

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Impressão 3D de membranas assimétricas à base de derivado cationizado
de quitosana e *whiskers* de beta-quitina visando aplicações biomédicas**

Leonardo Henrique Semensato

São Carlos – SP

2023

LEONARDO HENRIQUE SEMENSATO

Impressão 3D de membranas assimétricas à base de derivado cationizado de quitosana e *whiskers* de beta-quitina visando aplicações biomédicas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa (Embrapa Instrumentação)

São Carlos – SP

2023

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

Assinatura: *Leonardo Semensato*
Data: 28/07/2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Semensato, Leonardo Henrique

Impressão 3D de membranas assimétricas à base de derivado cationizado de quitosana e whiskers de beta-quitina visando aplicações biomédicas / Leonardo Henrique Semensato. — São Carlos, 2023.

86 f.

Dissertação (Mestrado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa

1. Polímeros (materiais). 2. Quitosana. 3. Impressão 3-D. 4. Membranas assimétricas. 5. Materiais nanoestruturados. I. Título.



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Josmar e Simone, e à minha irmã, Giovana, por todo o amor, carinho, suporte, compreensão e incentivo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho e ao Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa, pela dedicação, apoio, compreensão, inspiração, ensinamentos e motivação constante. Um agradecimento especial a ambos por me incentivarem a continuar na carreira acadêmica (que venha o doutorado!).

À minha namorada, companheira e amiga, Gisele, pelo amor, carinho, compreensão, bom humor e solidariedade. Sou imensamente feliz e grato por sua companhia e por todos os momentos que compartilhamos juntos.

Aos meus avós maternos e paternos, por todo o suporte, carinho e por me estimularem a sempre dar o meu melhor.

Aos amigos de minha terra natal, Tapinas, e aos amigos e colegas de São Carlos, por proporcionarem tantos momentos de descontração e alegria.

Aos colegas do IQSC e da Embrapa Instrumentação, por todo o companheirismo e apoio. Um agradecimento especial à Amanda, Danilo, Filipe e Patrícia pelas contribuições teóricas e experimentais fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos do IQSC e da Embrapa Instrumentação, por sempre serem tão solícitos e eficientes em suas funções.

À USP e à Embrapa Instrumentação, por oferecerem estruturas de excelência que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

O objetivo principal do presente trabalho foi de produzir, através de impressão 3D por *direct ink writing* (DIW), membranas assimétricas com potenciais aplicações biomédicas utilizando cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat), *whiskers* de beta-quitina e genipina como agente reticulante. Para tanto, quitosana foi produzida a partir de beta-quitina empregando desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (DAIUS) e a mesma beta-quitina de partida foi submetida à acidólise para produção de *whiskers*. O derivado QCat foi sintetizado a partir da reação da quitosana obtida na etapa anterior com cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA) em meio levemente ácido. A tinta para impressão 3D DIW foi produzida a partir da solubilização de QCat em suspensão aquosa de *whiskers* de beta-quitina com subsequente adição de genipina, e as membranas foram impressas com duas camadas de diferentes geometrias. A beta-quitina de partida, os *whiskers*, a quitosana DAIUS e o derivado QCat foram caracterizados empregando espectroscopias no infravermelho (FTIR) e de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , viscosimetria capilar em regime diluído, titulação condutimétrica, difratometria de raios X (DRX), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia de força atômica (AFM), análise termogravimétrica (TGA), além de ensaios de concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC). O comportamento reológico da tinta utilizada para impressão 3D DIW foi avaliado através de ensaios de pseudoplasticidade, viscoelasticidade e tixotropia para amostras com e sem adição de genipina. As membranas assimétricas foram caracterizadas através de espectroscopia no infravermelho, TGA, medidas de ângulo de contato, capacidade de intumescimento, teste de disco-difusão e susceptibilidade à degradação enzimática *in vitro*. A síntese do derivado QCat foi evidenciada através de seu espectro no infravermelho, que exibiu banda em 1486 cm^{-1} , e pelo espectro de RMN de ^1H , que exibiu pico em 3,2 ppm. QCat apresentou grau médio de substituição (\overline{GS}) próximo a 30%, fator que conferiu hidrossolubilidade em ampla faixa de pH e atividade antimicrobiana contra *E. Coli* e *S. aureus*, conforme evidenciado nos ensaios de MIC e MBC. Os *whiskers* apresentaram grau médio de polimerização viscosimétrico (\overline{GP}_v) aproximadamente 47 vezes menor que a beta-quitina, evidenciando que a acidólise causou severa despolimerização. A tinta para impressão 3D apresentou pseudoplasticidade, tixotropia, comportamento semelhante ao de um sólido quando submetida à baixa deformação oscilatória e comportamento semelhante ao de um líquido quando submetida à alta deformação oscilatória, que são características ideais para fluidos utilizados em impressão 3D DIW. As membranas assimétricas apresentaram ângulo de contato de $59,4^\circ \pm 7,6^\circ$ para a camada externa, capacidade de intumescimento em tampão PBS próxima a 35% e degradação total após 7 dias de incubação *in vitro* com lisozima. Por fim, as membranas assimétricas apresentaram inibição por contato contra *E. coli* e *S. aureus* no teste de disco-difusão, qualidade notável considerando aplicações biomédicas. As próximas etapas do trabalho serão centradas na otimização dos processos de homogeneização e formulação da tinta para impressão 3D, o que possibilitará a produção e caracterização de materiais totalmente homogêneos. Além disso, serão avaliadas alternativas à reticulação com genipina empregando fotorreticulação.

Palavras-chave: membranas assimétricas, impressão 3D, quitosana cationizada, *whiskers* de beta-quitina, aplicações biomédicas.

ABSTRACT

The main purpose of this work was to produce, through direct ink writing (DIW) 3D printing, asymmetric membranes with potential biomedical applications, based on *N*-(2-hydroxy)-propyl-3-trimethylammonium chitosan chloride (QCat), beta-chitin whiskers and genipin as crosslinking agent. For this purpose, chitosan was produced from beta-chitin, using ultrasound-assisted deacetylation (USAD), and the same beta-chitin underwent acidolysis to produce whiskers. The QCat derivative was synthesized through the reaction of chitosan from the previous step with glycidyltrimethylammonium chloride (GTMAC) in slightly acidic medium. The ink for the DIW 3D printing was produced through QCat solubilization in beta-chitin whiskers aqueous suspension, followed by the addition of genipin, and the membranes were printed with two layers with different geometries. The starting beta-chitin, the DAIUS chitosan, the QCat derivative and the beta-chitin whiskers were characterized using infrared spectroscopy (FTIR), ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, dilute regime capillary viscometry, conductimetric titration, X ray diffractometry (XRD), transmission electron microscopy (TEM), atomic force microscopy (AFM), thermogravimetric analysis (TGA) as well as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assays. The rheological behavior of the ink used DIW 3D printing was evaluated through shear thinning, viscoelasticity and thixotropy assays for samples with and without addition of genipin. The asymmetric membranes were characterized through infrared spectroscopy, TGA, contact angle measurements, swelling capacity, disk diffusion test and in vitro enzymatic degradation. The synthesis of the QCat derivative was evidenced by its infrared spectrum, which showed a band at 1486 cm^{-1} , and by the ^1H NMR spectrum, which showed a peak in 3.2 ppm. QCat showed average degree of substitution (\overline{DS}) close to 30%, which provided water solubility in a wide pH range and antimicrobial activity against *E. Coli* and *S. aureus*, as evidenced by MIC and MBC assays. The beta-chitin whiskers showed an average viscometric degree of polymerization (\overline{DP}_v) approximately 47 times lower than the starting beta-chitin, evidencing that acidolysis caused severe depolymerization. The ink prepared for DIW 3D printing showed pseudoplasticity, thixotropy, solid-like behavior under low oscillatory strain and liquid-like behavior under high oscillatory strain, which are ideal characteristics for DIW 3D printing inks. The asymmetric membranes showed contact angle of $59.4^\circ \pm 7.6^\circ$ for the outer layer, swelling capacity in PBS buffer close to 35% and total degradation after 7 days of in vitro incubation with lysozyme. Finally, the asymmetric membranes showed contact inhibition against *E. coli* and *S. aureus* in the disk diffusion test, a notable feature considering biomedical applications. The next steps of this work consist in the optimization of formulation and homogenization of the ink for DIW 3D printing, which will enable the production and characterization of totally homogeneous materials. In addition, alternatives to genipin crosslinking, like photocrosslinking, will be evaluated.

Keywords: asymmetric membranes, 3D printing, cationized chitosan, beta-chitin whiskers, biomedical applications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da pele humana.	16
Figura 2 – Representação esquemática das principais funções exercidas pela camada externa (CE) e camada interna (CI) de membranas assimétricas utilizadas como curativos de pele....	18
Figura 3 - Estruturas idealizadas da quitina e quitosana (n = grau de polimerização).	19
Figura 4 - Imagens de (a) microscopia eletrônica de transmissão e (b) microscopia de força atômica de <i>whiskers</i> de alfa-quitina.	21
Figura 5 - Reação da quitosana com cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA), produzindo cloreto de <i>N</i> -(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat) (n = grau de polimerização).	22
Figura 6 - Mecanismo de reticulação da quitosana com genipina (a) em meio ácido ou neutro e (b) em meio alcalino.	24
Figura 7 – Comportamento reológico ideal de tinta para impressão 3D DIW: a) comportamento pseudoplástico; b) $G' > G''$ em região de baixa deformação e $G'' > G'$ em região de alta deformação; c) recuperação rápida de G' em teste de tixotropia de três intervalos.	26
Figura 8 - Capturas de tela do software Simplify3D 4.1.2, ilustrando diferentes padrões de preenchimento (hexagonal, retilíneo e grade) com diferentes densidades de preenchimento (20%, 50% e 80%).	28
Figura 9 - Ilustração esquemática geral do presente trabalho.	29
Figura 10 - Ilustração esquemática do preparo da tinta para impressão 3D.	33
Figura 11 - Ilustração da geometria das membranas assimétricas (largura do filamento desconsiderada).	34
Figura 12 - Composição da microplaca de 96 poços para o ensaio de concentração inibitória mínima (MIC).	39
Figura 13 - Espectros no infravermelho da beta-quitina, quitosana QD2, derivado QCat e <i>whiskers</i>	45
Figura 14 - Espectros de RMN de ^{13}C dos <i>whiskers</i> e da beta-quitina.	46
Figura 15 - Espectros de RMN de ^1H da quitosana QD2 e do derivado QCat.	47
Figura 16 - Difratogramas referentes a (a) beta-quitina e <i>whiskers</i> e (b) quitosana QD2 e derivado QCat.	51
Figura 17 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) obtidas para os <i>whiskers</i> de beta-quitina.	52
Figura 18 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) obtidas para os <i>whiskers</i> de beta-quitina.	53

Figura 19 - Curvas de (a) TG e (b) dTG da beta-quitina, <i>whiskers</i> , quitosana QD2 e derivado QCat.	53
Figura 20 - Curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras T e T_Gen_2h.....	56
Figura 21 - Curvas de G' e G'' em função da deformação oscilatória para a amostra T (a) e amostra T_Gen_2h (b).	57
Figura 22 - Curva referente ao ensaio de tixotropia de três intervalos para as amostras T e T_Gen_2h.....	58
Figura 23 - Evolução de coloração observada na camada interna (CI) das membranas assimétricas: a) 2 horas após impressão; b) 1 dia após impressão; c) 2 dias após impressão; d) 3 dias após impressão; e) 4 dias após impressão; f) 5 dias após impressão.....	60
Figura 24 - Espectros no infravermelho referentes à camada interna (CI) e camada externa (CE) das membranas assimétricas liofilizadas.....	62
Figura 25 - Curvas de (a) TG e (B) dTG das membranas assimétricas liofilizadas.	63
Figura 26 - Resultados de ângulo de contato para a camada externa (CE) das membranas assimétricas.	64
Figura 27 - Capacidade de intumescimento das membranas assimétricas em tampão fosfato salino (PBS), com pH = 7,4.	66
Figura 28 - Resultados do teste do halo de inibição para as membranas assimétricas: a) CI contra <i>S. aureus</i> ; b) CE contra <i>S. aureus</i> ; c) CI contra <i>E. coli</i> ; d) CE contra <i>E. coli</i>	68
Figura 29 - a) Curva de massa residual em função do tempo de incubação das membranas assimétricas em tampão PBS (pH = 7,4) na presença de lisozima (5500 u/mL); b) corpos de prova após 4 dias de incubação, com e sem presença de lisozima; c) frascos após 7 dias de incubação com e sem a presença de lisozima.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da impressão 3D empregados para a camada interna (CI) e camada externa (CE) das membranas assimétricas.	34
Tabela 2 - Valores de grau médio de acetilação, \overline{GA} , e grau médio de desacetilação, \overline{GD} , calculados para beta-quitina, <i>whiskers</i> e QD2.....	48
Tabela 3 - Viscosidade intrínseca, $[\eta]$, massa molecular viscosimétrica média, \overline{Mv} , e grau médio de polimerização viscosimétrico, \overline{GPv} , para beta-quitina, <i>whiskers</i> , QD2 e QCat.	49
Tabela 4 - Valores de massa das amostras de QCat, volume de equivalência (V_{eq}) e grau médio de substituição (\overline{GS}).....	50
Tabela 5 - Temperaturas características e perdas de massa referentes à degradação térmica da beta-quitina, <i>whiskers</i> , quitosana QD2 e derivado QCat.....	54
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) dos <i>whiskers</i> e de QCat contra <i>S. aureus</i> e <i>E. Coli</i>	55
Tabela 7 - Ponto de <i>crossover</i> , P_C , deformação no ponto de <i>crossover</i> , γ_C , e tensão no ponto de <i>crossover</i> , σ_C , para as amostras T e T_Gen_2h.	57
Tabela 8 - Temperaturas características e perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas assimétricas liofilizadas.	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFM	Microscopia de força atômica
CGTMA	Cloreto de glicidiltrimetilamônio
CE	Camada externa
CI	Camada interna
DAIUS	Desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade
DIW	<i>Direct ink writing</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
\overline{GA}	Grau médio de acetilação
\overline{GD}	Grau médio de desacetilação
GlcN	2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose
GlcNAc	2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose
\overline{GS}	Grau médio de substituição
\overline{GP}_v	Grau médio de polimerização viscosimétrico
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
P_c	Ponto de <i>crossover</i>
QCat	Cloreto de <i>N</i> -(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana
QD2	Quitosana duplamente desacetilada
RMN	Ressonância magnética nuclear
TGA	Análise termogravimétrica
γ	Deformação
$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento
γ_c	Deformação no ponto de <i>crossover</i>
η	Viscosidade
σ_c	Tensão no ponto de <i>crossover</i>
3ITT	<i>Three interval thixotropy test</i>
$[\eta]$	Viscosidade intrínseca

SUMÁRIO

1	MOTIVAÇÃO	14
2	INTRODUÇÃO	16
2.1	Lesões de pele e curativos	16
2.2	Quitosana e quitina	19
2.3	<i>Whiskers</i> de quitina	20
2.4	Cloreto de <i>N</i> -(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana	21
2.5	Genipina como agente reticulante.....	23
2.6	Impressão 3D por <i>direct ink writing</i> (DIW)	25
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Materiais	31
4.2	Produção de <i>whiskers</i> de beta-quitina.....	31
4.3	Produção de quitosana <i>via</i> processo DAIUS multi-etapas	31
4.4	Síntese do cloreto de <i>N</i> -(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat) 32	
4.5	Preparo da tinta e fabricação das membranas assimétricas <i>via</i> impressão 3D	32
4.6	Caracterizações das matérias-primas (beta-quitina, <i>whiskers</i> , quitosana QD2 e derivado QCat)	35
4.6.1	Espectroscopia no infravermelho.....	35
4.6.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C	35
4.6.3	Viscosimetria capilar em regime diluído	35
4.6.4	Titulação condutimétrica.....	37
4.6.5	Difratometria de raios X	37
4.6.6	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	38

4.6.7	Microscopia de força atômica (AFM)	38
4.6.8	Análise termogravimétrica	38
4.6.9	Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)	38
4.7	Caracterizações reológicas da tinta para impressão 3D DIW	40
4.7.1	Pseudoplasticidade	40
4.7.2	Viscoelasticidade	41
4.7.3	Tixotropia	41
4.8	Caracterizações das membranas assimétricas	41
4.8.1	Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	41
4.8.2	Análise termogravimétrica	41
4.8.3	Medidas de ângulo de contato	42
4.8.4	Capacidade de intumescimento	42
4.8.5	Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão (teste do halo de inibição)	42
4.8.6	Susceptibilidade à degradação enzimática <i>in vitro</i>	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
5.1	Caracterizações das matérias-primas (beta-quitina, <i>whiskers</i> , quitosana QD2 e derivado QCat).....	45
5.1.1	Espectroscopia no infravermelho	45
5.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹ H e ¹³ C ...	46
5.1.3	Viscosimetria capilar em regime diluído.....	49
5.1.4	Titulação condutimétrica	50
5.1.5	Difratometria de raios X.....	51
5.1.6	Morfologia dos <i>whiskers</i> de beta-quitina.....	51
5.1.7	Análise termogravimétrica	53

5.1.8	Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)	54
5.2	Caracterizações reológicas da tinta para impressão 3D.....	56
5.3	Caracterizações das membranas assimétricas.....	59
5.3.1	Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	61
5.3.2	Análise termogravimétrica.....	63
5.3.3	Medidas de ângulo de contato.....	64
5.3.4	Capacidade de intumescimento.....	65
5.3.5	Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão (teste do halo de inibição)	67
5.3.6	Susceptibilidade à degradação enzimática <i>in vitro</i>	69
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	72
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	74

1 MOTIVAÇÃO

Mesmo com uma diversidade de curativos disponíveis comercialmente, o tratamento de lesões de pele segue como um grande desafio científico e tecnológico, especialmente nos casos de lesões graves e de difícil cicatrização (FALANGA et al., 2022; HAN; CEILLEY, 2017). Neste sentido, é notável o esforço para desenvolvimento e produção de novos curativos que sejam capazes de acelerar o processo de cicatrização empregando matérias-primas renováveis e não poluentes. Além disso, é observada tendência no sentido de produção sob demanda de curativos multifuncionais e que se adaptem às necessidades do paciente (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; DENG et al., 2021; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; UCHIDA; BRUSCHI, 2023).

Membranas assimétricas são materiais que apresentam propriedades adequadas visando aplicações em curativos de pele, conforme já mostrado em outros trabalhos (GRAÇA et al., 2021a; MIGUEL et al., 2019; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019). A estrutura dessas membranas é usualmente baseada em uma camada externa de menor porosidade que, idealmente, confere proteção à ferida contra choques mecânicos, agentes químicos e microrganismos, e uma camada interna que fica em contato direto com a ferida, que é mais porosa e, idealmente, apresenta capacidade de absorver o excesso de exsudato, de favorecer a adesão e de promover a diferenciação e proliferação celular, acelerando o processo de cicatrização (GRAÇA et al., 2021a; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019).

Dentre as técnicas que podem ser utilizadas para produção de membranas assimétricas, é destacada a impressão 3D por *direct ink writing* (DIW) (“escrita direta por tinta”, em tradução livre em português), por ser versátil, de baixo custo, que gera poucos resíduos e que possui potencial para produção sob demanda de materiais de alta complexidade geométrica e estrutural (TAGLIAFERRI; PANAGIOTOPOULOS; MATTEVI, 2021a). A impressão 3D DIW requer, no entanto, controle e otimização tanto da reologia da tinta para impressão quanto dos parâmetros de processo (SAADI et al., 2022).

Cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat), derivado cationizado de quitosana obtido através da reação deste polissacarídeo com cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA), apresenta diversas propriedades atrativas para aplicações na área biomédica, como hidrossolubilidade, biocompatibilidade, atividade antimicrobiana e ação hemostática (DOS SANTOS et al., 2018). *Whiskers* de beta-quitina, produzidos a partir da acidólise deste polissacarídeo, podem ser utilizados como agentes modificadores de reologia e como reforço mecânico em materiais compósitos de matriz polimérica (ZENG et al., 2011). Genipina é um reticulante natural amplamente utilizado para reticulação de quitosana e

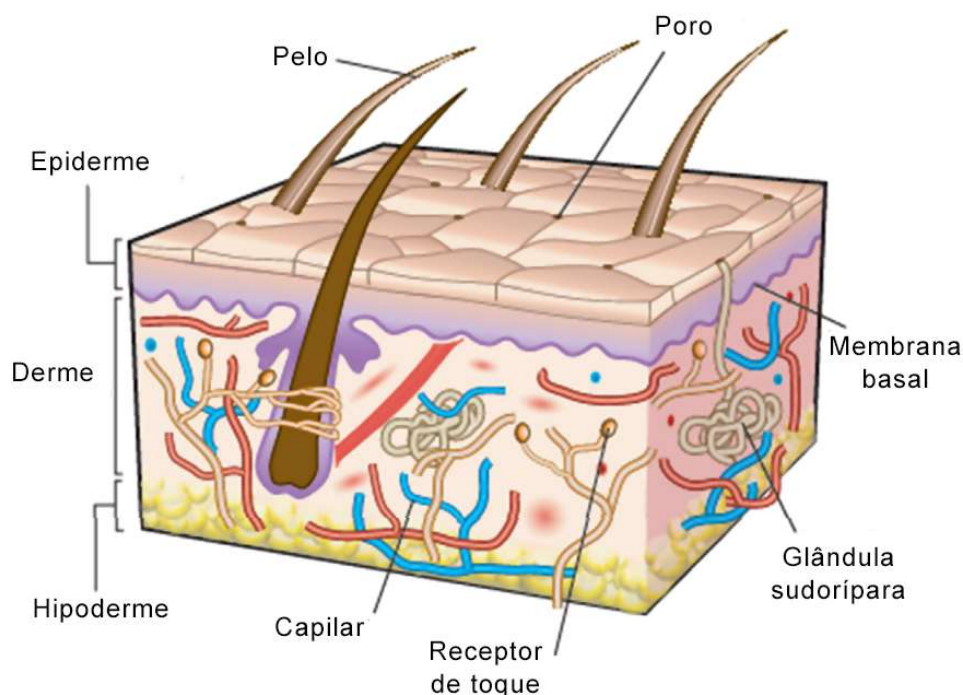
derivados, que apresenta biodegradabilidade e baixa toxicidade (GONSALVES et al., 2011; PEREIRA et al., 2014). Como o derivado QCat e a genipina são hidrossolúveis e os *whiskers* de beta-quitina podem ser suspensos em água, é possível produzir tinta para impressão 3D DIW à base d'água empregando essas matérias-primas. Neste contexto, este estudo tem como objetivo a produção, através da técnica de impressão 3D DIW, de membranas assimétricas com potenciais aplicações biomédicas empregando cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat), *whiskers* de beta-quitina e genipina como reticulante.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Lesões de pele e curativos

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, cobrindo cerca de 2 m² de área superficial e compondo cerca de 10% da massa corporal de um adulto (NG; LAU, 2015). Esse órgão é responsável por definir uma fronteira entre o corpo e seus arredores, de forma a permitir que funções vitais ocorram em ambiente controlado, além de regular a temperatura corporal, produzir vitamina D, fornecer proteção contra choques físicos, radiação, microrganismos e agentes químicos danosos, excretar metabólitos, prevenir desidratação e ser responsável por funções sensoriais (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015; MIGUEL et al., 2019). Conforme é ilustrado na Figura 1, a pele possui 3 camadas principais: epiderme, derme e hipoderme, sendo que cada uma delas apresenta diferentes tipos de células, responsáveis pela execução de diferentes funções.

Figura 1 - Representação esquemática da pele humana.



Fonte: Adaptado de BHARDWAJ; CHOUHAN; MANDAL, 2018.

A camada mais interna da pele, hipoderme, é constituída por tecido conjuntivo e adiposo e é responsável pela manutenção da temperatura corporal e na proteção contra choques mecânicos. A hipoderme, por vezes, não é classificada como estrutura da pele em si, visto que atua como suporte físico para a derme e a epiderme, unindo-as a órgãos adjacentes (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016). A derme é a camada intermediária da pele, composta

majoritariamente por fibroblastos em matriz extracelular de colágeno e elastina. A derme possui grande variedade de células do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas dérmicas. A camada mais externa, epiderme, é constituída majoritariamente por queratinócitos e está em constante renovação. A epiderme também é constituída por melanócitos, células de Langerhans (células dendríticas) e células de Merkel (células neuroendócrinas), e é responsável em fornecer proteção mecânica, prevenir a desidratação e produzir melanina (SCHLÜTER et al., 2014).

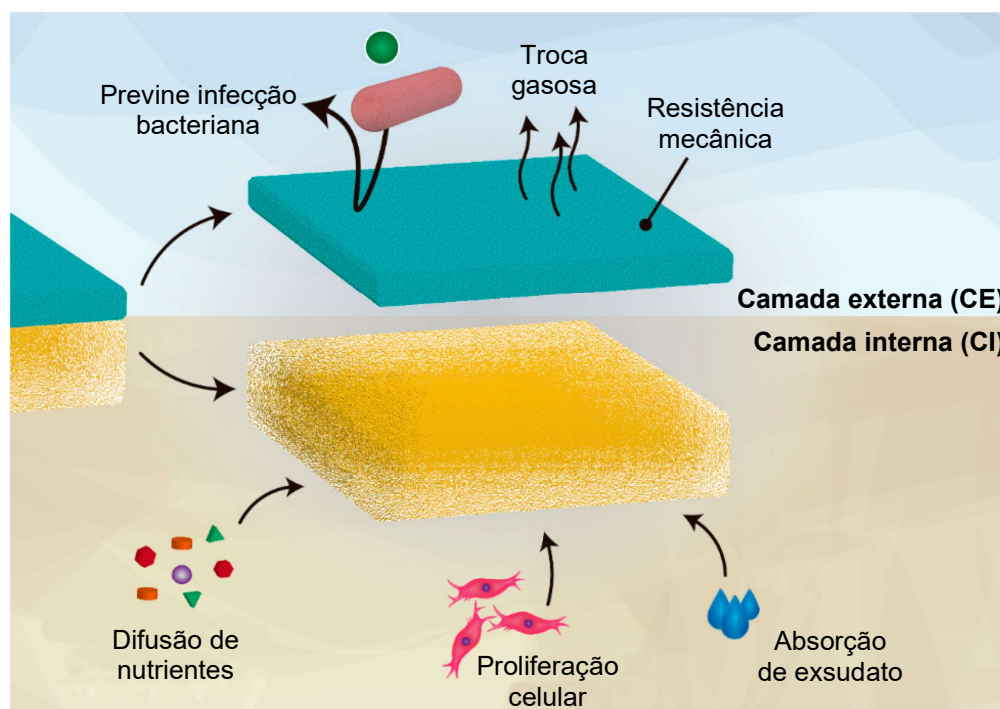
Por ser a camada mais externa do corpo, a pele está sujeita a diferentes tipos de lesões que podem ser classificadas como agudas ou crônicas, de acordo com o tempo necessário para cicatrização. Lesões agudas são aquelas em que o processo de cicatrização leva um período de tempo previsível, com duração máxima de 3 meses, dependendo do tamanho e magnitude do dano sofrido (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; HAN; CEILLEY, 2017). As causas de lesões agudas podem ser choques mecânicos, choques elétricos, exposição a agentes químicos danosos ou altas temperaturas. Por outro lado, as lesões crônicas, apresentam tempo indeterminado para cicatrização e enfrentam dificuldades adicionais durante este processo, os quais podem ser atribuídos a fatores externos, como infecção prolongada da ferida, ou a fatores relacionados ao paciente, como ocorrência de diabetes e insuficiência venosa, por exemplo. (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016). A seleção apropriada do curativo para tratamento de lesões de pele deve ser feita levando em consideração fatores como o local, extensão, profundidade e causa da ferida, além da presença de infecção bacteriana e excesso de exsudato, pois isso contribui significativamente para cicatrização mais rápida e eficiente (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

Um curativo ideal deve atuar como uma barreira física entre a lesão e o meio, proteger a ferida contra a ação de microrganismos, possibilitar a troca gasosa e de nutrientes na ferida, absorver o excesso de exsudato, atuar como agente hemostático, ser mucoadesivo, possuir propriedades mecânicas adequadas, permitir a adesão e proliferação celular e acelerar o processo de cicatrização (CHABY et al., 2007). Além disso, é essencial que o curativo seja seguro, eficaz e, preferencialmente, de fácil manipulação (MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019). Todavia, não há um curativo ideal e universal que possua todas essas características e possa ser utilizado em todos os tipos de lesões de pele. De fato, mesmo a maioria dos curativos disponíveis comercialmente não possuem todas as características desejáveis. Sendo assim, é notável o esforço para desenvolvimento de novos curativos, especialmente para tratamento de feridas crônicas (CHABY et al., 2007; FALANGA et al., 2022).

Dentre os diferentes tipos de materiais estudados como potenciais curativos, é destacado o potencial das membranas assimétricas, também chamadas de membranas bicamadas.

Conforme ilustrado na Figura 2, estas apresentam uma camada interna (CI), que é porosa e fica em contato direto com a ferida, e uma camada externa (CE), que é mais compacta e fica exposta ao meio (CHAGAS et al., 2021; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019).

Figura 2 - Representação esquemática das principais funções exercidas pela camada externa (CE) e camada interna (CI) de membranas assimétricas utilizadas como curativos de pele.



Fonte: Adaptado de (GRAÇA et al., 2021b).

Membranas assimétricas são materiais interessantes para utilização como curativos pois a camada externa é capaz de fornecer proteção contra microrganismos e controlar a troca gasosa com o meio, enquanto a camada interna pode fornecer ambiente propício para a adesão e proliferação celular, manter o equilíbrio de umidade no leito da ferida, permitir o transporte de nutrientes e absorver o excesso de exsudato (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019).

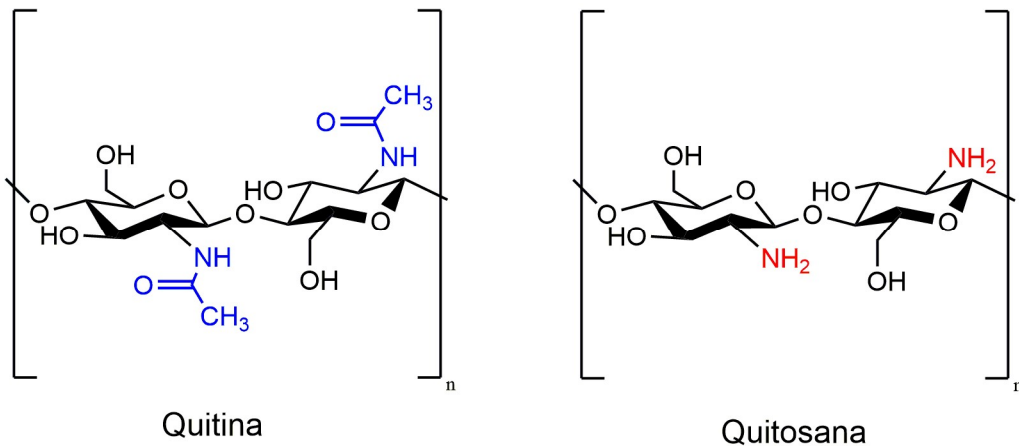
A escolha das matérias-primas e do processamento empregados para a produção de membranas assimétricas são pontos chave para obtenção de materiais que possuam propriedades adequadas para serem utilizados como curativos. Neste sentido, é notável o potencial do cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat), derivado cationizado de quitosana, por possuir características como hidroflicidade, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana (DE ALMEIDA; DA SILVA, 2021; DOS SANTOS et al., 2018; RUIHUA et al., 2012). Com relação ao processamento, a técnica de impressão 3D DIW se destaca por permitir a produção de materiais geometrias complexas, o que possibilita a

produção de membranas que possuam a camada externa mais compacta e densa e a camada interna com poros de tamanho ajustável (SAADI et al., 2022).

2.2 Quitosana e quitina

A quitosana é um biopolímero de cadeia linear formado majoritariamente por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas por ligação glicosídica do tipo β (1 \rightarrow 4), conforme ilustrado pela Figura 3. A quitosana geralmente é preparada a partir da *N*-desacetilação da quitina, um biopolímero abundante cujas unidades predominantes, 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc), são unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (LAVALL; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2007).

Figura 3 - Estruturas idealizadas da quitina e quitosana (n = grau de polimerização).



Fonte: Autoria própria.

A diferenciação entre quitina e quitosana está associada à quantidade de unidades GlcNAc e GlcN, expressa pelo grau médio de acetilação (\overline{GA}) (ou grau médio de desacetilação, \overline{GD}) e também à solubilidade em meio aquoso moderadamente ácido. Se o polímero contiver mais de 60% de unidades GlcN ($\overline{GA} < 40\%$ e $\overline{GD} > 60\%$) e for solúvel em solução aquosa de acidez moderada, na faixa de $\text{pH} \approx 4-5$, é classificado como quitosana, enquanto quitina apresenta $\overline{GA} > 40\%$ ($\overline{GD} < 60\%$) e é insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos mais comuns (ANITHA et al., 2014).

A quitina é considerada um dos polissacarídeos mais abundantes da natureza, sendo encontrada nos exoesqueletos de animais marinhos (lulas, camarões, caranguejos), insetos, como componente das paredes celulares de fungos e leveduras, e possui alta taxa de renovação, sendo estimado que cerca de 10 gigatoneladas de quitina são sintetizadas anualmente por diferentes organismos (ANITHA et al., 2014; LAVALL; ASSIS; CAMPANA-FILHO, 2007).

A quitosana ocorre naturalmente em alguns fungos, porém sua obtenção é realizada, na maioria das vezes, através da *N*-desacetilação da quitina (ANITHA et al., 2014).

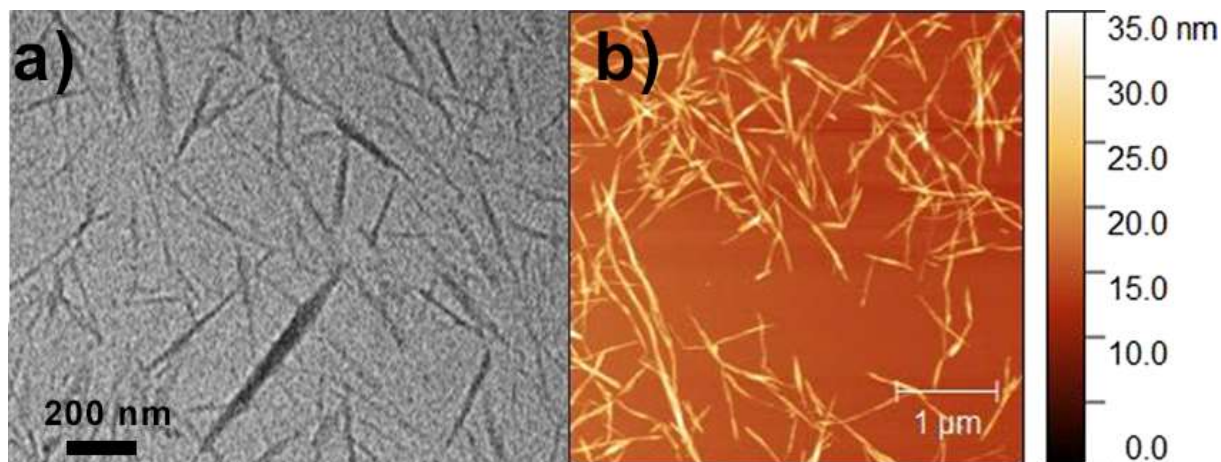
A reação de *N*-desacetilação da quitina corresponde à hidrólise dos grupos acetamido pertencentes às unidades GlcNAc, o que resulta na formação de grupos amino e, conseqüentemente, no aumento do teor de unidades GlcN, acarretando na conversão de quitina em quitosana quando \overline{GA} é inferior a 60%. A reação de *N*-desacetilação da quitina poder ser realizada enzimaticamente, porém o processo é custoso e lento, assim, os processos termoquímicos são os mais utilizados, sendo o processo mais frequentemente empregado aquele que utiliza meio fortemente alcalino e temperatura elevada. Todavia, o emprego de altas temperaturas e o prolongamento da reação resultam na ocorrência de severa despolimerização. Como alternativa aos processos enzimáticos e termoquímicos, é possível destacar a produção de quitosana através do processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, denominado processo DAIUS. Este processo geralmente é executado empregando temperatura de 60 °C e tempo de reação de 50 minutos, minimizando a ocorrência de despolimerização frente aos processos termoquímicos, o que resulta em quitosana de elevada massa molar (CAMPANA-FILHO; DELEZUK; CARDOSO, 2010; FIAMINGO et al., 2016).

2.3 *Whiskers* de quitina

Whiskers de quitina são nanoestruturas cristalinas obtidas através da acidólise deste polissacarídeo, que tem natureza semicristalina. Essas nanoestruturas apresentam alta área superficial e alta razão de aspecto (razão comprimento/diâmetro) e encontram aplicações principalmente quando incorporadas em materiais compósitos de matriz polimérica, devido à capacidade de melhorar propriedades mecânicas e potencializar outras propriedades, como atividade antimicrobiana (VISAKH; THOMAS, 2010; ZENG et al., 2011).

Os *whiskers* podem ser obtidos através de acidólise, pois a quitina apresenta caráter semicristalino, *i.e.*, possui tanto domínios amorfos quanto cristalinos. Os domínios cristalinos possuem compactação mais densa e organizada devido à ocorrência de numerosas ligações de hidrogênio entre as cadeias, enquanto os domínios amorfos apresentam menor coesão estrutural. Ao submeter a quitina a tratamento com solução de ácido mineral concentrado é possível hidrolisar predominantemente as ligações glicosídicas das cadeias dos domínios amorfos, tornando-as solúveis, enquanto a maior parte dos domínios cristalinos é preservada. Ao final da reação, o que resta são nanoestruturas cristalinas insolúveis denominadas *whiskers* de quitina, as quais são exibidas na Figura 4 por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão e de força atômica (ZENG et al., 2011).

Figura 4 - Imagens de (a) microscopia eletrônica de transmissão e (b) microscopia de força atômica de *whiskers* de alfa-quitina.



Fonte: Adaptado de SHAMSHINA; ABIDI, 2022.

O controle da razão de aspecto dos *whiskers* é essencial pois este é um parâmetro que influencia diretamente as propriedades mecânicas das nanoestruturas quando as mesmas são utilizadas como fase dispersa em materiais compósitos. Geralmente, quanto maior a razão de aspecto, melhores são as propriedades de reforço mecânico (ANWER et al., 2019; FAN; SAITO; ISOGAI, 2008a; ZENG et al., 2011). O diâmetro dos *whiskers* geralmente se encontra no intervalo de 10–50 nm, independentemente da origem da quitina ou das condições empregadas na acidólise, enquanto que o comprimento é variável de acordo com estas mesmas condições, assumindo valores no intervalo de 150–2200 nm (ZENG et al., 2011).

Além de encontrar aplicações como reforço mecânico em materiais de matriz polimérica, os *whiskers* de quitina também podem ser utilizados como agentes modificadores de reologia, o que é especialmente útil considerando processamento *via* impressão 3D DIW. É reportado que suspensões de *whiskers* apresentam comportamento pseudoplástico em taxa de cisalhamento entre 0,01 e 100 s⁻¹ e módulo de armazenamento (G') maior que o módulo de perda (G'') em frequências angulares entre 0,1 e 100 rad s⁻¹ (LIU et al., 2020).

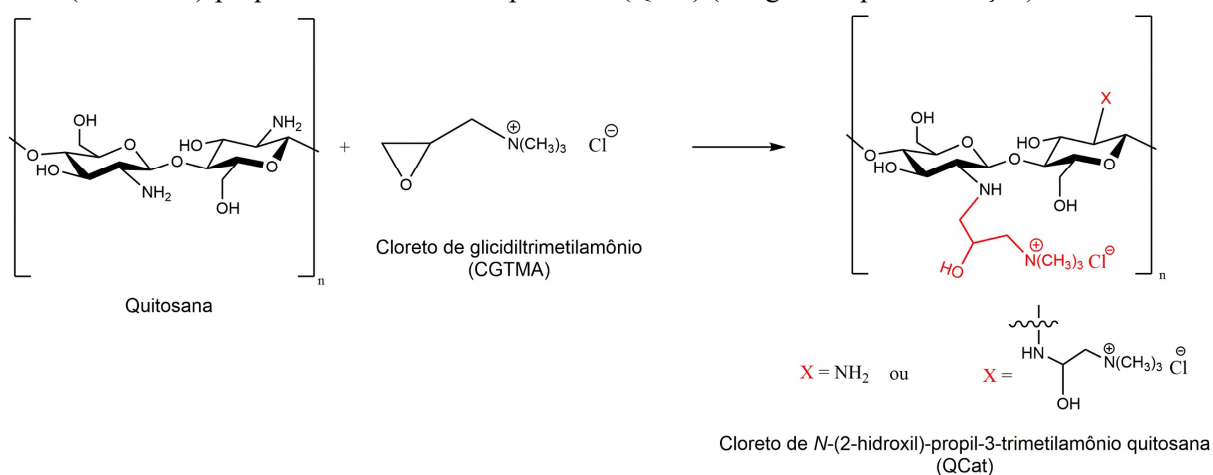
2.4 Cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana

A quitosana exibe propriedades biológicas de interesse, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana, as quais são atrativas para a produção de materiais com potenciais aplicações biomédicas (ANITHA et al., 2014). Entretanto, uma característica fundamental que limita a gama de aplicações da quitosana é sua baixa solubilidade em meios neutro e alcalino. Neste sentido, uma estratégia que pode ser adotada para superar as limitações decorrentes da baixa solubilidade da quitosana é sua derivatização

química, que permite obter derivados de quitosana solúveis em meio aquoso em ampla faixa de pH ($2 < \text{pH} < 12$), além de conferir novas propriedades ou potencializar as propriedades vantajosas já existentes na quitosana, como a atividade antimicrobiana (WANG et al., 2020).

A cationização é uma das modificações químicas que podem ser realizadas na quitosana com objetivo de obter derivados que sejam solúveis em meio aquoso em ampla faixa de pH e que apresentem atividade antimicrobiana potencializada quando comparada à quitosana de partida. Derivados cationizados de quitosana apresentam grupamento contendo nitrogênio quaternizado, que possui carga positiva permanente (SENRA et al., 2015). A depender das condições reacionais (tempo, temperatura, pH) empregadas, a cationização de quitosana pode ocorrer nas hidroxilas ligadas aos carbonos C3 e C6 das unidades GlcN e GlcNAc, produzindo derivados *O*-cationizados, ou no grupo amino das unidades GlcN, produzindo derivados *N*-cationizados (FENG et al., 2020; WANG et al., 2020). O cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat) é um derivado *N*-cationizado de quitosana que pode ser produzido a partir da reação deste biopolímero com cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA), conforme ilustrado pela Figura 5.

Figura 5 - Reação da quitosana com cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA), produzindo cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat) (n = grau de polimerização).



Fonte: Autoria própria.

As propriedades físico-químicas e atividades biológicas do derivado QCat dependem diretamente de parâmetros como massa molar média, grau médio de acetilação (\overline{GA}) e grau médio de substituição (\overline{GS}) de QCat (CHO et al., 2006; HUANG et al., 2014). O grau médio de substituição, \overline{GS} , refere-se ao teor de unidades que contém o grupamento com o nitrogênio quaternário (SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016a). De modo geral, a solubilidade em meio aquoso e a atividade antimicrobiana de QCat aumentam conforme \overline{GS}

aumenta, o que é atribuído à acentuação do caráter polieletrólítico à medida que a densidade de cargas positivas nas cadeias poliméricas aumenta. Entretanto, valores relativamente altos de \overline{GS} (> 60%) tornam QCat citotóxico a diversos tipos de células, o que pode inviabilizar a utilização de derivados com alto grau de substituição em aplicações biomédicas (WONGWANAKUL et al., 2017). A massa molar de QCat impacta diretamente suas propriedades reológicas em solução aquosa, enquanto \overline{GA} afeta principalmente sua susceptibilidade à degradação enzimática (VERHEUL et al., 2009a).

O controle desses importantes de parâmetros de QCat (\overline{GA} , \overline{GS} e massa molar) é realizado através do controle das condições reacionais entre quitosana e CGTMA. Tipicamente, a reação é executada em meio aquoso levemente ácido, empregando ácido acético a 0,5% (v/v), pois reações em meio neutro ou alcalino podem resultar em elevada despolimerização, *N*-desacetilação ou outras reações colaterais indesejadas, como a *O*-derivatização (RUIHUA et al., 2012). Para síntese de QCat com $\overline{GS} \approx 30\%$, parâmetro que confere hidrossolubilidade em ampla faixa de pH ($2 < \text{pH} < 12$) e atividade antimicrobiana, as condições empregadas são uma razão molar de CGTMA:quitosana de 4:1 e reação com duração de 8 horas a 80 °C (SAJOMSANG et al., 2009; SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016a).

2.5 Genipina como agente reticulante

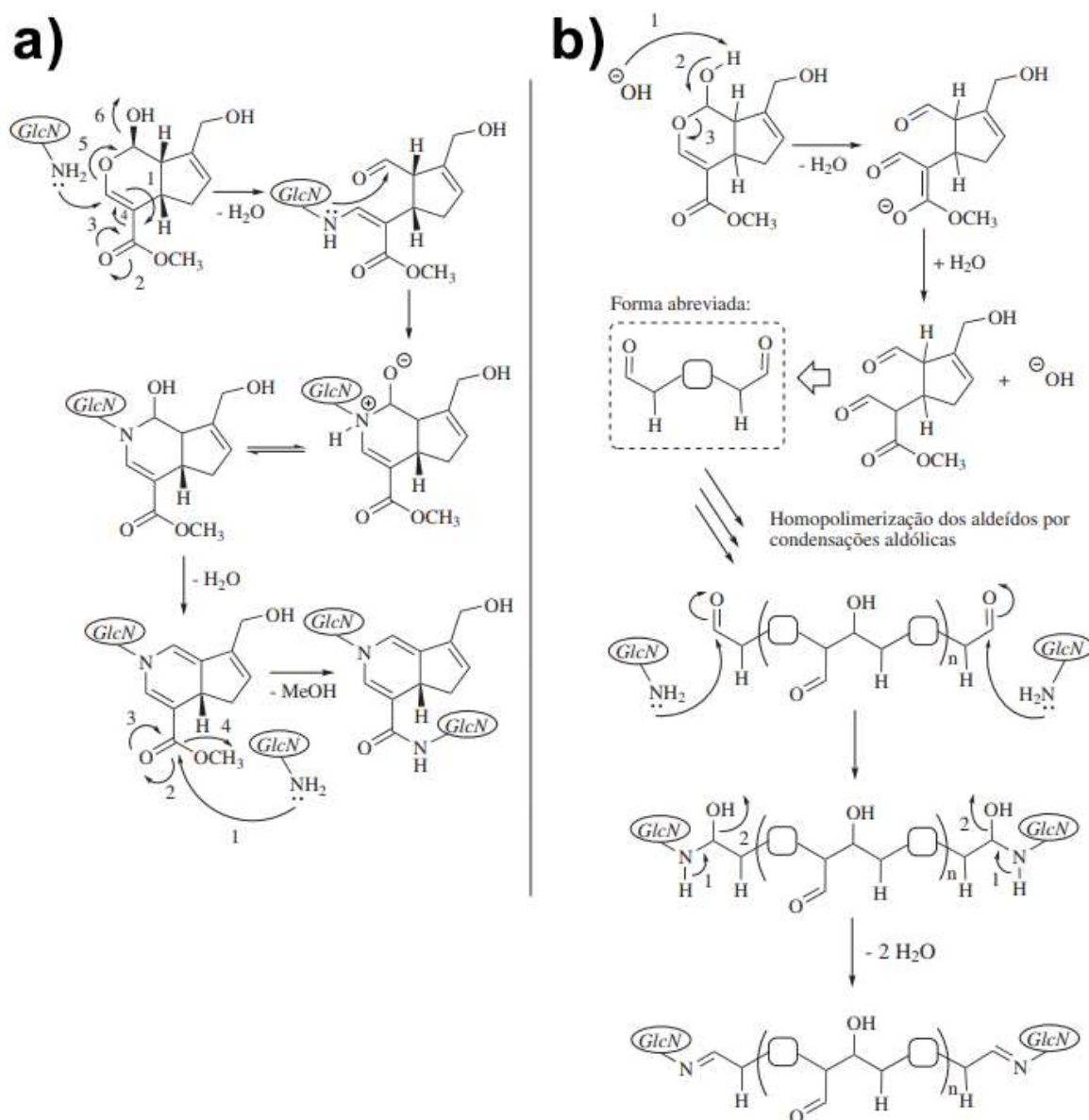
No desenvolvimento de membranas assimétricas à base do derivado QCat e *whiskers* de beta-quitina, é importante considerar que o material final deve apresentar propriedades mecânicas adequadas e ser insolúvel em meio aquoso. Desta forma, é necessário realizar a reticulação dos polímeros constituintes das membranas assimétricas, seja por interações físicas ou ligações covalentes, para evitar que o material se desintegre em contato com o meio aquoso. A escolha do reticulante deve ser realizada considerando a aplicação final do material, portanto, agentes reticulantes que apresentem alta toxicidade, como o glutaraldeído, devem ser evitados para reticulação de materiais com potencial aplicação biomédica (PEREIRA et al., 2014).

A genipina é um agente reticulante natural extraído de frutas de gardênia (*Gardenia jasminoides* Ellis), uma planta arbustiva (MUZZARELLI, 2009). Esse reticulante é amplamente empregado na reticulação covalente de quitosana e seus derivados, especialmente na produção de biomateriais, por ser considerado o agente reticulante com menor toxicidade, sendo até 10.000 vezes menos tóxica que o glutaraldeído (CHEN et al., 2004; HILLBERG; HOLMES; TABRIZIAN, 2009). Outra vantagem da genipina frente a outros agentes reticulantes é sua alta seletividade, pois reage apenas com grupamentos amino primários (–

NH₂), o que evita reações colaterais indesejadas com outros grupos funcionais presentes na estrutura do polímero (VO et al., 2021).

O mecanismo e o produto final de reticulação da quitosana com a genipina dependem do pH do meio reacional, conforme ilustrado na Figura 6. Em meio ácido ou neutro, o produto final apresenta cadeias curtas de genipina que atuam como pontes de reticulação. Já em meio alcalino, ocorre homopolimerização da genipina, o que resulta em produto final com cadeias de quitosana ligadas a longas pontes de reticulação de genipina (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003; GONSALVES et al., 2011; MUZZARELLI, 2009).

Figura 6 - Mecanismo de reticulação da quitosana com genipina (a) em meio ácido ou neutro e (b) em meio alcalino.



É reportado que hidrogéis a base de quitosana ou derivados de quitosana reticulados com genipina apresentam coloração verde/azulada. De acordo com a literatura, esta coloração ocorre se a reação de reticulação ocorrer em meio alcalino e/ou com a presença de oxigênio do ar, pois estas condições induzem a homopolimerização da genipina, que é responsável pela cor verde/azulada (BUTLER; NG; PUDNEY, 2003).

2.6 Impressão 3D por *direct ink writing* (DIW)

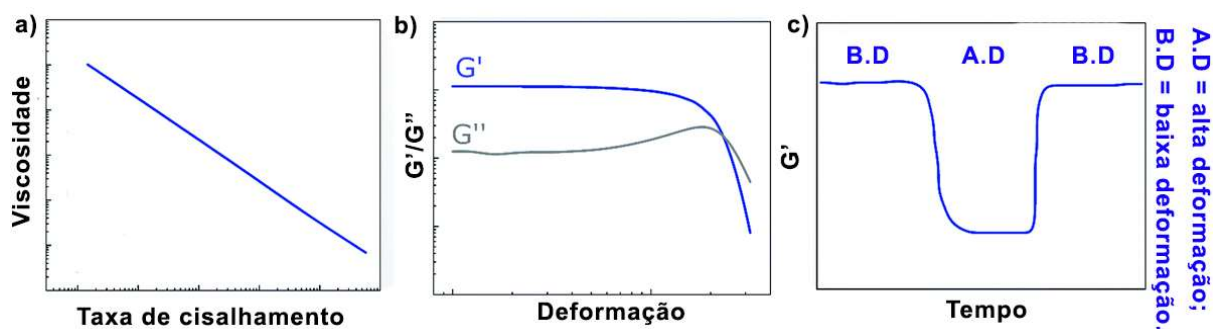
Existem diversas técnicas de impressão 3D, como as baseadas em extrusão, estereolitografia, jato de tinta e sinterização a laser, sendo que cada uma delas apresenta suas respectivas vantagens e desvantagens. A impressão 3D por *direct ink writing* (DIW) pode ser definida como uma técnica de impressão 3D baseada em extrusão que envolve a deposição de uma tinta viscoelástica através de um bocal fino (SAADI et al., 2022). A principal vantagem da impressão 3D DIW é sua versatilidade, pois permite o processamento de ampla gama de materiais. Na literatura, é possível encontrar trabalhos que utilizam impressão 3D DIW a base de tintas condutoras de eletricidade (NGUYEN et al., 2019), tintas à base de materiais cerâmicos (STANCIUC et al., 2018) e tintas à base de hidrogéis de polímeros naturais (AJDARY et al., 2022). Considerando aplicações biomédicas, como a de curativos de pele, as tintas mais exploradas são aquelas à base de hidrogéis de biopolímeros, devido ao fato dessas macromoléculas comumente apresentarem propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade e de o solvente usado ser água (FAYYABAKHSH; J. KHAYAT; C. LEU, 2022; LONG et al., 2019).

O processo de impressão 3D DIW pode ser dividido em 3 etapas principais. A primeira etapa consiste em projetar um modelo 3D em software de desenho assistido por computador (do inglês, *computer-aided design*, CAD). A segunda etapa é realizada em software fatiador, que é responsável por gerar um arquivo GCODE a partir do modelo 3D projetado na etapa anterior. O arquivo GCODE contém as informações dos parâmetros do processo de impressão e movimentos que a impressora deve realizar de forma a fabricar o material. Na última etapa, ocorre o processo de impressão em si, no qual a impressora executa os comandos contidos no GCODE, resultando na deposição do material na mesa de impressão por meio da extrusão da tinta pelo bocal da impressora (MANOJ PRABHAKAR et al., 2021).

O grande desafio para fabricação de materiais empregando impressão 3D DIW está no desenvolvimento da tinta, que deve possuir comportamento reológico bem definido (LEWIS, 2006). Características que afetam a fidelidade do material impresso frente ao modelo 3D inicialmente projetado, como a retenção da forma do filamento extrudado e a capacidade de

sustentação de camadas impressas em sequência estão diretamente relacionadas à reologia. Idealmente, a tinta deve apresentar comportamento pseudoplástico, *i.e.*, a viscosidade (η) deve diminuir com o aumento da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). O comportamento pseudoplástico (ilustrado na Figura 7a) é desejado pois no momento da extrusão a tinta é submetida a grande cisalhamento ao passar pelo bocal da impressora e, assim, uma diminuição da viscosidade facilita o escoamento (SAADI et al., 2022).

Figura 7 - Comportamento reológico ideal de tinta para impressão 3D DIW: a) comportamento pseudoplástico; b) $G' > G''$ em região de baixa deformação e $G'' > G'$ em região de alta deformação; c) recuperação rápida de G' em teste de tixotropia de três intervalos.



Fonte: Adaptado de TAGLIAFERRI; PANAGIOTOPOULOS; MATTEVI, 2021a.

Além da pseudoplasticidade, a tinta idealmente deve apresentar comportamento semelhante ao de um sólido quando submetida à baixa tensão (ou deformação) de cisalhamento e comportamento semelhante ao de um líquido quando submetida a grande tensão (ou deformação) de cisalhamento. Para avaliar estes comportamentos, são realizadas varreduras do módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da deformação, conforme ilustrado na Figura 7b. De forma geral G' corresponde à componente elástica do fluido, enquanto G'' corresponde à componente viscosa (RAMLI et al., 2022). Na região em que a componente elástica é predominante ($G' > G''$), o fluido se comporta de modo semelhante a um sólido e não escoam com facilidade, enquanto que na região onde a componente viscosa é predominante ($G'' > G'$), o comportamento é semelhante ao de um líquido, resultando em escoamento. Na prática, a tinta deve apresentar comportamento semelhante ao de um líquido durante a extrusão, quando é submetida à alta tensão de cisalhamento no bocal da impressora, de modo a favorecer o escoamento. Já o comportamento semelhante ao de um sólido é requerido após a extrusão, pois permite a retenção da forma do filamento extrudado e sustentação de camadas impressas subsequentemente (SAADI et al., 2022).

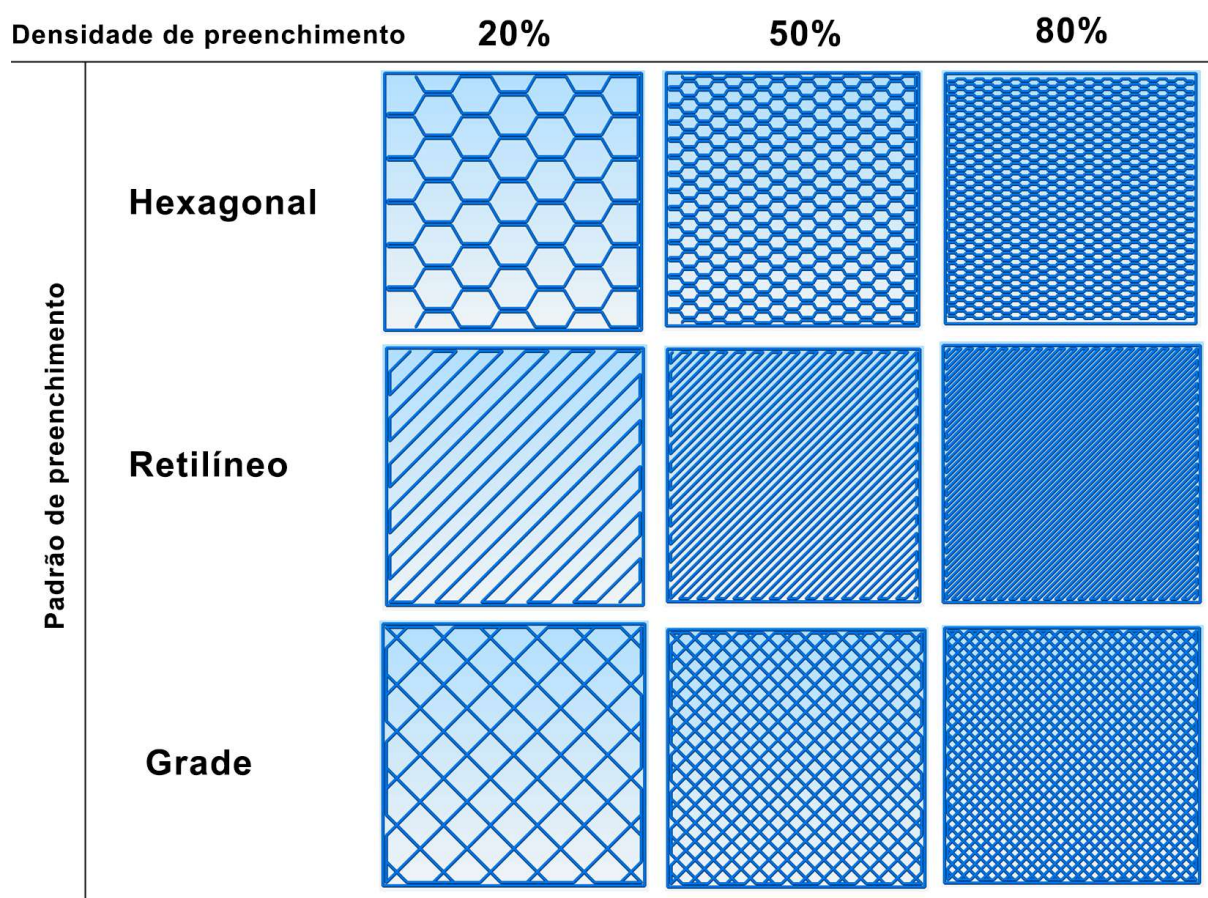
Por fim, é ideal que a tinta seja tixotrópica, *i.e.*, apresente diminuição da viscosidade com o tempo sob aplicação de taxa de cisalhamento constante, seguido da recuperação da

viscosidade quando o cisalhamento é removido (BARNES, 1997). Uma das maneiras de avaliar essa propriedade é através do ensaio de tixotropia de três intervalos (Figura 7c), no qual a amostra é submetida à diferentes patamares de deformação por determinados períodos de tempo, de modo a avaliar a recuperação do módulo de armazenamento (G'). A recuperação de G' indica que a tinta possui capacidade de recuperar a componente elástica logo após ser altamente cisalhada, ou seja, logo após ser extrudada, a tinta volta a se comportar de maneira semelhante a um sólido, o que resulta na retenção da forma do filamento após a extrusão (NAN et al., 2020a; TAGLIAFERRI; PANAGIOTOPOULOS; MATTEVI, 2021a).

Juntamente ao comportamento reológico ideal, a técnica de impressão 3D DIW requer a escolha e otimização de parâmetros de processo, denominados parâmetros de impressão. Alguns dos principais parâmetros que podem ser alterados com objetivo de produzir materiais com resolução adequada são o multiplicador de extrusão, a velocidade de impressão, o padrão de preenchimento e a densidade de preenchimento. O multiplicador de extrusão é definido como a taxa em que a tinta será extrudada através do bocal da impressora. A velocidade de impressão é dada em mm s^{-1} , e indica a velocidade que um único filamento é extrudado. Conforme esperado, maiores velocidades permitem a fabricação de materiais mais rapidamente, entretanto, a velocidade também influencia na taxa em que o material é extrudado e, conseqüentemente, na resolução da peça final (MANOJ PRABHAKAR et al., 2021).

O padrão de preenchimento diz respeito à geometria que será utilizada para preencher a peça, conforme ilustrado na Figura 8. A densidade de preenchimento está relacionada à quantidade de material que irá ser depositada no interior da peça, de acordo com o padrão de preenchimento escolhido, e pode variar de 0 (peça sem preenchimento) a 100% (peça totalmente preenchida) (MANOJ PRABHAKAR et al., 2021).

Figura 8 - Capturas de tela do software Simplify3D 4.1.2, ilustrando diferentes padrões de preenchimento (hexagonal, retilíneo e grade) com diferentes densidades de preenchimento (20%, 50% e 80%).



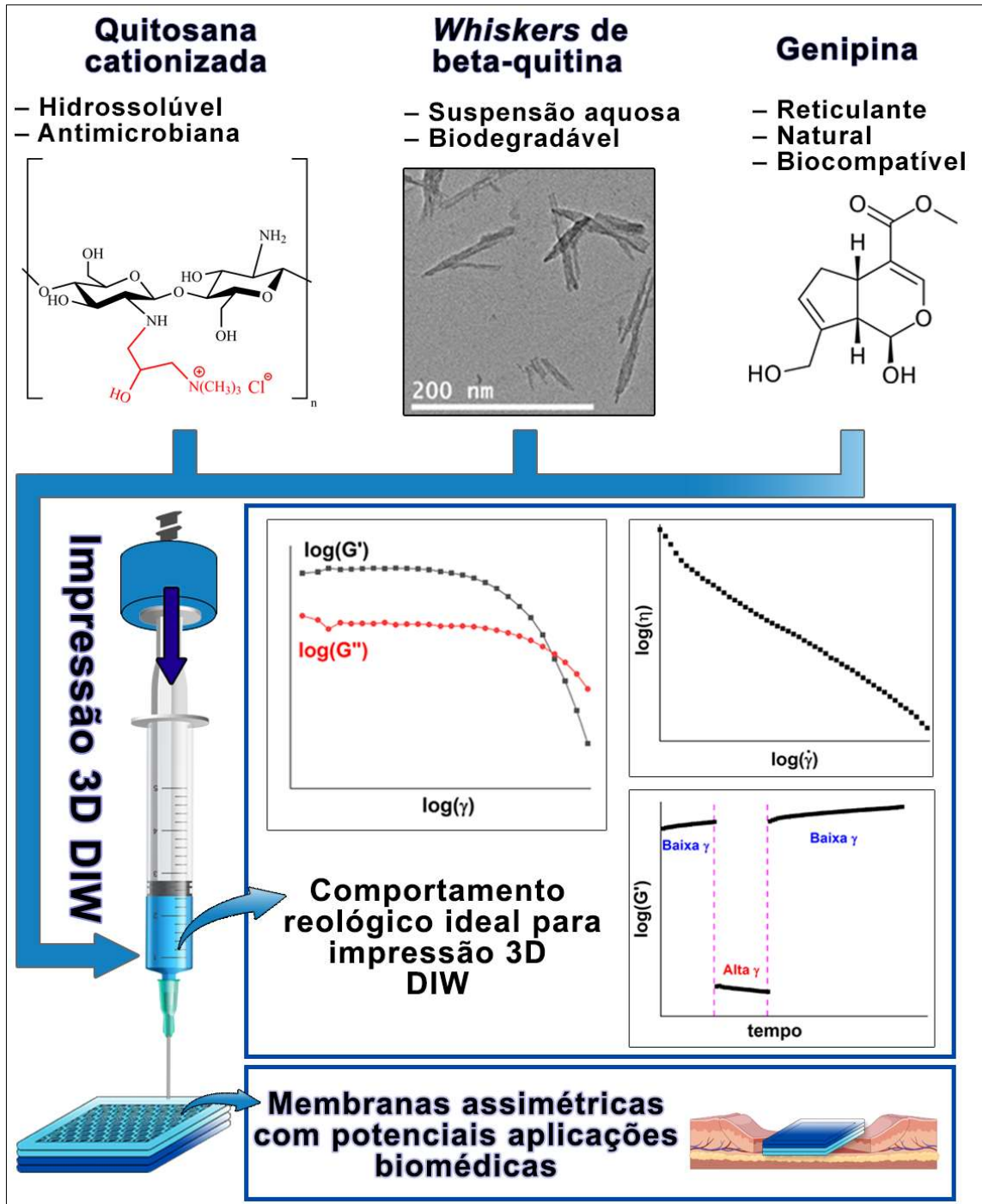
Fonte: Autoria própria.

Há ainda outros parâmetros de processo que podem ser alterados no software fatiador, como a quantidade de camadas, altura entre camadas, distância entre a agulha e a mesa de impressão, angulação do padrão de preenchimento, distância entre os filamentos extrudados, número de bordas externas, dentre outros. Todos esses parâmetros (e outros não citados) influenciam diretamente as propriedades do material final, como propriedades mecânicas, capacidade de absorção de água e atividade biológica (MANOJ PRABHAKAR et al., 2021). Por permitir imprimir tintas à base de diversos materiais e por possuir diversos parâmetros de processo que podem ser alterados e otimizados, a impressão 3D DIW se mostra uma técnica muito versátil e ajustável, sendo especialmente atrativa para produção de materiais com geometrias complexas (MANOJ PRABHAKAR et al., 2021; SAADI et al., 2022; TAGLIAFERRI; PANAGIOTOPOULOS; MATTEVI, 2021a).

Até o momento, não foram encontrados trabalhos na literatura que exploram a produção e caracterização reológica de tintas à base do derivado QCat e *whiskers* de beta-quitina para impressão 3D DIW. Desta forma, membranas assimétricas produzidas *via* impressão 3D DIW

à base de cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat), *whiskers* de beta-quitina e reticuladas com genipina são materiais promissores e ainda não explorados para aplicações biomédicas, especialmente no tratamento de lesões de pele, sendo este o principal objeto de estudo deste trabalho. O esquema geral apresentado na Figura 9 ilustra os pontos chave do presente estudo.

Figura 9 - Ilustração esquemática geral do presente trabalho.



Fonte: Autoria própria.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é produzir, através da técnica de impressão 3D DIW, membranas assimétricas com potenciais aplicações biomédicas utilizando cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat) e *whiskers* de beta-quitina.

3.2 Objetivos específicos

- A partir da mesma beta-quitina de partida, produzir *whiskers* empregando acidólise, e quitosana através do processo de desacetilação assistida por irradiação de alta intensidade (DAIUS);
- Sintetizar cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat) a partir da quitosana DAIUS;
- Preparar a tinta para impressão 3D DIW empregando QCat, *whiskers* de beta-quitina e genipina como agente reticulante e realizar sua caracterização reológica;
- Fabricar membranas assimétricas empregando impressão 3D DIW;
- Realizar caracterizações estruturais, morfológicas, físico-químicas e biológicas das matérias-primas (beta-quitina, *whiskers* de beta-quitina, quitosana DAIUS e derivado QCat) e das membranas assimétricas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Beta-quitina foi adquirida comercialmente (Glentham Lifesciences, Inglaterra) e triturada em moinho de facas (MA-048, Marconi) de forma intermitente, de maneira a minimizar a degradação térmica do polissacarídeo. O triturado foi peneirado, de forma a obter material com diferentes granulometrias, sendo separadas as seguintes frações com diâmetros médios (φ): $125 \mu\text{m} < \varphi < 250 \mu\text{m}$; $250 \mu\text{m} < \varphi < 425 \mu\text{m}$; $\varphi > 425 \mu\text{m}$.

Os demais reagentes de grau analítico – acetona, ácido acético, ácido clorídrico, cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA), hidróxido de sódio e genipina – foram adquiridos comercialmente e utilizados sem purificação prévia.

4.2 Produção de *whiskers* de beta-quitina

Cerca de 5,0 g de beta-quitina ($\varphi > 425 \mu\text{m}$) foram suspensos em 150 mL de solução aquosa de HCl 3 mol L⁻¹ em um balão de fundo redondo e submetidos a refluxo por 3 horas. Após este período, a reação foi interrompida pela imersão do balão em banho de gelo. A suspensão foi repetidamente centrifugada e lavada com água destilada para remoção do excesso de ácido, seguido de diálise em água destilada por 72 horas. Após esse período, a suspensão de *whiskers* resultante foi homogeneizada com misturador de alta velocidade (UltraTurrax IKA, modelo T25) a 19.000 rpm por 3 minutos, e então submetida à irradiação de ultrassom de alta intensidade utilizando o dispositivo ultrassônico Hielscher UP400S, com intensidade de 50% e pulsos de 0,5 segundo durante 3 minutos.

A concentração da suspensão de *whiskers* de beta-quitina foi determinada através da pesagem em triplicata de $\approx 1,0$ g da suspensão. As alíquotas foram congeladas a -20 °C, liofilizadas e pesadas novamente, e a concentração calculada foi de $33,0 \pm 0,2$ mg g⁻¹.

4.3 Produção de quitosana *via* processo DAIUS multi-etapas

Quitosana foi produzida *via* processo DAIUS multi-etapas, conforme descrito na literatura (FIAMINGO et al., 2016). Cerca de 5,0 g de beta-quitina ($125 \mu\text{m} < \varphi < 250 \mu\text{m}$) foram suspensos em 50 mL de solução aquosa de NaOH 40% (m/m). A suspensão foi submetida à irradiação de ultrassom de alta intensidade utilizando o dispositivo ultrassônico Hielscher UP400S, com intensidade de 50% e pulsos de 0,5 segundo durante 50 minutos a 60 °C, sob agitação magnética. Após este período, a suspensão foi transferida para outro recipiente, ao qual foi adicionado gelo para que a reação fosse interrompida. HCl concentrado (37% m/m) foi adicionado para neutralização do excesso de NaOH e o pH foi aferido com auxílio de um

pHmetro. Após a neutralização, a quitosana foi lavada exaustivamente com água destilada, até que apresentasse teste negativo para precipitação do íon cloreto com solução aquosa de AgNO_3 , sendo em seguida congelada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ e liofilizada.

A quitosana obtida na etapa anterior, denominada QD1, foi submetida a novo processamento DAIUS empregando as mesmas condições reacionais já descritas para desacetilar beta-quitina, resultando na amostra de quitosana DAIUS empregada neste trabalho, a qual foi denominada quitosana QD2.

4.4 Síntese do cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat)

A síntese do cloreto de *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat) foi realizada de acordo com a literatura (SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016b). Cerca de 2,5 g da quitosana QD2 foram solubilizados em 250 mL de solução aquosa de ácido acético 0,5% (v/v) em balão de fundo redondo. A solução foi então submetida a refluxo com controle de temperatura a $80\text{ }^\circ\text{C}$ e agitação magnética durante 8 horas. Durante este período, 11,93 mL de cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA) foram adicionados em 4 frações iguais de 2,983 mL nos períodos de tempo $t = 0, 2, 4$ e 6 horas. O volume de CGTMA adicionado (11,93 mL) corresponde à razão molar 4:1 de CGTMA:QD2. Após o período de 8 horas, a reação foi interrompida por imersão do balão reacional em banho de gelo, seguido da adição de cerca de 200 mL de propanona gelada, que causou a precipitação de um sólido branco gelatinoso, referente ao QCat. Para separação de QCat, foi realizada filtração empregando propanona em abundância para lavagem.

A purificação do QCat foi realizada em extrator soxhlet durante 6 horas com propanona como solvente. A secagem do sólido foi feita em estufa a $30\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

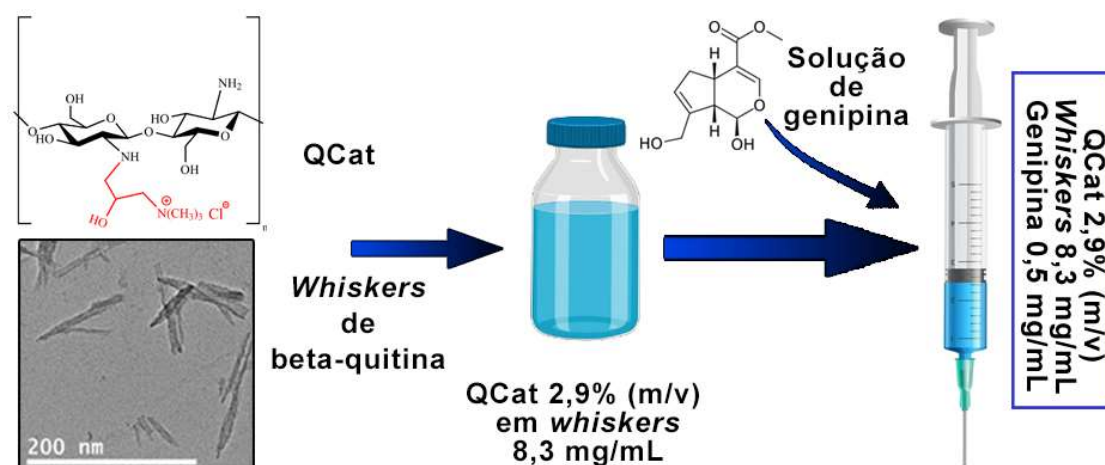
4.5 Preparo da tinta e fabricação das membranas assimétricas *via* impressão 3D

Foram realizados testes empíricos com diversas concentrações de QCat (1–5% m/v) em suspensão de *whiskers* de beta-quitina com concentração fixa ($8,3\text{ mg mL}^{-1}$), de forma a obter uma formulação (tinta) com parâmetros reológicos ideais para impressão 3D DIW. Também foram realizados testes com diferentes concentrações de genipina ($0,01$ – $1,0\text{ mg mL}^{-1}$) com intuito de obter membranas que não fossem solúveis em água. Considerando esses testes, a formulação final da tinta foi: QCat 2,9% (m/v) em suspensão aquosa de *whiskers* $8,3\text{ mg mL}^{-1}$, com genipina a $0,5\text{ mg mL}^{-1}$.

O preparo da tinta foi iniciado ao se adicionar lentamente QCat a uma suspensão de *whiskers* de beta-quitina (10 mg mL^{-1}) sob agitação magnética. Após aproximadamente 2 horas,

a agitação foi interrompida devido à alta viscosidade do fluido, que então foi deixado em repouso por aproximadamente 48 horas. Após esse período, solução aquosa de genipina a 3 mg mL^{-1} foi adicionada ao frasco de forma a obter uma concentração final de genipina de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, resultando em diluição da suspensão de *whiskers* para $8,3 \text{ mg mL}^{-1}$. A tinta resultante foi agitada mecanicamente com uma espátula por aproximadamente 5 minutos e transferida para uma seringa de polipropileno de 10 mL. A seringa contendo a tinta foi submetida a vácuo por 90 segundos, com intuito de remover o excesso de bolhas de ar. O esquema da Figura 10 ilustra o procedimento para preparação da tinta.

Figura 10 - Ilustração esquemática do preparo da tinta para impressão 3D.



Fonte: Autoria própria.

A seringa foi equipada com uma agulha 23G (diâmetro externo = 0,6 mm) com ponta previamente lixada, acoplada à bioimpressora 3D modelo Genesis II (3DBS) e o processo de impressão foi iniciado. Tipicamente, as membranas assimétricas foram impressas em formato retangular, com dimensões de $2,6 \text{ cm} \times 1,4 \text{ cm}$, sobre lâminas de microscópio ($2,6 \text{ cm} \times 7,6 \text{ cm}$) previamente esterilizadas em álcool 70%. O tempo de impressão de uma membrana com as dimensões citadas anteriormente foi de 15 minutos.

Foram realizados estudos empíricos no software fatiador (Simplify3D, versão 4.1.2) variando os principais parâmetros de impressão para a mesma formulação, com objetivo de produzir materiais com resolução adequada. A Tabela 1 contém os principais parâmetros de impressão empregados para a camada externa (CE) e a camada interna (CI).

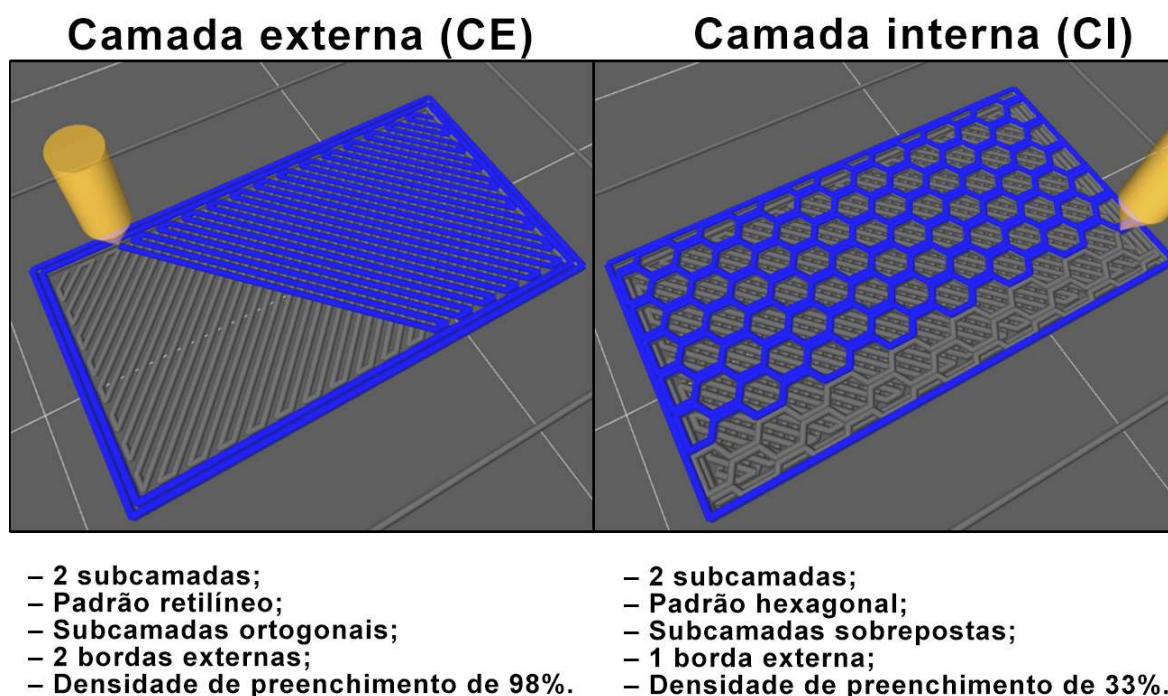
Tabela 1 - Parâmetros da impressão 3D empregados para a camada interna (CI) e camada externa (CE) das membranas assimétricas.

Parâmetro	Camada externa (CE)	Camada interna (CI)
Largura do filamento teórico (mm)	0,40	0,25
Multiplicador de extrusão (u.a.)	0,05	0,10
Padrão de preenchimento	Retilíneo	Hexagonal (<i>full honeycomb</i>)
Número de subcamadas	2 (ortogonais)	2 (sobrepostas)
Densidade de preenchimento (%)	98	33
Velocidade (mm s ⁻¹)	2,50	3,33
Bordas externas	2	1

Fonte: Autoria própria.

A Figura 11 ilustra a geometria das membranas assimétricas com suas subcamadas e padrões de preenchimento. A camada interna foi extrudada logo acima da camada externa, de forma a produzir um único material.

Figura 11 - Ilustração da geometria das membranas assimétricas (largura do filamento desconsiderada).



Fonte: Autoria própria.

Após a impressão, as lâminas de microscópio contendo as membranas depositadas em suas superfícies foram colocadas em dessecador saturado de vapor d'água, onde foram mantidas por no mínimo 5 dias, de modo a evitar desidratação durante a reação de reticulação.

4.6 Caracterizações das matérias-primas (beta-quitina, *whiskers*, quitosana QD2 e derivado QCat)

4.6.1 Espectroscopia no infravermelho

As análises de espectroscopia no infravermelho da beta-quitina, dos *whiskers*, da quitosana QD2 e do derivado QCat foram realizadas na CAQI (Central de Análises Químicas Instrumentais), utilizando o equipamento BOMEM modelo MB-102 com transformada de Fourier, no intervalo 4000–650 cm^{-1} com acúmulo de 32 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} .

4.6.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Espectroscopias de ressonância magnética nuclear de ^1H (^1H RMN) e de ^{13}C (^{13}C RMN) foram empregadas para caracterização estrutural da beta-quitina, dos *whiskers*, da quitosana QD2 e do derivado QCat. Além disso, os espectros foram utilizados para o cálculo do grau médio de acetilação (\overline{GA}) da beta-quitina, dos *whiskers* e da QD2 de acordo com a literatura (HIRAI; ODANI; NAKAJIMA, 1991a).

Para beta-quitina e *whiskers*, foram obtidos espectros de RMN de ^{13}C no estado sólido empregando espectrômetro Bruker Advance 400, com sonda de dupla ressonância de rotação em ângulo mágico de 4 mm operando a 100,5 MHz.

Para a quitosana QD2 e o derivado QCat, foram obtidos espectros RMN de ^1H . Para tanto, cerca de 10 mg da quitosana QD2 foi solubilizada em 1 mL de solução de HCl 1% (v/v) em D_2O , enquanto o derivado QCat (≈ 10 mg) foi solubilizado empregado 1 mL de D_2O . Os espectros de ^1H RMN foram obtidos a 80 °C em espectrômetro Premium Shielded 400/54 (Agilent Technologies) operando a 400 MHz, com janela espectral de 6,4 kHz, tempo médio de relaxação de 30 s e tempo médio de aquisição de 5 s.

4.6.3 Viscosimetria capilar em regime diluído

As viscosidades intrínsecas ($[\eta]$) da beta-quitina de partida, da quitosana QD2, dos *whiskers* e do derivado QCat foram determinadas em triplicata a partir da extrapolação à diluição infinita das respectivas curvas η_{sp}/C_p versus C_p . As amostras de beta-quitina e *whiskers* foram solubilizadas em *N,N*-dimetilacetamida (DMAc) contendo LiCl (5% m/v), enquanto a quitosana QD2 e o derivado QCat foram solubilizados em tampão ácido acético 0,2 mol L^{-1} /acetato de sódio 0,3 mol L^{-1} (pH = 4,5).

As medidas de tempo de escoamento foram realizadas em regime diluído, de forma que as concentrações das soluções dos polímeros foram suficientemente baixas para resultar em viscosidade relativa (η_{rel}) no intervalo $1,2 < \eta_{rel} < 1,8$. Tipicamente, alíquota de 15 mL da

solução do polímero foi adicionada em capilar de vidro com diâmetro de 0,84 mm, o qual foi acoplado a estativa dotada de sensores fotoelétricos e o conjunto imerso em banho termostático a $25 \pm 0,01^\circ\text{C}$. A conexão do conjunto capilar de vidro/estativa a viscosímetro AVS360 e bureta programável AV20, ambos da Schott-Gerate, permitiu a diluição isoiônica da solução do polímero com o tampão ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de sódio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 4,5) no intervalo $1,2 < \eta_{\text{rel}} < 1,8$.

Através da Equação 1 (Equação de Huggins (HUGGINS, 1942)), foi possível determinar a viscosidade intrínseca, $[\eta]$, através da extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida em função da concentração:

$$\frac{\eta_{SP}}{C_p} = [\eta] + K_H[\eta]^2 C_p \quad (1)$$

, sendo:

$\frac{\eta_{SP}}{C}$ = viscosidade reduzida (mL g^{-1});

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca (mL g^{-1});

K_H = constante de Huggins (adimensional);

C_p = concentração da solução (g mL^{-1}).

A partir dos dados de $[\eta]$, foi possível calcular a massa molar viscosimétrica média, \overline{M}_v , através da Equação 2, denominada Equação de Mark–Houwink–Sakurada (KASAAI, 2007)

$$[\eta] = K'(\overline{M}_v)^\alpha \quad (2)$$

, onde K' e α são constantes específicas que dependem do polímero, temperatura e solvente utilizados. Para beta-quitina e os *whiskers*, nas condições nas quais foram realizadas as medidas de viscosidade, $K' = 0,25 \text{ mL g}^{-1}$ e $\alpha = 0,69$ (TERBOJEVICH et al., 1988). Para a quitosana QD2, $K' = 0,074 \text{ mL g}^{-1}$ e $\alpha = 0,76$ (RINAUDO; MILAS; DUNG, 1993). Para o derivado QCat, $K' = 0,25 \text{ mL g}^{-1}$ e $\alpha = 0,69$ (YEVLAMPIEVA et al., 2015).

O grau médio de polimerização viscosimétrico, \overline{GP}_v , foi calculado considerando a massa molar viscosimétrica média, os graus médios de acetilação e desacetilação, \overline{GA} e \overline{GD} , assim como as massas das unidades GlcNAc (203 g mol^{-1}) e GlcN (161 g mol^{-1}). Para a beta-quitina, *whiskers* e quitosana QD2, utilizou-se a Equação 3 (RINAUDO; MILAS; DUNG, 1993).

$$\overline{GP}_v = \frac{\overline{M}_v}{(203 \times \overline{GA}) + (161 \times \overline{GD})} \times 100 \quad (3)$$

Já para QCat, foi empregada a Equação 4 (RUIHUA et al., 2012), que leva em conta o grau médio de substituição, \overline{GS} , e a massa molar da unidade cationizada (311 g mol⁻¹).

$$\overline{GP}_v(QCat) = \frac{\overline{M}_v}{(203 \times \overline{GA}) + \overline{GD}[(161\overline{GD} \times (1 - \overline{GS})) + (311 \overline{GS})]} \times 100 \quad (4)$$

4.6.4 Titulação condutimétrica

A titulação condutimétrica foi utilizada para determinar o grau médio de substituição (\overline{GS}) do derivado QCat através da precipitação dos íons cloreto (Cl⁻) com solução padrão de AgNO_{3(aq)} (CHO et al., 2006). Para isso, 6 amostras do derivado QCat (≈ 100 mg) foram solubilizadas em 100 mL de água desionizada. A condutividade das soluções foi medida utilizando o condutivímetro Handylab LF1, em função do volume de solução AgNO_{3(aq)} 0,018 mol L⁻¹ adicionado empregando titulador automático Titronic Universal. O grau médio de substituição, \overline{GS} , foi calculado através da Equação 5

$$\overline{GS}(\%) = \left(\frac{1,8 \times 10^{-5} V_{eq}}{\left(\frac{m - (1,8 \times 10^{-5} V_{eq} \times M_{CGTMA})}{(M_{GlcN} \times \overline{GD} + M_{GlcNAc} \times \overline{GA})} \right) \times \overline{GD}} \right) \times 100\% \quad (5)$$

, onde m é massa (g) da amostra de QCat, V_{eq} é o volume (mL) da solução de AgNO_{3(aq)} no ponto de equivalência, M_{GlcN} é a massa molar da unidade GlcN (161 g mol⁻¹), M_{CGTMA} é a massa molar do CGTMA (151 g mol⁻¹), M_{GlcNAc} é a massa molar da unidade GlcNAc (203 g mol⁻¹) e \overline{GA} e \overline{GD} são, respectivamente, os graus médios de acetilação e desacetilação da QD2 (CHO et al., 2006).

4.6.5 Difractometria de raios X

As análises de difração de raios X da beta-quitina, dos *whiskers*, da quitosana QD2 e do derivado QCat foram realizadas à temperatura ambiente, em difratômetro Bruker, modelo D8 Advance operando a 40 kV e 40 mA, com feixe de radiação Cu K α ($\lambda = 1,5406$ Å). O intervalo de 2θ foi de $5^\circ < 2\theta < 60^\circ$, com velocidade de varredura de 2° por minuto.

4.6.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) da suspensão de *whiskers* de beta-quitina foram obtidas em equipamento *JEM-2100* (*JEOL*) com voltagem de 200 kV. Para tanto, a suspensão de *whiskers* foi diluída a 0,1 mg mL⁻¹ e 10 µL foram depositados em *grids* (400 mesh) de cobre recobertas com filme de carbono e secas a temperatura ambiente em dessecador. As amostras foram coradas com solução 3% (m/v) de acetato de uranila e secas novamente pelo mesmo método.

4.6.7 Microscopia de força atômica (AFM)

As análises de microscopia de força atômica (*atomic force microscopy*, AFM) foram realizadas em equipamento SPM-9600 (*Shimadzu*). A suspensão de *whiskers* foi diluída a 0,01 mg g⁻¹ e 10 µL foram depositados sob superfície de mica e secos a temperatura ambiente. As imagens foram obtidas em temperatura ambiente, com taxa de varredura de 1 Hz, em modo intermitente sem contato, usando um cantilever de silício com raio de curvatura inferior a 10 nm e constante de mola de 48 N m⁻¹.

4.6.8 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das amostras de beta-quitina, dos *whiskers*, da quitosana QD2 e do derivado QCat foi avaliada através de equipamento TGA-50 (*Shimadzu*). As amostras (≈ 7 mg) foram alocadas em porta amostra de platina e aquecidas de 25 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de N₂ com vazão de 50 mL min⁻¹.

4.6.9 Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)

A concentração inibitória mínima (*minimum inhibitory concentration*, MIC) de suspensão aquosa de *whiskers* de beta-quitina e de solução de QCat, ambas com concentração inicial de 5,00 mg mL⁻¹, foi avaliada contra bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Foi empregado o método de microdiluição seriada, baseado na norma M7-A6 (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2005), traduzida pela ANVISA.

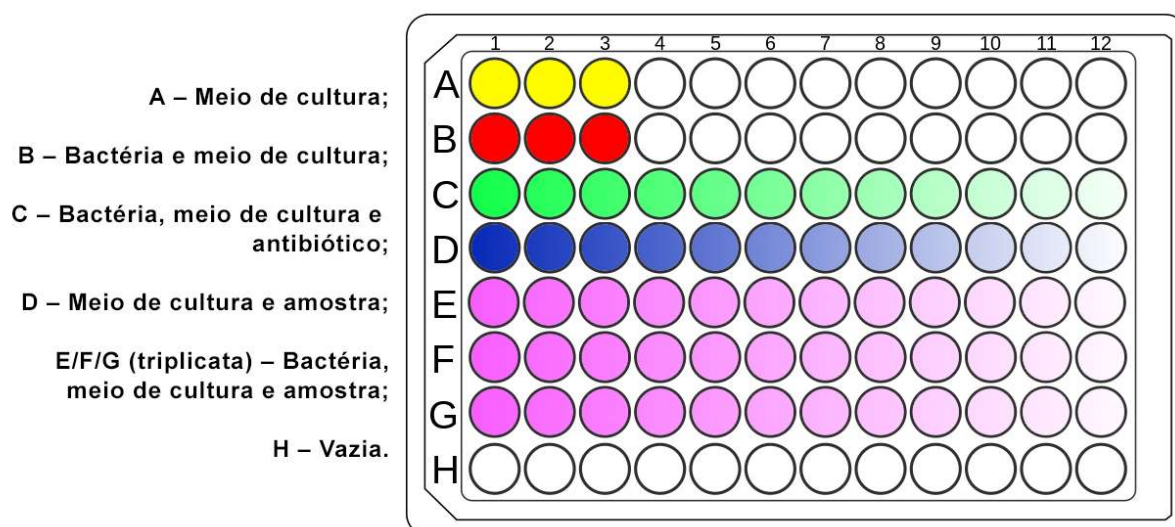
Meio de cultura líquido Mueller-Hinton (M-H) foi preparado em tubos de ensaio previamente esterilizados. Para o preparo dos inóculos, a superfície das colônias foi tocada com alça metálica e os microrganismos foram transferidos para os tubos de ensaio contendo o meio M-H. Os tubos foram colocados em estufa a 37 °C por 24 horas para crescimento das bactérias. Após esse período, o valor de absorvância do inóculo foi comparado com a turbidez de solução

padrão McFarland 0,5. A turbidez do inóculo foi ajustada através de diluição, de modo a obter a concentração de 1×10^6 células mL^{-1} tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*.

As microplacas estéreis utilizadas na análise possuem 96 poços com fundo em forma de “U”. Os poços são identificados através de letras (A, B, C, D, F, G e H) para as linhas e por números (1 a 12) para as colunas, conforme ilustrado na Figura 12. As linhas foram compostas da seguinte maneira:

- A: avaliação da esterilidade do meio, composta apenas pelo meio de cultura;
- B: avaliação da viabilidade das bactérias, composta pelo meio de cultura e o inóculo;
- C: controle positivo da análise, composta pelo meio de cultura, inóculo e antibiótico estreptomicina em concentração conhecida;
- D: avaliação da esterilidade da amostra, composta pelo meio de cultura e a amostra;
- E, F e G: avaliação da MIC da amostra em triplicata, compostas pelo meio de cultura, inóculo e amostra.

Figura 12 - Composição da microplaca de 96 poços para o ensaio de concentração inibitória mínima (MIC).



Fonte: Autoria própria.

A microplaca foi preenchida da seguinte maneira: 100 μL de meio líquido M-H foram colocados nos três primeiros poços das fileiras A e B e em todos os poços das fileiras C, D, E, F e G. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de antibiótico estreptomicina a 20 mg mL^{-1} , no poço C1, o qual foi homogeneizado 5 vezes com auxílio de uma micropipeta, e então 100 μL foram retirados desse poço e colocados no próximo (C2), o qual foi homogeneizado novamente. Este procedimento foi repetido até o final da fileira C, gerando assim uma diluição seriada de 1:2 em cada poço. Em seguida, 100 μL da amostra foram colocados nos poços D1,

E1, F1 e G1 e seguiu-se o procedimento de diluição seriada citado anteriormente. Finalmente, 10 µL do inóculo padronizado da bactéria foram colocados em cada um dos poços das fileiras B, C, E, F e G. As placas foram colocadas em estufa a 37 °C por 18 horas para a avaliação do crescimento e/ou da inibição de bactérias. Após esse período, as placas foram retiradas da estufa e foram acrescentados 40 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5%. A presença de coloração vermelha após cerca de 30 minutos da adição do CTT indicava o crescimento microbiano. A concentração inibitória mínima foi determinada pelo ponto final na concentração em que fosse observado uma redução de 80% ou mais do crescimento, quando comparado com o controle positivo.

O ensaio de concentração bactericida mínima (*minimum bactericidal concentration*, MBC) foi realizado apenas para as amostras que apresentaram MIC. Para tanto, foram retiradas alíquotas de 10 µL de 6 poços distintos, sendo 1 deles o poço que apresentou MIC, 2 poços mais concentrados que a MIC e 3 poços mais diluídos que a MIC. As alíquotas foram transferidas e espalhadas em placas de petri contendo meio de cultivo M-H sólido, sendo distribuídas 3 amostras por placa. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, a MBC foi determinada avaliando o crescimento microbiano a olho nu, sendo a menor concentração da amostra com propriedade bactericida correspondente à MBC.

4.7 Caracterizações reológicas da tinta para impressão 3D DIW

As análises reológicas foram realizadas na CAQI (IQSC-USP), utilizando reômetro rotacional DHR-2 (TA Instruments) com geometria cone-placa de diâmetro de 40 mm, inclinação de 2 graus e separação (*gap*) de 55 µm.

As amostras analisadas foram: tinta sem adição de genipina, com QCat a 2,9% (m/v) em suspensão aquosa de *whiskers* 8,3 mg mL⁻¹, a qual foi denominada “T”; tinta após 2 horas da adição de adição de genipina a 0,5 mg mL⁻¹, com as mesmas concentrações de QCat e *whiskers*, a qual foi denominada “T_Gen_2h”. Todas as análises foram realizadas em triplicata, a 25 °C.

4.7.1 Pseudoplasticidade

O comportamento pseudoplástico das amostras foi avaliado através de varredura da viscosidade (η) em função da variação da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) no intervalo de 0,001 s⁻¹ a 1000 s⁻¹.

4.7.2 Viscoelasticidade

O comportamento viscoelástico das amostras foi avaliado através de varredura do módulo de armazenamento (G') e do módulo de perda (G'') em função da deformação (γ), no intervalo de $\gamma = 0,01\%$ até $\gamma = 1000\%$, com frequência constante de 1,0 Hz. Através dessa análise, foram definidos os valores de deformação da região viscoelástica linear (RVL), referente a $\gamma = 0,15\%$, e da região viscoelástica não linear (RVNL), referente a $\gamma = 600\%$.

4.7.3 Tixotropia

A tixotropia das amostras foi avaliada empregando o ensaio de tixotropia de três intervalos (*three interval thixotropy test*, 3ITT), conforme abordado na literatura (NAN et al., 2020b). Este ensaio consistiu em 3 etapas sequenciais em que a amostra foi submetida a diferentes deformações sob frequência de oscilação constante de 1,0 Hz. Na primeira etapa, deformação de 0,15% (correspondente à RVL) foi aplicada durante 120 segundos. Na segunda etapa, a deformação foi aumentada abruptamente para 600% (correspondente à RVNL) e mantida por 120 segundos. Na última etapa, a deformação foi diminuída abruptamente para 0,15% e mantida por 300 segundos. A avaliação da tixotropia foi realizada através da análise visual da recuperação do módulo de armazenamento (G') da segunda para terceira etapa.

4.8 Caracterizações das membranas assimétricas

4.8.1 Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

As membranas assimétricas foram congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e então liofilizadas. Os grupos funcionais presentes na estrutura química das membranas liofilizadas foram avaliados utilizando equipamento ATR/FTIR Bruker Tensor 27, com acessório de refletância total atenuada horizontal empregando cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os espectros foram obtidos na região de 600 a 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e acúmulo de 32 varreduras.

4.8.2 Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das membranas assimétricas liofilizadas foi avaliada através de equipamento TGA-50 (Shimadzu). A amostra ($\approx 7\text{ mg}$) foi alocada em porta amostra de platina, e aquecida de 25 a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} .

4.8.3 Medidas de ângulo de contato

As medidas de ângulo de contato foram realizadas na CAQI, em um tensiômetro óptico Attension Theta Lite, a 25 °C. A camada externa (CE) de cinco corpos de prova de aproximadamente 1 cm² (1 cm × 1 cm) foram analisadas. Para tanto, uma gota de água deionizada (≈ 2 µL) foi depositada sobre a superfície da amostra com apoio de uma seringa e a imagem da gota sobre a superfície foi capturada por 10 segundos. Os ângulos de contato do lado direito e esquerdo da gota foram calculados através do software OneAttension. Os valores de ângulo de contato foram determinados utilizando-se a média entre os ângulos direito e esquerdo de 5 amostras. O ângulo de contato da camada interna (CI) não pôde ser analisado devido aos poros macroscópicos presentes em sua estrutura.

4.8.4 Capacidade de intumescimento

Cinco amostras das membranas assimétricas com formato de disco (diâmetro = 1,2 cm) foram pesadas, colocadas em frascos contendo 25 mL de tampão PBS (pH = 7,4) e incubadas a 37 °C. A massa das amostras foi aferida novamente após determinados períodos de tempo, sendo: de 15 em 15 minutos durante a primeira hora; de 30 em 30 minutos durante as próximas 5 horas; de 24 horas em 24 horas, durante 3 dias. Em todas as pesagens, as amostras foram secas com papel toalha para remoção do excesso de tampão PBS.

O grau de intumescimento, $I(\%)$, foi então calculado conforme a Equação 6

$$I(\%) = \frac{m_t - m_0}{m_0} \times 100\% \quad (6)$$

, em que m_t é a massa da amostra após determinado período de tempo e m_0 é a massa inicial da amostra.

4.8.5 Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão (teste do halo de inibição)

A atividade antimicrobiana da camada interna (CI) e da camada externa (CE) das membranas assimétricas foi avaliada contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), pelo teste de difusão em ágar, baseado na norma M2-A8 (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003) traduzida pela ANVISA.

Meio de cultura Mueller-Hinton líquido (M-H) foi preparado em tubos de ensaio, e sólido em placas de petri. Para o preparo dos inóculos, a superfície das colônias foi tocada com uma alça e os microrganismos transferidos para os tubos de ensaio contendo o meio líquido. Posteriormente, os tubos foram colocados em estufa a 37 °C por aproximadamente 18 horas para crescimento das bactérias. Após esse período, o valor de absorvância do inóculo foi verificado e comparado com a turbidez do padrão McFarland 0,5, sendo ajustada a concentração por diluição de modo a obter 1×10^6 células mL^{-1} tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*.

Para preparo das placas de petri, 100 μL da cultura inóculo de concentração de 1×10^6 células mL^{-1} foram colocados na superfície do meio e espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski previamente flambada em álcool 70%. As amostras das camadas CI e CE das membranas assimétricas foram cortadas em formato de disco com 1,2 cm de diâmetro, e com auxílio de uma pinça, foram colocadas 3 amostras por placa. Para o controle positivo, foram cortados papéis de filtro com 1,2 cm de diâmetro, os quais foram submersos em solução de antibiótico estreptomicina (2 mg mL^{-1}) e colocados nas placas de petri. Para a avaliação do crescimento das bactérias, foram preparadas placas de petri sem a adição de qualquer material. No total, foram preparadas 10 placas de petri, sendo: 2 placas com controle negativo (uma para *E. coli* e uma para *S. aureus*); 4 placas com controle positivo, contendo papel com estreptomicina; 4 placas com as amostras, sendo 2 para a camada externa (CE) e 2 para a camada interna (CI).

As placas foram transferidas para estufa a 37 °C por 24 horas para crescimento das bactérias. Após esse período, verificou-se a olho nu a presença de halos de inibição e inibição por contato.

4.8.6 Susceptibilidade à degradação enzimática *in vitro*

O ensaio de susceptibilidade à degradação enzimática foi realizado em triplicata, com base em outros trabalhos do grupo (BUKZEM, 2019; GABRIEL, 2021; SANTOS, 2018). Para tanto, corpos de prova das membranas assimétricas com formato semicircular (raio = 0,6 cm) foram pesados e colocados em recipientes de vidro de 10 mL contendo 5,0 mL de tampão PBS (pH = 7,4) com 5500 unidades de lisozima por mL. Os frascos contendo as amostras foram incubados a 37 °C por períodos de tempo de 12 horas, 24 horas, 2 dias, 4 dias e 7 dias. Após esses períodos, as amostras foram secas com papel toalha para remoção do excesso da solução tampão e então foram pesadas. O ensaio controle foi realizado empregando o mesmo procedimento, com imersão dos corpos de prova de mesmas dimensões em 5,0 mL de tampão PBS sem a adição de lisozima. A massa residual ($MR(\%)$) foi calculada levando em conta razão

a massa inicial (m_i) e a massa após determinado período de incubação (m_f) para as amostras imersas em PBS contendo lisozima, menos o intumescimento ($I(\%)$) das amostras imersas em tampão sem adição de lisozima, de acordo com a Equação 7.

$$MR(\%) = \frac{m_f}{m_i} \times 100\% - I(\%) \quad (7)$$

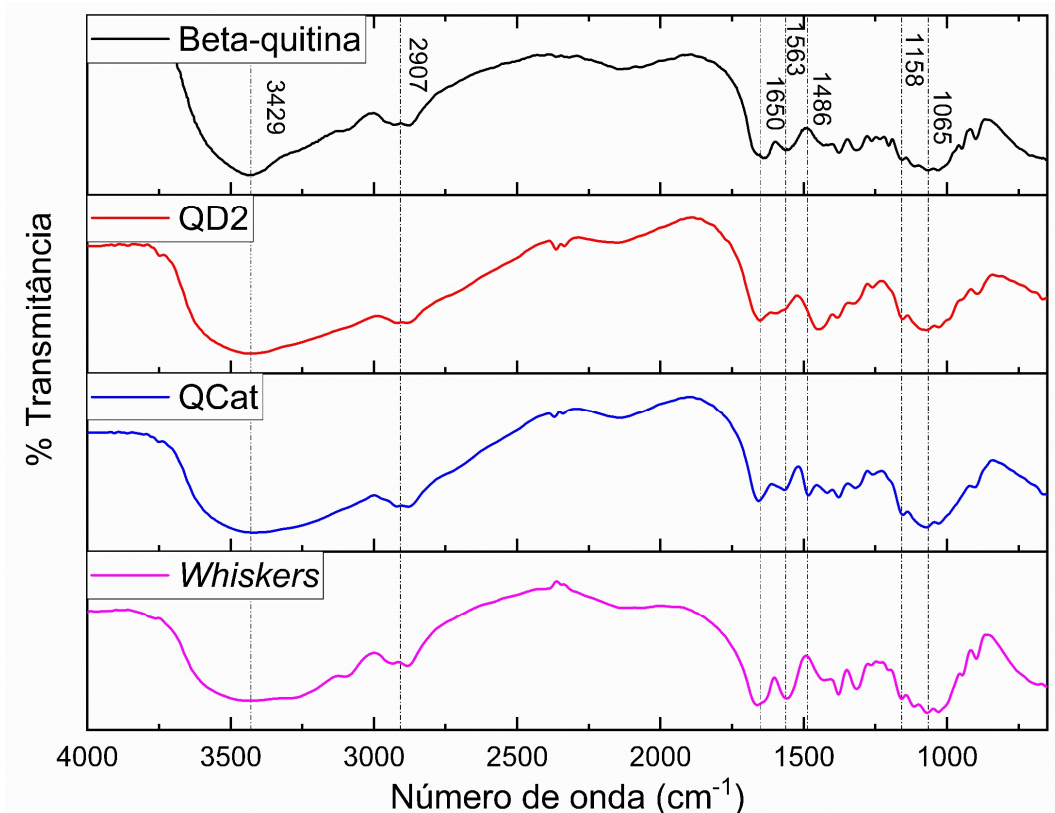
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterizações das matérias-primas (beta-quitina, *whiskers*, quitosana QD2 e derivado QCat)

5.1.1 Espectroscopia no infravermelho

A Figura 13 exibe os espectros no infravermelho da beta-quitina, da quitosana QD2, do derivado QCat e dos *whiskers* de beta-quitina.

Figura 13 - Espectros no infravermelho da beta-quitina, quitosana QD2, derivado QCat e *whiskers*.



Fonte: Autoria própria.

A banda intensa e larga centrada em aproximadamente 3429 cm^{-1} , que ocorre em todos os espectros da Figura 13, é atribuída aos estiramentos das ligações O–H e N–H presentes em todas as estruturas dos compostos analisados. Outra banda comum em todos os espectros, referente ao estiramento das ligações C–H de metila ($\text{H}_3\text{C}-$), metileno ($-\text{CH}_2-$) e metino ($-\text{CH}-$), é observada em aproximadamente 2907 cm^{-1} . As bandas nas regiões de 1065 e 1158 cm^{-1} são referentes à deformação angular das ligações C–O e O–H, respectivamente, e também são encontradas em todos os espectros. Em 1650 e 1563 cm^{-1} ocorrem bandas referentes, respectivamente, à deformação axial da ligação C=O (banda de amida I) e da ligação N–H

(banda de amida II) (LAVALL; ASSIS; CAMPANAFILHO, 2007; PEARSON; MARCHESSAULT; LIANG, 1960).

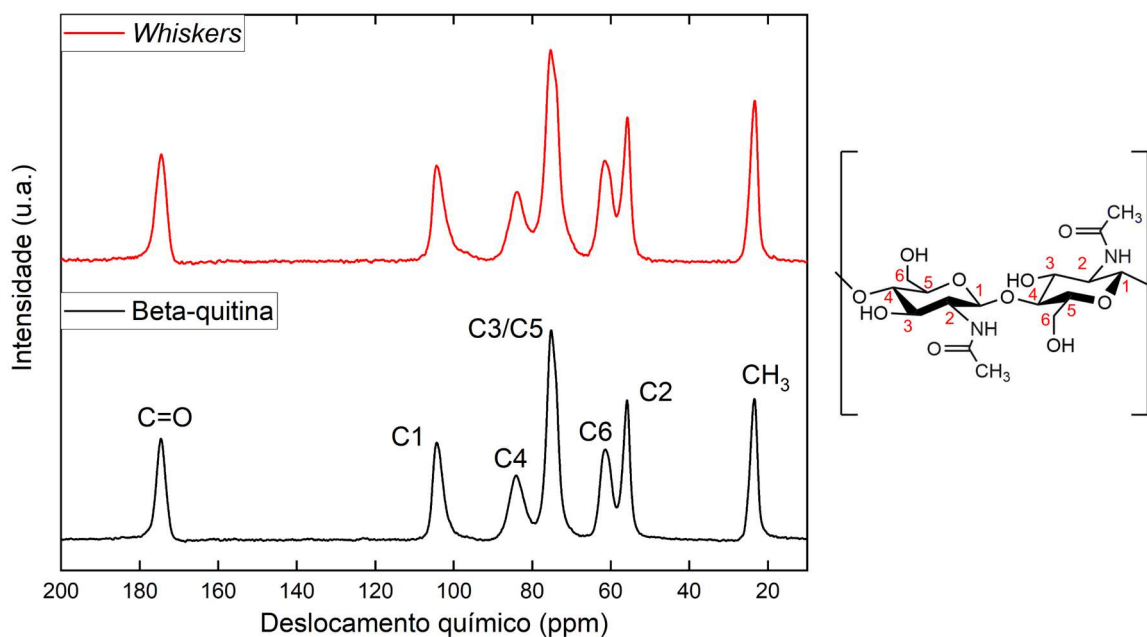
É observada menor intensidade relativa para a banda de amida I nos espectros de QD2 e QCat frente aos espectros da beta-quitina e dos *whiskers*, devido ao processo de *N*-desacetilação, que resulta na hidrólise de grupos acetamido (CHO et al., 2006). O espectro da beta-quitina apresenta perfil semelhante ao dos *whiskers*, evidenciando que a acidólise não modificou os grupos funcionais na estrutura do polissacarídeo, conforme era esperado (ZENG et al., 2011).

A banda observada em 1486 cm^{-1} ocorre apenas no espectro do derivado QCat e é referente às deformações C–H dos grupos metílicos ligados ao nitrogênio carregado positivamente do grupo $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (CHO et al., 2006). A presença desta banda evidencia que a síntese do QCat a partir da QD2 ocorreu com sucesso. Adicionalmente, a prevalência das bandas em 1065 e 1158 cm^{-1} evidenciam que a *N*-substituição ocorreu preferencialmente à *O*-substituição (HUANG et al., 2014).

5.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C

A Figura 14 exibe os espectros de ^{13}C RMN dos *whiskers* e da beta-quitina.

Figura 14 - Espectros de RMN de ^{13}C dos *whiskers* e da beta-quitina.



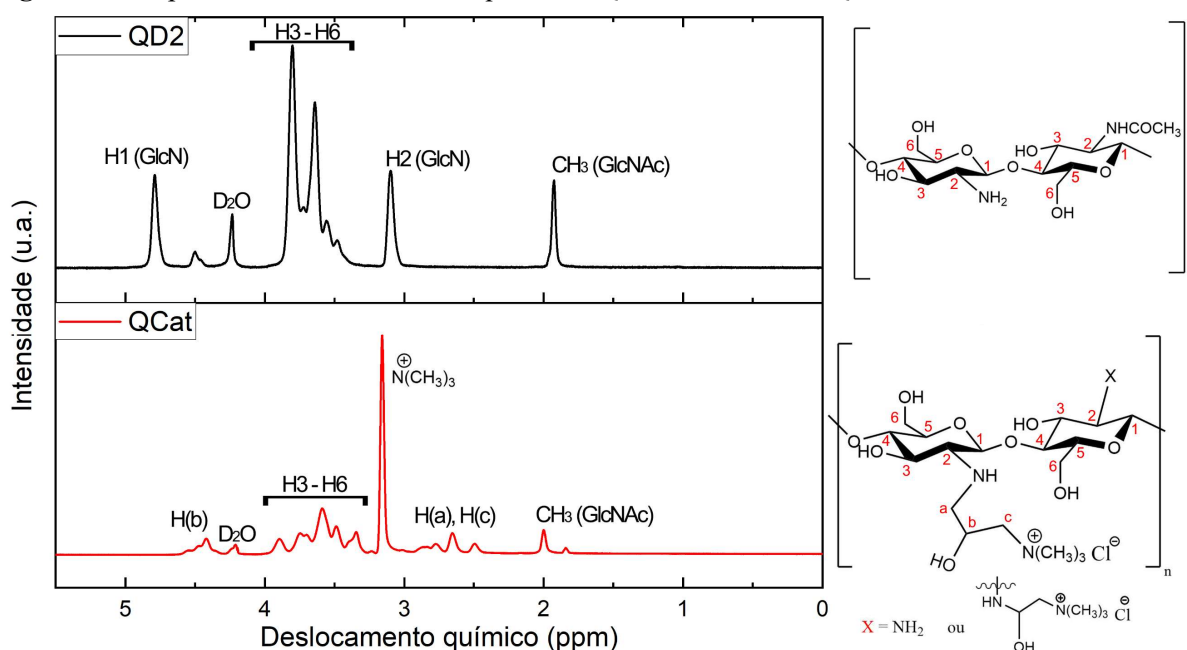
Fonte: Autoria própria.

O sinal referente ao carbono carbonílico (C=O) está disposto em região de mais baixo campo ($\approx 176\text{ ppm}$) por ser o carbono menos blindado. No intervalo entre 60 e 90 ppm,

encontram-se os sinais dos carbonos C3, C4, C5 e C6, todos ligados a um oxigênio. Ainda nesta região, há sobreposição dos sinais referentes aos carbonos C3 e C5, mostrando que ambos possuem ambientes químicos semelhantes. Já o carbono metílico presente no grupo acetamido das unidades GlcNAc é mais blindado, sendo observado em região de mais alto campo (≈ 23 ppm) (HEUX et al., 2000). Os espectros da beta-quitina e *whiskers* são praticamente idênticos, evidenciando que os grupos funcionais do polissacarídeo não foram alterados durante a reação de acidólise.

A Figura 15 exibe os espectros de ^1H RMN da quitosana QD2 e do derivado QCat.

Figura 15 - Espectros de RMN de ^1H da quitosana QD2 e do derivado QCat.



Fonte: Autoria própria.

Em ambos os espectros, é possível observar singlete característico em 2,0 ppm, referente aos hidrogênios metílicos das unidades GlcNAc. O conjunto de sinais em ambos os espectros entre 3,3 e 4,0 ppm é referente aos hidrogênios ligados aos carbonos C3 a C6 das unidades GlcNAc e GlcN. O pico intenso no espectro do QCat em 3,2 ppm é referente aos hidrogênios metílicos do grupo $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ e é característico para a identificação deste derivado cationizado de quitosana, o que evidencia que a síntese do QCat a partir da QD2 foi bem-sucedida (SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016a; XIAO et al., 2012a)

A partir dos espectros de RMN, foi possível calcular o grau médio de acetilação (\overline{GA}) e o grau médio de desacetilação (\overline{GD}) da beta-quitina, *whiskers* e QD2. A Equação 8 foi

utilizada em conjunto com os espectros de ^{13}C RMN para o cálculo de \overline{GA} da beta-quitina e *whiskers*

$$\overline{GA}(\%) = \left[1 - \left(\frac{A_{Metil}}{A_{C1-C6}} \right) \right] \times 100\% \quad (8)$$

, onde A_{Metil} é a área referente ao sinal do carbono metílico (≈ 24 ppm) e A_{C1-C6} é a soma das áreas referente aos carbonos do anel glicosídico (HEUX et al., 2000).

A Equação 9 foi utilizada em conjunto aos espectros de ^1H RMN da quitosana QD2 para o cálculo do grau médio de desacetilação

$$\overline{GD}(\%) = \left[1 - \left(\frac{A_{CH3}/3}{A_{H2-H6}/6} \right) \right] \times 100\% \quad (9)$$

, onde A_{CH3} é referente ao sinal dos hidrogênios metílicos da unidade GlcNAc (2,0 ppm) e A_{H2-H6} é referente aos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos C2 a C6 do anel glicosídico (HIRAI; ODANI; NAKAJIMA, 1991b).

A Tabela 2 sumariza os valores calculados de \overline{GA} e \overline{GD} para beta-quitina, *whiskers* e QD2.

Tabela 2 - Valores de grau médio de acetilação, \overline{GA} , e grau médio de desacetilação, \overline{GD} , calculados para beta-quitina, *whiskers* e QD2.

	$\overline{GA}(\%)$	$\overline{GD}(\%)$
Beta-quitina	96,4 \pm 1,0	3,6 \pm 1,0
<i>Whiskers</i>	96,0 \pm 0,9	4,0 \pm 0,9
QD2	21,5 \pm 1,4	78,5 \pm 1,4

Valores exibidos como média \pm desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

É possível observar que os valores de \overline{GA} para beta-quitina e *whiskers* não apresentam diferença significativa, o que evidencia que as condições reacionais empregadas na acidólise não favoreceram a *N*-desacetilação do polissacarídeo. Já a quitosana QD2 apresenta \overline{GA} muito menor que o da beta-quitina, evidenciando que as condições empregadas nos dois procedimentos DAIUS consecutivos promoveram a extensiva hidrólise dos grupamentos

acetamido das unidades GlcNAc. Por fim, é esperado que o derivado QCat apresente \overline{GA} muito próximo à quitosana QD2, pois o meio levemente ácido empregado durante a síntese (ácido acético 0,5% v/v) não favorece a hidrólise dos grupamentos acetamido das unidades GlcNAc (SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016a).

5.1.3 Viscosimetria capilar em regime diluído

A Tabela 3 sumariza os valores de viscosidade intrínseca, $[\eta]$, massa molar viscosimétrica média, \overline{M}_v , e grau médio de polimerização viscosimétrico, \overline{GP}_v , obtidos para beta-quitina, *whiskers*, QD2 e QCat.

Tabela 3 - Viscosidade intrínseca, $[\eta]$, massa molecular viscosimétrica média, \overline{M}_v , e grau médio de polimerização viscosimétrico, \overline{GP}_v , para beta-quitina, *whiskers*, QD2 e QCat.

	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)	\overline{M}_v (kg mol ⁻¹)	\overline{GP}_v (adimensional)
Beta-quitina	1795 ± 20	413 ± 56	2048 ± 339
<i>Whiskers</i>	127 ± 19	8,9 ± 1,8	44 ± 9
QD2	521 ± 13	115,5 ± 3,7	679 ± 22
QCat	472 ± 12	74,2 ± 2,0	364 ± 10

Valores exibidos como média ± desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

É possível observar que o grau médio de polimerização viscosimétrico (\overline{GP}_v) da beta-quitina é cerca de 47 vezes maior que o dos *whiskers*. Isto ocorreu pois a acidólise nas condições reacionais adotadas (HCl 3 mol L⁻¹, refluxo por 3 horas) favoreceu a hidrólise das ligações glicosídicas predominantemente dos domínios amorfos do polissacarídeo, acarretando em acentuada despolimerização. Desta forma, é possível concluir que a hidrólise ácida diminuiu drasticamente a massa molar do polímero, produzindo *whiskers* de beta-quitina de escala nanométrica e com alta área superficial. Ao analisar os resultados de espectroscopia no infravermelho e de RMN de ¹³C da beta-quitina e dos *whiskers*, que mostram que não ocorreram modificações nos grupos funcionais durante a acidólise, juntamente ao resultado de menores valores de \overline{M}_v e \overline{GP}_v dos *whiskers* frente à beta-quitina, é possível evidenciar que os *whiskers* foram obtidos com sucesso através da acidólise.

Comparando os valores de \overline{GP}_v da beta-quitina de partida com a quitosana QD2, é evidenciado que as condições reacionais utilizadas para *N*-desacetilação resultam em despolimerização. Ainda assim, de acordo com a literatura (CAMPANA-FILHO; DELEZUK;

CARDOSO, 2010; FIAMINGO et al., 2016), o processo DAIUS minimiza este efeito quando comparado a outros processos termoquímicos de *N*-desacetilação da quitina.

O derivado QCat apresenta menor \overline{GP}_v frente à quitosana QD2, evidenciando que as condições reacionais utilizadas para síntese de QCat levam à despolimerização. Isto pode ser atribuído à temperatura elevada (80 °C) e longo tempo de reação (8 h) empregados para síntese de QCat no presente trabalho (SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016a).

5.1.4 Titulação condutimétrica

A Tabela 4 exibe os valores de massa das amostras, volume de equivalência (V_{eq}) e o grau médio de substituição (\overline{GS}) calculado para o derivado QCat.

Tabela 4 - Valores de massa das amostras de QCat, volume de equivalência (V_{eq}) e grau médio de substituição (\overline{GS}).

Massa QCat (g)	V_{eq} (mL)	\overline{GS} (%)
0,1000	7,80	31,3
0,1054	7,70	29,2
0,1003	7,48	29,9
0,1046	7,98	30,5
0,1010	7,43	29,5
0,1017	7,35	29,0
		29,9 ± 0,9*

*Média ± Desvio padrão

Fonte: Autoria própria.

O valor de \overline{GS} foi, portanto, de $29,9 \pm 0,9\%$, o qual é considerado intermediário e o esperado de acordo com a razão molar CGTMA:QD2 (4:1) utilizada na reação de cationização de quitosana neste trabalho (SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016b). Para avaliação da hidrossolubilidade, foram realizados testes empíricos empregando QCat a 10 mg mL^{-1} , em soluções de HCl (pH \approx 1), NaOH (pH \approx 13), e água deionizada (pH \approx 7), e em todas QCat se mostrou completamente solúvel a olho nu. De fato, é relatado que a elevada densidade de cargas positivas ao longo das cadeias do derivado QCat confere plena solubilidade em meio aquoso em ampla faixa de pH (RUIHUA et al., 2012).

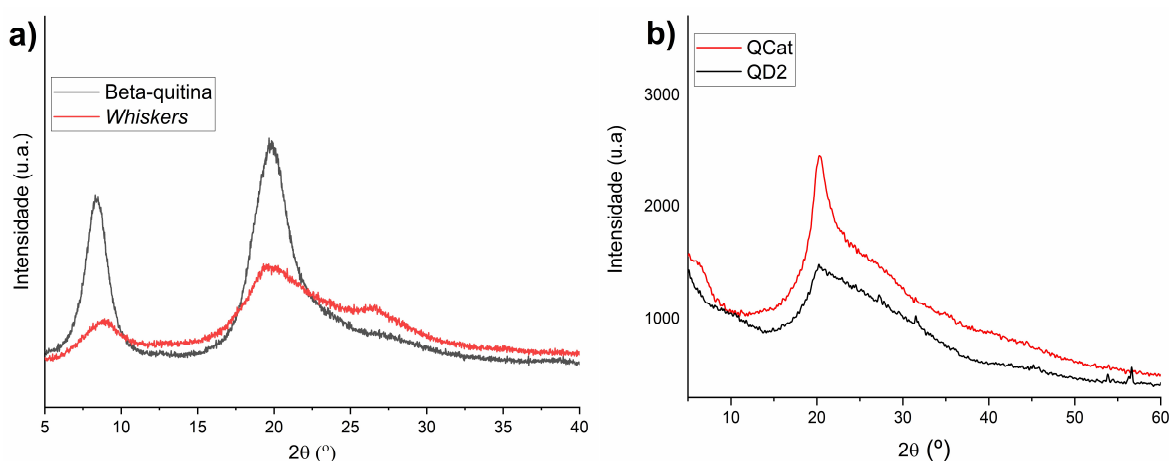
\overline{GS} é um parâmetro muito importante, pois além da hidrossolubilidade, impacta diretamente nas propriedades físico-químicas e atividades biológicas de QCat. De acordo com

a literatura (XIAO et al., 2012a), a partir de $\overline{GS} \approx 10\%$, QCat exibe solubilidade em meio aquoso em ampla faixa de pH, e à medida que \overline{GS} aumenta, há potencialização da atividade antimicrobiana, entretanto, também há aumento da citotoxicidade a diferentes tipos de células (SONG et al., 2018; WONGWANAKUL et al., 2017).

5.1.5 Difratomia de raios X

A Figura 16 exibe os difratogramas da beta-quitina e *whiskers*.

Figura 16 - Difratomogramas referentes a (a) beta-quitina e *whiskers* e (b) quitosana QD2 e derivado QCat.



Fonte: Autoria própria.

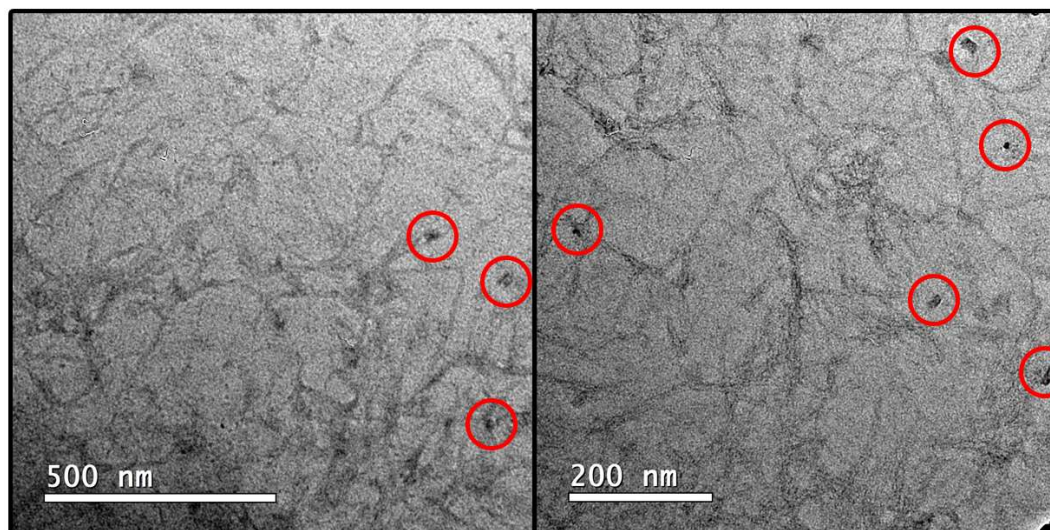
Analisando os difratogramas da Figura 16a, é possível observar que a beta-quitina e os *whiskers* possuem picos característicos em $2\theta = 8,4^\circ$, que corresponde ao plano (010), e em $2\theta = 19,7^\circ$ que corresponde aos planos (100), (1-10) e (110) (FAN; SAITO; ISOGAI, 2008b). Portanto, a estrutura dos domínios cristalinos da beta-quitina foi pouco alterada durante a reação de hidrólise para obtenção dos *whiskers*. Para os difratogramas da Figura 16b, é possível observar um pico comum em $2\theta = 20,3^\circ$, que é típico de quitosana e seus derivados, o que indica que a estrutura cristalina da quitosana QD2 foi pouco alterada durante a síntese do derivado QCat (XIAO et al., 2012b).

5.1.6 Morfologia dos *whiskers* de beta-quitina

A morfologia dos *whiskers* de beta-quitina fica evidente nas imagens de MET exibidas na Figura 17, na qual é possível observar cristais individuais com formato de bastonetes. Esses cristais possuem alta área superficial e apresentam comprimento muito maior que o diâmetro, resultando em alta razão de aspecto média (razão comprimento médio/diâmetro médio). Este resultado está de acordo outros trabalhos (FACCHINATTO et al., 2021; ZENG et al., 2011;

ZHANG et al., 2016) que mostram que com o tratamento adequado da quitina, é possível obter *whiskers* que apresentem alta razão de aspecto.

Figura 17 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) obtidas para os *whiskers* de beta-quitina.



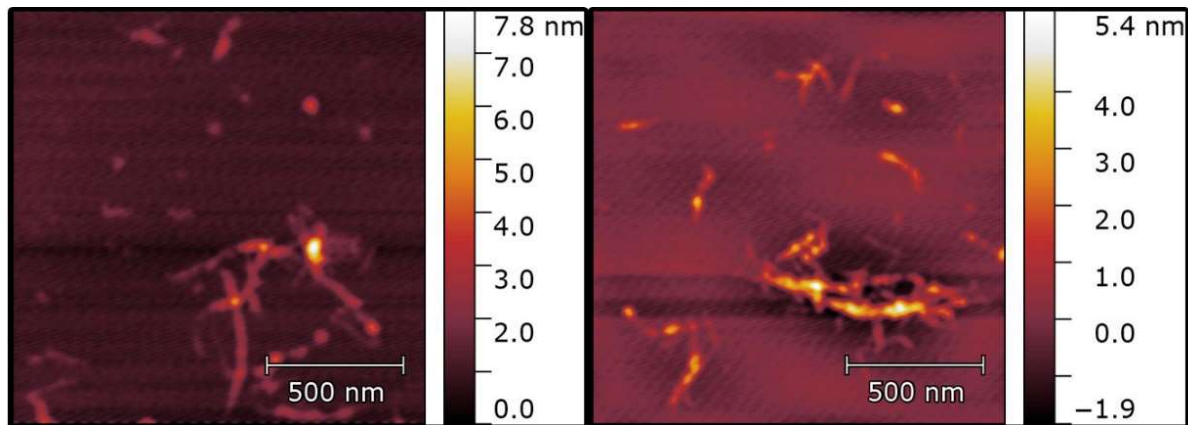
Fonte: Autoria própria.

Os pontos escuros destacados com círculos na Figura 17 são referentes a partículas sólidas de acetato de uranila, utilizado para corar a amostra. A presença dessas partículas indica que a solução de corante utilizada continha partículas sólidas, sendo necessário repetir a análise para obtenção de imagens com contraste melhorado. A partir de imagens de melhor contraste, será possível calcular a razão de aspecto média dos *whiskers*, utilizando softwares de tratamento de imagens.

Sabe-se que a razão de aspecto é um parâmetro importante, pois afeta diretamente as propriedades mecânicas de materiais em que os *whiskers* são empregados como agente de reforço (ZENG et al., 2011). O trabalho de Gabriel, A. G (GABRIEL, 2021), que empregou as mesmas condições reacionais de acidólise do presente estudo, reporta a produção de *whiskers* com diâmetro médio de 15 nm e comprimento médio de 228 nm a partir de beta-quitina extraída de gládios de lula.

Assim como as imagens de MET, as imagens de AFM apresentadas na Figura 18 evidenciam a morfologia dos *whiskers*, sendo possível observar cristais individuais alongados, que apresentam comprimento maior que o diâmetro. Portanto, as imagens de MET e AFM são coerentes entre si e corroboram com os resultados de espectroscopia, viscosimetria e difração de raios X, evidenciando que os *whiskers* de beta-quitina foram obtidos através da acidólise deste polissacarídeo.

Figura 18 - Imagens de microscopia de força atômica (AFM) obtidas para os whiskers de beta-quitina.

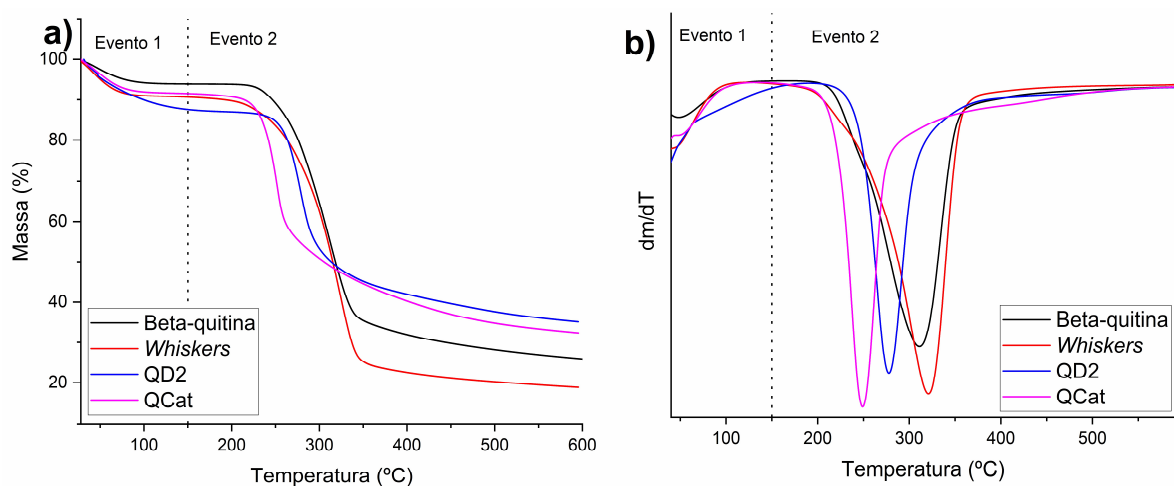


Fonte: Autoria própria.

5.1.7 Análise termogravimétrica

Os perfis de degradação térmica da beta-quitina, dos *whiskers* liofilizados, da quitosana QD2 e do derivado QCat são apresentados na Figura 19, através das curvas de gravimetria (TG) e respectivas derivadas (dTG). As curvas evidenciam que a degradação térmica desses polímeros apresenta dois eventos térmicos principais, conforme apresentado na Tabela 5. O Evento 1 é referente à evaporação de água fracamente ligada às cadeias poliméricas de todas as amostras, enquanto o Evento 2 está relacionado à degradação das cadeias poliméricas, desidratação dos anéis glicopiranosídicos de unidades GlcNAc e GlcN e clivagem dos grupos substituintes no caso do derivado QCat (DE BRITTO, 2004).

Figura 19 - Curvas de (a) TG e (b) dTG da beta-quitina, *whiskers*, quitosana QD2 e derivado QCat.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 5 - Temperaturas características e perdas de massa referentes à degradação térmica da beta-quitina, *whiskers*, quitosana QD2 e derivado QCat.

Amostra	Evento 1			Evento 2		
	Faixa (°C)	T _{máx} * (°C)	Δm** (%)	Faixa (°C)	T _{onset} *** (°C)	Δm (%)
Beta-quitina	25–110	71	6	210–360	273	58
<i>Whiskers</i>	25–120	74	9	190–380	272	66
QD2	25–150	110	13	200–410	263	45
QCat	25–110	70	9	195–395	241	51

*T_{máx} = temperatura da taxa máxima de degradação térmica; **Δm = perda de massa; ***T_{onset} = temperatura onset.

Fonte: Autoria própria.

O Evento 1 revela que as amostras de *whiskers*, QD2 e QCat contêm uma maior quantidade de água fracamente ligada que a amostra de beta-quitina. Essa ocorrência pode ser atribuída à maior área superficial dos *whiskers* frente à beta-quitina, bem como à maior hidrofiliabilidade de QD2 e QCat em relação à beta-quitina, devido à presença de grupos amino e grupos substituintes carregados positivamente. No Evento 2, é observado que a beta-quitina e os *whiskers* são termicamente mais estáveis que QD2 e QCat, por apresentarem maiores valores de T_{onset}. Por fim, o menor valor de T_{onset} do derivado QCat frente à quitosana QD2 revela que a cationização reduz a estabilidade térmica do polímero, conforme já constatado na literatura (CHETHAN et al., 2013). De forma geral, as curvas de degradação estão de acordo com trabalhos anteriores do grupo (GABRIEL, 2021; HABITZREUTER, 2021; SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016a) que estudaram o perfil de degradação térmica de beta-quitina, *whiskers*, quitosanas e derivado QCat.

5.1.8 Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)

A Tabela 6 exhibe os resultados das análises de MIC e MBC para as amostras *whiskers* e QCat.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) dos *whiskers* e de QCat contra *S. aureus* e *E. Coli*.

	<i>Whiskers</i> (mg mL ⁻¹)	QCat (mg mL ⁻¹)
MIC <i>S. aureus</i>	N.A.	1,25
MIC <i>E. coli</i>	N.A.	0,625
MBC <i>S. aureus</i>	N.A.	2,50
MBC <i>E. coli</i>	N.A.	N.A.

N.A. = não apresentou.

Fonte: Autoria própria.

A concentração inibitória mínima, MIC, é a menor concentração de um agente antimicrobiano que inibe por completo o crescimento de um microrganismo em condições *in vitro* bem estabelecidas (ANDREWS, 2001). Conforme mostrado pela Tabela 6, os *whiskers* não apresentaram MIC para nenhuma das bactérias testadas, enquanto o derivado QCat apresentou MIC de 1,25 e 0,625 mg mL⁻¹ para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. A literatura reporta valores de MIC de 0,064 mg mL⁻¹ contra *E. coli* e *S. aureus* para derivado QCat com grau médio de substituição de 80% (SAJOMSANG et al., 2009; TAN et al., 2013), enquanto outro trabalho do grupo (GABRIEL, 2021) já havia mostrado que a suspensão aquosa de *whiskers* de beta-quitina não apresenta MIC na faixa de concentração testada. A concentração bactericida mínima, MBC, é a menor concentração de um agente antimicrobiano requerida para matar determinado microrganismo, em condições *in vitro* bem estabelecidas (NCCLS, 2005). Novamente, os *whiskers* não apresentaram MBC, enquanto QCat apresentou MBC de 2,50 mg mL⁻¹ apenas para *S. aureus*.

Um parâmetro que impacta diretamente a atividade antimicrobiana de QCat é o grau médio de substituição, \overline{GS} . Geralmente, um maior \overline{GS} resulta em menor MIC (TAN et al., 2013), sendo relatado que derivados com \overline{GS} inferior a 20% apresentam diminuição considerável da atividade antimicrobiana (SAJOMSANG et al., 2009). Todavia, derivados com \overline{GS} maior que 60% apresentam citotoxicidade a diversos tipos de células, o que pode inviabilizar seu uso em aplicações biomédicas (SONG et al., 2018; WONGWANAKUL et al., 2017).

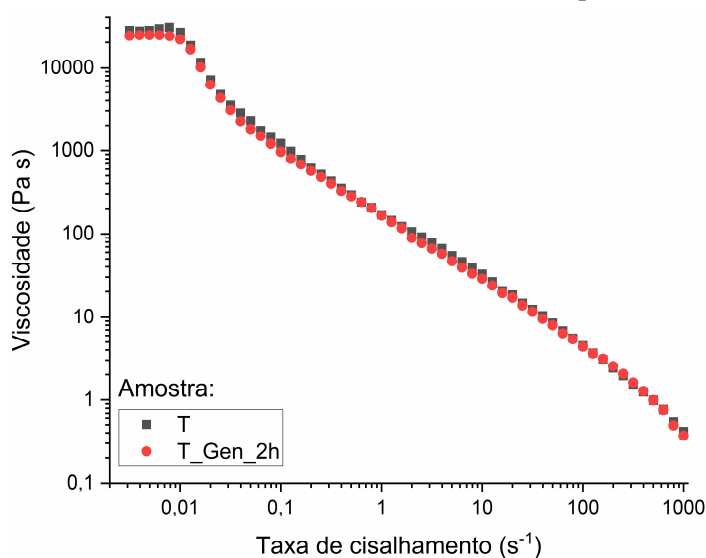
O mecanismo de ação antimicrobiana da quitosana e derivados que possuem carga positiva permanente ainda não foi elucidado. Há trabalhos que propõem que a alta densidade de cargas positivas presente nesses polímeros fique adsorvida na superfície celular das bactérias, que é carregada negativamente, acarretando no rompimento da parede celular e consequente inibição do crescimento desses microrganismos (LIU et al., 2004; MUZZARELLI et al., 1990; RHOADES; ROLLER, 2000).

É importante destacar que a concentração de QCat empregada na tinta para impressão 3D das membranas assimétricas foi de 2,9% m/v, o que corresponde a aproximadamente 46 vezes a MIC apresentada contra *E. coli*, 23 vezes a MIC contra *S. aureus* e 12 vezes a MBC contra *S. aureus*. Por conta disso, é esperado que as membranas assimétricas à base de QCat também inibam o crescimento dessas bactérias, sendo este efeito avaliado através do teste do halo de inibição (Seção 5.3.5).

5.2 Caracterizações reológicas da tinta para impressão 3D

A Figura 20 exibe a curva logarítmica da viscosidade (η) em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) das amostras T e T_Gen_2h. Ambas as amostras apresentam platô inicial de viscosidade até $\dot{\gamma} \approx 0,01 \text{ s}^{-1}$, referente à viscosidade de cisalhamento zero, η_0 , comumente apresentada por soluções poliméricas ou polímeros fundidos. Para taxas de cisalhamento maiores que $0,01 \text{ s}^{-1}$, as amostras exibiram comportamento pseudoplástico, *i.e.*, a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento. Este comportamento é requerido para impressão 3D DIW pois ao ser extrudada a tinta é submetida a grande taxa de cisalhamento e, assim, uma diminuição da viscosidade facilita seu escoamento através do bocal da impressora (SAADI et al., 2022; TAGLIAFERRI; PANAGIOTOPOULOS; MATTEVI, 2021a). Adicionalmente, as amostras T e T_Gen_2h apresentaram comportamento semelhante com relação à pseudoplasticidade, de forma que as curvas se sobrepõem após o platô inicial, evidenciando que a adição de genipina não altera significativamente o comportamento pseudoplástico da tinta.

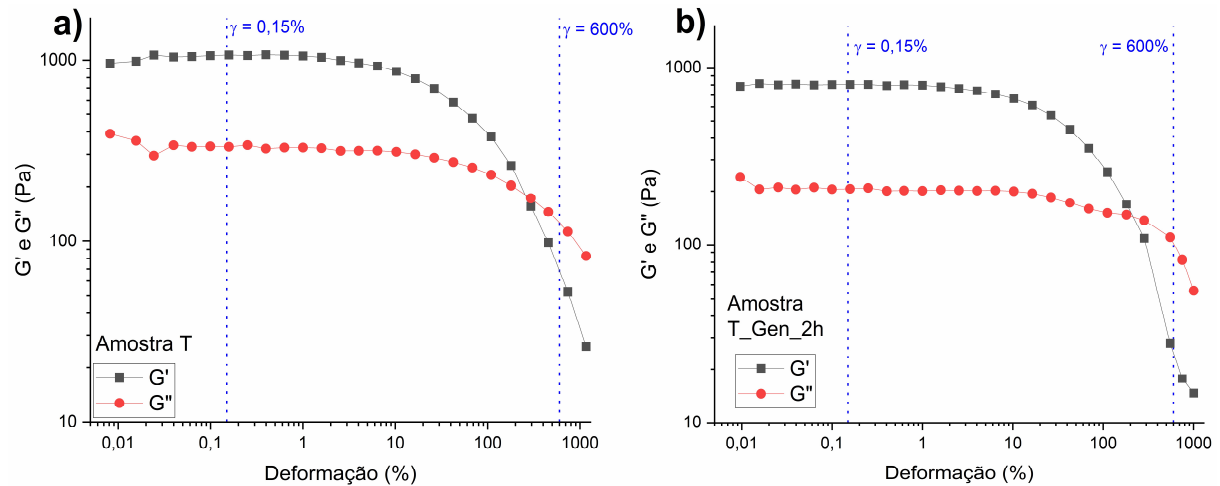
Figura 20 - Curva de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras T e T_Gen_2h.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 21 exibe o resultado da varredura do módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da porcentagem de deformação para as amostras T e T_Gen_2h.

Figura 21 - Curvas de G' e G'' em função da deformação oscilatória para a amostra T (a) e amostra T_Gen_2h (b).



Fonte: Autoria própria.

O ponto de *crossover*, P_C , referente à $G' = G''$, foi determinado para ambas as amostras, a partir da interseção das curvas de G' e G'' em software gráfico, considerando triplicata de cada amostra. A partir do ponto de *crossover*, foram determinados os valores de deformação no ponto de *crossover* (γ_c) e tensão no ponto de *crossover* (σ_c), e os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 - Ponto de *crossover*, P_C , deformação no ponto de *crossover*, γ_c , e tensão no ponto de *crossover*, σ_c , para as amostras T e T_Gen_2h.

Amostra	P_C (Pa)	γ_c (%)	σ_c (Pa)
T	136 ± 7	163 ± 11	330 ± 32
T_Gen_2h	141 ± 19	222 ± 9	420 ± 20

Valores exibidos como média \pm desvio padrão

Fonte: Autoria própria.

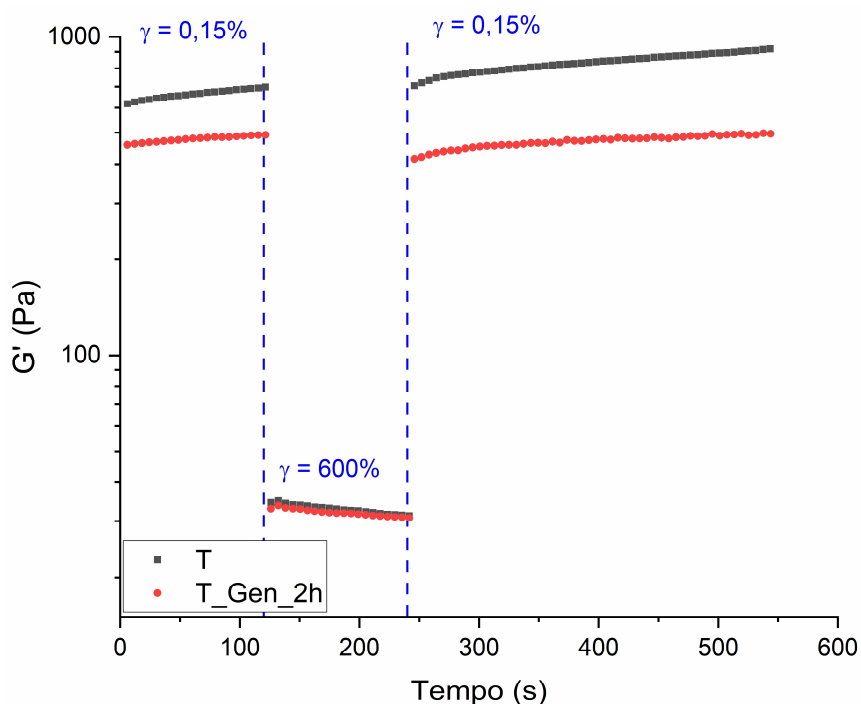
Através da Figura 21, é possível observar que ambas as amostras apresentam duas regiões bem definidas, uma antes de P_C , referente à relativa baixa deformação e que apresenta $G' > G''$, e outra após o P_C , em que a deformação é alta e que $G'' > G'$. Na região antes do ponto de *crossover*, há predominância da componente elástica, de forma que o fluido se comporta de maneira semelhante a um sólido. Já na região posterior ao ponto de *crossover*, há predominância da componente viscosa, o que resulta no comportamento semelhante ao de um líquido. De

acordo com a literatura (TAGLIAFERRI; PANAGIOTOPOULOS; MATTEVI, 2021a), este comportamento é ideal para impressão 3D DIW pois a tinta deve escoar no momento da extrusão, quando é submetida à alta tensão de cisalhamento, mas não deve escoar após ser extrudada, quando está em repouso, de maneira a manter o formato do filamento extrudado.

A Tabela 7 evidencia que a deformação e a tensão no ponto de *crossover* são maiores para T_Gen_2h. Isso indica que a reticulação se inicia nas primeiras horas após a adição de genipina, pois a reticulação de QCat cria ligações covalentes entre cadeias através dos grupos amino ($-NH_2$) das unidades GlcN presentes, resultando em maior rigidez estrutural, sendo necessária maior tensão para que o fluido escoe.

A partir Figura 21, foram determinados os valores de deformação (γ) na região viscoelástica linear (RVL), referente à $\gamma = 0,15\%$, e na região elástica não linear (RVNL), referente à $\gamma = 600\%$. A RVL caracteriza-se pela independência de G' em relação à γ e por apresentar $G' > G''$, indicando que a deformação aplicada não é suficiente para fazer o fluido escoar. Já na RVNL, G' varia com a deformação aplicada e a componente viscosa é predominante, resultando no escoamento do fluido (NAN et al., 2020a). Os valores de deformação da RVL e da RVNL foram empregados para o ensaio de tixotropia de três intervalos (3ITT), cujo resultado é apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Curva referente ao ensaio de tixotropia de três intervalos para as amostras T e T_Gen_2h.



Fonte: Autoria própria.

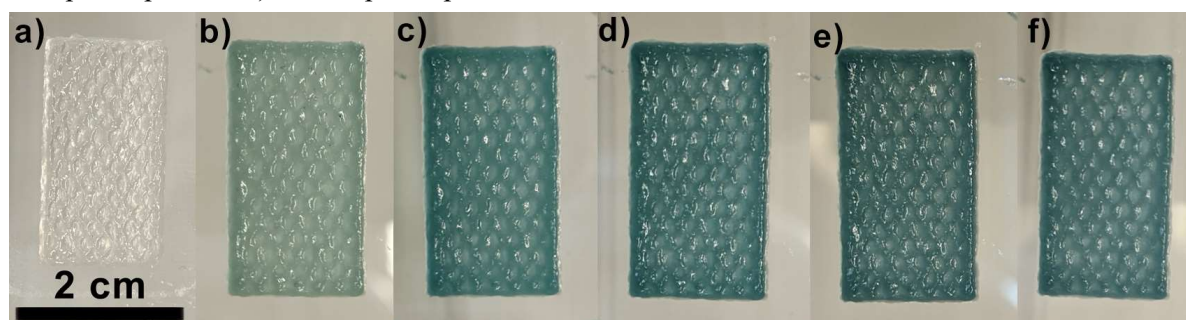
No ensaio de 3ITT, inicialmente é aplicado patamar de deformação (γ) referente à RVL (neste caso, $\gamma = 0,15\%$), depois, a deformação é aumentada abruptamente para um patamar referente à RVNL, e, por fim, γ é diminuída novamente para o primeiro patamar. Para impressão 3D DIW, o fluido deve idealmente exibir recuperação total de G' quando a deformação é alterada do segundo para o terceiro patamar, neste caso, de $\gamma = 600\%$ para $\gamma = 0,15\%$. Esta recuperação de G' mostra que, após ser extrudado, o fluido recupera sua componente elástica e se comporta de maneira semelhante a um sólido, o que resulta na retenção da forma do filamento e na capacidade de sustentar outras camadas impressas subsequentemente, sendo estas qualidades importantes para tintas utilizadas em impressão 3D DIW (NAN et al., 2020a; TAGLIAFERRI; PANAGIOTOPOULOS; MATTEVI, 2021a; ZHOU et al., 2022). Analisando a Figura 22, nota-se que ambas as amostras apresentam esse comportamento e recuperam G' de maneira instantânea quando a deformação é alterada abruptamente de $\gamma = 600\%$ para $\gamma = 0,15\%$.

De modo geral, os resultados das análises reológicas de pseudoplasticidade, viscoelasticidade e tixotropia mostraram que ambas as amostras apresentam características que resultam em comportamento reológico ideal para impressão 3D DIW.

5.3 Caracterizações das membranas assimétricas

A evolução de coloração observada nas membranas assimétricas (Figura 23) evidencia que a reação de reticulação ocorreu, já que outros trabalhos que empregaram genipina como agente reticulante de quitosana relataram formação de hidrogéis com coloração azul escuro ou verde (DELMAR; BIANCO-PELED, 2015; MUZZARELLI et al., 2015). A evolução da coloração ocorreu de forma que 2 horas após a adição de genipina (que corresponde a 2 horas após a impressão) o hidrogel não apresentava cor, enquanto que após o primeiro dia, foi observada coloração verde que se intensificou aproximadamente até o terceiro dia. Testes foram realizados de modo que amostras do material foram cortadas com pinça e imersas em água destilada para avaliação da solubilização. A não solubilização indica que a reticulação ocorreu como planejado. Nestes ensaios, amostras cuja adição de genipina haviam sido feitas há 3 dias ou mais se mostraram insolúveis. Considerando este resultado, todas as caracterizações das membranas assimétricas foram realizadas no mínimo 5 dias após a impressão, de maneira a garantir que a reticulação havia ocorrido com êxito.

Figura 23 - Evolução de coloração observada na camada interna (CI) das membranas assimétricas: a) 2 horas após impressão; b) 1 dia após impressão; c) 2 dias após impressão; d) 3 dias após impressão; e) 4 dias após impressão; f) 5 dias após impressão.



Fonte: Autoria própria.

Outros trabalhos reportam que é possível reticular materiais à base de quitosana e gelatina através de sua imersão em solução aquosa ou alcoólica de genipina (DEL GAUDIO et al., 2013; MEKHAIL; JAHAN; TABRIZIAN, 2014; MI; SHYU; PENG, 2005), sendo essa a ideia inicial para reticulação das membranas assimétricas produzidas neste trabalho. Testes foram realizados de modo que a tinta sem adição de genipina (composição de QCat 2,9%, *whiskers* 8,3 mg mL⁻¹) foi impressa, produzindo membranas assimétricas semelhantes à da Figura 23a. Após a impressão, as membranas foram imersas em solução aquosa/alcoólica de genipina, no entanto, ao remover o material da solução reticulante e colocá-lo em água destilada, observou-se completa solubilização após aproximadamente 30 minutos, indicando que a reticulação não ocorreu de forma eficiente. Nestes testes, foram variadas condições reacionais referentes à concentração de genipina (0,1–4 mg mL⁻¹), tempo de reticulação (1–10 dias) e solvente (água deionizada pura, etanol absoluto e misturas 20/80%, 50/50% e 80/20% de etanol/água), entretanto, nenhuma das condições experimentadas promoveu a reticulação bem-sucedida do material. Desta forma, seguiu-se o procedimento para reticulação adicionando solução de genipina diretamente ao QCat solubilizado em suspensão aquosa de *whiskers* de beta-quitina.

Uma alternativa interessante à utilização de genipina como reticulante é a fotorreticulação. Neste tipo de reticulação, um polímero passível à fotorreticulação é submetido, na presença de um fotoiniciador, à radiação de comprimento de onda específico, o que resulta na formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas (LIM et al., 2020). Uma alternativa interessante para tornar polímeros como quitosana e gelatina suscetíveis à fotorreticulação é a funcionalização com grupo metacrilato. Alguns trabalhos que exploram esta possibilidade reportam reações de reticulação rápidas, que ocorrem em alguns segundos ou minutos (LUO et al., 2020; XU et al., 2020). Desta forma, as alternativas sugeridas à utilização

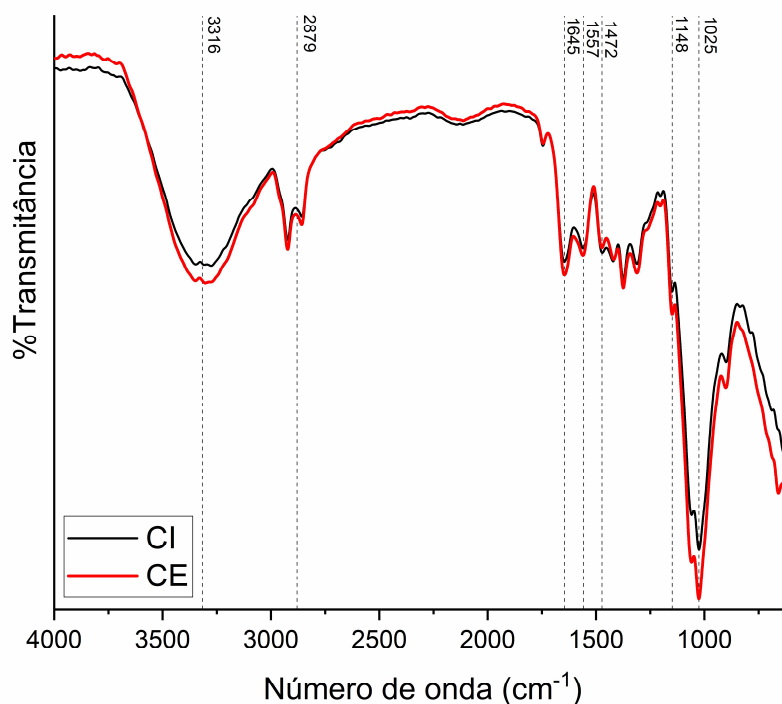
de genipina são a funcionalização do derivado QCat com grupo metacrilato ou ainda a produção de blenda entre o derivado QCat e gelatina metacrilada, que também é hidrossolúvel. Em ambos os casos, o material poderia ser impresso com a adição prévia de um fotoiniciador e, em sequência, submetido à radiação UV para reticulação.

A homogeneização da tinta se mostrou um desafio durante o processo de solubilização do derivado QCat em suspensão de *whiskers* e também após a adição da solução aquosa de genipina. Agitadores magnéticos, vórtex e ultrassom de banho foram empregados para homogeneização, entretanto, nenhum se mostrou totalmente eficiente, o que pode ser atribuído à alta viscosidade do fluido. Sem dúvida, a homogeneização de fluidos altamente viscosos como as tintas utilizadas na impressão 3D DIW representa um desafio, sendo exigido, muitas vezes, a utilização de equipamentos específicos para garantir um processo de homogeneização rápido e eficaz (DANI et al., 2021). O fato de a tinta não estar totalmente homogênea afetou as propriedades mecânicas das membranas assimétricas, resultando na impossibilidade de obter resultados para ensaios de tração e de potencial zeta de superfície, pois o material se rompeu antes do início destas análises. Uma hipótese é que a heterogeneidade de composição da tinta resultou em uma reticulação heterogênea do hidrogel, criando pontos de fratura que tornaram o material mais frágil. Uma análise válida para verificação da homogeneidade das membranas assimétricas é a microscopia eletrônica de varredura (MEV), que permitirá avaliar a morfologia da superfície do material. Embora apresentassem certa fragilidade, as membranas assimétricas impressas com as mesmas dimensões das apresentadas na Figura 23 se mostraram facilmente manipuláveis com o auxílio de pinça e espátula, o que possibilitou realizar as caracterizações apresentadas a seguir.

5.3.1 Espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

Os espectros no infravermelho das amostras das membranas assimétricas liofilizadas são apresentados na Figura 24. É possível notar que os espectros da camada interna (CI) e externa (CE) estão praticamente sobrepostos, o que evidencia que não há diferença entre os grupos funcionais presentes na composição de cada camada. Isto era esperado, pois as membranas foram produzidas de maneira que CI e CE apresentassem mesma composição, porém geometrias diferentes.

Figura 24 - Espectros no infravermelho referentes à camada interna (CI) e camada externa (CE) das membranas assimétricas liofilizadas.



Fonte: Autoria própria.

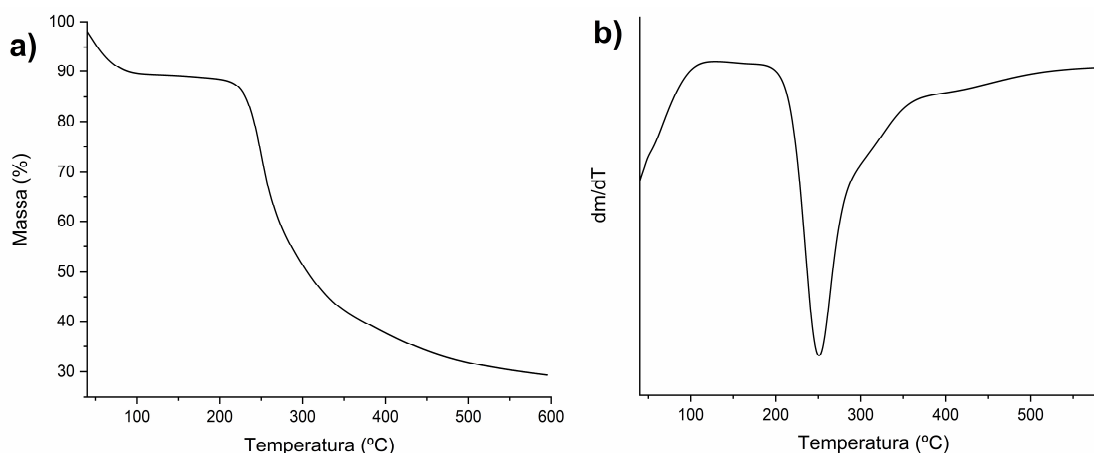
As bandas em 1025 e 1148 cm^{-1} são atribuídas às deformações angulares, respectivamente, das ligações C–O e O–H presentes nas estruturas do derivado QCat e dos *whiskers*. A banda larga e intensa centrada em 3316 cm^{-1} é referente ao estiramento das ligações O–H e N–H, enquanto a banda presente na região de 2879 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das ligações C–H. Adicionalmente, é observada em 1645 cm^{-1} a banda de amida I, referente à deformação axial da ligação C=O, e em 1557 cm^{-1} , a banda de amida II, referente à deformação axial da ligação N–H. Por fim, a banda em 1472 cm^{-1} é referente às deformações C–H dos grupos metílicos ligados ao nitrogênio quaternizado de QCat (CHO et al., 2006; HUANG et al., 2014; LAVALL; ASSIS; CAMPANAFILHO, 2007).

Conforme esperado, os espectros da Figura 24 são semelhantes aos de QCat e *whiskers* (Figura 13, Seção 5.1.1). Nenhuma banda referente às ligações covalentes formadas pela reticulação de genipina foi observada, o que pode ser atribuído a um baixo grau de reticulação. De fato, outro trabalho do grupo (BUKZEM, 2019) que empregou genipina para reticulação de carboximetilquitosana também não encontrou diferença significativa entre os espectros no infravermelho do material antes e após a reticulação com genipina.

5.3.2 Análise termogravimétrica

O perfil de degradação térmica das membranas assimétricas liofilizadas é apresentado através das curvas de TG e dGT (Figura 25) e das temperaturas características dos eventos térmicos (Tabela 8).

Figura 25 - Curvas de (a) TG e (B) dTG das membranas assimétricas liofilizadas.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 8 - Temperaturas características e perdas de massa referentes à degradação térmica das membranas assimétricas liofilizadas.

	Evento 1		Evento 2		
	Faixa (°C)	Δm^* (%)	Faixa (°C)	T_{onset}^{**} (°C)	Δm (%)
Membrana assimétrica	25–110	11	190–400	232	58

* Δm = perda de massa; ** T_{onset} = temperatura onset;

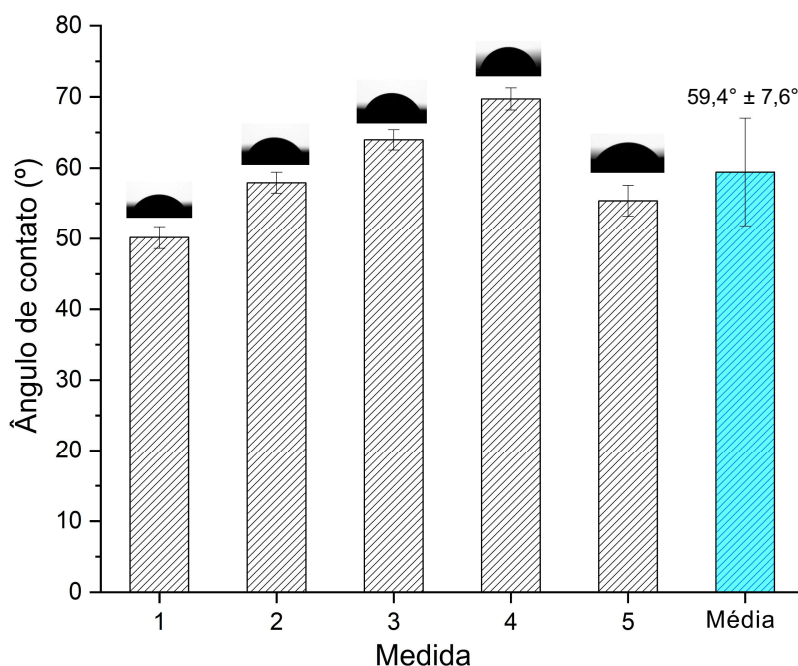
Fonte: Autoria própria.

São observados dois eventos térmicos principais, sendo o primeiro na faixa de 25–110 °C, com perda de massa de 11%, referente à evaporação de moléculas de água fracamente ligadas às cadeias poliméricas dos *whiskers* e de QCat. O Evento 2, que ocorre no intervalo de 190–400°C e apresenta perda de massa de 58%, é referente à degradação térmica das cadeias poliméricas e desidratação dos anéis glicopiranosídicos dos *whiskers* e de QCat, degradação ocasionada pela quebra das ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas formadas pela genipina, além da clivagem dos grupos substituintes de carga permanente positiva no caso do derivado (SANTOS; BUKZEM; CAMPANA-FILHO, 2016a). Foi observada diminuição da temperatura onset das membranas assimétricas ($T_{\text{onset}} = 232$ °C) com relação aos *whiskers* ($T_{\text{onset}} = 272$ °C) e derivado QCat ($T_{\text{onset}} = 241$ °C) isolados, o que pode indicar que a reticulação do material diminui sua estabilidade térmica.

5.3.3 Medidas de ângulo de contato

A molhabilidade é considerada uma das propriedades de superfície que mais influencia na resposta biológica de um material a ser empregado como curativo, pois afeta características como mucoadesividade, capacidade de absorção de exsudato e capacidade do material em promover a proliferação e diferenciação celular (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; MIGUEL; MOREIRA; CORREIA, 2019). A literatura sugere que ângulos de contato próximos a 50–60° facilitam a adesão e proliferação de fibroblastos, que são as principais células responsáveis pelo processo de cicatrização da derme, pois apresentam como função principal a síntese de componentes da matriz extracelular (colágeno e elastina) durante o processo de cicatrização (KIM et al., 2007; PAGNANO et al., 2008). Os resultados das medidas de ângulo de contato da camada externa das membranas assimétricas são exibidos na Figura 26. O ângulo de contato da camada interna não pôde ser analisado devido aos poros macroscópicos presentes em sua estrutura (Figura 23).

Figura 26 - Resultados de ângulo de contato para a camada externa (CE) das membranas assimétricas.



Fonte: Autoria própria.

O ângulo de contato médio foi, portanto, de 59,4° ± 7,6° (média ± desvio padrão), o que indica que as membranas apresentam caráter hidrofílico. Este resultado era esperado pois o material final é composto majoritariamente de água, o que foi evidenciado após o processo de liofilização, no qual as membranas assimétricas perderam aproximadamente 95% de sua massa. Um ângulo de contato hidrofílico indica que o material apresenta potencial de interagir com

líquidos biológicos relevantes, como exsudato, plasma e sangue, o que pode ser interessante considerando possíveis aplicações biomédicas (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; FALANGA et al., 2022). Por fim, a análise da morfologia de superfície empregando a técnica de MEV deve ser realizada no material antes e após o processo de liofilização, pois proporcionará mais informações importantes sobre a superfície de ambas as camadas das membranas assimétricas.

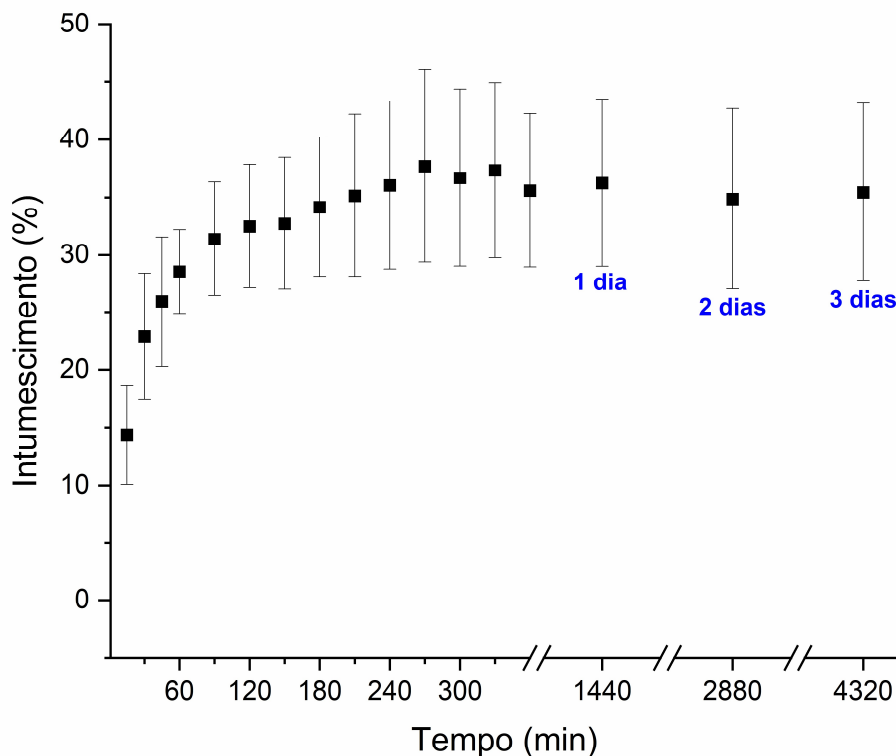
5.3.4 Capacidade de intumescimento

Geralmente, a pele saudável apresenta pH entre 4,0 e 6,5, enquanto o pH no leito da ferida costuma ser mais elevado, pois a presença de uma lesão expõe tecidos subjacentes cujo pH é próximo de 7,4. De fato, o pH no leito da ferida pode variar a depender principalmente do tipo de lesão, sendo relatado pH médio de 7,44 para lesões agudas e pH entre 7,42 e 8,90 para lesões crônicas (SIM et al., 2022). Desta forma, considerando apenas o pH, o tampão PBS com pH = 7,4 se mostra uma boa escolha para avaliar o perfil de hidratação de materiais com potencial aplicação como curativos de pele. Além disso, estima-se que uma ferida típica possa liberar cerca de 5 mL de exsudato por dia, sendo comum uma diminuição gradual dessa quantidade à medida que o processo de cicatrização avança (LU et al., 2023).

Sabe-se também que durante a cicatrização, um ambiente com pH ácido estimula a proliferação de fibroblastos, previne a colonização bacteriana e facilita a liberação de oxigênio da oxiemoglobina, sendo estes fatores essenciais para que o processo de cicatrização ocorra de forma mais rápida e eficiente. Adicionalmente, à medida que o processo de cicatrização avança, o pH no leito da ferida diminui, fazendo com que a pele alcance novamente o pH natural após a conclusão do processo de cicatrização (POWER; MOORE; O'CONNOR, 2017).

A Figura 27 ilustra o perfil de hidratação das membranas assimétricas em tampão fosfato salino (PBS).

Figura 27 - Capacidade de intumescimento das membranas assimétricas em tampão fosfato salino (PBS), com pH = 7,4.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 27 mostra que as membranas assimétricas apresentaram perfil de hidratação crescente até aproximadamente 180 minutos e, após esse período, o intumescimento foi aproximadamente constante, com valor próximo a 35%. Este valor é considerado baixo para materiais projetados para serem utilizados como curativos, especialmente se tratando de um material baseado em derivado de quitosana altamente hidrofílico, QCat. Para efeito de comparação, é possível encontrar na literatura capacidades de intumescimento em tampão PBS entre 300 e 500% para materiais à base de quitosana reticulados com genipina (GAO et al., 2014; HAFEZI et al., 2019). Também é relatado que pH, temperatura e grau de reticulação interferem fortemente na capacidade de intumescimento de hidrogéis à base de quitosana (MUZZARELLI, 2009).

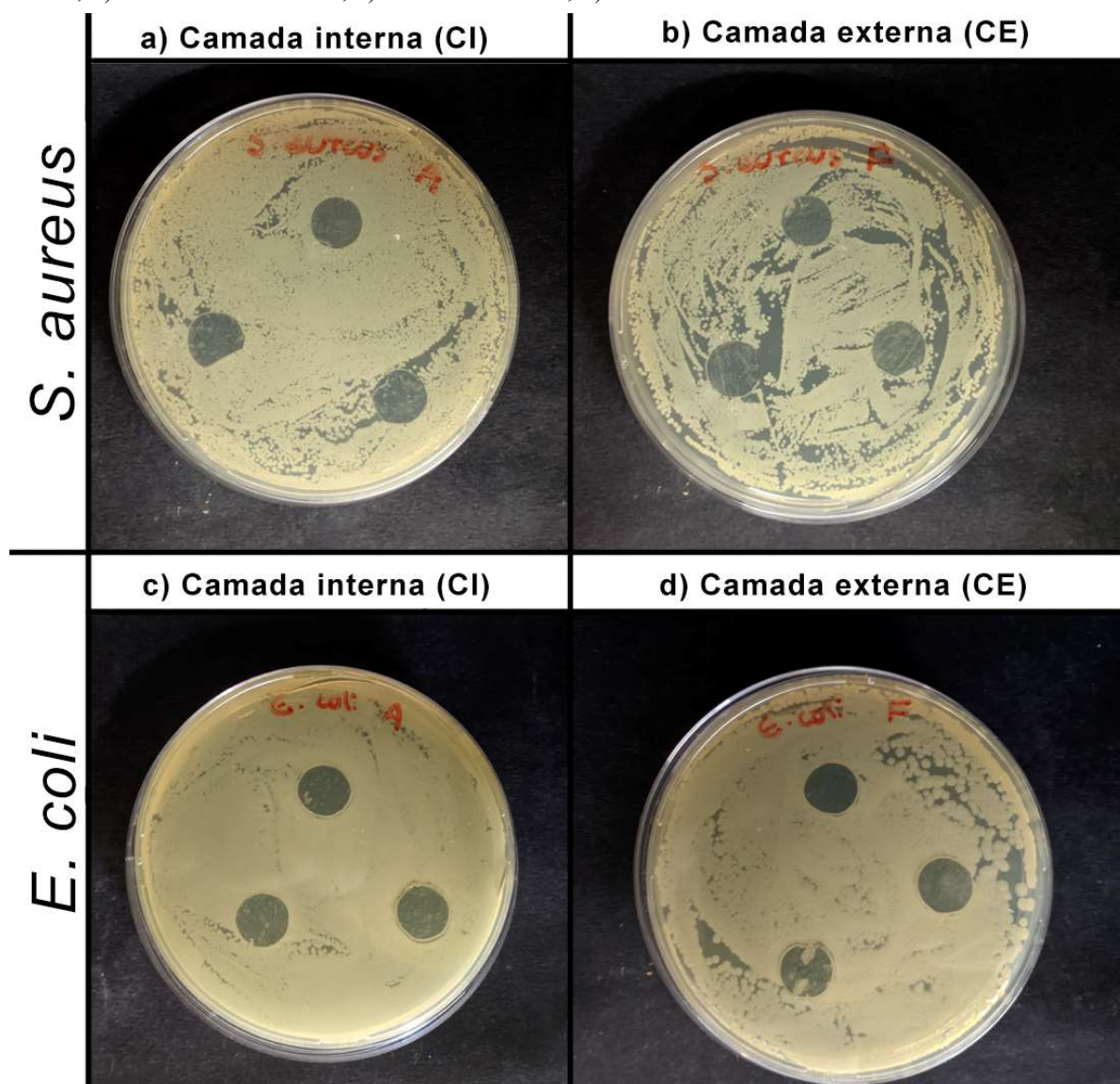
A baixa capacidade de intumescimento das membranas pode estar relacionada à força iônica do tampão PBS. Para avaliar esta hipótese, foi realizado um ensaio semelhante de intumescimento das membranas em água destilada, que consistiu na pesagem inicial de 3 corpos de prova circulares (1,2 cm de diâmetro) que foram colocados em recipientes diferentes contendo 25 mL de água destilada. Após 24 horas de incubação a 37 °C, o excesso de água foi removido com papel toalha e a massa dos corpos de prova foi novamente aferida, seguindo o

mesmo protocolo experimental para avaliação do intumescimento em tampão PBS. A massa adquirida das membranas em água destilada após esse período foi próxima a 200%, evidenciando que a força iônica do tampão PBS desempenhou papel importante no perfil de hidratação das membranas.

5.3.5 Teste de sensibilidade de antimicrobianos por disco-difusão (teste do halo de inibição)

A avaliação da capacidade do material em inibir o crescimento de microrganismos é fundamental para curativos de pele, uma vez que infecções podem dificultar ou retardar o processo de cicatrização (BORDA; MACQUHAE; KIRSNER, 2016; DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015). De forma geral, uma grande variedade de microrganismos pode ser encontrada em diferentes tipos de lesões de pele. Por exemplo, *S. aureus* e *E. coli* podem ser encontradas em lesões agudas, como no caso de cortes superficiais e de procedimentos cirúrgicos, e em lesões crônicas, como em queimaduras e úlceras (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001). Desta forma, o teste do halo de inibição foi realizado para avaliar a eficácia de ambas as faces das membranas assimétricas em inibir o crescimento e a proliferação bacteriana, e os resultados são apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Resultados do teste do halo de inibição para as membranas assimétricas: a) CI contra *S. aureus*; b) CE contra *S. aureus*; c) CI contra *E. coli*; d) CE contra *E. coli*.



Fonte: Autoria própria.

A análise da Figura 28 revela que tanto a camada interna (CI) quanto a camada externa (CE) exibiram inibição por contato para *S. aureus* e *E. coli*, *i.e.*, ambas se mostraram capazes de inibir o crescimento e proliferação bacteriana na área de contato direto com o ágar. Estes resultados evidenciam que as membranas assimétricas podem exibir eficácia tópica, ou seja, podem ser empregadas para prevenir proliferação bacteriana no local da lesão. Essa é uma característica notável e desejável do material considerando potencial aplicação como curativo de pele, pois prevenir a infecção e proliferação bacteriana no local da ferida são fatores cruciais para estimular e acelerar o processo de cicatrização (DHIVYA; PADMA; SANTHINI, 2015).

O mecanismo de ação antimicrobiana de quitosana e derivados ainda não foi completamente elucidado, entretanto, acredita-se que as cargas positivas desempenhem papel

importante ao ficarem adsorvidas na superfície carregada negativamente das bactérias, ocasionando o rompimento da parede celular (LIU et al., 2004). Desta forma, a ação antimicrobiana apresentada pelas membranas provavelmente se deve ao caráter polieletrólítico do derivado QCat. Por fim, os resultados do teste do halo de inibição corroboram com os resultados de MIC e MBC, evidenciando que o derivado QCat sintetizado neste trabalho, que apresenta $\overline{GS} = 29,9\%$ e $\overline{M}_v = 74,2$ kDa, exibe atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. Coli*.

5.3.6 Susceptibilidade à degradação enzimática *in vitro*

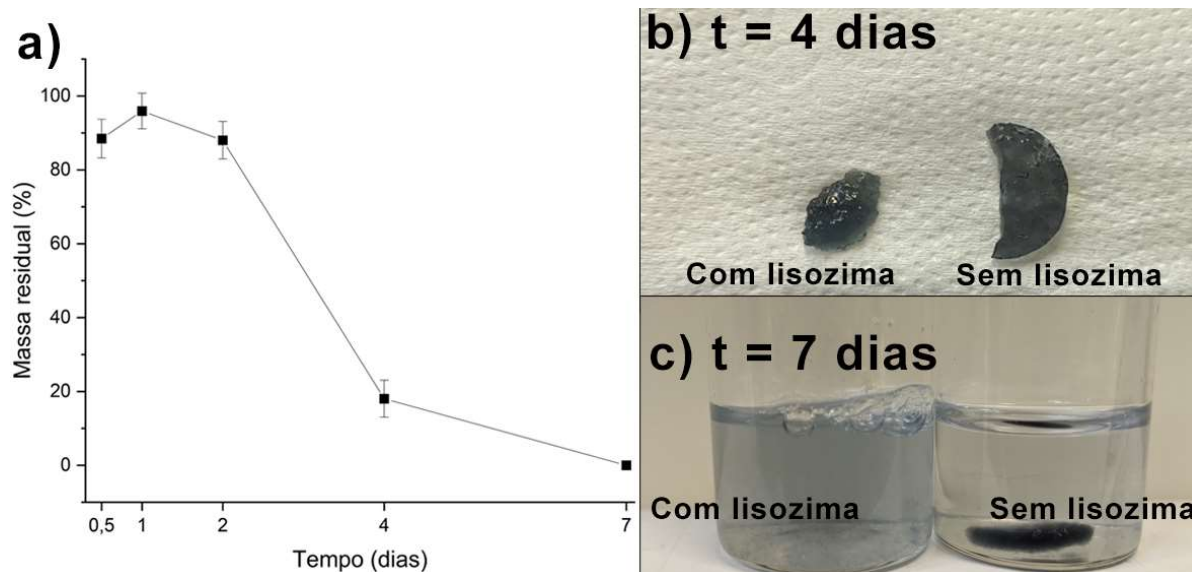
Considerando potenciais aplicações biomédicas, a avaliação da susceptibilidade à degradação enzimática é um estudo relevante pois permite mensurar a estabilidade e o tempo de vida útil do material perante ação de enzimas presentes na área de aplicação (ESKANDARINIA et al., 2019). Produzida pelo sistema imunológico humano, a lisozima é uma proteína de aproximadamente 16,5 kDa que apresenta como principal função a defesa do organismo contra bactérias e fungos através da catálise da reação de hidrólise das ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ presentes em peptidoglicanos, que compõe a parede celular desses organismos (ERCAN; DEMIRCI, 2015).

É relatado que a degradação enzimática de quitina, quitosana e derivados depende sobretudo do grau médio de acetilação (\overline{GA}), visto que a lisozima interage com as unidades GlcNAc presentes na estrutura desses polímeros (KEAN; THANOU, 2010). Com relação ao derivado QCat, ainda não há estudos que relacionem a susceptibilidade à degradação por enzimas com o grau médio de substituição, \overline{GS} , todavia, para outros derivados de quitosana, como a *N,N,N*-trimetilquitosana, é relatado que \overline{GS} não influencia substancialmente na taxa de degradação enzimática do polímero (VERHEUL et al., 2009b).

A lisozima pode ser encontrada em grande parte dos tecidos humanos, além de estar presente em secreções, saliva e lágrimas (HASMANN et al., 2011). Em lesões de pele, sua concentração pode variar a depender principalmente da presença de infecção bacteriana, sendo relatados valores próximos de 1000 unidades/mL (u/mL) para feridas não infeccionadas e 5500 u/mL para feridas infeccionadas (HASMANN et al., 2011; NIYONSABA; OGAWA, 2005; TALLIAN et al., 2019). Desta forma, o experimento foi conduzido com 5500 unidades de lisozima por mL, de forma a simular o ambiente de uma ferida infeccionada. Além disso, foi considerado o perfil de hidratação das membranas assimétricas, pois conforme discutido na Seção 5.3.4, os materiais intumescem quando são imersos em tampão PBS. Assim, os resultados são apresentados na Figura 29a, onde a massa residual diz respeito à massa dos corpos de prova

após determinados períodos de incubação com lisozima a 37 °C (12h, 24h, 2 dias, 4 dias, 7 dias) em relação à massa inicial, menos a massa obtida por intumescimento em tampão PBS sem a presença de lisozima.

Figura 29 - a) Curva de massa residual em função do tempo de incubação das membranas assimétricas em tampão PBS (pH = 7,4) na presença de lisozima (5500 u/mL); b) corpos de prova após 4 dias de incubação, com e sem presença de lisozima; c) frascos após 7 dias de incubação com e sem a presença de lisozima.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 29a evidencia que a degradação das membranas assimétricas ocorre rapidamente a partir do segundo dia de incubação. O perfil de hidratação das membranas sem a presença de lisozima mostrou resultado idêntico àquele exibido na Figura 27 (Seção 5.3.4), com intumescimento médio de 35% em todos os períodos de incubação. As Figuras 29b e 29c ilustram a rápida degradação observada a partir do segundo dia de incubação. De fato, decorridos os 7 dias de análise, os corpos de prova submetidos à ação da lisozima foram completamente degradados, impossibilitando a aferição de sua massa. Portanto, para esse período de incubação, foi atribuída massa residual igual à zero.

Idealmente, a degradação de um material utilizado como curativo de pele deve ocorrer de forma controlada, proporcionando tempo hábil para que o processo de cicatrização evolua e garantindo que, ao final desse processo, não haja resquícios do material usado como curativo no local da ferida (CHEN et al., 2019). Os resultados de degradação enzimática *in vitro* do presente trabalho mostraram que as membranas assimétricas foram extensamente degradadas após 4 dias sob a ação da lisozima. Esse período pode ser considerado curto para aplicações em curativos de pele, uma vez que pode não haver tempo suficiente para uma evolução apreciável

do processo de cicatrização da ferida, especialmente no caso de lesões graves (CHABY et al., 2007; CHEN et al., 2019).

Conforme mencionado previamente, a susceptibilidade à degradação por lisozima de quitina, quitosana e derivados está associada ao \overline{GA} , sendo relatado que $\overline{GA} > 30\%$ propicia a degradação enzimática do polímero, enquanto que $\overline{GA} < 20\%$ dificulta e retarda este processo (VERHEUL et al., 2009b). Desta forma, a rápida degradação das membranas assimétricas pode ser atribuída à presença dos *whiskers* de beta-quitina em sua composição, os quais apresentaram $\overline{GA} = 96,0\%$. Após a total degradação, foi observado material particulado com coloração verde/azulada em solução (Figura 29c), o que indica que as cadeias de QCat reticuladas com genipina são insolúveis em tampão PBS e que QCat não é degradado pela lisozima. De fato, QCat provavelmente apresenta \overline{GA} semelhante à quitosana QD2 ($\overline{GA} = 21,5\%$), o que pode indicar que o derivado cationizado sintetizado neste trabalho seja pouco suscetível à ação da lisozima.

De acordo com os resultados obtidos e considerando que não foi possível realizar os experimentos de tração visando à determinação das propriedades mecânicas bem como aqueles de medidas do potencial zeta de superfície das membranas, é evidenciado que o processo de reticulação das membranas com genipina, embora tenha resultado em material insolúvel em meio aquoso, não se deu de maneira homogênea, o que justifica o comportamento mecânico frágil dos materiais e indica a necessidade de elaborar novos experimentos de reticulação. Nesse sentido, a continuidade do presente estudo indica a necessidade de se utilizar de meios mais eficientes para promover a homogeneização do sistema suspensão aquosa de *whiskers* de beta-quitina/QCat/genipina, sendo sugerido o emprego de misturador UltraTurrax por curtos período de tempo, e o emprego de outros métodos de reticulação como, por exemplo, a introdução de grupos metacrilato nas cadeias de QCat visando à promoção de fotorreticulação.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho permitiu a produção e caracterização de membranas assimétricas à base cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana (QCat), *whiskers* de beta-quitina e genipina como agente reticulante. As membranas foram produzidas através da técnica de impressão 3D por *direct ink writing* (DIW), a qual permitiu a fabricação de materiais que apresentassem uma camada externa (CE) mais densa e uma camada interna (CI) porosa.

Os espectros no infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C evidenciaram que o derivado QCat foi sintetizado a partir da reação da quitosana com cloreto de glicidiltrimetilamônio (CGTMA). As condições reacionais desta síntese permitiram obtenção de QCat com grau médio de substituição (\overline{GS}) próximo a 30%, o que conferiu hidrossolubilidade e atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*. O menor grau médio de polimerização viscosimétrico (\overline{GP}_v) dos *whiskers* (44 ± 9) frente ao da beta-quitina de partida (2048 ± 339) evidenciou que sua produção através de acidólise foi bem-sucedida.

A tinta utilizada para impressão 3D DIW foi preparada a partir da solubilização de QCat em suspensão aquosa de *whiskers* de beta-quitina com subsequente adição de genipina. A tinta mostrou comportamento reológico adequado para impressão 3D DIW, exibindo propriedades como pseudoplasticidade e tixotropia, o que permitiu a impressão das membranas assimétricas. Os parâmetros de impressão foram ajustados e permitiram produzir, com resolução adequada, diferentes geometrias para as camadas interna e externa. A adição de genipina se deu antes do início do processo de impressão e a reticulação foi evidenciada através da evolução de coloração azul/esverdeada, especialmente 2 dias após a adição do reticulante.

Os espectros no infravermelho mostraram a presença de bandas características de QCat e *whiskers* em ambas as camadas das membranas assimétricas liofilizadas, enquanto a análise termogravimétrica indicou que a reticulação com genipina diminuiu a estabilidade térmica do material. O ângulo de contato médio da camada externa foi próximo a 60° , evidenciando comportamento hidrofílico, e o grau de intumescimento em tampão PBS foi próximo a 35%, valor inferior a outros trabalhos da literatura.

No ensaio do halo de inibição, tanto a camada externa quanto a interna apresentaram inibição por contato contra *S. aureus* e *E. coli*, qualidade interessante considerando aplicações biomédicas. No ensaio de degradação com lisozima *in vitro*, foi observada degradação total dos materiais após 7 dias, o foi atribuído ao alto grau médio de acetilação dos *whiskers* de beta-quitina ($\overline{GA} = 96,0\%$) presentes na composição das membranas assimétricas.

As próximas etapas deste estudo serão centradas na otimização do processo de homogeneização da tinta, que se mostrou pouco eficiente. A partir disso, novas membranas

assimétricas serão produzidas e caracterizadas, de forma a obter mais informações relevantes sobre propriedades físico-químicas, morfológicas e biológicas para melhor avaliar seu potencial em aplicações biomédicas.

É ressaltado que este estudo abre perspectivas para trabalhos futuros, pois evidencia que hidrogéis à base do derivado QCat podem ser processados *via* impressão 3D DIW, o que possibilita a produção de diversos materiais com propriedades interessantes, especialmente para aplicações biomédicas, considerando as propriedades biológicas de QCat, e também na produção de materiais compósitos, devido à facilidade de processamento conferida pela hidrossolubilidade deste derivado cationizado. Também são destacadas alternativas à reticulação com genipina para trabalhos futuros, especialmente a fotorreticulação, pois podem facilitar a produção, homogeneização e processamento da tinta.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

AJDARY, R.; REYES, G.; KUULA, J.; RAUSSI-LEHTO, E.; MIKKOLA, T. S.; KANKURI, E.; ROJAS, O. J. Direct ink writing of biocompatible nanocellulose and chitosan hydrogels for implant mesh matrices. **ACS Polymers Au**, Washington, v. 2, n. 2, p. 97–107, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9011395/>. Acesso em: 10 jul. 2023.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 48, p. 5–16, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11420333/>. Acesso em: 05 out. 2022.

ANITHA, A.; SOWMYA, S.; KUMAR, P. T. S.; DEEPTHI, S.; CHENNAZHI, K. P.; EHRlich, H.; TSURKAN, M.; JAYAKUMAR, R. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, Oxford, v. 39, n. 9, p. 1644–1667, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0079670014000288>. Acesso em: 10 jan. 2021.

ANWER, M. A. S.; WANG, J.; GUAN, A.; NAGUIB, H. E. Chitin nano-whiskers (CNWs) as a bio-based bio-degradable reinforcement for epoxy: evaluation of the impact of CNWs on the morphological, fracture, mechanical, dynamic mechanical, and thermal characteristics of DGEBA epoxy resin. **RSC Advances**, Cambridge, v. 9, n. 20, p. 11063–11076, 2019. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/ra/c9ra00769e>. Acesso em: 10 jan. 2021.

BARNES, H. A. Thixotropy — a review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, Amsterdam, v. 70, n. 1–2, p. 1–33, 1997. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377025797000049>. Acesso em: 10 jul. 2023.

BHARDWAJ, N.; CHOUHAN, D.; MANDAL, B. B. 3D functional scaffolds for skin tissue engineering. In: DENG, Y.; KULPER, J. (ed.) **Functional 3D tissue engineering scaffolds**. Duxford: Elsevier, 2018. p. 345–365. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780081009796000148>. Acesso em: 10 jul. 2023.

BORDA, L. J.; MACQUHAE, F. E.; KIRSNER, R. S. Wound dressings: a comprehensive review. **Current Dermatology Reports**, New York, v. 5, n. 4, p. 287–297, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13671-016-0162-5>. Acesso em: 10 jan. 2021.

BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clinical Microbiology Reviews**, New York, v. 14, n. 2, p. 244–269, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11292638/>. Acesso em: 10 jul. 2023.

- BUKZEM, A. L. **Membranas porosas à base de carboximetilquitosana e poli (álcool vinílico) para o tratamento de lesões de pele**. Orientador: Sergio Paulo Campana Filho. 2018. 113 f. Tese (Doutorado em Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-14012019-101144/pt-br.php>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- BUTLER, M. F.; NG, Y. F.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. **Journal of Polymer Science Part A: polymer chemistry**, Hoboken, v. 41, n. 24, p. 3941–3953, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pola.10960>. Acesso em: 10 jul. 2023.
- CAMPANA FILHO, S. P.; DELEZUK, J. A. M.; CARDOSO, M. B. Desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade: uma nova tecnologia para a produção de quitosana. **Revista Processos Químicos**, Goiânia, v. 4, n. 7, p. 9–18, 2010. Disponível em: http://ojs.rpqsena.org.br/index.php/rpq_n1/article/view/102. Acesso em: 21 maio 2022.
- CHABY, G.; SENET, P.; VANEAU, M.; MARTEL, P.; GUILLAUME, J. C.; MEAUME, S.; TÉOT, L.; DEBURE, C.; DOMPMARTIN, A.; BACHELET, H.; CARSIN, H.; MATZ, V.; RICHARD, J. L.; ROCHET, J. M.; SALES-AUSSIAS, N.; ZAGNOLI, A.; DENIS, C.; GUILLOT, B.; CHOSIDOW, O. Dressings for acute and chronic wounds. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 143, n. 10, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17938344/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- CHAGAS, P. A. M.; SCHNEIDER, R.; DOS SANTOS, D. M.; OTUKA, A. J. G.; MENDONÇA, C. R.; CORREA, D. S. Bilayered electrospun membranes composed of poly(lactic-acid)/natural rubber: a strategy against curcumin photodegradation for wound dressing application. **Reactive and Functional Polymers**, Amsterdam, v. 163, p. 104889, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S138151482100081X>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- CHEN, H.; LI, B.; FENG, B.; WANG, H.; YUAN, H.; XU, Z. Tetracycline hydrochloride loaded citric acid functionalized chitosan hydrogel for wound healing. **RSC Advances**, Cambridge, v. 9, n. 34, p. 19523–19530, 2019. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/ra/c9ra02628b>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- CHEN, S. C.; WU, Y. C.; MI, F. L.; LIN, Y. H.; YU, L. C.; SUNG, H. W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of *N,O*-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 96, n. 2, p. 285–300, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365904000604>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- CHETHAN, P. D.; VISHALAKSHI, B.; SATHISH, L.; ANANDA, K.; POOJARY, B. Preparation of substituted quaternized arylfuran chitosan derivatives and their antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 59, p. 158–164, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23608102/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

CHO, J.; GRANT, J.; PIQUETTE-MILLER, M.; ALLEN, C. Synthesis and physicochemical and dynamic mechanical properties of a water-soluble chitosan derivative as a biomaterial. **Biomacromolecules**, Washington, v. 7, n. 10, p. 2845–2855, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm060436s>. Acesso em: 10 jan. 2021.

DANI, S.; AHLFELD, T.; ALBRECHT, F.; DUIN, S.; KLUGER, P.; LODE, A.; GELINSKY, M. Homogeneous and reproducible mixing of highly viscous biomaterial inks and cell suspensions to create bioinks. **Gels**, Basel, v. 7, n. 4, p. 227, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2310-2861/7/4/227>. Acesso em: 10 jul. 2023.

DE ALMEIDA, W. S.; DA SILVA, D. A. Does polysaccharide quaternization improve biological activity? **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 182, p. 1419–1436, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813021009818>. Acesso em: 10 jul. 2023.

DE BRITTO, D.; CAMPANA FILHO, S. P. A kinetic study on the thermal degradation of *N,N,N*-trimethylchitosan. **Polymer Degradation and Stability**, Oxford, v. 84, n. 2, p. 353–361, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141391004000655>. Acesso em: 22 jul. 2023.

DEL GAUDIO, C.; BAIGUERA, S.; BOIERI, M.; MAZZANTI, B.; RIBATTI, D.; BIANCO, A.; MACCHIARINI, P. Induction of angiogenesis using VEGF releasing genipin-crosslinked electrospun gelatin mats. **Biomaterials**, Oxford, v. 34, n. 31, p. 7754–7765, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961213007552>. Acesso em: 20 jul. 2023.

DELMAR, K.; BIANCO-PELED, H. The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 127, p. 28–37, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861715002520>. Acesso em: 20 jul. 2023.

DENG, P.; JIN, W.; LIU, Z.; GAO, M.; ZHOU, J. Novel multifunctional adenine-modified chitosan dressings for promoting wound healing. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 260, p. 117767, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861721001545>. Acesso em: 20 maio 2023.

DHIVYA, S.; PADMA, V. V.; SANTHINI, E. Wound dressings – a review. **BioMedicine**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 22, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4662938/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

ERCAN, D.; DEMIRCI, A. Enhanced human lysozyme production by *Kluyveromyces lactis* K7 in biofilm reactor coupled with online recovery system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 98, p. 68–74, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X15000777>. Acesso em: 10 maio 2023.

ESKANDARINIA, A.; KEFAYAT, A.; RAFIENIA, M.; AGHEB, M.; NAVID, S.; EBRAHIMPOUR, K. Cornstarch-based wound dressing incorporated with hyaluronic acid and propolis: *in vitro* and *in vivo* studies. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 216, p. 25–35, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31047065/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

FACCHINATTO, W. M.; DOS SANTOS, D. M.; BUKZEM, A. L.; MORAES, T. B.; HABITZREUTER, F.; DE AZEVEDO, E. R.; COLNAGO, L. A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Insight into morphological, physicochemical and spectroscopic properties of β -chitin nanocrystalline structures. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 273, p. 118563, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34560974/>. Acesso em: 10 jan. 2021.

FALANGA, V.; ISSEROFF, R. R.; SOULIKA, A. M.; ROMANELLI, M.; MARGOLIS, D.; KAPP, S.; GRANICK, M.; HARDING, K. Chronic wounds. **Nature Reviews Disease Primers**, Berlin, v. 8, n. 1, p. 50, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41572-022-00377-3>. Acesso em: 20 jul. 2023.

FAN, Y.; SAITO, T.; ISOGAI, A. Preparation of chitin nanofibers from squid pen β -chitin by simple mechanical treatment under acid conditions. **Biomacromolecules**, Washington, v. 9, n. 7, p. 1919–1923, 2008a. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm800178b>. Acesso em: 10 jan. 2021.

FAYYABAKHSH, F.; J. KHAYAT, M.; LEU, M. C. 3D-printed gelatin-alginate hydrogel dressings for burn wound healing: a comprehensive study. **International Journal of Bioprinting**, Singapura, v. 8, n. 4, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36404780/>. Acesso em: 10 maio 2023.

FENG, M.; LU, X.; HOU, D.; ZHANG, S. Solubility, chain characterization, and derivatives of chitin. In: GOPI, S.; THOMAS, S.; PIUS, A. (ed.) **Handbook of chitin and chitosan**. Amsterdam: Elsevier, 2020. p. 101–129. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128179703000043>. Acesso em: 20 jul. 2023.

FIAMINGO, A.; DELEZUK, J. A. M.; TROMBOTTO, S.; DAVID, L.; CAMPANA-FILHO, S. P. Extensively deacetylated high molecular weight chitosan from the multistep ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin. **Ultrasonics Sonochemistry**, Amsterdam, v. 32, p. 79–85, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27150748/>. Acesso em: 20 maio 2022.

GABRIEL, A. G. **Nãotecidos de poli (ácido láctico) modificados com whiskers de beta-quitina e nanopartículas de prata visando aplicações como curativos de pele: uma comparação entre os métodos de eletrofiação e fiação por sopro**. Orientador: Sergio Paulo Campana Filho. 2021. 103 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-24012022-125656/pt-br.php>. Acesso em: 20 jul. 2023.

GAO, L.; GAN, H.; MENG, Z.; GU, R.; WU, Z.; ZHANG, L.; ZHU, X.; SUN, W.; LI, J.; ZHENG, Y.; DOU, G. Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Hoboken, v. 117, p. 398–405, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24675278/>. Acesso em: 20 maio 2023.

GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; DE ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/k3GqvpJJx4jqmNzNQZQV3Mw/>. Acesso em: 20 mar. 2023.

GRAÇA, M. F. P.; DE MELO-DIOGO, D.; CORREIA, I. J.; MOREIRA, A. F. Electrospun asymmetric membranes as promising wound dressings: a review. **Pharmaceutics**, Basel, v. 13, n. 2, p. 183, 2021a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7912487/>. Acesso em: 20 maio 2022.

HABITZREUTER, F. **Produção e caracterização de whiskers de beta-quitina por diferentes tratamentos ácidos e sua aplicação na remoção de corantes em meio aquoso**. Orientador: Sergio Paulo Campana Filho. 2021. 127 f. Tese (Doutorado em Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-02022022-152957/pt-br.php>. Acesso em: 20 maio 2023.

HAFEZI, F.; SCOUTARIS, N.; DOUROUMIS, D.; BOATENG, J. 3D printed chitosan dressing crosslinked with genipin for potential healing of chronic wounds. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 560, p. 406–415, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30797865/>. Acesso em: 20 maio 2022.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments. **Advances in Therapy**, New York, v. 34, n. 3, p. 599–610, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28108895/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

HASMANN, A.; WEHRSCHUETZ-SIGL, E.; KANZLER, G.; GEWESSLER, U.; HULLA, E.; SCHNEIDER, K. P.; BINDER, B.; SCHINTLER, M.; GUEBITZ, G. M. Novel peptidoglycan-based diagnostic devices for detection of wound infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 71, n. 1, p. 12–23, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21388768/>. Acesso em: 20 maio 2023.

HEUX, L.; BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, J.; VERSALI, M. F.; RINAUDO, M. Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. **Biomacromolecules**, Washington, v. 1, n. 4, p. 746–751, 2000. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm000070y>. Acesso em: 17 jan. 2021.

HILLBERG, A. L.; HOLMES, C. A.; TABRIZIAN, M. Effect of genipin cross-linking on the cellular adhesion properties of layer-by-layer assembled polyelectrolyte films. **Biomaterials**, Oxford, v. 30, n. 27, p. 4463–4470, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961209005316>. Acesso em: 15 maio 2022.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, New York, v. 26, n. 1, p. 87–94, 1991a. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/bf00299352>. Acesso em: 11 jan. 2021.

- HUANG, J.; CHENG, Z. H.; XIE, H. H.; GONG, J. Y.; LOU, J.; GE, Q.; WANG, Y. J.; WU, Y. F.; LIU, S. W.; SUN, P. L.; MAO, J. W. Effect of quaternization degree on physiochemical and biological activities of chitosan from squid pens. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 70, p. 545–550, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813014004899>. Acesso em: 12 jan. 2021.
- HUGGINS, M. L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 64, n. 11, p. 2716–2718, 1942. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja01263a056>. Acesso em: 12 jan. 2021.
- KASAAI, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 68, n. 3, p. 477–488, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861706005728>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 3–11, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19800377/>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- KIM, S. H.; HA, H. J.; KO, Y. K.; YOON, S. J.; RHEE, J. M.; KIM, M. S.; LEE, H. B.; KHANG, G. Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 609–622, 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856207780852514>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- LAVALL, R.; ASSIS, O.; CAMPANA FILHO, S. P. β -chitin from the pens of *Loligo sp.*: extraction and characterization. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 98, n. 13, p. 2465–2472, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852406004561>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- LEWIS, J. A. Direct ink writing of 3D functional materials. **Advanced Functional Materials**, Weinheim, v. 16, n. 17, p. 2193–2204, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adfm.200600434>. Acesso em: 20 maio 2023.
- LIM, K. S.; GALARRAGA, J. H.; CUI, X.; LINDBERG, G. C. J.; BURDICK, J. A.; WOODFIELD, T. B. F. Fundamentals and applications of photo-cross-linking in bioprinting. **Chemical Reviews**, Washington, v. 120, n. 19, p. 10662–10694, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32302091/>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- LIU, H.; DU, Y.; WANG, X.; SUN, L. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 95, n. 2, p. 147–155, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15282127/>. Acesso em: 21 jul. 2023.

LIU, W.; LIU, K.; ZHU, L.; LI, W.; LIU, K.; WEN, W.; LIU, M.; LI, H.; ZHOU, C.; LUO, B. Liquid crystalline and rheological properties of chitin whiskers with different chemical structures and chargeability. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 157, p. 24–35, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813020330233/>. Acesso em: 18 out. 2022.

LONG, J.; ETXEBERRIA, A. E.; NAND, A. V.; BUNT, C. R.; RAY, S.; SEYFODDIN, A. A 3D printed chitosan-pectin hydrogel wound dressing for lidocaine hydrochloride delivery. **Materials Science and Engineering C - materials for biological applications**, Amsterdam, v. 104, p. 109873, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092849311930788X>. Acesso em: 17 mar. 2023.

LU, J.; FAN, X.; HU, J.; LI, J.; RONG, J.; WANG, W.; CHEN, Y.; LIU, W.; CHEN, J.; CHEN, Y. Construction and function of robust and moist bilayer chitosan-based hydrogel wound dressing. **Materials & Design**, Oxford, v. 226, p. 111604, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264127523000199>. Acesso em: 20 jul. 2023.

LUO, X.; LIU, Y.; PANG, J.; BI, S.; ZHOU, Z.; LU, Z.; FENG, C.; CHEN, X.; KONG, M. Thermo/photo dual-crosslinking chitosan-gelatin methacrylate hydrogel with controlled shrinking property for contraction fabrication. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 236, p. 116067, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861720302411>. Acesso em: 20 jul. 2023.

PRABHAKAR, M. M.; SARAVANAN, A. K.; LENIN, A. H.; LENO, I. J.; MAYANDI, K.; RAMALINGAM, P. S. A short review on 3D printing methods, process parameters and materials. **Materials Today: proceedings**, Oxford, v. 45, p. 6108–6114, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214785320378317>. Acesso em: 12 jul. 2023.

MEKHAIL, M.; JAHAN, K.; TABRIZIAN, M. Genipin-crosslinked chitosan/poly-L-lysine gels promote fibroblast adhesion and proliferation. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 108, p. 91–98, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24751251/>. Acesso em: 19 maio 2023.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; PENG, C. K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science Part A: polymer chemistry**, Hoboken, v. 43, n. 10, p. 1985–2000, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pola.20669>. Acesso em: 19 maio 2023.

MIGUEL, S. P.; CABRAL, C. S. D.; MOREIRA, A. F.; CORREIA, I. J. Production and characterization of a novel asymmetric 3D printed construct aimed for skin tissue regeneration. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Hoboken, v. 181, p. 994–1003, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776519304680>. Acesso em: 20 maio 2022.

MIGUEL, S. P.; MOREIRA, A. F.; CORREIA, I. J. Chitosan based-asymmetric membranes for wound healing: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 127, p. 460–475, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813018366492>. Acesso em: 17 out. 2021.

MUZZARELLI, R. A. A.; TARSI, R.; FILIPPINI, O.; GIOVANETTI, E.; BIAGINI, G.; VARALDO, P. E. Antimicrobial properties of *N*-carboxybutyl chitosan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 34, n. 10, p. 2019–2023, 1990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2291669/>. Acesso em: 20 out. 2022.

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861709000526>. Acesso em: 18 mar. 2023.

MUZZARELLI, R. A. A.; EL MEHTEDI, M.; BOTTEGONI, C.; AQUILI, A.; GIGANTE, A. Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. **Marine Drugs**, Basel, v. 13, n. 12, p. 7314–7338, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26690453/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

NAN, B.; GOŁĘBIEWSKI, P.; BUCZYŃSKI, R.; GALINDO-ROSALES, F. J.; FERREIRA, J. M. F. Direct ink writing glass: a preliminary step for optical application. **Materials**, Basel, v. 13, n. 7, p. 1636, 2020a. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/13/7/1636>. Acesso em: 22 mar. 2023.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. CLSI/NCCLS document M2-A8. Wayne: NCCLS, 2003. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo5.pdf. Acesso em: 18 out. 2022.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. CLSI/NCCLS document M100-S15. Wayne: NCCLS, 2005. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo4.pdf. Acesso em: 18 out. 2022.

NG, K. W.; LAU, W. M. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. *In*: DRAGICEVIC, N.; MAIBACH, H. I. (ed.). **Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement**. Berlin: Springer, 2015. p. 3–11. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-45013-0_1. Acesso em: 20 jul. 2023.

NGUYEN, T. N. H.; NOLAN, J. K.; PARK, H.; LAM, S.; FATTAH, M.; PAGE, J. C.; JOE, H. E.; JUN, M. B. G.; LEE, H.; KIM, S. J.; SHI, R.; LEE, H. Facile fabrication of flexible glutamate biosensor using direct writing of platinum nanoparticle-based nanocomposite ink. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 131, p. 257–266, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566319300806>. Acesso em: 22 jul. 2023.

NIYONSABA, F.; OGAWA, H. Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents β -defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. **Journal of Dermatological Science**, Shannon, v. 40, n. 3, p. 157–168, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16150577/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

PAGNANO, L. O.; BARALDI-ARTONI, S. M.; PACHECO, M. R.; DOS SANTOS, E.; OLIVEIRA, D.; LUI, J. F. Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1662–1666, 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cr/a/kTGpC6QFGn6bWjhR6x8QdSq>. Acesso em: 20 jul. 2023.

PEARSON, F. G.; MARCHESSAULT, R. H.; LIANG, C. Y. Infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. Chitin. **Journal of Polymer Science**, Hoboken, v. 43, n. 141, p. 101–116, 1960. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pol.1960.1204314109>. Acesso em: 13 jan. 2021.

PEREIRA, G. G.; GUTERRES, S. S.; BALDUCCI, A. G.; COLOMBO, P.; SONVICO, F. Polymeric films loaded with vitamin E and aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds. **BioMed Research International**, London, v. 2014, p. 1–9, 2014. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24524083/>. Acesso em: 20 maio 2022.

POWER, G.; MOORE, Z.; O'CONNOR, T. Measurement of pH, exudate composition and temperature in wound healing: a systematic review. **Journal of Wound Care**, London, v. 26, n. 7, p. 381–397, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28704150/>. Acesso em: 20 maio 2022.

RAMLI, H.; ZAINAL, N. F. A.; HESS, M.; CHAN, C. H. Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. **Chemistry Teacher International**, Groningen, v. 4, n. 4, p. 307–326, 2022. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cti-2022-0010>. Acesso em: 20 mar. 2023.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 80–86, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91788/>. Acesso em: 22 jul. 2023.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P. L. Characterization of chitosan: influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 281–285, 1993. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/014181309390027J>. Acesso em: 20 maio 2022.

RUIHUA, H.; BINGCHAO, Y.; ZHENG, D.; WANG, B. Preparation and characterization of a quaternized chitosan. **Journal of Materials Science**, New York, v. 47, n. 2, p. 845–851, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-011-5862-4>. Acesso em: 13 jan. 2021.

SAADI, M. A. S. R.; MAGUIRE, A.; POTTACKAL, N. T.; THAKUR, M. S. H.; IKRAM, M. M.; HART, A. J.; AJAYAN, P. M.; RAHMAN, M. M. Direct ink writing: a 3D printing technology for diverse materials. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 34, n. 28, p. 2108855, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adma.202108855>. Acesso em: 20 fev. 2023.

SAJOMSANG, W.; TANTAYANON, S.; TANGPASUTHADOL, V.; DALY, W. H. Quaternization of *N*-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization, and antibacterial activity. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 344, n. 18, p. 2502–2511, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S000862150900425X>. Acesso em: 22 maio 2022.

SANTOS, D. M. **Materiais não tecidos à base de poli(ϵ -caprolactona)/cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana**: desenvolvimento por eletrofiação, caracterização físico-química e avaliação citotóxica *in vitro*. Orientador: Sergio Paulo Campana Filho. 2018. 120 f. Tese (Doutorado em Físico-Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-08052018-101745/pt-br.php>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SANTOS, D. M.; BUKZEM, A. L.; CAMPANA FILHO, S. P. Response surface methodology applied to the study of the microwave-assisted synthesis of quaternized chitosan. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 138, p. 317–326, 2016a. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861715011467>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SANTOS, D. M.; LEITE, I. S.; BUKZEM, A. L.; DE OLIVEIRA SANTOS, R. P.; FROLLINI, E.; INADA, N. M.; CAMPANA FILHO, S. P. Nanostructured electrospun nonwovens of poly(ϵ -caprolactone)/quaternized chitosan for potential biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 186, p. 110–121, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718300638>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SCHLÜTER, H.; UPJOHN, E.; VARIGOS, G.; KAUR, P. Burns and skin ulcers. *In*: LANZA, R.; ATALA, A. (ed.). **Essentials of stem cell biology**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 501–513. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124095038000342>. Acesso em: 20 jul. 2023.

SENRA, T. D. A.; DOS SANTOS, D. M.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA FILHO, S. P. Extensive *N*-methylation of chitosan: evaluating the effects of the reaction conditions by using response surface methodology. **Polymer International**, Hoboken, v. 64, n. 11, p. 1617–1626, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pi.4962>. Acesso em: 10 jan. 2023.

SHAMSHINA, J. L.; ABIDI, N. Isolation of chitin nano-whiskers directly from crustacean biomass waste in a single step with acidic ionic liquids. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, Washington, v. 10, n. 36, p. 11846–11855, 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.2c02461>. Acesso em: 20 jul. 2023.

SIM, P.; STRUDWICK, X. L.; SONG, Y. M.; COWIN, A. J.; GARG, S. Influence of acidic pH on wound healing in vivo: a novel perspective for wound treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 23, n. 21, p. 13655, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36362441/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

SONG, H.; WU, H.; LI, S.; TIAN, H.; LI, Y. R.; WANG, J. G. Homogeneous synthesis of cationic chitosan via new avenue. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 8, p. 1921, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30071648/>. Acesso em: 20 maio 2022.

STANCIUC, A. M.; SPRECHER, C. M.; ADRIEN, J.; ROIBAN, L. I.; ALINI, M.; GREMILLARD, L.; PEROGLIO, M. Robocast zirconia-toughened alumina scaffolds: processing, structural characterisation and interaction with human primary osteoblasts. **Journal of the European Ceramic Society**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 845–853, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955221917305708>. Acesso em: 17 jul. 2023.

TAGLIAFERRI, S.; PANAGIOTOPOULOS, A.; MATTEVI, C. Direct ink writing of energy materials. **Materials Advances**, Cambridge, v. 2, n. 2, p. 540–563, 2021a. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/ma/d0ma00753f>. Acesso em: 22 maio 2022.

TALLIAN, C.; TEGL, G.; QUADLBAUER, L.; VIELNASCHER, R.; WEINBERGER, S.; CREMERS, R.; PELLIS, A.; SALARI, J. W. O.; GUEBITZ, G. M. Lysozyme-responsive spray-dried chitosan particles for early detection of wound infection. **ACS Applied Bio Materials**, Washington, v. 2, n. 3, p. 1331–1339, 2019. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsabm.9b00023>. Acesso em: 25 jul. 2023.

TAN, H.; MA, R.; LIN, C.; LIU, Z.; TANG, T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 1, p. 1854–1869, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23325051/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

TERBOJEVICH, M.; CARRARO, C.; COSANI, A.; MARSANO, E. Solution studies of the chitin-lithium chloride-*N,N*-di-methylacetamide system. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 180, n. 1, p. 73–86, 1988. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/000862158880065X>. Acesso em: 12 jan. 2021.

UCHIDA, D. T.; BRUSCHI, M. L. 3D printing as a technological strategy for the personalized treatment of wound healing. **AAPS PharmSciTech**, New York, v. 24, n. 1, p. 41, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36698047/>. Acesso em: 25 jul. 2023.

VERHEUL, R. J.; AMIDI, M.; VAN STEENBERGEN, M. J.; VAN RIET, E.; JISKOOT, W.; HENNINK, W. E. Influence of the degree of acetylation on the enzymatic degradation and in vitro biological properties of trimethylated chitosans. **Biomaterials**, Oxford, v. 30, n. 18, p. 3129–3135, 2009a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19339046/>. Acesso em: 25 maio 2022.

VISAKH, P. M.; THOMAS, S. Preparation of bionanomaterials and their polymer nanocomposites from waste and biomass. **Waste and Biomass Valorization**, Dordrecht, v. 1, n. 1, p. 121–134, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-010-9009-7>. Acesso em: 15 jan. 2021.

VO, N. T. N.; HUANG, L.; LEMOS, H.; MELLOR, A. L.; NOVAKOVIC, K. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels: preliminary evaluation of the in vitro biocompatibility and biodegradation. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 138, n. 34, p. 50848, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/app.50848>. Acesso em: 26 jul. 2023.

WANG, W.; MENG, Q.; LI, Q.; LIU, J.; ZHOU, M.; JIN, Z.; ZHAO, K. Chitosan derivatives and their application in biomedicine. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 2, p. 487, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7014278/>. Acesso em: 21 maio 2022.

WONGWANAKUL, R.; JIANMONGKOL, S.; GONIL, P.; SAJOMSANG, W.; MANIRATANACHOTE, R.; AUEVIRIYAVIT, S. Biocompatibility study of quaternized chitosan on the proliferation and differentiation of Caco-2 cells as an in vitro model of the intestinal barrier. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, London, v. 32, n. 1, p. 92–107, 2017. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0883911516658780>. Acesso em: 26 jul. 2023.

XIAO, B.; WAN, Y.; WANG, X.; ZHA, Q.; LIU, H.; QIU, Z.; ZHANG, S. Synthesis and characterization of *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride for potential application in gene delivery. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, Hoboken, v. 91, p. 168–174, 2012a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22104403/>. Acesso em: 15 jan. 2021.

XU, H.; CASILLAS, J.; KRISHNAMOORTHY, S.; XU, C. Effects of irgacure 2959 and lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate on cell viability, physical properties, and microstructure in 3D bioprinting of vascular-like constructs. **Biomedical Materials**, Bristol, v. 15, n. 5, p. 055021, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32438356/>. Acesso em: 26 jul. 2023.

YEVLAMPIEVA, N. P.; GUBAREV, A. S.; GORSHKOVA, M. Y.; OKRUGIN, B. M.; RYUMTSEV, E. I. Hydrodynamic behavior of quaternized chitosan at acidic and neutral pH. **Journal of Polymer Research**, Dordrecht, v. 22, n. 9, p. 166, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10965-015-0802-7>. Acesso em: 12 abr. 2022.

ZENG, J. B.; HE, Y. S.; LI, S. L.; WANG, Y. Z. Chitin whiskers: an overview. **Biomacromolecules**, Washington, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2012. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bm201564a>. Acesso em: 15 jan. 2021.

ZHANG, C.; ZHUANG, X.; LI, X.; WANG, W.; CHENG, B.; KANG, W.; CAI, Z.; LI, M. Chitin nanowhisiker-supported sulfonated poly(ether sulfone) proton exchange for fuel cell applications. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 140, p. 195–201, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861715012072>. Acesso em: 22 abr. 2022.

ZHOU, G.; LI, M. C.; LIU, C.; WU, Q.; MEI, C. 3D printed $Ti_3C_2T_x$ MXene/cellulose nanofiber architectures for solid-state supercapacitors: ink rheology, 3D printability, and electrochemical performance. **Advanced Functional Materials**, Weinheim, v. 32, n. 14, p. 2109593, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/adfm.202109593>. Acesso em: 26 jul. 2023.