

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação da segurança e da viabilidade tecnológica de nanofibras de celulose de caule de tabaco como insumo farmacêutico

KETH RIBEIRO GARCIA

PORTO ALEGRE, 2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação da segurança e da viabilidade tecnológica de nanofibras de celulose de caule de tabaco como insumo farmacêutico

Tese apresentada por **Keth Ribeiro Garcia** para obtenção do TÍTULO DE DOUTORA em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

Coorientadora: Profa. Dra. Venina dos Santos

Porto Alegre, 2022

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23 de fevereiro de 2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Bianca Ramos Pezzini
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Thiago Caon
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

CIP - Catalogação na Publicação

Garcia, Keth Ribeiro
Avaliação da segurança e da viabilidade tecnológica de nanofibras de celulose de caule de tabaco como insumo farmacêutico / Keth Ribeiro Garcia. -- 2022. 186 f.
Orientadora: Letícia Scherer Koester.

Coorientadora: Venina dos Santos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Nanocelulose. 2. Caule de tabaco. 3. Insumo farmacêutico. 4. Toxicidade. 5. Granulação em leito fluidizado. I. Koester, Letícia Scherer, orient. II. Santos, Venina dos, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606), Laboratório 405, Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) , no Laboratório de Pesquisa Toxicológica (LAPETOX) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), no Laboratório de Polímeros (LPol) e Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade de Caxias do Sul (UCS), sob financiamento do CNPq e CAPES. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

AGRADECIMENTOS

A nanocelulose entrou na minha vida há pouco mais de 6 anos e, desde então, muito aprendizado, dúvidas e incertezas passaram a fazer parte da minha rotina. Os 4 anos do doutoramento me desafiaram a buscar respostas onde, por muitas vezes, parecia não haver. Em especial, nos dois últimos anos, com as incertezas instaladas em função da pandemia, os desafios pareceram ganhar uma maior proporção. Nesses momentos, sempre tive o apoio e suporte de pessoas que me fizeram enxergá-los sob uma nova perspectiva.

Agradeço à minha orientadora, professora Dra. Letícia Scherer Koester por me conduzir e auxiliar no desenvolvimento do pensamento crítico durante o desenvolvimento da tese.

À minha coorientadora, professora Venina dos Santos, que sempre me estendeu sua mão amiga e me deu conselhos valiosos.

Agradeço imensamente à professora Dra. Eliane Dallegrave que, com seu jeito carismático aceitou trabalhar em colaboração conosco para a avaliação *in vivo* das amostras. Com sua sabedoria e simpatia, ela me acalmou e orientou em momentos que eu duvidava de mim mesma.

Ao professor Dr. Ruy Beck, estendo meus agradecimentos por suas importantes participações no desenvolvimento e condução dos trabalhos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) por me abrirem as portas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À Universidade de Caxias do Sul (UCS) e à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) pela parceria.

Aos queridos colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG), que sempre foram muito solícitos e prestativos com minhas demandas sobre o funcionamento da UFRGS. Agradeço a amizade e os momentos de descontração.

Agradeço infinitamente à minha família por acreditarem na minha capacidade, por sempre me apoiarem e torcerem pela minha felicidade e sucesso. Amo vocês!

Por último, mas não menos importante, agradeço à Deus e aos meus mentores espirituais por sempre me amparem, me inspirem e darem forças para seguir. Que assim seja!

Na natureza, nada se cria, nada se perde, tudo se transforma.”

Antoine Lavoisier, (1777)

APRESENTAÇÃO

Em conformidade com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos, com encarte de publicações. Dessa forma, este exemplar encontra-se estruturado da seguinte maneira:

- **Introdução;**
- **Objetivo geral e objetivos específicos;**
- **Revisão da literatura;**
- **Capítulo I – Análise do panorama mundial das inovações contendo nanocelulose como um produto de alto valor agregado no desenvolvimento de produtos farmacêuticos:**
 - Artigo de revisão publicado: “Nanocellulose, the green biopolymer trends in pharmaceuticals: a patent review”.
- **Capítulo II – Avaliação da segurança das nanofibras de celulose de caule de tabaco em fêmeas de ratos Wistar:**
 - Artigo científico publicado: “Towards a greener multifunctional pharmaceutical excipient: *in vivo* safety evaluation of nanofibrillated cellulose from tobacco stalk”.
- **Capítulo III – Estudo da viabilidade do uso de nanofibras de celulose de caule de tabaco como agente aglutinante em processo de granulação em leite fluidizado:**
 - Artigo científico submetido: “Tobacco stalk nanofibrillated cellulose: an eco-friendly binder on fluidized bed granulation”.
- **Discussão geral;**
- **Conclusões;**
- **Referências;**
- **Anexos.**

RESUMO

Derivados celulósicos como a nanocelulose vêm se destacando e gerando interesse contínuo em diversas áreas devido a sua versatilidade e alto valor agregado. Na tecnologia farmacêutica, as nanofibras de celulose (NFC) de resíduos agroindustriais surgem como uma importante alternativa aos excipientes tradicionais. O caule de tabaco se apresenta como um material rico em celulose tornando-se uma alternativa sustentável a ser explorada como fonte de nanofibras de celulose. Sendo assim, a presente tese prioriza a sustentabilidade, a utilização de materiais que seriam descartados para obtenção de novos produtos. Primeiramente, foi realizada uma análise sobre o panorama atual de patentes abrangendo um período de 12 anos envolvendo propriedades intelectuais relacionados a nanocelulose em produtos farmacêuticos. As patentes foram divididas por *clusters* e separadas em dois principais grupos: (i) NFC+NC (sinônimos de nanocelulose) e (ii) BNC (nanocelulose bacteriana). As patentes dentro desses grupos foram classificadas em cinco grandes áreas de acordo com sua aplicação. O *cluster* de *design* e manufatura representou 50% e 35,5% das patentes para os grupos compostos por nanocelulose (NFC+NC) e nanocelulose bacteriana (BNC), respectivamente. O *cluster* referente aos “sistemas de cultura celular e tecnologia celular” representaram 13,4% das patentes pesquisadas apenas para o grupo NFC+NC. Na sequência, o *cluster* de *drug delivery* mostrou que 17,9% e 35,5% das patentes pertenciam aos grupos NFC+NC e BNC. O grupo referente à “tratamento de feridas” forneceu 11,6% das patentes para o grupo NFC+NC e 6,5% para o BNC. Por fim, o grupo de “engenharia de tecidos” classificou 7,1% e 22,6% das patentes NFC+NC e BNC. Como segunda abordagem, a possibilidade de utilização das NFC de caule de tabaco na produção de formas farmacêuticas orais trouxe consigo a preocupação com a segurança do material devido aos conhecidos efeitos deletérios do tabaco à saúde. Portanto, um estudo em modelo animal foi realizado para estabelecer a segurança das NFC de caule de tabaco para posterior uso como um “novo” ingrediente farmacêutico. Os resultados do ensaio de toxicidade aguda (*Up and Down*) realizado em ratas Wistar, mostraram que as NFC de caule de tabaco não apresentaram toxicidade ao utilizar doses de 175, 550, 1750 e 5000 mg·kg⁻¹. No teste de toxicidade subcrônica de dose repetida (28 dias), os resultados mostraram que as NFC não causaram mortalidade ou sinais de toxicidade em ratas Wistar quando foram utilizadas doses de 500, 2500 e 5000 mg·kg⁻¹. Assim, devido à aparente ausência de efeitos adversos nas avaliações hematológica,

bioquímica e histopatológica, a extrapolação dos resultados para humanos sugere que as NFC de caule de tabaco devam ser relativamente seguras para uso nas doses testadas. Esse resultado positivo abriu perspectivas para propor seu uso como potencial insumo farmacêutico. Por fim, com a determinação da segurança das NFC de caule de tabaco, uma abordagem tecnológica para aplicação das NFC foi possível. O comportamento *gel-like* das NFC foi explorado e utilizado como agente aglutinante em processo de granulação em leite fluidizado. Os resultados foram comparados com a povidona (PVP), um aglutinante amplamente utilizado na indústria. Dessa forma, ao comparar o uso de NFC e PVP como agentes aglutinantes, foi possível mostrar que a dispersão de NFC apresentou viscosidade semelhante à dispersão de povidona, mesmo em diferentes concentrações. Foram produzidos grânulos com propriedades de fluxo fraca, baixa umidade e altos rendimentos. Além disso, a friabilidade granular apresentou para todos os grânulos, exceto para THP-NFC, uma perda de massa na faixa de 20% após 10 min de rotações. Os resultados representam a análise de três lotes diferentes e revelam que a povidona e as nanofibras de celulose diferem quimicamente entre si e apresentam mecanismos de interação distintos que podem ser influenciados pela presença do fármaco. Este resultado positivo contribuiu para uma análise comparativa tanto das questões morfológicas quanto das propriedades de fluxo dos grânulos obtidos. Em conclusão, a presente tese compilou as patentes mais recentes quanto ao uso da nanocelulose em produtos farmacêuticos e possibilitou a compreensão do avanço deste biomaterial como uma tendência promissora para o desenvolvimento de um futuro mais verde. A avaliação de segurança *in vivo* revelou o aspecto não-tóxico ou minimamente tóxico das NFC de caule de tabaco e se mostrou como uma alternativa sustentável e segura para uso como insumo farmacêutico nas doses experimentadas e compatíveis com o uso proposto. Sendo assim, o processo tecnológico de granulação em leite fluidizado proporcionou o uso das NFC de caule de tabaco como agente aglutinante e os resultados obtidos são um indicativo favorável da atuação dessas nanofibras como um aglutinante ecologicamente correto em substituição a um material amplamente utilizado.

Palavras-chave: Nanocelulose; Caule de tabaco; NFC; Insumo farmacêutico; Toxicidade; Granulação em leite fluidizado.

ABSTRACT

Safety and technological feasibility assessment of nanofibrillated tobacco stalk cellulose as a pharmaceutical ingredient

Cellulosic derivatives such as nanocellulose have been standing out and generating continuous interest in several areas due to its versatility and high added-value. In pharmaceutical technology, nanofibrillated cellulose (NFC) from agro-industrial wastes arises as an important alternative to the traditional excipients. Tobacco stalk emerges as a cellulose-rich material becoming a sustainable alternative to be explored and its possible multifunctionalities applied as a plant-based nanofibrillated cellulose source. Thus, the present thesis prioritizes sustainability, the use of materials that would be discarded to obtain new products. Firstly, an analysis on the current panorama regarding the search of patents within a 12-year timeframe involving applications related to nanocellulose of all types in pharmaceuticals was performed. Patents were divided-by-clusters and separated into two main groups: (i) NFC+NC (synonyms for nanocellulose), and (ii) BNC (bacterial nanocellulose). The patents within these groups were classified into five major areas according to its application. Design and manufacturing cluster represented 50% and 35.5% of patents for the groups comprising nanocellulose (NFC+NC) and bacterial nanocellulose (BNC), respectively. Cell culture systems and cell technology cluster depicted 13.4% of searched patents only for NFC+NC group. In the sequence, drug delivery cluster showed that 17.9% and 35.5% of patents belonged to NFC+NC and BNC groups. Wound healing cluster provided 11.6% of patents to NFC+NC group and 6.5% to BNC. Lastly, tissue engineering cluster classified 7.1% and 22.6% of NFC+NC and BNC patents. As a second approach, the possibility of using NFC from tobacco stalk in the production of oral pharmaceutical forms brought with it the concern about the material's safety due to tobacco's known deleterious effects on health. Therefore, an animal model study was carried out to establish the safety of NFC from tobacco stalk for later use as a "new" pharmaceutical ingredient. Results showed that NFC in the acute toxicity test (Up and Down) performed on female Wistar rats was practically non-toxic when using doses of 175, 550, 1750 and, 5000 mg·kg⁻¹. In the repeated dose subchronic toxicity test (28 days), the results showed that NFC did not cause mortality or signs of toxicity in female Wistar rats when doses of 500, 2500 and, 5000 mg·kg⁻¹ were used. Thus,

due to the lack of apparent adverse effects found in hematology, clinical biochemistry and histopathology assess, the extrapolation of the results to humans suggests that NFC from tobacco stalk should be relatively safe for usage at experimented doses and compatible with the proposed use. This positive result opened perspectives to prospect its use as a potential pharmaceutical ingredient. Finally, by the establishment of safety, a technological approach to apply NFC from tobacco stalk could be performed. The gel-like behavior of NFC was explored and used as binder agent in a fluidized bed granulation process. Results were compared with povidone (PVP), a widely binder used in industry. Therefore, when comparing the use of binding agents NFC and PVP, it was possible to show that NFC dispersion presented similar viscosity to povidone dispersion, even in different concentrations. The process provided granules with fair flow properties, low moisture, and high yields. Additionally, granules friability presented for all granules, except for THP-NFC a weight loss in the range of 20% after the 10-min rotations. The results represent the analysis of three different batches and reveal that povidone and nanofibrillated cellulose chemically differ from each other and exhibit different mechanisms of interaction that may be influenced by the presence of the drug. This positive result contributed to a comparative analysis of both morphological issues and the flow properties of the granules obtained. In conclusion, the present work had compiled the protected innovations regarding the use of nanocellulose in pharmaceuticals and turned possible the comprehension of the advance of this biomaterial as a promise trend to the development of a greener future. The *in vivo* safety evaluation revealed the non-toxic or minimally toxic aspect of NFC from tobacco stalk and proved to be a sustainable and safe alternative for usage as pharmaceutical ingredient at experimented doses and compatible with the proposed use. In addition, the technological process of fluidized bed granulation provided the use of NFC from tobacco stalk as binder agent and the positive results demonstrated to be a favorable indication of the NFC role as an eco-friendly substitute binder to a widely used material.

Keywords: Nanocellulose; Tobacco stalk; NFC; Pharmaceutical ingredient; Toxicity; Fluidized bed granulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do conceito de produto “sustentável”29

Figura 2 - (a) Estrutura química da celulose com indicações da posição da ligação β -1,4 glicosídica e ligações de hidrogênio intramoleculares representadas pelas linhas pontilhadas. (b) Simulação do arranjo ordenado (região cristalina) e desordenado (região amorfa) das nanofibras de celulose (adaptado de Tayeb et al., 2018). (c) Arranjo das fibras/fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular vegetal (LAVOINE *et al.*, 2012; LÖBMANN; SVAGAN, 2017).40

Figura 3 - Gráfico logarítmico da tensão de cisalhamento, σ , em função da taxa de cisalhamento, $\dot{\gamma}$, para uma suspensão de NFC. Adaptado de Tatsumi et al., 2002. 46

Capítulo I

Figure 1. Nanocellulose as a high-value natural source. (a) The outstanding globally interest of nanocellulose (microfibrillated cellulose) as a study matter. The figures indicated in the map represents the total number of patents referring to nanocellulose in distinguish fields; (b) Graphic representation of the number of publications per year using the search term "nanocellulose" (blue bars) and the combined terms "nanocellulose AND drug delivery" (orange line) in Scopus database; (c) Donut chart, and (d) Bibliometric data concerning the latest articles, book chapters and other publications depicting original research and reviews considering the combination of nanocellulose and drug delivery topics.....67

Figure 2. Nanocellulose global market forecast for the period comprising 2019-2027. Adapted from (*Nanocellulose Market*, 2021).....69

Figure 3. Results of search terms (a) Total number of patents documents concerning the terms “nanocellulose (NC)” and “nanofibrillar cellulose (NFC)”, and/or “nanofibrillated cellulose”, and/or “microfibrillated cellulose”, and “bacterial nanocellulose” (BNC). NFC+NC represent the patents in pharmaceutical field and BNC the patents in the pharmaceutical field excluding duplicates. (b) Representative

percentual of refined patent documents regarding the search terms “nanofibrillar cellulose”, “nanofibrillated cellulose”, “microfibrillated cellulose”, “nanocellulose”, “bacterial nanocellulose”, “pharmaceutical”, “excipient”, and “drug delivery” combined with Boolean operator and truncation symbol. (c) Donut chart representing the percentage of patents referring to the search terms aforementioned.....72

Figure 4. Patents divided-by-clusters. (a) Relative number of patents classified in each cluster. (b) Representative percentage of applicant countries of patents regarding the joint of terms “nanocellulose”, “nanofibrillar cellulose”, and/or “nanofibrillated cellulose”, and/or “microfibrillated cellulose” (NFC+NC) and “bacterial nanocellulose” (BNC).....74

Figure 5. Nanocellulose patents classified into clusters.....75

Capítulo II

Fig. 1 Main steps to develop NFC pellets from tobacco stalk of dosed samples for oral administration in rodents. (a) *In natura* tobacco stalk; (b) tobacco stalk NFC powder; (c) pellet compression; (d) different pellet sizes for subchronic oral toxicity study.....107

Fig. 2 Effects of NFC pellets on the relative bodyweight of female Wistar rats (n=5). Group I, lower NFC dose (500 mg·kg⁻¹); Group II, medium NFC dose (2,500 mg·kg⁻¹); Group III, higher NFC dose (5,000 mg·kg⁻¹); Group IV, control group (conventional diet). Data were analyzed using Repeated Measures ANOVA followed by *post hoc* comparisons (Bonferroni test). Values are expressed as mean ± standard deviation. Different letters within the line indicate significant differences among groups (*p < 0.05).....113

Fig. 3 Histopathological images (HE, 100x) of liver and kidney of female Wistar rats after oral treatment for 28 consecutive days with tobacco stalk NFC.....116

Capítulo III

Figure 1. Transmission electron microscopy (TEM) of tobacco stalk nanofibrillated cellulose present in a 10% dispersion. (a-b) reference scale bar of 0.2 μ m and magnification of 100x; (c) reference scale bar of 100 nm and magnification of 200x..137

Figure 2. (a) THP-NFC granules aspect at the end of granulation process; (b) Particle size distribution of granules produced with NFC and PVP as binders.....138

Figure 3. Morphology observation of granules by using scanning electron microscope/field emission gun (SEM/FEG) produced by fluidized bed granulation using the different binder systems tested: NFC dispersion and povidone dispersion (PVP). (a) theophylline; (b) maltodextrin; (c) THF-NFC; (c1) solid bridge formation in THP-NFC granules; (d) THP-PVP; (d1) solid bridge formation in THP-PVP granules; (e) B-NFC; (f) B-PVP.....141

Figure 4. FTIR spectra of compounds used as model drug (THP) and substrate (maltodextrin) to produce fluidized bed granules with different binder systems.....142

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Métodos utilizados para obtenção dos diferentes tipos de nanocelulose.....42

Tabela 1 - Diâmetro das NFC produzidas a partir de fibras de madeira aplicando diferentes tratamentos mecânicos.....45

Capítulo I

Table 1. The three types of nanocellulose.....65

Table S1. Patents separated by clusters after examination of documents obtained in WIPO, Espacenet, and Lens.org databases, comprising the timeframe between 2011-2023, with the search terms “nanofibrillar cellulose”, “nanocellulose”, “pharmaceutical”, “excipient”, and “drug delivery” combined with Boolean operator and truncation symbol.....97

Table S2. Patents separated by clusters after examination of documents obtained in WIPO, Espacenet, and Lens.org databases, comprising the timeframe between 2011-2023, with the search terms “bacterial nanocellulose”, “pharmaceutical”, “excipient”, and “drug delivery” combined with Boolean operator and truncation symbol.....100

Capítulo II

Table 1 Hematological parameters for subchronic oral toxicity of tobacco stalk NFC in Wistar rats.....114

Table 2 Blood hepatic and renal biomarkers for subchronic oral toxicity of NFC tobacco stalk in Wistar rats.....115

Table 3 Relative organs weight (%) for subchronic oral toxicity of NFC tobacco stalk in Wistar rats.....115

Capítulo III

Table 1. Characterization analyzes in the supernatant fraction of 10% NFC dispersion and povidone dispersion.....136

Table 2. Fluidized bed granules friability index values for samples prepared with NFC and PVP dispersions as binders.....139

Table 3. Physicochemical properties and flow parameters of fluidized bed granules containing NFC dispersion and povidone (PVP) as liquid binders.....144

Table 4. Flow classification of raw material and fluidized bed granules.....144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	tridimensional
4R	conceito da economia circular que abrange: reutilizar, reciclar, recuperar e reduzir
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	ângulo de repouso
BNC	nanocelulose bacteriana
B-PVP	branco-povidona
C	comprimento
CI%	índice de Carr
CNC	celulose nanocristalina
CNF	celulose nanofibrilada
CNW	celulose <i>nanowisker</i>
D	diâmetro
DL ₅₀	dose letal mediana
fNCC	superfície de nanocristais de celulose
HaCaT	células de queratinócito humano
HDF- α	células fibroblástica dérmicas humanas
HPC	hidroxipropilcelulose
HPMC	hidroxipropilmetilcelulose ou hipromelose
HR	fator de Hausner, do inglês <i>Hausner Ratio</i>
kgf	quilograma força
MA	anidrido maléico
MC	metilcelulose
MCC PH 102	celulose microcristalina com tamanho de partícula de 100 μm
MFC	celulose microfibrilada, do inglês <i>Microfibrillated cellulose</i>
mg·kg ⁻¹	miligramas por quilo
m-NCC	celulose nanocristalina modificada
NCC	celulose nanocristalina, do inglês <i>Nanocrystalline cellulose</i>

NFC	nanofibras de celulose, do inglês <i>Nanofibrillated cellulose</i>
NFC+NC	sinônimos de nanocelulose
nm	nanômetro
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PVA-PVP	copovidona e/ou polivinil álcool - polivinilpirrolidona
PVP	povidona e/ou polivinilpirrolidona
SD	<i>spray dryer</i>
SD-NFC	nanofibras de celulose secas por aspersão (<i>spray dryer</i>)
THP	teofilina anidra
THP-NFC	amostra contendo teofilina anidra e nanofibras de celulose
THP-PVP	amostra contendo teofilina anidra e povidona
$\dot{\gamma}$	taxa de cisalhamento
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	microgramas por centímetro quadrado
$\mu\text{g}/\text{mL}$	microgramas por mililitro
μm	micrômetro
σ	tensão de cisalhamento

SUMÁRIO

Introdução	27
Objetivo geral	34
Objetivos específicos	35
Revisão da literatura	37
Celulose	38
Nanocelulose	41
Caule de tabaco	43
Propriedades das nanofibras de celulose	44
Toxicidade das nanofibras de celulose	47
Nanocelulose como excipiente farmacêutico	50
Granulação por leite fluidizado	56
Capítulo I	59
Análise do panorama mundial das inovações contendo nanocelulose como um produto de alto valor agregado no desenvolvimento de produtos farmacêuticos	59
Capítulo II	101
Avaliação da segurança das nanofibras de celulose de caule de tabaco em fêmeas de ratos Wistar	101
Capítulo III	125
Estudo da viabilidade do uso de nanofibras de celulose de caule de tabaco como agente aglutinante em processo de granulação em leite fluidizado	125
Conclusões	163
Referências	167
Anexos	179

Introdução

As frequentes alterações climáticas, o esgotamento dos recursos naturais e o constante uso de combustíveis fósseis para a obtenção de energia tem gerado grande preocupação a respeito do futuro (MACKEY; LINDENMAYER, 2014; PALMER; STEVENS, 2019). O atual cenário mundial, sobretudo em relação ao descarte de resíduos, vem reforçar a importância e a relevância da discussão da proteção ambiental, da sustentabilidade; da reutilização de materiais que são considerados resíduos (TRACHE *et al.*, 2017) para a geração de novos produtos garantindo, assim, a proteção de biomas e ecossistemas.

Dessa forma, o desenvolvimento sustentável requer o uso de produtos que sejam obtidos de fontes renováveis, ambientalmente corretos, não derivados do petróleo, apresentem baixos riscos em relação à saúde e à segurança e economicamente viáveis podendo, então, serem realmente definidos como materiais sustentáveis (MOHANTY; MISRA; DRZAL, 2002; THOMAS *et al.*, 2018). Na Figura 1, é apresentada a representação esquemática desse conceito de sustentabilidade.

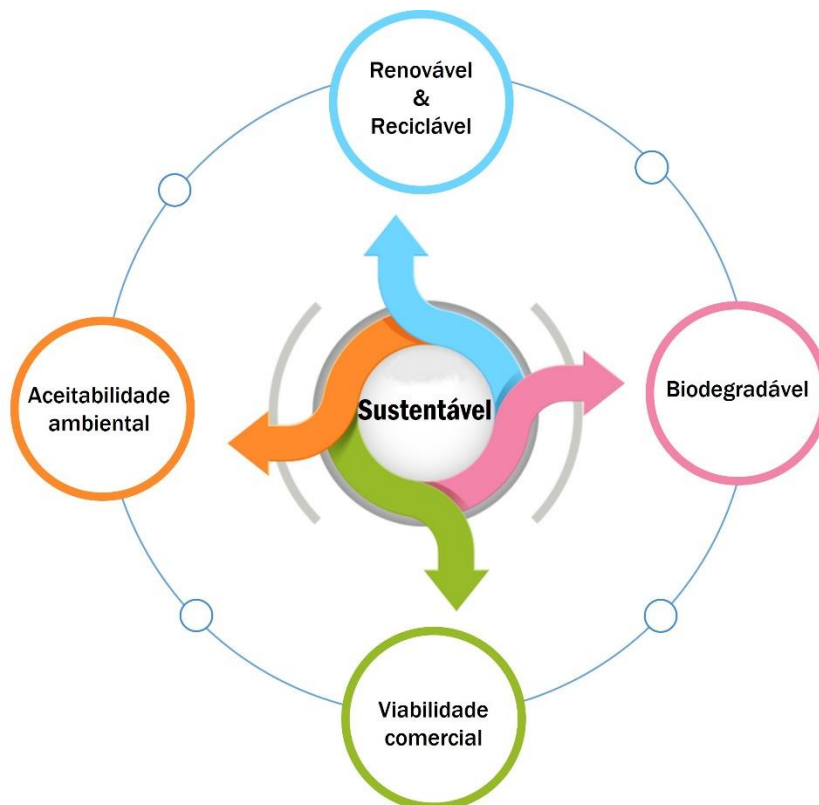


Figura 1 - Representação esquemática do conceito de produto "sustentável"
(Adaptado de Mohanty et al., 2002).

Dentro dessa vertente *eco-friendly*, insere-se o tema principal da presente tese, que busca reaproveitar resíduos da agricultura, especialmente da indústria fumageira,

como o caule de tabaco, para a produção e aplicação como um novo insumo na área farmacêutica. O caule de tabaco é um material rico em celulose, apresentando em sua composição entre 35-40% de celulose (KULIĆ; RADOJICIC, 2011), hemicelulose (15-35%), e lignina (10-20%) (DHARMARAJA *et al.*, 2020). Essas características conferem a essa biomassa a condição de material lignocelulósico. Biomassas lignocelulósicas geralmente se referem a resíduos agroindustriais e a outros materiais de origem vegetal como os derivados da madeira (RAHMAN *et al.*, 2020; TEO; WAHAB, 2020).

Nesse contexto, a celulose encontra-se como o biopolímero natural mais abundantemente encontrado na natureza (JIA *et al.*, 2014) e vem se estabelecendo dentro de uma base econômica de grande interesse (KONTTURI *et al.*, 2018). Sendo assim, derivados celulósicos como a nanocelulose vem se destacando e gerando contínuo interesse em diversas áreas por se tratar de um material versátil e de alto valor agregado, passível de modificações na estrutura química e/ou adição de grupamentos funcionais (TRACHE *et al.*, 2020).

Nanocelulose é o termo mais comumente empregado para referir-se às nano estruturas da celulose, no entanto, dependendo do tipo de tratamento empregado para sua extração, novas expressões são utilizadas. A hidrólise ácida da celulose remove a porção amorfa do material e gera nanocristais. Portanto, o produto desse tratamento químico passa a ser chamado de celulose nanocristalina (CNC) ou, do inglês, *nanocrystalline cellulose* (NCC). Quando um método físico é utilizado para cisalhar as fibras celulósicas como moagem, homogeneização a alta pressão ou microfluidização, o produto é chamado de nanofibra de celulose (NFC), celulose nanofibrilada (CNF), *nanofibrillated cellulose* (NFC), ou celulose microfibrilada (do inglês, *microfibrillated cellulose* – MFC). Há uma terceira classificação proveniente da síntese de diversas espécies de *Acetobacteraceae* e são classificadas como nanocelulose bacteriana, *bacterial nanocellulose* (BNC), celulose microbiana, ou biocelulose (KLEMM *et al.*, 2018; LAVOINE *et al.*, 2012; LIN; DUFRESNE, 2014; YU *et al.*, 2021).

O processo de moagem micronizadora estabelecido por Garcia e colaboradores (2021) foi empregado na extração das nanofibras de celulose para o desenvolvimento da presente tese. Esse método foi adotado, pois embora alguns processos de obtenção de nanocelulose utilizem solventes orgânicos (KLEMM *et al.*, 2011), a vantagem do processamento mecânico das fibras de celulose é a obtenção de nanofibras de celulose (NFC) apenas pelo cisalhamento das fibras (VARTIAINEN

et al., 2011), sem a utilização de nenhum tipo de solvente que não a água. Cabe destacar que esses tratamentos podem ser feitos em celuloses de diferentes fontes, não apenas no caule de tabaco, foco da presente tese (KLEMM *et al.*, 2018).

As nanoceluloses tem ganhado evidência e sido consideradas como um dos mais promissores materiais verdes da modernidade em função de apresentarem características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade de absorção de água, boas propriedades mecânicas de força e rigidez, além de terem relativo baixo custo e abundância na natureza (LIN; DUFRESNE, 2014; THOMAS *et al.*, 2018). O biomaterial é considerado a menor estrutura da fibra vegetal e composto de emaranhados de fibras longas e flexíveis com tamanhos que variam de 1-100 nm (ABDUL KHALIL *et al.*, 2014).

Esse novo produto proveniente da celulose, as nanofibras de celulose (NFC), são o foco do estudo de doutoramento, ao qual pretende-se avaliar sua potencial utilização como um insumo farmacêutico.

O caule de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) é considerado um resíduo da cultura fumageira e, na safra 2020/2021 atingiu a proporção de 254 mil hectares cultivados apenas no estado do Rio Grande do Sul (SINDITABACO, 2022). Isso representa praticamente, a mesma área plantada de caules que são deixados na lavoura após a colheita das folhas, cujo material apresenta valor econômico de interesse.

A intenção de utilizar as nanofibras de celulose oriundas de caule de tabaco, sobretudo no desenvolvimento de comprimidos, atuando como adjuvante de compressão, é uma inovação no âmbito da tecnologia farmacêutica. Garcia (2017) descreveu a obtenção por moagem micronizadora de nanofibras de celulose de caule de tabaco nas apresentações em suspensão e gel e sua posterior aplicação como aglutinante no preparo de grânulos contendo teofilina. Os grânulos foram produzidos pelo método tradicional, de granulação por via úmida, utilizando granulador oscilatório e incorporação manual dos agentes aglutinantes. Os agentes aglutinantes celulósicos avaliados apresentavam-se na forma de suspensão, gel, ou mistura binária de gel e povidona. As amostras de grânulos preparados com NFC foram comparados com a povidona (PVP), um polímero amplamente utilizado na indústria farmacêutica.

Dentro de uma abordagem mundial, os estudos sobre a utilização de nanocelulose como excipiente farmacêutico tiveram início em um grupo da Faculdade de Farmácia da Universidade de Helsinki, na Finlândia. Esse grupo é pioneiro em descrever a utilização de nanofibras de celulose extraídas da bétula e secas por *spray-*

dryer como um excipiente no preparo de comprimidos (KOLAKOVIC *et al.*, 2011). Os pesquisadores desenvolveram, também, filmes altamente resistentes a partir de uma suspensão aquosa de nanofibras, em que os fármacos analisados foram incorporados a esta suspensão resultando na liberação sustentada por um período superior a 3 meses (KOLAKOVIC *et al.*, 2012a). Da mesma forma, utilizaram as nanofibras secas por *spray-dryer* e incorporadas com fármaco, como matriz de liberação em micropartículas. Os resultados dos estudos de liberação apontaram liberação sustentada por um período superior a 2 meses (KOLAKOVIC *et al.*, 2012b). Neste contexto, pode-se observar que as características específicas da nanocelulose abrem perspectivas para promover a liberação modificada de fármacos, entre outros benefícios, para além da substituição de adjuvantes clássicos pautada na sustentabilidade.

Isto posto, o ineditismo da presente tese está pautado não apenas na origem das nanofibras, provenientes do caule de tabaco, como também na demonstração da viabilidade do emprego das NFC de caule de tabaco, liofilizadas ou em suspensão aquosa, como insumo farmacêutico. Especificamente, espera-se com essa tese avaliar a capacidade aglutinante das NFC em granulação por leiteo fluidizado, bem como demonstrar a segurança toxicológica *in vivo* do nanomaterial, ora inéditos, além de traçar o panorama atual de propriedade intelectual e inovação voltada exclusivamente para aplicações farmacêuticas

Objetivos

Objetivo geral

O objetivo geral da tese é avaliar a segurança e a aplicabilidade tecnológica de nanofibras de celulose (NFC), oriundas de caule de tabaco, como insumo farmacêutico.

Objetivos específicos

- Identificar o panorama de propriedade intelectual relacionado ao uso de nanocelulose como um produto de alto valor agregado no desenvolvimento de produtos farmacêuticos;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* das nanofibras de celulose de caule de tabaco por meio de parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos;
- Avaliar a viabilidade da utilização das nanofibras de celulose de caule de tabaco como agente aglutinante na obtenção de granulados por granulação em leito fluidizado almejando sua possível aplicação como insumo farmacêutico alternativo.

Revisão da literatura

Celulose

A celulose foi descoberta e isolada das plantas pela primeira vez em 1838 pelo químico francês Anselme Payen (Hon, 1994). Em 1928, Norman Haworth, um ganhador do prêmio Nobel anuncia que as ligações covalentes de estruturas como açúcar, amido e celulose ocorre dentro da molécula e entre as unidades de glicose (HAWORTH, 1966). Dois anos depois, em 1930, foi descoberto que a estrutura molecular da celulose era formada por longas cadeias de glicose. Esta descoberta deu origem à ciência dos polímeros (STAUDINGER, 1953; WÜSTENBERG, 2014). Duas décadas depois, em 1955, a celulose microcristalina é descoberta e passa a ser comercializada pela marca Avicel[®] sendo utilizada tanto nas indústrias farmacêuticas quanto alimentícias (THOORENS *et al.*, 2014).

Atualmente, a celulose é considerada como um biopolímero renovável de maior importância do planeta. Para a indústria manufatureira, é a principal fonte de materiais sustentáveis (KUMAR; SHARMA; SINGH, 2018). A celulose comercializada é proveniente, principalmente da madeira e do algodão (BRINCHI *et al.*, 2013), no entanto, outros materiais vegetais podem ser fontes importantes para a obtenção de celulose, como fibras de sementes, fibras de cânhamo, juta e linho, bambu, bagaço de cana-de-açúcar, bem como algas – *Valonica ventricosa* e, bactérias – *Gluconacetobacter xylinum* e *Acetobacter xylinum* (KLEMM *et al.*, 2011).

Independentemente das fontes, a celulose pode ser encontrada em folhas, frutos ou nos caules sendo um componente de reforço da parede celular, atuando juntamente com a hemicelulose, a lignina e a pectina (GU; CATCHMARK, 2013; KONTTURI *et al.*, 2018). As hemiceluloses, também chamadas de polioses, são heteropolissacarídeos associados com a celulose na parede celular. Apresentam estrutura ramificada, amorfa e composta pela combinação de açúcares, as hexoses D-glicose, D-manose e D-galactose e as pentoses D-xilose e L-arabinose. A lignina é um hidrocarboneto complexo que apresenta constituintes alifáticos e aromáticos (JOHN; THOMAS, 2008) os quais são responsáveis por fornecer rigidez às plantas (MOHANTY; MISRA; DRZAL, 2002). Esse constituinte vegetal pode ser classificado como um polifenol constituído por unidades de fenilpropano sem estrutura ordenada e regular em função de ser uma macromolécula amorfa e hidrofóbica, de estrutura tridimensional e altamente ramificada (FENGEL; WEGENER, 1989; JOHN; THOMAS, 2008). Pectinas são heteropolissacarídeos que consistem em ligações α -1,4 de ácido

galacturônico e outros açúcares como ramnose e arabinose, parcialmente esterificado com grupos metoxila, cuja função está relacionada com a flexibilidade das plantas (JOHN; THOMAS, 2008).

A celulose é um homopolímero de cadeia linear composta por unidades de repetição que consistem em dois anéis de anidroglicose conectados por uma ligação glicosídica β -1,4 (TAYEB *et al.*, 2018), conforme apresentado na Figura 2(a). As moléculas de celulose são empacotadas no sentido paralelo em microfibrilas semicristalinas que são mantidas unidas via ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares e por forças de van der Waals (KONTTURI *et al.*, 2018; LÖBMANN; SVAGAN, 2017).

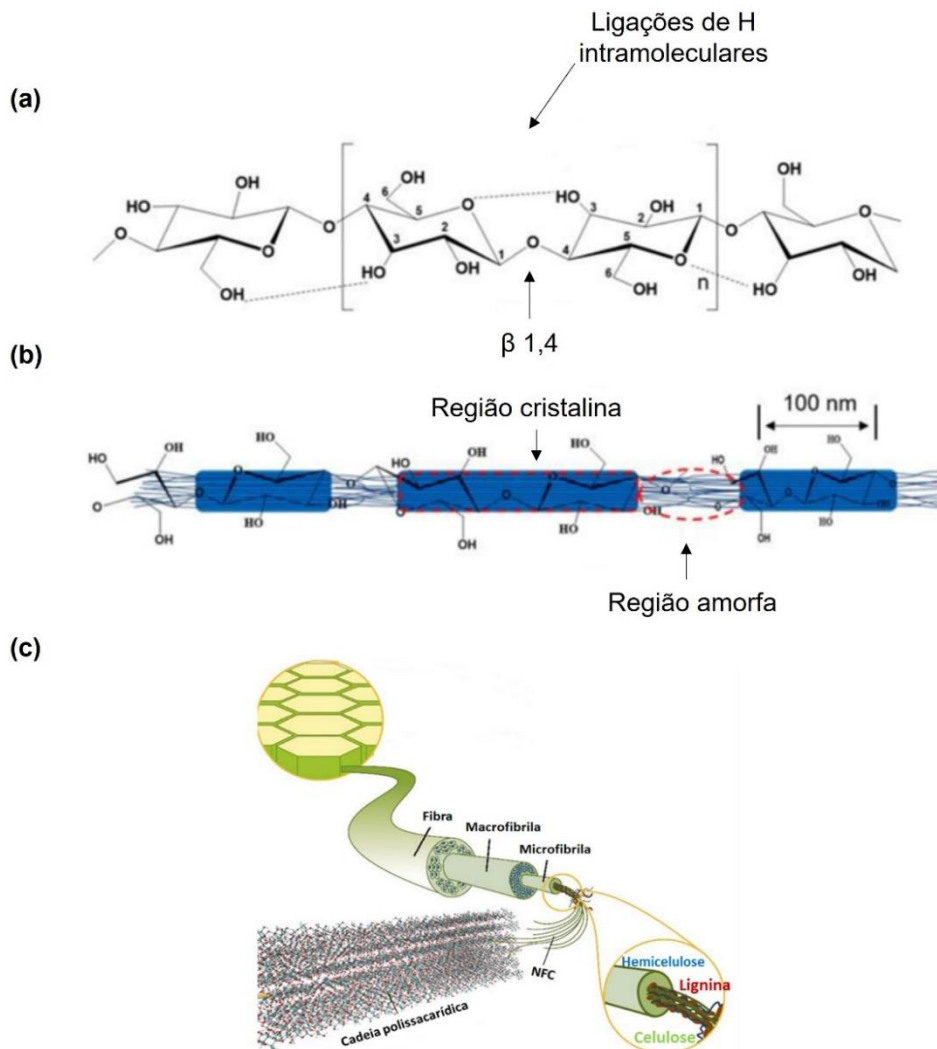


Figura 2 - (a) Estrutura química da celulose com indicações da posição da ligação β -1,4 glicosídica e ligações de hidrogênio intramoleculares representadas pelas linhas pontilhadas. (b) Simulação do arranjo ordenado (região cristalina) e desordenado (região amorfa) das nanofibras de celulose (adaptado de Tayeb *et al.*, 2018). (c) Arranjo das fibras/fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular vegetal (LAVOINE *et al.*, 2012; LÖBMANN; SVAGAN, 2017).

As microfibrilas presentes nas paredes celulares, Figura 2(c), se apresentam arranjadas em regiões cristalinas e amorfas. As regiões amorfas estão presentes na superfície e são encontradas ao longo do comprimento das microfibrilas (FERNANDES *et al.*, 2011), conforme apresentado na Figura 2(b). O tamanho de uma microfibrila varia de acordo com a fonte de origem, por exemplo, o diâmetro das microfibrilas proveniente da madeira geralmente se apresenta em torno de 4 nm com comprimento dentro da escala micrométrica (ENDLER; PERSSON, 2011; LÖBMANN; SVAGAN, 2017).

Existem seis diferentes polimorfos da celulose (I, II, III_I, III_{II}, IV_I, IV_{II}) que permitem a conversão de um para outro (KLEMM *et al.*, 2005; LAVOINE *et al.*, 2012). A forma polimórfica prevalente na natureza é a celulose-I, que consiste em dois alomorfos, as formas cristalinas I α e I β em proporções diferentes dependendo da origem botânica. A celulose-I, também chamada de nativa, não é a forma polimórfica termodinamicamente mais estável, pois se nano- ou microfibras forem dissolvidas e, após, a solução formada for recristalizada, ou seja, regenerada em condições altamente alcalinas – reação de mercerização - haverá a formação de cristais de celulose do tipo II. A celulose-II, é a forma mais estável (SIQUEIRA; BRAS; DUFRESNE, 2010) e se diferencia do tipo I pelo arranjo antiparalelo no sentido das microfibrilas, em que o consumo de energia é mínimo (LÖBMANN; SVAGAN, 2017; SCHENZEL; ALMLÖF; GERMGÅRD, 2009).

O tratamento da celulose tipo I e II com amônia produz, respectivamente, a celulose tipo III_I e III_{II}. A partir da modificação do tipo III com glicerol, a celulose-IV é obtida (LAVOINE *et al.*, 2012).

Aplicando diferentes técnicas à celulose, é possível extrair duas formas usuais de nanocelulose (TAYEB *et al.*, 2018).

Nanocelulose

Materiais celulósicos que apresentem ao menos uma das dimensões na escala nanométrica (1-100 nm) são considerados nanocelulose (JORFI; FOSTER, 2015; KLEMM *et al.*, 2011, 2018; LIN; DUFRESNE, 2014).

Diferentes tipos de nanocelulose podem ser obtidos dependendo do método de obtenção aplicado e sua classificação em três categorias é descrita na literatura e apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 - Métodos utilizados para obtenção dos diferentes tipos de nanocelulose.

Tipo de nanocelulose	Termos relacionados	Fontes	Método	Dimensões	Referência
Celulose nanocristalina (CNC)	Nanocristais de cellulose (NCC); <i>Nanocellulose wisker</i> (CNW); <i>Rodlike cellulose microcrystals</i>	Madeira, algodão, cânhamo, linhaça, palha de trigo, casca de amora, rami e celulose de algas e bactérias	Hidrólise ácida para remoção da porção amorfa	D: 5–70 nm C: 100–250 nm	Yu et al., 2021
Nanofibras de celulose (NFC)	Celulose microfibrilada (MFC); Celulose nanofibrilada (CNF); Nanofibrilas; Microfibrilas	Madeira, beterraba, batata, cânhamo, e linhaça, algodão, caule de tabaco, bagaço de cana-de-açúcar	Delaminação da polpa de madeira por homogeneização a alta pressão, microfluidização ou moagem e/ou seguida de tratamentos químicos ou enzimáticos	D: 5–60 nm C: vários μm	Lavoine et al., 2012
Nanocelulose bacteriana (BNC)	Celulose bacteriana; Celulose microbiana; Biocelulose	Açúcares e álcoois de baixo peso molecular	Sintetizado por várias espécies de Acetobacteraceae	20-100 nm	Klemm et al., 2018; Lin & Dufresne, 2014

D: diâmetro; C: comprimento

Na presente tese, as “nanofibras de celulose – NFC” são o tipo de interesse e, portanto, a partir deste momento todas as menções ao nanomaterial serão feitas utilizando-se este termo.

As nanofibras de celulose (NFC) consistem em um feixe de moléculas de celulose com longas, flexíveis e emaranhadas nanofibras com tamanhos aproximados de 1-100 nm (ABDUL KHALIL *et al.*, 2014). Devido à estrutura original da celulose, as NFC contêm grande quantidade de grupos hidroxila na superfície das fibras o que proporciona a formação de ligações de hidrogênio. Isso significa que as NFC possuem alta afinidade com a água e formam dispersões altamente viscosas com teor de sólidos muito baixos (KOLAKOVIC *et al.*, 2012a).

A madeira é sem dúvida a maior fonte de celulose para a produção de NFC. Contudo, plantas como milho, trigo, arroz, sorgo, cevada, cana-de-açúcar, abacaxi, banana e batata e, especialmente, seus subprodutos podem ser fontes valiosas de nanofibras (SIRÓ; PLACKETT, 2010). Mais recentemente, o caule e o talo de tabaco também surgiram como uma fonte alternativa de obtenção de nanofibras de celulose para diferentes aplicações (AGRUPIS; MAEKAWA, 1999; AGRUPIS; MAEKAWA; SUZUKI, 2000; GARCIA *et al.*, 2021; KULIĆ; RADOJICIC, 2011; LI XIAOPING, WU ZHANGKANG, 2014; SHAKHES *et al.*, 2011; TUZZIN *et al.*, 2016).

Caule de tabaco

A *Nicotiana tabacum* L. é uma planta herbácea à subarborescente, anual ou bianual, pertencente à família das Solanaceas, nativa das regiões tropicais e subtropicais das Américas. Dependendo da espécie, pode atingir de 0,8 a 2,5 metros de altura (REFLORA, 2020; SHAKHES *et al.*, 2011). O caule principal é ereto com ramos escassos e entrenós alados ou parcialmente alados. As folhas são persistentes e numerosas (REFLORA, 2020) e possuem importância social e econômica em muitas regiões do planeta (AGRUPIS; MAEKAWA, 1999).

Após a colheita das folhas, o caule permanece na lavoura, sendo derrubado e incorporado ao solo como adubo (SHAKHES *et al.*, 2011). Todavia, o caule de tabaco é um material que pode ser considerado como resíduo verde, pois apresenta em sua composição aproximadamente 40% em massa de celulose (KULIĆ; RADOJICIC, 2011), entre 15 e 35% de hemicelulose e, variando de 10 a 20% de lignina (DHARMARAJA *et al.*, 2020).

O tabaco é a cultura agrícola não alimentar mais importante do mundo e, o Brasil figura entre os maiores exportadores do produto. Nos primeiros cinco meses de 2021, o país foi o responsável pela exportação de 195.591 toneladas de tabaco, o que representou um aumento de 34,6% no volume de exportações e uma arrecadação em valor 11,15% maior (aumento de US\$ 82,74 milhões) em relação ao mesmo período do ano precedente. Os estados da região Sul do país são os maiores produtores de tabaco e juntos participaram com 98,9% das exportações contabilizadas até maio do último ano (MDIC, 2021). Nesse sentido, devido à grande produção mundial de tabaco, alguns estudos têm buscado alternativas econômicas e sustentáveis de aproveitar resíduos agroindustriais que não eram relevantes em fontes para a obtenção de celulose e seus derivados (AGRUPIS; MAEKAWA, 1999; AGRUPIS; MAEKAWA; SUZUKI, 2000; GARCIA *et al.*, 2021; KULIĆ; RADOJICIC, 2011; LI XIAOPING, WU ZHANGKANG, 2014; SHAKHES *et al.*, 2011; TUZZIN *et al.*, 2016).

A extração dessa celulose e seu posterior tratamento pode propiciar sua aplicação em outros fins como produção de papel, tecidos, painéis, compósitos, entre outros (AGRUPIS; MAEKAWA; SUZUKI, 2000; AKPINAR *et al.*, 2010; LI XIAOPING, WU ZHANGKANG, 2014; SHAKHES *et al.*, 2011) despertando, sobretudo, interesse na obtenção de nanofibras de celulose (NFC) para o desenvolvimento de novos produtos.

Propriedades das nanofibras de celulose

Dependendo da fonte da matéria-prima celulósica utilizada, especialmente materiais considerados resíduos, as fibras de celulose empregadas para a obtenção da NFC podem apresentar diferentes características em termos de comprimento, quantidade residual de lignina e hemicelulose. Essas diferenças seguidas de distintos métodos de produção podem gerar nanofibras com morfologias semelhantes, mas com dimensões (diâmetro e comprimento) desiguais em relação à utilização de fibras da madeira. Entretanto, a exata comparação das dimensões das nanofibras são dificultadas em função da disparidade entre as matérias-primas (KLEMM *et al.*, 2018; NECHYPORCHUK; PIGNON; BELGACEM, 2014). De modo geral, a literatura reporta a estreita relação entre o método mecânico utilizado e o diâmetro das nanofibras obtidas, conforme apresentado na Tabela 1.

Dentre os derivados celulósicos, as nanofibras de celulose se apresentam como um novo material que, além de ser obtida a partir de fontes renováveis, apresenta algumas vantagens em relação aos demais, como sua alta relação área/volume (razão de aspecto), alto módulo de Young (propriedade que mede a rigidez de um material sólido), capacidade de biodegradação e características atóxicas (FLAUZINO NETO *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Diâmetro das NFC produzidas a partir de fibras de madeira aplicando diferentes tratamentos mecânicos.

Tratamento mecânico	Diâmetro (nm)	Referência
Homogeneização à alta pressão	20-40	Lee et al., 2009; Nakagaito & Yano, 2004
Moagem	15-50	Lavoine et al., 2012; Nechyporchuk et al., 2014
Misturador à alta velocidade	15-20	Sajab et al., 2019; Uetani & Yano, 2011
Microfluidização	10-30	Aulin et al., 2009; Onyianta et al., 2018

Nesse sentido, a caracterização química obtida para cada NFC varia de acordo com a fonte de origem. Em geral, amostras de celulose derivadas da indústria do papel (*Eucalyptus* sp.) apresentam um teor de α -celulose em torno de 92% (TONOLI *et al.*, 2012), sendo o alto teor justificado devido à maior parte da lignina e hemicelulose terem sido eliminadas no processo de deslignificação (VILA *et al.*, 2011). Em relação às NFC de tabaco, os estudos realizados por Kulić e Radojičić (2011) apresentaram teores de α -celulose de 30,5% para a variedade Virgínia, enquanto Garcia (2017) encontrou para o caule de tabaco de mesma espécie 32,4% e, Tuzzin e colaboradores (2016), na avaliação de talos reportou 41,7% de α -celulose. Essas diferenças entre os estudos podem ser explicadas em função da espécie de tabaco estudada e, também, da porção analisada do caule – se parte superior, mediana ou inferior, e da posição dos talos no caule.

Suspensões aquosas de NFC formam uma rede altamente emaranhada de partículas fibrosas que exibem comportamento semelhante ao gel (*gel-like*).

Geralmente, se comportam como suspensões coloidais quando diluídas e como géis quando mais concentradas (DERAKHSHANDEH *et al.*, 2011; NECHYPORCHUK; BELGACEM; PIGNON, 2016).

A rede de nanofibras predominante dentro de uma suspensão de NFC pode ser quebrada por cisalhamento e fluirá com o tempo, chamado comportamento de cisalhamento (PÄÄKKO *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, suspensões de NFC apresentam comportamento tixotrópico tempo-dependentes, em que a viscosidade atinge o equilíbrio ao manter a taxa de cisalhamento constante por um determinado tempo (IOTTI *et al.*, 2011). A forma característica da curva de fluxo da suspensão de NFC é mostrada na Figura 3.

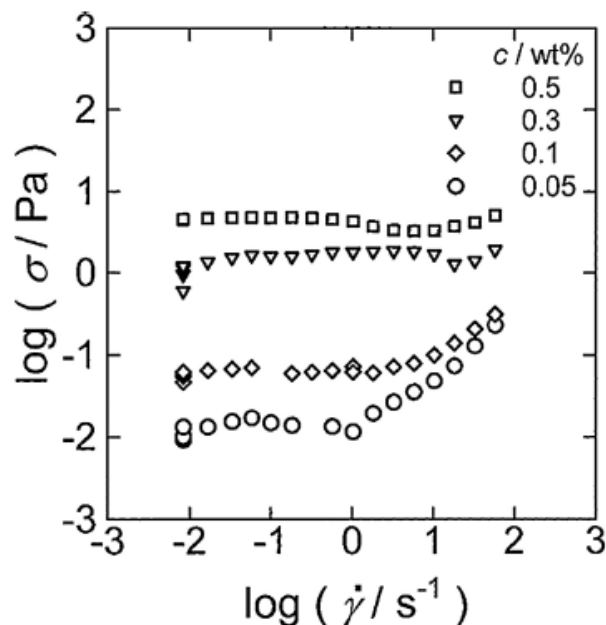


Figura 3 - Gráfico logarítmico da tensão de cisalhamento, σ , em função da taxa de cisalhamento, $\dot{\gamma}$, para uma suspensão de NFC. Adaptado de Tatsumi *et al.*, 2002.

De acordo com a Figura 3, a tensão de cisalhamento é constante a baixas taxas de cisalhamento para as concentrações que variam entre 0,05-0,5% em massa. Acima disso, a tensão de cisalhamento aumenta com a taxa de cisalhamento. Segundo Iotti e colaboradores (2011), o fenômeno pode ser explicado em função da provável orientação das NFC ao longo das linhas de fluxo, causando um aumento na viscosidade.

Em geral, quanto mais fina a NFC, maior a viscosidade. A concentração na qual um gel se formará, é inversamente proporcional à razão de aspecto (comprimento/largura) das nanofibras (NECHYPORCHUK; BELGACEM; PIGNON, 2016; TATSUMI; ISHIOKA; MATSUMOTO, 2002). Com relação à influência do método de fibrilação, a

viscosidade da NFC aumenta com o número de passagens através do equipamento de homogeneização (LÖBMANN; SVAGAN, 2017).

As propriedades reológicas das NFC dependem das características da rede de nanofibras e da organização dessas nanofibras na rede formada (SAARIKOSKI *et al.*, 2012). De acordo com Hubbe (2007), as propriedades reológicas também estão relacionadas com a homogeneidade de distribuição de tamanho das NFC na suspensão ao qual, acaba sendo inerente à origem do material celulósico e das condições de processo e pré-processo.

Dessa forma, as diferentes propriedades reológicas permitem que as NFC obtidas de fontes botânica diversas possam atuar como espessante ou estabilizante em suspensões ou emulsões (ANDRESEN; STENIUS, 2007; XHANARI *et al.*, 2011), em produtos farmacêuticos (KOLAKOVIC *et al.*, 2011, 2012b, 2012a; LÖBMANN; SVAGAN, 2017) e em muitas aplicações como alimentos (JIN *et al.*, 2021), tintas (WANG *et al.*, 2022) e cosméticos (SONG; SHIN, 2016).

Toxicidade das nanofibras de celulose

A principal questão envolvendo as nanofibras é o comprimento das fibras que, segundo Donaldson e Tran (2004), fibras > 5 µm podem impactar na capacidade dos macrófagos de fagocitarem apropriadamente as fibras quando inaladas, gerando um subsequente estímulo dos fatores inflamatórios que levam a uma potencial fibrose ou efeitos cancerígenos se as fibras são muito longas.

A potencial aplicação das nanofibras ressalta a importância de conhecer a forma e o tipo de interação biológica da substância quando em contato com células e tecidos de mamíferos. Baseado neste entendimento, a literatura apresenta alguns estudos que investigaram os possíveis riscos à saúde associados com materiais celulósicos (DE LIMA *et al.*, 2012; ENDES *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2017; MOREIRA *et al.*, 2009).

Lopes e colaboradores (2017) avaliaram citotoxicidade, estresse oxidativo e secreção de citocinas provocadas pela presença de NFC-gel derivada de madeira em células humanas dérmicas, pulmonares e do sistema imunológico. Nesse estudo, não houve a indução do estresse oxidativo pela NFC. No entanto, os níveis de citocina pró-inflamatória foram elevados acima de 250 µg/mL da concentração de tratamento. Os resultados apresentados pelos autores sugerem que a resposta inflamatória aos

NFC-gel pode ser devido à alteração na superfície química da molécula de celulose. Os autores finalizaram a discussão afirmando que são necessários mais estudos, especialmente para exposição por tempo prolongado e ensaios *in vivo* para investigar os efeitos das NFC na resposta imune e assim, garantir a segurança das nanoceluloses.

No artigo de revisão de Endes e colaboradores (2016), os autores referenciam trabalhos que confirmaram o potencial tóxico limitado das nanoceluloses em termos de citotoxicidade. Nesse estudo, os autores utilizaram um modelo sofisticado de cocultura de células triplas da barreira do tecido epitelial humano (formulado com uma camada de células epiteliais, complementada por macrófagos derivados de monócitos do sangue humano e células dendríticas nos lados apical e basolateral, respectivamente) que não mostrou citotoxicidade significativa de dois tipos diferentes de celulose nanocristalina isolados de algodão e tunicados (algas) que foram depositados nas células em doses realistas ($0,14 \pm 0,04$, $0,81 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Mais recentemente, Kim e colaboradores (2019) avaliaram citotoxicidade a curto prazo, irritação dérmica e ocular das nanofibras de celulose para fins de aplicação cosmética. Neste estudo, foram utilizadas nanofibras de celulose provenientes de uma indústria norte-coreana especializada na produção deste material. A citotoxicidade foi avaliada em células de queratinócito humano (HaCaT) e em células fibroblásticas dérmicas humanas (HDF- α). O ensaio de irritação dérmica e ocular foi feito em um modelo epidérmico e de córnea 3D. Como resultado, os autores reportaram a indução da citotoxicidade nas células HaCaT ($\geq 156 \mu\text{g}/\text{mL}$) e HDF- α ($\geq 313 \mu\text{g}/\text{mL}$), inibindo o crescimento celular. No entanto, as nanofibras não foram capazes de promover irritação dérmica ou ocular. Os autores concluem que estudos a longo prazo se fazem necessários e sugerem que adequações na concentração de nanofibras de celulose permitem sua utilização como material cosmético.

A investigação *in vitro* e *in vivo* da toxicidade da nanocelulose quando ingerida, foi realizada por DeLoid e colaboradores (2019). Os autores utilizaram nanocelulose obtida a partir de fibras branqueadas de madeira (*softwood*) e consideraram sua aplicação como um importante aditivo alimentício. A avaliação *in vitro* foi realizada em trato gastrointestinal simulado e um modelo de epitélio intestinal foi utilizado para avaliar os efeitos. Já a avaliação da toxicidade aguda *in vivo* foi realizada em ratos por 5 semanas, com administração por gavagem da suspensão de nanofibras dispersa em creme ou água. Os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos foram

avaliados. Os autores relataram que não houve morte dos animais ou alteração dos parâmetros avaliados, o que sugere a classificação do nanomaterial como não-tóxico ou minimamente tóxico.

Por outro lado, a origem das nanofibras de celulose utilizadas na presente tese, a partir do caule de tabaco, suscita preocupações acerca da segurança de seu uso como insumo farmacêutico. Não há, na literatura, qualquer estudo que avalie a toxicidade oral *in vivo*, de nanofibras obtidas a partir do caule do tabaco. Os estudos apresentados na literatura são majoritariamente estudos biológicos *in vitro* das NFC.

No caso da NFC advinda do tabaco, o material tem alta capacidade de aglomeração, o que dificulta o estabelecimento de protocolos confiáveis para a avaliação, assim como tem sido observado para outros sistemas nanométricos (BRINCHI *et al.*, 2013; ENDES *et al.*, 2016; LAVOINE *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2009; PENG; GARDNER; HAN, 2012). Neste contexto, um dos estudos realizado no doutoramento e apresentado em detalhes no Capítulo II, vislumbrou a investigação de aspectos toxicológicos desses materiais por meio de estudos *in vivo*.

Os testes que verificam a toxicidade aguda *in vivo* são utilizados para classificação dos perigos e avaliação de riscos à saúde humana e ao meio ambiente (OECD, 2000). Estes testes têm por finalidade avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste administrada em uma ou mais doses durante um período de 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (ANVISA, 2013). Atualmente, existem 3 métodos de avaliação da toxicidade aguda oral: Teste da dose fixa (OECD, 2008a), Toxicidade aguda de Classe (OECD, 2002) e Teste *Up and Down* (OECD, 2008b). O teste de dose fixa identifica a menor dose que causa toxicidade evidente. Nele, são administradas doses fixas da substância teste, utilizando 5 animais por dose. Já o método de Toxicidade aguda de Classe identifica a menor dose que causa mortalidade. Doses fixas da substância teste são administradas e são utilizados 3 animais por dose. O Teste *Up and Down* estima a faixa da DL₅₀. Uma dose inicial estimada é administrada ao qual deverá ser multiplicada por um fator de progressão, sendo utilizado apenas 1 animal por dose. Estes testes de toxicidade aguda avaliam a faixa estimada de DL₅₀, sinais de toxicidade aguda e órgãos-alvo. As informações obtidas pelos 3 métodos não são idênticas, portanto, a escolha do método deve ser feita com base na proposta científica e regulatória para o teste de toxicidade oral aguda.

Nanocelulose como excipiente farmacêutico

No desenvolvimento de formas farmacêuticas, a nanocelulose tem sido estudada como adjuvante farmacêutico podendo ter propriedades que variam desde material de enchimento (KOLAKOVIC *et al.*, 2011) até sua aplicação como superdesintegrantes (SHEIKHY *et al.*, 2021) na produção de comprimidos, além de apresentarem aplicação na liberação de medicamentos em dispositivos transdérmicos (ABBA *et al.*, 2019; ANIRUDHAN; NAIR; SEKHAR. V, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020; EVDOKIMOVA *et al.*, 2018), tratamento de feridas (ALKHATIB *et al.*, 2017; BASU; STRØMME; FERRAZ, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019; MORITZ *et al.*, 2014) e desenvolvimento de produtos injetáveis (ALIZADEH *et al.*, 2018; KUSHAN; SENSES, 2021; WONG *et al.*, 2021). Além disso, a nanocelulose também demonstrou sua efetividade na engenharia de tecidos (BACAKOVA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2021). A seguir, são apresentados alguns dos estudos mais recentes sobre a ação das nanoceluloses como excipiente farmacêutico.

Kolakovic e colaboradores (2011) estudaram a utilização de nanofibras de celulose, oriundas de madeira e secas por *spray dryer* (SD) como material de enchimento na produção de comprimidos contendo 60% e 40% de paracetamol, respectivamente. Os autores relataram que os comprimidos preparados com as SD-NFC apresentaram menor deformação plástica e maior fragilidade quando comparados com celulose microcristalina (MCC PH 102). Os resultados demonstraram liberação de 78% de fármaco quando utilizada a celulose microcristalina e, 94% de liberação após 4 minutos quando empregada a SD-NFC como excipiente. Os autores explicaram que essa rápida liberação é em consequência da maior desintegração da SD-NFC. Esse estudo teve como conclusão a possibilidade de utilização das NFC como excipiente farmacêutico, apesar do material se mostrar ser mais frágil e requerer maior força de compressão do que a celulose microcristalina empregada.

Uma das aplicações da nanocelulose relatada na literatura é no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. Mais uma vez, Kolakovic e colaboradores (2012b) relataram o uso de NFC como formador de matriz. Nanofibras secas por aspersão (*spray-dried* – SD), foram utilizadas para a preparação de micropartículas carregadas com fármacos como indometacina, nadolol, atenolol, metropolol tartarato, cloridrato de verapamil e ibuprofeno.

Primeiramente, os autores prepararam suspensões contendo NFC e fármacos nas proporções 20/80; 30/70 e, 40/60 respectivamente, para secagem por aspersão. Os autores afirmaram que as NFC demonstraram a habilidade de formar micropartículas porosas de aproximadamente 5 μm pelo processo de *spray-drying* e de, simultaneamente, encapsular fármaco dentro do carreador NFC. Também foi descrito que uma porção do fármaco foi seca separadamente ou encontrada na superfície da partícula, o que acabou afetando a incorporação final do fármaco. Os autores ainda observaram que diferentes fármacos apresentaram diferentes perfis de liberação, como resultado da combinação de vários fatores, incluindo diferentes solubilidades do fármaco no meio e diferentes afinidades dos fármacos com as NFC, e perfis de sustentação na liberação por um período superior a dois meses foram observados. Por fim, concluíram o estudo com a afirmativa de que as micropartículas podem sustentar a liberação de fármaco pela formação de uma rede justa de fibras que limitaram a difusão do fármaco.

Por fim, Kolakovic e colaboradores (2012a) relatam o controle na liberação de fármacos, dessa vez, com o uso de filmes de NFC. Neste trabalho, foi utilizado esse recurso para encapsular fármacos insolúveis em água em uma rede de fibras e produzir os filmes de NFC incorporados de fármacos. A hipótese sustentada pelos autores era de que a rede de fibras criada ao redor das partículas de fármaco os protegeria do meio ambiente líquido, sustentaria a dissolução das moléculas de fármaco e criaria uma barreira para sua difusão. A produção do filme envolveu uma etapa de filtração na qual pretendeu-se manter o fármaco na massa do filtrado. Uma suspensão aquosa altamente viscosa de NFC foi obtida e misturada com o fármaco escolhido nas proporções fármaco/NFC 20/80; 30/70 e, 40/60, respectivamente. Na sequência, a mistura foi diluída e filtrada em filtro de membrana gerando matrizes úmidas, que foram secas em estufa resultando em filmes. Os autores concluíram que os filmes apresentaram excelentes propriedades mecânicas e puderam ser facilmente manuseados após o preparo. A eficiência de encapsulação foi maior que 90% e a incorporação de fármaco final ficou entre 20-40%. Os estudos de liberação *in vitro* apontaram a ocorrência de liberação sustentada por um período superior a três meses com a cinética de liberação sendo dependente do fármaco utilizado. Os autores encerram a discussão reafirmando a utilização das NFC como um novo excipiente com características muito interessantes para serem aplicadas nos estudos de controle de liberação.

A nanocelulose também foi avaliada exercendo a função de superdesintegrante. Nesse estudo, Sheikhy e colaboradores (2021) relatam a síntese de um novo nanogel como um promissor agente superdesintegrante. Foram avaliados nanogel formado por celulose nanocristalina (NCC) extraída a partir da celulose microcristalina e celulose nanocristalina modificada (m-NCC). A modificação é baseada em processo de reticulação via ação do anidrido maléico (MA) como o agente de reticulação. Na sequência, é adicionado um agente absorvente ao sistema para gerar um balanço de polímeros hidrofóbico-hidrofílico e assim, obter celulose m-NCC com uma capacidade aumentada de intumescimento. Os comprimidos produzidos com o novo superdesintegrante foram comparados com excipientes clássicos como amido glicolato de sódio e celulose microcristalina como controles positivo e negativo, respectivamente. Como resultado, os autores citaram a rápida desintegração dos comprimidos preparados com NCC (4 min) e m-NCC com diferentes concentrações de MA – 0,1; 0,3; e 0,6 g - (2,1; 1,16; e 2,6 min), respectivamente. O controle positivo apresentou tempo de desintegração de 5,03 min e o controle negativo 6,56 min. Os nanogéis apresentaram excelente capacidade de intumescimento e melhores eficiências de dissolução em comparação com os controles. Os autores concluem que os nanogéis possuem características promissoras para se tornarem os próximos candidatos do mercado de excipientes farmacêuticos.

A função como aglutinante em processo de granulação oscilatória foi tema de pesquisa de Garcia (2017). A autora utilizou nanofibras de caule de tabaco como agente aglutinante. Os agentes aglutinantes celulósicos avaliados apresentavam-se na forma de suspensão, gel, ou mistura binária de gel e povidona. As amostras de grânulos preparados com NFC foram comparados com a povidona (PVP). Os resultados apresentados pela autora foram prósperos e indicaram a potencialidade da utilização desse material contendo nanofibras como aglutinante. Os grânulos de teofilina preparados com as NFC apresentaram resultados semelhantes aos obtidos com os grânulos preparados com povidona; no entanto, suas características de fluxo foram melhoradas. Estes granulados se apresentaram menos friáveis do que aqueles preparados com povidona como aglutinante, quando submetidos à ensaio de friabilidade. A resistência à compressão dos grânulos mostrou que estes são passíveis de compressão, suportando forças da ordem de 3,0 kgf (GARCIA, 2017).

Em relação à liberação transdérmica de fármacos, Abba e colaboradores (2019) utilizaram uma membrana de nanocelulose bacteriana para a liberação de

crocin, um agente anticâncer e antidepressor. Películas poliméricas foram produzidas por cepas bacterianas de *Gluconacetobacter xylinus*, filtradas e purificadas. Após, as membranas foram incorporadas com crocin por imersão. A determinação da quantidade de crocin absorvida pelo filme bacteriano foi realizada pela diferença entre o filme antes e depois da incorporação. Os autores avaliaram o intumescimento, a dissolução e a liberação transdérmica. Os resultados apresentaram altas taxas de intumescimento em diferentes meios o que indica boa capacidade de absorção de líquidos. Na avaliação de dissolução, cerca de 90% da crocin incorporada foi liberada em 25 min e cerca de 50% foram liberados nos primeiros 5 minutos. A liberação transdérmica das membranas se mostrou lenta ($215 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) e foi atribuída à estrutura singular das fibrilas, que se apresentam em nanoescala, e, à rede tridimensional. A conclusão do estudo foi a de que as membranas de nanocelulose bacteriana atuaram como bons carreadores de substância hidrossolúvel o que pode vir a ser uma alternativa para a liberação de compostos com atividade biológica.

Em relação à liberação bucal, Carvalho e colaboradores (2020) desenvolveram *patches* de nanocelulose bacteriana (BNC) incorporados via difusão ao ácido hialurônico e diclofenaco para o tratamento de estomatite aftosa. Foram avaliados aspectos morfológicos, térmicos e mecânicos das BNC, além da viabilidade celular e perfil de liberação. Os resultados apresentados pelos autores reportam que os *patches* produzidos não apresentaram citotoxicidade para células dérmicas humanas (HaCaT) com viabilidade celular de praticamente 100% após 24 h. O perfil de liberação *in vitro* foi avaliado em saliva simulada apontando para um mecanismo controlado de liberação na difusão e intumescimento da membrana de BNC. Os autores encerram a discussão sugerindo a potencial aplicação dessas membranas no tratamento de estomatite aftosa.

No que se refere ao tratamento de feridas, muitos são os trabalhos relacionados com este tópico. No estudo realizado por Basu e colaboradores (2018), um hidrogel de nanofibras de celulose (NFC) provenientes da madeira foi reticulado com íons cálcio com o intuito de avaliar sua ação na liberação tópica de fármacos. Para tanto, proteínas de tamanho e ponto isoelétrico variados foram incorporadas ao hidrogel e a liberação dessas proteínas monitorada. Os resultados mostraram que as interações eletrostáticas entre as proteínas e a estrutura do hidrogel NFC carregada negativamente desempenharam um papel fundamental no processo de incorporação. O tamanho aumentado, bem como a carga positiva da proteína, facilitou o processo

de liberação mais lento e sustentado da matriz de hidrogel. Ao mesmo tempo, a proteína carregada positivamente mostrou aumentar a força do hidrogel após a incorporação. As proteínas liberadas mantiveram a estabilidade estrutural e a atividade, indicando assim que o hidrogel NFC reticulado com íons cálcio poderia funcionar como um transportador de proteínas terapêuticas sem comprometer a função da proteína.

Moritz e colaboradores (2014) estudaram a incorporação de octenidina, uma substância antisséptica, em filmes de BNC. Foram investigadas a incorporação e liberação do fármaco, características mecânicas do filme, biocompatibilidade e eficácia antimicrobiana. A liberação do fármaco baseou-se nos processos de difusão e intumescimento e caracterizadas como liberação bifásica tempo-dependente com rápida liberação nas primeiras 8 h, seguida de uma taxa de liberação mais lenta de até 96 h. Nos ensaios biológicos, o filme BNC incorporado de fármaco demonstrou alta biocompatibilidade em queratinócitos humanos e atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Ainda, em teste de armazenamento a longo prazo, o filme BNC apresentou-se estável, com as características de liberação preservadas e biologicamente ativa por um período de 6 meses. Os autores concluem o estudo afirmando que o filme BNC incorporado com octenidina se apresenta na forma pronta para uso em curativos no tratamento de feridas.

Na revisão apresenta por Carvalho e colaboradores (2019), os autores avaliam a utilização de materiais derivados da celulose bacteriana no tratamento de feridas, em sistemas de liberação de fármaco e na engenharia de tecidos. Concluem que em função da celulose bacteriana apresentar características de biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e alta capacidade de retenção de água, além de boas propriedades mecânicas, o material é um excelente candidato para aplicação em diferentes áreas. Como resultado de sua versatilidade e capacidade de customização, e a inserção de novas tecnologias com o passar do tempo, os autores afirmam que o material será mais relevante na área biomédica. Questões custo-benefício e o refinamento do material e das técnicas serão mais bem avaliados o que possibilitará o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, *patches* e *scaffolds* tanto para uso externo quanto interno adequados para o que se propõe.

Em se tratando de engenharia de tecidos, o uso das nanoceluloses tem se mostrado promissor para uso em *scaffolds* para a engenharia, reparo e regeneração de diferentes tecidos, na construção de lentes de contato e como barreiras protetoras

(BACAKOVA *et al.*, 2019). Em estudo, Bacakova e colaboradores (2019) relatam que o uso da nanocelulose na engenharia de tecidos e áreas relacionadas, como cicatrização de feridas e interação celular, tem sido desenvolvida, juntamente com aplicações da nanocelulose na indústria e tecnologia, incluindo várias biotecnologias como *biosensing* e liberação controlada de fármacos. No entanto, mais recentemente, pesquisas relacionadas com o potencial uso da nanocelulose na engenharia de tecidos neurais, cartilaginosos e de curativos para feridas na pele, também, na engenharia hepática, vascular e de tecidos ósseos se mostraram bem-sucedidos e com resultados promissores.

Resultados positivos também têm sido obtidos na utilização de nanocelulose na área de injetáveis. Kushan e Senses (2021) estudaram a termorresponsividade de compósitos formados de hidrogéis de nanocristais de celulose (NCC) e Pluronic F127 para aplicação como injetável. Pluronic F127 é um copolímero anfifílico termorresponsivo que apresenta capacidade de gelificar em temperaturas próximas ao do corpo humano. Os autores informaram que os resultados obtidos “revelaram um papel sem precedentes” da formação da rede de NCC no comportamento de gelificação e formação de micelas. Os resultados das análises reológicas sugerem que a incorporação de concentrações de baixa a moderada (1-3% em massa) de NCC, o gel formado torna-se mais macio e deformável em relação aos géis puros do copolímero. Os autores explicam que o efeito suave resulta da ruptura das micelas pelos cristais da nanocelulose. Em altas concentrações, no entanto, os nanocristais formam suas próprias redes e as micelas ficam presas na malha de NCC. Como conclusão, o gel composto é muito mais deformável e mais resistente na presença de NCC do que quando formado apenas por Pluronic F127. A adição de até 3% de NCC ao hidrogel não altera a rápida gelificação térmica do copolímero sendo, portanto, uma estratégia adequada para o desenvolvimento de sistemas inteligentes de *drug-delivery*. Os autores reforçam que em concentrações mais altas de NCC não se observam transições abruptas de viscosidade, mas os géis compósitos ficam mais viscosos conforme a temperatura aumenta, contrastando com a perda da viscosidade quando avaliado NCC puro. Dessa forma, os autores sugerem a utilização deste hidrogel como biolubrificantes e materiais reguladores de viscosidade.

Além disso, Wong e colaboradores (2021) realizaram a modificação química da superfície de nanocristais de celulose (fNCC) de modo a aproveitar o caráter de biopolímero natural, seguro e biocompatível. Desta forma, essas macromoléculas em

nanoescala podem ser covalentemente funcionalizadas e produzir nanoplataformas fibrilares solúveis em água e biocompatíveis para liberação de genes, fármacos e radionuclídeos *in vivo*. Os resultados obtidos apontaram para mais de 50% do fNCC radiomarcado e injetado intravenosamente sendo excretado na urina em até 1 h após a administração e consistentemente com o perfil farmacológico observado para outras macromoléculas. A distribuição tecidual de fNCC mostrou acúmulo nos rins, fígado e baço sugerindo sua aplicação como uma plataforma de liberação de fármacos diretamente nos rins.

Em função do grande número de pesquisas sobre a utilização das nanoceluloses como excipiente farmacêutico, a proteção patentária de inovações farmacêuticas tem estabelecido um novo panorama da atual realidade e demonstrado o alto valor agregado dos produtos. Esse é o assunto a que se refere o primeiro capítulo da presente tese e que será apresentado em detalhes.

Granulação por leito fluidizado

A granulação úmida é um processo pelo qual os pós finos são convertidos em aglomerados maiores, chamados grânulos, com a adição de um agente aglutinante (MARTINS; KIECKBUSCH, 2008; ZIYANI; FATAH, 2014). Os benefícios deste processo incluem características de fluxo e dispensação aprimoradas, aparência mais atraente do produto e melhor controle de dispersibilidade, porosidade e outras propriedades funcionais de sólidos finamente divididos (HOORNAERT *et al.*, 1998; TARDOS; KHAN; MORT, 1997).

A granulação em leito fluidizado é um dos processos de granulação úmida mais amplamente utilizados e estudados em tecnologia farmacêutica (BURGGRAEVE *et al.*, 2013; NÄRVÄNEN; ANTIKAINEN; YLIRUUSI, 2009). O processo é complexo e consiste em muitas variáveis que, ficam à disposição do operador para que possa ordená-las da melhor forma possível de modo a obter uma boa granulação (CHAUDHURY; NIZIOLEK; RAMACHANDRAN, 2013).

O principal objetivo da granulação em leito fluidizado é melhorar as propriedades de processamento do material, como por exemplo, o fluxo e a compactação (NÄRVÄNEN; ANTIKAINEN; YLIRUUSI, 2009).

A granulação em leito fluidizado envolve três processos simultâneos: (1) umidificação e nucleação; (2) consolidação e crescimento; (3) quebra e atrito e, essas

etapas são obtidas a partir da mistura de pós que se encontram em suspensão com ar quente no leito fluidizado (ROY; KHANNA; SUBBARAO, 2010). Em seguida, a solução/dispersão aglutinante é introduzida por pulverização superior ou tangencial molhando as partículas (ZIYANI; FATAH, 2014). A evaporação da superfície das partículas granulares resultantes do processo é regida pelo fluxo ar no sistema, um fator dependente da temperatura do ar de entrada, vazão e umidade (NÄRVÄNEN; ANTIKAINEN; YLIRUUSI, 2009; ROY; KHANNA; SUBBARAO, 2010).

Os compostos tradicionalmente utilizados como agentes aglutinantes incluem polímeros naturais, como gelatina, goma acácia, amido, goma guar, e açúcares como a sacarose e a glicose. Destes, apenas a goma acácia e a sacarose são eventualmente utilizadas em preparações nutraceuticas. Mais frequentemente, o uso de compostos sintéticos e semissintéticos são eleitos para aglutinar as partículas (DÜRIG; KARAN, 2019).

Dentre os agentes aglutinantes mais comumente utilizados estão a povidona (PVP) e copovidona (PVA-PVP), amidos modificados, como amido parcialmente pré-gelatinizado e vários derivados de celulose como hidroxipropilcelulose (HPC), metilcelulose (MC) e hipromelose (HPMC) (DÜRIG, 2013; DÜRIG; KARAN, 2019).

Uma vez que estudos que reportem a utilização de nanocelulose/nanofibras de celulose como aglutinante em processo de granulação por leito fluidizado não foram encontrados, torna-se interessante avaliar a capacidade aglutinante das NFC nesse processo. A avaliação da capacidade aglutinante das nanofibras de celulose foi tema do terceiro capítulo da presente tese e será apresentado em detalhes na sequência.

Capítulo I

Análise do panorama mundial das inovações contendo nanocelulose como um produto de alto valor agregado no desenvolvimento de produtos farmacêuticos

Nanocellulose, The Green Biopolymer Trending in Pharmaceuticals: A Patent Review

Keth Ribeiro Garcia^a, Ruy Carlos Ruver Beck^a, Rosmary Nichele Brandalise^b, Venina dos Santos^b, Letícia Scherer Koester^{a1}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.

¹ Corresponding author:

Dr. Letícia S. Koester | leticia.koester@ufrgs.br

Faculdade de Farmácia - UFRGS

Av. Ipiranga, 2752/607 | 90610-000 | Porto Alegre | RS | Brazil

Abstract

The use of nanocellulose in pharmaceuticals is a trend that has been emerging in the last years. Its inherent good mechanical properties, compared to different materials, as high tensile strength and elastic modulus, high porosity, as well as renewability and biodegradability are driving nanocellulose's industrial use and innovations protection. In this sense, this study aims to conduct a search of patents from 2011 to 2023 involving applications of nanocellulose in pharmaceuticals. A patent search was carried out employing three different patent databases: WIPO; Espacenet; and LENS.ORG. Patents were separated into two main groups: (i) nanocellulose (NC) comprising all its variations and (ii) bacterial nanocellulose (BNC) and classified into five major areas according to their application. It was retrieved a total of 215 documents where 179 referred to NC and 36 to BNC groups. The NC group depicted 49.7%, 15.6%, 16.2%, 8.9% and 9.5% of patents as belonging to design and manufacturing, cell culture systems, drug delivery, wound healing and tissue engineering clusters, respectively. BNC group classified 44.5% of patents as design and manufacturing and 30.6% of drug delivery cluster, 5.6% and 19.4% of patents as wound healing and tissue engineering, respectively. In conclusion, this work had compiled and classified patents addressing exclusively nanocellulose in pharmaceuticals providing its current status and trending advance considering environmental responsibility and sustainability on materials and products development for a greener upcoming future.

Keywords: Nanocellulose; Nanofibrillar cellulose; Drug delivery; Pharmaceuticals; Excipients; Technological indicators.

Introduction

Cellulose is one of the most abundant and renewable biomaterial resources on earth, with an estimated production of 7.5×10^{10} tons per year [1] being naturally synthesized in plants and produced by some bacteria [2].

Its use from biomass wastes is inserted in the concept of circular economy with regard to the 4 R's model of how to "reuse", "recycle" and best "recover" various waste biomass, in addition to establishing waste "reduction" [3].

Cellulosic derivatives such as nanocellulose have been standing out and generating continuous interest because it is a versatile material with high added value, subject to modifications in the chemical structure and/or addition of functional groups [4]. Therefore, nanocellulose-based materials become an advanced plant-derived material that allows its application in distinguish areas such as fiber-reinforced composites, electronic templates, biosensors, viscosity modifiers, food packing, and drug delivery [5].

Currently, most marketed nanocellulose is proceeding from high-quality fiber material, such as wood pulp or cotton [6]. However, other plant-based materials can be

important sources of nanocellulose, such as coconut fiber [7], cotton stalk [8], sugarcane bagasse [9], wheat straw [10], and tobacco stalk [11]. In addition, agro-industrial residues have demonstrated their feasibility and suitability for commercial purposes [3].

Despite the growing interest in nanocellulose, a mapping of patents referring to the pharmaceutical area has not yet been carried out. Academic reviews published so far addressed the possibilities of using nanocelluloses for drug delivery in transdermal devices [12–15], as disintegrants or super disintegrants [16], for wound healing [17–19], for injectables [20–22]. Furthermore, nanocellulose has also demonstrated its effectiveness in tissue engineering [19,23,24]. The present review explores for the first time the assessment of existing patents concerning nanocellulose applied to pharmaceuticals. Nanocellulose per se is a novel subject and several knowledge areas from engineering to medical addressed important studies. But it was necessary to conduct data acquisition on patents in order to understand how far the studies advanced to a valuable product/process with monetary potential and a greener outcome. Indeed, academic research may have different outcomes depending on the level of innovation and the result may generate a product with commercial interest or requires further studies. Thus, some patents are a result of 10+ years of studies.

Innovation in pharmaceuticals is the backbone of the pharmaceutical industry and must be duly protected by patenting [25]. Ultimately, patents are frequently used as an indicator of the rate of invention, which is a crucial precursor to innovation [26]. A patent is an intellectual property right issued by authorized bodies to inventors to make use of and exploit their inventions for a limited period (usually 20 years) [27].

Patents filling related to nanocellulose in pharmaceuticals have been gradually growing and the products have demonstrated their participation in the market as important high added-value alternatives to traditional products. Therefore, considering the importance and originality of the subject, this study aimed to conduct a patent survey with a 12-year timeframe covering the applications of nanocellulose in the development of pharmaceuticals.

Background

Cellulose and its different sources

Cellulose was first discovered and isolated from plants in 1838 by the French chemist Anselm Payen [28]. Almost a century later, around 1928, the Nobel prize winner Norman Haworth studied the composition of carbohydrates and mapped the composition and structure of various forms of sugar, starch, and cellulose, showing that the covalent bond occurs within the molecule and between the glucose units [29]. Two years later, the scientist Hermann Staudinger reported that the cellulose structure was constituted of glucose units tightly bound together forming long molecular chains covalently linked. This discovery was the origin of polymer science [30,31].

Ever since, cellulose is considered the renewable biopolymer of the most importance on the planet and, for the manufacturing industry it is the main source of sustainable materials [32].

Cellulose is indeed characterized as a high molecular weight homopolymer of β -1,4-linked anhydro-D-glucose units [2]. These cellulose molecules are packed in the parallel direction of semi-crystalline microfibrils that are held together via inter- and intramolecular hydrogen bonds and by van der Waals forces [5,33].

These microfibrils contain crystalline and amorphous regions. Amorphous regions are present on the surface and are found along the length of the microfibrils [34]. The size of a microfibril varies according to the origin source, for example, the diameter of microfibrils from wood is usually around 4 nm with a length of a few micrometers [33,35].

Nanocellulose

Nanocellulose was originally introduced by Turbak et al. [36] and Herrick et al. [37]. The researchers first named nanocellulose as microfibrillated cellulose (MFC) and demonstrated that a gel-like material was produced by treating wood-based cellulose fiber suspensions with a high-pressure homogenizer. In the mid-1980s, a Sweden company, STFI AB, now Innventia AB, also started to work with MFC. The purpose was to use the nanomaterial in paper applications [38].

Throughout time, many companies became active in the field. Microfibrillated cellulose history in innovation started with three patents in 1983 - US 4341807 [39]; US 4452721

[40]; US 4481076 [41] and two papers [36,37] published by ITT Rayonnier group. These studies grew up to 825 by 2007 and today it comprises more than 5,000 patents about MFC around the world [42].

In the current days, nanocellulose is defined as a cellulosic material that has at least one of its dimensions (diameter, length, or width) within the nanometer scale [2,43–46]. In general, it is a term used to refer to cellulose crystals or fibers having lengths in few micrometers and diameters between 1-100 nm, which can be extracted from natural cellulose fibers [47].

It is considered a pseudoplastic material and exhibits the property of forming gels or fluids that are viscous under normal conditions, however, it flows over time when shaken, agitated, or otherwise stressed. When the shearing forces are removed, the gel regains much of its original state [48].

The field of nanocelluloses is subdivided into three categories: bacterial nanocellulose, nanocrystalline cellulose, and nanofibrillated cellulose [2]. Each type of nanocellulose refers to its production method as summarized in Table 1.

Table 1. The three types of nanocellulose

<i>Type of nanocellulose</i>	<i>Related terms</i>	<i>Typical sources</i>	<i>Formation</i>	<i>Dimensions</i>	<i>Reference</i>
Bacterial nanocellulose (BNC)	Bacterial cellulose; Microbial cellulose; Biocellulose	Low-molecular sugars and alcohols	Synthesized by several species of Acetobacteraceae	20-100 nm	Klemm et al., 2018; Lin & Dufresne, 2014
Nanocrystalline cellulose (NCC)	Cellulose nanocrystal (CNC); Nanocellulose whisker (CNW); Rodlike cellulose microcrystals	Wood, cotton, hemp, flax, wheat straw, mulberry bark, ramie, tunicin, and cellulose from algae and bacteria	Acid hydrolysis to remove amorphous cellulose	D: 5–70 nm L: 100–250 nm	Yu et al., 2021a
Nanofibrillated cellulose (NFC)	Microfibrillated cellulose (MFC); Cellulose nanofibers (CNF); Nanofibrils; Microfibrils	Wood, sugar beets, potatoes, hemp, and flax	Delamination of wood pulp by high-pressure homogenization; microfluidization or grinding and/or following chemical or enzymatic treatments	D: 5–60 nm L: several μm	Lavoine et al., 2012

D: diameter; L: length

Table 1 shows the three types of nanocellulose that are obtained depending on which extraction method will be applied. NFC obtaining needs a physical method as micronizer grinding, microfluidization or high-pressure homogenization to get the delaminated nanofibers. NCC obtaining requires acid hydrolysis to remove amorphous cellulose. The obtaining nanocrystals have needle shape and, BNC compared with plant nanocellulose has higher purity due to its obtaining method that is get by Gram-negative strains of bacteria such as *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Rhizobium*, *Botulinum*, *Pseudomonas*, etc.

Owing to different obtention methods and its outstanding features such as biocompatibility, mechanical strength, and tunable surface properties, nanocellulose has become a high-value natural source for groundbreaking applications in distinct areas [3,46,50].

All over the world, innovations on nanocellulose figure among the subject matter of patents. WIPO database presents 14,637 search results of patents related to “microfibrillated cellulose”, the most usual term, since the year 1984. As depicted in Figure 1a, the ranking of the top 10 countries with the higher number of patents is presented. Included in this list are 2,999 patents filed through the Patent Cooperation Treaty (PCT), which allows the application for patent protection of an invention, simultaneously, in several countries, through a single deposit called “International Patent Deposit” [27]. Moreover, 1,942 patents filed with the European office are considered in the rank. Such interest may be explained due to cellulose versatility. The biopolymer offers the advantage of being tailored to achieve the desired features to apply in several fields [1].

Another possible explanation resides in the fact that in many countries, wood has always been an important part of their livelihood. The main goal of these countries was to make full use of the versatility of this material without causing damage to the environment and the ecosystem. Consequently, investments in expertise and new technologies were necessary. New ways of using wood emerged and, with it, the need to establish innovative strategies to prospect new commercial opportunities [51]. Thus, the incorporation of nanocellulose into products and processes boosts its application in new industrial sectors, including biomedical, environmental, energy, and pharmaceutical [52,53]. In addition, its multi functionalities have been explored by consolidated companies such as Innventia (Sweden), Daicel (Japan), UPM Kymmene

its intrinsic relationship concerning the pharmaceutical approach are depicted in Figure 1d.

Regarding pharmaceutical application, the first study displayed by the Scopus database was “Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibers by steam explosion” [55], in which the authors intended nanocellulose obtaining for biomedical and biotechnological applications, such as wound dressings, drug delivery, and tissue engineering.

Sequentially, in 2011, the Finnish research group demonstrated the use of nanocellulose as filler for tablets [56] and as a matrix for controlled delivery of drugs [57,58]. Since then, the growing number of studies considering nanocellulose for tablets manufacture had arisen and been studied as excipient performing different functions. For instance, nanocellulose was applied as disintegrant [59,60] and superdisintegrant [16]; as a matrix for controlled delivery of drugs [61,62]; and also, as an inclusion complex incorporated with nanocellulose as a delivery system [63–65]. Furthermore, transdermal delivery approach [12–15,66–68] has been mentioned by obtaining a nanocellulose hydrogel.

Hydrogel is the usual attained form of nanocellulose, and its purposes may range from wound healing [17,18,69–71] to design in developing injectables [20–22]. Moreover, the tissue engineering field has developed promising research regarding nanocellulose [19,23,24,72].

Innovations Regarding Pharmaceuticals

The development and industrial application of innovative advanced materials are imperative for technological and economic progress [73]. In accordance with the Global Nanocellulose Fiber Market Report [74], in 2019 nanocellulose market size was \$291.53 million and, by 2027 it is expected to achieve \$1,053.09 million corresponding to a compound annual growth rate (CAGR) of 19.9% during the forecast period (Figure 2). Nonetheless, there are some challenges to overcome in order to reach economic growth. In fact, the biggest concern lies in standardized production with attention to techniques evolution and environment care besides cost control, which may vary depending on its application and production mode [3].

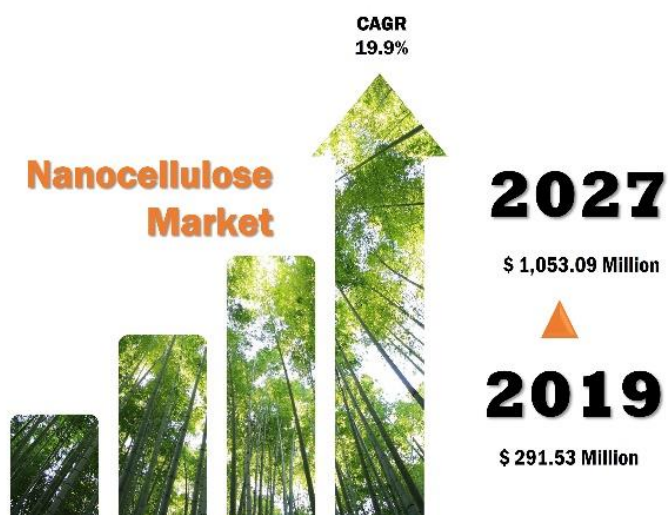


Figure 2. Nanocellulose global market forecast for the period comprising 2019-2027. Data from [74].

Few companies monopolize the successful commercialization of nanocellulose and its high value-added products. In 2018, a Swedish company named Cellink AB has developed and patented jointly with UPM-Kymmene the first bioink designed to print human tissue models for 3D-bioprinting systems. The bioink is composed of alginate and hydrated cellulose nanofibrils, that act as a regulator of rheologic behavior. The nanofibrillated cellulose dispersion had extremely high viscosity at zero shear and viscosity of about 10 Pa·s at 100 s⁻¹. That is what contributed to good printability. Chemical modification of cellulose pulp prior to mechanical disintegration gives rise to optically transparent hydrogels giving it a semi-translucent aspect and is thus compatible with many advanced imaging techniques. The 5 mL syringe of sterile NFC thickener is commercialized at the price of \$139.00 [75,76].

Another successful study that evolved from academia to global commercialization is the product GrowDex® launched in 2014 by UPM-Kymmene, a Finnish company that is a reference in nanofibrillated cellulose studies. In fact, the product was born as an interdisciplinary effort made by UPM and the researchers from the University of Helsinki, in which the research was carried out for ten years prior to its entrance in the market. The product is a ready-to-use hydrogel extracted from birch pulp and presents the benefit of easily replacing animal-derived matrices without lot-to-lot variations. It mimics the extracellular matrix for 3D cell culture applications, supports cell growth and differentiation consistently, and is worldwide commercialized at the price of €120.00 for 5 mL [77].

A recent evolution of innovation involving nanocellulose is also presented by UPM-Kymmene, the GrowInk®. It is a bioink products family developed for 3D printing launched in 2020. The bioink is composed of two main components: nanofibrillar cellulose and water, providing a fully defined matrix which can be mixed with cells and customized with additional molecules depending on the cell application. The version containing pure nanofibrillated cellulose is commercialized at €135.00 for 5 mL [78].

These novelties exploit the nanocellulose structural similarity to extracellular matrices (ECM) in terms of both porosity and interconnected framework within the structural hydrogel and the fibrillar arrangement of cellulose that somehow is analogous to collagen and fibronectin in native ECM, not to mention the biocompatibility with cellular activities [79]. Directed efforts to ensure that research evolves into products with intellectual property signalize the high added-value of the nanofibrillated cellulose when compared with its raw material [3].

There is also an increasing interest in cosmetics development by using microfibrillated cellulose (MFC) as thickening agent as an alternative to synthetic and imported polymers. In Brazil, the idea came by the time of SARS-COV2 global pandemic when thickening agents were out of commercialization for alcohol gel production and as consequence, for cosmetics. So that, a partnership between Klabin S.A. and Kind to You Cosmetics have been using MFC multifunctionality to develop cosmetics with the premise of offering a creamier texture and more intense skin hydration. The partnership uses microfibrillated cellulose derived from paper manufacture (US 2021/0197540 A1) [80] and promotes a more sustainable product.

3. Patent survey

In order to assess the current status of innovation regarding nanocellulose in pharmaceutical applications, a patent search was carried out employing three patent databases: WIPO (www.wipo.int); Espacenet (worldwide.espacenet.com); and LENS.ORG (www.lens.org). The search consisted of a patent survey sort by priority date in a timeframe of 12 years (2011 until August 2023). A patent query was performed by applying the terms “nanofibrillar cellulose”, since products are already being commercialized using this terminology, “nanofibrillated cellulose” and its synonyms “microfibrillated cellulose”, “cellulose nanofibers”, “cellulose nanocrystals”, “nanocrystalline cellulose”, and the classical and general term “nanocellulose” that

comprises a plethora of applications, and “bacterial nanocellulose”, which, in this search was considered a separated niche due to its non-plant-based source. Terms were combined with words like “pharmaceutical”, “excipient”, and “drug delivery” with Boolean operator “AND”, and with truncation symbol (*) in title or abstract.

4. Results

There were found a total of 1,952 patents comprising the search terms. In order to facilitate the results presentation, the documents were divided into two main groups: 1) NC referring to the sum of results obtained with the interchangeable terms “nanocellulose” and/or “nanofibrillar cellulose”, and/or “nanofibrillated cellulose”, and/or “microfibrillated cellulose”, and/or “cellulose nanofibers”, and/or “cellulose nanocrystalline”, and/or “nanocrystalline cellulose”, and (2) BNC referring to bacterial nanocellulose.

Excluding the duplicates and selecting only the documents referring to the use of the nanomaterial considering extraction, development, and application into the pharmaceutical field, 179 results regarding the terms compiled in NC group were retrieved over the cited lapse time, which represents 9.2% of the comprising terms. The remaining 1.8% (n= 36) corresponded to the term “bacterial nanocellulose (BNC)” (Figure 3).

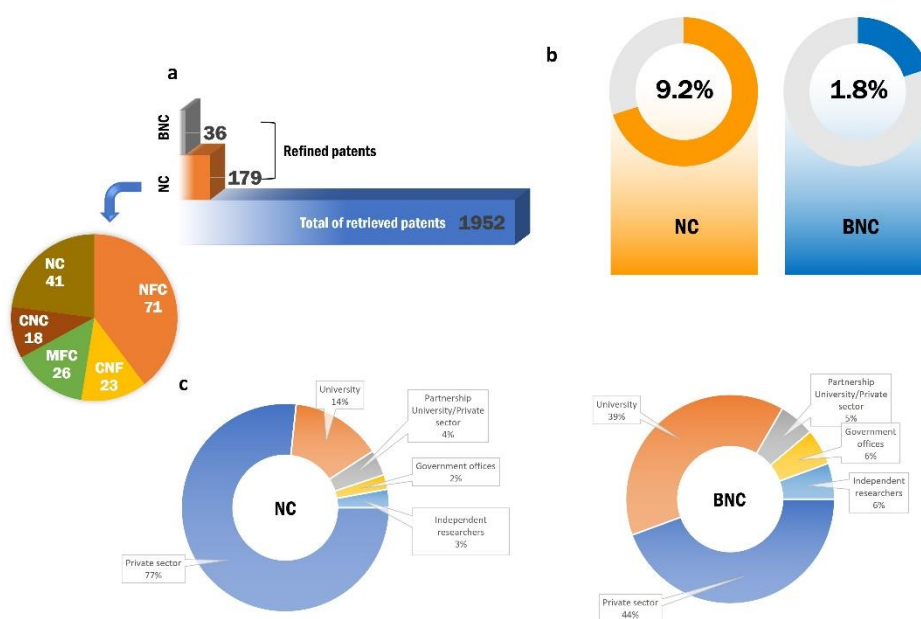


Figure 3. Results of search terms (a) Total number of patents documents concerning the group terms “nanocellulose” (NC), and “bacterial nanocellulose” (BNC). NC represent the patents in pharmaceutical field and BNC the patents in the pharmaceutical field excluding duplicates. (b) Representative percentual of refined patent documents regarding the search terms “nanofibrillar cellulose”, “nanofibrillated cellulose”, “microfibrillated cellulose”, “cellulose nanofibers”, “cellulose nanocrystalline”, “nanocrystalline cellulose”, “nanocellulose”, “bacterial nanocellulose”, “pharmaceutical”, “excipient”, and “drug delivery” combined with Boolean operator and truncation symbol. (c) Donut chart representing the percentage of patents referring to the search terms aforementioned.

To better visualize the types of patent applicants involving nanocellulose in pharmaceuticals, the holders were depicted in Figure 3c. From the evaluated documents, 76.7% were from the private sector, mainly headed by companies that have a cellulose working history. Universities were responsible for 14.2% of granted patents and their interests vary from design and manufacturing to drug delivery. The research originated from the partnership between the private sector and university resulted in 4% of patents and for government offices showed 2.3%, and 2.8% referred to independent researchers. Furthermore, the nanocellulose market growth also reflects the presented figures for bacterial nanocellulose (BNC) whose patent filing has been arising mostly because of the academic contribution, responsible for 38.9% of the documents. The private sector still gets the bigger part comprising 44.4% of innovations. The other sectors comprise a market share of 5.5% each.

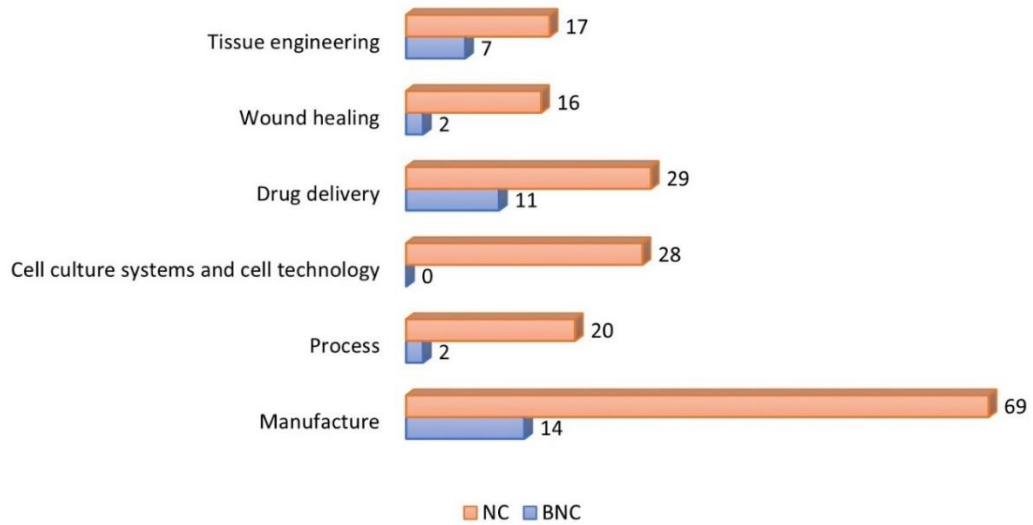
In view of the different application purposes and the multiple ways of manufacturing, intending its use for pharmaceuticals, the present manuscript selected and divided the patents (Figure 4a) into five major clusters: (1) design and manufacturing, sub-divided into manufacture, and process for nanocellulose conception; (2) cell culture systems and cell technology; (3) drug delivery, classified according to release site and/or system; (4) wound healing; and (5) tissue engineering. The set of patents published in the last 12 years regarding the perspective of nanocellulose inside the pharmaceutical field is depicted in Figure 4.

The countries of the applicants and the corresponding percentage of patents filed for each term, and BNC – are shown in Figure 4b.

The complete list of patents number is shown in the supplemental material (Tables S1 and S2). It is important to highlight that the total number of patents described herein in the division-by-cluster, comprises all patents jurisdictions and only a document of each applicant was accounted for.

Regarding NC group, the applicant country that invests the most in innovations is Finland, followed by Sweden and United States. Those are the home countries of traditional wood and cellulose working enterprises that have extensive knowledge in cellulose and its derivatives. To date, it seems to be a trend the insertion of a biomedical sector inside those companies to research and develop plant-based bioproducts. On the other hand, companies from China were the ones who patented the most for BNC. The country is historically a greater generator of innovations and stands out in different achievements. Despite its great territory, the country does not have tradition in wood manufacture which appears as a barrier to the research of nanocellulose.

a



b

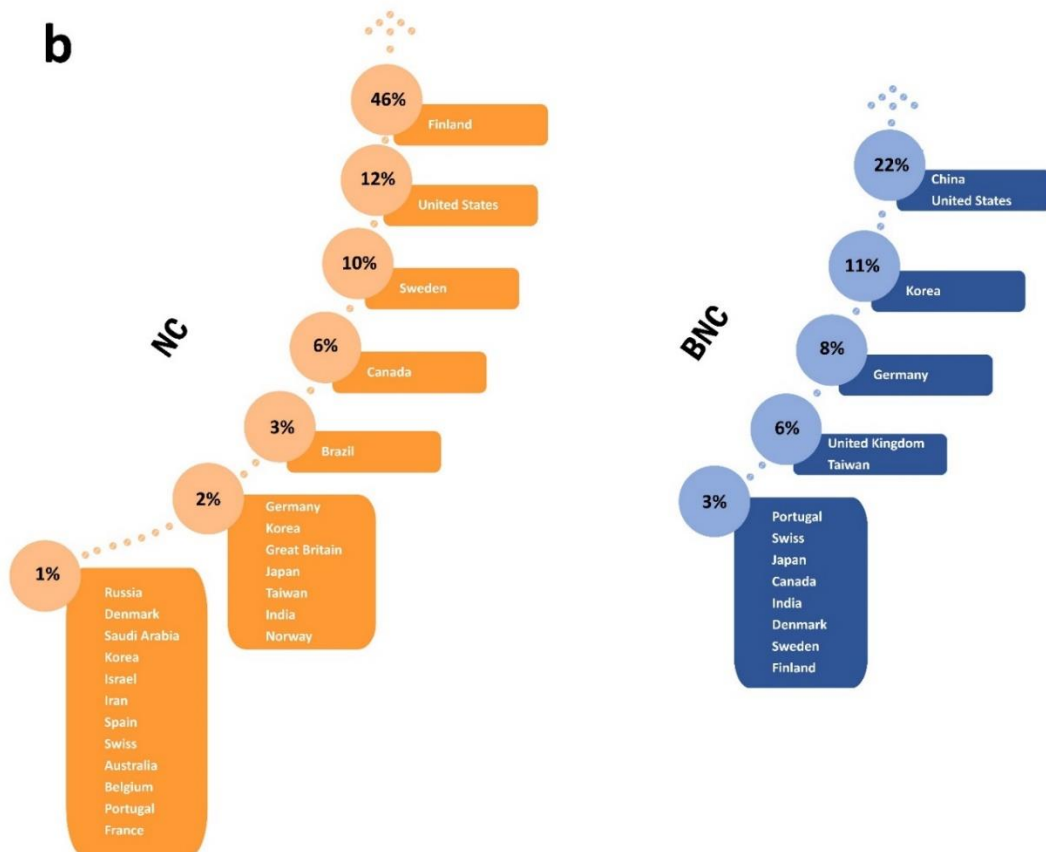


Figure 4. Patents divided-by-clusters. (a) Relative number of patents classified in each cluster. (b) Representative percentage of applicant countries of patents regarding the joint of terms “nano-cellulose” (NC), “nanofibrillar cellulose”, and/or “nanofibrillated cellulose”, and/or “microfibrillated cellulose”, and/or “cellulose nanofibers”, and/or “cellulose nanocrystals”, and/or “nano-crystalline cellulose”, and “bacterial nanocellulose” (BNC).

4.1 Nanocellulose patents

Nanocellulose patents were divided into 5 clusters which is depicted in Figure 5.

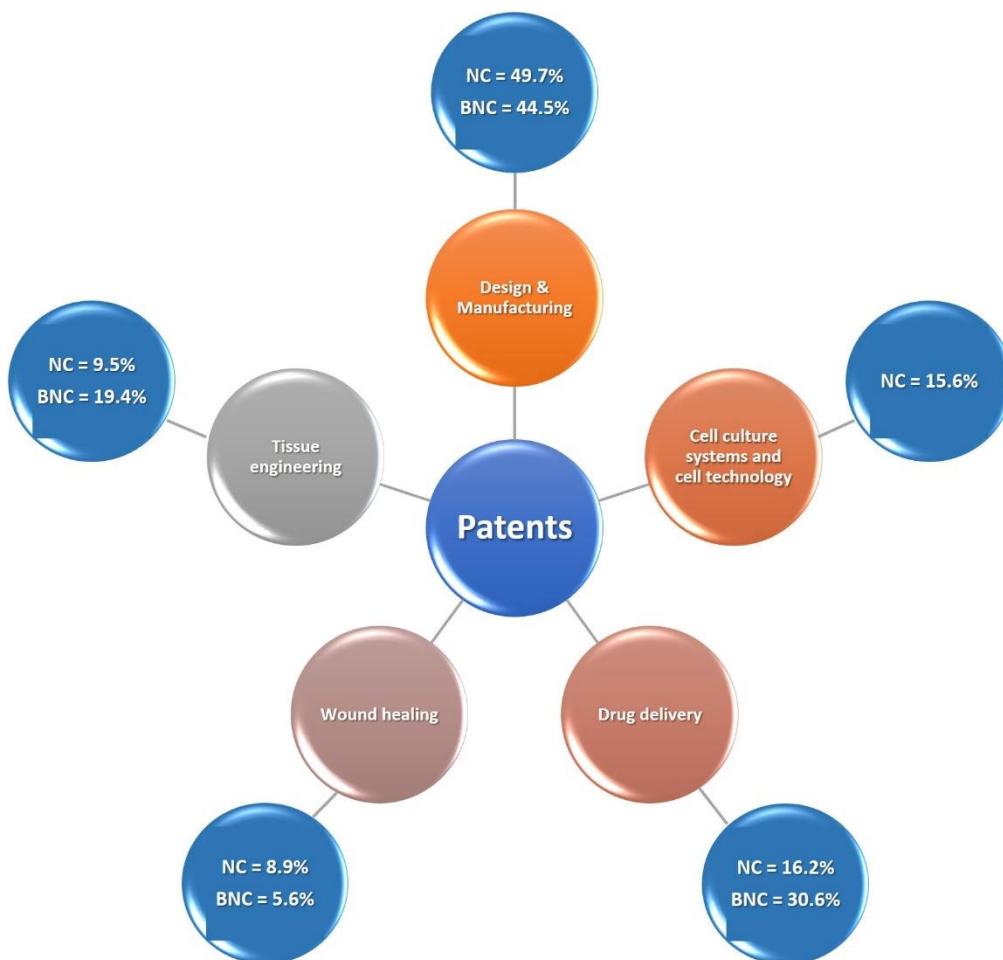


Figure 5. Nanocellulose patents classified into clusters.

4.1.1 Design & Manufacturing cluster

The conception of a pharmaceutical product begins with designing the composition and manufacturing the raw material. The following discussion regards data depicted in Figure 4a. In the pharmaceutical field, every single protected innovation matters, therefore, herein, we are going to present some interesting patents from each cluster.

The major cluster that discloses about procedures and treatments in nanocellulose was “Design & Manufacturing”, presenting 69 patents. The U.S. Patent N° 2016/0184438 A1 [81], for example, provides a process for producing pharmaceuticals excipients from lignocellulosic biomass. Lignocellulosic biomass

usually regards agro-industrial residues and other plant-based high value-added materials [82,83]. Nevertheless, the main concern of nanocellulose extraction regards obtaining a multi-functional product and, at the same time, preserving the environment during the process [84]. Independently of the source, wood-based or plant-based, most lignocellulosic framework contains 30-50% of cellulose, 15-35% of hemicellulose, and 10-20% of lignin [85] which are attractive features to bulk raw materials in distinguishing fields.

In the aforementioned patent, the lignocellulosic biomass was applied to produce what is called crystalline cellulose, but it may also refer to nanocellulose and its different terminology, as a pharmaceutical excipient that may function as an antiadherent, a binder, a coating, or a disintegrant, a lubricant, a glidant, a sorbent, a preservative, or other component present in solid dosage forms.

Still, regarding pharmaceutical composition, the U.S. Patent N° 2021/0077403 A1 [86] refers to a “Method for preparing pharmaceutical composition and pharmaceutical composition” in which provides the use of nanostructured cellulose for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. The pharmaceutical compound is suitable for different types of administration, especially when it is desired to have a composition in a form of a hydrogel.

When the term “hydrogel” appeared, a great sequence of patents shows the high value of nanofibrillar cellulose. Hydrogel is the most usual form of obtaining a product after the grinding or homogenization process of nanofibrillar cellulose [87]. It is cited in the majority of patents as a versatile material due to the presence of a network of interconnected pores allowing the retention of a large number of compounds ranging from drugs to cosmetics for skin treatment. For example, WO 2016/193548 A1 [88] relates to a process for producing sterile nanofibrillar cellulose hydrogel for use in various applications. WO 2018/108341 A1 [89] describes a method for freeze-drying cells in a nanofibrillar cellulose hydrogel; WO 2018/109281 A1 [90] refers to a method for drying nanofibrillar cellulose hydrogel; and WO 2016/102766 A1 [91] discloses about the treatment of nanofibrillar cellulose hydrogel at elevated temperature. Although the referred documents provide the use of hydrogel, the cited patents were classified accordingly as the suitable cluster regarding the field of the invention.

Following the cluster-classification, the “Process” subdivision of “Design & Manufacturing” accounted for 20 patents regarding some kind of nanocellulose

structure functionalization. In this sense, WO 2012/152997 A1 [92] discloses a coating derived from spray-dried nanocellulose particles originating superhydrophobic surfaces enabling water repellence for membranes or films production. The hydrophobisation may occur during and/or after the addition of the nanocellulose particles with the use of a modifier compound.

A functionalization process was also invented and documented by US 2016/0130368 A1 [93] regarding the “Synthesis of nanostructured carboxycelluloses from non-wood cellulose”. The invention discloses about an improved process for the preparation of oxidized/carboxy nanostructured cellulose derived from sugarcane bagasse or cotton cellulose. The patent provides a pharmaceutical composition for microbial treatments by using 6-carboxy cellulose, and 2,3,6-tricarboxycellulose alone or in association with pharmaceutically acceptable carriers or excipients.

4.1.2 Cell culture systems and cell technology cluster

The use of nanocellulose for “Cell culture systems and cell technology” was also reported as protected invention. This cluster established 28 patents concerning the topic. An example of this application is provided by the invention EP 3750982 A1 [94] that discloses about a cell culture plate by using nanofibrillar cellulose as a barrier dividing the cell culture on the plate into at least two compartments. The invention reports the ideal barriers properties provided by nanofibrillar cellulose preventing cells from passing through the barrier and allowing small molecules or extracellular components to pass.

Another example is provided by US 2021/0214510 A1 [95], in which a nanofibrillar cellulose hydrogel is used as a three-dimensional matrix for 3D cell culture. The matrix allows cell growth without the interference of growth factors or other components that are usually present in ordinary matrices and affect adherence, differentiation, or even cells growth.

One recently protected invention, US 2020/0164103 A1 [75], refers to the use of a water dispersion of cellulose nanofibrils as bioink to be used in 3D bioprinting technology. This invention is suitable for 3D cell culturing and growing living tissues and organs. The applicants claim that this bioink is cytocompatible and, therefore can be combined with living cells. As mentioned before, this invention has already been commercialized as Cellink™ Nanofibrillated Cellulose granting to the nanomaterial a market share.

4.1.3 Drug delivery cluster

Following the cluster-division, “Drug delivery” was linked to 29 patents. The inventions ranged from oral to transdermal delivery. Some of those inventions are summarized as follows. WO 2013/009253 A1 [96] reports the development of films of nanocellulose for the controlled release of drugs. Films for controlled release are made of an insoluble film-forming polymer and a pore-forming agent. In such a case, nanocellulose provides the water-insoluble film-forming feature, and another cellulose derivative as HPMC is responsible for the pore formation. This strategy enables to modify the permeability of the film and, therefore, the release control. The film may be used as a coating for solid dosage forms.

WO 2012/056111 A2 [97], for instance, discloses about cellulose nanofibers in a hydrogel matrix designed for drug delivery. The invention may be suitable for intramuscular, intraocular, subcutaneous, or topical preparations. In addition, WO 2013/072563 A1 [98], relates to the invention of a drug delivery matrix for sustained delivery of bioactive agents. The matrix comprises nanofibrillated cellulose and four different obtaining methods are described. Method A comprises the blending of bioactive agents with aqueous suspension or dispersion of nanofibrillated cellulose (NFC); Method B refers to dissolving the bioactive agents in a solvent or buffer solution to obtain a solution that will be blended with the aqueous suspension or dispersion of NFC, and then spray-dried; Method C, is about the steps mentioned in Method B with the additional step of elements extraction with organic agent miscible with water, and then the drying step; and finally, the Method D relates to the introduction of an aqueous suspension or dispersion of NFC, extract some elements according to the procedure described in Method C and comprising bioactive agents for further drying process. Altogether, the methods described are intended to the development of intrauterine devices or subcutaneous implants.

Within the advance of health care, the pharmaceutical formulations also boosted research and product development intended for injection. Furthermore, the invention US 2021/0085602 A1 [99] concerns an injectable and implantable pharmaceutical formulation capable of providing sustained release of one or more active pharmaceutical ingredients. Therefore, nanofibrillated cellulose has demonstrated to be used as matrix material providing modified-release. The matrix comprises nanofibrillar cellulose hydrogel in a fibrillar content ranging from 1-8% (w/w) and administered by a syringe. Due to its good stability and bioavailability and sustained

release properties, nano-fibrillar cellulose demonstrated to be a suitable material for subcutaneous, intradermal, or intramuscular administration.

A buccal delivery was described in WO 2018/152627 A1 [100] which discloses about an artificial saliva gel to treat or ameliorate xerostomia. The gel can comprise a synthetic polymer or a combination of synthetic polymers. In addition, a second polymer (such as a natural polymer) for example nanocrystalline cellulose (NCC) can be added or replace the carbomer accordingly to the desired function such as thickening, gelling, or viscosity enhancer.

Some interesting purposes were also found regarding topical application such as WO 2020/031186 A1 [101], which refers to topical formulations comprising cellulose-based materials such as cellulose nanocrystals. The document cites that most allergens have a binding site for cellulose and by applying a nanocellulose material to a skin region to be exposed to the allergen, the competitive binding of the nanocellulose material to expansin-like proteins is exploited to block or reduce the immune response to the allergens. Furthermore, US 2020/0188538 A1 [102] describes an ultrasound gel for use with internal and oral ultrasound imaging and/or therapy. The gel is also formed using NCC due to its capacity to crosslink and easily disperse in water. In this case, NCC is used as an additional gelling agent in carbomer based ultrasounds gels which can increase the viscosity of the resulting gel, while maintaining appropriate acoustic properties of the gel, besides the high viscosity maintenance undergoing gamma radiation sterilization.

Still referring to dermal application, US 2016/0186377 A1 [103] discloses about a hydrated, nanocellulose nonwoven sheet and method for manufacturing the nanocellulose sheet having dermatologically active ingredients. The sheet is claimed to be a device and a method which is capable of transpiring or evaporating water through a dermatological mask, thereby causing a dynamic fluid system between the skin beneath the sheet and the sheet itself. Additionally, a method which is capable of incorporating particulates and solution-based active ingredients at many different phases of the method, allowing for evenly dispersed ingredients.

4.1.4 Wound healing cluster

On the other hand, "Wound healing" ranked 16 patents regarding the subject. In this sense, U.S. Patent N° 2021/0030919 A1 [104] refers to a medical hydrogel comprising nanofibrillar cellulose for treating wounds inducing its vascularization. The

invention reported that nanofibrillar hydrogel can induce vascularization in deep tissues such as dermis or adipose tissue, speeding up the wound healing process. The product presents the advantage of being applied and easily removed without harm or injuries, besides protecting the wound from infections and providing a moist environment, which is ideal for the healing process.

Moreover, WO 2018/130390 A1 [105] discloses about an invention based on the loading of a hydrophilic natural three-dimensional network made of cellulose nanofibers with lipid-based dermal carrier systems. The invention assures that lipophilic active substances may be incorporated into the nanofibrillar hydrogel and release its content into wounds, burns, and foot ulcers. Its application is not restricted to wound treatment as it may be widened to the cosmetics field.

Formulations for wound healing were described by EP 3402462 B1 [106]. The invention refers to the development and use of nanocrystalline cellulose from biological plant material (*Syzygium cumini*) impregnated with nanosilver as antibacterial wound care products.

Furthermore, nanocellulose had still been studied as a hemostatic material. The U.S. Patent N° 2016/0325011 A1 [107] describes an invention of a material in the form of a liquid or a spray mist to a bleeding wound surface that exhibits an excellent solidifying action on all of the plasma, serum, and blood, and achieves a hemostatic effect quickly and easily. An aqueous dispersion comprising insoluble polysaccharides having an average fiber diameter of 0.001 to 100 μm and a ratio (L/D) of an average fiber length (L) to an average fiber diameter (D) of 5 to 500. These measurement parameters permit to conclude that the polysaccharide in question belongs to the nanocellulose field. The document reported that insoluble polysaccharides are selected from the group consisting of cellulose fibers and chitin fibers, reinforcing the thesis.

4.1.5 Tissue engineering cluster

The last cluster classified in the present work is “Tissue engineering” being responsible for 17 patents in the interested timeframe. The U.S. Patent N° 11103617 B1 [108] refers to producing and obtaining of a scaffold of hollow fibers comprising a mixture of polylactic acid (PLA) and polybutylene succinate (PBS) within cellulose nanofibers (CNF). The invention produces scaffolds for tissue engineering by using the electrospinning process, a technique capable to originate products that mimic native

extracellular matrix. The patent comprises a reinforced CNF with PLA/PBS scaffold structure suitable for tissue regeneration and vascular tissue engineering.

Another example intended for tissue engineering aspects is US 2019/0015550 A1 [109]. The invention refers to the development of a method for preparing injectable thermosensitive cellulose nanofibers hydrogel with functionalization of its molecular structure. The product showed excellent cell proliferation and bone regeneration. Additionally, the hydrogel exhibited an interconnected structure enabling it to rapidly gelatinize in vivo based on thermosensitivity of undergoing sol-gel transition temperature. This process facilitated bone regeneration upon implantation in vivo.

Three-dimensional printing of human tissues is also a protected invention regarding the use of nanocellulose. WO 2019/122351 A1 [110] refers to the use of extra-cellular matrix material combined with biocompatible bioink to bioprint human tissues and scaffolds. The invention is supported by the possibility of using human tissue-specific extracellular matrix associated with a polysaccharide hydrogel-based, in this case, nanocellulose-based bioink for 3D bioprinting. The combination of nanocellulose-based biomaterial together with human extracellular matrix materials showed improvement in cell function, viability and engraftment compared to the nanocellulose only printed tissues.

4.2 Bacterial nanocellulose patents

Finally, there is an interesting number of patents concerning bacterial nanocellulose (BNC), which as mentioned before, was considered in this paper as a class apart. In Figure 3c it is possible to observe the growing number of patents focused on the subject. Moreover, the application of such nanomaterial in pharmaceutical research has demonstrated technological improvement and an alternative to well-established materials. The results of the refined patent search are exemplified as follows.

4.2.1 Design & Manufacturing cluster

The “Design and manufacturing” cluster was the first one with more patents regarding BNC application into pharmaceuticals, presenting a total of 14 documents. Bacterial nanocellulose has also been studied to create enclosure particles devices, known as pharmaceutical capsules. The patent CN 109223727 A [111] discloses about a preparation method of bacterial cellulose hollow capsule for filling with

pharmaceutical ingredients. The inventors claimed that the production process is simple and reasonable, low cost, safe and reliable. The process had shown to be suitable for scale-up and mass production. Moreover, the Japanese Patent N^o 2021065224 A [112] is an invention referring to methods to produce capsules made from bacterial cellulose film which is capable of enclosing particles and bacterial cellulose film and pharmaceutical compositions containing the bacterial cellulose film capsules.

On the other hand, WO 2020/136629 A1 [113] refers to BNC powder development useful for medicine, cosmetics, food, polymer composites, among others. The invention is a powdered and rehydratable bacterial cellulose and discloses different manufacturing conditions.

4.2.2 Drug delivery cluster

According to the divided-cluster approach, “Drug delivery” was the classification responsible for the second highest number of patents encompassing 11 documents. The discussion of some inventions is summarized as follows.

For instance, WO 2011/079380 A1 [114] refers to the bacterial nanocellulose hydrogels and methods to produce transparent hydrogels with improved mechanical properties and water content. The hydrogel development is envisioned for the production of ophthalmic devices, such as intraocular lenses and contact lenses. The invention can provide drug delivery through the incorporation of drugs and active substances into the BNC hydrogel.

A transdermal delivery approach was invented by CN 106074458 A [115] in which a composite-structure bacterial cellulose/polyacrylonitrile medicine-carrying fiber was prepared incorporated with an anti-inflammatory agent and a skin penetration enhancer. This composition provided slow drug release property for 10 days turning possible its use as an external dressing for inflammatory issues.

Furthermore, oral delivery was described in the patent US 2012/0308649 A1 [116] where the invention takes advantage of the entangled fibers network originated by bacterial nanocellulose to use it as a matrix to deliver functional components such as drugs, probiotics, or nutrients encapsulated in calcium alginate capsules.

Topical application was approached by CN 210673549 U [117] which describes an invention relating to a bacterial cellulose medical cold compress patch. The inventors assure the compressed patch is convenient to carry, easy to use, good in

adhesion effect, not prone to falling off, capable of achieving lasting cooling without active pharmaceutical ingredients, safe in effect, good in biocompatibility and degradability, and easy to produce on an assembly line in a large scale.

4.2.3 Tissue engineering cluster

“Tissue engineering” ranked as the third cluster with 7 patents accounted. In this regard, WO 2016/174104 A1 [118] relates to a composite comprising bacterial nanocellulose, sensor, or signal processing molecules for chip card technology and material engineering. Bacterial nanocellulose composite comprises DNA or RNA or modified nucleotides altogether with chip cards components intended for muscle stimulation, skin stimulus conduction, neuro transplant, among others.

Tissue engineering is also a protected invention described in US 10767205 B2 [119], where bacterial nanocellulose is used and has its structure modified in order to produce exopolysaccharides susceptible to hydrolysis and, hence bioresorbable and biodegradable by the human organism. This invention is destined to be used as a bioresorbable implant for soft tissue repair.

4.2.4 Wound healing cluster

The importance of bacterial cellulose is described due to its frequent use in skin repair treatments in cases of burns, wounds, and ulcers. This material is important to provide acceleration of the epithelization process and avoid infections [120]. Thus, “Wound healing” was also a subject covered in patent research resulting in 2 patents. Bacterial cellulose has been reported due to its high-water uptake capacity and purity. U.S. Patent N° 2016/0074520 A1 [121] relates to compositions comprising cellulose hydrogel membranes that are useful to treat wounds, including ocular wounds. The invention is based on the fact that cellulose hydrogel membranes can be synthesized by having a combination of desirable properties, including transparency, strength, and biocompatibility, which make them particularly advantageous for wound healing applications, including ophthalmic wound healing applications. The document safeguards the commercially available trademarks of bacterial cellulose as XCell, Biofill, Bioprocess, and Dermafill as a possibility to produce the cellulose hydrogel membranes. The other document concerning wound protection is CN 111265709 A [122], in which the invention provides a wound protection film for preventing pneumonia virus infection. In such case, the film is composed of bacterial cellulose and

impregnated with a triazole nucleoside solution. According to the inventors, the wound protection film prepared by the invention not only has excellent antibacterial and pneumonia virus infection resistance, but also has good biocompatibility, biodegradability, and mechanical properties.

5. Discussion

The relative number of patents involving the different types of nanocellulose corresponds to the huge amount of research and publications depicted in Figure 1c-d. The different applications of nanocellulose regarding pharmaceuticals have arisen as an interesting alternative to synthetic compounds and established a new opportunity for the development of biocompatible, bioresorbable, and biodegradable products.

It is a consensus that nanocellulose has been invested to biomedical applications in general due to its properties of low cost, easy availability, biocompatibility, good mechanical properties, and low cytotoxicity. It was noticed that NFC and NCC are most applied as an alternative to nanofillers, to provide more resistance in drug delivery applications, while BNC has been commercialized for wound healing treatments and skin-related issues [123].

In the current days it is imperative to consider environmental responsibility and sustainability on materials development. That is why there is so many studies looking at materials from renewable sources, biodegradable and with highly valuable cost. In this context, nanocellulose has arisen attention due to its characteristics of low density, reactive surfaces, biodegradability, renewability, biocompatibility, easy to find (de-ri-ved from agro-industrial wastes) [124], and low toxicity [125].

The majority of protected inventions cover the manufacturing steps in order to obtain a high value-added product. Furthermore, the invention protection process of pharmaceutical products has also patented nanocellulose as a drug delivery component and shown to be effective in different administration routes.

In fact, when a patent is developed, confidentiality about the reasons that led a certain material characteristic to turn into a product are not disclosed. Some of these features were presented in this review and discussed, as possible, in 2.4 section.

Hydrogels are mostly produced with NFC because of its gel-like behavior due the highly entangled network of fibrous particles that usually promotes colloidal suspension behavior when diluted and as gels when more concentrated [126]. Wound healing bioadhesives [127], contact lenses [128] and artificial skin [129] are some

examples of materials made with hydrogels. In this sense, nanocellulose act as a gel viscosity enhancer. Depending on the type and concentration of nanocellulose used, the hydrogel can show more elasticity or form linked networks.

In pharmaceuticals, hydrogels focused on nanotechnology are the pioneers among the primary biomaterials developed for human uses. Hydrogels have a number of characteristics that play an important role in their application as biomaterials. They mimic the extracellular matrix's (ECM) behavior in organs and tissues due to its rubbery and soft structure in the swelled condition. Hydrogels are suitable for pharmaceutical and biomedical applications because of the aforementioned characteristics as well as their mucoadhesive nature, swelling and deswelling traits and elasticity [125].

Besides, this review shows light on the possibility of using nanocellulose as a printable bioink to develop tissues, organs, extracellular matrix, scaffolds and matrix for drug delivery. Thus, reusing an agricultural waste or benefiting from paper production process turns nanocellulose a "green" material for upcoming future of pharmaceuticals.

Cell culture systems and cell technology is the utmost area of interest for companies that filed several patents regarding 3D cell culture and 3D bioprinting. Some companies have launched nanocellulose derived products and commercialized them reinforcing the concept of high value-added product. Therefore, this field seems to further advance in the upcoming years. On the other hand, some patents focused on bone or tissue repair mixing strategies of cell culturing with tissue engineering concepts, thus providing the nanomaterial absorbance in the organism. In this sense, nanocellulose has proven to be a fundamental part of the positive outcomes since the nanomaterial did not jeopardize human functions. Moreover, nanocellulose has demonstrated its importance in wound recovery and established its use mainly with bacterial nanocellulose.

Undoubtedly, nanocellulose has plenty of potential to be part of a greener future of pharmaceutical technology. Thus, it is a versatile material that has already been shown to have a high added-value when used in the pharmaceutical field. Furthermore, bacterial nanocellulose has proven to be a promising candidate in a range of biomedical applications due to its high in vivo biocompatibility[130], purity [131], porosity, and flexibility, besides the absence of hemicellulose and lignin [132]. Bacterial nanocellulose also has a great capacity to retain water, which makes it suitable for hydrophilic ingredients [133]. All those aspects contribute to market growth and

reassure nanocellulose based materials progression to take part in the upcoming future of nanoscience.

Notwithstanding, nanocellulose shows up as the green byproduct from the circular economy, and therefore has sustainability concepts prior to their conception. Thus, ensuring forests preservation and giving a novel destination to agro-industrial residues, which guarantees the nanocellulose application as an ecofriendly biomaterial.

6. Conclusions

Research and investment in the development of products using nanocellulose, regardless of its origin is a remarkable accomplishment to science and society. This study has shown results that portray the current reality of the scientific community and, especially of companies that found out in nanocellulose a high value-added material, versatile, with low manufacture cost. It was possible to map and evaluate the panorama of the last 12 years (2011-August 2023) of technological strategies for nanocellulose products development. It was provided the majors applicants, and the inventions were divided into clusters of interest. With the present data, it was possible to comprehend how fast the nanocellulose market advance towards greener technology and how suitable is this biopolymer for distinguishing applications. Nonetheless, the present work contributes to the nanocellulose field, since it could assist for further decision-making processes of research and product developments regarding pharmaceuticals, boosting the upcoming innovations.

7. Challenges and future perspectives

It is a fact that in the nanocellulose's field the main concern is to obtain a multifunctional product preserving the environment and exploring new ways of addressing sustainability throughout the product's life cycle. At the same time, depending on nanocellulose application, the process standardization reveals to be a question to be answered through time. Nanocellulose per se has been shown having a high added-value when used into pharmaceuticals. Recently, the positive results regarding drug delivery systems have demonstrated the importance and interest of academy and companies in investing in the development of products, which brings with

it the concern about manufacturing cost control. Another query to be answered is the need for further safety studies, especially depending on the nanocellulose origin. Nonetheless, bacterial nanocellulose already has envisioned the pharmaceutical and cosmetic industry offering an opportunity in the development of high-tech bio platforms. Thus, in a general way, the scale-up of nanocellulose production process and manufacturing in order to obtain price-performance in its different applications remains a challenge as well. As part of the scientific advance there are several new concepts and methods of employing nanocellulose to deliver therapeutic molecules. The ability of nanocellulose to deliver biologics has not been explored much, therefore, some nanocellulose properties must be evaluated to choose the better type, since it will depend on size and shape, charge, chemical composition and hydrophilicity of the molecule to be delivered. The subject is still new and requires knowledge on extraction and synthesis methods of nanocellulose obtaining in order to choose the appropriate type to the delivery of biologics using nanocellulose. Further information can be found in the reference [134].

Supplemental material

Tables S1 and S2 depicts the complete list of patents number regarding NC+NFC and BNC.

Conflicts of interest/competing interests

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

Funding Statement

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

References

1. Habibi, Y.; Lucia, L.A.; Rojas, O.J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. *Chem Rev* 2010, 110, 3479–3500, doi:10.1021/cr900339w.
2. Klemm, D.; Cranston, E.D.; Fischer, D.; Gama, M.; Kedzior, S.A.; Kralisch, D.; Kramer, F.; Kondo, T.; Lindström, T.; Nietzsche, S.; et al. Nanocellulose as a Natural Source for Groundbreaking Applications in Materials Science: Today's State. *Materials Today* 2018, 21, 720–748.

3. Yu, S.; Sun, J.; Shi, Y.; Wang, Q.; Wu, J.; Liu, J. Nanocellulose from Various Biomass Wastes: Its Preparation and Potential Usages towards the High Value-Added Products. *Environmental Science and Ecotechnology* 2021, 5, 100077, doi:10.1016/j.ese.2020.100077.
4. Trache, D.; Tarchoun, A.F.; Derradji, M.; Hamidon, T.S.; Masruchin, N.; Brosse, N.; Hussin, M.H. Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications. *Front Chem* 2020, 8.
5. Kontturi, E.; Laaksonen, P.; Linder, M.B.; Nonappa; Gröschel, A.H.; Rojas, O.J.; Ikkala, O. Advanced Materials through Assembly of Nanocelluloses. *Advanced Materials* 2018, 30, doi:10.1002/adma.201703779.
6. Chauve, G.; Bras, J. Industrial Point of View of Nanocellulose Materials and Their Possible Applications. In *Materials and Energy: Handbook of Green Materials: Processing Technologies, Properties and Applications*; Oksman, K., Mathew, A.P., Bismarck, A., Rojas, O., Sain, M., Eds.; World Scientific, 2014; Vol. 5, pp. 233–252.
7. Nascimento, D.M. do; Almeida, J.S.; Vale, M. do S.; Leitão, R.C.; Muniz, C.R.; Figueirêdo, M.C.B. de; Morais, J.P.S.; Rosa, M. de F. A Comprehensive Approach for Obtaining Cellulose Nanocrystal from Coconut Fiber. Part I: Proposition of Technological Pathways. *Ind Crops Prod* 2016, 93, 66–75, doi:10.1016/J.INDCROP.2015.12.078.
8. Cengiz, M.; Dincturk, O.D.; Sahin, H.T. Fractional Extraction and Structural Characterization of Opium Poppy and Cotton Stalks Hemicelluloses. *Pharmacogn Mag* 2010, 6, 315–319, doi:10.4103/0973-1296.71798.
9. Oliveira, F.B. de; Bras, J.; Pimenta, M.T.B.; Curvelo, A.A. da S.; Belgacem, M.N. Production of Cellulose Nanocrystals from Sugarcane Bagasse Fibers and Pith. *Ind Crops Prod* 2016, 93, 48–57, doi:10.1016/J.INDCROP.2016.04.064.
10. Chen, W.; Yu, H.; Liu, Y.; Chen, P.; Zhang, M.; Hai, Y. Individualization of Cellulose Nanofibers from Wood Using High-Intensity Ultrasonication Combined with Chemical Pretreatments. *Carbohydr Polym* 2011, 83, 1804–1811, doi:10.1016/J.CARBPOL.2010.10.040.
11. Garcia, K.R.; Weiss-Angeli, V.; Koester, L.S.; Santos, V. dos; Brandalise, R.N. Tobacco Stalk Lignocellulosic Nanofibers Characterization for Pharmaceutical Applications. *Research, Society and Development* 2021, 10, e522101422261, doi:https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.22261.
12. Abba, M.; Ibrahim, Z.; Chong, C.S.; Zawawi, N.A.; Kadir, M.R.A.; Yusof, A.H.M.; Razak, S.I.A. Transdermal Delivery of Crocin Using Bacterial Nanocellulose Membrane. *Fibers and Polymers* 2019, 20, 2025–2031, doi:10.1007/s12221-019-9076-8.
13. Anirudhan, T.S.; Nair, S.S.; Sekhar, V, C. Deposition of Gold-Cellulose Hybrid Nanofiller on a Polyelectrolyte Membrane Constructed Using Guar Gum and Poly(Vinyl Alcohol) for Transdermal Drug Delivery. *J Memb Sci* 2017, 539, 344–357, doi:10.1016/j.memsci.2017.05.054.
14. Carvalho, J.P.F.; Silva, A.C.Q.; Bastos, V.; Oliveira, H.; Pinto, R.J.B.; Silvestre, A.J.D.; Vilela, C.; Freire, C.S.R. Nanocellulose-Based Patches Loaded with Hyaluronic Acid and Diclofenac towards Aphthous Stomatitis Treatment. *Nanomaterials* 2020, 10, 628, doi:10.3390/nano10040628.
15. Evdokimova, O.; Svensson, F.; Agafonov, A.; Håkansson, S.; Seisenbaeva, G.; Kessler, V. Hybrid Drug Delivery Patches Based on Spherical Cellulose Nanocrystals and Colloid

- Titania—Synthesis and Antibacterial Properties. *Nanomaterials* 2018, 8, 228, doi:10.3390/nano8040228.
16. Sheikhy, S.; Safekordi, A.A.; Ghorbani, M.; Adibkia, K.; Hamishehkar, H. Synthesis of Novel Superdisintegrants for Pharmaceutical Tableting Based on Functionalized Nanocellulose Hydrogels. *Int J Biol Macromol* 2021, 167, 667–675, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.031.
 17. Alkhatib, Y.; Dewaldt, M.; Moritz, S.; Nitzsche, R.; Kralisch, D.; Fischer, D. Controlled Extended Octenidine Release from a Bacterial Nanocellulose/Ploxamer Hybrid System. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2017, 112, 164–176, doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.025.
 18. Basu, A.; Strømme, M.; Ferraz, N. Towards Tunable Protein-Carrier Wound Dressings Based on Nanocellulose Hydrogels Crosslinked with Calcium Ions. *Nanomaterials* 2018, 8, 550, doi:10.3390/nano8070550.
 19. Carvalho, T.; Guedes, G.; Sousa, F.L.; Freire, C.S.R.; Santos, H.A. Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Materials for Wound Healing, Delivery Systems, and Tissue Engineering. *Biotechnol J* 2019, 14, 1900059, doi:10.1002/biot.201900059.
 20. Alizadeh, N.; Akbari, V.; Nurani, M.; Taheri, A. Preparation of an Injectable Doxorubicin Surface Modified Cellulose Nanofiber Gel and Evaluation of Its Anti-Tumor and Anti-Metastasis Activity in Melanoma. *Biotechnol Prog* 2018, 34, 537–545, doi:10.1002/btpr.2598.
 21. Kushan, E.; Senses, E. Thermoresponsive and Injectable Composite Hydrogels of Cellulose Nanocrystals and Pluronic F127. *ACS Appl Bio Mater* 2021, 4, 3507–3517, doi:10.1021/acsbm.1c00046.
 22. Wong, S.; Alidori, S.; Mello, B.P.; Almeida, B.A.; Ulmert, D.; Brendel, M.B.; Scheinberg, D.A.; McDevitt, M.R. Fibrillar Pharmacology of Functionalized Nanocellulose. *Sci Rep* 2021, 11, 157, doi:10.1038/s41598-020-79592-5.
 23. Bacakova, L.; Pajorova, J.; Bacakova, M.; Skogberg, A.; Kallio, P.; Kolarova, K.; Svorcik, V. Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Nanomaterials* 2019, 9, 164, doi:10.3390/nano9020164.
 24. Peng, W.; Ren, S.; Zhang, Y.; Fan, R.; Zhou, Y.; Li, L.; Xu, X.; Xu, Y. MgO Nanoparticles-Incorporated PCL/Gelatin-Derived Coaxial Electrospinning Nanocellulose Membranes for Periodontal Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 2021, 9, doi:10.3389/fbioe.2021.668428.
 25. Gurgula, O. Strategic Patenting by Pharmaceutical Companies – Should Competition Law Intervene? *IIC International Review of Intellectual Property and Competition Law* 2020, 51, 1062–1085, doi:10.1007/s40319-020-00985-0.
 26. Higham, K.; de Rassenfosse, G.; Jaffe, A.B. Patent Quality: Towards a Systematic Framework for Analysis and Measurement. *Res Policy* 2021, 50, doi:10.1016/j.respol.2021.104215.
 27. WIPO Innovation and Intellectual Property.
 28. Hon, D.N.-S. Cellulose: A Random Walk along Its Historical Path. *CELLULOSE* 1994, 1, 1–25.

29. Haworth, N. Nobel Lecture. NobelPrize.Org. Nobel Prize Outreach AB 2021 Available online: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1937/haworth/lecture/> (accessed on 7 September 2021).
30. Staudinger, H. Nobel Lecture. NobelPrize.Org. Nobel Prize Outreach AB 2021 Available online: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1953/staudinger/lecture/> (accessed on 7 September 2021).
31. Wüstenberg, T. Cellulose. In *Cellulose and cellulose derivatives in the food industry: fundamentals and applications*; Wüstenberg, T., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2014; pp. 91–142 ISBN 9783527682935.
32. Kumar, R.; Sharma, R.K.; Singh, A.P. Grafted Cellulose: A Bio-Based Polymer for Durable Applications. *Polymer Bulletin* 2018, 75, 2213–2242, doi:10.1007/s00289-017-2136-6.
33. Löbmann, K.; Svagan, A.J. Cellulose Nanofibers as Excipient for the Delivery of Poorly Soluble Drugs. *Int J Pharm* 2017, 533, 285–297, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.064.
34. Fernandes, A.N.; Thomas, L.H.; Altaner, C.M.; Callow, P.; Forsyth, V.T.; Apperley, D.C.; Kennedy, C.J.; Jarvis, M.C. Nanostructure of Cellulose Microfibrils in Spruce Wood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108, doi:10.1073/pnas.1108942108.
35. Endler, A.; Persson, S. Cellulose Synthases and Synthesis in Arabidopsis. *Mol Plant* 2011, 4, 199–211, doi:10.1093/mp/ssq079.
36. Turbak, A.F.; Snyder, F.W.; Sandberg, K.R. Microfibrillated Cellulose, a New Cellulose Product: Properties, Uses, and Commercial Potential. *Journal of Applied Polymer Science, Applied Polymer Symposia* 1983, 37, 815–827.
37. Herrick, F.W.; Casebier, R.L.; Hamilton, J.K.; Sandberg, K.R. Microfibrillated Cellulose: Morphology and Accessibility. *Journal of Applied Polymer Science, Applied Polymer Symposia* 1983, 37, 797–813.
38. Lindström, T.; Aulin, C.; Naderi, A.; Ankerfors, M. Microfibrillated Cellulose. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2014.
39. Turbak, A.F.; Snyder, F.; Sandberg, K.R. Food Products Containing Microfibrillated Cellulose 1983.
40. Turbak, A.F.; Snyder, F.; Sandberg, K.R. Suspensions Containing Microfibrillated Cellulose 1983.
41. Herrick, F.W. Redispersible Microfibrillated Cellulose 1983.
42. Lens.Org Available online: www.lens.org (accessed on 19 September 2021).
43. Klemm, D.; Kramer, F.; Moritz, S.; Lindström, T.; Ankerfors, M.; Gray, D.; Dorris, A. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angewandte Chemie International Edition* 2011, 50, 5438–5466, doi:<https://doi.org/10.1002/anie.201001273>.
44. Lin, N.; Dufresne, A. Nanocellulose in Biomedicine: Current Status and Future Prospect. *Eur Polym J* 2014, 59, 302–325, doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025>.
45. Jorfi, M.; Foster, E.J. Recent Advances in Nanocellulose for Biomedical Applications. *J Appl Polym Sci* 2015, 132, 1–19, doi:10.1002/app.41719.

46. Thomas, P.; Duolikun, T.; Rumjit, N.P.; Moosavi, S.; Lai, C.W.; Bin Johan, M.R.; Fen, L.B. Comprehensive Review on Nanocellulose: Recent Developments, Challenges and Future Prospects. *J Mech Behav Biomed Mater* 2020, 110.
47. Sharma, A.; Thakur, M.; Bhattacharya, M.; Mandal, T.; Goswami, S. Commercial Application of Cellulose Nano-Composites – A Review. *Biotechnology Reports* 2019, 21.
48. Wüstenberg, T. Nanocellulose. In *Cellulose and Cellulose Derivatives in the Food Industry: Fundamentals and Applications*; Wüstenberg, T., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2014; pp. 491–510 ISBN 9783527682935.
49. Lavoine, N.; Desloges, I.; Dufresne, A.; Bras, J. Microfibrillated Cellulose – Its Barrier Properties and Applications in Cellulosic Materials: A Review. *Carbohydr Polym* 2012, 90, 735–764, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.026>.
50. Salimi, S.; Sotudeh-Gharebagh, R.; Zarghami, R.; Chan, S.Y.; Yuen, K.H. Production of Nanocellulose and Its Applications in Drug Delivery: A Critical Review. *ACS Sustain Chem Eng* 2019, 7, 15800–15827.
51. Pietarinen, S. The Forest Is Finland's Future Available online: <https://www.upm.com/articles/beyond-fossils/22/the-forest-is-finlands-future> (accessed on 2 February 2022).
52. Klemm, D.; Heublein, B.; Fink, H.-P.; Bohn, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition* 2005, 44, 3358–3393, doi:10.1002/anie.200460587.
53. Tayeb, A.H.; Amini, E.; Ghasemi, S.; Tajvidi, M. Cellulose Nanomaterials-Binding Properties and Applications: A Review. *Molecules* 2018, 23.
54. Siró, I.; Plackett, D. Microfibrillated Cellulose and New Nanocomposite Materials: A Review. *Cellulose* 2010, 17, 459–494, doi:10.1007/s10570-010-9405-y.
55. Cherian, B.M.; Leão, A.L.; de Souza, S.F.; Thomas, S.; Pothan, L.A.; Kottaisamy, M. Isolation of Nanocellulose from Pineapple Leaf Fibres by Steam Explosion. *Carbohydr Polym* 2010, 81, 720–725, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.046>.
56. Kolakovic, R.; Peltonen, L.; Laaksonen, T.; Putkisto, K.; Laukkanen, A.; Hirvonen, J. Spray-Dried Cellulose Nanofibers as Novel Tablet Excipient. *AAPS PharmSciTech* 2011, 12, 1366–1373, doi:10.1208/s12249-011-9705-z.
57. Kolakovic, R.; Peltonen, L.; Laukkanen, A.; Hirvonen, J.; Laaksonen, T. Nanofibrillar Cellulose Films for Controlled Drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2012, 82, 308–315, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.06.011>.
58. Kolakovic, R.; Laaksonen, T.; Peltonen, L.; Laukkanen, A.; Hirvonen, J. Spray-Dried Nanofibrillar Cellulose Microparticles for Sustained Drug Release. *Int J Pharm* 2012, 430, 47–55, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.03.031>.
59. Carlsson, D.O.; Hua, K.; Forsgren, J.; Mihranyan, A. Aspirin Degradation in Surface-Charged TEMPO-Oxidized Mesoporous Crystalline Nanocellulose. *Int J Pharm* 2014, 461, 74–81, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.032>.
60. Wang, C.; Huang, H.; Jia, M.; Jin, S.; Zhao, W.; Cha, R. Formulation and Evaluation of Nanocrystalline Cellulose as a Potential Disintegrant. *Carbohydr Polym* 2015, 130, 275–279, doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.007.

61. Mishra, D.; Yadav, V.; Khare, P.; Jyotshna, .; R. Das, M.; Meena, A.; Shanker, K. Development of Crystalline Cellulosic Fibres for Sustained Release of Drug. *Curr Top Med Chem* 2016, 16, 2026–2035, doi:10.2174/1568026616666160215160426.
62. Zainuddin, N.; Ahmad, I.; Kargarzadeh, H.; Ramli, S. Hydrophobic Kenaf Nanocrystalline Cellulose for the Binding of Curcumin. *Carbohydr Polym* 2017, 163, 261–269, doi:10.1016/j.carbpol.2017.01.036.
63. Aytac, Z.; Sen, H.S.; Durgun, E.; Uyar, T. Sulfisoxazole/Cyclodextrin Inclusion Complex Incorporated in Electrospun Hydroxypropyl Cellulose Nanofibers as Drug Delivery System. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015, 128, 331–338, doi:10.1016/j.colsurfb.2015.02.019.
64. Khattab, M.M.; Dahman, Y. Functionalized Bacterial Cellulose Nanowhiskers as Long-lasting Drug Nanocarrier for Antibiotics and Anticancer Drugs. *Can J Chem Eng* 2019, 97, 2594–2607, doi:10.1002/cjce.23566.
65. Xia, N.; Wan, W.; Zhu, S.; Liu, Q. Preparation of Crystalline Nanocellulose/Hydroxypropyl β Cyclodextrin/Carboxymethyl Cellulose Polyelectrolyte Complexes and Their Controlled Release of Neohesperidin-Copper (II) in Vitro. *Int J Biol Macromol* 2020, 163, 1518–1528, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.272.
66. Medhi, P.; Olatunji, O.; Nayak, A.; Uppuluri, C.T.; Olsson, R.T.; Nalluri, B.N.; Das, D.B. Lidocaine-Loaded Fish Scale-Nanocellulose Biopolymer Composite Microneedles. *AAPS PharmSciTech* 2017, 18, 1488–1494, doi:10.1208/s12249-017-0758-5.
67. Saïdi, L.; Vilela, C.; Oliveira, H.; Silvestre, A.J.D.; Freire, C.S.R. Poly(N-Methacryloyl Glycine)/Nanocellulose Composites as PH-Sensitive Systems for Controlled Release of Diclofenac. *Carbohydr Polym* 2017, 169, 357–365, doi:10.1016/j.carbpol.2017.04.030.
68. Song, J.E.; Jun, S.-H.; Park, S.-G.; Kang, N.-G. A Semi-Dissolving Microneedle Patch Incorporating TEMPO-Oxidized Bacterial Cellulose Nanofibers for Enhanced Transdermal Delivery. *Polymers (Basel)* 2020, 12, 1873, doi:10.3390/polym12091873.
69. Moritz, S.; Wiegand, C.; Wesarg, F.; Hessler, N.; Müller, F.A.; Kralisch, D.; Hipler, U.-C.; Fischer, D. Active Wound Dressings Based on Bacterial Nanocellulose as Drug Delivery System for Octenidine. *Int J Pharm* 2014, 471, 45–55, doi:10.1016/j.ijpharm.2014.04.062.
70. Liu, Y.; Sui, Y.; Liu, C.; Liu, C.; Wu, M.; Li, B.; Li, Y. A Physically Crosslinked Polydopamine/Nanocellulose Hydrogel as Potential Versatile Vehicles for Drug Delivery and Wound Healing. *Carbohydr Polym* 2018, 188, 27–36, doi:10.1016/j.carbpol.2018.01.093.
71. Ring, L.C.; Yenn, T.W.; Wahidin, S.; Tan, W.; Abdullah, S.Z.; Jamil, N.A.M.; Rahman, M.S.A. Antimicrobial Wound Dressing Film Utilizing Nano-Cellulose and Gelatin as Drug Delivery System for *Garcinia Mangostana* L Extract. *Malays J Microbiol* 2019, doi:10.21161/mjm.180249.
72. Sukul, M.; Nguyen, T.B.L.; Min, Y.-K.; Lee, S.-Y.; Lee, B.-T. Effect of Local Sustainable Release of BMP2-VEGF from Nano-Cellulose Loaded in Sponge Biphasic Calcium Phosphate on Bone Regeneration. *Tissue Eng Part A* 2015, 21, 1822–1836, doi:10.1089/ten.tea.2014.0497.
73. Inshakova, E.; Inshakov, O. World Market for Nanomaterials: Structure and Trends. In *Proceedings of the MATEC Web of Conferences; EDP Sciences, November 7 2017; Vol. 129.*

74. Fortune Business Insights Nanocellulose Market Available online: <https://www.fortunebusinessinsights.com/nanocellulose-market-104565> (accessed on 1 August 2021).
75. Gatenholm, P. Cellulose Nanofibrillar Bioink for 3d Bioprinting for Cell Culturing, Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications 2020.
76. CELLINK Nanofibrillated Cellulose Available online: <https://www.cellink.com/product/nanofibrillated-cellulose/> (accessed on 19 September 2021).
77. UPM Biomedicals GrowDex Available online: <https://www.upmbiomedicals.com/for-life-science/growdex-hydrogels/growdex/> (accessed on 20 September 2021).
78. UPM Biomedicals GrowInk Available online: <https://www.upmbiomedicals.com/for-life-science/growink/> (accessed on 20 September 2021).
79. Wang, X.; Wang, Q.; Xu, C. Nanocellulose-Based Inks for 3D Bioprinting: Key Aspects in Research Development and Challenging Perspectives in Applications—A Mini Review. *Bioengineering* 2020, 7, 40, doi:10.3390/bioengineering7020040.
80. Damásio, R.A.P.; Soares, M.C.S.M. Paper and Process for Manufacturing Paper Using Microfibrillated Cellulose Between the Layers Thereof. US 2021/0197540 A1 2021.
81. Nelson, K.; Retsina, T.; Pylkkanen, V. Processes for Producing Pharmaceutical Excipients From Lignocellulosic Biomass, and Pharmaceutical Excipients Obtained Therefrom 2016.
82. Rahman, Md.S.; H. Mondal, Md.I.; Yeasmin, Mst.S.; Sayeed, M.A.; Hossain, M.A.; Ahmed, M.B. Conversion of Lignocellulosic Corn Agro-Waste into Cellulose Derivative and Its Potential Application as Pharmaceutical Excipient. *Processes* 2020, 8, 711, doi:10.3390/pr8060711.
83. Teo, H.L.; Wahab, R.A. Towards an Eco-Friendly Deconstruction of Agro-Industrial Biomass and Preparation of Renewable Cellulose Nanomaterials: A Review. *Int J Biol Macromol* 2020, 161, 1414–1430.
84. Kamel, R.; El-Wakil, N.A.; Dufresne, A.; Elkasabgy, N.A. Nanocellulose: From an Agricultural Waste to a Valuable Pharmaceutical Ingredient. *Int J Biol Macromol* 2020, 163, 1579–1590, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.242.
85. Dharmaraja, J.; Shobana, S.; Arvindnarayan, S.; Vadivel, M.; Atabani, A.E.; Pugazhendhi, A.; Kumar, G. Biobutanol from Lignocellulosic Biomass: Bioprocess Strategies. In *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels*; Elsevier, 2020; pp. 169–193.
86. Nuopponen, M.; Xiang, H.; Song, H.; Wang, Y.; Liu, Y. Method for Preparing Pharmaceutical Composition and Pharmaceutical Composition 2021.
87. Abdul Khalil, H.P.S.; Davoudpour, Y.; Islam, Md.N.; Mustapha, A.; Sudesh, K.; Dungani, R.; Jawaid, M. Production and Modification of Nanofibrillated Cellulose Using Various Mechanical Processes: A Review. *Carbohydr Polym* 2014, 99, 649–665, doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>.
88. Kajanto, I.; Nuopponen, M. Process for Producing a Nanofibrillar Cellulose Hydrogel 2016.
89. Paukkonen, H.; Auvinen, V.-V.; Yliperttula, M.; Laurén, P.; Urtti, A.; Laaksonen, T.; Merivaara, A.; Hakkarainen, T.; Monni, O.; Mäkelä, A.; et al. A Method for Freeze-Drying Cells in a Hydrogel Comprising Nanofibrillar Cellulose and Freeze-Dried Cells in an Aerogel Comprising Nanofibrillar Cellulose 2018.

90. Auvinen, V.-V.; Paukkonen, H.; Yliperttula, M.; Urtti, A.; Hakkarainen, T.; Laurén, P.; Kunnari, M.; Laaksonen, T.; Li, M.; Luukko, K. A Method for Drying Hydrogel Comprising Nanofibrillar Cellulose and a Dried Hydrogel Comprising Nanofibrillar Cellulose 2018.
91. Laukkanen, A.; Laurinsilta, E. Treating Nanofibrillar Cellulose Hydrogel at Elevated Temperature 2016.
92. Laukkanen, A.; Teirfolk, J.-E.; Ikkala, O.; Ras, R.; Mertaniemi, H. Hydrophobic Coating and a Method for Producing Hydrophobic Surface 2012.
93. Varma, A.J.-P.; Sharma, P.R.; Sarkar, D. Synthesis of Nanostructured Carboxycelluloses from Non-Wood Cellulose 2016.
94. Nuopponen, M.; Paasonen, L.; Mannerström, M.; Heinonen, T.; Toimela, T. Cell Culture Plate, Method for Preparing Thereof and Method for Detecting a Substance 2019.
95. Nuopponen, M.; Paasonen, L.; Satomaa, T.; Aitio, O.; Helin, J. Nanofibrillar Cellulose Hydrogel 2021.
96. Larsson, A.; Larsson, M.; Hjaertstam, J. Microfibrillated Cellulose Films for Controlled Release of Active Agents 2013.
97. Yliperttula, M.; Lauren, P.; Bhattacharya, M.; Lou, Y.; Laukkanen, A. Drug Delivery Compositions 2012.
98. Laukkanen, A.; Kolakovic, R.; Peltonen, L.; Laaksonen, T.; Hirvonen, J.; Lyytikäinen, H.; Jukarainen, H.; Kortesoja, P. Drug Delivery System for Sustained Delivery of Bioactive Agents 2013.
99. Nuopponen, M.; Paasonen, L.; Meriluoto, A.; Rissanen, J.; Jukarainen, H. Injectable Pharmaceutical Formulation 2021.
100. Scurtescu, C.; Gill, G. Artificial Saliva, Related Methods, and Uses 2018.
101. Shoseyov, O.; Ben, S.T. Cellulose-Based Topical Formulations 2020.
102. Scurtescu, C.; Gill, G. Viscosity and Stability Modified Ultrasound Gel 2020.
103. Haldane, D.; Kearney, J.; Turner, J.; Dhumpa, R. Formation of Hydrated Nanocellulose Sheets With or Without A Binder For The Use As A Dermatological Treatment 2016.
104. Nuopponen, M.; Luukko, K.; Yliperttula, M.; Koivuniemi, R.; Snirvi, J. Medical Hydrogel Comprising Nanofibrillar Cellulose, Tailored Wound Dressing, and Methods for Preparing Thereof 2021.
105. Blume, G.; Fischer, D.; Alkhatib, Y. Introduction of Active Substances That Are Hardly Water-Soluble or Water-Insoluble Into a Hydrophilic Three-Dimensional Network Made of Cellulose Using Lipid-Based Nanoparticles/Vesicles 2018.
106. Yadav, S.K.; Singla, R.; Kumari, A. A Nanobiocomposite Formulation for Wound Healing and a Process for the Preparation Thereof 2020.
107. Iwama, T.; Hayashi, H. Aqueous Dispersion for Solidifying Serum and Blood 2016.
108. Abudula, T.; Saeed, U.; Al-Turaif, H.; Alshahrie, A. Homogenous Microporous Hollow Nano Cellulose Fibril Reinforced PLA/PBS Scaffolds for Tissue Engineering 2021.

109. Lee, B.T.; Lee, S.-Y.; Nguyen, H.M.T.; Abueva, C.; Chun, S.-J.; Gwon, J.-G. Preparation Method of Injectable Thermosensitive Chitosan/Tempo Based-Oxidized Cellulose Hydrogel 2019.
110. Frenguelli, L.; Martinez, H.; Gatenholm, E.; Mazza, G. Tissue-Specific Human Bioinks for the Physiological 3d-Bioprinting of Human Tissues for in Vitro Culture and Transplantation 2019.
111. Zhong, C.; Yang, X.; Liu, L.; Jia, S. Preparation Method of Bacterial Cellulose Hollow Capsule 2019.
112. Hoshi, T.; Aoyanagi, T. Methods for Producing Capsules Made From Bacterial Cellulose Film, Bacterial Cellulose Film Capsules and Pharmaceutical Compositions 2021.
113. Queirós Dourado, F.O.; Portela Da Gama, F.M. Bacterial Cellulose Formulations, Methods and Uses Thereof 2020.
114. Li, X.; Wan, W.; Panchal, C.J. Transparent Bacterial Cellulose Nanocomposite Hydrogels 2011.
115. Wu, H. Composite-Structure Anti-Inflammatory Medicine-Carrying Fiber for Transdermal Drug Delivery 2016.
116. Chen, P.-Y.; Lai, J.-T.; Hsiao, H.-C.; Chu, Y.-H.; Liao, C.-C. Bacterial Cellulose Composite with Capsules Embedded Therein and Preparation Thereof 2012.
117. Tu, L.; Fu, Y.; Peng, Q.; Yang, H.; Zhan, F.; Feng, H.; Zhou, M. Bacterial Cellulose Medical Cold Compress Patch 2020.
118. Dandekar, T. Modified Bacterial Nanocellulose and Its Uses in Chip Cards and Medicine 2016.
119. Buechter, D.D. Bacterium for the Production of an Exopolysaccharide Comprising N-Acetylglucosamine and D-Glucose 2020.
120. Fadel Picheth, G.; Pirich, C.L.; Sierakowski, M.R.; Woehl, M.A.; Sakakibara, C.N.; Fernandes De Souza, C.; Martin, A.; Da Silva, R.; Alves De Freitas, R. Bacterial Cellulose in Biomedical Applications: A Review. *Int J Biol Macromol* 2017, 104, 97–106, doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.05.171.
121. Trexler, M.M.; Elisseeff, J.H.; Mulreany, D.; Guo, Q.; Breidenich, J.L.; Maranchi, J.P.; Graham, J.L.; Patrone, J.B.; Patchan, M.W.; Calderon-Colon, X. Wound Healing Compositions Comprising Biocompatible Cellulose Hydrogel Membranes and Methods of Use Thereof 2016.
122. Chen, C. Wound Protection Film for Preventing Pneumonia Virus Infection for Pediatrics and Preparation Method Thereof 2020.
123. Varghese, R.; Cherian, R.; Chirayil, C.; Antony, T.; Kargarzadeh, H.; Thomas, S. Nanocellulose as an Avenue for Drug Delivery Applications: A Mini-Review. *Journal of Composites Science* 2023, 7, 210, doi:10.3390/jcs7060210.
124. Ji, Q.; Zhou, C.; Li, Z.; Boateng, I.D.; Liu, X. Is Nanocellulose a Good Substitute for Non-Renewable Raw Materials? A Comprehensive Review of the State of the Art, Preparations, and Industrial Applications. *Ind Crops Prod* 2023, 202, 117093, doi:10.1016/J.INDCROP.2023.117093.

125. Das, S.; Ghosh, B.; Sarkar, K. Nanocellulose as Sustainable Biomaterials for Drug Delivery. *Sensors International* 2022, 3, 100135, doi:10.1016/J.SINTL.2021.100135.
126. Derakhshandeh, B.; Kerekes, R.J.; Hatzikiriakos, S.G.; Bennington, C.P.J. Rheology of Pulp Fibre Suspensions: A Critical Review. *Chem Eng Sci* 2011, 66, 3460–3470, doi:10.1016/j.ces.2011.04.017.
127. Li, J.; Yu, F.; Chen, G.; Liu, J.; Li, X.-L.; Cheng, B.; Mo, X.-M.; Chen, C.; Pan, J.-F. Moist-Retaining, Self-Recoverable, Bioadhesive, and Transparent in Situ Forming Hydrogels To Accelerate Wound Healing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020, 12, 2023–2038, doi:10.1021/acsami.9b17180.
128. Tummala, G.K.; Felde, N.; Gustafsson, S.; Bubholz, A.; Schröder, S.; Mihranyan, A. Light Scattering in Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels Reinforced with Nanocellulose for Ophthalmic Use. *Opt Mater Express* 2017, 7, 2824, doi:10.1364/OME.7.002824.
129. Wu, T.; Farnood, R.; O’Kelly, K.; Chen, B. Mechanical Behavior of Transparent Nanofibrillar Cellulose–Chitosan Nanocomposite Films in Dry and Wet Conditions. *J Mech Behav Biomed Mater* 2014, 32, 279–286, doi:10.1016/j.jmbbm.2014.01.014.
130. Helenius, G.; Bäckdahl, H.; Bodin, A.; Nannmark, U.; Gatenholm, P.; Risberg, B. In Vivo Biocompatibility of Bacterial Cellulose. *J Biomed Mater Res A* 2006, 76A, 431–438, doi:10.1002/jbm.a.30570.
131. Piatkowski, A.; Drummer, N.; Andriessen, A.; Ulrich, D.; Pallua, N. Randomized Controlled Single Center Study Comparing a Polyhexanide Containing Bio-Cellulose Dressing with Silver Sulfadiazine Cream in Partial-Thickness Dermal Burns. *Burns* 2011, 37, 800–804, doi:10.1016/j.burns.2011.01.027.
132. Pertile, R.A.N.; Andrade, F.K.; Alves, C.; Gama, M. Surface Modification of Bacterial Cellulose by Nitrogen-Containing Plasma for Improved Interaction with Cells. *Carbohydr Polym* 2010, 82, 692–698, doi:10.1016/j.carbpol.2010.05.037.
133. Zaborowska, M.; Bodin, A.; Bäckdahl, H.; Popp, J.; Goldstein, A.; Gatenholm, P. Microporous Bacterial Cellulose as a Potential Scaffold for Bone Regeneration. *Acta Biomater* 2010, 6, 2540–2547, doi:10.1016/j.actbio.2010.01.004.
134. Puppala, N. V.; Doddipatla, P.; Mohannath, G. Use of Nanocellulose in the Intracellular Delivery of Biological and Non-Biological Drugs: A Review. *Cellulose* 2023, 30, 1335–1354, doi:10.1007/s10570-022-04977-w.

Supplementary material

Table S1. Patents separated by clusters after examination of documents obtained in WIPO, Espacenet, and Lens.org databases, comprising the timeframe between 2011-August 2023, with the search terms “nanofibrillar cellulose”, “nanocellulose”, “pharmaceutical”, “excipient”, and “drug delivery” combined with Boolean operator and truncation symbol.

<i>Cluster</i>	<i>Patent number</i>		
Design & Manufacturing	US 2018/0094081	US 2017/0218567	WO 2020/058803
• Manufacture	A1	A1	A1
	US 10626191 B2	US 10570564 B2	WO 2020/075056
	WO 2016/177395	WO 2017/046455	A1
	A1	A1	WO 2019/123405
	US 10626191 B2	US 10570564 B2	A1
	WO 2019/238327	EP 3581590 A1	WO 2019/073370
	A1	RU 2719165 C1	A1
	US 2021/0130500	WO 2017/103328	US 2021/0207324
	A1	A1	A1
	EP 3581591 A1	US 10640632 B2	US 2019/0234020
	US 2021/0077403	US 2018/0371211	A1
	A1	A1	US 10927504 B2
	EP 3791864 A1	CN 103520739 A	WO 2017/221137
	WO 2016/102767	US 9611586 B2	A1
	A1	US 2014/0323714	EP 3475485 B1
	US 2018/0179703	A1	WO 2010/092239
	A1	EP 2782937 B1	A1
	US 10822743 B2	WO 2013/076376	US 9181653 B2
	WO 2016/193548	A1	US 2014/0182797
	A1	US 10113005 B2	A1
	WO 2017/174874	EP 2935446 B1	US 2020/0086604
	A1	US 2015/0322170	A1
	EP 3228329 A1	A1	WO 2018/189698
	US 2019/0111175	WO 2014/096547	A1
	A1	A1	WO 2019/171279
	WO 2016/128620	US 2020/0032454	A1
	A1	A1	WO 2020/102605
	US 2018/0021473	EP 3382095 A1	A1
	A1	WO 2018/177878	WO 2011/030170
	US 10729804 B2	A1	A1
	US 2021/0205490	US 2019/0298838	WO 2021/123499
	A1	A1	A1
	WO 2017/115018	WO 2016/109479	US 10813377 B2
	A1	A1	CA 3003670 A1
	EP 3187195 A1	US 2016/0184438	US 2021/0045422
	EP 3187195 B1	A1	A1
	EP 3077592 B1	EP 3212676 B1	WO 2017/075417
	WO 2015/082774	WO 2020/075057	A1
	A1	A1	US 2018/0319957
	EP 3077592 B2	US 2019/0040581	A1
	US 10214855 B2	A1	CN 108430237 A
	US 2016/0289894	US 10883226 B2	CA 3003670 C
	A1	WO 2017/134334	WO 2017/105337
		A1	A1

	US 2017/0190799 A1 US 10113006 B2 WO 2015/197906 A1 WO 2016/024046 A1 EP 3350368 B1	EP 3574143 B1 US 2020/0023409 A1 WO 2018/138702 A1	US 2018/0291119 A1 US 11084885 B2 US 2020/0157250 A1 WO 2018/231143 A1 WO 2020/227816 A1 WO 2020/201627 A1 US 9970159 B2 US 2018/0044856 A1 WO 2018/013034 A1 WO 2021/229406 A1 US 11174324 B2
• Process	US 10625232 B2 WO 2016/102766 A1 US 2017/0348662 A1 EP 3237108 B1 US 2021/0229057 A1 US 2017/0348663 A1 WO 2016/102764 A1 US 10981135 B2 EP 3237107 B1 US 2020/0078305 A1 WO 2018/109281 A1 WO 2016/102765 A1 US 2017/0368211 A1	US 10322196 B2 EP 3237025 B1 EP 3335695 A1 EP 3335695 B1 US 2021/0127663 A1 WO 2018/108341 A1 EP 3335696 B1 EP 3335696 A1 WO 2018/109282 A1 US 2019/0343889 A1 WO 2010/102802 A1 US 10017583 B2	US 2016/0130368 A1 WO 2014/195971 A1 EP 2812483 B2 US 2014/0374045 A1 EP 2812483 B1 US 2016/0186376 A1 US 9315942 B2 WO 2013/117823 A1 US 9725849 B2 WO 2019/116245 A1 WO 2012/152997 A1 US 2014/0130710 A1
Cell culture systems and cell technology	US 2020/0385660 A1 EP 3750982 A1 US 2021/0214510 A1 EP 3572434 A1 EP 3669651 A1 US 2020/0199536 A1 WO 2020/260741 A1	US 2021/0190765 A1 US 10976308 B2 WO 2016/097490 A1 US 2018/0024121 A1 EP 2900806 B1 WO 2014/049204 A1 EP 3699264 A1	US 2020/0164103 A1 WO 2016/100856 A1 EP 3233493 B1 US 2020/0206385 A1 US 2017/0368225 A1 US 10675379 B2 EP 3418377 A1

	WO 2021/127373 A1 EP 3234600 B1	US 2015/0267164 A1 US 9593304 B2	WO 2018/234634 A1 US 2020/0115678 A1 CA 3140249 A1 US 11186736 B2 US 2021/0179871 A1 EP 2975115 A1
Drug delivery			
• Injectable	CA 3101156 A1 US 2021/0085602 A1 JP 2021046393 A EP 3791858 A1		WO 2012/056111 A2 EP 2632493 B1 US 2013/0330379 A1 US 9631177 B2
• Oral	WO 2021/071974 A1 CN 112336741 A US 2021/0030782 A1 WO 2019/094769 A1		WO 2021/116917 A1 WO 2018/009139 A1 WO 2013/009253 A1
• Buccal	WO 2018/104971 A1 WO 2018/152627 A1 US 2020/0281868 A1		
• Topical	WO 2020/031186 A1 US 9816230 B2 US 2016/0186377 A1 WO 2018/009112 A1		WO 2018/009113 A1 US 2020/0188538 A1 WO 2017/117650 A1 WO 2020/227814 A1
• Transdermal	WO 2021/108722 A1 US 2020/0375878 A1 EP 3730122 A2		
• Matrix	WO 2013/072563 A1 US 2014/0322327 A1 US 2021/0015121 A1 WO 2019/108887 A1		
Wound healing	EP 3771470 A1 US 2021/0030919 A1 WO 2019/166606 A1 EP 3533458 A1 US 2021/0170041 A1 EP 3816338 A1 US 2021/0128365 A1 WO 2018/109275 A1 EP 3335740 A1 US 2019/0336643 A1 US 2014/0213764 A1		US 2013/0330417 A1 WO 2017/103263 A1 EP 3181152 A1 US 2016/0325011 A1 EP 3088008 A1 EP 3402462 B1 WO 2017/122224 A1 US 2019/0015468 A1 US 10426809 B2 WO 2018/130390 A1 US 11173228 B2
Tissue engineering	WO 2020/249814 A1 US 2021/0069964 A1 US 2021/0138113 A1 WO 2019/211854 A1		WO 2020/249814 A1 WO 2019/122351 A1 US 2019/0015550 A1 US 11103617 B1 US 11167062 B2

Table S2. Patents separated by clusters after examination of documents obtained in WIPO, Espacenet, and Lens.org databases, comprising the timeframe between 2011-August 2023, with the search terms “bacterial nanocellulose”, “pharmaceutical”, “excipient”, and “drug delivery” combined with Boolean operator and truncation symbol.

Cluster	Patent number	
Design & Manufacturing	WO 2020/136629 A1	WO 2021/009038 A1
• Manufacture	US 10975242 B2	US 2019/0060205 A1
	US 10982387 B2	WO 2012/106707 A3
	JP 2021065224 A	US 2013/0309295 A1
	CN 109223727 A	WO 2012/106707 A2
	WO 2021/009021 A1	KR 20200085090 A
		US 2021/0015966 A1
• Process	US 10870950 B2	
	WO 2017/165465 A1	
	US 2021/0071366 A1	
	US 2019/0093288 A1	
Drug delivery		
• Intraocular	US 2013/0011385 A1	
	US 8940337 B2	
	WO 2011/079380 A1	
• Oral	CN 103191441 A	
	CN 102743356 A	
• Topical	CN 210673549 U	US 2018/0303726 A1
	US 2011/0039744 A1	US 2020/0364264 A1
	WO 2011/019876 A2	EP 3812494 A1
	US 8097574 B2	US 2021/0140100 A1
	US 10736823 B2	US 2011/0286948 A1
	EP 3380072 B1	US 8772003 B2
	WO 2017/089005 A1	
• Transdermal	CN 106074458 A	
• Matrix	US 2012/0308649 A1	
	US 8871743 B2	
	WO 2020/058836 A1	
Wound healing	CN 111265709 A	US 9314531 B2
	US 9211256 B2	US 2012/0231038 A1
	US 2016/0074520 A1	
Tissue engineering	US 2018/0298370 A1	CN 105031722 A
	WO 2016/174104 A1	US 2016/0354406 A1
	RO 130767 A0	US 10130653 B2
	US 10767205 B2	WO 2021/245324 A1

Capítulo II

Avaliação da segurança das nanofibras de celulose de caule de tabaco em fêmeas de ratos Wistar

**Towards a greener multifunctional pharmaceutical excipient: in vivo safety
evaluation of nanofibrillated cellulose from tobacco stalk**

Keth Ribeiro Garcia^a; Rafaella Câmara Rocha Menezes^b; Venina dos Santos^c; Letícia Scherer Koester^a; Eliane Dallegrave^{d*}

^a *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Laboratório de Pesquisa em Toxicologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^c *Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brazil.*

^d *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Laboratório de Pesquisa em Toxicologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.*

*Corresponding author:

Dr. Eliane Dallegrave, Laboratório de Pesquisa em Toxicologia/UFCSPA, Sarmiento Leite/245, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. e-mail: elianedal@ufcspa.edu.br

Towards a greener multifunctional pharmaceutical excipient: *in vivo* safety evaluation of nanofibrillated cellulose from tobacco stalk

Tobacco stalk is a cellulose-rich material and a sustainable alternative to be applied as a plant-based nanofibrillated cellulose (NFC) source. NFC use has garnered attention in the development of oral pharmaceutical forms, despite concerns about its safety due to the adverse effects of nicotine on health. Therefore, we aimed at establishing the safety of NFC derived from tobacco stalk for its potential use as a novel pharmaceutical excipient, exploring its potential functions for tablet production. We conducted acute and subchronic oral toxicity tests in adult female Wistar rats. Initially, individual animals received sequential doses (175 – 5,000 mg·kg⁻¹) for 24 hours followed by a careful observation of any toxic effects. Subsequently, 20 rats were divided into four groups for a subchronic assay, evaluating toxicity signs, body weight changes, hematological, biochemical, and histopathological parameters. No deaths or other clinical toxicity signs were observed in either the acute or the subchronic assays. We noticed a significant reduction in body weight gain ($p < 0.05$) after 14 days. We found statistical differences for hematological and biochemical parameters, unrelated to dosage. There were no observed toxic effects, and tobacco stalk ingestion did not adversely affect organ morphology in the histopathological evaluation. The oral administration of NFC at 5,000 mg·kg⁻¹ per day for 28 days was well-tolerated by treated rats, with no reported deaths. In conclusion, NFC derived from tobacco stalk has shown to be a sustainable and safe alternative for use as an excipient at experimental doses, demonstrating compatibility with its proposed applications.

Keywords: Nanofibrillated cellulose; Acute toxicity; Subchronic toxicity; Tobacco stalk; Pharmaceutical excipient; Sustainability.

1. Introduction

Considered a cellulose-rich biomaterial, with approximately 40% of its mass consisting of cellulose content (Kulić and Radojicic 2011), tobacco stalk currently lacks commercial value and results in a significant amount of waste post-harvest. This waste is either incorporated into the soil or incinerated, contributing to an increase of carbon dioxide into the atmosphere (Shakhes et al., 2011). Thus, tobacco stalk emerges as a prominent candidate within the context of the circular economy, enabling the reuse of this cellulose-rich plant part as a green residue for various applications. This has sparked a growing interest in obtaining nanofibers for the development of innovative products.

Nanofibrillated cellulose (NFC), also known as nanocellulose (Klemm et al., 2011, Lavoine et al., 2012, Brinchi et al., 2013), belongs to a class of emerging biomaterials with several desirable features, including low cost, biodegradability, biocompatibility, significant water absorption capacity, and mechanical properties such as strength and rigidity comparable to the original material (Lin and Dufresne, 2014). The extraction and isolation of nanocellulose from agro-industrial wastes, such as pineapple fibers (Cherian et al., 2010), banana peel (Deepa et al., 2011), rice husk (Johar et al., 2012), and cotton stalks (Soni et al., 2015), have been previously documented. However, despite its potential as a profitable material, there have been relatively few studies on the use of tobacco stalk as a source of nanocellulose (Agrupis and Maekawa 1999, Agrupis et al., 2000, Kulić and Radojicic 2011, Shakhes et al., 2011, Li Xiaoping, Wu Zhangkang 2014, Tuzzin et al., 2016, Garcia et al., 2021).

The use of nanocellulose in the development of pharmaceutical forms as an eco-friendly alternative excipient in tablets for modulating drug release and disintegration time has been extensively studied (Kolakovic, Laaksonen et al., 2012, Kolakovic Peltonen, et al., 2012, Carlsson et al., 2014, Sheikhy et al., 2021). Nevertheless, a crucial aspect that demands special attention is the potential toxicity associated with nanofibers (Endes et al.,

2016). This safety concern arises from the nanometer-scale width (1-100 nm) and micrometer-scale length (2-5 μm) of NFC (Lin and Dufresne 2014, Klemm et al., 2018), as well as its fibrous morphology. According to Donaldson and Tran (2004), this morphology can impact the ability of macrophages to phagocytize, leading to subsequent inflammatory factor stimulation and potential fibrosis or cancerous effects.

Regarding the presence of nicotine in tobacco stalk, a previous study conducted by our group (Garcia et al., 2021) emphasized the absence of nicotine in this plant part, mostly due to the treatment involving heat and alkali use. Nicotine may increase the risk of cardiovascular, respiratory, and gastrointestinal disorders, as well as adversely affect reproductive health. Its presence in the organism is associated with cell proliferation, DNA mutation, and oxidative stress, potentially leading to cancer development (Mishra et al., 2015). Notably, the highest levels of nicotine are found in plant roots and leaves, with only a minimal quantity (0.005%) identified in the smoke when stalk is burned (Pesevski et al., 2010).

The utilization of NFC derived from tobacco stalk as a pharmaceutical excipient remains largely unexplored. Given its distinctive features, it holds the potential to drive innovation, particularly in tablet development, in which it could serve as a compression excipient to modulate drug release. However, studies that substantiate its safety are still required in order to facilitate its widespread industrial application and capture the attention of the scientific community. Recognizing the significance of sustainability, characterized by the repurposing of materials that would be discarded to create novel products, this study aims at establishing the safety profile of NFC obtained from tobacco stalk for its future use as an innovative pharmaceutical excipient.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Recon Inc., located in Santa Cruz do Sul – Rio Grande do Sul State, Brazil, supplied tobacco stalks of the Virginia species harvested during the 2014-2015 crop season. Chemicals and reagents for treating the tobacco stalk were obtained as follows: sodium hydroxide (97%) from Vetec (Brazil) and acetic acid (99%) from Dinâmica (Brazil). Distilled water was utilized as needed.

2.2. Preparation of nanofibrillated cellulose tobacco stalk pellets

Initially, tobacco stalks (Fig. 1a) underwent oven-drying (De Leo, Brazil) at $40 \pm 5^\circ\text{C}$ for 10 days and were subsequently ground in a knife mill (Willye TE 650, Tecnal, Brazil) for storage. The resulting powder was subjected to pretreatment in a 1.0% (w/v) sodium hydroxide solution (Vetec, Brazil) at 100°C , stirred for 90 minutes, and washed with distilled water until pH neutralization was achieved using a 20% (v/v) acetic acid solution (Dinâmica, Brazil). This pretreatment, known as mercerization (Li Xiaoping, Wu Zhangkang 2014), was essential for reducing foam content. The sample underwent filtration and was subsequently oven-dried at 105°C for 24 hours for storage. Cryogenic grinding with an analytical mill (IKA A11 basic, Germany) resulted in a significant reduction in grain size of the tobacco stalk (Fig. 1b), which was previously characterized (Garcia et al., 2021) based on α -cellulose content, morphology, TGA, DSC, and XRD.



Fig. 1 Main steps to develop NFC pellets from tobacco stalk of dosed samples for oral administration in rodents. (a) *In natura* tobacco stalk; (b) tobacco stalk NFC powder; (c) pellet compression; (d) different pellet sizes for subchronic oral toxicity study

Subsequently, NFC was produced using the grinding method proposed by Garcia and co-workers (2021). The method consists of grinding tobacco stalks with distilled water in a Masuko® MKCA 6-2J (Japan) micronizer mill to obtain an NFC aqueous dispersion. The ratio of pretreated tobacco stalks (saponin-free tobacco samples) to distilled water during the grinding process was 120 g:6 L, resulting in a concentration of 2.0% (w/v) of dispersed NFC. The tobacco stalk underwent processing for 5 hours with a 2,500-rpm disk rotation, maintaining a null space between stone disks. This process yielded a gel-like NFC dispersion. To facilitate oral administration of tobacco stalk nanofibers, pellets were created as depicted in Figure 1. Gavage administration was not feasible due to syringe clogging.

Pellets were obtained by directly compressing (Fig. 1c) the tobacco stalk NFC powder using an eccentric compressor (Koersh EK0, Germany) that was manually fed and compressed. The pellets were prepared based on the average weight of rats during the experimental period. Three different sizes (6, 15, and 20 mm height x 15 mm width) and their corresponding dosages of 500, 2,500 and 5,000 mg·kg⁻¹ were manufactured (Fig. 1d).

2.3. *Animals*

Adult female Wistar rats (10-week-old), with an average weight of 264.9 ± 28.2 g, were sourced from the Bioterium of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). The rats were housed in polypropylene cages (41 x 34 x 16 cm, with 3 rats per box) and subjected to a four-hour fasting period. Following the Guidelines of the International Committee on Laboratory Animals, the rodents were kept in conditions of controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), relative humidity ($55 \pm 5\%$), and a 12-hour light/dark cycle with lights off at 7 pm. All experimental procedures were conducted during the light

phase of the cycle. The experiments received approval from the University Ethics Committee under deliberation number 569/18.

2.4. *Acute oral toxicity*

An oral study aimed at determining the median lethal dose (LD₅₀) was carried out following the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guideline 425 – Acute Oral Toxicity: Up and Down Procedure (OECD 2008a). Five female fasted Wistar rats were utilized for the study, with the test substance being orally administered in the form of tobacco stalk NFC pellets (Fig. 1d). Individual animals were sequentially dosed over a 48 hour-period. The initial dose of tobacco stalk NFC used was 175 mg·kg⁻¹, and strict observation of toxic effects was conducted. No toxicity symptoms were observed; thus, another rat was used to assay a higher dose of 550 mg·kg⁻¹. The same procedure was applied for 1,750 mg·kg⁻¹, until the maximum dose of 5,000 mg·kg⁻¹. One animal was used as control. The animals were closely monitored for gross behavioral, neurologic, autonomic, and toxic effects for six hours, as well as after 24 and 48 hours. The animals were daily observed during the test period for clinical signs of toxicity, such as increase or decrease of the ambulation, reaction to stimuli, hypnosis, decrease to touch response, grooming, piloerection, ataxia, dyspnea, tremor, diarrhea, sialorrhea, ptosis, altered muscle tone, convulsions, and abdominal contortions (Dallegrave et al., 2018).

2.5. *Subchronic oral toxicity study*

The experimental protocol for the subchronic oral toxicity study adhered to the OECD guideline 407 for Repeated Dose 28-day Oral Toxicity in Rodents (OECD 2008b). The definition of experimental doses was based on the outcomes of the Up and Down study. The Animal Care Committee of UFCSPA, via letter number 569/18, granted approval for

the animal studies. The study was conducted in strict accordance with the Guidelines of the International Committee on Laboratory Animals.

Treatments - Twenty female Wistar rats were utilized and divided into four groups of five animals each (Groups I-IV). Three distinct pellet sizes (6, 15, and 20 mm height x 15 mm width) and their corresponding dosages of 500, 2,500, and 5,000 mg·kg⁻¹ (Fig. 1d) were orally administered for the animals' spontaneous consumption. Animals were fasted for four hours prior to pellets offer. Pellet intake was monitored until total consumption, and when necessary, stimulation was provided using food flavorings. Group I was treated with tobacco stalk NFC pellets at a dosage of 500 mg·kg⁻¹. Group II received tobacco stalk NFC pellets of 2,500 mg·kg⁻¹ and Group III was treated with tobacco stalk NFC pellets of 5,000 mg·kg⁻¹ (Fig. 1d). The Control Group (Group IV) received pellets of conventional diet, matching the weight of the highest NFC tobacco stalk dose. After each treatment, animals remained for 20 hours with *ad libitum* conventional diet.

Throughout the treatment period, animals were housed in suitable cages, and samples were provided daily for 28 consecutive days for spontaneous consumption. The animals were observed until the completion of sample intake, with the observation period lasting 40 ± 10 minutes. Then, they were transferred to cages with unrestricted access to water and food. Continuous monitoring was conducted for clinical and behavioral symptoms, morbidity, and mortality. Signs of toxicity were observed as outlined in the acute oral toxicity section.

Bodyweight - The bodyweight of each rat was recorded prior to the beginning of the experiment and once a week throughout the study in a Ramuzatron-6 scale (Ramuz DCRC L 6 Bat, Brazil). Relative bodyweight was expressed, and any variations were calculated by considering the initial weight measurement as 100%, with all weight alterations compared to the initial measurement.

Euthanasia - At the end of the treatment period, all animals underwent euthanasia using a combination of a lethal dose of sodium thiopental ($40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and lidocaine ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), administered via the intraperitoneal route, followed by a subsequent overdose. The abdomen was incised, access to the caudal vena cava was established and approximately 4 mL of blood was collected and transferred to tubes with and without EDTA as an anticoagulant. The abdominal and thoracic organs (heart, liver, lungs, kidneys, adrenal glands, and spleen) were meticulously examined for macroscopic changes. Subsequently, these organs were removed, weighed, and preserved in a 10% neutral buffered formalin solution for further pathological analysis.

Clinical hematology - Hematological parameters included hemoglobin, red and white blood cell counts, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet count, mononuclear cells, lymphocytes, and neutrophils. The hematological profile was assessed using an automated hematology analyzer (Micros-60 Abx Horiba, France). Differential counting was conducted through an optical microscope (Olympus C011, Japan).

Clinical biochemistry - The biochemical parameters evaluated included urea, creatinine, aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), amylase, and creatine kinase. Commercial kits from Labtest Diagnóstica were utilized for these analyses, and the assessments were conducted using a biochemical auto analyzer (Mindray BS-120, China).

Histopathology assessment - Preserved organs (liver and kidney) from all groups underwent histological examination. The organs were subjected to dehydration using varying concentrations of ethanol and embedded in paraffin. A $5 \mu\text{m}$ section of each organ

tissue was stained with hematoxylin and eosin. Each section underwent assessment on an optical microscope at 400x magnification [Axio Imager.Z2 microscope with digital camera AxioCam connected to Zen 2.6 software (Zeiss -Germany)]. The evaluation involved systematic scanning of the upper section of the slide in a zigzag pattern across 100 representative fields. Possible degenerative, congestive and/or inflammatory changes were observed, and the the proportion of the affected area was scored according to the standard scale established by Racusen et al. (1999) [normal-up to 5% = 0; mild from 6 to 25% = 1; moderate from 26 to 50% = 2 and severe greater than 50% = 3].

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard deviation. The normal distribution of data was assessed using the Shapiro-Wilk test. Group comparisons were conducted using one-way analysis of variance (ANOVA) for parametric variables (relative organ mass, hematological, and biochemical parameters) that had a normal distribution, followed by the Bonferroni post hoc test. For non-parametric data, results were expressed as median and quartiles, and the Kruskal-Wallis was performed, followed by Dunn's post hoc analysis. Data were analyzed using the SPSS version 20. The significance level was set at 5% ($p < 0.05$). Repeated Measures ANOVA was employed for the analysis of relative body weight data.

3. Results

3.1. Acute toxicity study

No deaths or any other clinical signs of toxicity were observed in rats treated with tobacco stalk NFC in the acute toxicity study. Additionally, no gross pathological abnormalities were found in major organs during necropsy. There were no fatalities even

at the maximum administered dose of 5,000 mg·kg⁻¹. The raw data of results generated for both acute and subchronic toxicity studies are available as supplemental data.

3.2. Subchronic toxicity study

Clinical observations – Throughout the experimental period, rats displayed overall good health, and no signs of toxicity were observed. Rat behaviors were not adversely affected by tobacco stalk NFC treatment at any of the experimented doses.

Relative bodyweight – Figure 2 illustrates the relative bodyweight in the subchronic toxicity study, which demonstrated to be in sustained growth across all groups. Upon comparing Groups I, II and, III with the control group, a significant reduction in weight gain ($p < 0.05$, Repeated Measure ANOVA) was seen after 14 days of the experimental period when compared to the control and other groups.

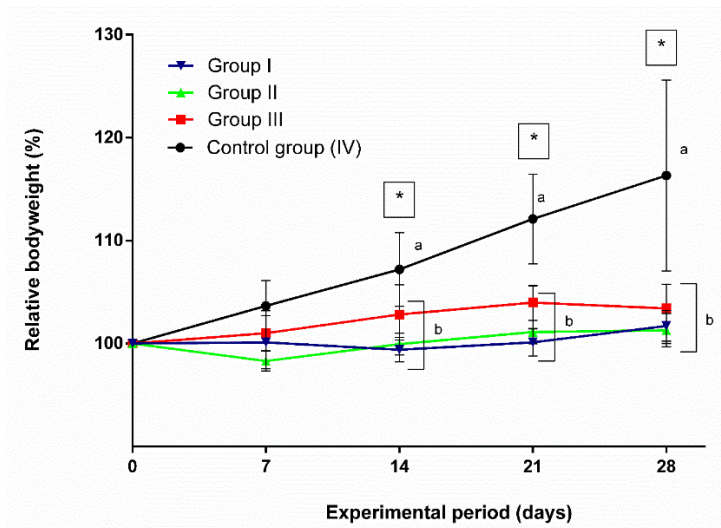


Fig. 2 Effects of NFC pellets on the relative bodyweight of female Wistar rats ($n=5$). Group I, lower NFC dose (500 mg·kg⁻¹); Group II, medium NFC dose (2,500 mg·kg⁻¹); Group III, higher NFC dose (5,000 mg·kg⁻¹); Group IV, control group (conventional diet). Data were analyzed using Repeated Measures ANOVA followed by *post hoc* comparisons (Bonferroni test). Values are expressed as mean \pm standard error. Different letters within the line indicate significant differences among groups (* $p < 0.05$)

Hematological parameters – Changes in hematological parameters are summarized in

Table 1. Tobacco stalk NFC did not significantly change hematological parameters, except

for erythrocytes and hematocrit counting, in which Group I presented a significant increase compared to the Control Group (IV). The hematological data were compared against the normality range protocol for female Wistar rats provided by Charles River (Giknis and Clifford 2008). All parameters were within the normal range of values (hematocrit: 37.9 – 49.9%; erythrocytes: $7.07 - 9.03 \times 10^6/\mu\text{L}$).

Table 1 Hematological parameters for subchronic oral toxicity of tobacco stalk NFC in Wistar rats

Hematological parameters	Control	Group I	Group II	Group III
Erythrocytes *	6.47 ^a (6.07:6.86)	7.56 ^b (7.49:7.89)	6.46 ^a (6.28:6.72)	6.95 ^{ab} (6.85:6.97)
Hemoglobin	13.5 ± 0.146	14.7 ± 0.576	13.5 ± 0.514	14.1 ± 0.312
Hematocrit *	35.9 ^a (34.5:36.5)	43.0 ^b (42.1:44.6)	35.8 ^a (34.2:37.0)	37.8 ^{ab} (37.5:38.3)
MCV	56.0 (53.0:57.0)	57.0 (56.0:57.0)	55.0 (54.0:55.0)	54.0 (54.0:56.0)
MCH	21.6 (19.7:22.2)	20.2 (19.9:20.7)	20.4 (20.2:21.9)	20.0 (19.8:20.3)
MCHC	39.0 (37.1:39.1)	35.4 (36.4:38.8)	38.8 (37.6:39.3)	36.7 (36.2:36.8)
WBC	1.3 (1.2:3.5)	2.8 (1.8:2.8)	1.5 (1.4:1.8)	1.8 (1.4:1.8)
Neutrophils	14.2 ± 1,240	10.2 ± 1.655	15.6 ± 1.749	10.6 ± 0.812
Lymphocytes	79.2 ± 1.157	86.0 ± 2.774	79.0 ± 1.949	85.8 ± 1.392
Monocytes	6.6 ± 0.600	3.8 ± 1.392	5.4 ± 0.400	3.6 ± 1.630
Platelet	608.4 ± 19.4	631.8 ± 49.8	705.2 ± 36.3	625.6 ± 31.8

Erythrocytes: $10^6/\text{mm}^3$; Hemoglobin: g/dL; Hematocrit: %; MCV: fl; MCH: pg; MCHC: g/dL; WBC - white blood cells: $10^3/\text{mm}^3$; Neutrophils: $10^3/\text{mm}^3$; Lymphocytes: $10^3/\text{mm}^3$; Monocytes: $10^3/\text{mm}^3$; Platelet: $10^3/\text{mm}^3$. Data were analyzed using the normality test (Shapiro-Wilk) and, for parametric data, results were analyzed by one way ANOVA, and values are expressed as mean ± standard error. For non-parametric data, results are presented as median and quartiles and analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post hoc*. Different letters within the line indicate significant differences among groups (* $p < 0.05$).

Biochemical parameters – Biochemical parameters are detailed in Table 2. Noteworthy differences were observed for creatinine, AST, ALT, ALP, and amylase. Amylase and ALT were significantly distinct from the control ($p < 0.05$), while AST showed a difference among the treated groups, albeit not significantly different from the control. Despite these variations, all values remained within the biological limits for the species (AST: 65-203 U/L; ALT: 16-48 U/L; ALP: 26-147 U/L) (Giknis and Clifford 2008), indicating no clinical relevance. Creatinine in Group I presented a significant increase ($p < 0.05$) compared to the control.

Relative organ weight – Results of relative organ weight are found in Table 3, demonstrating no significant differences ($p>0.05$) among the control and other groups.

Histopathological analysis – Histopathological analysis of the liver and kidney is depicted in Figure 3. No significant lesions or pathological changes in organs were evidenced in the treated groups (N=5 animals/group), considering proportions lower than 5% of hyaline degeneration, vacuolization, or inflammatory infiltrate, which were eventually observed in the visualized areas of the liver and kidneys.

Table 2 Blood hepatic and renal biomarkers for subchronic oral toxicity of NFC tobacco stalk in Wistar rats

Biomarkers	Control	Group I	Group II	Group III
Urea	53.8 ± 3.7	51.6 ± 7.1	52.6 ± 5.9	41.4 ± 3.8
Creatinine*	0.43 ^a ± 0.14	0.67 ^b ± 0.29	0.48 ^a ± 0.30	0.47 ^a ± 0.10
AST *	77.6 ^a ± 7.39	121.4 ^{ab} ± 10.24	55.4 ^{ac} ± 12.22	68.6 ^{ad} ± 11.58
ALT *	41.0 ^a (33.0:41.0)	71.0 ^b (52.0:76.0)	31.0 ^{ac} (29.0:32.0)	28.0 ^{ad} (26.0:29.0)
ALP *	83.0 ^a (54.0:90.0)	67.0 ^a (63.0:81.0)	37.0 ^b (33.0:42.0)	36.0 ^c (34.0:37.0)
Amylase *	503.0 ^a (490.0:504.0)	704.0 ^b (692.0:730.0)	595.0 ^a (561.0:694.0)	497.0 ^a (492.0:528.0)
CK-NAC	101.0 (0.0: 289.0)	744.0(509.0:1417.0)	242.0 (174.0:297.0)	170.0 (131.0:217.0)

Urea: mg/dL; Creatinine: mg/dL; AST: aspartate aminotransferase U/L; ALT: alanine aminotransferase U/L; ALP: alkaline phosphatase U/L; CK-NAC: creatine kinase U/L. Data were analyzed using the normality test (Shapiro-Wilk) and, for parametric data, results were analyzed by one way ANOVA, and values are expressed as mean ± standard error. For non-parametric data, results are presented as median and quartiles and analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post hoc*. Different letters within the line indicate significant differences among groups (* $p < 0.05$).

Table 3 Relative organs weight (%) for subchronic oral toxicity of NFC tobacco stalk in Wistar rats

Organs (% bodyweight)	Control	Group I	Group II	Group III
Heart	0.31 ± 0.007	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.02
Liver	3.39 ± 0.28	3.47 ± 0.28	3.46 ± 0.38	3.64 ± 0.71
Lungs	0.42 ± 0.06	0.45 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.02
Kidney	0.65 ± 0.05	0.64 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.10
Adrenal	0.03 ± 0.005	0.027 ± 0.005	0.028 ± 0.005	0.02 ± 0.05
Spleen	0.33 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.02

Data were analyzed using the normality test (Shapiro-Wilk) and, for parametric data, results were analyzed by one way ANOVA. Values are expressed as mean \pm standard deviation.

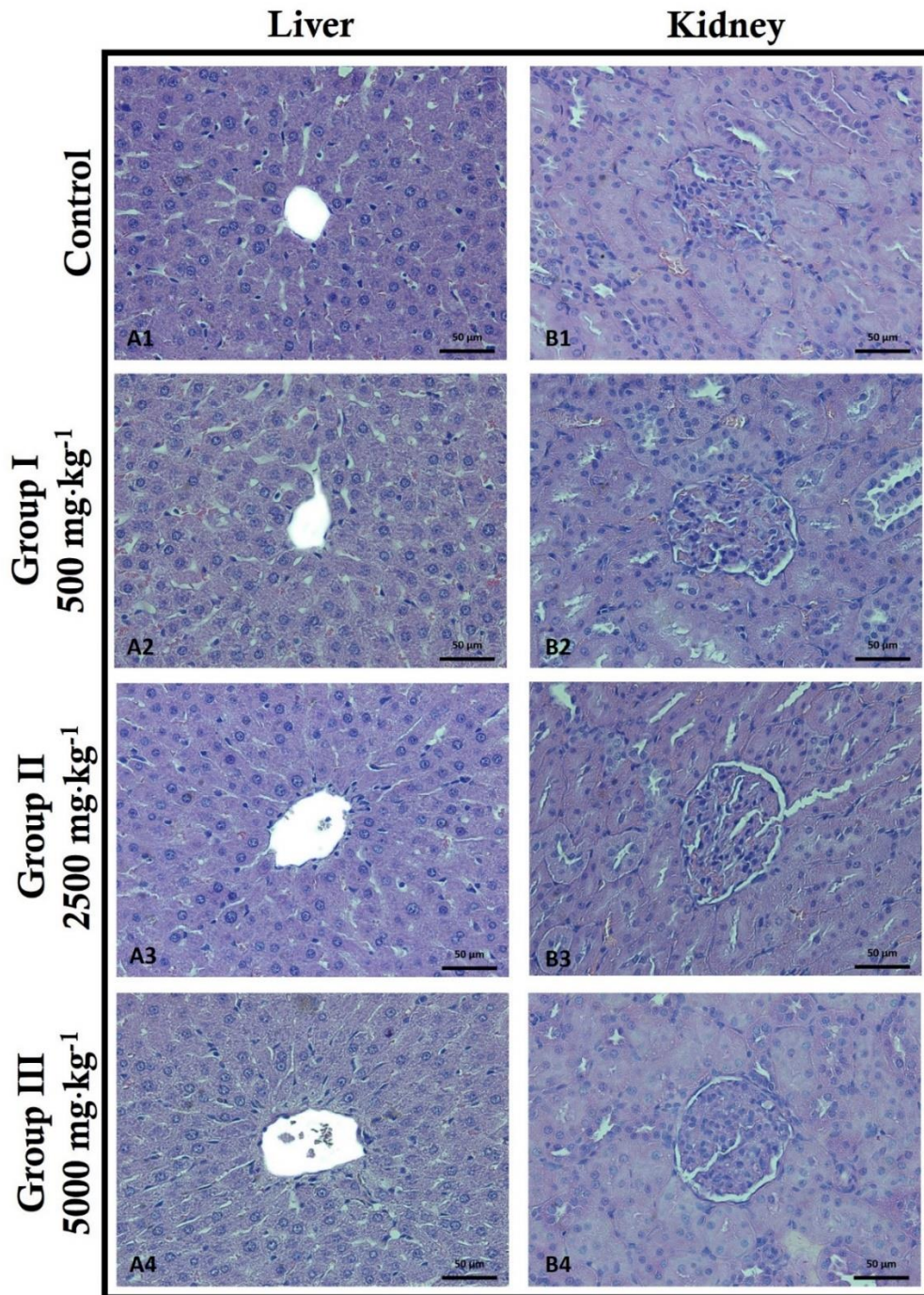


Fig. 3 Histopathological images (HE, 100x) of liver and kidney of female Wistar rats after oral treatment for 28 consecutive days with tobacco stalk NFC

4. Discussion

NFC, a byproduct of cellulose pulp processing, presents a chemical structure consisting of polymerized sugars (Lee et al., 2014). This biopolymer is stable and is not digested by surrounding tissues (Lin and Dufresne 2014). Despite its natural origin, its nanostructure must undergo a thorough safety assessment before its incorporation into solid oral dosage form production.

Acute toxicity tests are aimed at evaluating the potential toxic effects arising from single or multiple doses administered over a period not exceeding 24 hours (OECD 2000). The Up and Down method is an acute toxicity test allowing the estimation of LD50, enabling the classification of substances based on acute toxicity (Erhirhie et al., 2018). In this investigation, no deaths occurred even at the maximum dose of 5,000 mg·kg⁻¹, suggesting that tobacco stalk NFC did not demonstrate toxicity under these conditions. There were also no observable changes in rat behavior; therefore, tobacco stalk NFC may have had no adverse effects on the animals' health. In this way, a repeated doses study was conducted to assess potential cumulative effects.

Daily oral exposure of tobacco stalk NFC in female Wistar rats did not reveal any signs of toxicity during the 28-day experimental period. This implies that the tested doses of 500, 2,500, and 5,000 mg·kg⁻¹ demonstrated either no or low toxicity.

Despite the increase in weight gain in the control group compared to the other groups, overall bodyweight did not show significant changes during the 28-day experimental period. Cellulose nanofibers may function as a non-caloric fiber source, capable of increasing stomach content and providing a feeling of satiety (Benton and Young 2017). Previous studies have found that the ingestion of small amounts of NFC can reduce fat absorption in Wistar rats (DeLoid et al., 2018). A reduction in weight gain was also observed by DeLoid and colleagues (2019) during a five-week treatment in Wistar rats fed with high-fat meals and cellulose nanofibers.

The assessment of blood parameters serves as a crucial means to predict hematological injury (Olson et al., 2000), enabling the diagnosis of adverse effects caused by drugs or compounds in animal blood, thereby evaluating toxicity (Ashafa et al., 2012, Arika et al., 2016) and translating the high-risk profile of a compound to humans (Clark and Steger-Hartmann 2018). Hemoglobin (Hb) and red blood cells collectively represent the total population of red blood cells, while MCV, MCH, and MCHC are associated with individual red blood cells. The lack of effect on these parameters indicates that neither the individual nor the total population of red blood cells was affected, thereby reducing or nullifying toxicity (Ashafa et al., 2012). In this study, although statistical differences were observed for erythrocytes and hematocrit in Group I (Table 1), such differences were not dose-related and were considered incidental. Therefore, the orally administered doses of tobacco stalk NFC were non-toxic and did not interfere with the production of circulating red blood cells, white blood cells, and platelets. Thus, the results were considered unrelated to the treatment.

Serum biochemistry analysis was conducted to assess the overall health status and potential alterations in metabolic processes. Results indicated statistical differences for creatinine, AST, ALT, ALP, and amylase, with only Group I not being compatible with reference values (Giknis and Clifford 2008) for the ALT parameter. However, this result was not dose-related, suggesting it could be considered incidental.

In a 13-week feeding study in rats (Schmitt et al., 1991), groups were administered a diet containing 0,5, or 10% of cellulose fiber (Cellulon). From the hematology and clinical chemistry assessment, the only parameter that showed a significant difference was hematocrit. This result appeared in the group of female rats fed with 5% cellulose fiber compared to the positive control group (microcrystalline cellulose – Avicel), in which hematocrit levels were elevated. Dose-response was not evidenced. Necropsy results and

histological observations did not indicate any treatment-related effects of microcrystalline cellulose during the 13-week experimental period at either 5 or 10% in the diet.

In a 90 consecutive days study conducted by Kotkoskie et al. (1996), groups of Sprague-Dawley rats from Charles River Laboratories were subjected to suspensions of fine particle size (6 μm) microcrystalline cellulose via gavage, with dose levels of 0 (Control), 500, 2,500 and 5,000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ per day. The study revealed no treatment-related deaths, and the sole treatment-related clinical sign (pale feces) was not attributed to toxicity. There were no toxicologically significant effects in treated animals regarding bodyweight, absolute and relative organ weights, food consumption, clinical chemistry measurements, hematology measurements, or ophthalmoscopic examinations. In animals that received 5,000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ per day, no treatment-related histopathological lesions were detected, and there were no macroscopic or microscopic findings of microemboli or granulomatous inflammatory lesions.

Relative organ weight is an important index to determine whether organs have been exposed to injury-induced changes, such as swelling, atrophy, or hypertrophy (Amresh et al., 2008, Rosidah et al., 2009). In this study, the relative weights of the heart, lung, liver, kidney, adrenal glands, and spleen in treated groups did not show statistically differences from the control group. No treatment-related gross macroscopic findings were observed in the necropsy examination. Furthermore, no toxic effects were seen and the ingestion of tobacco stalk NFC did not adversely affect the morphology of rat organs in the histopathological evaluation. This result aligns with the biochemical analysis, indicating that the oral administration of 5,000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ per day of NFC for 28 days was well-tolerated by the treated rats.

In humans, the ingestion of microcrystalline cellulose in doses up to 30 g per day appears to be therapeutically tolerated, with larger quantities potentially inducing a laxative effect (Rowe et al., 2006).

In comparison to microcrystalline cellulose, a well-established excipient widely used in pharmaceutical formulations, tobacco stalk NFC emerges as a novel alternative with multifunctional properties. Microcrystalline cellulose, known for its roles as a binder, diluent, filler, disintegrant, or lubricant, is recognized as a relatively nontoxic and nonirritant substance in pharmaceutical formulations. Its concentration in tablets varies depending on the intended purpose, i.e. if it is applied as a binder/diluent in a 50-mg tablet, the final one will be between 20 and 90% of the tablet weight (Rowe et al., 2006). The acceptable daily intake (ADI) of microcrystalline cellulose has been designated as “not specified” by the Food and Agriculture Organization of the World Health Organization Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA), indicating very low toxicity and no significant hazard to health (Greig 1998).

This study is pioneer in assessing the acute and subchronic oral toxicity of tobacco stalk NFC using an animal model. The findings suggest that NFC could serve as a promising alternative of multifunctional pharmaceutical excipient for the development of oral dosage forms. Considering the absence of studies in humans, the recommendation for a safe dose of NFC becomes challenging. In light of the widespread use of multiple medications, especially among the polypharmacy patients (World Health Organization 2019), and recognizing that NFC might not be present in all drug formulations, a cautious approach is advised. It is strongly recommended that the final daily intake of NFC follows the established safety indication for microcrystalline cellulose ($0.43 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in a 70-kg patient). Thus, under the proposed conditions of use, tobacco stalk NFC can be considered a safe excipient for pharmaceutical applications.

Conclusions

In the acute toxicity study, the oral administration of tobacco stalk NFC at the maximum dose of $5,000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ did not result in mortality or adverse clinical symptoms. This

suggests that the substance under experimentation did not demonstrate toxicity. Similarly, in the 28-day subchronic toxicity study, the oral administration of tobacco stalk NFC at levels of 500, 2,500, and 5,000 mg·kg⁻¹ per day to female Wistar rats did not result in any deaths, and no toxicity effects were observed. Given the absence of apparent adverse effects in hematology, clinical biochemistry, and histopathology evaluation, these results can be extrapolated to suggest that NFC from tobacco stalk should be considered relatively safe for human usage at doses of 500, 2,500, and 5,000 mg·kg⁻¹. These positive findings pave the way for the potential utilization of NFC from tobacco stalk as a pharmaceutical excipient for oral administration, contributing to sustainability and heralding a greener future for pharmaceutical technology.

Acknowledgements

The authors would like to thank the LAPETOX research group, especially MSc Juliana Fank Gomes, Dr Marina Tuerlinckx Costa Valle and, MSc Mateus Belmonte Macedo from Programa de Pós-Graduação in Neurosciences of UFRGS for their contributions.

Disclosure Statement

The authors report there are no competing interests to declare.

Funding

This study was supported by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil* (CAPES), under grant Finance Code 001.

Data availability statement

The original dataset used to generate Tables and Figures in the manuscript are available.

References

- Agrupis, S., Maekawa, E., and Suzuki, K., (2000). Industrial utilization of tobacco stalks II: preparation and characterization of tobacco pulp by steam explosion pulping. *Journal of Wood Science*, 46 (3), 222–229.
- Agrupis, S.C. and Maekawa, E., (1999). Industrial Utilization of Tobacco Stalks (1) Preliminary Evaluation for Biomass Resources. *Holzforschung*, 53 (1), 29–32.
- Amresh, G., Singh, P.N., and Rao, C.V., (2008). Toxicological screening of traditional medicine Laghupatha (*Cissampelos pareira*) in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (3), 454–460.
- Arika, W., Nyamai, D., Musila, M., Ngugi, M., and Njagi, E., (2016). Hematological Markers of In Vivo Toxicity. *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases*, 04 (02), 4–10.
- Ashafa, A.O.T., Orekoya, L.O., and Yakubu, M.T., (2012). Toxicity profile of ethanolic extract of *Azadirachta indica* stem bark in male Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (10), 811–817.
- Benton, D. and Young, H.A., (2017). Reducing calorie intake may not help you lose body weight. *Perspectives on Psychological Science*, 12 (5), 703–714.
- Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., and Kenny, J.M., (2013). Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. *Carbohydrate Polymers*, 94 (1), 154–169.
- Carlsson, D.O., Hua, K., Forsgren, J., and Mihranyan, A., (2014). Aspirin degradation in surface-charged TEMPO-oxidized mesoporous crystalline nanocellulose. *International Journal of Pharmaceutics*, 461 (1–2), 74–81.
- Cherian, B.M., Leão, A.L., de Souza, S.F., Thomas, S., Pothan, L.A., and Kottaisamy, M., (2010). Isolation of nanocellulose from pineapple leaf fibres by steam explosion. *Carbohydrate Polymers*, 81 (3), 720–725.
- Clark, M. and Steger-Hartmann, T., (2018). A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 96 (April), 94–105.
- Dallegreave, E., Taschetto, E., Leal, M.B., Antunes, F.T.T., Gomez, M.V., and de Souza, A.H., (2018). Acute toxicity of the recombinant and native $\text{ph}\alpha 1$ toxin: New analgesic from *Phoneutria nigriventer* spider venom. *Toxins*, 10 (12), 1–11.
- Deepa, B., Abraham, E., Cherian, B.M., Bismarck, A., Blaker, J.J., Pothan, L.A., Leao, A.L., de Souza, S.F., and Kottaisamy, M., (2011). Structure, morphology and thermal characteristics of banana nano fibers obtained by steam explosion. *Bioresource Technology*, 102 (2), 1988–1997.
- DeLoid, G.M., Cao, X., Molina, R.M., Silva, D.I., Bhattacharya, K., Ng, K.W., Loo, S.C.J., Brain, J.D., and Demokritou, P., (2019). Toxicological effects of ingested nanocellulose in *in vitro* intestinal epithelium and *in vivo* rat models. *Environmental Science: Nano*, 6 (7), 2105–2115.
- DeLoid, G.M., Sohal, I.S., Lorente, L.R., Molina, R.M., Pyrgiotakis, G., Stevanovic, A., Zhang, R., McClements, D.J., Geitner, N.K., Bousfield, D.W., Ng, K.W., Loo, S.C.J., Bell, D.C., Brain, J., and Demokritou, P., (2018). Reducing intestinal digestion and absorption of fat using a nature-derived biopolymer: interference of triglyceride hydrolysis by nanocellulose. *ACS Nano*, 12 (7), 6469–6479.

- Donaldson, K. and Tran, C.L., (2004). An introduction to the short-term toxicology of respirable industrial fibres. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 553 (1–2), 5–9.
- Endes, C., Camarero-Espinosa, S., Mueller, S., Foster, E.J., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., Weder, C., and Clift, M.J.D., (2016). A critical review of the current knowledge regarding the biological impact of nanocellulose. *Journal of Nanobiotechnology*, 14 (1), 1–14.
- Erhirhie, E.O., Ihekwereme, C.P., and Iloigwe, E.E., (2018). Advances in acute toxicity testing: Strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdisciplinary Toxicology*, 11 (1), 5–12.
- Garcia, K.R., Weiss-Angeli, V., Koester, L.S., Santos, V. dos, and Brandalise, R.N., (2021). Tobacco stalk lignocellulosic nanofibers characterization for pharmaceutical applications. *Research, Society and Development*, 10 (14), e522101422261.
- Giknis, M.L.A. and Clifford, C.B., (2008). *Clinical laboratory parameters for CrI:WI (Han)*. Montreal.
- Greig, J.B., (1998). *Safety evaluation of certain food additives and contaminants - Microcrystalline cellulose*. Geneva.
- Johar, N., Ahmad, I., and Dufresne, A., (2012). Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. *Industrial Crops and Products*, 37 (1), 93–99.
- Klemm, D., Cranston, E.D., Fischer, D., Gama, M., Kedzior, S.A., Kralisch, D., Kramer, F., Kondo, T., Lindström, T., Nietzsche, S., Petzold-Welcke, K., and Rauchfuß, F., (2018). Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. *Materials Today*.
- Klemm, D., Kramer, F., Moritz, S., Lindström, T., Ankerfors, M., Gray, D., and Dorris, A., (2011). Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (24), 5438–5466.
- Kolakovic, R., Laaksonen, T., Peltonen, L., Laukkanen, A., and Hirvonen, J., (2012). Spray-dried nanofibrillar cellulose microparticles for sustained drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 430 (1–2), 47–55.
- Kolakovic, R., Peltonen, L., Laukkanen, A., Hirvonen, J., and Laaksonen, T., (2012). Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82 (2), 308–315.
- Kotkoskie, L.A., Selinger, E., Freeman, C., Weiner, M.L., and Butt, M.T., (1996). Qualitative investigation of uptake of fine particle size microcrystalline cellulose following oral administration in rats. *Journal of Anatomy*, 189 (3), 531–535.
- Kulić, G.J. and Radojicic, V.B., (2011). Analysis of cellulose content in stalks and leaves of large leaf tobacco. *Journal of Agricultural Sciences*, 56 (3), 207–215.
- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., and Bras, J., (2012). Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, 90 (2), 735–764.
- Lee, H. v., Hamid, S.B.A., and Zain, S.K., (2014). Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: Structure and chemical process. *Scientific World Journal*, 2014.
- Li Xiaoping, Wu Zhangkang, Y.G., (2014). Influence of the Mechanical Properties of Tobacco Stalk Fiber Cell Wall on Particleboard Panels. *Advances in Materials Science and Applications*, 3 (1), 1–5.

- Lin, N. and Dufresne, A., (2014). Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*, 59, 302–325.
- Mishra, A., Chaturvedi, P., Datta, S., Sinukumar, S., Joshi, P. and Garg, A., (2015). Harmful effects of nicotine. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 36 (1), 24-31.
- OECD, (2000). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals : OECD Guidelines for the Testing of Chemicals June 2000, (January), 1–44.
- OECD, (2008a). Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. *In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. Paris: OECD Publishing.
- OECD, (2008b). Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. *In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. Paris: OECD Publishing.
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., van Deun, K., Smith, P., Berger, B., and Heller, A., (2000). Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32 (1), 56–67.
- Pesevski, M., Iliev, B., Zivkovic, D., Jakimovska-Popovska, V., Srbinska, M., and Filiposki, B., (2010). Possibilities for utilization of tobacco stems for production of energetic briquettes. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 55 (1), 45–54.
- Racusen, L.C., Solez, K., Colvin, R.B., Bonsib, S.N., Castro, M.C., et al. (1999). The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney International*, 55 (2), 713–723.
- Rosidah, Yam, M.F., Sadikun, A., Ahmad, M., Akowuah, G.A., and Asmawi, M.Z., (2009). Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 123 (2), 244–249.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., and Owen, S.C., eds., (2006). *Handbook of pharmaceutical excipients*. 5th ed. Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association.
- Schmitt, D.F., Frankos, V.H., Westland, J., and Zoetis, T., (1991). Toxicologic evaluation of Cellulon™ fiber; genotoxicity, pyrogenicity, acute and subchronic toxicity. *Journal of the American College of Toxicology*, 10 (5), 541–554.
- Shakhes, J., Marandi, M.A.B., Zeinaly, F., Saraian, A., and Saghafi, T., (2011). Tobacco residuals as promising lignocellulosic materials for pulp and paper industry. *BioResources*, 6 (4), 4481–4493.
- Sheikhy, S., Safekordi, A.A., Ghorbani, M., Adibkia, K., and Hamishehkar, H., (2021). Synthesis of novel superdisintegrants for pharmaceutical tableting based on functionalized nanocellulose hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 667–675.
- Soni, B., Hassan, E.B., and Mahmoud, B., (2015). Chemical isolation and characterization of different cellulose nanofibers from cotton stalks. *Carbohydrate Polymers*, 134, 581–589.
- Tuzzin, G., Godinho, M., Dettmer, A., and Zattera, A.J., (2016). Nanofibrillated cellulose from tobacco industry wastes. *Carbohydrate Polymers*, 148, 69–77.
- World Health Organization, (2019). *Medication safety in polypharmacy*. Geneva.

Capítulo III

Estudo da viabilidade do uso de nanofibras de celulose de caule de tabaco como agente aglutinante em processo de granulação em leito fluidizado

O texto completo do Capítulo III, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 127 – 150, foi suprimido por tratar-se de manuscrito submetido para publicação em periódico científico, em que um estudo da viabilidade do uso de nanofibras de caule de tabaco como agente aglutinante em processo de granulação em leite fluidizado foi realizado.

Discussão geral

O século XXI é marcado por uma explosão na demanda por materiais, energia, alimentos e água potável, impulsionados por um mundo em crescimento e tecnologias em rápido desenvolvimento (THOMAS *et al.*, 2018). Nesse contexto, a busca por novos insumos farmacêuticos que promovam benefícios de formulação em relação aos já existentes e que sejam derivados de recursos naturais limpos e sustentáveis tem avançado ao longo dos anos (WYNENDAELE *et al.*, 2021).

Como uma importante alternativa aos insumos tradicionais, surgem as nanofibras de celulose (NFC), mais especificamente, derivadas de resíduos agroindustriais. Na última década, os estudos envolvendo nanocelulose como um material promissor e sustentável vem ganhando crescente destaque em pesquisas nas mais diversas áreas (Figura 1 do Capítulo I). No entanto, atualmente a maior parte da utilização de resíduos de biomassa, após o processamento de reciclagem ou recuperação, está amplamente limitada a poucos produtos de valor agregado (CHAUVE; BRAS, 2014).

A utilização de materiais considerados resíduos agroindustriais tem gerado interesse e sendo explorados como um produto de alto valor agregado, uma vez que sua reutilização está inserida no conceito da economia circular, em que o modelo 4R (reutilizar, reciclar, recuperar e reduzir) é amplamente discutido (YU *et al.*, 2021). De modo geral, sabe-se que a nanocelulose é obtida, principalmente, através de resíduos da agricultura, ou da polpa da celulose utilizada na fabricação do papel (MISHRA; SABU; TIWARI, 2018). Esses resíduos da agricultura são classificados como biomassas, que podem ser considerados como uma importante fonte de biocombustíveis e produtos químicos para a obtenção de insumos, sendo uma excelente alternativa em substituição ao petróleo (THOMAS *et al.*, 2018).

Atualmente, a maior parte da nanocelulose utilizada comercialmente é preparada a partir de materiais fibrosos de alta qualidade, como a polpa de madeira e de algodão (CHAUVE; BRAS, 2014). Contudo, há cada vez mais estudos e esforços que comprovam a viabilidade da utilização de biomassas residuais como matéria-prima para a extração e obtenção de nanoceluloses adequadas para fins comerciais (YU *et al.*, 2021).

Sendo assim, o Capítulo I da presente tese ressalta o fato da nanocelulose ser considerada um produto de alto valor agregado e avalia o panorama da inovação frente ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Esse novo caráter das nanoceluloses levou ao incremento no número de patentes de inovação no que se

refere a produtos farmacêuticos. Nessa área, a nanocelulose tem apresentado funções promissoras com algumas propriedades únicas e competitivas, o que demonstra um amplo espectro de aplicações, principalmente no que diz respeito à cultura de células e engenharia de tecidos.

A intenção na busca de patentes foi verificar se o crescente número de pesquisas publicadas sobre a utilização de nanocelulose nas tecnologias farmacêuticas de alguma forma era traduzido no número de inovações patenteadas. A proteção intelectual figura como um diferencial no sentido de contribuir com a possível inserção no mercado dessas novas tecnologias. Nesse contexto, foram encontradas 112 patentes abordando a aplicação de nanocelulose (NFC+NC) e 31 patentes utilizando nanocelulose bacteriana (BNC), totalizando 143 invenções voltadas para o desenvolvimento de produtos ou estratégias de obtenção destinados ao uso na área farmacêutica - ver Figura 3 no capítulo I.

Do total de patentes avaliadas, o setor privado é o maior detentor das propriedades intelectuais depositadas (Figura 3c). Muito provavelmente, a atuação de empresas tradicionalmente manufatureiras do setor da madeira e celulose, têm incrementado os investimentos em pesquisa e inovação, o que reflete no número de patentes depositadas. Além disso, as inovações geradas dentro da universidade têm se refletido no número de depósitos patentários e, de alguma forma vem alavancando o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, seja na parceria universidade/setor privado, ou de forma independente. O estabelecimento da proteção da propriedade intelectual por parte da universidade abre caminho para futuros acordos comerciais e vislumbram o desenvolvimento da pesquisa básica. Há ainda, uma fatia importante de patentes que são geradas pelos escritórios governamentais e por pesquisadores independentes.

Nos países nórdicos como a Finlândia e a Suécia, a cultura do processamento da madeira é muito frequente, sendo que as maiores empresas exploradoras desse material estão sediadas nesses países. Mais de 50% das inovações foram protegidas por uma única empresa que, também, vem investindo na ampliação do setor biomédico dentro da empresa.

Em função das diferentes propostas de aplicação das nanoceluloses com finalidade farmacêutica, no Capítulo I foram selecionados e os documentos divididos em 5 grupos: (1) projeto e manufatura, sendo subdividido em manufatura/obtenção e processos de modificação; (2) sistemas de cultura celular e tecnologia celular; (3) *drug*

delivery, classificadas de acordo com o local de ação ou sistema; (4) tratamento de feridas e, (5) engenharia de tecidos (Figura 4a). A partir dessa classificação foi possível obter e avaliar o panorama das aplicações do nanomaterial.

Como esperado, o grupo de projeto e manufatura foi a área com o maior percentual de patentes depositadas (39,3% para NFC+NC e 32,3% para BNC), configurando o aperfeiçoamento dos processos de obtenção e a versatilidade apresentada pelo material, o qual pode ser moldado e ajustado conforme a necessidade. Já a área relacionada com o processamento dado ao material compreendeu 10,7% para NFC+NC e 3,2% para BNC. O baixo percentual em relação à BNC se deve ao fato de que o processo de síntese além de ser capaz de gerar um produto com alto teor de pureza, também proporciona que as modificações nos componentes da superfície da estrutura química da nanocelulose sejam feitas durante a síntese adicionando, obviamente os reagentes necessários durante o processo (CARVALHO *et al.*, 2019). Dessa forma, é provável que patentes classificadas como “manufacturing”, de alguma forma tenham resguardado essa etapa de funcionalização ou modificação estrutural em suas reivindicações.

Na sequência, o grupo classificado como *drug delivery* apresentou 17,9% e 35,5% de patentes para NFC+NC e BNC, respectivamente. As aplicações da nanocelulose nesse grupo variaram desde uso por via oral, até a via transdérmica. Um fator que chamou bastante a atenção foi a utilização de hidrogéis de nanocelulose destinados ao desenvolvimento de formulações injetáveis. O hidrogel é a forma mais usual de obtenção de um produto após o processo de moagem ou homogeneização da celulose nanofibrilar (ABDUL KHALIL *et al.*, 2014) e é citado na maioria das patentes como um material versátil devido à presença de uma rede de poros interligados permitindo a retenção de muitos compostos biativos com finalidade medicamentosa ou cosmética. Na literatura em geral, sua utilização é proposta para diferentes atividades que variam desde o tratamento de feridas (ALKHATIB *et al.*, 2017; BASU; STRØMME; FERRAZ, 2018; LIU *et al.*, 2018; MORITZ *et al.*, 2014; RING *et al.*, 2019) ao planejamento e desenvolvimento de injetáveis (ALIZADEH *et al.*, 2018; KUSHAN; SENSES, 2021; WONG *et al.*, 2021).

O próximo *cluster* a apresentar maior percentual em termos de depósito de patentes foi a engenharia de tecidos, com 7,1% dos resultados relacionados com NFC+NC, enquanto 22,6% se referiram à BNC. Os resultados obtidos parecem refletir a literatura científica e se referem à potencialidade do uso das nanoceluloses como

material para aplicação na engenharia de tecidos dos mais variados tipos, principalmente tecidos cartilagosos, ósseos e vasculares (BACAKOVA *et al.*, 2019). Exemplos de impressão tridimensional associada ao uso de nanocelulose são apresentados neste capítulo e sugerem o uso combinado de biotinta à base de hidrogel de nanocelulose para a impressão 3D de tecidos humanos e *scaffolds*.

O grupo referente à classificação “tratamento de feridas” compreendeu 11,6% das patentes depositadas para NFC+NC e 6,5% para BNC. Características como pureza, propriedades mecânicas favoráveis e capacidade de absorção de água (BACAKOVA *et al.*, 2019; THOMAS *et al.*, 2018) fazem desse tópico um importante ponto no desenvolvimento de pesquisas e, sobretudo, inovações. As nanoceluloses possuem a capacidade de acelerar a cicatrização tendo como benefício a ausência de resíduos, como ocorre com as gazes convencionais (BACAKOVA *et al.*, 2019).

A utilização de celulose nanofibrilada (NFC) tem alavancado as pesquisas e o desenvolvimento de “sistemas de culturas celulares e tecnologia celular”. Esse grupo foi o responsável por 13,4% das patentes de invenção depositadas relacionadas com NFC+NC. Muito disso se deve ao fato de já ter disponível no mercado produtos indicados para utilização como matriz extracelular para cultivo celular e biotintas indicadas para processos de impressão 3D demonstrando o conceito de produto com alto valor agregado.

Sendo assim, o relativo grande número de patentes envolvendo os diferentes tipos de nanocelulose corresponde à massiva quantidade de pesquisas e publicações apresentadas nas Figuras 1c-d do Capítulo I. As diferentes aplicações da nanocelulose na indústria farmacêutica surgiram como uma alternativa interessante aos compostos sintéticos e estabeleceram uma nova oportunidade para o desenvolvimento de produtos biocompatíveis, bioabsorvíveis e biodegradáveis. Essa área, juntamente com a engenharia de tecidos, parece avançar ainda mais nos próximos anos. Essa interpretação é baseada nos achados científicos e em algumas patentes que focaram no reparo ósseo ou tecidual combinando estratégias de cultura celular com conceitos de engenharia de tecidos, proporcionando assim, a absorção do nanomaterial no organismo.

Nesse sentido, a nanocelulose tem se mostrado peça fundamental nos resultados positivos, uma vez que o nanomaterial não comprometeu as funções do organismo humano. Além disso, a nanocelulose demonstrou sua importância na

recuperação de feridas e estabeleceu seu uso principalmente com nanocelulose bacteriana.

O desenvolvimento sustentável requer um esforço combinado da sociedade e da ciência de modo a produzir materiais inovadores para novas e emergentes aplicações. A intenção de utilizar a nanocelulose oriunda de resíduo não-agroalimentar, como a obtida a partir do caule de tabaco, foco da presente tese, no âmbito da tecnologia farmacêutica traz consigo algumas preocupações acerca de sua segurança e aplicabilidade.

Com o intuito de avaliar a funcionalidade das nanofibras de celulose (NFC) em diferentes propostas de uso farmacêutico, tomou-se por base a ausência de estudos toxicológicos envolvendo o uso oral das NFC, incluindo a obtida do caule de tabaco. Uma vez que a proposta da tese é a utilização das NFC como um potencial insumo farmacêutico e que as nanofibras apresentam, como principal característica, tendência à aglomeração na presença de água, a avaliação da citotoxicidade tornou-se inviável. Por este motivo, optou-se pelo estudo da toxicidade das nanofibras em modelo animal, como forma de evidenciar a segurança das NFC de caule de tabaco.

O estudo realizado para atestar a segurança toxicológica das NFC de caule de tabaco foi a avaliação da toxicidade *in vivo* (Capítulo II). O estudo priorizou o uso de protocolos internacionais atualmente aceitos que compreendessem um reduzido número de animais necessários para estimar a toxicidade oral aguda – LD₅₀ e, ao mesmo tempo, permitissem a utilização de animais do mesmo sexo, como por exemplo as fêmeas em função de apresentarem maior sensibilidade (OECD, 2008b). Tendo sido caracterizado como não-tóxico ou minimamente tóxico no teste *Up and Down*, ensaios de dose repetida foram conduzidos (OECD, 2008a) aos quais doses de 500, 2500 e 5000 mg·kg⁻¹·dia⁻¹ de NFC foram administradas oralmente em ratas Wistar, também levando em consideração a maior sensibilidade das fêmeas em relação aos machos.

Um aspecto importante a ser ressaltado, foi a dificuldade na administração das amostras por gavagem. As NFC de caule de tabaco não são solúveis em água e permaneciam dispersas no meio causando entupimento da seringa. Como alternativa, a administração por via oral do material a ser testado em seu estado sólido foi viabilizada produzindo-se *feed pellets*, conforme apresentado nas Figuras 1c-d do Capítulo II. As doses foram calculadas a partir da estimativa do ganho de peso médio das ratas durante o período. Os *feed pellets* foram oferecidos aos animais para

consumo espontâneo e, quando necessário, aromas alimentícios foram acrescentados para tornar as amostras mais atrativas. O consumo foi observado até o término das amostras, o que levava, em média, de 30 a 40 min por dia.

A administração oral de NFC durante 28 dias consecutivos não causou morte ou sinais de toxicidade nas doses testadas permitindo, assim, que este resultado positivo abrisse perspectivas de sua utilização como um potencial insumo farmacêutico e corroborou com os estudos já existentes que têm demonstrado a ausência de toxicidade das nanoceluloses em geral (BRINCHI *et al.*, 2013; DELOID *et al.*, 2019; KLEMM *et al.*, 2011, 2018; LAVOINE *et al.*, 2012; MISHRA; SABU; TIWARI, 2018; ROMAN, 2015; THOMAS *et al.*, 2018). Dessa forma, foi possível dar enfoque na aplicação das NFC, como apresentado no Capítulo III.

A granulação em leite fluidizado é um dos processos mais utilizados na indústria farmacêutica (BURGGRAEVE *et al.*, 2013) e, frequentemente utiliza povidona como agente aglutinante (GOH; HENG; LIEW, 2018; NAGEL; PECK, 2003; NÄRVÄNEN; ANTIKAINEN; YLIRUUSI, 2009). O Capítulo III da presente tese teve como objetivo verificar a viabilidade da utilização das nanofibras de celulose de caule de tabaco como um agente aglutinante em processo de granulação por leite fluidizado.

A etapa de adequação dos parâmetros foi a mais desafiadora. Diversos testes com diferentes parâmetros, substratos e diluições da dispersão de NFC de caule de tabaco foram avaliados. Foram testados diferentes substratos, dentre eles lactose e lactose SD, no entanto, não apresentando uma boa fluidização (fluidização em ondas). Estudos anteriores realizados no mesmo equipamento (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020, 2021) utilizaram maltodextrina como substrato e obtiveram resultados bem-sucedidos. Dessa forma, o desenvolvimento dos experimentos apresentados no Capítulo III utilizaram maltodextrina como substrato na fluidização por leite. O próximo passo foi a avaliação da melhor diluição de NFC de caule de tabaco. Proporções variando de 1:1 até 1:9 foram testadas, porém, quanto mais concentrada em sólidos, mais obstrução do atomizador era causada. Por fim, a diluição mais adequada foi a 1:9 que permitiu a adequada aspensão do agente aglutinante sobre a mistura de fármaco e substrato.

Conforme apresentado no Capítulo III, ao comparar a utilização dos agentes aglutinantes NFC e PVP, foi possível evidenciar que a dispersão de NFC mostrou viscosidade semelhante à da dispersão de povidona, mesmo em concentrações distintas (Tabela 1). Esse resultado positivo contribuiu para uma análise comparativa

tanto das questões morfológicas, quanto das propriedades de fluxo dos grânulos obtidos.

O processo de granulação em leite fluidizado ocorreu de maneira satisfatória e gerou alto rendimento e baixa umidade dos grânulos obtidos, corroborando com a literatura (BURGGRAEVE *et al.*, 2013; FRIEDRICH *et al.*, 2010).

A distribuição do tamanho de partícula apresentou maior retenção de grânulos na fração 150-125 µm para todas as amostras. Para o granulado THP-NFC a retenção foi de 85,2% representando um resultado positivo em relação aos parâmetros do processo em que não foi gerada uma grande quantidade de partículas com tamanho inferior a 100 µm, o que dificultaria muito o fluxo. A avaliação das propriedades de fluxo é uma maneira importante de prever o comportamento do pó ou grânulos destinados à formação de comprimidos (SUN, 2016). A fluidez é influenciada por fatores relacionados ao pó, como morfologia, tamanho de partícula, distribuição do tamanho de partícula, densidade e área superficial (LAVOIE; CARTILIER; THIBERT, 2002), bem como da composição química (SANDLER *et al.*, 2010).

Em relação à friabilidade granular, todos os grânulos, exceto THP-PVP, apresentaram uma perda de massa na faixa de 20% após os 10 minutos de rotações. Os resultados representam a análise de três lotes diferentes e revelam que a povidona e a celulose nanofibrilada diferem quimicamente entre si e apresentam mecanismos de interação distintos que podem ser influenciados pela presença do fármaco.

Ainda não foram determinados valores ótimos de friabilidade, no entanto, sugere-se que valores abaixo de 30% sejam os mais adequados para resistência granular (VAN MELKEBEKE; VERVAET; REMON, 2008). Corroborando com a estimativa oferecida anteriormente, alguns autores encontraram valores de friabilidade para grânulos obtidos pelo processo de fluidização em leite variando entre 20 e 34% utilizando concentrações de 5% de PVP ou HPMC como agentes aglutinantes (PLANINŠEK *et al.*, 2000).

Dessa forma, os resultados obtidos em relação à friabilidade dos grânulos podem ser considerados como um grande avanço sob o ponto de vista da granulação em leite fluidizado, pois estabelece a possibilidade da utilização das NFC de caule de tabaco como uma solução aglutinante obtendo os mesmos resultados que a povidona em concentração usual. Já em relação à sustentabilidade, esse resultado sustentou a hipótese da reutilização de materiais de origem vegetal para incrementar ou substituir materiais sintéticos tradicionais por resíduos agroindustriais.

A respeito das propriedades de fluxo, estes foram analisados de forma a avaliar se houve um incremento no fluxo da teofilina, um fármaco conhecidamente de fluxo ruim (SANDLER *et al.*, 2010). Propriedades de fluxo como índice de Carr (CI%), fator de Hausner (HR) e ângulo de repouso (AR), bem como a coesividade, foram avaliados e estão apresentados nas Tabelas 3 e 4 do Capítulo III.

O índice de Carr é o parâmetro mais usual de avaliação para grânulos produzidos em leito fluidizado. O valor obtido auxilia na quantificação do comportamento do escoamento relacionando diferentes características, como forma, tamanho e distribuição de tamanho dos grânulos (PASSERINI *et al.*, 2010). De maneira geral, quanto maior o índice de Carr, pior o fluxo (PROPST, 2021). A amostra THP-NFC apresentou o menor valor do índice de Carr, resultando em melhor fluxo em relação aos demais lotes, tendo sido classificado como “fluxo fraco”. Os resultados se apresentaram na faixa entre 19 e 27 para os três lotes de THP. Resultados semelhantes do índice de Carr, de 10 a 26 também foram relatados por pesquisadores que utilizaram granulação em leito fluidizado (GAO *et al.*, 2002; MORIN; BRIENS, 2014).

O fator de Hausner é o parâmetro que avalia a relação interparticular. Quanto maior o índice, menor o tamanho de partícula. Grânulos menores tendem a ser mais coesos devido à alta razão superfície-massa e resultam em maior densidade aparente. Dessa forma, pode-se aceitar índices inferiores a 1,3 devido ao melhor comportamento do escoamento (SINGH *et al.*, 2011). Sendo assim, os resultados obtidos e apresentados no Capítulo III mostraram melhor fluxo para THP-NFC em comparação com os outros grânulos, ainda que seja classificado como “fluxo fraco”.

O ângulo de repouso é uma medida direta utilizada para caracterizar o escoamento. Valores mais baixos de ângulo de repouso geralmente indicam melhor fluxo (GOH; HENG; LIEW, 2018). O resultado médio dos três lotes de THP-NFC apresentou valores de $45,0 \pm 0,3^\circ$. Apesar da falta de consenso sobre a confiabilidade da medida devido à segregação do material e consolidação ou aeração à medida que o cone é formado (NAGEL; PECK, 2003), a amostra THP-NFC foi a única classificada como “aceitável”, enquanto todas as outras foram consideradas com fluxo “pobre”.

A avaliação da coesão entre as partículas também foi avaliada. Como resultado, todas as amostras, exceto a THP na forma pura e B-PVP, demonstraram comportamento de fluxo livre; as outras duas amostras mencionadas apresentaram coesividade. De acordo com Abdullah *et al.* (2010), existe uma relação entre o índice

de coesão e o fator de Hausner, confirmando que ambos os indicadores podem fornecer uma avaliação confiável do fluxo de pó.

Portanto, o uso da dispersão de NFC como aglutinante no processo de granulação em leito fluidizado melhorou as propriedades de fluxo da teofilina. De modo geral, o comportamento *gel-like* das NFC de caule de tabaco foi explorado e o processo gerou grânulos com propriedades de fluxo “fraco”, porém estatisticamente semelhante aos resultados obtidos para as amostras produzidas com povidona.

Assim, esses resultados mostraram semelhança significativa com a povidona, incluindo a resistência dos grânulos. Nesse sentido, no que diz respeito a uma abordagem sustentável para o desenvolvimento de um insumo farmacêutico, os resultados obtidos até agora demonstram e reafirmam o conceito dos 4Rs de reutilizar, reduzir, substituir e reciclar potenciais resíduos agroindustriais.

Portanto, de forma inédita, pode-se considerar que na presente tese, foram desenvolvidos grânulos pelo processo de granulação em leito fluidizado utilizando NFC de caule de tabaco como agente aglutinante e seus resultados são um indicativo favorável da atuação dessas nanofibras como aglutinante em substituição a um material amplamente utilizado.

Conclusões

Por meio do estudo realizado pode-se concluir que:

- As diferentes aplicações da nanocelulose na indústria farmacêutica surgiram como uma alternativa interessante aos compostos sintéticos e estabeleceram uma nova oportunidade para o desenvolvimento de produtos biocompatíveis, bioabsorvíveis e biodegradáveis;
- A nanocelulose se apresenta como um biomaterial de alto valor agregado, principalmente na área farmacêutica;
- Os dados resultantes da busca de patentes permitiram a identificação das aplicações dos produtos farmacêuticos contendo nanocelulose na composição;
- O maior número de patentes depositadas são originárias dos países nórdicos, como a Finlândia e a Suécia;
- O setor privado é o maior detentor de patentes, com 77% e 45% para NFC+NC e BNC, respectivamente seguido pelas inovações geradas na universidade;
- A produção patentária por parte da universidade pode ser um indicativo da potencial transferência de tecnologia para a indústria e, portanto, tornando possível a comercialização dos produtos;
- As patentes relacionadas com *drug delivery* compõem 17,9% e 35,5% das inovações para NFC+NC e BNC, respectivamente;
- A área de "sistemas de cultura celular e tecnologias celulares" juntamente com a área de "engenharia de tecidos" tem ganhado destaque e parecem avançar nos próximos anos apresentando inovações tanto no campo da cultura de células 3D, quanto na bioimpressão 3D;
- A administração oral de nanofibras de celulose (NFC) de caule de tabaco na dose máxima de 5000 mg·kg⁻¹ no estudo de toxicidade aguda (*Up and Down*)

não causou mortalidade ou sintomas clínicos adversos sugerindo, que a substância testada é não-tóxica ou minimamente tóxica;

- As três diferentes doses testadas de nanofibras de celulose de caule de tabaco (500, 2500 e 5000 mg·kg⁻¹·dia⁻¹) no estudo de toxicidade subcrônico realizado em fêmeas de ratos Wistar não causaram morte ou evidenciou sinais de toxicidade;
- Devido à aparente falta de efeitos adversos nas avaliações hematológica, bioquímica e histopatológica, a extrapolação desses resultados para seres humanos sugere que as nanofibras de celulose de caule de tabaco sejam relativamente seguras para uso nas doses avaliadas;
- Tendo as nanofibras de celulose de caule de tabaco se mostrado segura na avaliação toxicológica em modelo animal, foi possível aplicá-la como um agente aglutinante no processo de granulação em leito fluidizado;
- O processo gerou grânulos utilizando NFC como aglutinante com propriedades de fluxo classificadas como aceitáveis, com umidade abaixo de 2% e rendimentos superiores a 90%;
- A atuação das nanofibras de celulose de caule de tabaco foi comparada com a povidona, cujos resultados referentes às propriedades de fluxo demonstraram semelhança significativa para os dois agentes aglutinantes avaliados;
- Os resultados obtidos são um indicativo favorável da atuação dessas nanofibras como aglutinante em substituição a um material amplamente utilizado.

Referências

ABBA, Mustapha *et al.* Transdermal Delivery of Crocin Using Bacterial Nanocellulose Membrane. **Fibers and Polymers**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 2025–2031, 2019.

ABDUL KHALIL, H P S *et al.* Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 99, p. 649–665, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713008539>.

ABDULLAH, E. C.; SALAM, A. M.; AZIZ, A. R. Cohesiveness and Flowability Properties of Silica Gel Powder. **Physics International**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 16–21, 2010.

AGRUPIS, S. C.; MAEKAWA, E. Industrial Utilization of Tobacco Stalks (1) Preliminary Evaluation for Biomass Resources. **Holzforschung**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 29–32, 1999. Disponível em: Acesso at: 15 Oct. 2018.

AGRUPIS, Shirley; MAEKAWA, Eiichi; SUZUKI, Kyoji. Industrial utilization of tobacco stalks II: preparation and characterization of tobacco pulp by steam explosion pulping. **Journal of Wood Science**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 222–229, 2000. Disponível em: Acesso at: 15 Oct. 2018.

AKPINAR, Ozlem *et al.* Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 119–125, 2010.

ALIZADEH, Najmeh *et al.* Preparation of an injectable doxorubicin surface modified cellulose nanofiber gel and evaluation of its anti-tumor and anti-metastasis activity in melanoma. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 537–545, 2018.

ALKHATIB, Y. *et al.* Controlled extended octenidine release from a bacterial nanocellulose/Pluronic hybrid system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 112, p. 164–176, 2017.

ANDRESEN, Martin; STENIUS, Per. Water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobized microfibrillated cellulose. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 837–844, 2007.

ANIRUDHAN, T.S.; NAIR, Syam S.; SEKHAR, V, Chithra. Deposition of gold-cellulose hybrid nanofiller on a polyelectrolyte membrane constructed using guar gum and poly(vinyl alcohol) for transdermal drug delivery. **Journal of Membrane Science**, [s. l.], v. 539, p. 344–357, 2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília - DF: [s. n.], 2013.

AULIN, Christian *et al.* Nanoscale cellulose films with different crystallinities and mesostructures - Their surface properties and interaction with water. **Langmuir**, [s. l.], v. 25, n. 13, p. 7675–7685, 2009.

- BACAKOVA, Lucie *et al.* Versatile Application of Nanocellulose: From Industry to Skin Tissue Engineering and Wound Healing. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 164, 2019.
- BASU, Alex; STRØMME, Maria; FERRAZ, Natalia. Towards Tunable Protein-Carrier Wound Dressings Based on Nanocellulose Hydrogels Crosslinked with Calcium Ions. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 550, 2018.
- BRINCHI, L *et al.* Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 94, n. 1, p. 154–169, 2013.
- BURGGRAEVE, Anneleen *et al.* Process analytical tools for monitoring, understanding, and control of pharmaceutical fluidized bed granulation: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 2–15, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.09.008>.
- CARVALHO, Tiago *et al.* Latest Advances on Bacterial Cellulose-Based Materials for Wound Healing, Delivery Systems, and Tissue Engineering. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1900059, 2019.
- CARVALHO, João P. F. *et al.* Nanocellulose-Based Patches Loaded with Hyaluronic Acid and Diclofenac towards Aphthous Stomatitis Treatment. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 628, 2020.
- CHAUDHURY, Anwsha; NIZIOLEK, Alexander; RAMACHANDRAN, Rohit. Multi-dimensional mechanistic modeling of fluid bed granulation processes: An integrated approach. **Advanced Powder Technology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 113–131, 2013.
- CHAUVE, Grégory; BRAS, Julien. Industrial Point of View of Nanocellulose Materials and Their Possible Applications. *In*: OKSMAN, Kristiina *et al.* (org.). **Materials and Energy: Handbook of Green Materials: Processing Technologies, Properties and Applications**. [S. l.]: World Scientific, 2014. v. 5, p. 233–252.
- DE LIMA, Renata *et al.* Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. **International Journal of Nanomedicine**, [s. l.], v. 7, p. 3555–3565, 2012.
- DE OLIVEIRA, Edilene Gadelha *et al.* Phenytoin-loaded lipid-core nanocapsules improve the technological properties and in vivo performance of fluidised bed granules. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 111, 2020.
- DE OLIVEIRA, Edilene Gadelha *et al.* Polymeric nanocapsules as a binder system for fluidized bed granules: Influence on particle growth behavior, flow, compaction properties, and drug release. **Powder Technology**, [s. l.], v. 385, p. 327–335, 2021.
- DELOID, Glen M. *et al.* Toxicological effects of ingested nanocellulose in *in vitro* intestinal epithelium and *in vivo* rat models. **Environmental Science: Nano**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 2105–2115, 2019.
- DERAKHSHANDEH, B. *et al.* Rheology of pulp fibre suspensions: A critical review. **Chemical Engineering Science**, [s. l.], v. 66, n. 15, p. 3460–3470, 2011.

- DHARMARAJA, Jeyaprakash *et al.* Biobutanol from lignocellulosic biomass: bioprocess strategies. *In: LIGNOCELLULOSIC BIOMASS TO LIQUID BIOFUELS*. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 169–193.
- DONALDSON, Ken; TRAN, C. Lang. An introduction to the short-term toxicology of respirable industrial fibres. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 553, n. 1–2, p. 5–9, 2004.
- DÜRIG, Thomas. Binders in Pharmaceutical Granulation. *In: PARIKH, Dilip M. (org.). Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. Third Edited. Boca Raton - FL: Taylor & Francis, 2013. p. 78–97.
- DÜRIG, Thomas; KARAN, Kapish. Binders in Wet Granulation. *In: HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL WET GRANULATION*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 317–349.
- ENDES, C. *et al.* A critical review of the current knowledge regarding the biological impact of nanocellulose. **Journal of Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–14, 2016.
- ENDLER, Anne; PERSSON, Staffan. Cellulose synthases and synthesis in arabidopsis. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 199–211, 2011.
- EVDOKIMOVA, Olga *et al.* Hybrid Drug Delivery Patches Based on Spherical Cellulose Nanocrystals and Colloid Titania—Synthesis and Antibacterial Properties. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 228, 2018.
- FENGEL, Dietrich; WEGENER, Gerd. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDES, Anwesh N. *et al.* Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 47, 2011.
- FLAUZINO NETO, Wilson Pires *et al.* Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - Soy hulls. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 480–488, 2013.
- FRIEDRICH, R. B. *et al.* Drying polymeric drug-loaded nanocapsules: The wet granulation process as a promising approach. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 616–621, 2010.
- GAO, Julia Z.H *et al.* Fluid bed granulation of a poorly water soluble, low density, micronized drug: comparison with high shear granulation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 237, n. 1–2, p. 1–14, 2002.
- GARCIA, Keth Ribeiro *et al.* Tobacco stalk lignocellulosic nanofibers characterization for pharmaceutical applications. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 10, n. 14, p. e522101422261, 2021.
- GARCIA, Keth Ribeiro. **Utilização de nanofibras de celulose de biomassas residuais das indústrias do papel e fumaça como adjuvante na preparação de granulados contendo teofilina**. 2017. 166 f. - Universidade de Caxias do Sul (UCS), [s. l.], 2017.

GOH, Hui Ping; HENG, Paul Wan Sia; LIEW, Celine Valeria. Comparative evaluation of powder flow parameters with reference to particle size and shape. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 547, n. 1–2, p. 133–141, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.05.059>.

GU, Jin; CATCHMARK, Jeffrey M. The impact of cellulose structure on binding interactions with hemicellulose and pectin. **Cellulose**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 1613–1627, 2013.

HAWORTH, Norman. **Nobel Lecture. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2021**. [S. l.], 1966. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1937/haworth/lecture/>. Acesso at: 7 Sep. 2021.

HOORNAERT, Frederik *et al.* Agglomeration behaviour of powders in a Lödige mixer granulator. **Powder Technology**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 116–128, 1998.

HUBBE, Martin A. Suspensions : a Review of Effects of Hydrodynamic. **BioResources**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 296–331, 2007.

IOTTI, Marco *et al.* Rheological Studies of Microfibrillar Cellulose Water Dispersions. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 137–145, 2011.

JIA, Xuejuan *et al.* Rheological properties of an amorphous cellulose suspension. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 39, p. 27–33, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X13004104>.

JIN, Kaiyan *et al.* Nanofibrillated cellulose as coating agent for food packaging paper. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 168, p. 331–338, 2021.

JOHN, Maya Jacob; THOMAS, Sabu. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 343–364, 2008.

JORFI, Mehdi; FOSTER, E. Johan. Recent advances in nanocellulose for biomedical applications. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 132, n. 14, p. 1–19, 2015.

KIM, Soo Min *et al.* Toxicity Evaluation of Cellulose Nanofibers (Cnfs) for Cosmetic Industry Application. **Journal of Toxicology and Risk Assessment**, [s. l.], v. 5, n. 2, 2019.

KLEMM, Dieter *et al.* Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.200460587>. Acesso at: 1 Nov. 2018.

KLEMM, Dieter *et al.* **Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state**. [S. l.: s. n.], 2018.

KLEMM, Dieter *et al.* Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 50, n. 24, p. 5438–5466, 2011.

- KOLAKOVIC, Ruzica *et al.* Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 82, n. 2, p. 308–315, 2012a. Disponível em: Acesso at: 15 Oct. 2018.
- KOLAKOVIC, Ruzica *et al.* Spray-dried cellulose nanofibers as novel tablet excipient. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1366–1373, 2011.
- KOLAKOVIC, Ruzica *et al.* Spray-dried nanofibrillar cellulose microparticles for sustained drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 430, n. 1–2, p. 47–55, 2012b.
- KONTTURI, Eero *et al.* Advanced Materials through Assembly of Nanocelluloses. **Advanced Materials**, [s. l.], v. 30, n. 24, 2018.
- KULIĆ, Gordana J.; RADOJICIC, Vesna B. ANALYSIS OF CELLULOSE CONTENT IN STALKS AND LEAVES OF LARGE LEAF TOBACCO. **Journal of Agricultural Sciences**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 207–215, 2011.
- KUMAR, Rajesh; SHARMA, Rajeev Kr; SINGH, Anirudh P. Grafted cellulose: a bio-based polymer for durable applications. **Polymer Bulletin**, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 2213–2242, 2018.
- KUSHAN, Eren; SENSES, Erkan. Thermoresponsive and Injectable Composite Hydrogels of Cellulose Nanocrystals and Pluronic F127. **ACS Applied Bio Materials**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 3507–3517, 2021.
- LAVOIE, François; CARTILIER, Louis; THIBERT, Roch. New Methods Characterizing Avalanche Behavior to Determine Powder Flow. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 19, n. 6, 2002.
- LAVOINE, Nathalie *et al.* Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 90, n. 2, p. 735–764, 2012.
- LEE, Sun Young *et al.* Preparation of cellulose nanofibrils by high-pressure homogenizer and cellulose-based composite films. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 50–55, 2009.
- LI XIAOPING, WU ZHANGKANG, Yu Guanxia. Influence of the Mechanical Properties of Tobacco Stalk Fiber Cell Wall on Particleboard Panels. **Advances in Materials Science and Applications**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–5, 2014.
- LIN, Ning; DUFRESNE, Alain. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 59, p. 302–325, 2014.
- LIU, Yingying *et al.* A physically crosslinked polydopamine/nanocellulose hydrogel as potential versatile vehicles for drug delivery and wound healing. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 188, p. 27–36, 2018.
- LÖBMANN, Korbinian; SVAGAN, Anna J. Cellulose nanofibers as excipient for the delivery of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 533, n. 1, p. 285–297, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.064>.

LOPES, Viviana R. *et al.* In vitro biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: Surface chemistry aspect. **Particle and Fibre Toxicology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–13, 2017.

MACKEY, Brendan; LINDENMAYER, David. Fossil fuel's future. **Science**, [s. l.], v. 345, n. 6198, p. 739–740, 2014.

MARTINS, P. C.; KIECKBUSCH, T. G. Influence of a lipid phase on steam jet agglomeration of maltodextrin powders. **Powder Technology**, [s. l.], v. 185, n. 3, p. 258–266, 2008.

MDIC. **Exportação - Fumo em folhas e desperdícios**. [S. l.], 2021. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/comex-vis>. Acesso at: 28 Jan. 2022.

MISHRA, Raghvendra Kumar; SABU, Arjun; TIWARI, Santosh K. Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect. **Journal of Saudi Chemical Society**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 949–978, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2018.02.005>.

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; DRZAL, L. T. Sustainable Bio-Composites from Renewable Resources: Opportunities and Challenges in the Green Materials World. **Journal of Polymers and the Environment**, [s. l.], v. 10, n. 1/2, p. 19–26, 2002. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1023/A:1021013921916>. Acesso at: 15 Oct. 2018.

MOREIRA, Susana *et al.* BC nanofibres: In vitro study of genotoxicity and cell proliferation. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 189, n. 3, p. 235–241, 2009.

MORIN, Garrett; BRIENS, Lauren. A Comparison of Granules Produced by High-Shear and Fluidized-Bed Granulation Methods. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 1039–1048, 2014.

MORITZ, Sebastian *et al.* Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 471, n. 1–2, p. 45–55, 2014.

NAGEL, Karen M.; PECK, Garnet E. Investigating the effects of excipients on the powder flow characteristics of theophylline anhydrous powder formulations. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 277–287, 2003.

NAKAGAITO, A. N.; YANO, H. The effect of morphological changes from pulp fiber towards nano-scale fibrillated cellulose on the mechanical properties of high-strength plant fiber based composites. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 547–552, 2004.

NÄRVÄNEN, Tero; ANTIKAINEN, Osmo; YLIRUUSI, Jouko. Predicting particle size during fluid bed granulation using process measurement data. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1268–1275, 2009.

NECHYPORCHUK, Oleksandr; BELGACEM, Mohamed Naceur; PIGNON, Frédéric. Current Progress in Rheology of Cellulose Nanofibril Suspensions. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 2311–2320, 2016.

NECHYPORCHUK, Oleksandr; PIGNON, Frédéric; BELGACEM, Mohamed Naceur. Morphological properties of nanofibrillated cellulose produced using wet grinding as an ultimate fibrillation process. **Journal of Materials Science**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 531–541, 2014.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals : OECD Guidelines for the Testing of Chemicals June 2000. [s. l.], n. January, p. 1–44, 2000.

OECD. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. *In*: OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 4. Paris: OECD Publishing, 2008a. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4).

OECD. **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. [S. l.]: OECD, 2002. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4).

OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. *In*: OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, SECTION 4. Paris: OECD Publishing, 2008b. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4).

ONYIANTA, Amaka J.; DORRIS, Mark; WILLIAMS, Rhodri L. Aqueous morpholine pre-treatment in cellulose nanofibril (CNF) production: comparison with carboxymethylation and TEMPO oxidation pre-treatment methods. **Cellulose**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1047–1064, 2018.

PÄÄKKO, M. *et al.* Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1934–1941, 2007.

PALMER, Tim; STEVENS, Bjorn. The scientific challenge of understanding and estimating climate change. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 116, n. 49, p. 34390–34395, 2019.

PASSERINI, Nadia *et al.* Melt granulation of pharmaceutical powders: A comparison of high-shear mixer and fluidised bed processes. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 391, n. 1–2, p. 177–186, 2010.

PENG, Wenzao *et al.* MgO Nanoparticles-Incorporated PCL/Gelatin-Derived Coaxial Electrospinning Nanocellulose Membranes for Periodontal Tissue Regeneration. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 9, 2021.

PENG, Yucheng; GARDNER, Douglas J.; HAN, Yousoo. Drying cellulose nanofibrils: in search of a suitable method. **Cellulose**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 91–102, 2012.

PLANINŠEK, O *et al.* The utilization of surface free-energy parameters for the selection of a suitable binder in fluidized bed granulation. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 207, n. 1–2, p. 77–88, 2000.

PROPST, Cecil W. Granulation characterization. *In*: PARIKH, Dilip M. (org.). **Handbook of Pharmaceutical Granulation Technology**. 4. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2021. p. 619–640.

RAHMAN, Md. Saifur *et al.* Conversion of Lignocellulosic Corn Agro-Waste into Cellulose Derivative and Its Potential Application as Pharmaceutical Excipient. **Processes**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 711, 2020.

REFLORA. **Nicotiana tabacum L.** [S. l.], 2020. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB88067>. Acesso at: 3 Mar. 2020.

RING, L. C. *et al.* Antimicrobial wound dressing film utilizing nano-cellulose and gelatin as drug delivery system for *Garcinia mangostana* L extract. **Malaysian Journal of Microbiology**, [s. l.], 2019.

ROMAN, Maren. Toxicity of Cellulose Nanocrystals: A Review. **Industrial Biotechnology**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 25–33, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ind.2014.0024>.

ROY, Papiya; KHANNA, Rajesh; SUBBARAO, Duvvuri. Granulation time in fluidized bed granulators. **Powder Technology**, [s. l.], v. 199, n. 1, p. 95–99, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2009.04.018>.

SAARIKOSKI, Eve *et al.* Flocculated flow of microfibrillated cellulose water suspensions: An imaging approach for characterisation of rheological behaviour. **Cellulose**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 647–659, 2012.

SAJAB, Mohd Shaiful *et al.* Telescopic synthesis of cellulose nanofibrils with a stable dispersion of Fe(0) nanoparticles for synergistic removal of 5-fluorouracil. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

SANDLER, Niklas *et al.* Effect of moisture on powder flow properties of theophylline. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 275–290, 2010.

SCHENZEL, Karla; ALMLÖF, Heléne; GERMGÅRD, Ulf. Quantitative analysis of the transformation process of cellulose I → cellulose II using NIR FT Raman spectroscopy and chemometric methods. **Cellulose**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 407–415, 2009.

SHAKHES, Jalal *et al.* TOBACCO RESIDUALS AS PROMISING LIGNOCELLULOSIC MATERIALS FOR PULP AND PAPER INDUSTRY. **BioResources**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 4481–4493, 2011. Disponível em: https://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_06_4_4481_Shakher_MZSS_Tobacco_Residuals_Materials_Pulp_Paper. Acesso at: 15 Oct. 2020.

SHEIKHY, Shabnam *et al.* Synthesis of novel superdisintegrants for pharmaceutical tableting based on functionalized nanocellulose hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 167, p. 667–675, 2021.

SINDITABACO. **Dimensão do setor.** [S. l.], 2022. Disponível em: <http://www.sinditabaco.com.br/sobre-o-setor/dimensoes-do-setor/>. Acesso at: 6 Feb. 2022.

SINGH, Virendra K. *et al.* Study the effect of process variables in fluid bed granulation on the physico-chemical properties of granules. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 370–377, 2011.

SIQUEIRA, Gilberto; BRAS, Julien; DUFRESNE, Alain. Cellulosic Bionanocomposites: A Review of Preparation, Properties and Applications. **Polymers**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 728–765, 2010.

SIRÓ, István; PLACKETT, David. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. **Cellulose**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 459–494, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10570-010-9405-y>. Acesso at: 15 Oct. 2018.

SONG, Woo-Yong; SHIN, Soo-Jeong. Evaluation of water holding property for applying a cosmetic moisturizer from oil palm trunk CNF. **Journal of Korea Technical Association of The Pulp and Paper Industry**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 91–98, 2016.

STAUDINGER, Hermann. **Nobel Lecture. NobelPrize.org. Nobel prize Outreach AB 2021**. [S. l.], 1953. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1953/staudinger/lecture/>. Acesso at: 7 Sep. 2021.

SUN, Changquan Calvin. A classification system for tableting behaviors of binary powder mixtures. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 486–491, 2016.

TARDOS, Gabriel I.; KHAN, M. Irfan; MORT, Paul R. Critical parameters and limiting conditions in binder granulation of fine powders. **Powder Technology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 245–258, 1997.

TATSUMI, Daisuke; ISHIOKA, Satoshi; MATSUMOTO, Takayoshi. Effect of fiber concentration and axial ratio on the rheological properties of cellulose fiber suspensions. **Nihon Reoroji Gakkaishi**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 27–32, 2002.

TAYEB, Ali H. *et al.* **Cellulose nanomaterials-binding properties and applications: A review**. [S. l.]: MDPI AG, 2018.

TEO, Hwee Li; WAHAB, Roswanira Abdul. **Towards an eco-friendly deconstruction of agro-industrial biomass and preparation of renewable cellulose nanomaterials: A review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2020.

THOMAS, Bejoy *et al.* Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 118, n. 24, p. 11575–11625, 2018.

THOORENS, Gregory *et al.* Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment—A review. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 473, n. 1–2, p. 64–72, 2014.

TONOLI, G. H.D. *et al.* Cellulose micro/nanofibres from Eucalyptus kraft pulp: Preparation and properties. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 80–88, 2012.

- TRACHE, Djalal *et al.* **Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Applications**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020. Disponível em: Acesso at: 3 Jul. 2021.
- TRACHE, Djalal *et al.* Recent progress in cellulose nanocrystals: Sources and production. **Nanoscale**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 1763–1786, 2017.
- TUZZIN, Glaiton *et al.* Nanofibrillated cellulose from tobacco industry wastes. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 148, p. 69–77, 2016. Disponível em: Acesso at: 15 Oct. 2018.
- UETANI, Kojiro; YANO, Hiroyuki. Nanofibrillation of wood pulp using a high-speed blender. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 348–353, 2011.
- VAN MELKEBEKE, B.; VERVAET, C.; REMON, J.P. Validation of a continuous granulation process using a twin-screw extruder. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 356, n. 1–2, p. 224–230, 2008.
- VARTIAINEN, Jari *et al.* Health and environmental safety aspects of friction grinding and spray drying of microfibrillated cellulose. **Cellulose**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 775–786, 2011.
- VILA, C. *et al.* Extracting value from Eucalyptus wood before kraft pulping: Effects of hemicelluloses solubilization on pulp properties. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 8, p. 5251–5254, 2011.
- WANG, Xin *et al.* Preparation and properties of paint prepared with nanofibrillated cellulose and waterborne epoxy resin. **BioResources**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 802–825, 2022.
- WONG, Sam *et al.* Fibrillar pharmacology of functionalized nanocellulose. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 157, 2021.
- WÜSTENBERG, Tanja. Cellulose. *In*: WÜSTENBERG, Tanja (org.). **Cellulose and cellulose derivatives in the food industry: fundamentals and applications**. First Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014. p. 91–142.
- WYNENDAELE, Evelien *et al.* Sustainability in drug discovery. **Medicine in Drug Discovery**, [s. l.], v. 12, p. 100107, 2021.
- XHANARI, Klodian *et al.* Structure of nanofibrillated cellulose layers at the o/w interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 356, n. 1, p. 58–62, 2011.
- YU, Sujie *et al.* Nanocellulose from various biomass wastes: Its preparation and potential usages towards the high value-added products. **Environmental Science and Ecotechnology**, [s. l.], v. 5, p. 100077, 2021.
- ZIYANI, Layella; FATAH, Nouria. Use of experimental designs to optimize fluidized bed granulation of maltodextrin. **Advanced Powder Technology**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 1069–1075, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apt.2014.02.013>.

Anexos

Além disso, serão verificados parâmetros hematológicos e bioquímicos e histopatologia de órgãos.

- 7) FINALIDADE DO PROJETO: Ensino Pesquisa
- 8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:
- | | | |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|
| Título | <input checked="" type="checkbox"/> Adequado | <input type="checkbox"/> Comentários |
| Introdução | <input checked="" type="checkbox"/> Adequada | <input type="checkbox"/> Comentários |
| Objetivos | <input checked="" type="checkbox"/> Adequados | <input type="checkbox"/> Comentários |
| Relevância e Justificativa | <input checked="" type="checkbox"/> Adequados | <input type="checkbox"/> Comentários |
| Materiais e Métodos | <input checked="" type="checkbox"/> Adequados | <input type="checkbox"/> Comentários |
| Cronograma para execução da pesquisa | <input checked="" type="checkbox"/> Adequado | <input type="checkbox"/> Comentários |
| Orçamento e fonte financiadora | <input checked="" type="checkbox"/> Adequados | <input type="checkbox"/> Comentários |
| Referências Bibliográficas | <input checked="" type="checkbox"/> Adequadas | <input type="checkbox"/> Comentários |

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim

Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B



C

D

E

Justifique:

Ensaio de toxicidade aguda apresenta desconforto de intensidade moderada

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral:

Sim

Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:

Sim

Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia:

Sim

Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Não se aplica

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada
Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

A dose da substância que será utilizada para eutanásia deverá ser 3x maior que a dose anestésica.

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Biotério da UFCSPA prédio 3- sala de experimentação

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
2º semestre de 2018	Ratas wistar	fêmeas	35

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Data de início: 1º semestre de 2018 Data de Término: 1º semestre de 2019

Comentários gerais sobre o projeto:

O projeto está aprovado com a seguinte ressalva: corrigir no formulário de utilização dos animais no item 10.1. (Estresse) onde se lê “compostos imidazólicos” corrigir por nanofibras lignocelulósicas de caule do tabaco.

Anexo 2. Cadastro de acesso ao patrimônio genético no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SiSGen).



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão
Cadastro nº AF1D73B**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AF1D73B**
 Usuário: **Universidade de Caxias do Sul**
 CPF/CNPJ: **88.648.761/0001-03**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Nicotiana tabacum

Título da Atividade: **Desenvolvimento farmacotécnico de comprimidos contendo nanofibras de celulose de caule de tabaco como adjuvante de compressão**

Equipe

Venina dos Santos	Universidade de Caxias do Sul
Valeria Weiss Angeli	Universidade de Caxias do Sul
Rosmary Nichele Brandalise	Universidade de Caxias do Sul
Léticia Scherer Koester	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Keth Ribeiro Garcia	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Ruy Carlos Ruver Beck	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Eliane Dallegrove	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Ale

Data do Cadastro: **31/10/2018 14:06:25**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **23:13** de **03/02/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**