câmera digital integrada ao microscópio. Para as análises, as amostras foram diluídas 10 vezes em água ultrapura e depositadas 5 μ L sobre grades de cobre recobertas por uma película de Formvar. As grades de cobre foram mantidas em placa de Petri a 25°C por 24 horas para posterior análise no microscópio. As imagens foram adquiridas com magnificação de 10 e 40 mil vezes. Para determinar o diâmetro seco foi utilizado o *software* ImageJ versão 1.52 e as imagens utilizadas foram todas com a mesma magnificação de 10 mil vezes.

4.8. Obtenção de modelos 3D

Os modelos 3D ou modelos CAD (em português, Desenho Assistido por Computador) foram obtidos a partir de duas técnicas de digitalização 3D: escaneamento 3D e fotogrametria (Figura 2). Os equipamentos utilizados foram um escâner 3D de bancada (*desktop*) do tipo sem contato e ativo (fonte própria de radiação); e para a fotogrametria, uma câmera fotográfica DSLR com lente de 18-55 mm. Os materiais utilizados para os processos de digitalização 3D foram materiais botânicos de *Hibiscus brackenridgei* (flor e folha de hibisco amarelo), *Plumeria rubra* (flor e folha de jasmim-manga), *Malus domestica* (maçã) e *Phaseolus vulgaris* (semente de feijão carioca). Os materiais de hibisco amarelo e jasmim-manga foram obtidos em zona urbana do Distrito Federal, e os materiais de maçã e feijão carioca foram obtidos de forma comercial no Distrito Federal. Foram obtidas pelo menos uma digitalização de cada material para aquisição dos dados tridimensionais e posteriormente gerar o modelo CAD. As digitalizações 3D foram obtidas logo após a obtenção do tecido vegetal (dia 0) e após período de senescência (para hibisco amarelo, jasmim-manga e maçã) e germinação (para feijão carioca), sendo 3 dias após a coleta (dia 3). O tempo necessário para cada aquisição foi monitorado com um cronômetro digital.

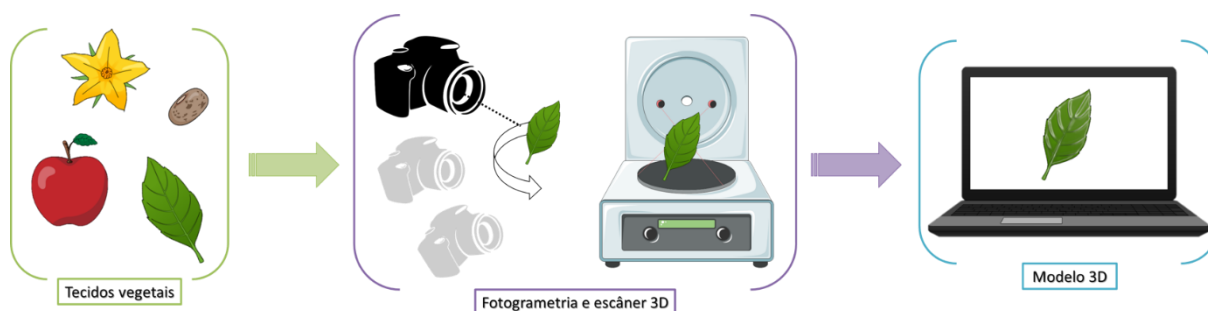


Figura 2. Metodologia de digitalização 3D de materiais botânicos para obtenção de modelos CAD.

4.8.1. Escâner 3D

Para a digitalização 3D utilizando o escaneamento 3D, foram feitas de 1 a 3 digitalizações de cada material botânico, obtendo varreduras com o material na horizontal e na vertical. Para os materiais do tipo folha e flor foi preciso utilizar um prendedor de papel como suporte para auxiliar no posicionamento horizontal e vertical do material. Para a semente foi utilizada apenas fita adesiva para posicioná-la, e para o fruto não foi preciso suporte. A cada digitalização, o material vegetal foi depositado no centro da área de digitalização e após iniciar o processo de varredura do material, o cronômetro foi iniciado e interrompido ao final da digitalização. Dois tipos de arquivos foram gerados após a digitalização de cada material, um com dados tridimensionais como a nuvem de pontos e outro com informações de textura, sendo que ambos foram processados no próprio *software* do escâner 3D, MFStudio versão 1. Após o processamento, um arquivo do tipo .stl contendo o modelo 3D foi exportado. A partir dos modelos 3D foram analisadas características morfológicas qualitativas, como a forma e a coloração comparando-as com as observadas nos materiais botânicos originais. Essas etapas foram repetidas para todos os materiais analisados nos dias 0 e 3. O processo de digitalização por escaneamento 3D foi demonstrado nos vídeos de *time-lapse* [neste link](#).

4.8.2. Fotogrametria

Para a digitalização 3D utilizando a fotogrametria, foi feita 1 digitalização de cada material botânico, a qual consistiu em fixar o material em apenas uma posição e fotografá-lo em vários ângulos. A fixação dos materiais foi feita em superfície plana com prendedor de papel para os materiais de folhas e flores e fita adesiva para a semente. Para o fruto foi utilizada uma agulha hipodérmica de calibre 18 G acoplada

em uma seringa de 5 mL, a qual foi imobilizada com fita adesiva na superfície plana. A agulha foi atravessada no pseudofruto para que a maior parte de sua superfície estivesse visível para ser fotografada. Ao iniciar as fotografias, o cronômetro foi disparado e interrompido ao final da digitalização por fotos. Após fotografar ao redor do material, as imagens foram carregadas e processadas no *software* VisualSFM versão V0.5.26 e exportados dois arquivos, um contendo a nuvem de pontos e outro as informações de textura. Para a formação da malha do modelo 3D foi utilizado o *software* MeshLab versão V2016.12. Ao carregar e processar os dois arquivos no programa, o modelo 3D foi gerado e exportado em arquivo .stl. As características de forma e coloração dos modelos também foram comparadas com as observadas nos materiais botânicos originais. E todas as etapas foram repetidas para todos os materiais analisados nos dias 0 e 3. O processo de digitalização por fotogrametria foi demonstrado nos vídeos de *time-lapse* [neste link](#).

4.9. Obtenção dos hidrogéis baseados em alginato de sódio

As matrizes biopoliméricas foram produzidas com alginato de sódio como principal insumo para formação dos hidrogéis. Foram avaliadas três composições de hidrogéis: 1) alginato de sódio 3%; 2) alginato de sódio 3% e carboximetilcelulose 9%; e 3) alginato de sódio 2,8%, agarose 0,9% e carboximetilcelulose 3%. As concentrações foram definidas em peso (g) e volume (mL). As composições e concentrações foram baseadas e adaptadas de trabalhos da literatura científica (HABIB et al., 2018; SEIDEL et al., 2017; SCHÜTZ et al., 2017; LODE et al., 2015).

Para cada uma das composições (1, 2 e 3) foram produzidos três hidrogéis com diferentes meios: água ultrapura somente; AgNP (CP) II em água ultrapura; AgNP (CV) II em água ultrapura, completando então 9 hidrogéis com volume final de 15 mL para cada um. Para os hidrogéis contendo AgNPs, as mesmas foram adicionadas diretamente como solventes, na concentração final de 1 mM. Foram utilizadas para a produção dos hidrogéis apenas as AgNPs sintetizadas com extratos dos sachês de segundo uso (II). Os componentes de cada hidrogel foram misturados aos poucos e um soluto por vez em agitador magnético. Para os hidrogéis com as composições 2 e 3 foi necessária a agitação mecânica quando a barra magnética já não era suficiente para a dissolução completa. Os hidrogéis foram armazenados a 4°C até o momento do uso.

4.10. Biofabricação de estruturas 3D

As técnicas utilizadas para a biofabricação das estruturas (Figura 3) foram a fiação úmida (*wet spinning*), para a formação de fibras; gotejamento por injetor de seringa e também de forma manual com pipeta Pasteur, para a formação de esferoides; e bioimpressão 3D, para a formação de modelos de sementes. Para todas as técnicas foi utilizado o cloreto de cálcio (CaCl_2) na concentração de 0,1 M como agente reticulante (*crosslinking*), e a cada ciclo de biofabricação de cada técnica foi substituída a solução de CaCl_2 . Foram produzidas aproximadamente 8 estruturas de cada hidrogel para cada técnica como descrito na Tabela 1 com as composições e técnicas utilizadas para cada hidrogel.

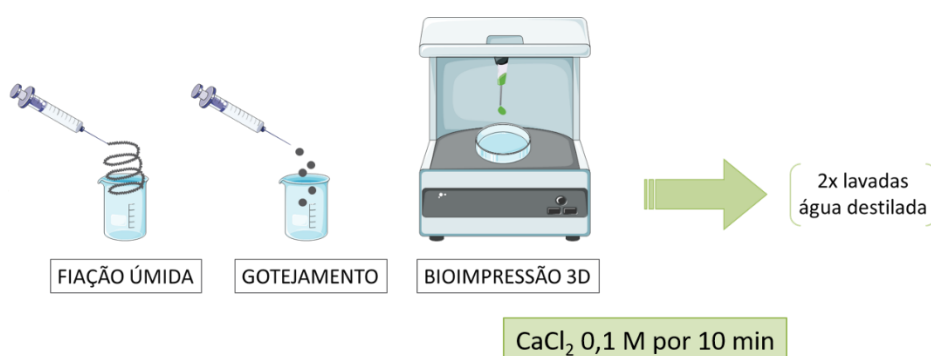


Figura 3. Esquema representativo de técnicas de biofabricação utilizadas neste trabalho: fiação úmida; gotejamento; e bioimpressão 3D.

Tabela 1. Composições dos hidrogéis, técnicas e estruturas produzidas.

	Composição	Técnica	Estruturas 3D
1	alginato de sódio 3%	fiação úmida	fibras
		gotejamento	esferoides
2	alginato de sódio 3% carboximetilcelulose 9%	fiação úmida	fibras
		bioimpressão 3D	modelos de sementes
3	alginato de sódio 2,8% agarose 0,9% carboximetilcelulose 3%	fiação úmida	fibras
		bioimpressão 3D	modelos de sementes

4.10.1. Fiação úmida (*wet spinning*)

Para a formação de fibras foi utilizada a técnica de fiação úmida. Os hidrogéis utilizados nesta técnica foram os de composição 1, 2 e 3 (com as três variações de meio reacional aquoso cada), e foram adicionados em seringas de 10 mL e posteriormente o conteúdo foi adicionado em uma seringa com bico *luer slip* de 1 mL com agulhas hipodérmicas com calibre de 18 G. Para a formação das fibras, cada seringa contendo o hidrogel foi posicionada com a ponta da agulha dentro da solução de CaCl_2 (0,1 M) com aproximadamente 50 mL e pressionada de forma contínua e manual para expelir aproximadamente 0,3 mL do hidrogel em forma de fibra dentro da solução, para cada fibra produzida. Após a formação da estrutura em solução reticulante de CaCl_2 , as fibras permaneceram 10 minutos nessa solução para estabilização estrutural, e depois foram lavadas duas vezes em água destilada autoclavada. Todas essas etapas foram seguidas para a produção das estruturas de cada um dos 9 tipos hidrogéis utilizados com esta técnica. As fibras foram separadas em béqueres com aproximadamente 1 mL de água destilada autoclavada, suficiente para não ressecarem. Posteriormente, as fibras foram utilizadas nos ensaios de atividade biológica realizados no mesmo dia.

4.10.2. Gotejamento

Para a formação de esferoides com diferentes tamanhos (menores e maiores) foi utilizado o gotejamento por injetor de seringa (bomba infusora) e também de forma manual com pipeta Pasteur. O hidrogel utilizado nesta técnica foi apenas o de composição 1 (com as três variações de meio). Para a formação dos esferoides menores, os hidrogéis foram adicionados em seringas com bico *luer slip* de 1 mL com agulha hipodérmica com calibre de 27 G e posteriormente a seringa foi posicionada no injetor de seringa com velocidade de 3000 $\mu\text{L/h}$. Abaixo da agulha durante cada processamento foi posicionado um béquer contendo aproximadamente 50 mL da solução de CaCl_2 0,1 M onde a solução biopolimérica era gotejada, e cuja as estruturas formadas permaneceram por 10 minutos, sendo depois lavadas duas vezes em água destilada autoclavada. Para a formação dos esferoides maiores, foram utilizadas pipetas Pasteur com capacidade volumétrica de 3 mL para gotejar os biopolímeros e formar os hidrogéis em um béquer com aproximadamente 50 mL da solução de CaCl_2 0,1 M e da mesma forma os esferoides permaneceram por 10 minutos na solução, e depois foram lavados duas vezes em água destilada autoclavada. Todas essas etapas foram seguidas para a produção das estruturas de cada um dos 3 hidrogéis biofabricados com esta técnica. Todos os esferoides também foram separados em béqueres com aproximadamente 1 mL de água destilada autoclavada para não ressecarem. Posteriormente, foram utilizados nos ensaios de atividade biológica realizados no mesmo dia.

4.10.3. Bioimpressão 3D

Para a formação de modelos de sementes foi utilizada a técnica de bioimpressão 3D. Os hidrogéis utilizados nesta técnica foram os de composição 2 e 3 (com as três variações de solvente cada), e foram adicionados em seringas com bico *luer lock* de 5 mL com ponteiros P200 (amarela) acopladas apenas rosqueando-as no bico da seringa. Antes da bioimpressão 3D dos modelos de semente, o arquivo .stl do modelo 3D da semente, obtido por escaneamento 3D, foi utilizado no *software* Slic3r versão 1.1.7 para preparar e gerar o arquivo .gcode para a bioimpressão 3D. Os principais parâmetros de configuração do *software* que foram modificados para a bioimpressão do modelo da semente com os hidrogéis e ponteira selecionados estão descritos na Tabela 2. Após a configuração do *software*, o arquivo 3D do tipo .stl foi carregado no programa e posteriormente exportado o

arquivo do tipo .gcode. O arquivo .gcode foi utilizado no *software* que controla a bioimpressora 3D, Pronterface versão Printron 2014.08.01. Após ligar a bioimpressora ao *notebook* e por sua vez conectá-la ao programa Pronterface instalado no mesmo computador, o arquivo .gcode foi carregado no programa. A seringa já preparada com o hidrogel foi acondicionada na extrusora da bioimpressora 3D e uma placa de Petri foi montada na mesa de impressão, sendo que posteriormente foi acionada a operação de biopressão na bioimpressora do modelo da semente. Após a bioimpressão de cada estrutura com aproximadamente 0,6 mL do hidrogel, a placa de Petri com o modelo de semente bioimpresso foi retirada da bioimpressora 3D e adicionada parte da solução de CaCl_2 0,1 M para auxiliar na retirada da estrutura com uma espátula. A estrutura bioimpressa foi transferida para um béquer contendo aproximadamente 50 mL da solução de CaCl_2 0,1 M, onde permaneceu por 10 minutos e depois foi lavada duas vezes em água destilada autoclavada. Todas essas etapas foram seguidas para a produção das estruturas de cada um dos 6 tipos de biofabricados produzidos com hidrogéis por esta técnica. Todas os miméticos de sementes bioimpressas foram separados em béqueres contendo aproximadamente 10 mL água destilada autoclavada para não ressecarem. Posteriormente, foram utilizadas nos ensaios de atividade biológica realizados no mesmo dia.

Tabela 2. Parâmetros de configuração do *software* Slic3r para gerar arquivo .gcode.

<i>Print Settings</i>	
<i>Layer height</i>	0,35 mm
<i>First layer height</i>	0,41 mm
<i>Fill density</i>	30%
<i>Speed: Perimeters, Solid infill, Top solid infill</i>	6 mm/s
<i>Speed: Small perimeters, External perimeters, Infill</i>	7 mm/s
<i>Filament Settings</i>	
<i>Diameter</i>	1 mm
<i>Extrusion multiplier</i>	0,12
<i>Temperature: Extruder, Bed</i>	0°C

4.11. Fabricação 3D e imobilização de nanopartículas de prata em termoplástico

A imobilização de AgNPs foi realizada em termoplástico acrilonitrila butadieno estireno (ABS), comumente utilizado em processos de fabricação 3D, como a impressão 3D. A fabricação 3D foi feita utilizando o modelo 3D de semente de feijão carioca que foi digitalizada pelo escâner 3D, sendo que o arquivo .gcode foi utilizado na impressora 3D e o filamento de ABS para a impressão do modelo. As temperaturas utilizadas no processo de impressão com o filamento de ABS foram de 220°C para a extrusora e 110°C para a mesa de impressão. Foi utilizado no modelo o suporte de adesão na mesa de impressão do tipo *Raft*. Foram impressos em 3D 15 modelos idênticos de semente em ABS para a imobilização de AgNPs nas superfícies. Após a impressão, os modelos de sementes produzidos em ABS foram lavados com água destilada contendo 1% de Extran durante 3 minutos e depois enxaguadas 2 vezes em água destilada. Após a secagem ao ar das sementes de ABS, foram inseridas individualmente dentro dos tubos de ensaio de vidro. As soluções de AgNO₃ (1 mM) e extratos de CP II e CV II (1 mg/mL relação massa do pulverizado de chá e volume de água) foram adicionadas aos tubos de ensaio para a

síntese de AgNPs durante 2,5 horas. O processo de imobilização foi realizado mediante a formação e adsorção de AgNPs nas superfícies dos modelos de termoplástico ABS durante a síntese verde de AgNPs já descrita. Para os controles foi utilizado as sementes impressas em 3D com o filamento de ABS sem a imobilização de AgNPs. Todas as sementes foram separadas em tubos do tipo Falcon de 15 mL e armazenadas a 4°C.

4.12. Atividade biológica de nanopartículas de prata livres, em hidrogéis e imobilizadas em termoplástico

A atividade biológica testada foi a atividade antibacteriana contra *Escherichia coli* com AgNPs livres, incorporadas nas estruturas biofabricadas em 3D com hidrogéis e nos modelos 3D de sementes à base de termoplástico ABS. O microrganismo modelo utilizado foi *E. coli* ATCC 8739 e os testes realizados foram de concentração inibitória mínima (CIM) para AgNPs livre; difusão em meio LB sólido e em meio LB líquido para as estruturas biofabricadas e para os modelos 3D impressos em ABS; e cultivo em meio LB líquido das estruturas biofabricadas com encapsulamento de *E. coli*.

Para todos os ensaios de atividade antibacteriana foram realizados os pré-inóculos e inóculos de *E. coli*. As colônias de *E. coli* foram isoladas em placas de Petri contendo meio LB sólido e incubadas a 37°C por cerca de 16 horas e posteriormente armazenadas a 4°C. Posteriormente, o pré-inóculo foi feito coletando-se com uma colônia isolada a qual foi inoculada em 5 mL de meio LB líquido, a 37°C por cerca de 24 horas sob agitação de 200 rpm em incubadora *shaker*. Após esse processo, foi realizada leitura em biofotômetro da OD em comprimento de onda de 600 nm e inoculado em OD final de 0,05 em 5 mL de meio LB líquido, a 37°C por cerca de 6 horas sob agitação de 200 rpm. Após esse preparo, o inóculo foi utilizado com volume final de acordo com ensaio e OD final de 0,05.

4.12.1. Ensaio de concentração inibitória mínima (CIM)

Para as AgNPs livres foi realizado o ensaio de CIM utilizando microplacas de 96 poços, onde foram testadas as AgNPs I e II, os extratos de CP e CV I e II, controles de Ag⁺, controle positivo com ampicilina e estreptomicina a 200 µg/mL e controle negativo com água destilada autoclavada. As concentrações das amostras

testadas foram de 256 μM , 128 μM , 64 μM , 32 μM , 16 μM e 8 μM em equivalente a AgNO_3 . As diluições foram feitas separadamente em microtubos tipo Eppendorf. Para a aplicação na placa de 96 poços, o volume máximo de cada amostra foi de 12,8% do volume final em cada poço, exceto para a maior concentração (256 μM) em que foi utilizado 25,6% do volume final do poço, sendo que para este foi preparado um controle independente. Em cada poço da placa foram aplicados 25,6 μL de amostra mais 174,4 μL de inóculo em meio de cultivo, e para a concentração de 256 μM foi aplicado 51,2 μL de amostra mais 148,8 μL de inóculo em meio de cultivo. As placas foram incubadas em estufa a 37°C. Os ensaios foram avaliados por inspeção visual de acordo com a turbidez do meio e por espectrofotometria medindo a absorbância em comprimento de onda de 630 nm durante os períodos de tempo de 0, 24, 48 e 72 horas.

4.12.2. Ensaio de difusão em meio LB líquido

Para as estruturas biofabricadas em 3D e para os modelos 3D em ABS foi realizado ensaio de difusão em meio LB líquido. Foi preparada uma placa de 24 poços e inseridas em cada poço 1 estrutura biofabricada ou equivalente a aproximadamente 0,3 mL (no caso dos esferoides) de todas as 9 composições de hidrogéis e suas respectivas formas (fibras, esferoides e modelos de sementes), além dos modelos de sementes em ABS. Foram adicionados em cada poço 0,872 mL do inóculo de *E. coli*, com OD de 0,05 em comprimento de onda de 600 nm, em meio de cultivo, considerando a estrutura e o inóculo no poço à concentração final de 256 μM . Para os modelos de sementes bioimpressas, foram adicionados em cada poço 1,800 mL do inóculo de *E. coli*, também considerando a concentração final de 256 μM . As placas foram incubadas em estufa a 37°C. O crescimento microbiano no meio líquido foi monitorado por inspeção visual durante os períodos de tempo de 24, 48 e 72 horas.

4.12.3. Ensaio de difusão em meio LB sólido

Para as estruturas biofabricadas em 3D e para os modelos 3D em ABS foi realizado ensaio de difusão em meio LB sólido. Similar aos testes de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão, foram preparadas 21 placas de Petri com meio LB sólido, sendo realizada a semeadura com *swab* estéril no inóculo de *E. coli* na superfície do meio sólido em 3 direções diferentes. Dentro de cada placa foi

colado na tampa com fita adesiva dupla face um papel filtro para reter a umidade. Foram inseridas 2 estruturas biofabricadas de todas as 9 composições de hidrogéis e suas respectivas formas (fibras, esferoides e modelos de sementes) em cada placa, e 3 estruturas dos modelos de sementes em ABS foram depositadas sobre o meio LB sólido. Em seguida as placas foram incubadas em estufa a 37°C. O crescimento microbiano ao redor das estruturas e o possível halo de inibição foram avaliados por inspeção visual e durante os períodos de tempo de 24, 48 e 72 horas.

4.12.4. Ensaio de cultivo em meio LB líquido das estruturas biofabricadas com encapsulamento de *E. coli*

Para ensaio de cultivo das estruturas biofabricadas com *E. coli* encapsuladas foram acrescentados ao hidrogel antes do processo de biofabricação, o inóculo de *E. coli* em meio de cultivo na proporção 1:1. Posteriormente, o hidrogel e o inóculo foram misturados com auxílio de uma espátula e inseridos em uma seringa de 1 mL. Foram avaliadas todas as 9 composições de hidrogéis e escolhidas apenas as estruturas de fibras por ser a forma presente em todas as composições. A biofabricação das fibras com *E. coli* encapsuladas foi feita com a mesma metodologia já descrita para produção de fibras. Foi preparada uma placa de 12 poços e inserida 1 fibra em cada poço. Posteriormente foi adicionado 0,872 mL de meio LB líquido autoclavado em cada poço. A placa foi incubada em estufa a 37°C. Após 24 horas foi avaliado o crescimento microbiano no meio LB líquido por inspeção visual e as fibras foram retiradas do meio, lavadas 2 vezes com água destilada autoclavada e armazenadas em tubos tipo Falcon de 15 mL contendo água destilada autoclavada a 4°C para posterior processamento para análises por microscopia eletrônica de varredura.

4.13. Caracterização das estruturas biofabricadas em 3D e modelos 3D de termoplástico

4.13.1. Ensaio de estabilidade térmica em meio de cultivo

Após a produção das estruturas biofabricadas foi preparada uma placa de 24 poços e inseridas em cada poço uma estrutura biofabricada ou equivalente a aproximadamente 0,3 mL (no caso dos esferoides) de todas as 9 composições de hidrogéis e suas respectivas formas (fibras, esferoides e modelos de sementes).

Foram adicionados em cada poço 0,872 mL de meio LB líquido autoclavado, considerando a estrutura biofabricada e o volume do meio no poço à concentração final de 256 μ M. Para os modelos de sementes bioimpressas, foram adicionados em cada poço cerca de 1,800 mL de meio LB líquido autoclavado, também considerando a concentração final de 256 μ M. As placas foram incubadas em estufa a 37°C. Foi realizada inspeção visual da estabilidade da forma em meio e temperatura de cultivo durante os períodos de tempo de 24, 48 e 72 horas.

4.13.2. Microscopia de luz

As estruturas biofabricadas foram processadas para avaliação em microscopia de luz. Após a produção das estruturas de todas as 9 composições de hidrogéis e suas respectivas formas (fibras, esferoides e modelos de sementes), estas foram separadas em tubos tipo Falcon contendo 10 mL de água ultrapura em cada. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C por aproximadamente 16 horas. As estruturas biofabricadas foram fixadas utilizando dois fixadores diferentes, metil-Carnoy (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) e paraformaldeído a 4%, durante 2 horas à aproximadamente 22°C. Após retirar os fixadores, no caso das estruturas fixadas com metil-Carnoy as amostras foram submetidas a etapas sucessivas de concentrações decrescentes de etanol [100, 90, 80 e 70%], no caso das estruturas fixadas com paraformaldeído foram adicionados álcool etílico 70% nas amostras. Todas as etapas tiveram 1 hora de duração cada. Após a adição de etanol 70% em todas as estruturas, estas foram armazenadas a 4°C durante aproximadamente 16 horas. Em seguida, as amostras foram submetidas a etapas sucessivas de desidratação em concentrações crescentes de etanol [80, 90 e 100% (2 \times)], todas as etapas também tiveram 1 hora de duração cada. As amostras foram submetidas à diafanização (etanol/xileno 1:1, xileno 1 e xileno 2) com 1 hora de duração cada. Posteriormente, foram infiltradas com Paraplast por meio de dois banhos de 1,5 horas (Paraplast 1 e Paraplast 2). Após a infiltração, o material foi incluído em blocos de Paraplast. Os blocos foram seccionados em micrótomo e as secções em espessura de 5 μ m foram depositadas em lâminas de vidro e levados a uma chapa de aquecimento a 42°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, as lâminas foram submetidas a processo de coloração com hematoxilina e eosina (H&E). As análises das secções micrométricas das estruturas foram avaliadas em

microscópio de luz acoplado com câmera digital e documentadas digitalmente utilizando o *software* AxioVision versão 4.8.

4.13.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para os modelos de sementes em ABS foi realizada a caracterização da superfície dos impressos em 3D com AgNPs imobilizadas e como controle um impresso em 3D sem a imobilização de AgNPs. Os modelos 3D foram depositados sobre fita de carbono em porta-amostras (*stubs*). Posteriormente, as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro. Em seguida, foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura operado a 15 kV. As imagens foram obtidas com uma câmera digital integrada ao microscópio com ampliações de 25, 200 e 20 mil vezes.

Para as estruturas biofabricadas com *E. coli* encapsuladas também foi utilizada MEV para caracterização das superfícies externas e internas. As fibras utilizadas nesta caracterização foram as armazenadas a 4°C após o ensaio de cultivo já descrito. Cada fibra das 9 composições de hidrogéis foi cortada em um fragmento de aproximadamente 1 cm com auxílio de uma lâmina de bisturi. Posteriormente, os fragmentos foram separados em tubos tipo Eppendorf de 2 mL e fixados com 1 mL de Karnovsky em cada tubo, e armazenados a 4°C por aproximadamente 24 horas. Em seguida, foi retirado o fixador e adicionado 1 mL de tampão cacodilato de sódio a 0,1 M para lavar os fragmentos. Após a retirada do tampão, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO₄) durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas 2 vezes com água destilada. Foram submetidas a etapas sucessivas de desidratação em concentrações crescentes de acetona [50, 70, 90 e 100% (2x)] por 10 minutos em cada etapa. Em seguida, os fragmentos foram novamente seccionados de forma transversal e longitudinal e passaram por processo de secagem ao ponto crítico utilizando uma câmara com gás carbônico (CO₂). Após a secagem, os fragmentos foram inseridos sobre fita de carbono em porta-amostras (*stubs*), e posteriormente foram metalizados com uma fina camada de ouro. Em seguida, os fragmentos foram analisados em microscópio eletrônico de varredura operado a 15 kV. As imagens foram obtidas com uma câmera digital integrada ao microscópio com ampliações de 350, 4 mil, 6 mil e 20 mil vezes.

5. Resultados e Discussão

5.1. Síntese verde e caracterização de AgNPs com extratos de *C. sinensis*

As AgNPs de CP e CV dos sachês I e II também foram caracterizadas quanto à absorção entre os comprimentos de onda de 350 a 550 nm. Foi possível observar a semelhança entre as 4 AgNPs a partir dos picos de máxima absorção, em que as AgNPs (CP) I e II tiveram seu pico em 440 nm, enquanto a AgNP (CV) I teve a absorção em 450 nm e a AgNP (CV) II em 460 nm, apesar de apresentar uma larga banda de absorção (Figura 4).

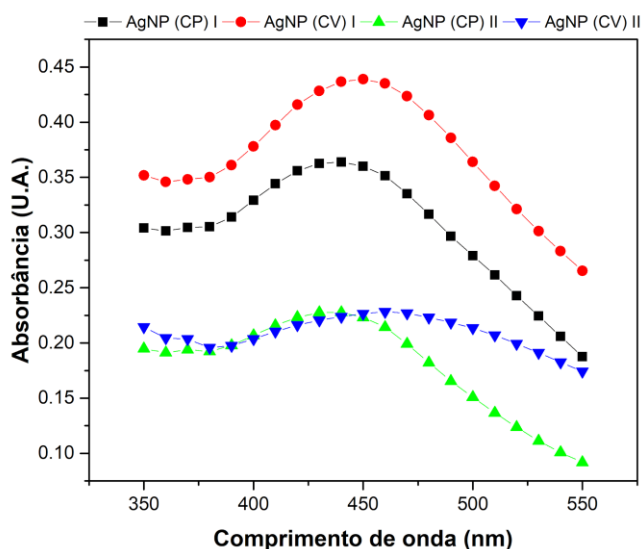


Figura 4. Curvas de absorção das AgNPs de CP e CV dos sachês I e II. Os comprimentos de onda analisados foram de 350 a 550 nm.

Os gráficos de absorbância da Figura 5 também apresentam indícios de formação de AgNPs para a síntese realizada com os extratos testados, bem como a mudança de coloração observada nos tubos de ensaio contendo as reações de síntese. Nota-se que as sínteses realizadas com extrato de CV se destacam com uma curva mais acentuada, possivelmente indicando maior formação de partículas.

Estudos sugerem que uma das classes de compostos presentes nos extratos de *C. sinensis* são os polifenóis, como os flavonoides, os quais podem fazer parte do processo de síntese de NPMs (BALENTINE; WISEMAN; BOUWENS, 1997; BEGUM

et al., 2009) auxiliando na biorredução da prata e na cobertura de NPMs (SEABRA et al., 2017). A diferença entre os extratos de CP e CV está nos níveis de oxidação dos polifenóis, os compostos no CV apresentam menores níveis de oxidação, já no CP são completamente oxidados (ONITSUKA; HAMADA; OKAMURA, 2019). Possivelmente, isso pode explicar o indicativo de maior formação de AgNPs por extratos de CV.

Pode-se observar que as populações de AgNPs apresentam diâmetro hidrodinâmico por intensidade, por volta de 100 nm com ambos os extratos (CP e CV) I e II. E quando comparados os resultados obtidos entre as sínteses realizadas com extratos dos sachês I com as dos sachês II, observa-se que mesmo sendo diferentes, apresentam perfis de AgNPs com características semelhantes. Os extratos (CP e CV) I e II apresentaram distribuição de tamanho, com valores altos de diâmetro hidrodinâmico, devido a aglomerados de biomoléculas e partículas presentes na solução aquosa dos extratos.

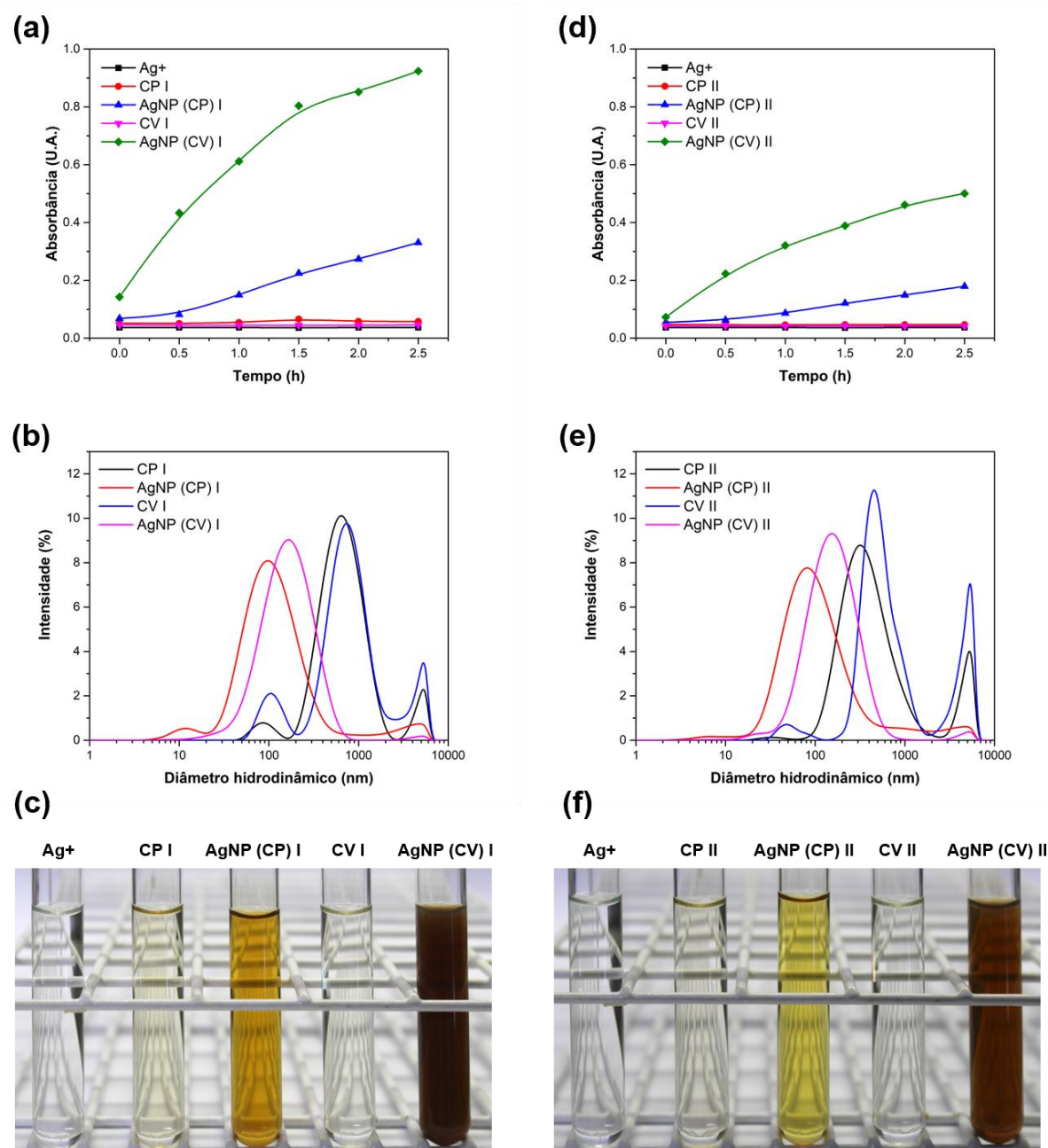


Figura 5. Caracterização das AgNPs sintetizadas por rota de síntese verde a partir de extratos de *C. sinensis* (CP e CV). Dados referentes à extração com sachês I (primeiro uso) e II (segundo uso): (a) e (d) Cinética de formação de AgNPs durante a síntese de 2,5 horas utilizando a média da absorbância dos 5 lotes de AgNPs; (b) e (e) Distribuição média do diâmetro hidrodinâmico em intensidade de amostras dos extratos e 5 lotes de AgNPs sintetizadas; (c) e (f) Amostras representativas após as reações de síntese.

Além da caracterização da absorbância e do diâmetro hidrodinâmico das amostras de AgNPs, a média do diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*) - dado em número, o índice de polidispersividade (Pdl) e o potencial Zeta foram determinados. Estes dados são apresentados na Tabela 3, onde observa-se que as AgNPs (CV)

apresentaram Pdl relativamente menor em relação às AgNPs (CP), indicando maior homogeneidade no nanossistema desenvolvido. No entanto, o potencial Zeta de todas as AgNPs foram detectados na faixa de instabilidade incipiente, mas as AgNPs (CP) demonstraram potenciais relativamente maiores em módulo, indicando estabilidade coloidal maior do que em AgNPs (CV). Quando comparados os potenciais Zeta das AgNPs sintetizadas com sachês I e II, permaneceram com instabilidade incipiente.

Tabela 3. Características físico-químicas das AgNPs sintetizadas utilizando os extratos da planta *C. sinensis* de CP e CV. Diâmetro hidrodinâmico médio (*Z-average*), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial Zeta. Valores referentes às médias e desvios padrão da média de três leituras independentes.

Sachês novos	Z-Average (d.nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
AgNP (CP) I_L1	82,89 ± 1,19	0,413 ± 0,013	-24,5 ± 4,0
AgNP (CP) I_L2	82,07 ± 2,34	0,442 ± 0,014	-20,3 ± 0,5
AgNP (CP) I_L3	83,80 ± 2,63	0,436 ± 0,022	-23,5 ± 2,3
AgNP (CP) I_L4	84,26 ± 1,98	0,430 ± 0,023	-21,2 ± 0,9
AgNP (CP) I_L5	78,55 ± 1,65	0,439 ± 0,014	-20,9 ± 1,2
AgNP (CV) I_L1	121,90 ± 0,87	0,377 ± 0,002	-13,8 ± 0,6
AgNP (CV) I_L2	129,10 ± 1,36	0,291 ± 0,004	-13,0 ± 0,2
AgNP (CV) I_L3	130,00 ± 0,64	0,330 ± 0,036	-13,3 ± 1,0
AgNP (CV) I_L4	125,80 ± 4,26	0,335 ± 0,037	-13,9 ± 1,8
AgNP (CV) I_L5	126,10 ± 2,16	0,333 ± 0,045	-13,1 ± 0,4
Sachês usados	Z-Average (d.nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
AgNP (CP) II_L1	67,77 ± 1,29	0,417 ± 0,013	-17,2 ± 0,5
AgNP (CP) II_L2	74,27 ± 6,29	0,443 ± 0,021	-18,3 ± 3,1
AgNP (CP) II_L3	70,89 ± 1,10	0,427 ± 0,014	-18,3 ± 6,1
AgNP (CP) II_L4	75,92 ± 3,89	0,451 ± 0,016	-19,2 ± 2,1
AgNP (CP) II_L5	84,35 ± 1,29	0,475 ± 0,008	-18,1 ± 1,5
AgNP (CV) II_L1	136,00 ± 3,12	0,344 ± 0,028	-14,5 ± 0,8
AgNP (CV) II_L2	123,60 ± 1,85	0,307 ± 0,047	-15,5 ± 0,7
AgNP (CV) II_L3	125,60 ± 0,81	0,296 ± 0,019	-15,4 ± 0,8
AgNP (CV) II_L4	123,40 ± 3,24	0,300 ± 0,029	-16,1 ± 0,6
AgNP (CV) II_L5	118,40 ± 1,51	0,327 ± 0,019	-14,7 ± 0,8

O diâmetro seco das AgNPs foi avaliado por MET, e as características de forma das nanopartículas também foram observadas (Figura 6). A análise por MET

revelou partículas com diferentes formatos, mas em sua maioria esféricas. As AgNPs (CP) I apresentaram diâmetro seco médio de 17,61 nm; AgNPs (CV) I com 70,50 nm; AgNPs (CP) II com 18,45 nm, e AgNPs (CV) II com 10,09 nm.

As diferenças entre os diâmetros hidrodinâmico e o seco são pelo fato de se utilizar técnicas diferentes. Onde o diâmetro hidrodinâmico é medido em solução aquosa e considera a camada de solvatação ao redor das AgNPs. Além de ser uma medida indireta por correlacionar outros fatores como o movimento browniano das partículas ao seu tamanho. Já o diâmetro seco é medido após secagem ao ar da amostra e sob vácuo. Além disso, ambos os diâmetros e a abundância da morfologia quase esférica são semelhantes à literatura (SUN et al., 2014).

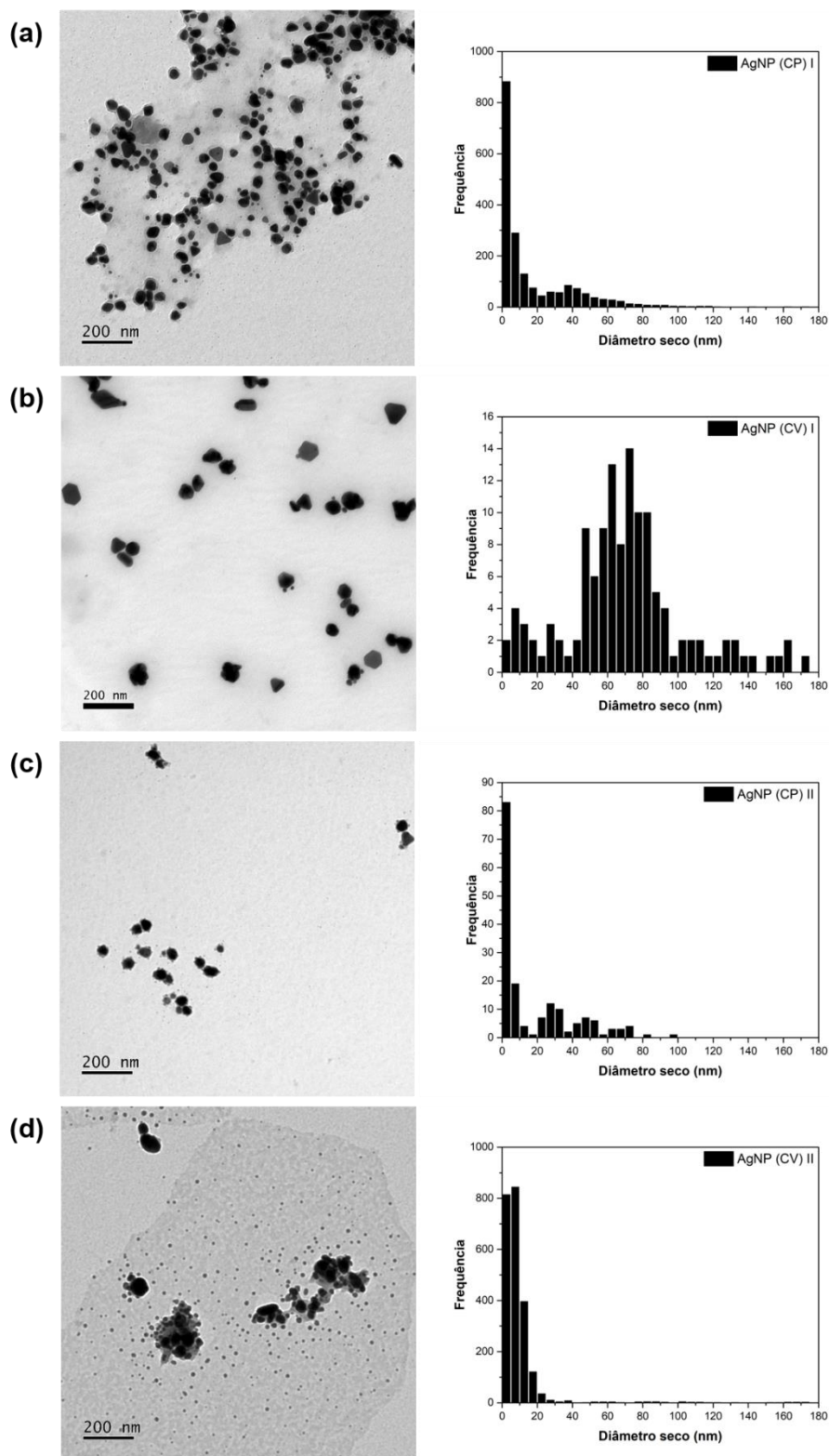


Figura 6. Microscopia eletrônica de transmissão para avaliação do diâmetro seco e da forma das AgNPs produzidas com os extratos de CP e CV de sachês I e II. Imagens e gráficos de histograma de distribuição de classes com número de estruturas e o diâmetro (nm) seco das amostras de AgNP (CP) I (a); AgNP (CV) I (b); AgNP (CP) II (c); e AgNP (CV) II (d).

5.2. Digitalização 3D de materiais botânicos

Os modelos CAD, que geralmente são utilizados para processos de fabricação 3D foram gerados neste estudo a partir das técnicas de digitalização 3D já descritas. Os tecidos vegetais de *Hibiscus brackenridgei* (flor e folha de hibisco amarelo), *Plumeria rubra* (flor e folha de jasmim-manga), *Malus domestica* (maçã) e *Phaseolus vulgaris* (semente de feijão carioca) foram digitalizados por escaneamento 3D e fotogrametria.

O tempo de cada aquisição durante o processo de digitalização 3D foi monitorado com um cronômetro e comparado entre as duas técnicas utilizadas e os dois dias avaliados, ou seja, o dia da coleta do material vegetal (dia 0) e após 3 dias da coleta (dia 3). Na Figura 7, observa-se que geralmente a fotogrametria é mais rápida em comparação ao escaneamento 3D, exceto para a digitalização da semente de feijão, devido ao seu tamanho em comparação com os outros materiais. Além disso, na mesma figura, observa-se o monitoramento da massa dos materiais avaliados, o qual corrobora com os períodos de senescência e germinação (no caso da semente de feijão), ou seja, a tendência a perder ou ganhar massa, influenciando na forma e tamanho do modelo CAD.

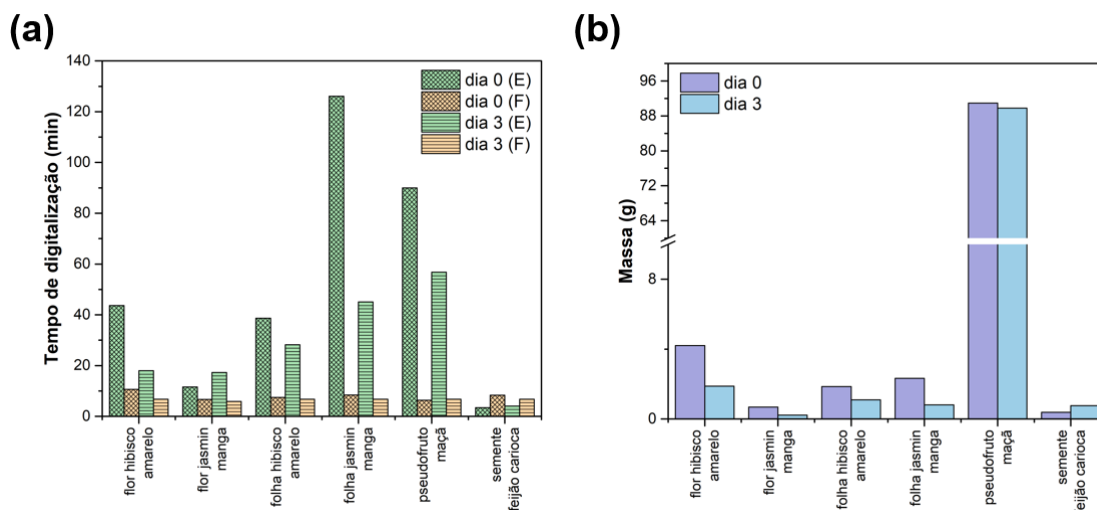


Figura 7. (a) Tempo de digitalização dos tecidos vegetais de *H. brackenridgei* (flor e folha de hibisco amarelo), *P. rubra* (flor e folha de jasmim-manga), *M. domestica* (maçã) e *P. vulgaris* (semente de feijão carioca) durante digitalização por escaneamento 3D (E) e com fotogrametria (F) nos dias 0 e 3. (b) Massa dos tecidos vegetais analisados como medida real de morfometria nos dias 0 e 3.

A partir dos modelos 3D, foram analisadas características morfológicas qualitativas, como a forma e a coloração, e comparando-as com propriedades dos materiais originais, como pode ser observado na Figura 8. Cada tecido vegetal avaliado, possui representado na figura duas imagens (uma em cada linha, na mesma coluna) da técnica de escanemamento 3D e duas imagens da técnica de fotogrametria, em que uma corresponde ao arquivo com nuvem de pontos e a outra ao modelo final já renderizado (produto final de um processamento digital). Nota-se que para o escaneamento 3D, materiais como algumas folhas, podem ter sofrido com efeitos de reflexão da luz no material durante a digitalização, gerando um modelo com um volume maior. Já para a fotogrametria, alguns materiais menores e mais delicados, como a flor de jasmim-manga e a semente de feijão carioca, não possibilitaram gerar modelos 3D por não terem sido geradas nuvens de pontos com informações tridimensionais suficientes para gerar uma malha densa. Alguns modelos 3D obtidos também podem ser observados [neste link](#).

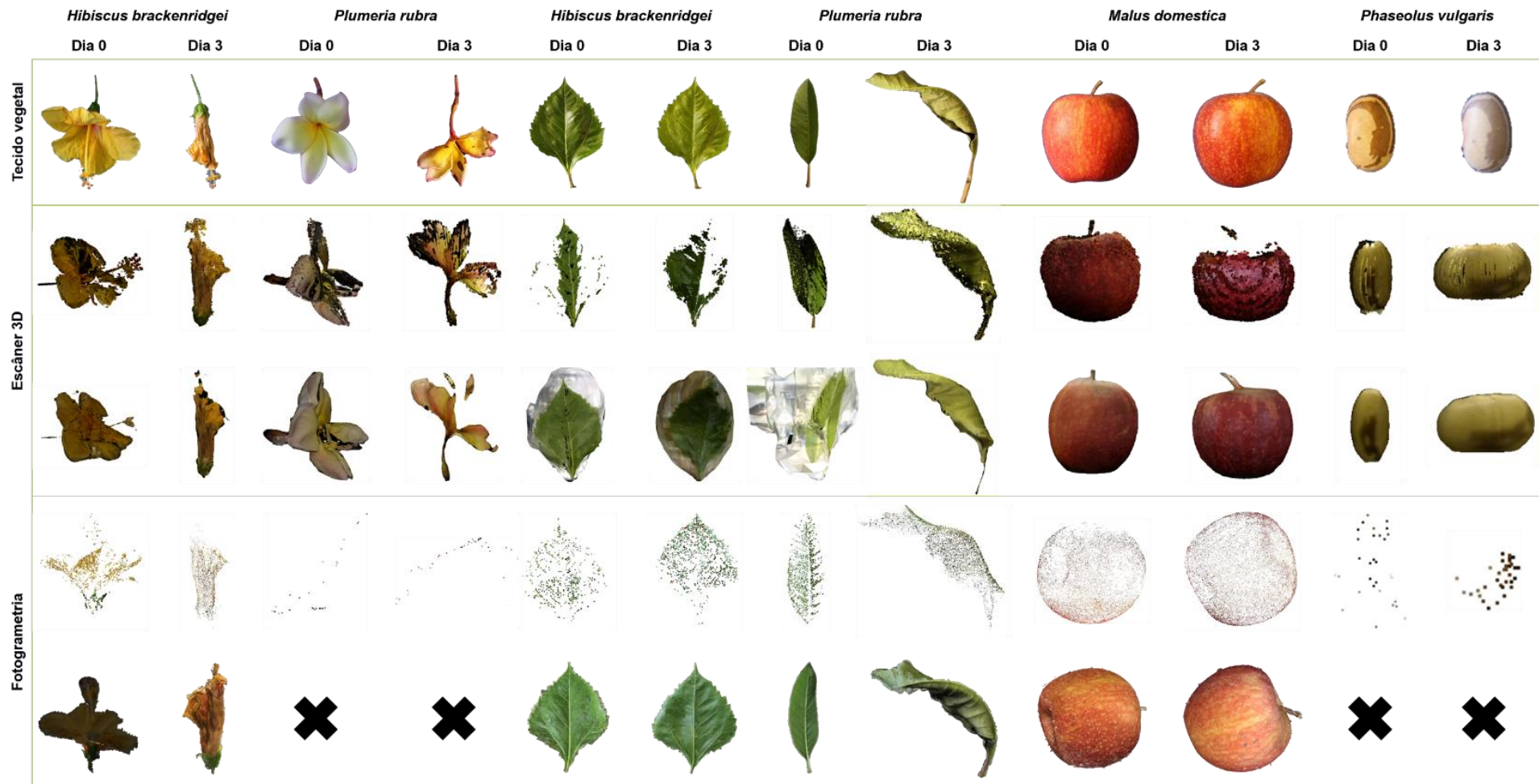


Figura 8. Tecidos vegetais de *H. brackenridgei*, *P. rubra*, *M. domestica* e *P. vulgaris* avaliados após a coleta do material botânico (Dia 0) e após 3 dias da coleta (Dia 3) utilizando as técnicas de digitalização 3D com escaneamento 3D e com fotogrametria.

No entanto, o modelo 3D gerado a partir do escaneamento 3D da semente de feijão carioca foi um dos modelos com maior semelhança ao material vegetal original. Por isso, e pelo modelo ser simples, tamanho reduzido e com forma orgânica bem definida, o modelo foi selecionado para a fabricação 3D em termoplástico e bioimpressão 3D.

A digitalização 3D de materiais botânicos se mostrou bem mais abrangente e aplicável que apenas a finalidade de obtenção de modelos 3D (CAD) para a fabricação 3D. Os modelos 3D de tecidos vegetais obtidos podem facilmente serem complementares a documentos de exsicatas, por exemplo. Assim, exsicatas 3D poderão representar um modelo virtual 3D com características de um material vegetal fresco, diferentemente de uma exsicata convencional na qual o material é prensado e seco. Estas informações poderão ser armazenadas em bancos de dados (herbários 3D) e serem prontamente acessíveis a pesquisadores e estudantes para estudos botânicos.

Estudos nessa área de digitalização e reconstrução 3D têm demonstrado a utilização de técnicas como a fotogrametria e o escaneamento de alta definição para aplicações na agricultura e em trabalhos de morfometria para medição de volume, topografia, geometria e fenotipagem de plantas (FAHLGREN; GEHAN; BAXTER, 2015; GIBBS et al., 2016; PAULUS et al., 2014). Adicionalmente, também tem-se utilizado outras técnicas para obtenção de modelos 3D de plantas, como tomografia computadorizada (CT) e imageamento por ressonância magnética (MRI) para a fenotipagem (LI; ZHANG; HUANG, 2014) e até interações planta-solo (GARBOUET et al., 2012). Estas técnicas de CT e MRI também são muito utilizadas em aplicações médicas para a fabricação 3D (RENGIER et al., 2010).

Além disso, um modelo digital, que por si oferece informações visuais sobre o material, pode oferecer características visuais de textura e forma de fitopatologias. Também pode fornecer medidas estruturais em alta resolução e fidedignidade, além de informações que comumente não são obtidas em avaliações morfométricas como o volume do tecido vegetal, portanto podendo atuar como ferramenta inovadora para estudos de morfologia e taxonomia vegetal. Outra aplicação para estes modelos 3D seria na área educacional, desde a visualização do modelo de tecido vegetal 3D em realidades virtual, aumentada ou mista até a fabricação digital em termoplástico do modelo para aprendizado de indivíduos com deficiência visual.

5.3. Biofabricação de estruturas 3D produzidas com hidrogéis e AgNPs

Durante os processos iniciais para obtenção de conhecimento e otimização da biofabricação de estruturas 3D produzidas com biopolímeros, foram realizados testes primários, os quais foram parte apenas da etapa de experimentação e não da metodologia final deste trabalho. Utilizou-se técnica de moldagem e também uma plataforma robótica baseada em CNC, a qual foi adaptada para tal função (Figura 9).

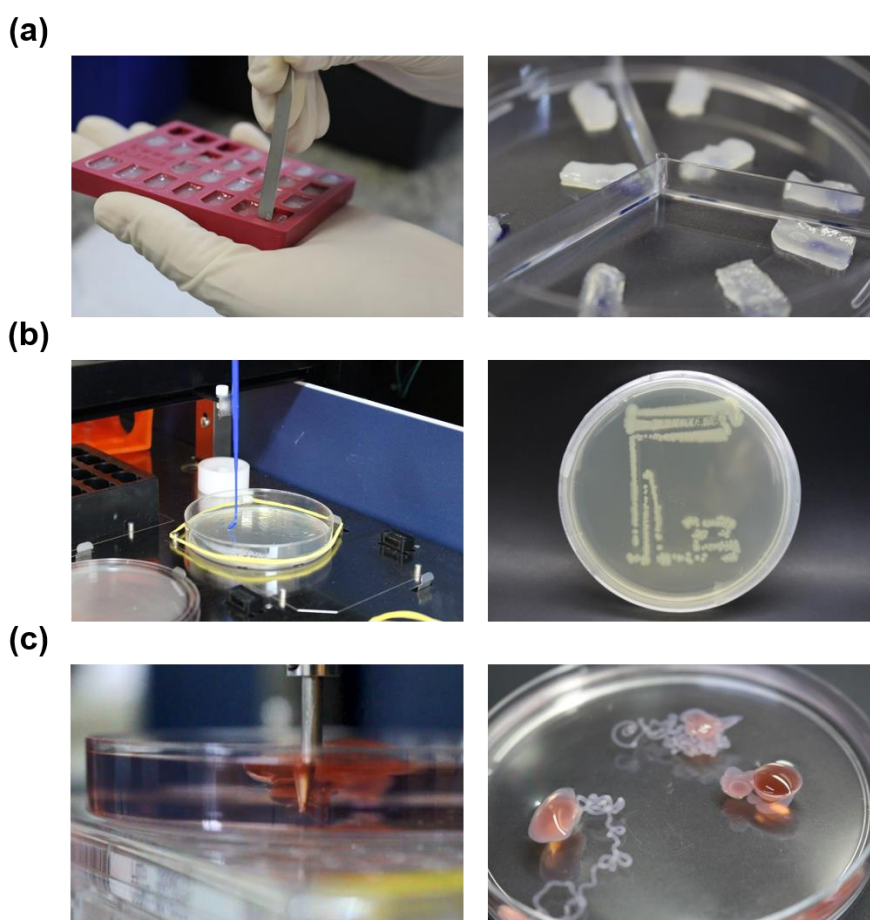


Figura 9. Técnicas e metodologias aplicadas durante período de iniciação em biofabricação. (a) biofabricação por moldagem em formas de silicone, utilizando gelatina e alginato; (b) adaptação de plataforma robótica para semeadura de bactérias; (c) biofabricação de fibras de alginato utilizando plataforma robótica adaptada.

Algumas estruturas representativas biofabricadas em plataforma robótica podem ser observadas na Figura 10, e foram produzidas a partir de alginato de sódio a 2% e reticuladas durante o processo de biofabricação em solução de CaCl_2 a 2%.

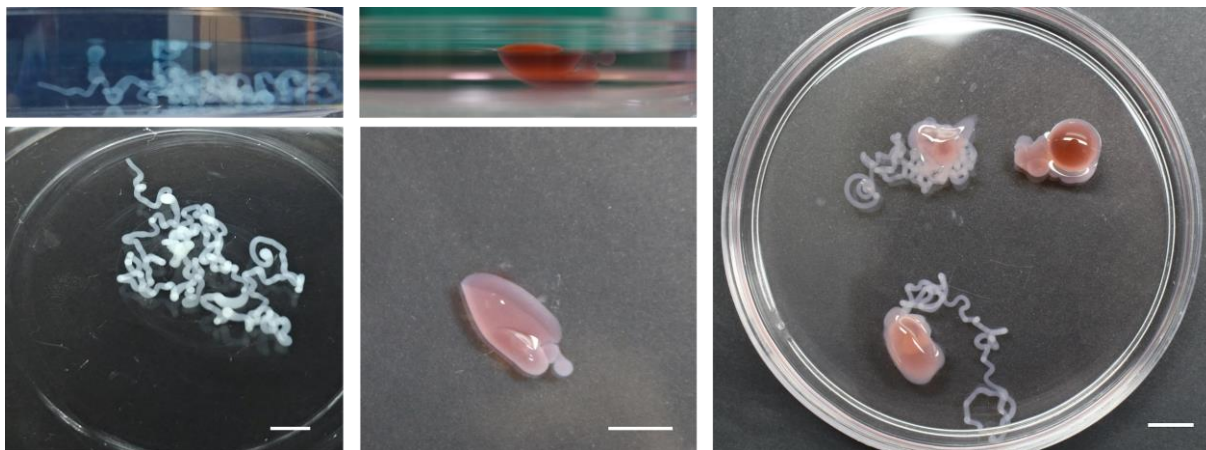


Figura 10. Estruturas 3D de alginato a 2% (com corantes azul e vermelho em sua composição) com reticulação de CaCl_2 a 2% produzidas com plataforma robótica adaptada durante otimização de processos de biofabricação. As barras de escala equivalem a 1 cm.

Apesar das estruturas produzidas por moldagem e pela plataforma robótica demonstrarem boa estabilidade e formas atrativas, a técnica de biofabricação via moldagem precisaria de uma triagem de biomateriais específicos para a técnica; já o uso da plataforma robótica não favoreceu a reprodutibilidade para produção das estruturas 3D. Assim, outras técnicas de biofabricação foram avaliadas, tais como fiação úmida, para a formação de fibras; gotejamento, para a formação de esferoides; e bioimpressão 3D, para a formação de estruturas com forma definida por modelos CAD. Estas técnicas se mostraram promissoras para a biofabricação de estruturas 3D estáveis, reprodutíveis e com composições de hidrogéis diferentes, as quais foram selecionadas para continuidade deste trabalho.

O alginato de sódio mostrou ser um biopolímero promissor na produção de hidrogéis e em processos de biofabricação devido às suas características de viscosidade, fácil reticulação iônica, biocompatibilidade e aplicações já bem conhecidas. Por isso, o alginato foi o biopolímero escolhido como base na composição dos hidrogéis. As concentrações dos biopolímeros e do agente reticulante foram baseadas na literatura e adaptadas quando necessário.

As estruturas 3D foram produzidas utilizando as 3 composições baseadas em alginato: 1) alginato de sódio 3%; 2) alginato de sódio 3% e carboximetilcelulose 9%; e 3) alginato de sódio 2,8%, agarose 0,9% e carboximetilcelulose 3%. Devido à viscosidade de cada uma das composições observou-se limitações na escolha de algumas das técnicas utilizadas para a biofabricação. Por isso, a composição 1

mostrou-se eficiente para as técnicas de fiação úmida e gotejamento e demonstrou-se ser pouco viscosa e fluida, permitindo a biofabricação de fibras e esferoides. Para o arcabouço estrutural se manter firme foi necessário sua gelificação rápida e assim foi preciso que as estruturas fossem produzidas dentro da solução reticulante. Já a composição 2 apresentou alta viscosidade e pode manter sua estrutura antes do processo de reticulação, por isso foi eficiente para as técnicas de fiação úmida e bioimpressão 3D. Finalmente, a composição 3 apresentou viscosidade moderada devido às baixas concentrações dos reagentes e também demonstrou-se favorável para o uso nas técnicas de fiação úmida e bioimpressão 3D.

Após os processos de biofabricação por meio de cada técnica já descrita, as estruturas se demonstraram estáveis (Figura 11), e não se desfizeram em meio aquoso. Além disso, a adição de AgNPs não alterou as propriedades dos hidrogéis e não afetou os processos de biofabricação.

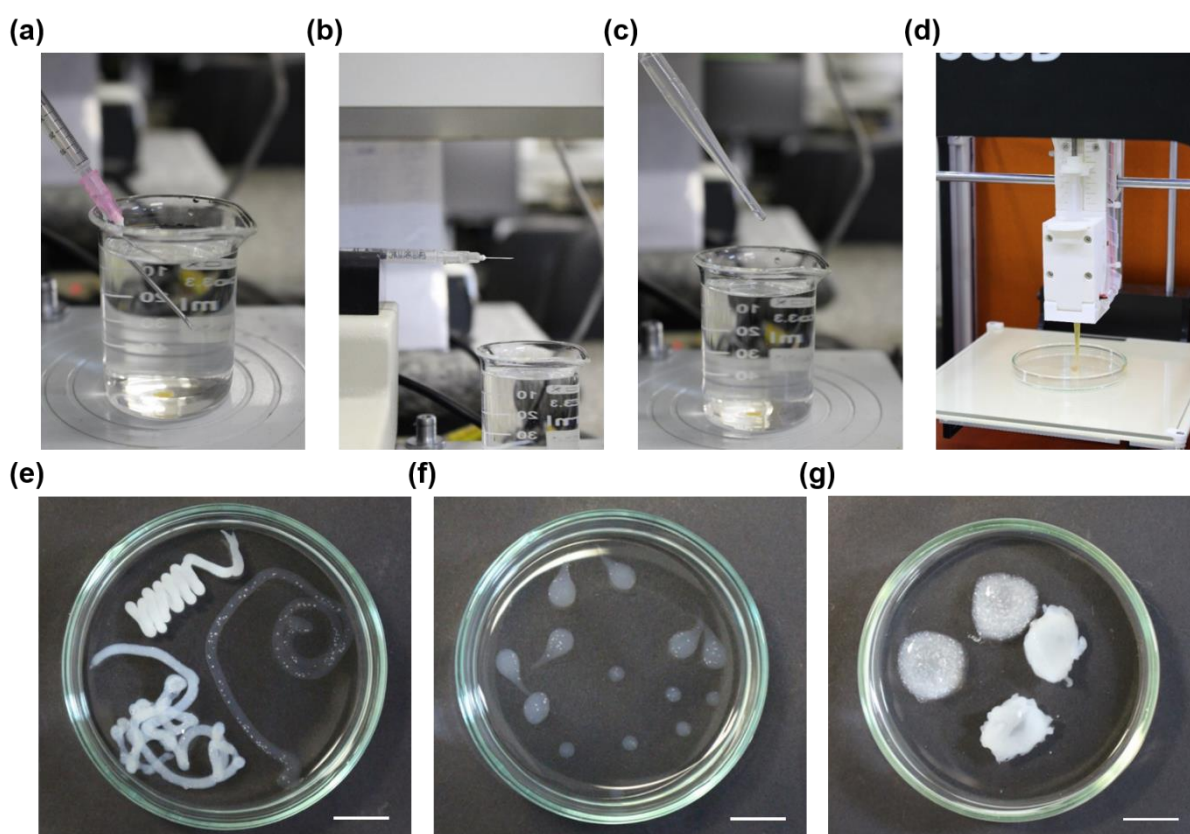


Figura 11. Técnicas de biofabricação utilizadas neste trabalho e estruturas 3D biofabricadas: fiação úmida (a) para a produção de fibras (e); gotejamento por injetor de seringa (b) e com pipeta Pasteur (c) para a produção de esferoides (f); e bioimpressão 3D (d) para a produção de modelos de sementes (g). Foram utilizadas as 3 composições sem AgNPs para representação das estruturas. As barras de escala equivalem a 1 cm.

As fibras foram as estruturas mais versáteis, pois foi possível biofabricá-las em diferentes tamanhos e formas com as 3 composições testadas (Figura 11 e), demonstrando que a estrutura fibrosa e a técnica podem ser aplicadas independentemente da característica de viscosidade do hidrogel.

Em estudos da área de biofabricação, é comum o uso de hidrogéis contendo alginato de sódio, o qual foi a base das 3 composições, até mesmo para a fabricação de fibras de alginato utilizando a técnica de fiação úmida (HE et al., 2012; HU et al., 2016; WATTHANAPHANIT et al., 2010). Já para a formação de esferoides é mais comum o uso desta técnica com alginato para o aprisionamento de células bacterianas para a produção de metabólitos (AHMAD; PANDA, 2013; WYNANT et al., 2009).

Entre as 3 composições biopoliméricas de hidrogéis, as estruturas 3D produzidas com a composição 1 foram as que mostraram-se mais rígidas. Além disso, entre as composições de hidrogéis utilizadas em técnicas de bioimpressão 3D, a composição 3 foi considerada de qualidade inferior porque durante processo de bioimpressão camada a camada, o arcabouço estrutural não manteve a estrutura oval como o modelo CAD da semente (observado na *time-lapse* [neste link](#)); o que poderia ser explicado pela viscosidade moderada do hidrogel em relação à composição 2. Na Figura 11 g, é possível visualizar os modelos de semente biompressas, onde as estruturas mais translúcidas e com forma mais esférica foram produzidas com a composição 3. E diferentemente destas estruturas sem forma definida, as estruturas mais opacas e com forma oval foram produzidas com a composição 2, e apresentaram maior semelhança com o modelo CAD (observado na *time-lapse* [neste link](#)).

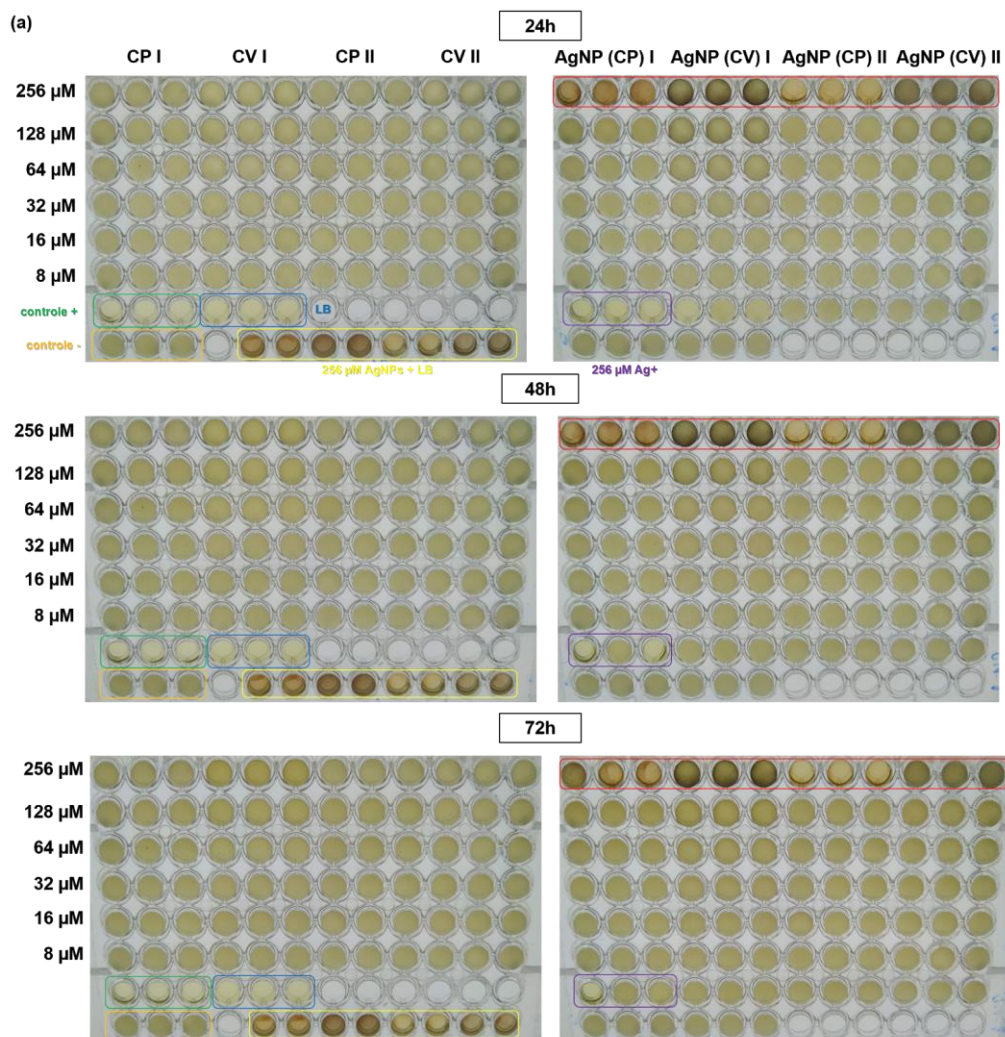
A biompressão 3D é uma das técnicas mais utilizadas na área de biofabricação, e um dos requisitos do hidrogel para a fidelidade ao modelo CAD de uma estrutura bioimpressa é a chamada printabilidade ou capacidade de impressão (KYLE et al., 2017; THAYER; MARTINEZ; GATENHOLM, 2018). Esta capacidade de impressão depende da composição do hidrogel, viscosidade, e até a agulha ou bico de impressão podem afetar a forma da estrutura bioimpressa. Por isso, a falta de fidelidade na forma da semente biompressa com o hidrogel de composição 3 pode ser explicada pela baixa capacidade de impressão do hidrogel.

As técnicas de biofabricação 3D utilizadas se mostraram viáveis e práticas durante a execução da produção das estruturas. No entanto, a bioimpressão 3D foi a

técnica mais robusta e demorada, por ser uma tecnologia que fabrica a estrutura camada a camada. Para cada estrutura de semente bioimpressa foram gastos aproximadamente de 6 a 8 minutos que foi o equivalente a aproximadamente um ciclo de biofabricação de aproximadamente 8 estruturas nas outras técnicas de biofabricação para a produção de esferoides ou fibras. Além disso, a bioimpressão 3D necessariamente precisa de um arquivo CAD com o modelo digital 3D para o preparo do arquivo .gcode visando ao processo de bioimpressão, o que pode demandar tempo também para a configuração do arquivo ideal para a bioimpressão 3D de uma determinada estrutura.

5.4. Atividade biológica de AgNPs livres

As atividades biológicas antibacterianas das AgNPs livres foram avaliadas com ensaios de CIM em microrganismo modelo *E. coli*. Na Figura 12, é possível observar avaliando a turbidez do meio LB e o gráfico da taxa de crescimento microbiano que a concentração inibitória mínima das AgNPs de CP dos sachês I e II para evitar o crescimento da bactéria foi a concentração de 256 μM (destaque em vermelho nas placas da Figura 12).



(b)

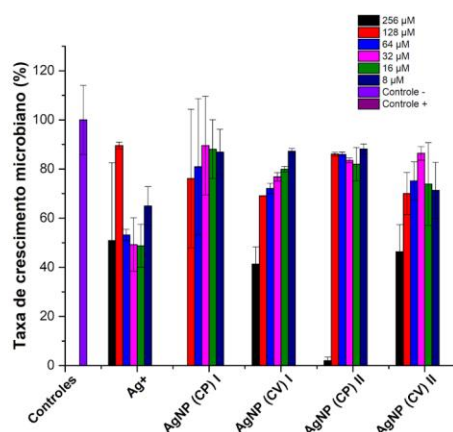


Figura 12. Ensaio de CIM de AgNPs e extratos de CP e CV dos sachês I e II testadas em *E. coli* nas concentrações de 8 µM a 256 µM. (a) Microplacas do ensaio durante os intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas; (b) Viabilidade celular de *E. coli* ao final do ensaio para as AgNPs testadas.

Observa-se também que apenas os extratos de CP e CV de ambos os sachês não apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli*. Além disso, a solução de

Ag⁺ apresentou atividade antimicrobiana inicial, mas ao final das 72 horas apenas um poço da triplicata apresentava inibição do crescimento da bactéria testada. Além disso, todas as AgNPs de CP e CV dos sachês I e II demonstraram atividade antimicrobiana em até 50% do crescimento da bactéria *E. coli*, no entanto as AgNPs (CP) I e II tiveram maior atividade antimicrobiana, apresentando total inibição, e semelhantes ao controle positivo (antibiótico penicilina e estreptomicina). As AgNPs de CP e CV dos sachês I e II também tiveram efeito antibiótico semelhante e por esta razão foi escolhido apenas as AgNPs de CP e CV dos sachês II para os testes seguintes em processos de biofabricação e fabricação 3D, devido à possibilidade de se utilizar um resíduo de material orgânico, ou seja, sachês já utilizados para produção de chás.

Além disso, muitos trabalhos têm discutido o efeito biológico e características das AgNPs que podem influenciar na atividade antimicrobiana, como tamanho (LU et al., 2013), forma (PAL; TAK; SONG, 2007), carga (ABBASZADEGAN et al., 2015) e cobertura química (NAVARRO et al., 2015). Avaliando a atividade de AgNPs sintetizadas com extrato de *C. sinensis* contra *E. coli*, o tamanho menor e a presença de fitoquímicos na cobertura das AgNPs podem explicar a alta atividade antibacteriana (ROLIM et al., 2019).

5.5. Atividade biológica de estruturas biofabricadas em 3D com hidrogéis e AgNPs em sua composição

Para a avaliação da atividade antimicrobiana das estruturas 3D biofabricadas com AgNPs em sua composição foram feitos ensaios de difusão em meio LB líquido e sólido, e cultivo das estruturas biofabricadas com encapsulamento de *E. coli* em meio LB líquido.

Foram testadas todas as estruturas: fibras, esferoides e sementes bioimpressas com os 9 hidrogéis diferentes (3 composições contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs em cada composição). Nos ensaios de difusão em meio LB líquido (Figura 13) observou-se o crescimento microbiano a partir da turbidez no meio. As fibras (destaque em verde na Figura 13), esferoides (destaque em laranja na Figura 13), e sementes bioimpressas (destaque em azul na Figura 13) contendo ambas AgNPs apresentaram pouca turbidez no meio LB após 24 horas, comparado com as estruturas sem AgNPs (controle). Após 48 e 72 horas, a turbidez no meio aumentou, indicando crescimento microbiano. Além disso, foi observado que as

estruturas contendo carboximetilcelulose apresentaram maior turbidez no meio, indicando que o polímero pode favorecer o crescimento de bactérias. O crescimento microbiano também pode ser explicado pela concentração efetiva de AgNPs em cada poço, podendo estar abaixo de 256 μM pelo volume de hidrogel em cada estrutura ser estimado e também pela possível perda de hidrogel durante os processos de biofabricação devido à viscosidade de cada composição.

Nos ensaios de difusão em meio LB sólido (Figuras 14, 15 e 16) com fibras (destaque em verde nas Figuras 14, 15 e 16), esferoides (destaque em laranja nas Figuras 14, 15 e 16), e sementes bioimpressas (destaque em azul nas Figuras 14, 15 e 16) nota-se que as estruturas que estiveram com maior área de sua superfície em contato com a semente de *E. coli* no meio sólido apresentaram áreas de inibição em volta de alguns pontos específicos de estruturas contendo AgNPs de CP e CV. Isto é possível observar claramente nas fibras de todas 3 composições de hidrogéis contendo AgNPs as quais apresentaram áreas de inibição em pontos da fibra que havia maior contato com o meio sólido. Para os esferoides foi difícil perceber a eventual inibição devido seu formato esférico que pode prejudicar o contato entre a estrutura e a semente de bactéria. Já para as sementes bioimpressas em 3D não foi possível avaliar por inspeção visual alguma área de inibição, sendo possível perceber uma camada de solvatação circundando as sementes bioimpressas, o que provavelmente ocorreu durante a retirada das estruturas de um béquer contendo água e no momento da deposição das sementes, o volume de água ao seu redor comprometeu esta análise. Além disso, no caso das fibras contendo AgNPs, notou-se que o tamanho das áreas de inibição aumentaram após 24, 48 e 72 horas. E não foi observada diferença notória nas áreas de inibição entre as composições 1, 2 e 3.

Segundo trabalhos nessa área de hidrogéis antimicrobianos, as principais aplicações para estas estruturas 3D são em engenharia de tecidos para o cultivo de células, evitando a contaminação com microrganismos, e a aplicações biomédicas, como o uso em feridas para auxiliar na regeneração e evitar infecções (ALARCON et al., 2015; RAGHAVENDRA et al., 2013; SONG et al., 2015). Além disso, estas estruturas poliméricas têm substituído hidrogéis carregados com íons Ag^+ , devido o alto potencial antimicrobiano das AgNPs, no entanto é preciso ainda entender a citotoxicidade e o mecanismo de ação das AgNPs (UNNITHAN; ARATHYRAM; KIM, 2015).

Além de avaliar a difusão das AgNPs presentes nas estruturas em meio LB líquido e sólido, foi avaliada a atividade antimicrobiana quando o crescimento de bactérias ocorreu dentro das estruturas biofabricadas. Por isso foi utilizado o ensaio de encapsulamento de *E. coli* nos hidrogéis e estruturas biofabricadas. Para este teste foram escolhidas apenas as estruturas em fibras por ser a forma mais versátil e prática para a biofabricação de todas as 3 composições de hidrogéis, além da facilidade em aproximar o volume de cada estrutura produzida pela visualização da graduação na seringa.

Após 24 horas do ensaio de atividade antimicrobiana com encapsulados de *E. coli* em fibras nas 3 composições contendo as AgNPs de CP e CV e sem AgNPs em meio LB líquido (Figura 17), não foi observada alteração de turbidez indicativa do crescimento de bactérias no meio contido em cada um dos poços de todas as fibras que apresentaram AgNPs (CP e CV). Quando comparado com as fibras sem AgNPs (controle), nota-se a turbidez do meio, indicativo de crescimento bacteriano e já nas fibras contendo AgNPs não há nenhum indicativo de crescimento de bactérias, sugerindo o efeito antibiótico aumentado no interior das estruturas.

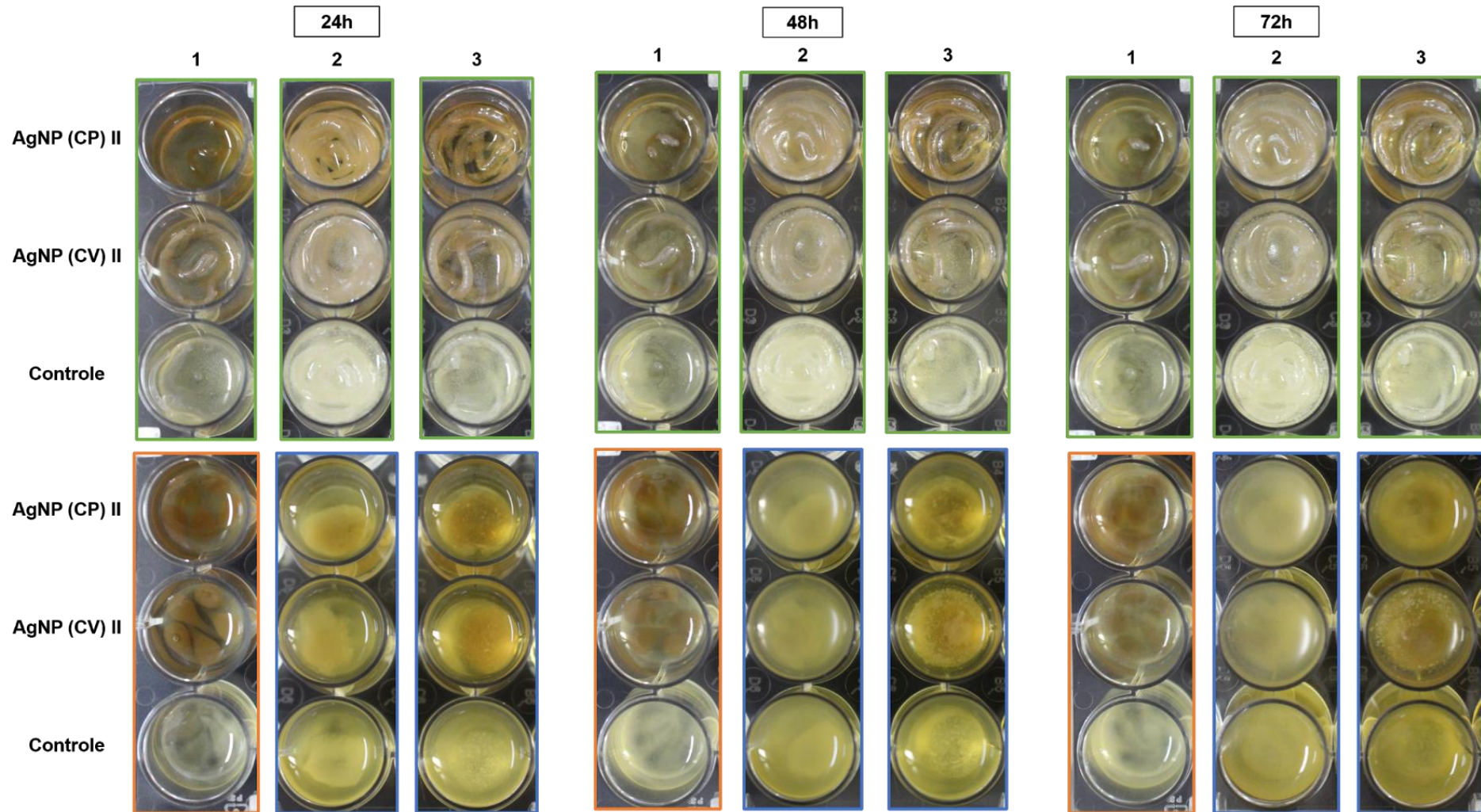


Figura 13. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB líquido com inóculo de *E. coli*, avaliando fibras (verde), esferoides (laranja) e sementes bioimpressas (azul) com as 3 composições de hidrogeis (1, 2, e 3) contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). Ensaio avaliado durante os intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas.

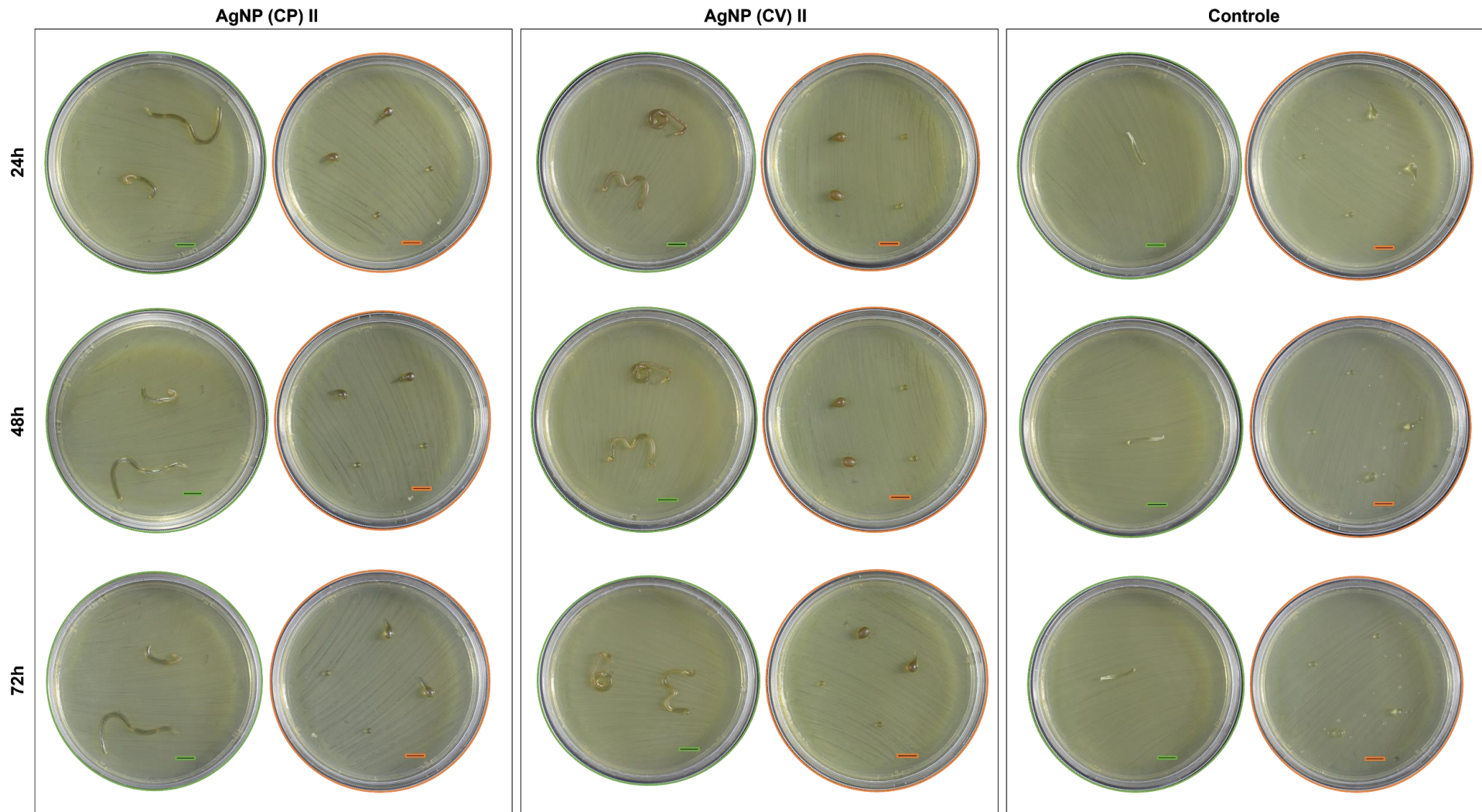


Figura 14. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB sólido com sementeira de *E. coli* avaliando fibras (verde) e esferoides (laranja) na composição 1 de hidrogel contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). As placas de Petri foram observadas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. As barras de escala equivalem a 1 cm.

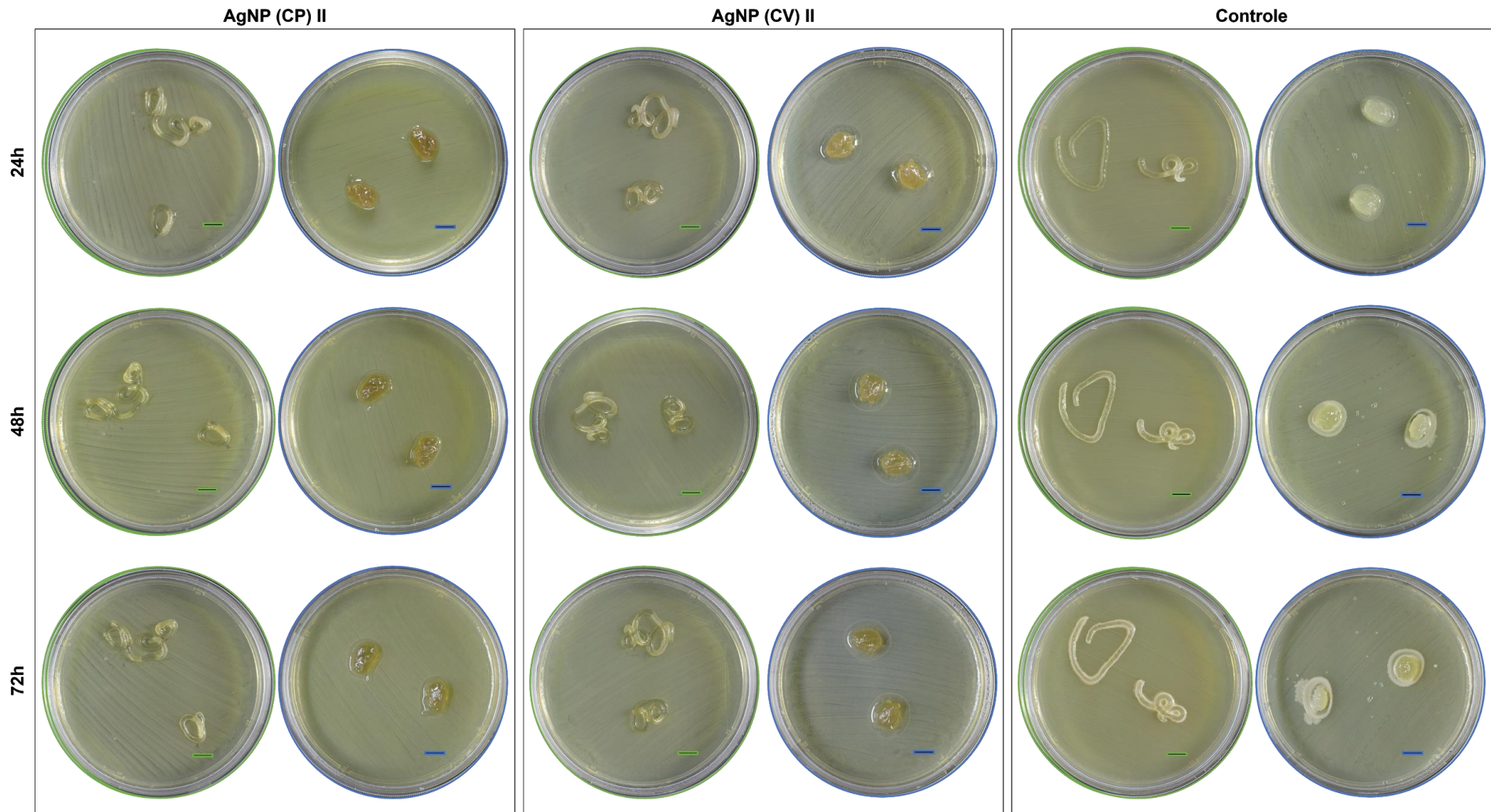


Figura 15. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB sólido com semeadura de *E. coli* avaliando fibras (verde) e sementes bioimpressas (azul) na composição 2 de hidrogel contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). As placas de Petri foram observadas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. As barras de escala equivalem a 1 cm.

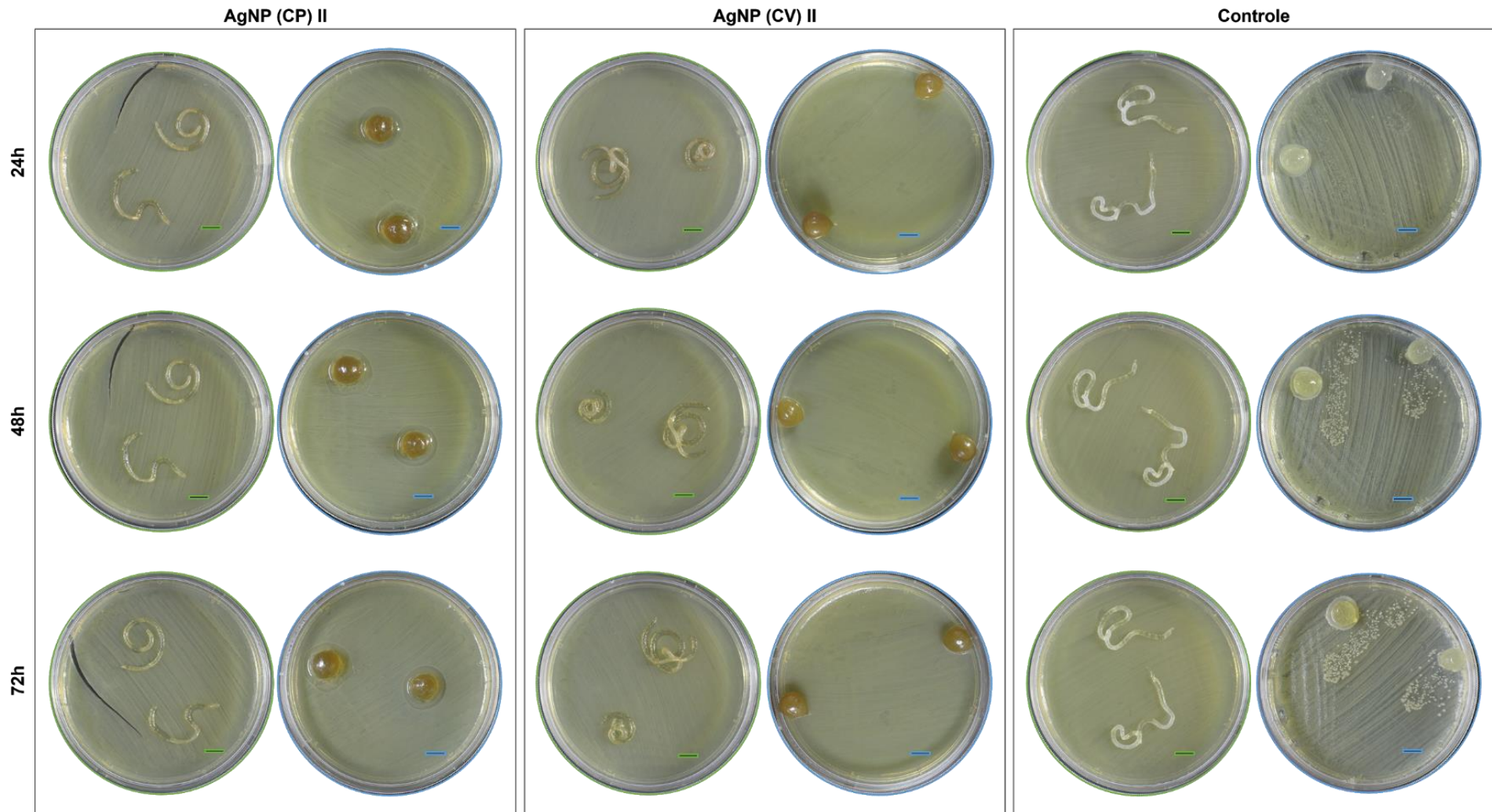


Figura 16. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB sólido com semeadura de *E. coli* avaliando fibras (verde) e sementes bioimpressas (azul) na composição 3 de hidrogel contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). As placas de Petri foram observadas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. As barras de escala equivalem a 1 cm.

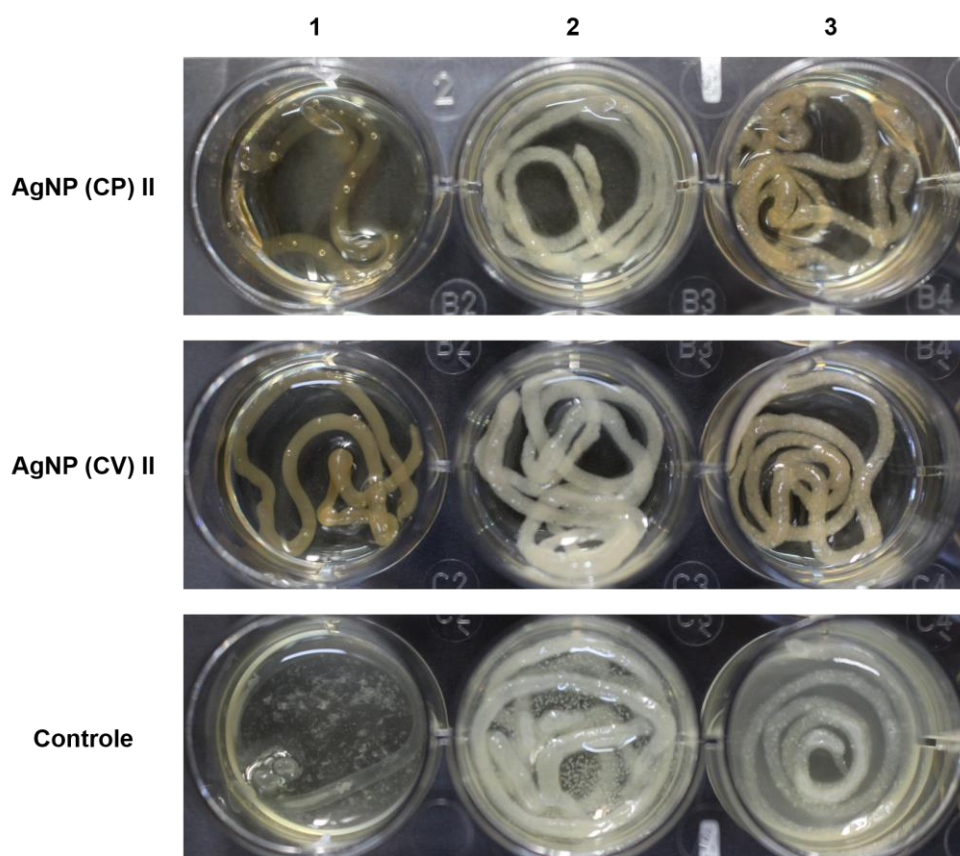


Figura 17. Ensaio de atividade antimicrobiana com encapsulados de *E. coli* em fibras nas 3 composições (1, 2 e 3) de hidrogéis contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle) em meio LB líquido. Crescimento bacteriano avaliado após 24 horas.

5.6. Atividade biológica de modelos 3D de termoplástico com AgNPs imobilizadas

Para a avaliação da possível atividade antimicrobiana dos modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS contendo AgNPs imobilizadas em suas superfícies (Figura 18) foram realizados ensaios de difusão em meio LB líquido e sólido da mesma forma do anteriormente apresentado com as estruturas biofabricadas.

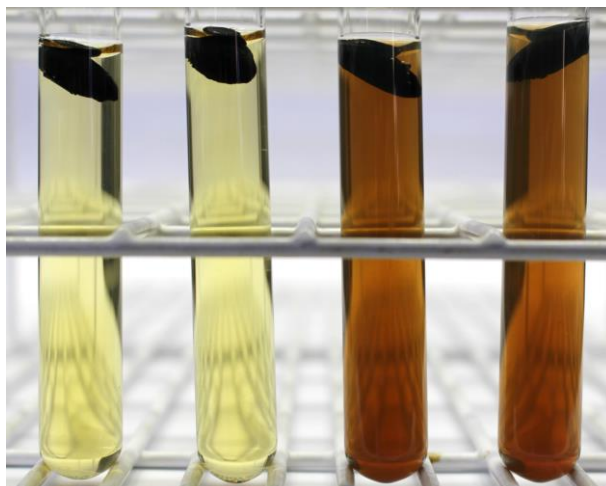


Figura 18. Modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico ABS durante a imobilização de AgNPs de CP e CV dos sachês I e II.

Nos ensaios de difusão em meio LB líquido (Figura 19) observou-se em todas as três condições (modelos de sementes em ABS com AgNPs CP e CV imobilizadas em sua superfície e sem AgNPs) o aumento da turbidez do meio líquido, indicando o crescimento bacteriano até nos poços que continham os modelos de sementes com AgNPs imobilizadas. O crescimento foi observado desde as primeiras 24 horas e se confirmou em 48 e 72 horas no ensaio. Pode-se sugerir que a concentração efetiva de AgNPs em cada poço foi abaixo da CIM por não ser possível saber a real concentração de AgNPs imobilizadas na superfície dos modelos de sementes em ABS durante o processo de imobilização.

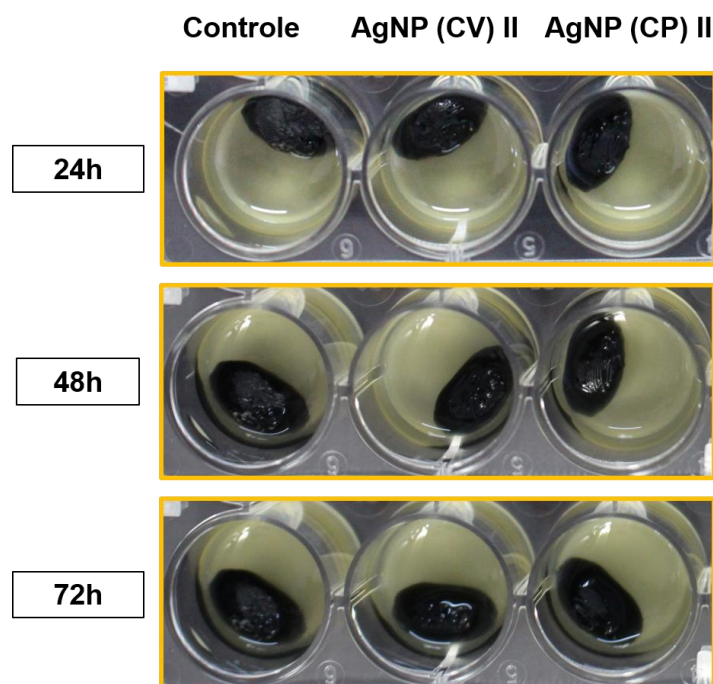


Figura 19. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB líquido com inóculo de *E. coli*, avaliando sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS contendo AgNP (CP) II ou AgNP (CV) II immobilizadas em sua superfície e sem AgNPs (controle). Ensaio avaliado durante os intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas.

Já nos ensaios de difusão em meio LB sólido (Figura 20) também não foi observado o efeito antibiótico das AgNPs. Nenhum halo ou área de inibição foi observado nas placas de Petri com semeadura de *E. coli* e os modelos de sementes em ABS contendo AgNPs immobilizadas em sua superfície. Isto pode ser explicado da mesma forma como no ensaio de difusão em meio líquido, por não saber a concentração efetiva na área da semente de ABS que estava em contato com a semeadura não foi possível observar atividade antibacteriana. Além disso, a área em contato com o meio sólido era mínima devido o formato oval do modelo impresso. As rachaduras presentes no meio LB sólido devem-se à pressão feita no momento da deposição das sementes de ABS sobre o meio sólido.

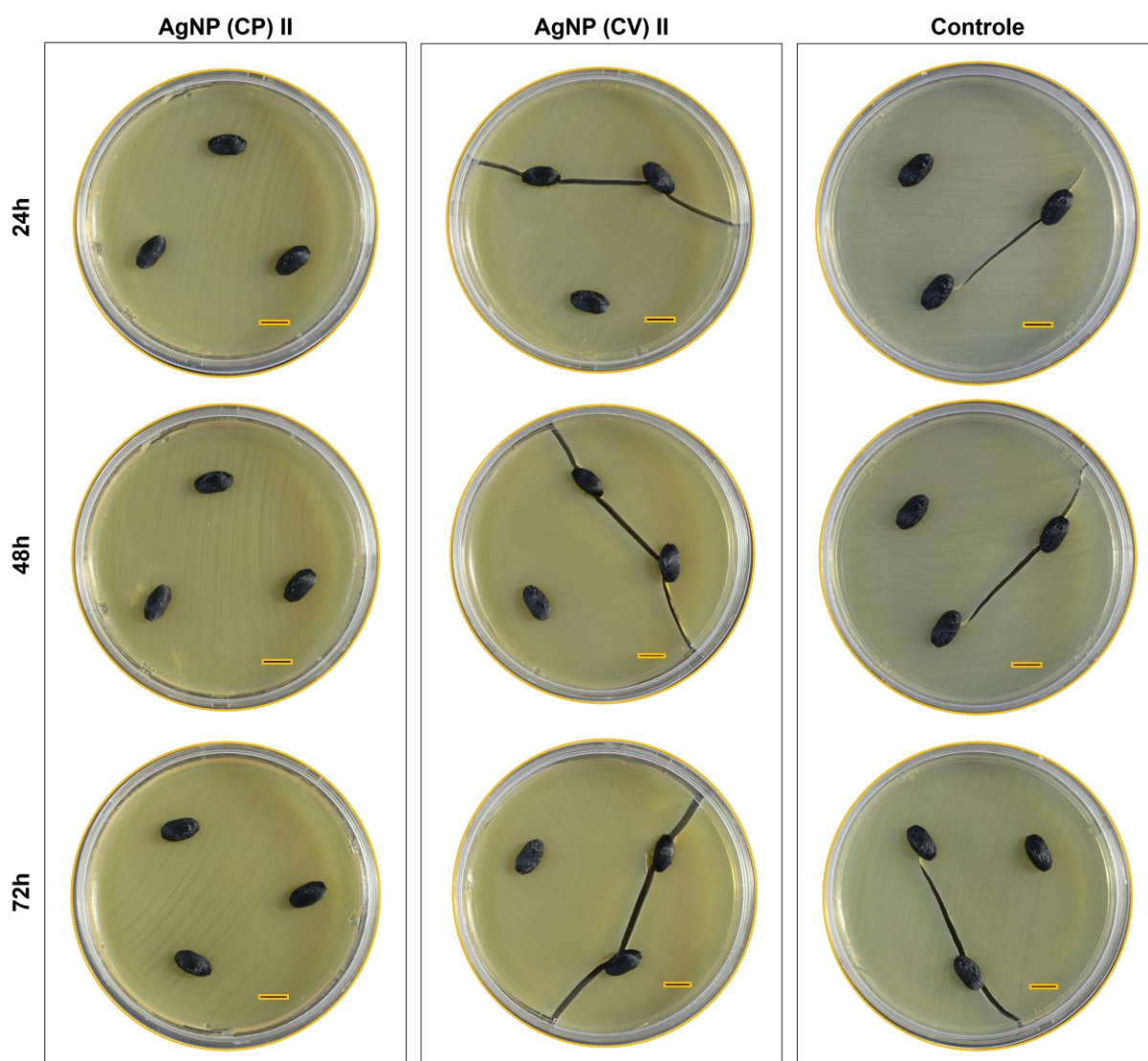


Figura 20. Ensaio de atividade antimicrobiana por difusão em meio LB sólido com sementeira de *E. coli* avaliando modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS contendo AgNP (CP) II ou AgNP (CV) II immobilizadas em sua superfície e sem AgNPs (controle). As placas de Petri foram observadas durante os intervalos de 24, 48 e 72 horas. As barras de escala equivalem a 1 cm.

Apesar de não apresentarem atividade antimicrobiana provavelmente por questões já discutidas, na literatura é possível encontrar estudos que a imobilização de AgNPs em superfícies poliméricas (LI et al., 2005; SILVA, 2015) e até têxteis utilizando AgNPs de extrato de *C. sinensis* (ONITSUKA; HAMADA; OKAMURA, 2019) a atividade antimicrobiana permanecia.

5.7. Caracterização das estruturas biofabricadas em 3D

As estruturas 3D biofabricadas foram avaliadas quanto à estabilidade térmica em meio LB líquido e também em análises por microscopia de luz e MEV de suas microestruturas internas.

A estabilidade estrutural foi avaliada em meio LB líquido, sem a adição de inóculo de *E. coli*, a 37°C, como pode ser observado na Figura 21. As fibras (destaque em verde na Figura 21), esferoides (destaque em laranja na Figura 21) e sementes bioimpressas (destaque em azul na Figura 21) permaneceram estáveis nessas condições durante os intervalos de tempo testados de 24, 48 e 72 horas. As estruturas mantiveram sua forma, sem se desfazer significativamente. Além disso, como já mencionado, as estruturas produzidas com a composição 1 foram as estruturas mais estáveis estruturalmente. As estruturas com as composições 2 e 3 pareciam mais frágeis devido ao seu peso mais pronunciado e consistência mais gelatinosa.

É possível observar também na Figura 21 que as estruturas sem AgNPs em sua composição (controles) foram contaminadas ao longo dos períodos de tempo avaliados, tendo como indicativo o aumento da turbidez do meio, indicativo do crescimento de algum microrganismo. Já a maioria das estruturas biofabricadas com AgNPs de CP e CV não apresentaram turbidez ao longo dos períodos de tempo do ensaio. É possível notar também que novamente as estruturas contendo o polímero carboximetilcelulose (composições 2 e 3) foram facilmente contaminadas e a turbidez aumentou até o fim do ensaio. No entanto, a composição 3 de hidrogel que apresenta menor concentração de carboximetilcelulose teve maior resistência à contaminação por microrganismos.

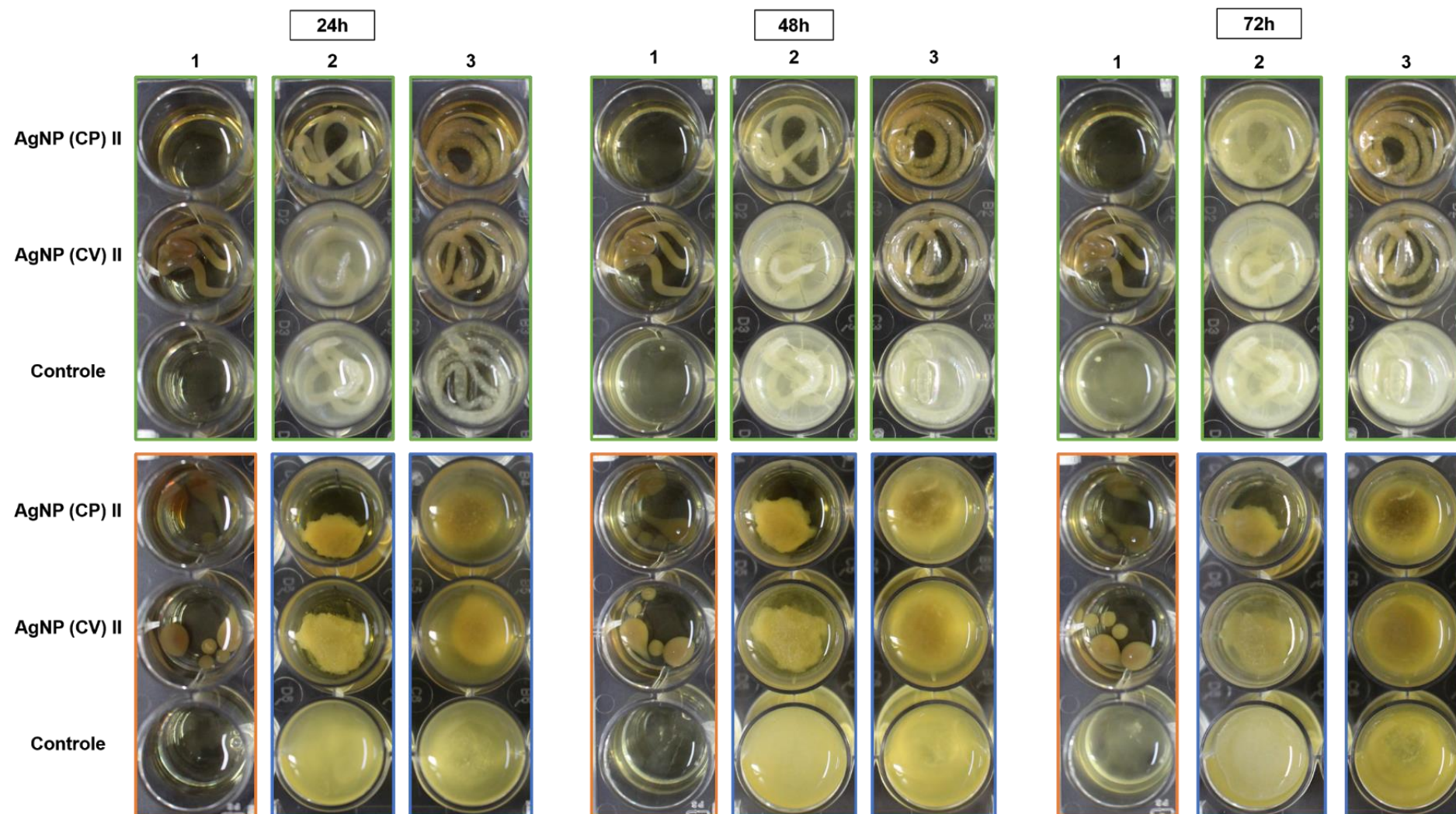


Figura 21. Ensaio de estabilidade térmica em meio LB líquido (sem adição de inóculo de *E. coli*) de fibras (verde), esferoides (laranja) e sementes bioimpressas (azul) nas 3 composições (1, 2, e 3) de hidrogéis contendo AgNP (CP) II, AgNP (CV) II e sem AgNPs (controle). Ensaio avaliado durante os intervalos de tempo de 24, 48 e 72 horas.

As microestruturas internas das estruturas 3D biofabricadas foram avaliadas a partir de cortes transversais corados com H&E e visualizados em microscópio de luz. Em testes iniciais foram processados apenas os esferoides da composição 1 de hidrogel para escolha de um fixador para o processamento das estruturas biofabricadas. Na Figura 22, pode ser observado que o uso do fixador paraformaldeído comprometeu a visualização da secção e sua estrutura interna, aparentemente pode ter desintegrado o hidrogel. Já o fixador metil-Carnoy demonstrou ser melhor que o anterior para o processamento das estruturas, preservando a estrutura interna. A partir disto, os processos de fixação química das demais estruturas foram realizados apenas com o fixador metil-Carnoy. Além disso, nota-se que a microestrutura interna dos esferoides menores apresentou ser mais fibrosa que aquelas dos esferoides maiores. Sendo assim, diferentes diâmetros de estruturas biofabricadas poderiam gerar microestruturas internas com organizações distintas.

Apesar do fixador metil-Carnoy ter tido melhor desempenho nos processos de fixação química, a fixação das estruturas 3D normalmente é realizada, segundo a literatura, com derivados de formaldeído (CVETKOVIC et al., 2014; LIU et al., 2009; LU et al., 2006).

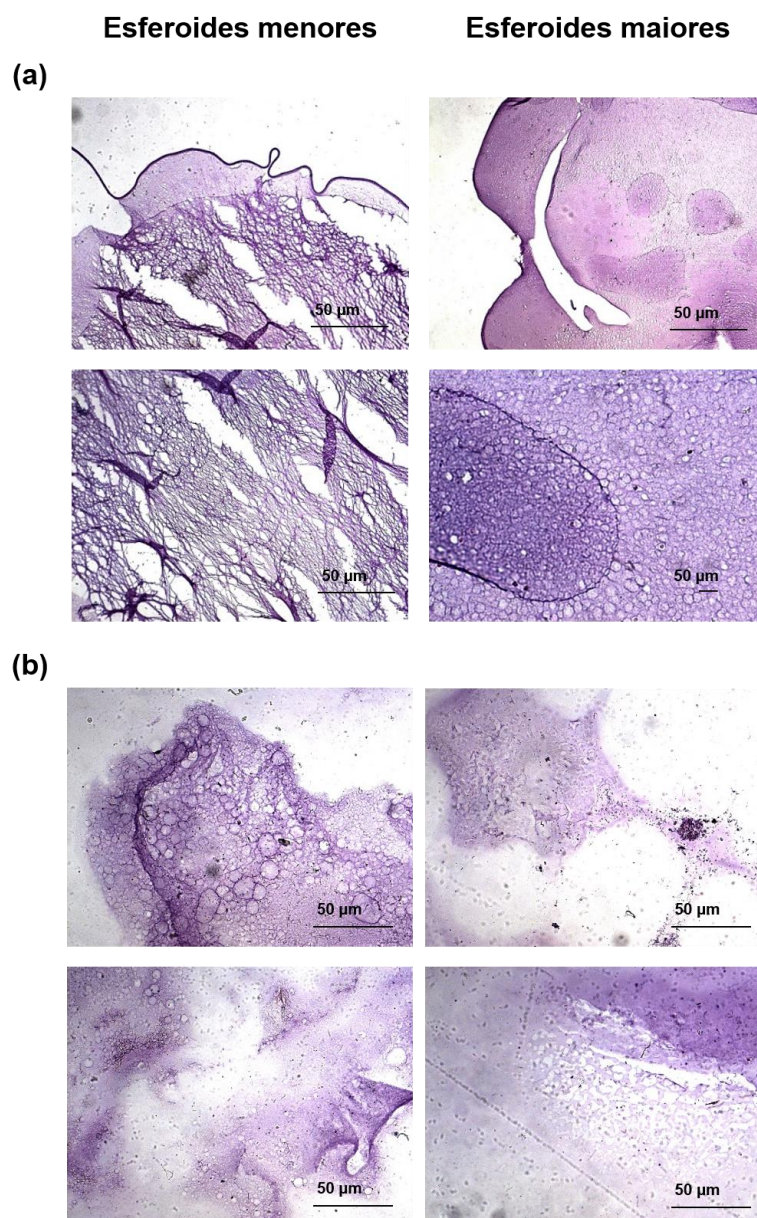


Figura 22. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções micrométricas de esferoides menores e maiores da composição 1 de hidrogel que permaneceram 24 horas em estufa a 37°C antes do processamento para a microscopia de luz. (a) Esferoides menores e maiores fixados com metil-Carnoy. (b) Esferoides menores e maiores fixados com paraformaldeído.

A microestrutura interna das outras estruturas também foram avaliadas como podem ser vistas nas Figuras 23, 24 e 25. Para as secções das fibras, está apresentado uma imagem transversal (imagem da esquerda) e longitudinal (imagem da direita) do sentido de cada fibra presente nas Figuras 23, 24 e 25 para cada amostra: controle, AgNP (CP) II e AgNP (CV) II.

É possível observar que cada composição de hidrogel apresenta uma microestrutura interna diferente com características próprias, independente da forma.

No entanto, as estruturas de todas as 3 composições de hidrogéis contendo AgNPs de CP e CV não apresentaram diferenças significativas em suas microestruturas quando comparadas às estruturas correspondentes sem AgNPs (controles).

Diferentemente da Figura 22, na Figura 23 a composição 1 de hidrogel não demonstrou diferenças entre as fibras e esferoides (menores e maiores) e apresentou uma microestrutura sem poros e densa. Provavelmente isso pode ser explicado pelo fato do uso em testes iniciais (Figura 22) terem sido realizados com o polímero alginato de sódio de uma marca diferente dos testes seguintes. Já na composição 2 de hidrogel (Figura 24) observou-se uma diferença significativa na microestrutura interna dos modelos de sementes bioimpressas e as fibras. As sementes bioimpressas com hidrogéis da composição 2 apresentaram maior uniformidade e homogeneidade dos poros internos ao comparar com as fibras da mesma composição. As estruturas biofabricadas com os hidrogéis da composição 3 (Figura 25) também apresentaram diferenças entre as sementes bioimpressas e as fibras. As sementes bioimpressas com hidrogéis da composição 3 apresentaram bordas mais densas e fibrosas e microestrutura interna com poros maiores em relação às fibras com a mesma composição.

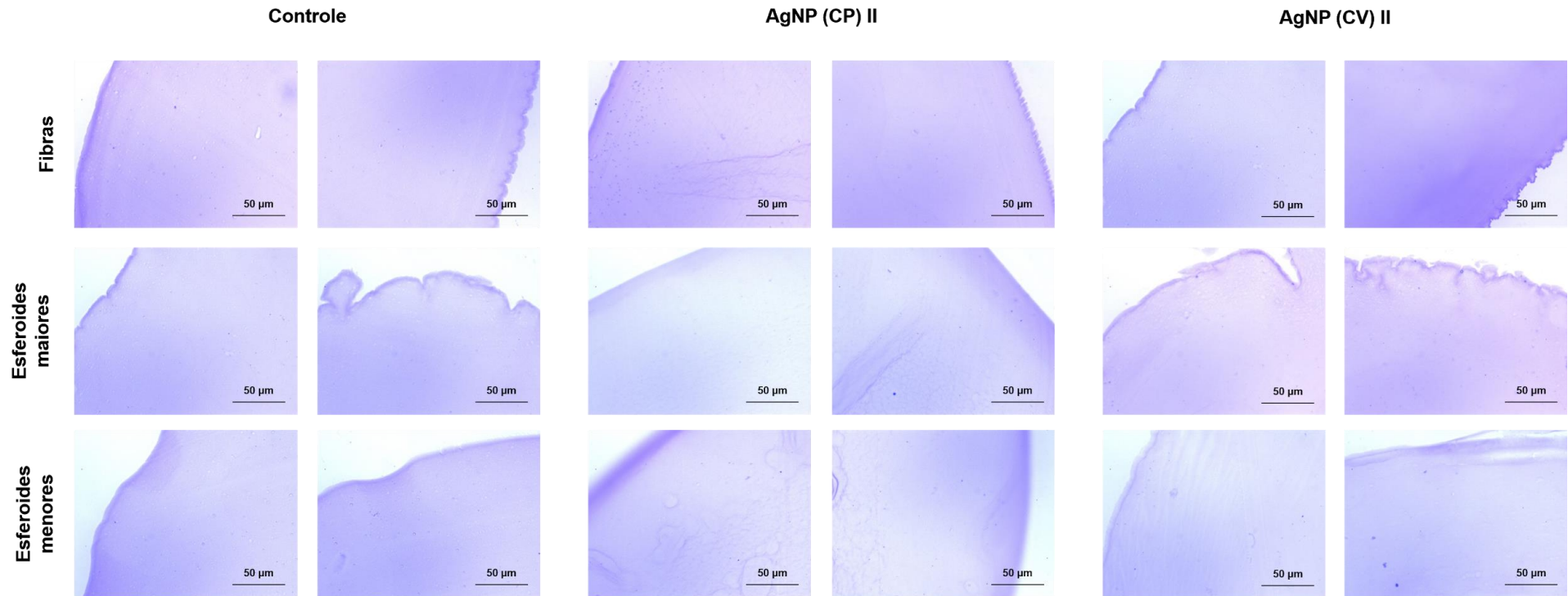


Figura 23. Imagens obtidas por microscopia de luz de seções micrométricas de fibras e esferoides (menores e maiores) da composição 1 de hidrogel sem AgNPs (controle) e com AgNP (CP) II e AgNP (CV) II que permaneceram 24 horas em estufa a 37°C antes do processamento para a microscopia de luz.

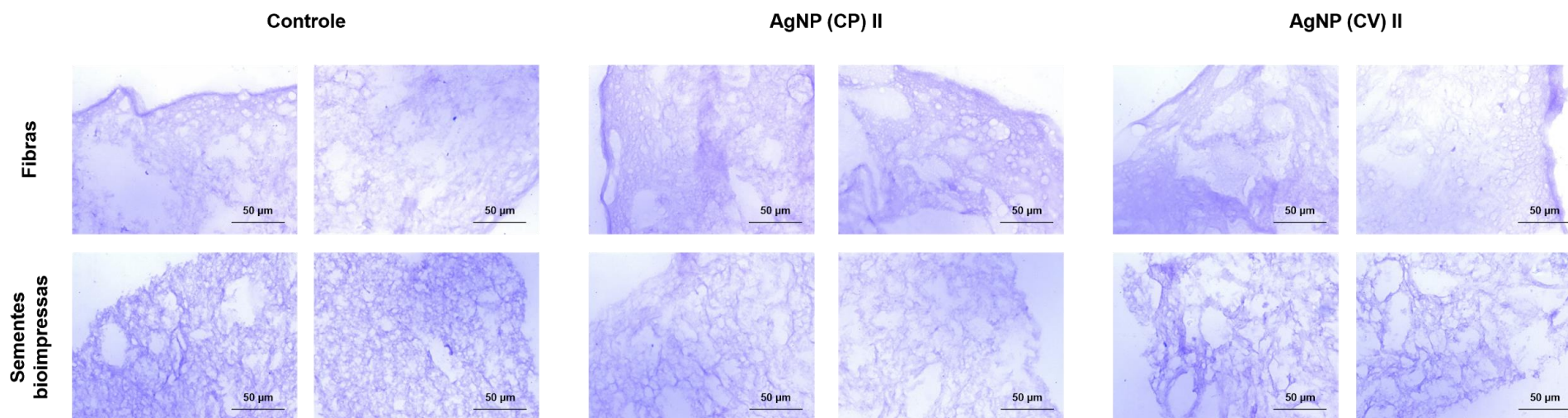


Figura 24. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções micrométricas de fibras e esferoides (menores e maiores) da composição 2 de hidrogel sem AgNPs (controle) e com AgNP (CP) II e AgNP (CV) II que permaneceram 24 horas em estufa a 37°C antes do processamento para a microscopia de luz.

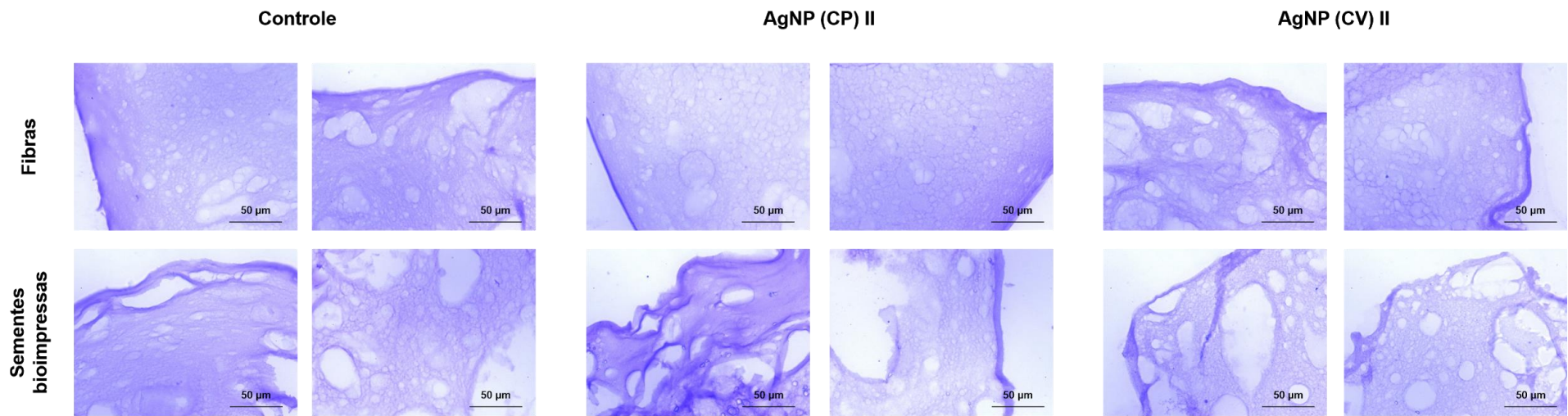


Figura 25. Imagens obtidas por microscopia de luz de secções micrométricas de fibras e esferoides (menores e maiores) da composição 3 de hidrogel sem AgNPs (controle) e com AgNP (CP) II e AgNP (CV) II que permaneceram 24 horas em estufa a 37°C antes do processamento para a microscopia de luz.

Além da caracterização da microestrutura interna por microscopia de luz, as fibras de todas as 3 composições de hidrogéis contendo encapsulados de *E. coli* foram avaliadas por MEV após o ensaio de atividade antimicrobiana (Figuras 26, 27 e 28). Nos encapsulados de *E. coli* na composição 1 de hidrogel é possível observar a diferença expressiva entre as fibras sem AgNPs (controle) (Figura 26 a) e as fibras com AgNPs (Figura 26 b e c). Nas imagens da fibra controle observa-se vários aglomerados de células de *E. coli* na superfície e internamente, como erupções. Já nas imagens das fibras produzidas com AgNPs, as superfícies e o interior das fibras estão com aparência lisa, sem erupções, apenas a rugosidade da fibra, e dificilmente são observadas algumas células bacterianas. Além disso, é possível observar a presença de alguns aglomerados de AgNPs.

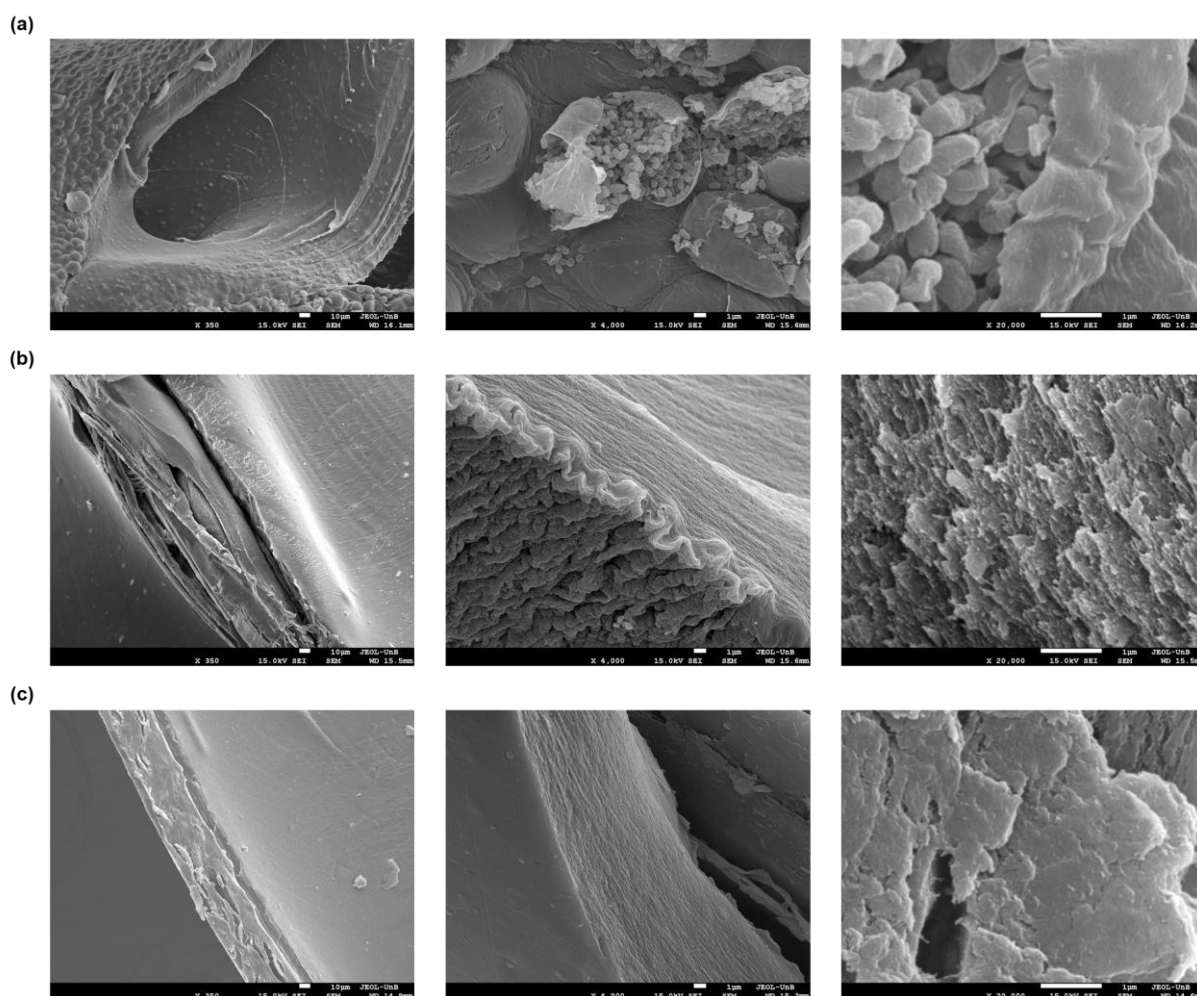


Figura 26. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos encapsulados de *E. coli* em fibras da composição 1 de hidrogel, onde (a) sem AgNPs (controle), apenas *E. coli*; (b) com AgNP (CP) II e *E. coli*; (c) com AgNP (CV) II e *E. coli*.

Já nos encapsulados de *E. coli* na composição 2 de hidrogel é possível observar também a diferença entre as fibras sem AgNPs (controle) (Figura 27 a) e as fibras com AgNPs (Figura 27 b e c). É possível observar também na fibra controle os aglomerados de células de *E. coli* envoltas pelo hidrogel na superfície e internamente. Nas fibras com AgNPs, as superfícies também não apresentaram erupções de células bacterianas. Devido o interior fibroso da fibra, dificilmente é possível visualizar AgNPs em seu interior.

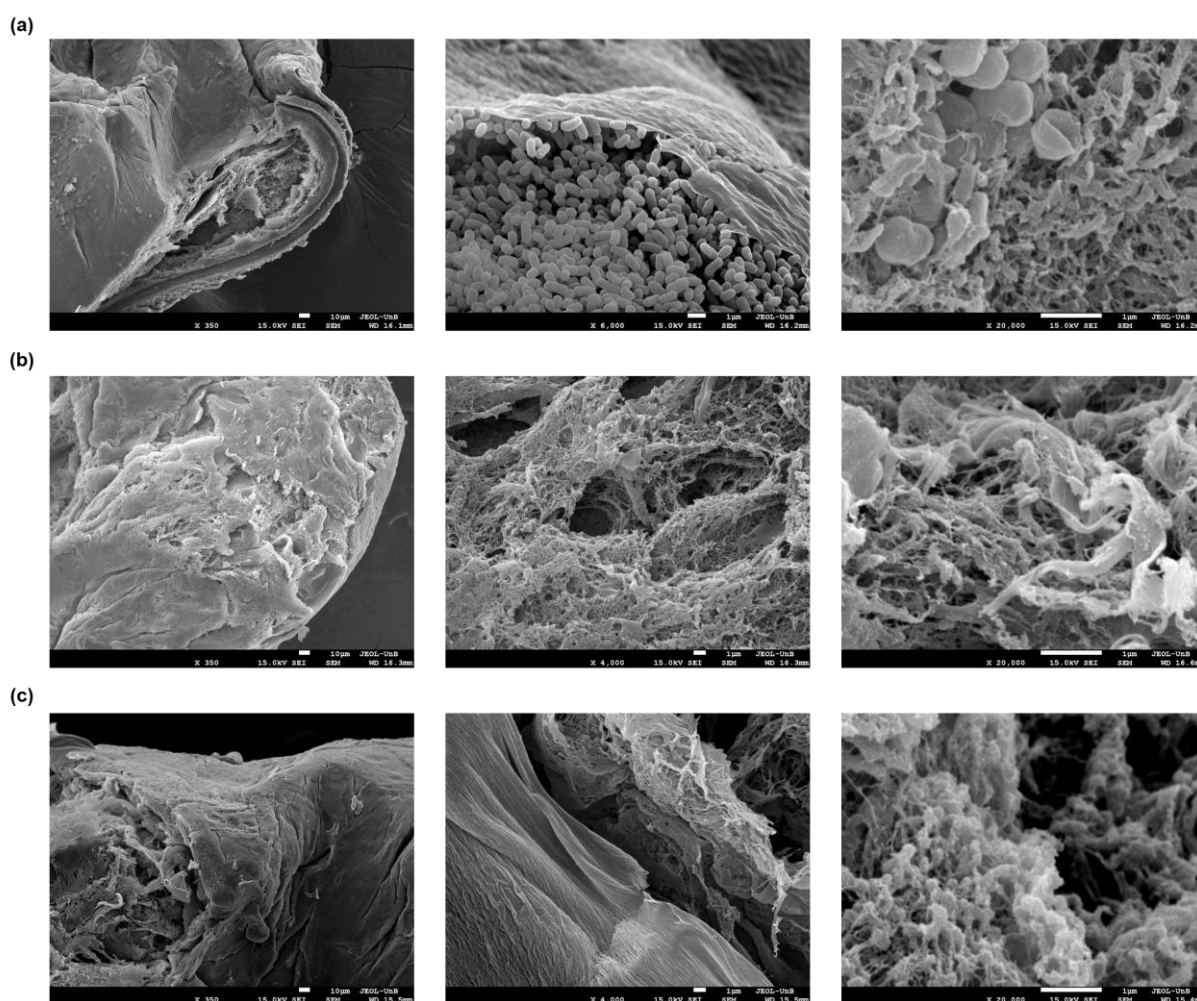


Figura 27. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos encapsulados de *E. coli* em fibras da composição 2 de hidrogel, onde (a) sem AgNPs (controle), apenas *E. coli*; (b) com AgNP (CP) II e *E. coli*; (c) com AgNP (CV) II e *E. coli*.

Nos encapsulados de *E. coli* na composição 3 de hidrogel nota-se a mesma diferença entre as fibras sem AgNPs (controle) (Figura 28 a) e as fibras com AgNPs

(Figura 28 b e c). É possível observar também na fibra controle os aglomerados e erupções de células de *E. coli* na superfície e internamente. Nas fibras com AgNPs, as superfícies também não apresentaram erupções de células bacterianas, no entanto é possível observar algumas células de *E. coli* não intactas, mas com aspecto murcho e possivelmente com aglomerados de AgNPs em suas membranas (Figura 28 b). Como o interior da fibra é fibroso, dificilmente é possível visualizar AgNPs em seu interior.

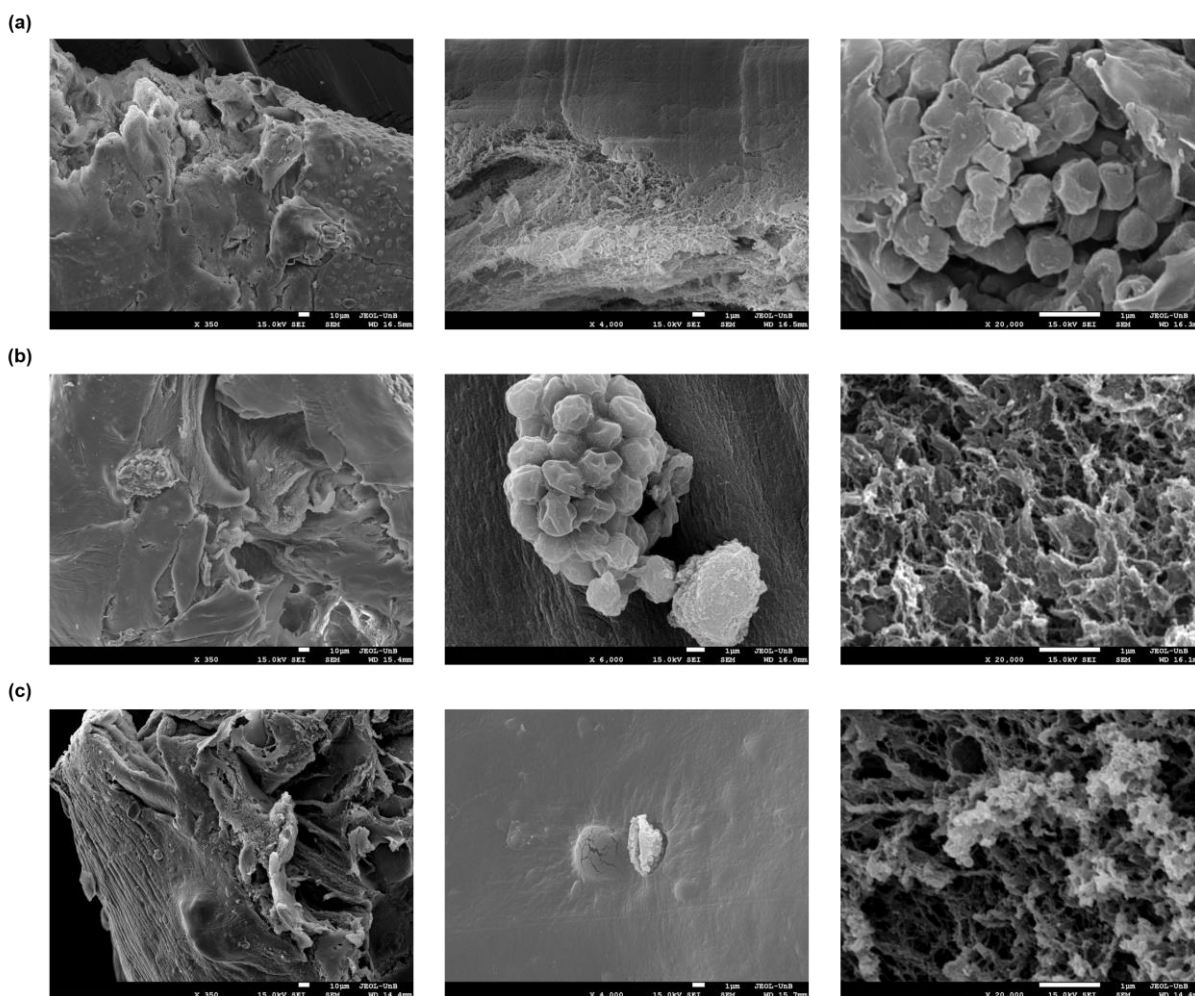


Figura 28. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos encapsulados de *E. coli* em fibras da composição 3 de hidrogel, onde (a) sem AgNPs (controle), apenas *E. coli*; (b) com AgNP (CP) II e *E. coli*; (c) com AgNP (CV) II e *E. coli*.

Observa-se que as imagens de MEV são complementares às imagens de microscopia de luz sem células de *E. coli*, onde é possível associar ambas imagens

das microestruturas internas com os poros, aparência fibrosa e até as bordas rugosas das estruturas comparando com as secções micrométricas.

5.8. Caracterização da superfície dos modelos 3D de termoplástico

As superfícies dos modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS também foram caracterizadas por MEV (Figura 29). Nas micrografias observa-se as camadas de termoplástico depositadas uma acima da outra durante processo de impressão 3D. Além disso, nas imagens de maior magnificação é possível ver as diferenças entre as superfícies do modelo sem AgNPs imobilizadas (controle) (Figura 29 a) e os modelos com AgNPs imobilizadas (Figura 29 b e c), os quais apresentam prováveis aglomerados de AgNPs.

Apesar dos modelos de sementes impressas em 3D não terem apresentado atividade antimicrobiana, as imagens de MEV indicam possíveis aglomerados de AgNPs adsorvidos na superfície do termoplástico. Além disso, geralmente os trabalhos de imobilização de AgNPs utilizam técnicas de microscopia como esta para a confirmação do processo de imobilização nas superfícies (ONITSUKA; HAMADA; OKAMURA, 2019).

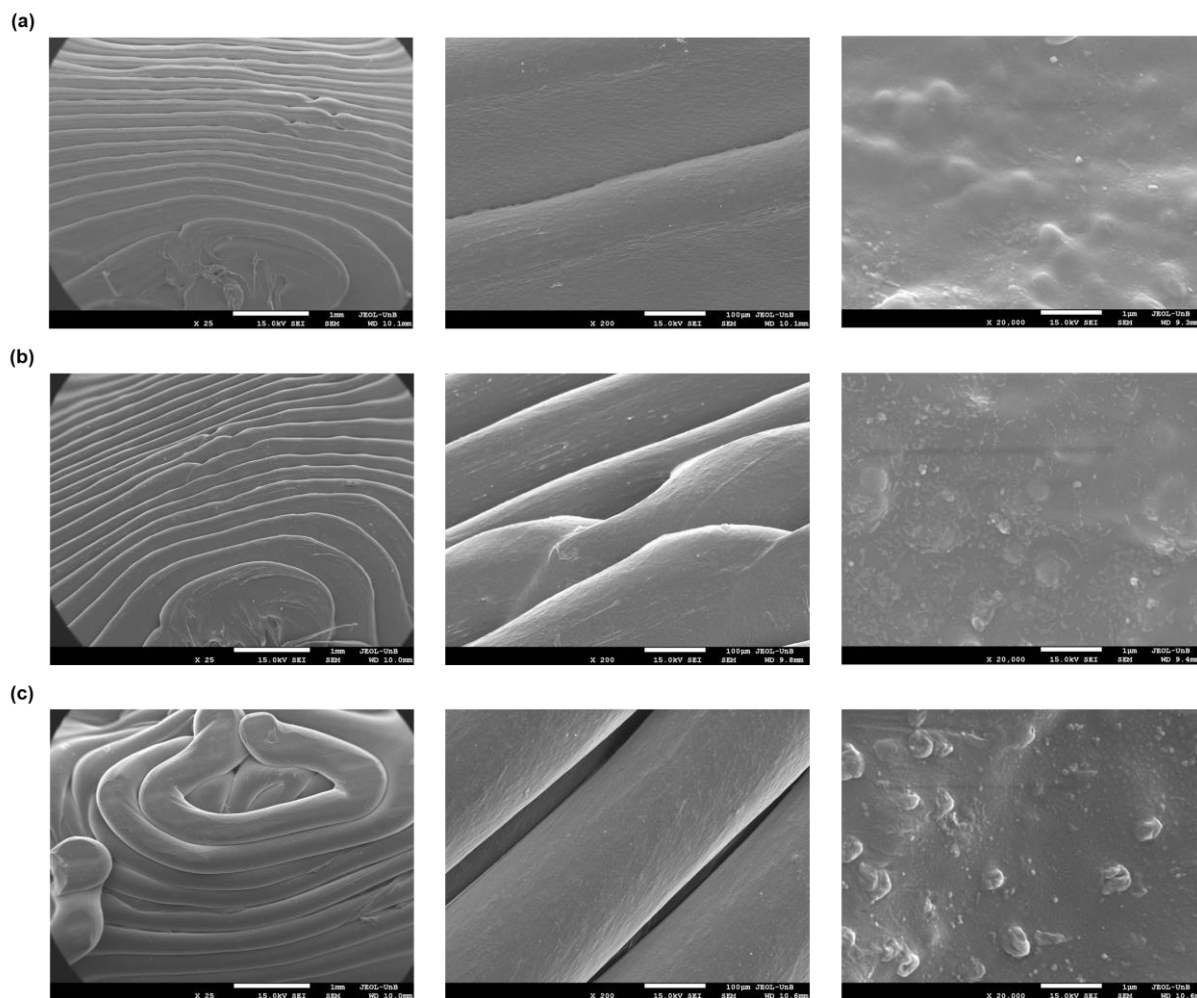


Figura 29. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura de modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS, onde (a) sem AgNPs (controle); (b) com AgNP (CP) II e (c) com AgNP (CV) II imobilizadas nas superfícies.

6. Conclusões

- As AgNPs produzidas via síntese verde utilizando extratos de CP e CV apresentaram atividade antibacteriana, em que AgNP (CP) apresentou CIM na concentração de 256 μM ;
- O escaneamento 3D demonstrou ser mais acurado para a digitalização de materiais botânicos simples como a semente de feijão carioca;
- A fotogrametria mostrou-se mais rápida na execução, mas complicada para a obtenção de um modelo CAD fiel;
- A escolha de cada hidrogel para cada técnica depende das propriedades de viscosidade e printabilidade dele;
- A utilização de técnicas manuais ou robóticas de biofabricação depende da forma da estrutura 3D desejada, o objetivo para a biofabricação (aplicação, uso de células, etc) e tempo disponível;
- As estruturas biofabricadas contendo AgNPs são pelo menos parcialmente protegidas contra contaminações bacterianas como *E. coli*;
- As estruturas biofabricadas contendo AgNPs demonstraram maior desempenho da atividade antibacteriana em sua estrutura interna quando comparado à atividade por difusão;
- A atividade antibacteriana dos modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico de ABS precisa ser investigada;
- Estruturas bioimpressas em 3D apresentaram uma microestrutura interna mais homogênea com poros uniformes quando comparadas às demais formas de biofabricação testadas;
- As estruturas biofabricadas (fibras, esferoides e bioimpressos) demonstraram ser estáveis e com estrutura interna favorável à construção de estruturas 3D funcionais com potencial para aplicação em cultivo celular 3D.

7. Perspectivas

Aspirando à aplicação e possibilidades deste estudo, alguns ensaios futuros podem ser avaliados. A atividade antimicrobiana de AgNPs livres e em estruturas biofabricadas em 3D com hidrogéis pode ser testada em outros microrganismos modelo. Para uma bactéria Gram-positiva pode-se utilizar a *Staphylococcus aureus*; já para um modelo de fungo pode-se utilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para os ensaios de atividade antimicrobiana, além de se observar a turbidez do meio líquido, pode-se analisar também de forma quantitativa. Ao semear o conteúdo de cada poço, contendo a estrutura 3D biofabricada, em uma placa de Petri com meio sólido será possível observar o crescimento de bactérias ou não, e contar as colônias crescidas.

Para a aplicação das estruturas 3D biofabricadas em cultivo celular, a caracterização da estabilidade estrutural em meio e temperatura de cultivo pode ser realizada em períodos de tempo mais prolongados. Além disso, deve-se avaliar o pH dos hidrogéis e realizar ensaios com células eucariontes e verificar a viabilidade celular nas estruturas biofabricadas em 3D. Adicionalmente, pode-se avaliar menores tempos de incubação em solução reticulante de CaCl_2 para evitar baixa viabilidade celular.

A visualização da presença e dispersão de aglomerados de AgNPs em microscopia de luz talvez possa ser avaliada utilizando algum tipo de marcador, corante ou fluorescência. Já em MEV pode-se utilizar a técnica de espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) acoplada ao microscópio. Assim, será possível verificar a presença de AgNPs e até sugerir mecanismos de ação na presença de células de *E. coli*.

A presença de AgNPs imobilizadas nos modelos de sementes impressas em 3D com termoplástico também podem ser avaliadas por EDS. Além disso, novos testes de imobilização e atividade antimicrobiana podem ser realizados. Visto que a aplicação em modelos 3D de sementes são apenas para prova de conceito, e assim poderão ser aplicadas em processos de fabricação 3D de objetos plásticos estéreis para laboratórios, hospitais, indústria de alimentos, etc.

8. Referências

3D Bioprinting Market Size, Share | Industry Analysis Report, 2019-2026.

Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/3d-bioprinting-market>>. Acesso em: 24 mar. 2019.

ABBASZADEGAN, A. et al. The Effect of Charge at the Surface of Silver Nanoparticles on Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria: A Preliminary Study. **Journal of Nanomaterials**. 2015.

AHMAD, M.; PANDA, B. P. Alginate immobilization of *Escherichia coli* MTCC 1652 whole cells for bioconversion of glycyrrhizinic acid and into 18-beta glycyrrhetic acid. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 16, n. 24, p. 2046–2049, 2013.

AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of advertising research**, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015.

ALARCON, E. I. et al. Safety and efficacy of composite collagen–silver nanoparticle hydrogels as tissue engineering scaffolds. **Nanoscale**, v. 7, n. 44, p. 18789-98, 2015.

ARSLAN-YILDIZ, A. et al. Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting. **Biofabrication**, v. 8, n. 1, p. 014103, 2016.

BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. C. The chemistry of tea flavonoids. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 37, n. 8, p. 693–704, 1997.

BEGUM, N. A. et al. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 71, n. 1, p. 113–118, 2009.

BUYUKHATIPOGLU, K. et al. Bioprinted nanoparticles for tissue engineering applications. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 16, n. 4, p. 631–642, 2010.

CHANG, C.; ZHANG, L. Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p. 40-53, 2011.

CHOI, N. W. et al. Microfluidic scaffolds for tissue engineering. **Nature materials**, v. 6, n. 11, p. 908, 2007.

CHRYSSOLOURIS, G. et al. Digital manufacturing: History, perspectives, and outlook. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part B: Journal of Engineering Manufacture**, v. 223, n. 5, p. 451–462, 2009.

CVETKOVIC, C. et al. Three-dimensionally printed biological machines powered by skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 28, p. 10125–10130, 2014.

DERBY, B. Printing and prototyping of tissues and scaffolds. **Science**, v. 338, n. 6109, p. 921–926, 2012.

FAHLGREN, N.; GEHAN, M. A.; BAXTER, I. Lights, camera, action: high-throughput plant phenotyping is ready for a close-up. **Current opinion in plant biology**, v. 24, p. 93–99, 2015.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. **Engineering and science**, v. 23, n. 5, p. 22–36, 1960.

GARBOUT, A. et al. The use of PET/CT scanning technique for 3D visualization and quantification of real-time soil/plant interactions. **Plant and Soil**, v. 352, n. 1–2, p. 113–127, 2012.

GIBBS, J. A. et al. Approaches to three-dimensional reconstruction of plant shoot topology and geometry. **Functional Plant Biology**, v. 44, n. 1, p. 62-75, 2016.

GUANG, Y. Controllable Micro/nano Biofabrication of Fascinating Composites based on Bacterial Cellulose. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, 2016.

HABIB, A. et al. 3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel. **Materials**, v. 11, n. 3, p. 454, 2018.

HE, Y.; XUE, G.-H.; FU, J.-Z. Fabrication of low cost soft tissue prostheses with the desktop 3D printer. **Scientific reports**, v. 4, p. 6973, 2014.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery**

Reviews, v. 64, p. 18-23, 2012.

JIA, J. et al. Engineering alginate as bioink for bioprinting. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4323–4331, 2014.

JUNG, J. W.; LEE, J.-S.; CHO, D.-W. Computer-aided multiple-head 3D printing system for printing of heterogeneous organ/tissue constructs. **Scientific reports**, v. 6, p. 21685, 2016.

KHALIL, S.; SUN, W. Bioprinting endothelial cells with alginate for 3D tissue constructs. **Journal of biomechanical engineering**, v. 131, n. 11, p. 111002, 2009.

KYLE, S. et al. “Printability” of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 16, 2017.

LAVIGNE, A. **Goodbye Lullaby**. [s.l.] Hal Leonard Publishing Corporation, 2011.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. **Chemical reviews**, v. 101, n. 7, p. 1869–1880, 2001.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LIU, X. et al. Biomimetic nanofibrous gelatin/apatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2252–2258, 2009.

LI, L.; ZHANG, Q.; HUANG, D. A review of imaging techniques for plant phenotyping. **Sensors**, v. 14, n. 11, p. 20078–20111, 2014.

LI, Z. et al. A simple method for selective immobilization of silver nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 250, n. 1, p. 109-116, 2005.

LODE, A. et al. Green bioprinting: Fabrication of photosynthetic algae-laden hydrogel scaffolds for biotechnological and medical applications. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 177-183, 2015.

LU, Y. et al. A digital micro-mirror device-based system for the microfabrication of complex, spatially patterned tissue engineering scaffolds. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 77, n. 2, p. 396–405, 2006.

LU, Y.; YAN, L. U.; LEHE, M. E. I. Production of Indigo by Immobilization of *E. coli* BL21 (DE3) Cells in Calcium-Alginate Gel Capsules. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 15, n. 3, p. 387-390, 2007.

LU, Z. et al. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 24, n. 6, p. 1465–1471, 2013.

MARKSTEDT, K. et al. 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose–Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 5, p. 1489–1496, 2015.

MEIRELES, A. B. et al. Trends in polymeric electrospun fibers and their use as oral biomaterials. **Experimental biology and medicine**, v. 243, n. 8, p. 665–676, 2018.

MEZA, L. R. et al. Resilient 3D hierarchical architected metamaterials. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 37, p. 11502–11507, 2015.

MIRONOV, V.; KASYANOV, V.; MARKWALD, R. R. Nanotechnology in vascular tissue engineering: from nanoscaffolding towards rapid vessel biofabrication. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 338–344, 2008.

MORONI, L. et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. **Trends in biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 384–402, 2018.

MURPHY, S. V.; ATALA, A. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 773–785, 2014.

NAKAMURA, M. et al. Biomatrices and biomaterials for future developments of bioprinting and biofabrication. **Biofabrication**, v. 2, n. 1, p. 014110, 2010.

NARAYANAN, L. K. et al. 3D-Bioprinting of Polylactic Acid (PLA) Nanofiber–Alginate Hydrogel Bioink Containing Human Adipose-Derived Stem Cells. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 2, n. 10, p. 1732–1742, 2016.

NASCIMENTO, M. H. M. DO; DO NASCIMENTO, M. H. M.; LOMBELLO, C. B. Hidrogéis a base de ácido hialurônico e quitosana para engenharia de tecido

cartilaginoso. **Polímeros**, v. 26, n. 4, p. 360-370, 2016.

NAVARRO, E. et al. Effects of Differently Coated Silver Nanoparticles on the Photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental science & technology**, v. 49, n. 13, p. 8041–8047, 2015.

ONITSUKA, S.; HAMADA, T.; OKAMURA, H. Preparation of antimicrobial gold and silver nanoparticles from tea leaf extracts. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 173, p. 242–248, 2019.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1712–1720, 2007.

PANACEK, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **The journal of physical chemistry. B**, v. 110, n. 33, p. 16248–16253, 2006.

PAULUS, S. et al. High-precision laser scanning system for capturing 3D plant architecture and analysing growth of cereal plants. **Biosystems Engineering**, v. 121, p. 1-11, 2014.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, 2015.

PUPPI, D.; CHIELLINI, F. Wet-spinning of biomedical polymers: from single-fibre production to additive manufacturing of three-dimensional scaffolds. **Polymer International**, v. 66, n. 12, p. 1690-1696, 2017.

RAGHAVENDRA, G. M. et al. Cellulose–polymer–Ag nanocomposite fibers for antibacterial fabrics/skin scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 2, p. 553-560, 2013.

RENGIER, F. et al. 3D printing based on imaging data: review of medical applications. **International journal of computer assisted radiology and surgery**, v. 5, n. 4, p. 335–341, 2010.

ROLIM, W. R. et al. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 463, n. 1, p. 66-74, 2019.

SCHÜTZ, K. et al. Three-dimensional plotting of a cell-laden alginate/methylcellulose blend: towards biofabrication of tissue engineering constructs with clinically relevant dimensions. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 11, n. 5, p. 1574–1587, 2017.

SEABRA, A. B. et al. Antibacterial activity of nitric oxide releasing silver nanoparticles. **Journal of Physics: Conference Series**, 2017.

SEIDEL, J. et al. Green bioprinting: extrusion-based fabrication of plant cell-laden biopolymer hydrogel scaffolds. **Biofabrication**, v. 9, n. 4, p. 045011, 2017.

SILVA, L. D. DA. Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira). 2015.

SILVA, L. P.; PEREIRA, T. M.; BONATTO, C. C. Frontiers and perspectives in the green synthesis of silver nanoparticles. **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**, p. 137-164, 2019.

SILVA, L. et al. Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agents: Past, Present, and Future. **Nanostructures for Antimicrobial Therapy**, p. 577–596, 2017.

SILVA, L. P. et al. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**, v. 4, p. 967-1012, 2017b.

SILVA, L. P. Current Trends and Challenges in Biofabrication Using Biomaterials and Nanomaterials: Future Perspectives for 3D/4D. **Bioprinting3D and 4D Printing in Biomedical Applications**, 2018.

SILVEIRA, A. P. et al. Physicochemical characteristics and antibacterial effects of silver nanoparticles produced using the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Materials Chemistry and Physics**, v. 216, p. 476-484, 2018.

SLAUGHTER, B. V. et al. Hydrogels in regenerative medicine. **Advanced materials**,

v. 21, n. 32-33, p. 3307–3329, 2009.

SMIDSROD, O.; SKJAKBRK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 71-78, 1990.

SONG, J. et al. Nano-silver in situ hybridized collagen scaffolds for regeneration of infected full-thickness burn skin. **Journal of Materials Chemistry B**, n. 20, 2015.

SUN, Q. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 444 p. 226–231, 2014.

TANAKA, H.; MATSUMURA, M.; VELIKY, I. A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. **Biotechnology and bioengineering**, v. 26, n. 1, p. 53–58, 1984.

THAYER, P.; MARTINEZ, H.; GATENHOLM, E. Manufacturing of Biomaterials via a 3D Printing Platform. **3D and 4D Printing in Biomedical Applications**, 2018.

TUMBLESTON, J. R. et al. Additive manufacturing. Continuous liquid interface production of 3D objects. **Science**, v. 347, n. 6228, p. 1349–1352, 2015.

UNNITHAN, A. R.; ARATHYRAM, R. S.; KIM, C. S. Scaffolds with Antibacterial Properties. **Nanotechnology Applications for Tissue Engineering**, p. 103-123, 2015.

WYNANT, I. et al. Recombinant *Escherichia coli* cells immobilized in Ca-alginate beads for metabolite production. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 5-6, p. 348-359, 2009.

ZARRINTAJ, P. et al. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. **Carbohydrate polymers**, v. 187, p. 66–84, 2018.