

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**IMPRESSÃO 3D DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS COM**  
**PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS**

**Camila Leites Reginatto**

**Dissertação de Mestrado**

Porto Alegre, 2024

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais**

**IMPRESSÃO 3D DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS COM**  
**PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS**

**Camila Leites Reginatto**

Dissertação realizada sob a orientação do Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Rosane Michele Duarte Soares e co-orientação do Prof.  
Dr. Alexandre Fuentesfria, apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como  
requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em  
Ciência dos Materiais.

Porto Alegre, 2024

### CIP - Catalogação na Publicação

Reginatto, Camila Leites  
IMPRESSÃO 3D DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS COM  
PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS / Camila Leites Reginatto.  
-- 2024.  
87 f.  
Orientadora: Rosane Michele Duarte Soares.

Coorientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre,  
BR-RS, 2024.

1. Hidrogel. 2. Impressão 3D. 3. Genipina . 4.  
Líquidos iônicos. 5. Antifúngico. I. Duarte Soares,  
Rosane Michele, orient. II. Fuentefria, Alexandre  
Meneghello, coorient. III. Título.

*“Dedico este trabalho a minha família”*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, André e Cristiane por serem meu porto seguro e meu ponto de equilíbrio, obrigada a tudo o que vocês já fizeram e fazem por mim.

À minha orientadora professora Dr<sup>a</sup>. Rosane Michele Duarte Soares por me guiar na jornada de combinar impressão 3D e hidrogéis. Agradeço os conselhos, o olhar atento, as conversas e a confiança investida de entregar a nova impressora 3D do laboratório em minhas mãos.

Ao meu co-orientador Alexandre Fuentefria pelo auxílio e seus conhecimentos farmacológicos.

Às minhas colegas de apartamento e laboratório Jóice Scheibel e a Laiane Souza pelas conversas, pelos conselhos, pelas risadas, pelos cafés, os pães e os bolos e até as discussões científicas.

À Flávia Sonaglio por ter introduzido o mundo dos hidrogéis na minha vida, me apresentando a quitosana.

À minha colega e amiga Manoela Mace por ter mergulhado de cabeça comigo no mundo da impressão 3D de hidrogéis e ter compartilhado experiências significantes para a realização deste projeto.

Ao Aluno de doutorado Elí Esparza e ao professor Dr. Plinho Francisco Hertz pela extração e fornecimento de genipina.

À Marianne Schaeffer, Cláudio Backes, pelos ensinamentos compartilhados, cafés, pelas discussões científicas, as risadas, as músicas cantadas, mas acima de tudo pela amizade.

Aos ICs Fernanda e Guilherme por terem sido essenciais a este trabalho, a ajuda de vocês está em cada um desses resultados.

À professora Dr<sup>a</sup>. Clarissa P. Frizzo e ao seu aluno Bruno L. Hennemann pelo fornecimento dos líquidos iônicos utilizados neste trabalho.

A professora Dr<sup>a</sup>. Dinara Jaqueline Moura e suas alunas na UFCSPA, Paola, Caroline e Victória pela realização dos testes de citotoxicidade e pelas contribuições para este trabalho.

Aos colegas de laboratório Rodrigo e Avenir pelo auxílio e condução dos testes mecânicos apresentados neste trabalho.

A todos que, de alguma forma, me ajudaram para eu chegar até aqui.

*"Devemos acreditar que somos talentosos para algumas coisas, e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada." Marie Curi*

## RESUMO

Infecções fúngicas representam um problema para a saúde, especialmente devido à resistência medicamentosa. Neste sentido, a adequação de biomateriais biocompatíveis e biodegradáveis capazes de carrear fármacos são uma alternativa promissora. Hidrogéis são reconhecidos carreadores de fármacos capazes de interagir com o ambiente biológico promovendo adesão e crescimento celular. A aplicação de hidrogéis como tinta de impressão 3D apresenta uma alternativa de tratamento personalizável, além de apresentar aumento da superfície de contato e liberação de fármaco através dos arca-bouços projetados. Com esta finalidade, foram desenvolvidos hidrogéis à base de quitosana e gelatina com incorporação de líquidos iônicos contendo fluconazol, para impressão 3D, visando uma alternativa ao tratamento de infecções fúngicas provocadas por *Candida Albicans*. Os hidrogéis foram impressos por manufatura aditiva de semissólidos (impressão 3D SSE) e reticulados com genipina para melhoria das propriedades mecânicas. A caracterização reológica realizada por ensaios de curva de fluxo e reologia oscilatória demonstrou que os hidrogéis possuem perfil pseudoplástico e tixotrópico. Os espectros de FTIR-ATR não demonstraram bandas relacionadas a reticulação covalente dos hidrogéis com genipina, porém através da deconvolução das bandas referentes a aminas secundárias e amidas, foi possível averiguar que quanto maior a razão entre as áreas, maior a reticulação obtida. A reticulação com genipina e acarretou em aumento da temperatura para a transição vítrea ( $T_g$ ) dos hidrogéis, enquanto que a adição de líquidos iônicos promove o decréscimo da  $T_g$ . A adição de líquidos iônicos altera as interações existentes entre a matriz polimérica e o reticulante, promovendo interferências no grau de reticulação. Os hidrogéis demonstraram menor grau de inchamento quanto maior a adição de genipina, porém, maior estabilidade durante o ensaio. Já a presença do líquido iônico incrementou o grau de intumescimento e reduziu a estabilidade em meio aquoso. O ensaio mecânico de compressão demonstrou que a adição de genipina promoveu melhoria das características mecânicas do hidrogel. Quanto aos ensaios antimicrobianos, hidrogéis contendo genipina demonstraram interessante resultado frente a *Candida albicans*, impedindo seu crescimento em sua superfície, enquanto que a adição de líquidos iônicos demonstrou a inibição do crescimento fúngico através da formação de halos. A adição de genipina promoveu melhor viabilidade celular na superfície dos hidrogéis, enquanto que, a adição de líquidos iônicos, diminui a viabilidade. Contudo, a impressão 3D de hidrogéis a base de quitosana e gelatina com incorporação de líquidos iônicos e reticulados por genipina se apresenta como uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas ocasionadas por *C. albicans*.

**Palavras chave:** Impressão 3D, Hidrogéis, Quitosana, Gelatina, Genipina, Líquidos iônicos.

## **ABSTRACT**

Fungal infections represent a health problem, especially due to drug resistance. In this sense, the suitability of biocompatible and biodegradable biomaterials capable of carrying drugs is a promising alternative. Hydrogels are recognized drug carriers capable of interacting with the biological environment, promoting cell adhesion and growth. Applying hydrogels as 3D printing ink presents a customizable treatment alternative, as well as increased contact surface area and drug release through designed scaffolds. With this purpose, hydrogels based on chitosan and gelatin with the incorporation of ionic liquids containing fluconazole were developed for 3D printing, aiming at an alternative to the treatment of fungal infections caused by *Candida Albicans*. The hydrogels were printed by additive semisolids (3D SSE) manufacturing and crosslinked with genipin to improve mechanical properties. Rheological characterization performed by flow curve and oscillatory rheology tests demonstrated that the hydrogels have a pseudoplastic and thixotropic profile. FTIR-ATR spectra did not show bands related to the covalent crosslinking of hydrogels with genipin, however, through deconvolution of bands related to secondary amines and amides, it was possible to ascertain that the higher the ratio between the areas, the greater the crosslinking obtained. Crosslinking with genipin increased the glass transition temperature ( $T_g$ ) of the hydrogels, while the addition of ionic liquids promoted a lower  $T_g$ . Adding ionic liquids alters the interactions between the polymeric matrix and the crosslinking agent, promoting changes in the degree of crosslinking. The hydrogels showed a lower degree of swelling with higher genipin addition; however, they had greater durability in PBS medium. Hydrogels containing ionic liquids showed a higher degree of swelling and lower durability in PBS medium. The compression mechanical test demonstrated that the addition of genipin improved the mechanical characteristics of the hydrogel, as well as the ionic interactions between the ionic liquids and the hydrogel. Hydrogels containing genipin showed interesting results against *Candida albicans*, preventing its growth on the surface, while the addition of ionic liquids demonstrated inhibition of fungal growth through halo formation. The addition of genipin promoted better cell viability on the surface of the hydrogels, whereas the addition of ionic liquids decreased viability.

**Keywords:** 3D Printing, Hydrogels, Chitosan, Gelatin, Genipin, Ionic Liquids.

## Lista de Figuras

Figura 1- Microscopia eletrônica de varredura de biofilme formado por hifas maduras de <i>C. albicans</i> Ramage et al., (2005).....	18
Figura 2- Estrutura molecular do Fluconazol.....	19
Figura 3- Estrutura molecular dos líquidos iônicos [C12MIM]Br e [C16MIM]Br.....	20
Figura 4- Estrutura micelar dos líquidos iônicos com fluconazol Onde a) [C12MIM]Br ou E8 e b) [C16MIM]Br ou E15.....	21
Figura 5- Estrutura química da quitosana.....	22
Figura 6- Estrutura química da gelatina. Kommareddy et al., (2007).....	23
Figura 7- Estrutura química da genipina.....	25
Figura 8- Reação de reticulação entre quitosana e genipina, segundo Dimida et al., (2015).....	25
Figura 9- Hidrogéis de quitosana/gelatina em diferentes concentrações de reticulação com genipina, onde a) Quitosana/gelatina 0,0% de genipina , b) Quitosana/gelatina com solução 0,25% (m/v) em genipina ,c) Quitosana/gelatina com solução 0,5% (m/v) em genipina e d) Quitosana/gelatina com solução 1,0% (m/v) em genipina. Fonte: de própria autoria.....	26
Figura 10- . Modelo de funcionamento Impressora 3D FDM, adaptado de Freitas et al., (2020).....	27
Figura 11- Esquema do processo de criação do objeto 3D para impressão. Fonte de própria autoria.....	28
Figura 12- Evolução da Impressão 3D.....	29
Figura 13- Mecanismos de Impressão 3D de Semissólidos. Fonte: De própria autoria....	30
Figura 14- Impressora 3D SLS modelo 3DBS Genesis.....	36
Figura 15- Arcabouço projetado para impressão: a) vista superior, b) vista isométrica e c) vista militar.....	37
Figura 16- Fluxograma da forma utilizada do material produzido em cada uma das análises de caracterização.....	38
Figura 17- Fluxograma análises reológicas. Fonte: De própria autoria.....	38
Figura 18- Reação química entre ninidrina e quitosana, formando o composto Púrpura de Rühmann.....	40
Figura 19- hidrogéis impressos a partir de quitosana/gelatina a) hidrogel quitosana/gelatina, b) hidrogel quitosana/ gelatina reticulado com solução de genipina 1% (m/v)....	44
Figura 20- Curva de Fluxo dos hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL E8 e QUI/GEL E15.....	45

Figura 21- Varredura de amplitude dos hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL E8 e QUI/GEL E15 pré-impressão 3D.....	47
Figura 22- Varredura de frequência dos hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL E8 e QUI/GEL E15, pré-impressão 3D.....	48
Figura 23- Teste 3ITT aplicado nos hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL E8 e QUI/GEL E15 pré-impressão.....	49
Figura 24- Espectro FTIR-ATR obtido para os pós dos polímeros quitosana e gelatina e o hidrogel QUI/GEL.....	50
Figura 25- Espectros de FTIR-ATR para os hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL 0,25%, QUI/GEL 0,5% e QUI/GEL 1,0%.....	51
Figura 26- Deconvolução das bandas referentes à amina primária e amida nos espectro de FTIR-ATR para os hidrogéis. a) QUI/GEL, b) QUI/GEL 0,25% , c) QUI/GEL 0,5%, d) QUI/GEL 1,0%.....	52
Figura 27- Espectros de FTIR-ATR obtidos para os hidrogéis: a) QUI/GEL E8, QUI/GEL E8 0,25%, QUI/GEL E8 0,5%, QUI/GEL E8 1,0% e b) QUI/GEL E15, QUI/GEL E15 0,25%, QUI/GEL E15 5,0%, QUI/GEL E15 1,0%.....	54
Figura 28- Deconvolução das bandas referentes a amina primária e amida nos espectros. a) QUI/GEL E8, b) QUI/GEL E8 0,25GEN, c) QUI/GEL E8 0,5% GEN, d) QUI/GEL E8 1,0% GEN.....	54
Figura 29- Deconvolução das bandas referentes a amina primária e amida nos espectros. a) QUI/GEL E15, b) QUI/GEL E15 0,25GEN, c) QUI/GEL E15 0,5% GEN, d) QUI/GEL E15 1,0% GEN.....	55
Figura 30- Relação entre as temperaturas de Tg apresentadas na análise de DSC e a estrutura dos hidrogéis formulados e reticulados.....	57
Figura 31- Grau de reticulação QUI/GEL 0,25%, QUI/GEL 0,5%, QUI/GEL 1,0%, QUI/GEL E8 0,25%, QUI/GEL E8 0,5%, QUI/GEL E8 1,0%, QUI/GEL E15 0,25%, QUI/GEL E15 0,5% e QUI/GEL E15 1,0%.....	59
Figura 32- Gráfico da análise de grau de inchamento para os hidrogéis: a) QUI/GEL ,QUI/GEL 0,25%, QUI/GEL 0,5% e QUI/GEL 1,0%, b)QUI/GEL E8, QUI/GEL E8 0,25%, QUI/GEL E8 0,5% e QUI/GEL E8 1,0%, c) QUI/GEL E15, QUI/GEL E15 0,25%, QUI/GEL E15 0,5% e QUI/GEL E15 1,0%.....	60
Figura 33-Gráfico de compressão mecânica dos hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL 0,25%, QUI/GEL 0,5%, QUI/GEL 1,0%, QUI/GEL E8 QUI/GEL E8 0,25%, QUI/GEL E8 0,5%, QUI/GEL E8 1,0%, QUI/GEL E15, QUI/GEL E15 0,25%, QUI/GEL E15 0,5% e	

QUI/GEL E15 1,0%.....	63
Figura 34- Ilustração do efeito da reticulação na matriz polimérica no ensaio de compressão mecânica, com base em Chen et al., (2009).....	63
Figura 35- Resultado do ensaio de halo de inibição para os hidrogéis QUI/GEL, a) QUI/GEL, b) QUI/GEL 0,25%, c) QUI/GEL 0,50% E d) QUI/GEL 1,0%.....	64
Figura 36- Resultado do ensaio de halo de inibição para os hidrogéis QUI/GEL E8, a) QUI/GEL E8, b) QUI/GEL E8 0,25%, c) QUI/GEL E8 0,50% E d) QUI/GEL E8 1,0%.....	66
Figura 37- Resultado do ensaio de halo de inibição para os hidrogéis QUI/GEL E15, a) QUI/GEL E15, b) QUI/GEL E15 0,25%, c) QUI/GEL E15 0,50% E d) QUI/GEL E15 1,0%.....	66
Figura 38- Média da viabilidade celular obtida dos hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL 0,25%, QUI/GEL 0,5%, QUI/GEL 1,0%, QUI/GEL E8, QUI/GEL E8 0,25%, QUI/GEL E8 0,5%, QUI/GEL E8 1,0%, QUI/GEL E15, QUI/GEL E15 0,25%, QUI/GEL E15 0,5% e QUI/GEL E15 1,0% por ensaio azul de tripan.....	68
Figura 39- Grau de intumescimento dos hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL 0,25%, QUI/GEL 0,5%, QUI/GEL 1,0%, QUI/GEL E8, QUI/GEL E8 0,25%, QUI/GEL E8 0,5%, QUI/GEL E8 1,0%, QUI/GEL E15, QUI/GEL E15 0,25%, QUI/GEL E15 0,5% e QUI/GEL E15 1,0% em 24h.....	69
Figura 40- Imagens obtidas por MEV das amostras: a) QUI/GEL, b) QUI/GEL 0,25% GEN, c) QUI/GEL 0,5% GEN e d) QUI/GEL 1,0% GEN.....	70
Figura 41- Imagens de MEV obtidas para os hidrogéis: a) QUI/GEL E8, b) QUI/GEL E8 0,25% GEN, c) QUI/GEL E8 0,5% GEN e d) QUI/GEL E8 1,0% GEN.....	71
Figura 42-Imagens de MEV obtidas para os hidrogéis: a) QUI/GEL E15, b) QUI/GEL E15 0,25% GEN, c) QUI/GEL E15 0,5% GEN e d) QUI/GEL E15 1,0% GEN.....	72
Figura 43- Termograma de DSC para os hidrogéis QUI/GEL, QUI/GEL 0,25%, QUI/GEL 0,5% e QUI/GEL 1,0%.....	86
Figura 44-Termograma de DSC para os hidrogéis QUI/GEL E8, QUI/GEL E8 0,25%, QUI/GEL E8 0,5% e QUI/GEL E8 1,0%.....	86
Figura 45-Termograma de DSC para os hidrogéis QUI/GEL E15, QUI/GEL E15 0,25%, QUI/GEL E15 0,5% e QUI/GEL E15 1,0%.....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

SSE- Extrusão de Semissólidos

DIW- Escrita direta SLS- Sinterização seletiva a laser

SLA- Estereolitografia

CAD- Projeto e desenho assistidos por computador

FDM- Modo de extrusão fusão por deposição

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

FTIR-ATR – Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier no Modo Refletância Total Atenuada

DSC- Calorimetria Exploratória Diferencial

TGA- Análise Termogravimétrica

cm- Centímetro

µm- Micrômetro

mm- Milímetro

g- Gramas

mg- Miligrama

kg- Quilograma

µg- Micrograma

mL- Mililitros

µL- Microlitros

3D- Tridimensional

h- Hora

min- Minutos

s- Segundos

Pa- Pascal

Abs- Absorbância

nm- Nanômetro

U.V- Ultravioleta

T<sub>g</sub>- Temperatura de transição vítrea

LI- Líquidos iônicos

E<sub>8</sub>- Líquido iônico imidazólico [C<sub>12</sub>MIM]Br

E<sub>15</sub>-Líquido iônico imidazólico [C<sub>16</sub>MIM]Br

QUI/GEL- Hidrogel de quitosana e gelatina

QUI/GEL 0,25% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina reticulado com solução de 0,25% de genipina

QUI/GEL 0,5% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina reticulado com solução de 0,5% de genipina

QUI/GEL 1,0% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina reticulado com solução de 1,0% de genipina

QUI/GEL E<sub>8</sub>- Hidrogel de quitosana e gelatina com líquido iônico [C<sub>12</sub>MIM]Br

QUI/GEL E<sub>8</sub> 0,25% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina com líquido iônico [C<sub>12</sub>MIM]Br reticulado com solução de 0,25% de genipina

QUI/GEL E<sub>8</sub> 0,5% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina com líquido iônico [C<sub>12</sub>MIM]Br reticulado com solução de 0,5% de genipina

QUI/GEL E<sub>8</sub> 1,0% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina com líquido iônico [C<sub>12</sub>MIM]Br reticulado com solução de 1,0% de genipina

QUI/GEL E<sub>15</sub>- Hidrogel de quitosana e gelatina com líquido iônico [C<sub>16</sub>MIM]Br

QUI/GEL E<sub>15</sub> 0,25% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina com líquido iônico [C<sub>16</sub>MIM]Br reticulado com solução de 0,25% de genipina

QUI/GEL E<sub>15</sub> 0,5% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina com líquido iônico [C<sub>16</sub>MIM]Br reticulado com solução de 0,5% de genipina

QUI/GEL E<sub>15</sub> 1,0% GEN- Hidrogel de quitosana e gelatina com líquido iônico [C<sub>16</sub>MIM]Br reticulado com solução de 1,0% de genipina

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
	Infecções fúngicas.....	17
	Candida albicans.....	17
	Fluconazol.....	19
	Líquidos Iônicos.....	20
	Hidrogéis.....	21
	Quitosana.....	22
	Gelatina.....	23
	Reticulação de Hidrogéis.....	24
	Impressão 3D de hidrogéis.....	26
2.	OBJETIVOS.....	32
	2.1 Objetivo geral.....	32
	2.2 Objetivos específicos.....	32
3.	MATERIAL E METODOLOGIA.....	33
	3.1 Materiais.....	33
	3.2 Produção dos Hidrogéis.....	34
	3.3 Produção dos Hidrogéis com Líquido Iônico.....	34
	3.4 Impressão 3D dos Hidrogéis.....	36
	3.5 Reticulação.....	37
4.	CARACTERIZAÇÃO.....	38
	4.1 Reologia.....	38
	4.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier modo Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	39

4.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	39
4.4 Grau de Reticulação (%).....	40
4.5 Grau de Intumescimento (%).....	41
4.6 Ensaio Mecânicos.....	41
4.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	42
4.8 Ensaio de disco difusão- Halo de Inibição ( <i>Candida albicans</i> ).....	42
4.9 Citotoxicidade.....	43
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1. Hidrogéis.....	44
5.2. Reologia.....	45
5.3. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier modo Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	50
5.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	56
5.7. Grau de Reticulação (%).....	58
5.8 Grau de Intumescimento (%).....	60
5.8. Ensaio Mecânicos.....	62
5.9. Ensaio de Halo de Inibição.....	64
5.10. Citotoxicidade.....	68
5.11 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	70
6. CONCLUSÃO.....	74
7.REFERÊNCIAS.....	76
8. ANEXO.....	86
8.1 Termogramas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	86

# 1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas são consideradas atualmente um grave problema de saúde pública, pois além de estarem aumentando no mundo, seu tratamento oferece resistência às intervenções medicamentosas convencionais, devido à popularização do uso de medicamentos antineoplásicos e imunossupressores, além da utilização de antibióticos em larga escala e por longo período [1].

A *Candida albicans* se destaca como a espécie fúngica de maior incidência em infecções sistêmicas no mundo, fato que ocorre devido ao seu alto fator de virulência, provenientes da sua capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e abióticas, o que promove resistência ao tratamento [2].

O desenvolvimento de um novo sistema de tratamento é necessário, visando obter um combate eficiente à infecção fúngica causada por *Candida Albicans*, através da utilização de novas tecnologias que proporcionam melhora aos tratamentos já existentes.

Neste ínterim, a capacidade de imprimir estruturas tridimensionais customizáveis colocou a impressão 3D no cenário da engenharia de tecidos, permitindo a produção de suportes tridimensionais que auxiliam na proliferação e regeneração celular, reconstrução tecidual, além de atuarem como carreadores de fármacos [3]. Os suportes projetados são chamados de andaimes ou arcabouços e podem ser customizados em termos de forma, dimensão e porosidade.

A impressão de hidrogéis vem ganhando destaque devido à possibilidade de fabricação de estruturas biológicas sintéticas em uma matriz tridimensional. Assim, podem ser criados microambientes biológicos que podem facilitar as interações célula-célula e célula-matriz. A grande vantagem da utilização de hidrogéis como material para impressão 3D é a sua estrutura macromolecular, composta por cadeias poliméricas, que possuem a propriedade de expandir seu volume quando imersos em água, não se dissolvendo devido à presença de interações intermoleculares e/ou reticulações. Dessa forma, são capazes de manter a estrutura do solvente em sua rede estrutural tridimensional, o que também pode contribuir para o transporte de oxigênio e nutrientes quando utilizados, por exemplo, na engenharia de tecidos [4].

A quitosana é um copolímero catiônico obtido através da hidrólise alcalina da quitina extraída do exoesqueleto de crustáceos e insetos, sendo uma forma desacetilada da quitina. A cadeia polimérica da quitosana é composta por dois monômeros D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina e sua cadeia apresenta grupos amino (-NH<sub>2</sub>) e

hidroxila (-OH), que normalmente são utilizados para reagir com agentes reticulantes, melhorando assim as propriedades mecânicas da hidrogel de quitosana [5].

Outro polímero versátil é a gelatina, que é obtida através de processos que envolvem a desnaturação do colágeno, que ocorre através da clivagem ácida ou básica de ligações covalentes intermoleculares e intramoleculares. Devido à sua estrutura química, numerosos grupos funcionais se apresentam disponíveis ao longo da cadeia da gelatina, o que permite que a molécula sofra funcionalização, para o transporte de medicamento, ou mesmo algo mais simples, como uma reação de reticulação, para melhorar as propriedades mecânicas do material. Uma interessante estratégia de reticulação para hidrogéis contendo quitosana e gelatina é a aplicação de genipina, biomolécula extraída do jenipapo, que pode atuar como reticulante, pois tem a capacidade de se associar covalentemente a grupamentos amino, aumentando assim a estabilidade e melhorando a propriedades mecânicas do material [6].

O fluconazol é um fármaco já utilizado para o tratamento de *Candida albicans*, porém apresenta uma capacidade fungistática, e não fungicida, o que pode proporcionar ao fungo o desenvolvimento de maior resistência ao tratamento. Porém a adição de fluconazol em líquidos iônicos imidazólicos pode apresentar efeito sinérgico, capaz de promover maior inibição ao crescimento fúngico [7].

Dentro desta perspectiva, pretende-se explorar o efeito da adição de de líquidos iônicos imidazólicos contendo fluconazol aos arcabouços 3D formados por quitosana e gelatina. Assim como explorar o potencial deste hidrogel como biomaterial para o tratamento de infecções fúngicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### **Infecções fúngicas**

Os fungos são microrganismos eucarióticos, normalmente encontrados no meio ambiente, mas também estão presentes na microbiota de plantas, animais e seres humanos, normalmente de forma inofensiva, porém podem se tornar patógenos oportunistas em certas condições do meio [8].

As infecções causadas por fungos invasivos apresentam aumento em todo mundo, este aumento, está relacionado a maior resistência as drogas antimicrobianas existentes além da popularização do uso de medicamentos antineoplásicos e imunossupressores e utilização de antibióticos em larga escala e por longo período, o que pode tornar o tratamento inefetivo [1].

No Brasil os óbitos por infecções fúngicas, seguem a tendência mundial de crescimento, com o passar dos anos foi observado um caráter exponencial nos números registrados, de 1996 até 2021 foi registrado um total de 10.802 óbitos, e só nos anos de 2018 a 2021 foram registrados 1744 casos [9].

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que doenças infecciosas são as principais causadoras de mortalidade e incapacidade no mundo, as estimativas demonstram a ocorrência de 4,95 milhões de mortes anualmente [10]. O que levou a mesma a publicar pela primeira em 2017 a lista de agentes bacterianos multirresistentes, já em 2022 a OMS publicou pela primeira vez a lista de fungos patogênicos prioritários e emergentes, entre os fungos de prioridade crítica, pode-se encontrar *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. As infecções fúngicas podem ser classificadas em quatro grupos: superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas [11].

### **Candida albicans**

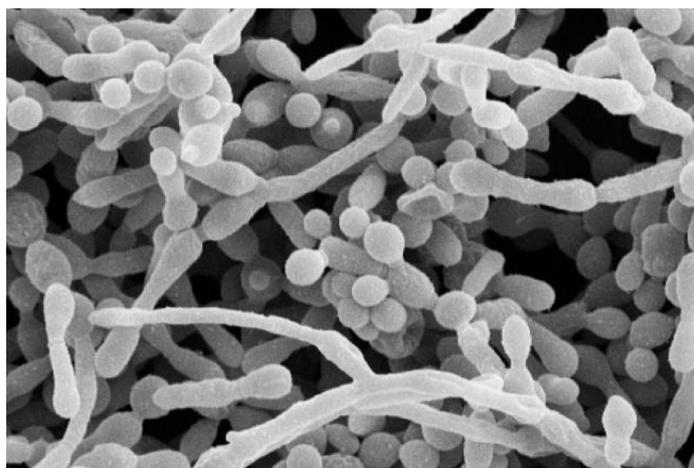
O fungo *Candida albicans*, representado na Figura 1, é considerado atualmente a causa mais comum de infecção fúngica grave e a mais comum em hospitais, cerca de 70% [12]. A maioria dessas infecções é causada por formação de um biofilme na superfície do hospedeiro ou em implantes, o que acarreta em alta morbidade e mortalidade [13]. A capacidade de formar biofilmes, junto a outros fatores de virulência, como a capacidade de produzir enzimas que degradam tecidos e alterar sua forma de levedura para a forma

de fungo filamentososo, se tornando mais invasiva, contribuem para este alto número de casos [14].

A *Candida albicans* é uma levedura unicelular de reprodução assexuada comumente presente na flora intestinal humana, podendo ser detectada na flora gastrointestinal e na boca em cerca de 60% dos seres humanos saudáveis [15]. Podendo apresentar várias morfologias, como, blastosporos, pseudo-hifas e hifas.

A parede celular da *C. albicans* é constituída de glucana, quitina e proteína. O que diferencia uma levedura de sua hifa é a quantidade de quitina presente na parede celular, ligeiramente maior na hifa do que na levedura [13]. Além de proteger a célula de condições ambientais estressantes como desidratação e mudanças de temperatura a membrana celular possui o papel de promover a comunicação da célula com o meio externo.

Figura 1- Microscopia eletrônica de varredura de biofilme formado por hifas maduras de *C. albicans* (Ramage et al. 2005)[16].



Apesar de ser encontrada de forma inofensiva no organismo de seres humanos saudáveis a *Candida albicans* é uma levedura oportunista que pode causar infecções em indivíduos imunocomprometidos, como no caso de pacientes em tratamento de câncer, AIDS e pacientes transplantados [17]. Normalmente presente na forma de levedura no organismo humano, a transição para forma de hifa, é o que está associada com sua forma patogênica [13].

A candidíase invasiva é uma infecção altamente mortal, apresentando taxas de mortalidade entre 40 e 60% [18]. Podendo se manifestar de diversas formas, desde a colonização de mucosas, apresentando baixa gravidade, até a ocorrência de

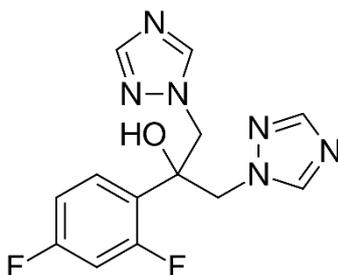
infecções graves, sistêmicas e mais profundas, instaladas normalmente na boca, vagina e trato intestinal, afetando vários órgãos do corpo e causando uma gama de infecções clínicas [19] [20].

### Fluconazol

Drogas azólicas, como o fluconazol, que possui alta biodisponibilidade e baixo efeito tóxico, são comumente utilizadas para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por *Candida albicans* [21]. Essa categoria de antifúngico surgiu no mercado na década de 80, como uma alternativa para o tratamento de micoses invasivas [22].

A estrutura molecular dos antifúngicos azólicos é caracterizada pela presença de um anel pentagonal com três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio (imidazólicos), ou dois carbonos e três de nitrogênio (triazólico) [20]. A figura 2 demonstra a estrutura molecular do fluconazol contendo dois anéis imidazólicos.

Figura 2- Estrutura molecular do Fluconazol.



O Fluconazol é obtido a partir da derivação de um álcool imidazólico, sendo considerada uma molécula bitriazólica sintética, que possui ação contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* [23], [24]. Considerado um antifúngico de amplo espectro, o fluconazol atua interagindo com a 14-desmetilase, enzima catalizadora da conversão de lanosterol em ergosterol, inibindo assim, a biossíntese de ergosterol. Como o ergosterol é um importante componente da membrana celular fungica sendo responsável pela estabilidade, rigidez e resistência a estressores físicos [25], sua inibição permite uma maior permeabilidade na membrana, além de prevenir a formação de leveduras [26].

Contudo, por ser uma droga fungistática, o fluconazol não mata o fungo patogênico, apenas inibe seu crescimento. Desta forma, é proporcionada uma oportunidade ao fungo patógeno desenvolver maior resistência ao medicamento. Outro fator importante é sua solubilidade, a qual é dificultada em meio aquoso, afetando a

biodisponibilidade e ação do fármaco. Assim é importante se estudar novas formas de aplicação do fluconazol, maneiras de promover sinergismo, aumentando a eficiência da droga frente ao tratamento de tecidos mucocutâneos infectados [7].

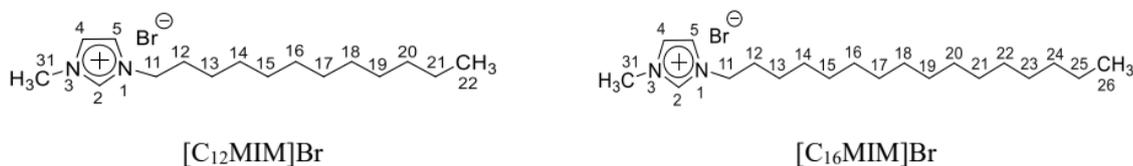
### Líquidos Iônicos

Como alternativa para superar as limitações existentes no emprego de fluconazol no tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. albican*, Hennemann *et al.*, (2022) [27], propôs a utilização de líquidos iônicos imidazólicos em emulsões de liberação do fármaco. Os líquidos iônicos atuam melhorando a solubilidade do fluconazol no meio, além de aumentarem a sua liberação tópica e transdérmica [28].

Os líquidos iônicos são compostos iônicos que possuem um cátion orgânico e um ânion, orgânico ou inorgânico, como demonstrado na Figura 3, podendo ser obtidos através de uma reação de quaternização e posterior troca iônica (apróticos) ou preparados por neutralização (próticos) [29],[30].

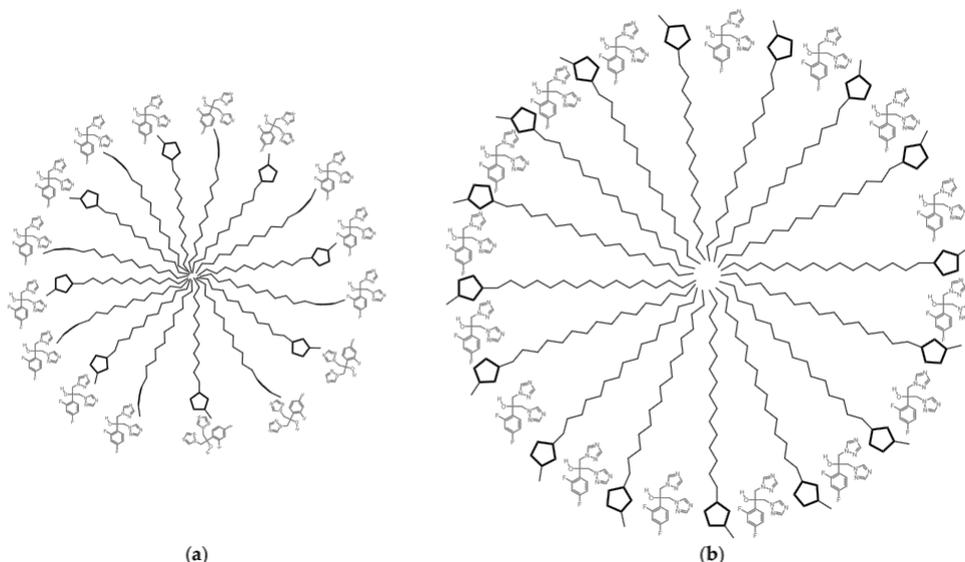
Descritos como sais orgânicos líquidos, os LI apresentam ponto de fusão menor que 100°C, o que faz com que sejam encontrados em sua forma líquida na temperatura ambiente [31],[32].

Figura 3- Estrutura molecular dos líquidos iônicos [C<sub>12</sub>MIM]Br e [C<sub>16</sub>MIM]Br.



Em seu estudo Hennemann *et al.* (2022) observou que os líquidos iônicos propostos, chamados de [C<sub>12</sub>MIM]Br ou E<sub>8</sub> e [C<sub>16</sub>MIM]Br ou E<sub>15</sub>, apresentam estrutura similar a micelas quando submetidos a presença do fármaco fluconazol, como mostrado na Figura 4. Este formato ocorre devido às interações intermoleculares (ligações de hidrogênio) presentes entre o fluconazol e as cabeças catiônicas dos LI. Curiosamente, possivelmente devido a essas interações, emulsões contendo LI apresentaram atividade inibitória superior à do fluconazol livre frente a *C. albicans*.

Figura 4- Estrutura micelar dos líquidos iônicos com fluconazol [32]. Onde a) [C12MIM]Br ou E<sub>8</sub> e b) [C16MIM]Br ou E<sub>15</sub>.



### Hidrogéis

Por definição, segundo a **International Union for Pure and Applied Chemistry** (IUPAC), hidrogéis são redes poliméricas capazes de absorver uma grande quantidade de água [33].

Quando empregados na engenharia de tecidos, os hidrogéis são utilizados na formulação de matrizes tridimensionais para o crescimento e multiplicação celular. Através de seu ambiente tridimensional que possui propriedades mecânicas semelhantes a de tecidos naturais, os hidrogéis permitem que as células, ao se multiplicarem, formem estruturas semelhantes aos tecidos já existentes [34].

Esta aplicação é possível devido a propriedade de grande destaque dos hidrogéis, sua biocompatibilidade, que permite sua aplicação no tecido biológico sem desencadear respostas imunológicas indesejáveis. Essa característica permite que estes biomateriais possuam ampla aplicação, tais como: curativos para feridas, carreadores de fármacos, implantes e sistemas poliméricos injetáveis [35], [36].

Outra grande vantagem de se empregar hidrogéis está em sua estrutura macromolecular. Por serem constituídos de cadeias poliméricas que possuem a

propriedade de expandir seu volume quando imersos em água, não se dissolvem devido a presença de interações intermoleculares e/ou reticulação. Desta forma, são capazes de manter a estrutura do solvente em sua rede estrutural tridimensional, o que também pode contribuir para o transporte de oxigênio e nutrientes quando são utilizados, por exemplo, na engenharia de tecidos.

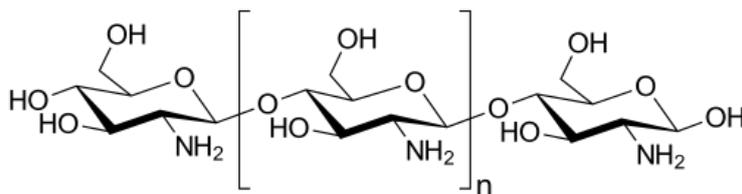
Quanto a preparação, podem ser obtidos a partir de polímeros sintéticos ou naturais, fornecendo diferentes propriedades físicas, químicas e mecânicas. Os hidrogéis de polímeros sintéticos permitem serem obtidos por processos químicos controláveis, possibilitando uma produção em larga escala mantendo as mesmas características como degradabilidade e propriedades mecânicas entre diferentes lotes. Já os hidrogéis de polímeros naturais apresentam a vantagem de se assemelharem a constituintes orgânicos, sendo biocompatíveis e possibilitando interações celulares. Porém apresentam desvantagens, como baixas propriedades mecânicas e alta variabilidade de composição, dependendo da fonte de extração [37], [38].

### Quitosana

Dentre os polímeros de origem natural, destaca-se a quitosana, amplamente aplicada na engenharia de tecidos, pode ser utilizada como matriz de liberação de fármacos, material para fios cirúrgicos e na produção de curativos para cicatrização de feridas. Essas aplicações são possíveis, devidas as características como, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, adesividade e capacidade hemostática [39][40].

A quitosana, é um copolímero catiônico, obtido através da hidrólise alcalina da quitina, extraída do exoesqueleto de crustáceos e insetos, sendo assim uma forma desacetilada da quitina. Sua cadeia polimérica é constituída por dois monômeros D-glucosamina e *N*-acetil-D-Glicosamina ligados por uma ligação glicosídica  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), que formam um polissacarídeo semicristalino, como mostra a Figura 5 [41],[42].

Figura 5-Estrutura química da quitosana .[43]



O grau de desacetilação da quitina influencia diretamente na massa molecular e

nas propriedades físicas e químicas que a quitosana pode apresentar.[44] O grau de desacetilação varia entre 60 e 100, e a massa molecular, de 300 a 1000kDa, o que pode alterar parâmetros como a solubilidade, reatividade em processos químicos e os comportamentos biológico, mecânico e reológico [45].

A quitosana é insolúvel em soluções neutras e alcalinas, mas é solúvel em soluções de ácidos diluídos, como ácido acético e ácido láctico, devido a presença de grupos amina em sua estrutura. As aminas em pH ácido, se apresentam protonados, as cargas se repelem e as cadeias poliméricas se afastam, facilitando a solubilização. Porém em pH maior que 6 as aminas perdem seus prótons e a quitosana se torna insolúvel, precipitando em solução [46], [44].

A presença dos grupos amina na quitosana, não auxiliam apenas em sua solubilização, mas também podem contribuir na melhoria das propriedades mecânicas da quitosana, consideradas baixas. A adição de outro polímero a quitosana, em uma blenda polimérica, faz com que, as interações intermoleculares, que podem ser, tanto iônicas, como covalentes, ou de menor energia, como ligações de hidrogênio, favoreçam o aumento de resistência mecânica [47],[48].

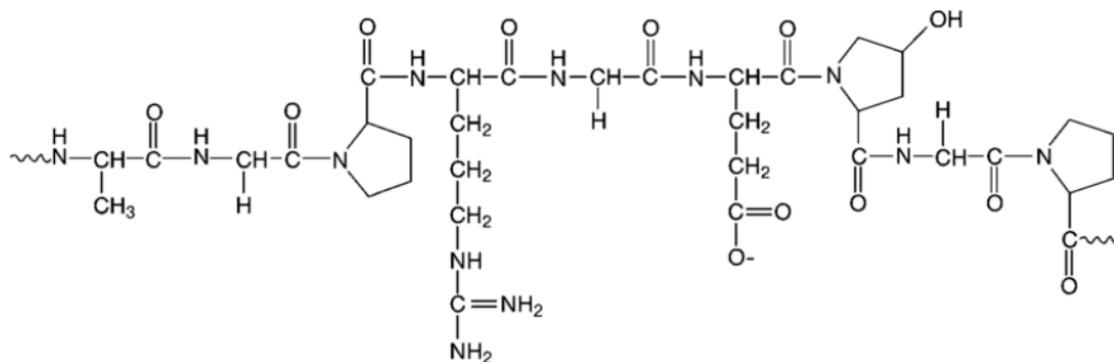
Outra forma de aumentar as propriedades mecânicas da quitosana é através de ligações covalentes ou interações iônicas de reticulação, onde a adição de uma molécula, permitir formar ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas da quitosana [49] [50].

### **Gelatina**

A gelatina, polímero natural de origem animal, mostrado na Figura 6, pode ser obtida através de processos que envolvem a desnaturação do colágeno, como a clivagem ácida ou básica das ligações não covalentes intermoleculares e intramoleculares entre as cadeias [51].

O tipo de clivagem empregada altera o produto obtido. A gelatina tipo B pode ser obtida pela hidrólise alcalina do colágeno, com pH entre 4,8 e 5,0, enquanto a gelatina tipo A é obtida através do tratamento ácido do colágeno com pH entre 7,0 e 9,0 [51],[52].

*Figura 6- Estrutura química da gelatina.(Kommareddy et al).[51]*



A gelatina forma géis físicos na presença de solventes polares com capacidade de realizar ligações de hidrogênio, em uma temperatura de gelação de 30°C. As ligações de hidrogênio entre domínios N-H de glicina (Gli) e C=O de prolina (Pro) são responsáveis por formar estrutura de tripla hélice no polímero, com regiões amorfas. As hélices apresentam interações de ligações de hidrogênio entre si e este efeito faz com que a temperatura para a desnaturação dos hidrogéis de gelatina aumente [53] [50].

A presença da sequência dos aminoácidos, arginina, glicina e aspartato (RGD), na estrutura polimérica da gelatina, permite com que este polímero seja empregado para adesão celular, estimulando o crescimento de células em sua superfície, além de ser biocompatível, biodegradável e além de bioabsorvível. Outro emprego da gelatina, é como agente de liberação de fármacos, pois a estrutura polimérica da gelatina permite interação com biomoléculas carregadas [54][48].

Ainda, por ser um poliânion, a gelatina é capaz de interagir de forma eletrostática com policações, como a quitosana, essa interação forma um complexo insolúvel, assim, formando géis insolúveis e reversíveis, capazes de serem aplicados como biomaterial [55],[56].

### **Reticulação de Hidrogéis**

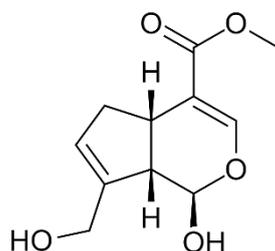
A reticulação física de hidrogéis, considerada um processo reversível, ocorre por interações iônicas, ligações de hidrogênio e coordenação metálica, além de interações  $\pi$ - $\pi$  que podem ocorrer entre as cadeias que constituem a rede tridimensional do polímero.

Já o hidrogéis por reticulação química, são hidrogéis de reticulação irreversível e estáveis, formados através de ligações covalentes pela presença de um agente reticulante [57].

Dentre os agentes de reticulação, a genipina (Figura 7), um composto extraído do jenipapo, é uma molécula que pode se associar covalentemente a diversos polímeros,

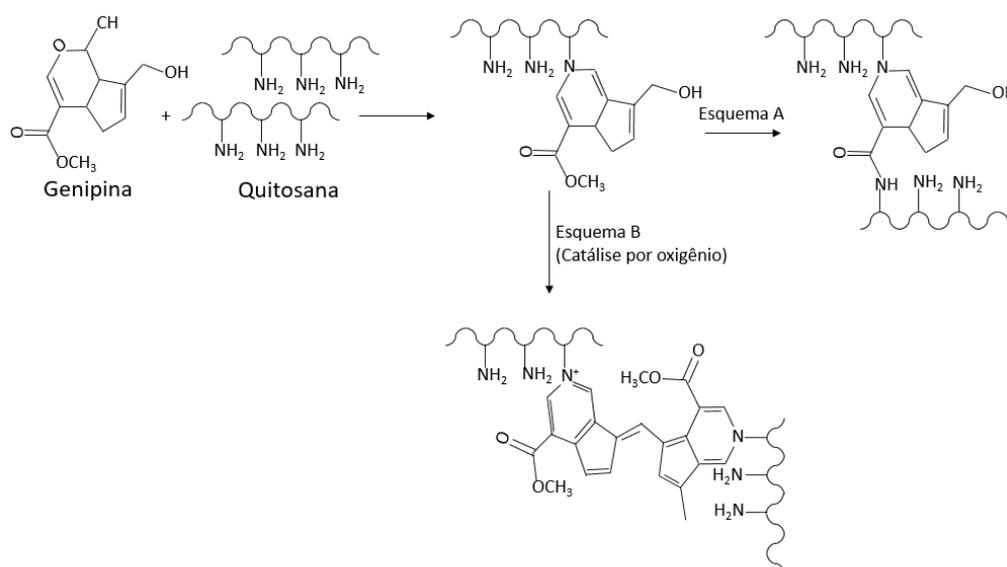
elevando assim sua estabilidade e propriedades mecânicas dos materiais formulados [6].

Figura 7- Estrutura química da genipina.



A reação da genipina com a quitosana (Figura 8), por exemplo, ocorre por diferentes mecanismos, ao se alterar o pH do meio reacional. Em meios ácidos e neutros, a reação é caracterizada por um ataque nucleofílico dos grupamentos amino pertencentes a quitosana, ao carbono C-3 da genipina. Em seguida, o anel di-hidropirano se abre, sendo atacado pelo grupamento amino secundário da quitosana, formando ligações moleculares entre as cadeias de quitosana e a genipina [58]. Em meio básico a reação ocorre através do ataque nucleofílico dos íons hidroxila presentes na solução aquosa que acarretam na abertura do anel da genipina, formando grupos aldeído intermediários, os quais sofrem condensação aldólica. Em outras palavras, os grupos aldeídos formados da genipina podem sofrer reação de *Schiff* com os grupos amino presentes na quitosana, formando desta forma, pontos de reticulação entre as cadeias [59].

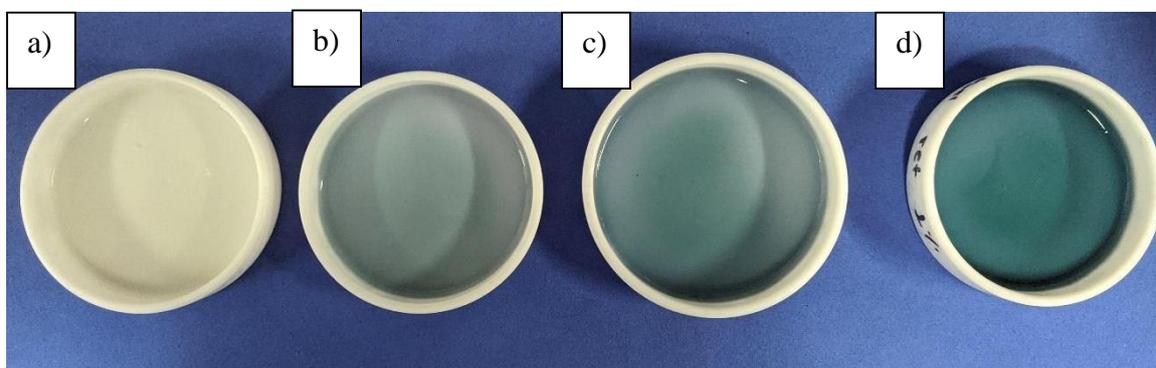
Figura 8- Reação de reticulação entre quitosana e genipina, segundo Dimida et al., 2015 [60].



A reação que ocorre de forma mais rápida entre a quitosana e a genipina, é o ataque

nucleofílico do grupo amino da quitosana ao carbono C-3 olefínico, como consequência desse ataque, ocorre a formação de amina terciária, já a segunda etapa da reação, que ocorre de forma mais lenta, é a formação de um grupamento amida que provem da substituição nucleofílica do éster presente no anel de genipina. Assim não apenas a genipina se liga a quitosana, mas pode ocorrer uma pequena copolimerização da genipina (Figura 7) [61] . Uma consequência da reação entre a quitosana e a genipina é o surgimento de coloração azul, como mostra a Figura 9, que aparece tanto devida a reação nucleofílica com as aminas quanto pela presença de radicais de oxigênio. Ainda, segundo Dimida *et al.* (2015) [60] a coloração azul também é resultando da alta conjugação da ligação dupla C-C presentes na genipina, resultando em uma molécula cromófora. Estudos realizados por Mi *et al.* (2003) [62] demonstraram que na faixa de pH ácido, a reticulação presente é de caráter iônico, enquanto que em pH básicos, a tendência é de que ocorra reticulações covalentes, ou seja, reações de reticulação irreversíveis.

Figura 9- Hidrogéis de quitosana/gelatina em diferentes concentrações de reticulação com genipina, onde a) Quitosana/gelatina 0,0% de genipina , b) Quitosana/gelatina com solução 0,25% (m/v) em genipina ,c) Quitosana/gelatina com solução 0,5% (m/v) em genipina e d) Quitosana/gelatina com solução 1,0% (m/v) em genipina.Fonte: de própria autoria..



### **Impressão 3D de hidrogéis**

A técnica de manufatura aditiva, também conhecida como Impressão 3D é uma tecnologia que surgiu a partir de 1984, sendo inicialmente desenvolvida e patenteada por Charles Hull, sob a denominação de estereolitografia. Até então, a técnica consistia em criar um objeto em três dimensões, onde repetidas camadas de uma resina polimérica eram adicionadas enquanto sofriam o processo de cura com o auxílio de uma lâmpada U.V. Desta forma, o material ia adquirindo forma e enrijecimento durante sua elaboração

[63].

Mais tarde, em 1998 Scott Crump desenvolveu o modelo de fusão por deposição (FDM), demonstrado na Figura 10, que consiste em depositar um polímero (termoplástico) fundido, camada por camada, de maneira a se construir o objeto desejado [64].

No método de impressão FDM, o objeto a ser impresso é projetado através de um programa de computador, como o CAD (desenho assistido por computador), o desenho projetado é convertido para o formato de arquivo stl. (linguagem padrão de triângulos). Neste formato o modelo da peça desenhada tem sua superfície convertida em um padrão de triângulos, onde os vértices são descritos pelas coordenadas x, y e z ortogonais, como mostra a Figura 11. Quando lidos pelo código da impressora são transformados na linguagem código G (G-code), programa de computador que permite que a impressora possa fatiar a peça e assim imprimi-la por meio de camadas. As camadas são depositadas pelo bico de extrusão da impressora em uma mesa coletora que pode se movimentar nos eixos x, y e z de forma a facilitar a impressão do objeto proposto [64].

*Figura 10- . Modelo de funcionamento Impressora 3D FDM, adaptado de Freitas et al., 2020 [65].*

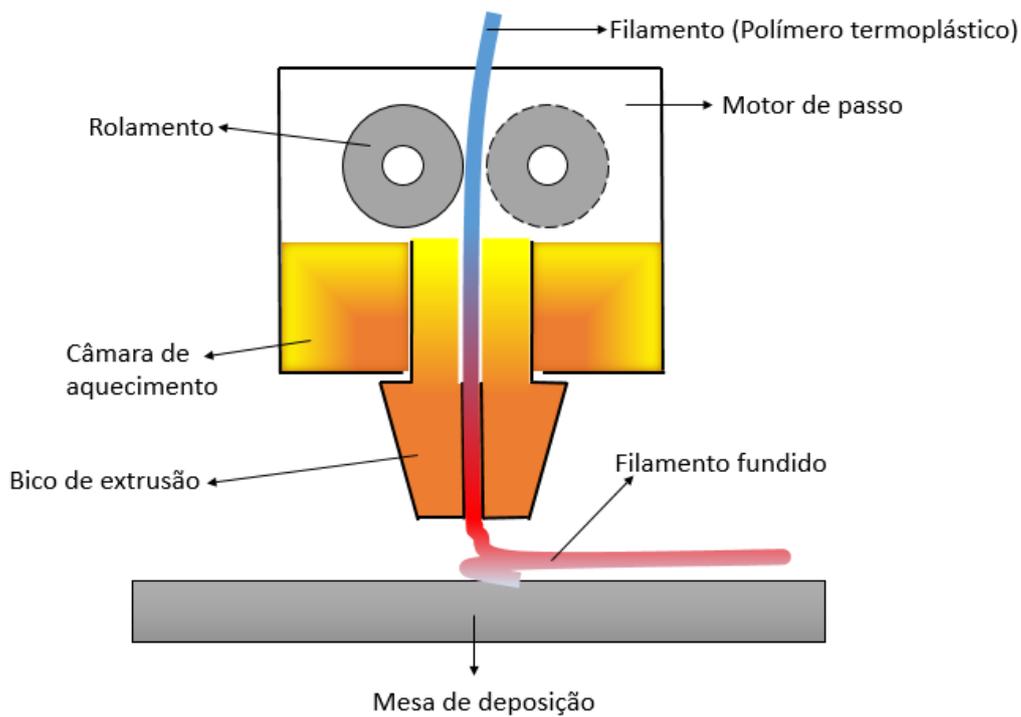
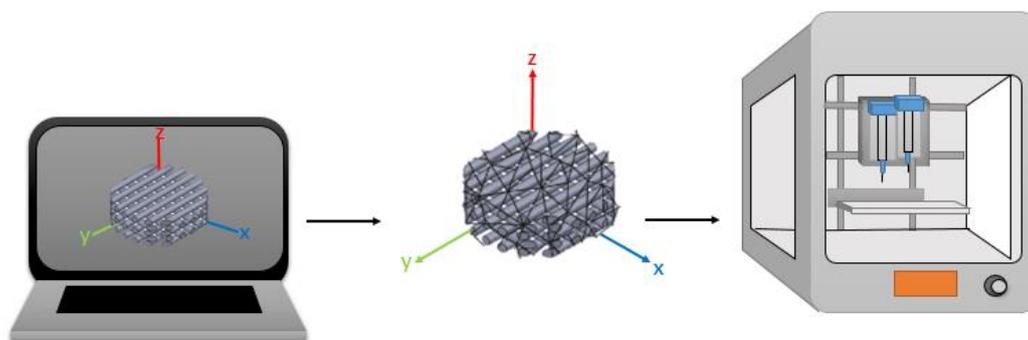


Figura 11- Esquema do processo de criação do objeto 3D para impressão. Fonte de própria autoria.



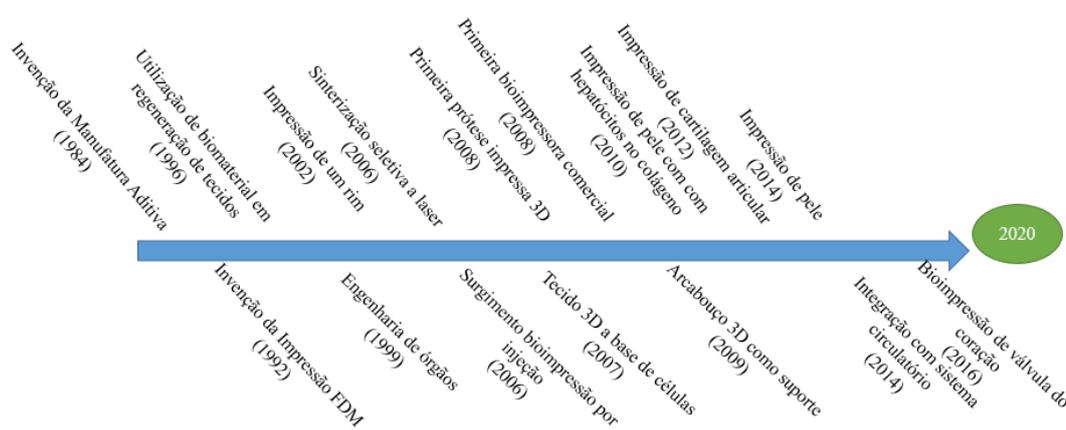
A capacidade de imprimir estruturas tridimensionais e personalizáveis, colocou a impressão 3D no cenário da engenharia de tecidos, possibilitando a produção de suportes tridimensionais que auxiliam na proliferação celular e reconstrução de tecidos lesionados, atuando como suporte mecânico capaz de suportar ambientes estressantes do corpo humano, mantendo o espaço para a reconstrução e remodelação do tecido, além de permitirem a entrega de fármacos diretamente no local. Os suportes projetados são chamados de arcabouços (*scaffolds*) e podem ser personalizados, quanto a forma, dimensão, porosidade. Além disso, podem ser preparados a partir de diversos polímeros,

permitindo uma ampla variedade de aplicações em diferentes tecidos do corpo humano [3].

Além de polímeros no estado fundido, materiais preparados à base de hidrogéis também podem ser modificados e empregados como suportes poliméricos carreadores de fármacos, células, moléculas bioativas, nanopartículas, etc, como demonstrado na Figura 12.

A impressão de hidrogéis é uma tecnologia recente, que permite a aplicação de diversos biomateriais para a área de regeneração de tecidos lesionados. No processo de impressão de hidrogéis assim como o processo FDM, a peça a ser impressa é modelada através de um programa gerador de sólidos, porém a diferença é o tipo de material a ser processado. Para a impressão de biomateriais podem ser empregados, por exemplo, hidrogéis poliméricos, fármacos, nanopartículas, biomoléculas e até mesmo células. A impressão 3D de hidrogéis tem grande destaque em comparação às demais técnicas devido a possibilidade de fabricação de estruturas sintéticas biológicas em matriz tridimensional. Assim, podem ser criados microambientes biológicos que podem facilitar a interação célula-célula e célula-matriz [66].

Figura 12- Evolução da Impressão 3D [43].



O emprego de hidrogéis como tinta de impressão é possível através da adaptação de métodos de impressão 3D, entre os vários métodos existentes como Modelagem por fusão deposição (FDM), escrita direta (DIW), Sinterização seletiva a laser (SLS) e

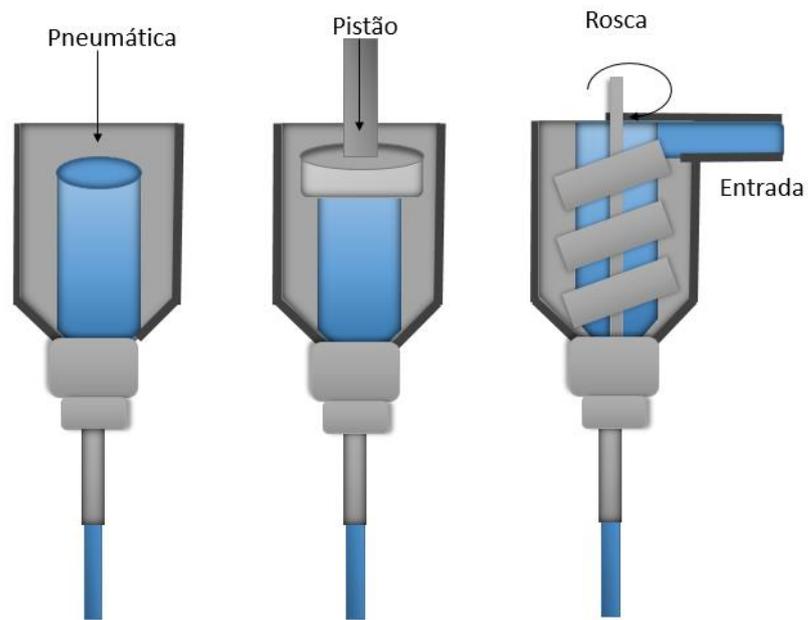
Estereolitografia (SLA).

Segundo estudos realizados por Guvendiren *et al.* (2017) [67] modelos de impressão onde se aplicam técnicas de extrusão em bicos (FDM e DIW) podem ser adaptadas para a utilização de hidrogéis, porém diferentemente de um polímero termoplástico, não podemos fundir um hidrogel sem causar danos a cadeia do mesmo, nem utiliza-los como filamentos por conta de suas baixas propriedades mecânicas, como necessário na técnica de FDM. Também não é necessária a utilização de solventes de baixo ponto de ebulição, como na técnica de DIW para que se tenha um líquido viscoso, já que para um hidrogel basta utilizar água.

Seguindo a mesma lógica já descrita para o processo FDM/DIW, o líquido viscoso é depositado camada por camada em uma mesa coletora, seguindo um determinado caminho pré-definido gerando o sólido construído em CAD[67],[3]. Esse processo de impressão 3D foi chamado de impressão de semissólidos SSE, seu grande diferencial está no tipo de material utilizado para alimentação do extrusor da impressora, podemos utilizar materiais de baixa resistência mecânica e macios como os hidrogéis, sem a necessidade de aquecimento[68] [69][70].

O processo de extrusão controlada do material contido no interior da seringa pode ocorrer de diferentes sistemas, (Figura 13) sendo os existentes até o momento: pneumático, pistão ou rosca (este último, utilizado para materiais de viscosidade mais elevada). Assim é possível o material fluir através da agulha da seringa formando um filamento [71].

O sistema de extrusão de semissólidos por pistão, aplica força mecânica diretamente à seringa. Esse sistema oferece maior controle sobre o fluxo de extrusão do que o sistema de impressão que utiliza rosca, além disso, outra vantagem da impressão SSE por pistão, é que o mecanismo de impressão é mais simples, acessível que o utilizado no sistema de impressão pneumática, dispensando a necessidade de se utilizar um compressor de ar. Outra vantagem é que o sistema de pistão permite a fácil troca de seringas contendo o material a ser impresso, o que resulta em um processo de impressão mais rápido [69], [72].



Para que um hidrogel seja considerado uma boa tinta para a impressão 3D, este, deve possuir certas características, como, ser um material viscoelástico, pseudoplásticos e tixotrópico. Essas características permitem com que o hidrogel seja capaz de fluir pelo bocal de extrusão, formar filamento, e após ser depositado na mesa de impressão, reorganizar suas cadeias poliméricas de forma a aumentar sua resistividade, sendo assim, capaz de suportar as camadas seguintes de impressão [73].

## **2.OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolvimento de hidrogéis poliméricos com atividade antifúngica, obtidos através da técnica de impressão 3D.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Investigar as propriedades reológicas de hidrogéis formados a partir da combinação de quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/líquido iônico;
- Otimizar parâmetros e realizar a impressão 3D de hidrogéis poliméricos formados a partir de hidrogéis de quitosana e gelatina com e sem a incorporação de líquido iônico;
- Realizar a reticulação química pela incorporação de diferentes concentrações de genipina, aos hidrogéis pós-impressão;
- Avaliar a efetividade da reticulação química dos hidrogéis e seu efeito na estabilidade estrutural;
- Investigar as propriedades mecânicas dos hidrogéis à base de quitosana/gelatina, com e sem a presença de líquido iônico;
- Investigar as propriedades estruturais e térmicas dos hidrogéis construídos por impressão 3D;
- Avaliar a atividade antifúngica dos hidrogéis com e sem a adição de líquidos iônicos, e citotoxicidade e viabilidade celular frente aos hidrogéis preparados com e sem a adição de líquidos iônicos;

## 7.REFERÊNCIAS

- [1] P. Eggimann, J. Garbino, and D. Pittet, “Management of *Candida* species infections in critically ill patients,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 3, no. 12, pp. 772–785, 2003, doi: 10.1016/S1473-3099(03)00831-4.
- [2] B. Sharma and S. Nonzom, “Superficial mycoses, a matter of concern: Global and Indian scenario-an updated analysis,” *Mycoses*, vol. 64, no. 8, pp. 890–908, Aug. 2021, doi: 10.1111/MYC.13264.
- [3] T. S. Jang, H. Do Jung, H. M. Pan, W. T. Han, S. Chen, and J. Song, “3D printing of hydrogel composite systems: Recent advances in technology for tissue engineering,” *Int. J. Bioprinting*, vol. 4, no. 1, 2018, doi: 10.18063/IJB.V4I1.126.
- [4] M. W. Tibbitt and K. S. Anseth, “Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 103, no. 4, pp. 655–663, Jul. 2009, doi: 10.1002/BIT.22361.
- [5] M. C. G. Pella, M. K. Lima-Tenório, E. T. Tenório-Neto, M. R. Guilherme, E. C. Muniz, and A. F. Rubira, “Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. Carbohydrate Polymers, 196, 233–245 | 10.1016/j.carbpol.2018.05.033,” pp. 233–245, 2018. Accessed: Feb. 15, 2022. [Online]. Available: <https://scihub.se/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.033>
- [6] C. Lárez Velásquez, A. Rivas, and I. Santos Ocanto, “Obtención de Genipina a partir de frutos de caruto (*Genipa americana* L.) del llano venezolano,” vol. 9, no. 2, pp. 75–86, 2014, Accessed: Feb. 15, 2022. [Online]. Available: [www.saber.ula.ve/avancesenquimica](http://www.saber.ula.ve/avancesenquimica)
- [7] B. L. Hennemann *et al.*, “Antifungal Activity and Stability of Fluconazole Emulsion Containing Ionic Liquids Explained by Intermolecular Interactions,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 4, 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14040710.
- [8] J. J. C. Sidrim and J. L. B. Moreira, “Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica,” p. xiii,287-xiii,287, 1999.
- [9] R. K. S. Araújo, V. C. de A. Frota, M. de S. Santana, and N. R. Souza, “RISCO EMERGENTE DAS INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS: REVISÃO DA LITERATURA,” *Rev. Ibero-Americana Humanidades, Ciências e Educ.*, vol. 9, no. 8, pp. 1111–1125, Sep. 2023, doi: 10.51891/rease.v9i8.10892.
- [10] X. Wu, Y. Lu, S. Zhou, L. Chen, and B. Xu, “Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation,” *Environ. Int.*, vol. 86, pp.

- 14–23, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.ENVINT.2015.09.007.
- [11] W. Dismukes, P. Pappas, and J. Sobel, *Clinical Mycology*. 2002.
- [12] H. O. J. Morad *et al.*, “Pre-clinical Imaging of Invasive Candidiasis Using ImmunoPET/MR,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. AUG, Aug. 2018, doi: 10.3389/FMICB.2018.01996.
- [13] J. Talapko *et al.*, “Candida albicans—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection,” *J. Fungi 2021, Vol. 7, Page 79*, vol. 7, no. 2, p. 79, Jan. 2021, doi: 10.3390/JOF7020079.
- [14] H. Kuchi Bhotla *et al.*, “Opportunistic mycoses in COVID-19 patients/survivors: Epidemic inside a pandemic,” *J. Infect. Public Health*, vol. 14, no. 11, pp. 1720–1726, Nov. 2021, doi: 10.1016/J.JIPH.2021.10.010.
- [15] Z. Cai *et al.*, “A Photonic Crystal Protein Hydrogel Sensor for Candida albicans,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 54, no. 44, pp. 13036–13040, Oct. 2015, doi: 10.1002/ANIE.201506205.
- [16] G. Ramage, S. P. Saville, D. P. Thomas, and J. L. López-Ribot, “Candida biofilms: An update,” *Eukaryot. Cell*, vol. 4, no. 4, pp. 633–638, Apr. 2005, doi: 10.1128/EC.4.4.633-638.2005.
- [17] D. A. Enoch, H. Yang, S. H. Aliyu, and C. Micallef, “The changing epidemiology of invasive fungal infections,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1508, pp. 17–65, 2017, doi: 10.1007/978-1-4939-6515-1\_2/COVER.
- [18] O. Leroy *et al.*, “Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study,” *Ann. Intensive Care*, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1186/s13613-015-0103-7.
- [19] L. . Trabulsi, *Microbiologia*, 4<sup>a</sup>. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- [20] I. B. Oliveira, “ESTUDO DO EFEITO DO EXTRATO DE Aloe vera SOBRE Candida albicans,” Universidade do Vale da Paraíba, 2008.
- [21] A. Govindarajan, K. G. Bistas, C. J. Ingold, and A. Aboed, “Fluconazole,” *Kucers Use Antibiot. A Clin. Rev. Antibacterial, Antifung. Antiparasit. Antivir. Drugs, Seventh Ed.*, pp. 2756–2785, May 2023, doi: 10.1201/9781315152110.
- [22] R. A. Akins, “An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in Candida albicans,” *Med. Mycol.*, vol. 43, no. 4, pp. 285–318, Jun. 2005, doi: 10.1080/13693780500138971.
- [23] S. J. Inaldo, S. Izamara, and B. Renata, “Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol General traits of action, treatment and

fungal resistance to fluconazol,” *Sci. Med. (Porto. Alegre)*., vol. 15, no. 3, pp. 189–197, 2005.

[24] M. K. Kathiravan *et al.*, “The biology and chemistry of antifungal agents: A review,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 20, no. 19, pp. 5678–5698, Oct. 2012, doi: 10.1016/J.BMC.2012.04.045.

[25] R. Garcia-Rubio, H. C. de Oliveira, J. Rivera, and N. Trevijano-Contador, “The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, p. 492056, Jan. 2020, doi: 10.3389/FMICB.2019.02993/BIBTEX.

[26] S. Emami, E. Ghobadi, S. Saednia, and S. M. Hashemi, “Current advances of triazole alcohols derived from fluconazole: Design, in vitro and in silico studies,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 170, pp. 173–194, May 2019, doi: 10.1016/J.EJMECH.2019.03.020.

[27] B. L. Hennemann *et al.*, “Antifungal Activity and Stability of Fluconazole Emulsion Containing Ionic Liquids Explained by Intermolecular Interactions,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 4, p. 710, Apr. 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14040710/S1.

[28] W. Zhuang, K. Hachem, D. Bokov, M. Javed Ansari, and A. Taghvaie Nakhjiri, “Ionic liquids in pharmaceutical industry: A systematic review on applications and future perspectives,” *J. Mol. Liq.*, vol. 349, p. 118145, Mar. 2022, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2021.118145.

[29] S. N. Pedro, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, and M. G. Freire, “The Role of Ionic Liquids in the Pharmaceutical Field: An Overview of Relevant Applications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 21, pp. 1–50, Nov. 2020, doi: 10.3390/IJMS21218298.

[30] T. A. A. Rodrigues, “Influência da incorporação de líquidos iônicos na estabilidade de emulsões O/A,” Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

[31] W. Silva, M. Zanatta, A. S. Ferreira, M. C. Corvo, and E. J. Cabrita, “Revisiting Ionic Liquid Structure-Property Relationship: A Critical Analysis,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 20, pp. 1–37, Oct. 2020, doi: 10.3390/IJMS21207745.

[32] D. Dobler, T. Schmidts, I. Klingenhöfer, and F. Runkel, “Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems,” *Int. J. Pharm.*, vol. 441, no. 1–2, pp. 620–627, Jan. 2013, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2012.10.035.

[33] J. Alemán *et al.*, “Definitions of terms relating to the structure and processing of sols, gels, networks, and inorganic-organic hybrid materials (IUPAC recommendations 2007),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 79, no. 10, pp. 1801–1829, 2007, doi: 10.1351/pac200779101801.

- [34] B. Grigoryan *et al.*, “Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels,” *Science*, vol. 364, no. 6439, pp. 458–464, May 2019, doi: 10.1126/SCIENCE.AAV9750.
- [35] S. Peers, A. Montembault, and C. Ladavière, “Chitosan hydrogels for sustained drug delivery,” *J. Control. Release*, vol. 326, pp. 150–163, Oct. 2020, doi: 10.1016/J.JCONREL.2020.06.012.
- [36] H. Hamed, S. Moradi, S. M. Hudson, and A. E. Tonelli, “Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 199, pp. 445–460, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2018.06.114.
- [37] S. M. Willerth, S. E. Sakiyama-elbert, B. Engineering, and S. Louis, “Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery \*,” no. 314, pp. 1–18, 2008, doi: 10.3824/stembook.1.1.1.
- [38] H. Y. Cheung, K. T. Lau, T. P. Lu, and D. Hui, “A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 38, no. 3, pp. 291–300, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.COMPOSITESB.2006.06.014.
- [39] R. Jayakumar, M. Prabakaran, P. T. Sudheesh Kumar, S. V. Nair, and H. Tamura, “Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 3, pp. 322–337, May 2011, doi: 10.1016/J.BIOTECHADV.2011.01.005.
- [40] A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska, C. J. Kennedy, and T. J. Wess, “Molecular interactions in collagen and chitosan blends,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 5, pp. 795–801, 2004, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00595-7.
- [41] Y. He, F. Wang, X. Wang, J. Zhang, D. Wang, and X. Huang, “A photocurable hybrid chitosan acrylamide bioink for DLP based 3D bioprinting.”
- [42] J. M. Unagolla and A. C. Jayasuriya, “Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives,” *Appl. Mater. today*, vol. 18, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.APMT.2019.100479.
- [43] M. Taghizadeh *et al.*, “Chitosan-based inks for 3D printing and bioprinting,” *Green Chem.*, vol. 24, no. 1, pp. 62–101, Jan. 2022, doi: 10.1039/D1GC01799C.
- [44] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini, “Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 8, pp. 981–1014, 2011, doi: 10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.02.001.

- [45] F. Croisier and C. Jérôme, “Chitosan-based biomaterials for tissue engineering,” *Eur. Polym. J.*, vol. 49, no. 4, pp. 780–792, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.EURPOLYMJ.2012.12.009.
- [46] A. S. de Azevedo, M. J. C. de Sá, M. V. Lia Fook, P. I. da Nóbrega Neto, O. B. de Sousa, and S. S. de Azevedo, “Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo histológico e morfométrico,” *Ciência Rural*, vol. 43, no. 7, pp. 1265–1270, Jul. 2013, doi: 10.1590/S0103-84782013000700019.
- [47] S. J. Hollister, “Porous scaffold design for tissue engineering,” *Nat. Mater.*, vol. 4, no. 7, pp. 518–524, Jul. 2005, doi: 10.1038/NMAT1421..
- [48] I. C. Carvalho, “Hidrogéis Híbridos Poliméricos de Quitosana Funcionalizada e Gelatina Fotoreticulada como Matriz Porosa Tridimensionais para Potencial Reparo de Tecido Epitelial,” Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.
- [49] S. K. H. Gulrez, S. Al-Assaf, G. O. Phillips, S. K. H. Gulrez, S. Al-Assaf, and G. O. Phillips, “Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications,” *Prog. Mol. Environ. Bioeng. - From Anal. Model. to Technol. Appl.*, Aug. 2011, doi: 10.5772/24553.
- [50] C. D. S. Santos, “Mineralização biomimética de hidrogéis de quitosana/gelatina,” Universidade de São Paulo, 2014.
- [51] S. Kommareddy, D. B. Shenoy, and M. M. Amiji, “Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization,” *Nanotechnologies Life Sci.*, Sep. 2007, doi: 10.1002/9783527610419.NTLS0011.
- [52] M. C. Gómez-Guillén, M. Pérez-Mateos, J. Gómez-Estaca, E. López-Caballero, B. Giménez, and P. Montero, “Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 20, no. 1, pp. 3–16, Jan. 2009, doi: 10.1016/J.TIFS.2008.10.002.
- [53] S. Gorgieva, V. Kokol, S. Gorgieva, and V. Kokol, “Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives,” *Biomater. Appl. Nanomedicine*, Nov. 2011, doi: 10.5772/24118.
- [54] U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler, “RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 24, pp. 4385–4415, 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00343-0.
- [55] M. George and T. E. Abraham, “Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review,” *J. Control. Release*, vol. 114, no. 1,

pp. 1–14, Aug. 2006, doi: 10.1016/J.JCONREL.2006.04.017.

[56] H. W. Kim, H. E. Kim, and V. Salih, “Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 25, pp. 5221–5230, Sep. 2005, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.01.047.

[57] J. Zhang *et al.*, “Quantum dots-based hydrogels for sensing applications,” *Chem. Eng. J.*, vol. 408, p. 127351, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.CEJ.2020.127351.

[58] F. L. Mi, S. S. Shyu, and C. K. Peng, “Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 43, no. 10, pp. 1985–2000, May 2005, doi: 10.1002/POLA.20669.

[59] R. A. A. Muzzarelli, “Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. Carbohydrate Polymers, 77(1), 1–9 | 10.1016/j.carbpol.2009.01.016,” pp. 1–9, 2009. Accessed: Feb. 15, 2022. [Online]. Available: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>

[60] S. Dimida, C. Demitri, V. M. De Benedictis, F. Scalera, F. Gervaso, and A. Sannino, “Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 28, p. 42256, Jul. 2015, doi: 10.1002/APP.42256.

[61] M. F. Butler, Y. F. Ng, and P. D. A. Pudney, “Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 41, no. 24, pp. 3941–3953, Dec. 2003, doi: 10.1002/POLA.10960.

[62] F. L. Mi, H. W. Sung, S. S. Shyu, C. C. Su, and C. K. Peng, “Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 44, no. 21, pp. 6521–6530, Oct. 2003, doi: 10.1016/S0032-3861(03)00620-7.

[63] R. Scheeren, “FABRICAÇÃO DIGITAL NA AMÉRICA DO SUL,” 2021.

[64] L. K. Takagaki, “Tecnologia de impressão 3d,” *Rev. Inovação Tecnológica*, vol. 2, no. 2, pp. 28–40, 2012.

[65] L. L. C. De Freitas, F. M. Jesuino, E. B. O. Filho, and V. J. Do Prado, “DESENVOLVIMENTO DE UM PROJETO PARA IMPRESSÃO 3D MULTIMATERIAL UTILIZANDO UM MÓDULO EXTRUSOR DUPLO PARA IMPRESSÕES PESSOAIS,” pp. 127–137, 2020, doi: 10.37885/200300005.

- [66] B. Piola, M. Sabbatini, S. Gino, M. Invernizzi, and F. Renò, “3D Bioprinting of Gelatin–Xanthan Gum Composite Hydrogels for Growth of Human Skin Cells,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 1, 2022, doi: 10.3390/ijms23010539.
- [67] M. Guvendiren, J. Molde, R. M. D. Soares, and J. Kohn, “Designing Biomaterials for 3D Printing,” *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 2, no. 10, pp. 1679–1693, 2016, doi: 10.1021/acsbiomaterials.6b00121.
- [68] A. Gholamipour-Shirazi, I. T. Norton, and T. Mills, “Designing hydrocolloid based food-ink formulations for extrusion 3D printing,” *Food Hydrocoll.*, vol. 95, pp. 161–167, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.FOODHYD.2019.04.011.
- [69] I. Seoane-Viaño, P. Januskaite, C. Alvarez-Lorenzo, A. W. Basit, and A. Goyanes, “Semi-solid extrusion 3D printing in drug delivery and biomedicine: Personalised solutions for healthcare challenges,” *J. Control. Release*, vol. 332, pp. 367–389, Apr. 2021, doi: 10.1016/J.JCONREL.2021.02.027.
- [70] K. Shi, J. P. Slavage, M. Maniruzzaman, and A. Nokhodchi, “Role of release modifiers to modulate drug release from fused deposition modelling (FDM) 3D printed tablets,” *Int. J. Pharm.*, vol. 597, p. 120315, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.IJPHARM.2021.120315.
- [71] J. Malda *et al.*, “25th anniversary article: Engineering hydrogels for biofabrication,” *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 36, pp. 5011–5028, Sep. 2013, doi: 10.1002/ADMA.201302042.
- [72] M. Hospodiuk, K. K. Moncal, M. Dey, and I. T. Ozbolat, “Extrusion-Based Biofabrication in Tissue Engineering and Regenerative Medicine,” *3D Print. Biofabrication*, pp. 255–281, 2018, doi: 10.1007/978-3-319-45444-3\_10.
- [73] J. L. D. Sánchez, “Rheological studies and 3D extrusion-based printing of nanocomposite hydrogels,” 2018.
- [74] L. Cui, J. Jia, Y. Guo, Y. Liu, and P. Zhu, “Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 99, pp. 31–38, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2013.08.048.
- [75] T. Fischetti, N. Celikkin, N. Contessi Negrini, S. Farè, and W. Swieszkowski, “Tripolyphosphate-Crosslinked Chitosan/Gelatin Biocomposite Ink for 3D Printing of Uniaxial Scaffolds,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00400.
- [76] F. M. Chen and X. Liu, “Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 53, pp. 86–168, Feb. 2016, doi:

10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2015.02.004.

[77] J. L. Sánchez, “Fabricação de Scaffolds de PCL Reforçados com  $\beta$ -TCP Mediante Impressão 3D por Rosca de Extrusão para Aplicações em Engenharia Tecidual,” 2014. Accessed: Mar. 14, 2021. [Online]. Available: [www.tcpdf.org](http://www.tcpdf.org)

[78] S. R. Derkach, N. G. Voron’ko, and N. I. Sokolan, “The rheology of hydrogels based on chitosan–gelatin (bio)polyelectrolyte complexes,” *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 10, pp. 1427–1434, Oct. 2017, doi: 10.1080/01932691.2016.1250218.

[79] H. Zhang *et al.*, “Chitosan membranes from acetic acid and imidazolium ionic liquids: Effect of imidazolium structure on membrane properties,” *J. Mol. Liq.*, vol. 340, p. 117209, Oct. 2021, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2021.117209.

[80] I. J. M. Corzo, J. H. L. da Fonsêca, and M. A. d’Ávila, “Influence of carboxymethyl cellulose solutions on rheological properties of Laponite dispersions,” *Rheol. Acta*, vol. 62, no. 7–8, pp. 393–404, Aug. 2023, doi: 10.1007/S00397-023-01401-3/FIGURES/9.

[81] R. Qiu *et al.*, “Analysis on the printability and rheological characteristics of bigel inks: Potential in 3D food printing,” *Food Hydrocoll.*, vol. 129, p. 107675, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.FOODHYD.2022.107675.

[82] H. Wang *et al.*, “Encapsulation of lutein in gelatin type A/B-chitosan systems via tunable chains and bonds from tweens: Thermal stability, rheologic property and food 2D/3D printability,” *Food Res. Int.*, vol. 173, no. P2, p. 113392, 2023, doi: 10.1016/j.foodres.2023.113392.

[83] M. Brebu, R. P. Dumitriu, D. Pamfil, E. Butnaru, and E. Stoleru, “Riboflavin mediated UV crosslinking of chitosan-gelatin cryogels for loading of hydrophobic bioactive compounds,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 324, p. 121521, Jan. 2024, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2023.121521.

[84] V. Chiono, E. Pulieri, G. Vozzi, G. Ciardelli, A. Ahluwalia, and P. Giusti, “Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 889–898, Feb. 2008, doi: 10.1007/S10856-007-3212-5/FIGURES/11.

[85] C. Peniche, C. Elvira, and J. San Roman, “Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: preparation, characterization and modification by thermal treatment,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 39, no. 25, pp. 6549–6554, Dec. 1998, doi: 10.1016/S0032-3861(98)00059-7.

[86] A. Ghaee, S. Bagheri-Khoulenjani, H. Amir Afshar, and H. Bogheiri,

- “Biomimetic nanocomposite scaffolds based on surface modified PCL-nanofibers containing curcumin embedded in chitosan/gelatin for skin regeneration,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 177, no. July, p. 107339, 2019, doi: 10.1016/j.compositesb.2019.107339.
- [87] L. Cui *et al.*, “Fabrication of interpenetrating polymer network chitosan/gelatin porous materials and study on dye adsorption properties,” Elsevier, 2015. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2015.06.017.
- [88] S. Magli, L. Rossi, C. Consentino, S. Bertini, F. Nicotra, and L. Russo, “Combined analytical approaches to standardize and characterize biomaterials formulations: Application to chitosan-gelatin cross-linked hydrogels,” *Biomolecules*, vol. 11, no. 5, May 2021, doi: 10.3390/BIOM11050683/S1.
- [89] J. H. Chen and M. C. Yang, “Preparation and characterization of nanocomposite of maleated poly(butylene adipate-co-terephthalate) with organoclay,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 46, pp. 301–308, 2015, doi: 10.1016/j.msec.2014.10.045.
- [90] M. Ao, G. Xu, W. Kang, L. Meng, and T. Zhou, “Surface rheological behavior of gelatin / ionic liquid-type imidazolium gemini surfactant mixed systems,” pp. 1199–1206, 2011, doi: 10.1039/c0sm00556h.
- [91] P. I. M. Ward, “Polymers: Chemistry and Physics of Modern Materials, 3rd edition, by J.M.G. Cowie and V. Arrighi,” *Contemp. Phys.*, vol. 50, no. 6, pp. 670–670, Nov. 2009, doi: 10.1080/00107510902992270.
- [92] C. H. Chen, F. Y. Wang, C. F. Mao, W. T. Liao, and C. D. Hsieh, “Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 43, no. 1, pp. 37–42, Jul. 2008, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2007.09.005.
- [93] H. Cassimjee, P. Kumar, P. Ubanako, and Y. E. Choonara, “Genipin-Crosslinked, Proteosaccharide Scaffolds for Potential Neural Tissue Engineering Applications,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS14020441.
- [94] K. Hu *et al.*, “Experimental and theoretical studies of chitosan dissolution in ionic liquids: Contribution ratio effect of cations and anions,” *J. Mol. Liq.*, vol. 331, p. 115762, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2021.115762.
- [95] L. P. Yan *et al.*, “Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 95 A, no. 2, pp. 465–475, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32869.
- [96] M. Ubaid and G. Murtaza, “Fabrication and characterization of genipin cross-linked chitosan/gelatin hydrogel for pH-sensitive, oral delivery of metformin with an

application of response surface methodology,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 114, pp. 1174–1185, Jul. 2018, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2018.04.023.

[97] Y. Yuan *et al.*, “The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 68, no. 3, pp. 561–567, Apr. 2007, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2006.10.023.

[98] M.-C. Chen, C.-T. Liu, H.-W. Tsai, W.-Y. Lai, Y. Chang, and H.-W. Sung, “Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent,” 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.039.

[99] C. Alorbu and L. Cai, “Fungal resistance and leachability of genipin-crosslinked chitosan treated wood,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 169, no. January, p. 105378, 2022, doi: 10.1016/j.ibiod.2022.105378.

[100] A. R. Esposito, E. A. R. Duek, C. Lucchesi, L. Prazeres, and A. P. T. Pezzin, “Citocompatibilidade de blendas de poli(p-dioxanona)/ poli(hidroxi butirato) (PPD/PHB) para aplicações em engenharia de tecido cartilaginoso,” *Polímeros*, vol. 20, no. 5, pp. 383–388, 2010, doi: 10.1590/S0104-14282010005000062.

[101] L. Gao *et al.*, “Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 117, pp. 398–405, May 2014, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2014.03.002.

[102] A. L. Hillberg, C. A. Holmes, and M. Tabrizian, “Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 27, pp. 4463–4470, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.026.

[103] J. D. Mendelsohn, S. Y. Yang, J. A. Hiller, A. I. Hochbaum, and M. F. Rubner, “Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films,” *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 1, pp. 96–106, Jan. 2003, doi: 10.1021/bm0256101.