

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

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL POLIMÉRICO PARA IMPRESSÃO 3D: uma
alternativa tópica para o manejo da criptococose cutânea**

MANOELA ALMEIDA MARTINS MACE

Porto Alegre, 2024

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

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL POLIMÉRICO PARA IMPRESSÃO 3D: uma
alternativa tópica para o manejo da criptococose cutânea**

Dissertação apresentada por Manoela
Almeida Martins Mace para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria
Co-Orientadora: Profa. Dr. Rosane Michele Duarte Soares

Porto Alegre, 2024

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 06 de março de 2024 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Walter Orlando Beys da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Irene Clemes Kulkamp Guerreiro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pra. Dra. Leliz Ticoná Arenas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Mace, Manoela Almeida Martins
DESENVOLVIMENTO DE HIDROGEL POLIMÉRICO PARA
IMPRESSÃO 3D: uma alternativa tópica para o manejo da
criptococose cutânea / Manoela Almeida Martins Mace.
-- 2024.
175 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientadora: Rosane Michele Duarte Soares.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2024.

1. biomaterial. 2. impressão 3D. 3. polímeros
naturais. 4. atividade antifúngica. I. Fuentefria,
Alexandre Meneghello, orient. II. Soares, Rosane
Michele Duarte, coorient. III. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada do Anexo II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no Laboratório de Biomateriais Poliméricos no Instituto de Química da UFRGS e no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, na cidade de Porto Alegre. Todos os experimentos foram financiados pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Dedico este trabalho ao meu irmão Pedro, por me mostrar que amor, coragem, perseverança e dedicação geram frutos em todos os âmbitos da vida.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo e pelo incentivo à pesquisa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, minha segunda casa, pela estrutura e recursos oferecidos.

Ao meu orientador, Professor Alexandre, pelos anos de parceria e ensinamentos. Sou eternamente grata pela confiança que destes a mim.

À minha coorientadora, Professora Rosane, pelos aprendizados e amizade que criamos. Por me receber com tanto carinho em seu grupo de pesquisa.

À Professora Dinara Jaqueline Moura, pela parceria e oportunidade de aprender na prática sobre ensaios de citotoxicidade.

Às alunas de Biomedicina da UFCSPA, Victória Rapack Jacinto Silva e Ana Carolina Pinheiro, pelos ensinamentos de cultivo celular, risadas, experimentos e cafés compartilhados.

À minha família, pelo incansável incentivo à minha maior aspiração. Por acreditar no meu potencial e me acolher em todos momentos.

Ao Gabriel, meu companheiro, meu maior incentivador desta jornada. Pelo carinho e compreensão nos dias difíceis. Por dividir comigo as vitórias de cada conquista.

Aos colegas do LPMA, pela parceria, amizades e momentos de descontração na rotina laboratorial.

Aos colegas do Poli-Bio e LAFOS, Camila, Laiane, Joice, Avener, Cláudio, Duda, e Bibiana, por me acolherem e apresentarem o mundo dos polímeros. Por me apresentarem tantas técnicas, equipamentos e setores do campus do Vale. Pelas amizades estabelecidas, cafés e lanches compartilhados.

Aos colegas do PPGCF, Alex, Corina e Ágata, pela ajuda na escrita deste trabalho. Pela amizade, cafés e almoços compartilhados.

Aos amigos farmacêuticos Carol, Tarik, Joanne, Kelin e Lethicia, por tornarem a jornada mais divertida.

Ao meu amigo de infância, Lucas, por acompanhar esta longa jornada acadêmica e compreender meus momentos de ausência sempre estando presente.

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica de difícil tratamento que ameaça a vida de indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes ao redor do mundo. Com diferentes apresentações clínicas, a manifestação cutânea da criptococose depende exclusivamente do esquema terapêutico já em prática, ou seja, sem uma abordagem tópica. Este estudo desenvolveu um hidrogel polimérico impresso tridimensionalmente (3D) para proporcionar uma alternativa econômica, ecológica e eficaz para o tratamento tópico da criptococose. Desde sua invenção na década de 1980, a impressão 3D tem sido amplamente investigada para aplicações em biomateriais personalizáveis e variadas formas farmacêuticas, incluindo aplicações em infecções microbianas. Nessa perspectiva, a compreensão de quais aplicações em saúde podem ser exploradas e quais materiais têm o potencial de incorporar substâncias ativas é extremamente importante, revelando quais áreas precisam de mais investigação. Portanto, foi realizada uma revisão sistemática para responder às possíveis aplicações, materiais e técnicas de impressão 3D, bem como quais doenças ainda precisam de atenção. A revisão sistemática revelou que regeneração de tecidos, ortopedia e revestimento de próteses foram as aplicações mais difundidas para materiais antimicrobianos impressos 3D. Os polímeros termoplásticos e naturais são os materiais mais empregados. A vancomicina foi a substância antimicrobiana mais incorporada. Nesse aspecto, as infecções bacterianas foram as mais investigadas, negligenciando as infecções virais e fúngicas. O hidrogel antifúngico desenvolvido apresentou boa capacidade de impressão e comportamento reológico. As propriedades espectroscópicas, térmicas e de inchamento confirmaram o efeito de reticulação e indicaram o potencial de aplicação em sistemas de liberação modificada. Além disso, foi observada uma atividade antifúngica *in vitro* notável contra cepas de *Cryptococcus neoformans*, formando uma zona de inibição significativa. O hidrogel apresentou viabilidade superior a 70% para todos os sistemas poliméricos fabricados. Nossos resultados indicam que o biomaterial impresso 3D desenvolvido tem potencial para futuras investigações *in vivo* e aplicação em testes clínicos.

Palavras-chave: biomaterial; impressão 3D; polímeros naturais; atividade antifúngica

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF POLYMERIC HYDROGEL BY 3D PRINTING: a topical alternative for the management of cutaneous cryptococcosis

Cryptococcosis is a worldwide fungal infection that threatens the lives of immunocompromised and immunocompetent individuals. With different clinical presentations, the cutaneous manifestation of cryptococcosis relies solely on the therapeutic regimen already in practice, i.e., without a topical approach. This study developed a 3D-printed polymeric hydrogel to create an affordable, eco-friendly, and effective alternative for the topical management of cryptococcosis. Since its invention in the 1980s, 3D printing has been widely investigated for applications in personalizable biomaterials and various pharmaceutical forms, including microbial infection applications. In this perspective, the understanding of which healthcare applications can be explored for 3D-printed biomaterials and which materials have the potential to incorporate active substances is extremely important, revealing which areas need further investigation. Therefore, a systematic review was carried out to answer the possible applications, materials, and techniques of 3D printing and which diseases still need attention in this area. The systematic review revealed that applications in tissue regeneration, orthopedics, and prosthesis coating were the most widespread applications for antimicrobial 3D-printed materials. Thermoplastic and natural polymers are the most widely used materials. Vancomycin was the most incorporated antimicrobial substance. In this respect, bacterial infections have been the most investigated, neglecting viral and fungal infections. The developed hydrogel showed good printability and rheological performance. Spectroscopic, thermal, and swelling properties confirmed the crosslinking effect and indicated the potential for application in modified-release systems. In addition, remarkable *in vitro* antifungal activity was observed against *Cryptococcus neoformans* strains, forming a significant inhibition zone. The hydrogel showed viability surpassing 70% for all fabricated polymeric systems. Our results indicate that the developed 3D-printed biomaterial has the potential for future *in vivo* investigations and application in clinical trials.

Keyword: biomaterial; 3D printing; natural polymers; antifungal activity

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO, FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

- Figura 1.** Exame direto de líquido cefalorraquidiano com tinta da China demonstrando presença de células de *Cryptococcus neoformans*.....30
- Figura 2.** Colônias de *Cryptococcus* spp. em ágar níger.....31
- Figura 3.** Apresentação da *criptococose* cutânea.....34
- Figura 4.** Representação esquemática das etapas de obtenção do hidrogel 3D ...144

ARTIGO CIENTÍFICO – *Three-dimensional printing of medical devices and biomaterials with antimicrobial activity: A systematic review*

- Figure I - 1.** PRISMA flow diagram of search strategy used in the present review ..50
- Figure I - 2.** Primary 3D printing methodologies, materials, and antimicrobial substances used to obtain 3D-printed biomaterials and main microorganisms evaluated in the antimicrobial tests against printed biomaterials.....56

ARTIGO CIENTÍFICO – *3D printed ketoconazole hydrogel patch as a wound dressing material for cutaneous cryptococcosis*

- Figure II - 1.** Rheological properties of chitosan alginate hydrogels. **(A)** Flow curves of CSa inks as function of shear rate. **(B)** Amplitude sweep demonstrating LVR and crossover point for both hydrogels. **(C)** Frequency sweep demonstrating a gel behavior 115
- Figure II - 2.** Schematic illustration of the microstructure of the hydrogels during extrusion, rest and recover condition..... 116
- Figure II - 3.** ATR-FTIR spectra of chitosan, sodium alginate, ketoconazole and formulated hydrogels..... 118

Figure II - 4. Thermogravimetric analyzes of CSa hydrogels and their components	120
Figure II - 5. Swelling behavior of pure CSa hydrogels. (A) Effect of different crosslinking ratios in the swelling performance. (B) Schematic illustration of alginate, chitosan, and calcium forming a physical double-network known as egg-box model	122
Figure II - 6. Swelling behavior of drug-containing CSa hydrogels. (A) Effect of different crosslinking ratios and ketoconazole in the swelling performance. (B) Schematic illustration of alginate, chitosan, and calcium egg-box model permeated with complexes.....	122
Figure II - 7. Effect of different crosslinking ratios on the microstructure and pores of pure CSa hydrogels.....	123
Figure II - 8. Effect of ketoconazole and different crosslinking ratios on the microstructure and pores of drug-containing CSa hydrogels.....	124
Figure II - 9. Evaluation of antifungal activity of the formulated hydrogels against <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> B3501 and their respective inhibition zones	125
Figure II - 10. Evaluation of antifungal activity of the formulated hydrogels against <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> H99 and their respective inhibition zones	126
Figure II - 11. V79 cell viability after treatment with CSa hydrogels.....	128

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO – *Three-dimensional printing of medical devices and biomaterials with antimicrobial activity: A systematic review*

Table 1. Database search strategies and their respective search results	49
Table 2. Number of studies for 3DP categories and primary materials used	53
Table 3. Number of studies for each 3D-printed material and their main applications	57
Table 4. Numbers of studies found for each commercial antimicrobial	61
Table 5. Number of studies found for each natural product	62
Table 6. Number of studies found for different metallic compounds	64
Table 7. Number of studies found for other antimicrobial substances.....	64
Table 8. Number of studies found for each pathogen and their respective tests	67

ARTIGO CIENTÍFICO – *3D printed ketoconazole hydrogel patch as a wound dressing material for cutaneous cryptococcosis*

Table 1. Cell viability of formulated hydrogels.....	129
---	-----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. OBJETIVOS	23
1.1.1. Objetivo Geral	23
1.1.2. Objetivos específicos	23
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1. CRIPTOCOCOSE	26
2.1.1. Criptococose cutânea	33
2.2. IMPRESSÃO 3D E PRODUTOS FARMACÊUTICOS INOVADORES	35
2.3. HIDROGÉIS – UMA ABORDAGEM FARMACÊUTICA	37
ARTIGO CIENTÍFICO	42
3. ARTIGO CIENTÍFICO – Three-dimensional printing of medical devices and biomaterials with antimicrobial activity: A systematic review	44
ARTIGO CIENTÍFICO	104
4. ARTIGO CIENTÍFICO – 3D printed ketoconazole hydrogel patch as a wound dressing material for cutaneous cryptococcosis	106
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	138
5. DISCUSSÃO	140
6. CONCLUSÃO	150
REFERÊNCIAS	152

INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO

A criptococose é uma infecção fúngica oportunista fatal que provoca cerca de 180 mil mortes anualmente (RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos, como pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), estima-se que 1 milhão de novos casos ocorram todos os anos. Entretanto, indivíduos imunocompetentes também podem ser infectados por esta levedura (SABIITI; MAY, 2012). *Cryptococcus* spp. engloba mais de 30 espécies. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* se destacam no cenário clínico (GUPTA; PAUL; KAUR, 2020). As manifestações comuns da criptococose incluem o acometimento cerebral e pulmonar. No entanto, o agente etiológico desta infecção fúngica também pode afetar outros tecidos, como a pele – gerando extensas lesões e cicatrizes (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

No Brasil, o regime terapêutico da criptococose inclui quatro medicamentos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e flucitosina. Para a criptococose cutânea, os mesmos medicamentos são utilizados no manejo, sem uma abordagem tópica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). Em alguns casos, a administração oral de solução de itraconazol também é realizada para obtenção de maiores concentrações séricas (NOGUCHI *et al.*, 2019). Entretanto, a baixa biodisponibilidade oral do fármaco (BAE *et al.*, 2011) pode prejudicar o tratamento tópico e ocasionar recidivas (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021), sugerindo a necessidade de alternativas terapêuticas. Dessa forma, a investigação de formas farmacêuticas que proporcionem maior biodisponibilidade e tempo de retenção do fármaco sobre a pele se faz extremamente necessária.

A impressão tridimensional (3D), descoberta e patenteada por Charles Hull em 1986 (HULL, 1986), vem sendo nos últimos anos extensivamente pesquisada no âmbito farmacêutico – desde cultivos celulares 3D a formas farmacêuticas impressas (LI, Jinhua *et al.*, 2020). Além do caráter de inovação, a impressão 3D confere a personalização de produtos farmacêuticos – como comprimidos e hidrogéis curativos. A utilização de hidrogéis poliméricos 3D na veiculação de fármacos possibilita a personalização de cada produto de acordo com as necessidades do paciente, proporcionando ajuste de dose, direcionamento terapêutico e melhores desfechos (JAMRÓZ *et al.*, 2018; LI, Nan *et al.*, 2023). Ademais, os hidrogéis possuem notável capacidade de retenção de água, mimetizando tecidos biológicos e mantendo um

ambiente fisiológico adequado para a recuperação do tecido afetado (AGRAWAL; HUSSAIN, 2023). Dessa forma, é possível desenvolver novas terapias para infecções microbianas, por exemplo, visando tratamentos mais sustentáveis e direcionados para as demandas de cada paciente. De maneira positiva, uma extensa produção científica a respeito do desenvolvimento e caracterização de biomateriais e dispositivos médicos com atividade antimicrobiana vêm sendo observada. Entretanto, a escassez de trabalhos que organizem a notável quantidade de informações pode estabelecer um desafio no desenvolvimento de novos biomateriais.

Tendo em vista a necessidade de compreender os biomateriais impressos 3D com atividade antimicrobiana disponíveis em literatura, potenciais aplicações em saúde e as lacunas que ainda precisam ser preenchidas no desenvolvimento de dispositivos 3D funcionalizados, realizou-se uma revisão sistemática de literatura. Ademais, visando o desenvolvimento de terapias mais eficientes e de custo acessível para o Sistema Único de Saúde (SUS), foi desenvolvido um hidrogel a partir de polímeros naturais, imprimível tridimensionalmente e aditivado com antifúngico comercial. Dessa forma, o presente trabalho apresenta uma revisão sistemática de literatura e o desenvolvimento de um biomaterial 3D para o manejo tópico personalizável da criptococose cutânea em consonância com o regime terapêutico atual.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Realizar uma revisão sistemática acerca da impressão 3D de biomateriais com atividade antimicrobiana para dar suporte ao preparo e a caracterização de hidrogéis formados a partir de polímeros naturais e de um agente de reticulação inorgânico para a impressão tridimensional (3D) de curativos personalizáveis visando o manejo tópico da criptococose cutânea.

1.1.2. Objetivos específicos

- a) Identificar as metodologias e materiais empregados na impressão 3D de dispositivos e biomateriais;
- b) Analisar as possíveis aplicações em saúde dos materiais impressos com atividade antimicrobiana;

- c) Realizar a montagem de tabelas organizando os principais pontos acerca da impressão 3D de biomateriais com atividade antimicrobiana.
- d) Propor uma metodologia de preparo de hidrogel a partir de polímeros naturais, e de reticulação utilizando um sal inorgânico;
- e) Estudar as propriedades viscoelásticas do hidrogel não reticulado e a influência da adição do antifúngico comercial através de experimentos reológicos;
- f) Determinar as configurações de impressão para a etapa de impressão 3D do hidrogel;
- g) Avaliar o efeito da presença do antifúngico e de diferentes concentrações de reticulante na performance de inchamento do hidrogel através de ensaio de intumescimento;
- h) Caracterizar propriedades térmicas e espectroscópicas do hidrogel e avaliar o efeito do antifúngico e de diferentes concentrações de reticulante;
- i) Investigar a atividade antifúngica do hidrogel em função da presença do antifúngico e de diferentes concentrações de reticulante frente a cepas patogênicas de *Cryptococcus neoformans* através de ensaio de halo de inibição;
- j) Determinar a citotoxicidade do hidrogel pelo método de exclusão do azul de tripano e avaliar o efeito do antifúngico e diferentes concentrações de reticulante através de análises estatísticas;
- k) Avaliar o efeito da reticulação e da adição do fármaco na estrutura interna do hidrogel através de microscopia eletrônica de varredura.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CRIPTOCOCOSE

A levedura *Cryptococcus* spp. é um microrganismo ubíquo amplamente encontrado em matéria orgânica – como madeira em decomposição, excretas de aves e solo (MONTROYA; MAGWENE; PERFECT, 2021). Entretanto, esta levedura saprófita é capaz de infectar o ser humano e provocar cerca de 180 mil mortes anualmente. Ocasionalmente cerca de 1 milhão de casos por ano (SABIITI; MAY, 2012) e sendo responsável por 15% dos óbitos anuais relacionados a AIDS (RAJASINGHAM *et al.*, 2017), a criptococose é uma infecção fúngica de preocupação mundial.

Entre as espécies deste gênero, destacam-se *Cryptococcus neoformans* (sorotipos A e D) – levedura que acomete principalmente imunocomprometidos, e *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C) – espécie capaz de infectar imunocompetentes. Enquanto *C. neoformans* apresenta distribuição mundial, *C. gattii* demonstrou por muitos anos ser uma levedura restrita a regiões de clima tropical e subtropical (MAY *et al.*, 2016; RATHORE *et al.*, 2022). Entretanto, evidências mostram que este fungo está se disseminando, uma vez que já foi identificado em reservatórios ambientais no norte dos Estados Unidos, Canadá e norte da Europa (CHEN, Sharon C.A.; MEYER; SORRELL, 2014; MAY *et al.*, 2016). Mais além, *C. gattii* é frequentemente isolado de eucaliptos (CHEN, Sharon C.A.; MEYER; SORRELL, 2014). Porém, acredita-se que este não seja um reservatório ambiental exclusivo, uma vez que existem relatos de indivíduos infectados com *C. gattii* sem histórico de viagem e que vivem em área sem eucaliptos (HARRIS; LOCKHART; CHILLER, 2012).

A transmissão desta doença ocorre através da inalação de esporos e/ou leveduras dissecadas. Com o auxílio do movimento mucociliar do trato respiratório, o fungo inicia seu processo de colonização nos alvéolos pulmonares. Uma vez iniciada a resposta imunológica de um hospedeiro imunocompetente, fagócitos combatem a infecção e levam a formação de granulomas. Porém, algumas leveduras podem permanecer latentes por longos períodos, até a alteração do sistema imunológico do indivíduo. Em hospedeiros imunocomprometidos, os fagócitos atuam em um mecanismo denominado “cavalo de Troia”, onde leveduras fagocitadas são transportadas na corrente sanguínea a outras partes do corpo, podendo provocar uma infecção disseminada (CHARLIER *et al.*, 2009; SABIITI; MAY, 2012).

O estado de imunossupressão em um indivíduo constitui um alto risco para o estabelecimento bem sucedido de infecções, bem como o avanço destas. Em indivíduos infectados por *Cryptococcus* spp., o quadro de imunossupressão é geralmente ocasionado pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Porém, em países onde o HIV é menos prevalente, outros causadores se destacam. Transplante de órgãos, sarcoidose, terapia corticosteroide, cirrose, imunodeficiência de células T, linfocitopenia CD4 idiopática, síndrome de Hiper IgE e outros distúrbios imunológicos são fatores associados ao hospedeiro que aumentam o risco de infecção a *Cryptococcus* spp.. Terapias imunossupressoras também aumentam o risco à criptococose (TEMFACK *et al.*, 2019).

Mais além, fatores de virulência são expressos por estas leveduras e contribuem no processo de estabelecimento da infecção, bem como seu avanço. Os fatores de virulência possibilitam a penetração de barreiras do hospedeiro, o escape imunológico e o rompimento celular. *Cryptococcus* spp. é uma levedura produtora de cápsula, complexo polissacarídico composto de glucuronoxilomanana e galactoxilomanana que protege a levedura da ação de produtos de estresse oxidativo gerados pela resposta imunológica (SABIITI; MAY, 2012). Embora a cápsula polissacarídica seja um dos artifícios utilizados no diagnóstico da criptococose, ela estabelece um papel crítico na virulência, sendo responsável por 25% da virulência total expressa pelo agente fúngico. A cápsula também apresenta atividade antifagocítica, exigindo opsonização por anticorpos e fragmentos do complemento para que ocorra o processo de fagocitose. Ademais, os polissacarídeos componentes desta estrutura fúngica são pouco imunogênicos e apresentam propriedades imunomoduladoras capazes de prejudicar funções imunológicas do hospedeiro (CASADEVALL *et al.*, 2019). Epítopos que se ligam a receptores de macrófagos são, em sua grande maioria, componentes da parede celular – protegida pela cápsula (ZARAGOZA, 2019). Dessa forma, a cápsula polissacarídica de *Cryptococcus* spp. é uma importante ferramenta de escape do sistema imune e auxilia no processo de instauração da infecção.

A melanina é outro importante fator na virulência de *Cryptococcus* spp. e auxilia na diferenciação de outros isolados não patogênicos. Esta substância negativamente carregada possui elevado peso molecular e exhibe caráter hidrofóbico (YANG *et al.*, 2022). Através da expressão de lacase, ocorre a conversão de compostos difenólicos

– substâncias extensamente presentes no tecido cerebral, em um pigmento marrom, a melanina. Além da proteção a exposição ambiental, como luz ultravioleta e estresse mecânico, a melanina confere resistência a citocinas, atenua o processo de fagocitose e neutraliza espécies reativas de oxigênio (RATHORE *et al.*, 2022). Dessa maneira, a melanina atua em conjunto com a cápsula polissacarídica em busca da sobrevivência da levedura no cenário hostil gerado pelo sistema imunológico.

A produção de enzimas como fosfolipases, urease e proteinases também contribui na virulência desta levedura patogênica. Através da produção de fosfolipases ocorre a desestabilização de membranas e rompimento celular. Ademais, esta enzima realiza a clivagem de surfactantes pulmonares, como a dipalmitoilfosfatidilcolina, aumentando a aderência da levedura ao tecido pulmonar e contribuindo na colonização do tecido. As fosfolipases também convertem ácido araquidônico proveniente de macrófagos em eicosanoides – substâncias que suprimem a resposta imunológica (SABIITI; MAY, 2012). A urease, enzima que converte ureia em ácido carbônico e amônia, também está envolvida na virulência de *Cryptococcus* spp.. Além da alcalinização e a danificação do tecido acometido, o aumento de pH demonstrou em modelo murino melhorar o *fitness* de leveduras fagocitadas por macrófagos (FU *et al.*, 2018). No cenário ambiental, a expressão de urease também pode estar envolvida com a resistência do fungo a ambientes hostis. Acredita-se que o isolamento frequente de cepas em excretas de pombos é justificado pela alta quantidade de ureia encontrada no material, servindo como fonte de nitrogênio para a sobrevivência da levedura (TOPLIS *et al.*, 2020). No âmbito clínico, proteinases possuem importante papel na sobrevivência de *Cryptococcus* spp.. Estas enzimas levam à degradação de substâncias como colágeno, fibrinogênio, fatores do complemento, elastina e imunoglobulinas, essenciais em processos inflamatórios e imunológicos (SABIITI; MAY, 2012). Dessa forma, a expressão de uma variedade de enzimas, cápsula e melanina – fatores de virulência notáveis, fazem de *C. neoformans* e *C. gattii*, em conjunto de outros fatores e mecanismos, leveduras oportunistas fatais.

A formação de biofilme por *Cryptococcus* spp. cria outra problemática no panorama de saúde mundial. Biofilmes são comunidades microbianas embebidas em matriz exopolissacarídica, material genético, proteínas e moléculas sinalizadoras que conferem resistência ao sistema imune do hospedeiro e a terapias farmacológicas, aumentando morbidade e mortalidade (KARYGIANNI *et al.*, 2020; MARTINEZ;

CASADEVALL, 2015). Cerca de 500 mil óbitos são provocados anualmente em decorrência da formação de biofilmes em infecções. Mais além, estima-se que 80% das infecções crônicas e 65% das infecções agudas estão associadas a biofilmes microbianos (LEBEAUX *et al.*, 2013; ROUDBARY *et al.*, 2022). De forma similar a outros microrganismos, o processo de formação de biofilme por *Cryptococcus* spp. ocorre a partir da adesão de células planctônicas em uma superfície, formação de microcolônias, produção de matriz exopolissacarídica, maturação e disseminação (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015). A formação de biofilme por esta levedura não se limita a tecidos – denominado criptococoma (ASLANYAN *et al.*, 2017). Relatos em dispositivos médicos implantáveis como catéteres de derivação ventriculoatrial, válvulas cardíacas, fístulas de hemodiálise e próteses articulares também já foram descritos (BANERJEE; GUPTA; VENUGOPAL, 1997; BRAUN *et al.*, 1994; JOHANNSSON; CALLAGHAN, 2009; SHAH, Neel B.; SHOHAM; NAYAK, 2015). Uma vez que a formação de biofilme exerce um papel importante na patogênese de *Cryptococcus* spp. limitando as terapias disponíveis para seu tratamento (MARTINEZ; CASADEVALL, 2015), estratégias terapêuticas inovadoras se fazem necessárias.

O diagnóstico da criptococose é baseado nos sinais clínicos e nos achados laboratoriais. No laboratório de microbiologia, a confirmação de *Cryptococcus* spp. pode ser realizada através da tinta da China ou tinta nanquim. Através desta técnica de exame direto é possível visualizar as células leveduriformes, podendo ou não estar em brotamento, em contraste com a coloração escura da tinta da China. A visualização das estruturas é evidenciada em função da cápsula fúngica, estrutura que impede a penetração da coloração na levedura, conforme demonstrado na Figura 1. O principal material clínico coletado é o líquido cefalorraquidiano (LCR). Porém, outros materiais como pus, urina, sangue, biópsia e lavado broncoalveolar também são utilizados no diagnóstico da criptococose. Outras ferramentas, como sorologia e histopatologia, também podem ser utilizadas na confirmação do diagnóstico laboratorial. O padrão-ouro de diagnóstico é a cultura fúngica, podendo ser realizada com os materiais biológicos citados anteriormente. As amostras são semeadas em ágar Sabouraud e incubadas a temperaturas de 25 °C a 37 °C por até 7 dias. Porém, em 48 horas já é possível visualizar o crescimento fúngico, eventualmente. Técnicas moleculares – como a técnica baseada na reação de cadeia da polimerase, e técnicas sorológicas – como o teste por aglutinação e o ensaio imunoenzimático, também

podem ser utilizadas para o diagnóstico da criptococose e são oferecidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021c). Ainda, meios de cultivo diferenciais podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico. Ágar níger e ágar dopamina, por exemplo, são ricos em compostos fenólicos que sofrem ação da lacase produzida por *Cryptococcus* spp., formando melanina e uma coloração típica na colônia (CLÁUDIA RACHID COSTA *et al.*, 2014), conforme demonstrado na Figura 2. Para diferenciação entre as espécies *C. neoformans* e *C. gattii* utiliza-se o ágar canavanina-glicina-azul de bromotimol (ágar CGB). *C. gattii* possui a capacidade de assimilar a glicina, alcalinizando o meio e, conseqüentemente, alterando sua cor de amarelo (negativo para *C. gattii*) para azul (positivo para *C. gattii*) (KWON-CHUNG *et al.*, 1982).

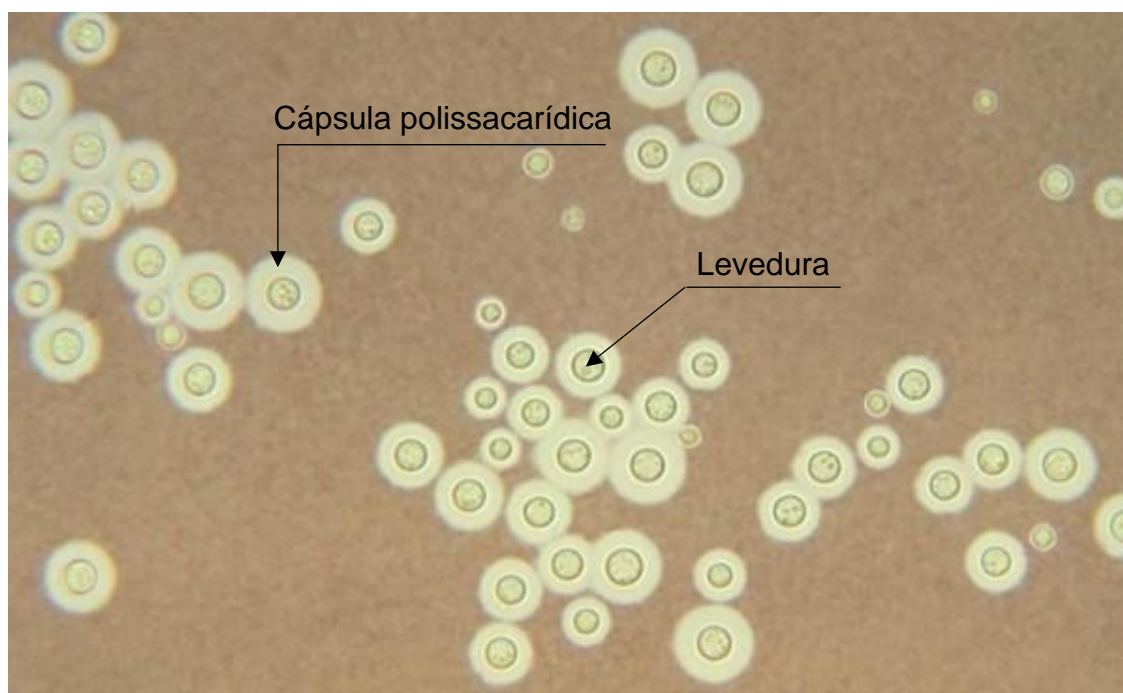


Figura 1. Exame direto de líquido cefalorraquidiano com tinta da China demonstrando presença de células de *Cryptococcus neoformans*

Fonte: Adaptado de KUSHAWAHA *et al.*, 2009.

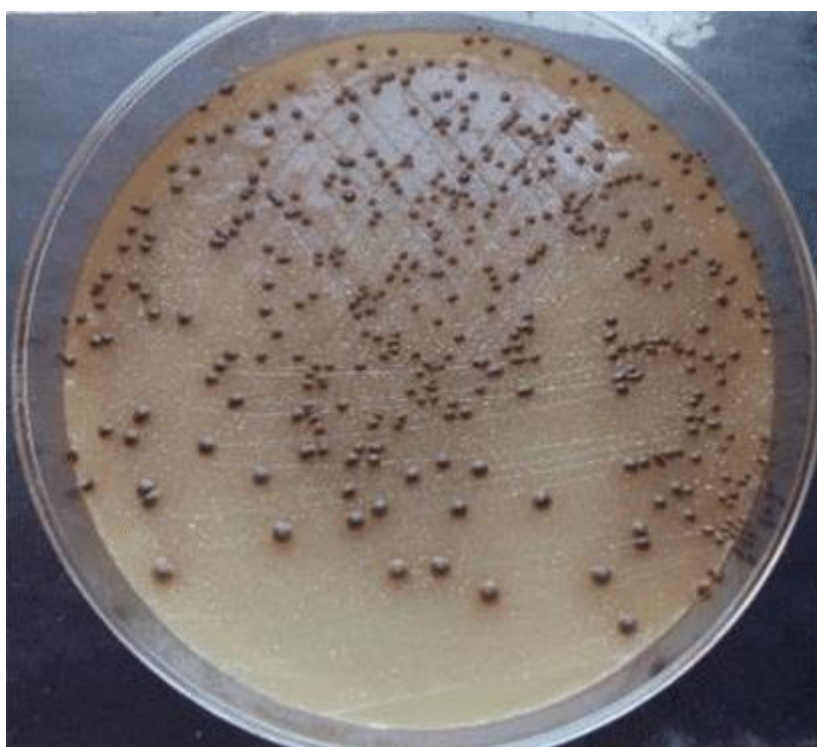


Figura 2. Colônias de *Cryptococcus* spp. em ágar níger
Fonte: Adaptado de MOSLEM et al., 2020.

No Brasil, o tratamento para criptococose oferecido pelo SUS consiste em quatro medicamentos antifúngicos: anfotericina B (complexo lipídico), itraconazol, fluconazol e flucitosina. Após a exclusão da flucitosina da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) em 2006, o fármaco foi reincorporado ao SUS em 2022 devido recomendação da Organização Mundial de Saúde e evidências clínicas positivas. O tratamento da infecção fúngica é realizado em três fases – indução, consolidação e manutenção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021a, b, 2022). Durante a fase de indução ocorre a redução da carga fúngica nos sítios acometidos pela infecção, bem como a redução de eventuais falhas em comparação com outros regimes terapêuticos. Nesta fase são utilizadas anfotericina B (endovenosa) e flucitosina (oral). Durante a fase de consolidação, realiza-se a administração endovenosa ou oral de elevadas dosagens do triazólico fluconazol. Por fim, na fase de manutenção, o tratamento é mantido com menores dosagens de fluconazol por no mínimo 12 meses em detrimento de recidivas – que podem ocorrer em até 1 ano desde o diagnóstico inicial (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2022).

As manifestações clínicas da criptococose incluem uma variedade de sinais e sintomas. Ressalta-se que o acometimento de múltiplos tecidos pode ocorrer. Entre as formas de manifestação da criptococose, o envolvimento pulmonar e do sistema nervoso central são os mais comuns. Entretanto, apresentações em outros tecidos – como epitelial, ocular, prostático, ósseo e peritoneal, podem ocorrer e devem ser cuidadosamente observadas, uma vez que podem indicar a disseminação da levedura.

Entre pacientes HIV positivos, a meningite criptocócica é a infecção mais comum no sistema nervoso central (RAJASINGHAM *et al.*, 2017). Entretanto, as manifestações podem ser pouco específicas e atrasar o diagnóstico da doença. Dor de cabeça, febre, náusea, vômito e alteração do estado mental são sinais e sintomas similares a outros tipos de meningite e, portanto, prejudicam o diagnóstico da meningite fúngica (JARVIS; HARRISON, 2007). Dessa forma, devido a elevada carga fúngica, alteração do estado mental e a baixa resposta inflamatória no sistema nervoso central, um prognóstico ruim é esperado (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

Em infecções pulmonares, a espécie *C. gattii* está mais frequentemente envolvida. Ademais, a manifestação pulmonar é apresentada em 50% dos pacientes com criptococose. De forma similar a infecção no sistema nervoso central, os sintomas são inespecíficos. Febre, tosse, dispneia, calor noturno, dor no peito e mal-estar são reportados e, geralmente, indivíduos imunodeprimidos são mais sintomáticos que imunocompetentes. Ferramentas de imagem podem auxiliar no diagnóstico, revelando nódulos, lesões em massa, infiltrados intersticiais e efusão pleural (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

Mais adiante, manifestações menos frequentes de criptococose também podem ocorrer. Sintomas oculares podem ser percebidos, estando relacionados com o aumento da pressão intracraniana e atrofia do nervo óptico em decorrência da meningite criptocócica. Entretanto, casos mais raros podem acometer diretamente o tecido ocular. Casos de endoftalmite (BERNARD E. BEYT; STEPHEN R. WALTMAN, 1978), coriorretinite, uveíte e conjuntivite granulomatosa causada por *Cryptococcus* spp. já foram reportados. Sinais e sintomas incluem redução da acuidade visual, perda da visão e dor (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021). Em sítios ainda mais raros, infecções na próstata (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021), ossos – como

vértebras e joelhos (MEDARIS *et al.*, 2016), trato gastrointestinal e peritônio (SINGH *et al.*, 2015) estão relatadas em literatura.

Por fim, há a forma cutânea de criptococose – que pode ser classificada em primária ou secundária. Na forma primária, as leveduras são inoculadas através de um trauma mecânico. Na forma secundária, ocorre a disseminação hematogênica do agente etiológico, provindo de outro sítio infectado. Devido a ferida apresentar aspecto semelhante a outras doenças – como sarcoma de Kaposi e molusco contagioso, o diagnóstico diferencial é muitas vezes necessário (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021). Sendo o foco deste trabalho, a criptococose cutânea será discutida com mais detalhes a seguir.

2.1.1. Criptococose cutânea

Embora já tenha sido isolada da pele de indivíduos saudáveis (RANDHAWA; PALIWAL, 1977), *C. neoformans* é uma levedura oportunista potencialmente letal. A criptococose cutânea é uma manifestação envolvida com a disseminação hematogênica do fungo ou com a inoculação direta através de trauma mecânico. Em pacientes com meningite criptocócica, cerca de 6% dos infectados apresentam a manifestação (NOGUCHI *et al.*, 2019). Embora a prevalência seja reduzida em relação as outras manifestações (cerebral e pulmonar), a criptococose cutânea é a terceira forma mais comum da doença (JOHNSON; GAJUREL, 2021). Ainda, considerando a elevada incidência anual, é estabelecida uma problemática notável em saúde, principalmente para indivíduos imunodeprimidos. Mais adiante, a incidência de sinais cutâneos aumenta em indivíduos recém-transplantados que estão em terapia imunossupressora e em pacientes infectados com o sorotipo D (GOLÈ NE NEUVILLE *et al.*, 2003).

As lesões características desta manifestação apresentam aspecto variado, conforme demonstrado na Figura 3. Placas, úlceras, abscessos, pústulas, pápulas umbilicadas e nódulos podem ser observados no corpo inteiro, porém cabeça e pescoço são sítios mais frequentes (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021; NOGUCHI *et al.*, 2019). Entretanto, apresentações atípicas já foram reportadas (PERI *et al.*, 2019; SIVARAJ *et al.*, 2018). O diagnóstico da criptococose cutânea pode ser realizado através do exame direto com tinta da China ou coloração de Giemsa, utilizando amostras coletadas de vesículas, pústulas e úlceras. Na visualização do

exame direto, observa-se a formação de um halo ao redor da célula leveduriforme – indicando a presença de cápsula. Não sendo possível identificar a estrutura, deve proceder-se para o diagnóstico histopatológico com coleta de biópsia do tecido. Coloração de hematoxilina-eosina, mucicarmim, ácido periódico-Schiff e metenamina de prata de Grocott-Gomori também podem ser utilizadas para visualização da cápsula criptocócica (NOGUCHI *et al.*, 2019).



Figura 3. Apresentação da *criptococose* cutânea

Fonte: Adaptado de HAN *et al.*, 2017; NANOFFF *et al.*, 2018; TABASSUM *et al.*, 2013.

Apesar da complexidade e severidade da forma cutânea da doença, seu tratamento se sustenta unicamente no regime terapêutico já utilizado para a criptococose. Pacientes em que fungemia e disseminação da levedura são descartadas, é realizada administração oral de fluconazol 400 mg/dia por 3 meses e de itraconazol 100 a 400 mg/dia de 3 a 6 meses. Entretanto, não é realizada nenhuma abordagem tópica para o manejo da criptococose cutânea. De maneira alternativa,

opta-se pela administração oral de solução de itraconazol (100 a 400 mg/dia de 3 a 6 meses) para obtenção de maiores concentrações séricas do fármaco. Embora apresente melhores desfechos em comparação a administração oral de cápsulas (NOGUCHI *et al.*, 2019), o itraconazol apresenta reduzida biodisponibilidade para uma ação tópica eficiente (BAE *et al.*, 2011). Visualizando este cenário, o desenvolvimento de produtos farmacêuticos que proporcionem maior biodisponibilidade e retenção adequada do princípio ativo na pele criaria alternativas mais eficazes para o manejo tópico da criptococose cutânea.

2.2. IMPRESSÃO 3D E PRODUTOS FARMACÊUTICOS INOVADORES

A impressão 3D consiste na deposição sucessiva de camadas de um material, visando a obtenção de objetos tridimensionais. Recorrendo a programas de modelagem 3D é possível realizar a prototipagem de formas personalizadas – ou desenhos assistidos por computador (CAD). Posteriormente, os objetos construídos no *software* são fatiados e convertidos em um arquivo de extensão .stl (GAO *et al.*, 2015). Desde o depósito de patente do primeiro método de impressão 3D, a estereolitografia (HULL, 1986), é estimado um crescimento anual de 26,9% deste mercado. Atualmente, a impressão 3D gera uma receita de cerca de 9,8 bilhões de dólares e é pesquisada para aplicações na engenharia civil e tecnologia aeroespacial à engenharia de tecidos e produtos farmacêuticos (TURNER, Robert D. *et al.*, 2020).

De acordo com a ASTM (*American Society for Testing and Materials*), a impressão 3D pode ser classificada em deposição por energia direcionada, jato de aglutinante, extrusão de material, fusão em leito de pó, jateamento de material, fotopolimerização em cuba e laminação de folhas (ASTM, 2012). A deposição por energia direcionada é uma técnica restrita a metais que utiliza uma fonte de energia térmica, como feixe de elétrons, para a fusão de um pó ou fio metálico (GAO *et al.*, 2015). O jato de aglutinante baseia-se no jateamento de um material aglutinante sobre um leito que contém pó. A plataforma de impressão é abaixada a cada camada que passa pelo jateamento, emergindo o objeto impresso ao final do processo (MOSTAFAEI *et al.*, 2021). Para a extrusão de material, destaca-se a modelagem por deposição fundida. Método amplamente empregado e popularmente conhecido como FDM (*fused deposition modeling*). Outras metodologias de extrusão de material, como a micro extrusão e a extrusão de semissólidos, também são exploradas. A extrusão de semissólidos foi empregada no desenvolvimento do presente trabalho e se baseia

na extrusão de um material contido em uma seringa através de uma agulha, não exigindo elevadas temperaturas (LIGON *et al.*, 2017; SEOANE-VIAÑO *et al.*, 2021). A fusão em leito de pó utiliza de metodologias como a sinterização seletiva a laser e fusão por feixe de elétrons para a fusão seletiva de um pó (metais ou polímeros) dispostos em um leito (LIGON *et al.*, 2017). A técnica de jateamento de material deposita gotículas de material, como fotopolímeros e termoplásticos, sobre a plataforma de impressão. Um processo de cura é utilizado para o ganho de resistência do material (YAP *et al.*, 2017). A fotopolimerização em cuba foi a primeira técnica de impressão 3D descrita e patenteada (método de estereolitografia) (HULL, 1986). Um material líquido em uma cuba é curado seletivamente por polimerização ativada por luz, imprimindo o objeto tridimensional (LIGON *et al.*, 2017). Por fim, a laminação de folhas combina a manufatura aditiva com um processo subtrativo. Isto é, um material laminado é sobreposto em camadas e posteriormente usinado para a obtenção do objeto 3D. Uma limitação desta técnica é a impressão de peças ocas (LIGON *et al.*, 2017).

Estas variadas metodologias trouxeram significativos avanços para a engenharia de materiais e, nos últimos anos, vêm sendo amplamente investigadas para fins biológicos e farmacêuticos. A impressão 3D de tecidos, culturas celulares tridimensionais, dispositivos médicos e produtos farmacêuticos traça boas perspectivas para o futuro na saúde (LI, Jinhua *et al.*, 2020). Entre as diversas descobertas da impressão 3D, acredita-se que a aplicação no âmbito farmacêutico foi uma das mais revolucionárias, sendo uma ferramenta versátil no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas e outros dispositivos (JAMRÓZ *et al.*, 2018).

Uma variedade de formas farmacêuticas 3D vem sendo investigadas (AWAD *et al.*, 2019; AYYOUBI *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2021; SHI *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2021; ZHANG, Jiexiang *et al.*, 2020; ZHAO, Xinyu *et al.*, 2022). Entretanto, até o presente momento, apenas uma forma farmacêutica é impressa tridimensionalmente e comercializada. Aprovado em 2015 pelo órgão de saúde dos Estados Unidos (Food and Drug Administration) e comercializado em 2016, o comprimido SPRITAM® busca a liberação imediata do princípio ativo levetiracetam. No entanto, formas farmacêuticas de liberação modificada também podem ser pensadas para a impressão 3D visando ajuste de dose, dosagens mais espaçadas, maior adesão terapêutica e redução de efeitos adversos (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014).

Ademais, a impressão 3D oferece a possibilidade de personalização de produtos farmacêuticos. O desenvolvimento de medicamentos individuais pensados de acordo com a necessidade de cada paciente proporciona ajuste de dose, direcionamento da terapia farmacológica e melhores desfechos clínicos (JAMRÓZ *et al.*, 2018; LI, Nan *et al.*, 2023). Nas últimas décadas, formas farmacêuticas sólidas de administração oral (CROITORU-SADGER *et al.*, 2019), pílulas (SHARMA *et al.*, 2022; ZHANG, Bin *et al.*, 2022) e hidrogéis curativos (LIU, Jin; TAGAMI; OZEKI, 2020; LOUREIRO *et al.*, 2023; RAJESH *et al.*, 2022; TALEBIAN *et al.*, 2021; TSEGAY *et al.*, 2022) feitos através de diferentes metodologias de impressão 3D vêm sendo extensivamente estudados. Aplicações em tecidos infectados também têm sido investigadas, projetando um cenário próspero para o tratamento de infecções microbianas. Porém, a ausência de estudos que sintetizem e organizem a variedade de dados pode impor desafios a laboratórios de pesquisa e setores de Pesquisa e Desenvolvimento de indústrias farmacêuticas na investigação e criação de biomateriais 3D com atividade antimicrobiana. Assim, sugere-se que esta lacuna deve ser preenchida a fim de auxiliar pesquisadores no desenvolvimento de biomateriais impressos tridimensionalmente.

O apelo pelo desenvolvimento de formas farmacêuticas e biomateriais 3D é notável. O pedido de patente destas necessárias tecnologias, no cenário atual, pode ser uma ferramenta eficiente para o progresso científico e adequado reconhecimento de invenções. A geração de uma patente de um produto brasileiro confere proteção ao titular e o objeto inventado. Assim, o inventor pode impedir a produção, uso e venda do item patenteado por terceiros e garante o adequado reconhecimento de sua criação. Contudo, extensa investigação deve ser feita e especial atenção deve ser dada ao que diz respeito à propriedade intelectual, respeitando novidade, atividade inventiva e aplicação industrial (BRASIL, 1996).

2.3. HIDROGÉIS – UMA ABORDAGEM FARMACÊUTICA

Hidrogéis são estruturas tridimensionais organizadas em forma de rede com capacidade de reter significativas quantidades de água e/ou fluidos biológicos – conferindo a este material notável semelhança com tecidos humanos. Conseqüentemente, hidrogéis vêm sendo extensivamente investigados para aplicações na engenharia de tecidos, como pele, sistema circulatório, músculos e tecido adiposo (AGRAWAL; HUSSAIN, 2023; TAVAKOLI; KLAR, 2020).

Nos últimos 20 anos, a utilização de hidrogéis na impressão 3D também vem sendo estudada. Hidrogéis podem ser carregados com diferentes componentes, como células, fármacos, fatores de crescimento, nutrientes e adjuvantes (TAVAKOLI; KLAR, 2020). Assim, protótipos tridimensionais variados podem ser construídos para diferentes fins. Contudo, os aditivos de um hidrogel devem ser cuidadosamente pensados de acordo com a aplicação daquele biomaterial. A escolha dos componentes do hidrogel, bem como dos materiais que o constituem, impactam na printabilidade, biocompatibilidade e comportamento mecânico – importantes propriedades de um biomaterial 3D (AGRAWAL; HUSSAIN, 2023). Portanto, é importante compreender as características dos componentes de um hidrogel, bem como classificá-los.

A classificação dos hidrogéis varia e pode ser determinada de acordo com sua composição, método de reticulação empregado, carga elétrica e interações intermoleculares (AGRAWAL; HUSSAIN, 2023; KAITH *et al.*, 2021). A composição desses materiais pode ser natural, sintética ou híbrida. Hidrogéis naturais são constituídos de polímeros encontrados na natureza, com biocompatibilidade inerente – como quitosana, alginato, gelatina e colágeno. No entanto, desafios no desenvolvimento de um biomaterial podem ser encontrados devido as baixas propriedades mecânicas e o complexo comportamento reológico dos biopolímeros. Em contraste aos hidrogéis naturais, os sintéticos são compostos de polímeros produzidos através de síntese. Polietilenoglicol (PEG), poliácridamida, álcool polivinílico (PVA), ácido polilático (PLA) são exemplos de alguns polímeros sintéticos. Dado os diversos processos que envolvem a síntese de um polímero, as propriedades mecânicas podem ser controladas. Assim, a printabilidade de um hidrogel pode ser previsível e ajustada de acordo com a viscosidade e escoamento desejados. Um hidrogel híbrido une polímeros naturais e sintéticos e, por combinar características de ambos materiais, geralmente apresenta propriedades adequadas e equilibradas. Dessa forma, os hidrogéis híbridos podem apresentar biocompatibilidade e bom perfil mecânico (AGRAWAL; HUSSAIN, 2023).

A reticulação, ou *crosslinking*, é uma etapa onde ligações, reversíveis ou não, são estabelecidas entre moléculas poliméricas e agentes de reticulação. A reticulação pode ser classificada em química – na qual ligações permanentes são construídas e dificilmente desfeitas, e física – na qual interações mais fracas mantêm o emaranhado

polimérico estruturado. De forma similar à composição do hidrogel que impacta no comportamento mecânico, o grau de reticulação influencia na rigidez do material. Quando maior o grau de reticulação, maior a firmeza do hidrogel e menor seu intumescimento – uma vez que as cadeias poliméricas estão menos disponíveis para interação com a água. O contrário é verdadeiro. Hidrogéis menos reticulados estão mais livres para interagir com a água e, conseqüentemente, apresentam maior capacidade de intumescimento. (KAITH *et al.*, 2021).

Quanto à carga elétrica, os hidrogéis são classificados em iônicos – podendo ser catiônicos ou aniônicos, anfóliticos – quando capazes de se ionizar em cátions e ânions e, por fim, não-iônicos (KAITH *et al.*, 2021). Hidrogéis catiônicos são sensíveis a pH e podem interagir com moléculas carregadas negativamente. A quitosana, por exemplo, é um polímero natural feito a partir da desacetilação alcalina da quitina extraída de crustáceos e é amplamente investigada por ser um hidrogel catiônico (ZHAO, Jun *et al.*, 2023). Dada esta interessante característica, o polímero interage com as cargas negativas oriundas da parede celular e membrana celular de bactérias, provocando a morte celular. Não obstante o potencial antibacteriano da quitosana, sabe-se que seu espectro e mecanismo de ação contra fungos é distinto (KAITH *et al.*, 2021). Estudos *in vitro* demonstraram que o espectro de atividade antifúngica da quitosana frente a diferentes espécies de *Candida* spp. é cepa-dependente (GARCIA *et al.*, 2018). Hidrogéis de alginato, contudo, são aniônicos e interagem fortemente com cátions divalentes, como Ca^{+2} , formando uma reticulação física por interações eletrostáticas. O alginato de sódio é um polímero extraído de algas marrons (ZHANG, Miao; ZHAO, 2020) que quando reticulado forma uma estrutura denominada “modelo de caixa de ovo”, ou *egg-box model* (REES, 1981), aprisionando o íon cálcio e tornando a rede polimérica mais estável. Ademais, o alginato também é capaz de formar complexos polieletrólito com a quitosana (LUO; WANG, 2014), como será descrito a seguir.

Os hidrogéis podem ser classificados quanto a suas interações intermoleculares – blendas, copolímeros em bloco e complexos polieletrólito. Blendas são misturas de dois ou mais polímeros que, em conjunto, criam um material com novas propriedades físicas. Em comparação aos hidrogéis clássicos, as blendas proporcionam melhores propriedades térmicas e mecânicas, assim como podem aumentar a taxa de encapsulação de determinadas substâncias. Hidrogéis feitos de

copolímeros em bloco são formados através de ligações covalentes entre uma sequência de monômeros A (estireno, por exemplo) e uma sequência de monômeros B (metil metacrilato, por exemplo), gerando uma estrutura capaz de reter significativas quantidades de água. Estes hidrogéis possibilitam diversas combinações poliméricas. Os polieletrólitos são interações entre polímeros catiônicos e aniônicos que geram um complexo resistente, sem exigir agentes de reticulação (KAITH *et al.*, 2021). Complexos polieletrólitos de alginato e quitosana vêm sendo estudados para liberação modificada de fármacos (IBRAHIM; SOROUR; SALAH AD-DIN, 2022; JIN *et al.*, 2020; LI, Liang *et al.*, 2013; LIU, Min *et al.*, 2022; SCHOELLER *et al.*, 2021; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2018; ZHOU *et al.*, 2013), demonstrando ser um sistema interessante e biocompatível para o combate de infecções de difícil tratamento – como a criptococose cutânea.

Para o tratamento de tecidos infectados (CERECERES *et al.*, 2020; NIZIOŁ *et al.*, 2021), câncer (KRAKOS *et al.*, 2023; LIU, Chunyang *et al.*, 2021), regeneração tecidual (JIANG *et al.*, 2021; LI, Pinxue *et al.*, 2021) e reparo de tecidos queimados (FAYYAZBAKSH; KHAYAT; LEU, 2022; MA *et al.*, 2022), hidrogéis impressos também vêm sendo investigados. Diversos estudos propõem hidrogéis 3D para o tratamento de infecções bacterianas (BRITES *et al.*, 2023; FOURMANN *et al.*, 2021; NARCISO *et al.*, 2023; RASTIN *et al.*, 2021; ZHANG, Qianqian *et al.*, 2023). Entre estes trabalhos, os hidrogéis são testados principalmente contra agentes etiológicos de infecções bacterianas relacionadas a pele, como *Staphylococcus aureus*, sendo propostos como materiais para aplicação na regeneração de tecidos (CHEN, Birui *et al.*, 2023; NIE *et al.*, 2022; WANG, Xiaoxue *et al.*, 2021). No entanto, até o presente momento, a literatura é escassa quanto a impressão 3D de hidrogéis para o tratamento de infecções fúngicas (KUMARI; BARGEL; SCHEIBEL, 2020).

Ademais, a toxicidade da terapia medicamentosa da criptococose é notória (IYER *et al.*, 2021). Considerando a toxicidade relacionada ao uso prolongado dos antifúngicos e o limitado arsenal de medicamentos (VAN DAELE *et al.*, 2019), a busca por produtos farmacêuticos inovadores com reduzida toxicidade se faz necessária. A ausência de um manejo tópico adequado para a criptococose cutânea, em conjunto à baixa biodisponibilidade tópica dos medicamentos utilizados no seu regime terapêutico (FERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2021; MOHAPATRA *et al.*, 2023) exige um

tratamento direcionado para a manifestação tópica da doença que, em muitos casos, gera cicatrizes permanentes.

Os imidazólicos, como o cetoconazol, são amplamente utilizados no tratamento de micoses de pele, sendo considerados antifúngicos de amplo espectro, baixo custo, seguros e efetivos (CHOI; JUHASZ; ATANASKOVA MESINKOVSKA, 2019). No tratamento da criptococose cutânea, a utilização do cetoconazol não é usual. No entanto, sua administração já foi registrada e apresentou bons resultados. Nesse sentido, seu espectro de atividade contra agentes dermatófitos também é notório (BAES; CUTSEMB, 1985; GRANIER *et al.*, 1987; GRAYBILL *et al.*, 1980; YAO; LIAO; CHEN, 2005), sugerindo sua aplicação em variadas infecções de etiologia fúngica plausível. Ademais, o cetoconazol é um fármaco com custo inferior aos medicamentos empregados no esquema terapêutico da criptococose. Visando uma terapia com custo acessível ao sistema público de saúde, desenvolveu-se um hidrogel de quitosana e alginato de sódio contendo 2% de cetoconazol para o manejo tópico da criptococose cutânea.

ARTIGO CIENTÍFICO

Three-dimensional printing of medical devices and biomaterials with antimicrobial activity: A systematic review

Artigo científico publicado no periódico *Bioprinting* (CiteScore 9.1)

ARTIGO CIENTÍFICO

3D printed ketoconazole hydrogel patch as a wound dressing material for cutaneous cryptococcosis

Artigo científico submetido no periódico *International Journal of Biological Macromolecules* (fator de impacto 8.2)

5. DISCUSSÃO

Diversos estudos acerca de biomateriais fabricados por impressão 3D foram caracterizados quanto à sua atividade antimicrobiana e foram incluídos no presente trabalho. A gama variada de técnicas de impressão 3D possibilita a criação de produtos para diferentes aplicações na área da saúde. Fatores como preço, tempo, praticidade e funcionalidade impactam no desempenho da impressora 3D e são importantes características a serem consideradas na escolha da metodologia de impressão. Ademais, a intenção pretendida com a manufatura aditiva deve guiar o processo de escolha, o que inclui a possibilidade de atender à demanda de pacientes de forma individualizada. Hidrogéis, protótipos em termoplástico e protótipos em resina são exemplos de produtos obtidos por diferentes métodos de impressão. A FDM, por exemplo, apesar de seu custo-benefício, apresenta a limitação de baixa resolução no acabamento das camadas e, por consequência, da superfície do produto final. Além disso, altas temperaturas de impressão podem afetar a bioatividade de compostos termossensíveis. Entretanto, a modelagem por deposição fundida possibilita a criação de protótipos com custo acessível devido a disseminação da técnica e dos polímeros usualmente empregados. Em consonância com sua popularidade, a extrusão de material foi a técnica mais avaliada, com 149 estudos apresentados. Sendo necessária a fabricação de biomateriais com maior acabamento através de polímeros termoplásticos e resinas, é possível utilizar a fotopolimerização em cuba (TULLY; MELONI, 2020), cuja técnica é a terceira mais investigada para a impressão de biomateriais com atividade antimicrobiana.

Mais além, a técnica de fusão em leito de pó foi extensivamente investigada para a fabricação de ligas metálicas com aplicações ortopédicas, como próteses ósseas – que demandam alta resistência mecânica. Sinterização seletiva a laser, fusão seletiva a laser e fusão por feixe de elétrons são métodos de obtenção de objetos 3D inclusos na categoria de fusão em leito de pó. Foram identificados 36 estudos que exploraram esta técnica no desenvolvimento de próteses e implantes com atividade antimicrobiana, como proposto por Cox e Maher (COX *et al.*, 2016; MAHER *et al.*, 2022). Com menor expressividade em relação as outras metodologias de impressão 3D, o jateamento de material, jato de aglutinante, laminação de folhas e deposição por energia direcionada foram abordados em 8 estudos (BAI *et al.*, 2020; CHEN, Fangping *et al.*, 2016; HE *et al.*, 2022; IDRIS *et al.*, 2021; INZANA *et al.*, [s.

d.]; MAHARUBIN *et al.*, 2019; MENDOZA *et al.*, 2018; WELCH *et al.*, 2021). Isto está provavelmente relacionado à disseminação limitada dessas técnicas, equipamentos e acesso a estes. Além disso, alguns estudos não especificaram a metodologia de impressão 3D utilizada, levantando questionamentos sobre a reprodutibilidade do trabalho.

De maneira semelhante à escolha da técnica de impressão, deve-se ponderar quanto ao material a ser utilizado, considerando a aplicação desejada do produto final. Polímeros naturais, como alginato, celulose, quitosana, gelatina e amido, foram extensivamente investigados na forma de hidrogéis para aplicações em engenharia de tecidos, medicina regenerativa, revestimento de próteses e sistemas de liberação de fármacos (BERGONZI *et al.*, 2021; GUTIERREZ *et al.*, 2019; RASTIN *et al.*, 2021). Isto está associado à capacidade de intumescimento e às propriedades mecânicas desses materiais, conferindo similaridade ao tecido epitelial e conjuntivo. Ademais, a rede polimérica de um hidrogel proporciona o encapsulamento de substâncias, as quais são liberadas mediante alterações de pH e inchamento, por exemplo. Dessa forma, hidrogéis poliméricos também podem ser empregados como sistemas de liberação modificada de fármacos (AGRAWAL; HUSSAIN, 2023). Entre a variada gama de polímeros naturais explorados para a fabricação de biomateriais antimicrobianos 3D, quitosana, alginato e gelatina foram os mais investigados, incluindo 35, 25 e 22 estudos, respectivamente. Destaca-se entre eles a quitosana, um biopolímero produzido a partir da desacetilação da quitina de crustáceos, com inerente atividade antimicrobiana, demonstrando potencial no desenvolvimento de biomateriais antimicrobianos (ZHAO, Jun *et al.*, 2023). No entanto, outros materiais, como polímeros termoplásticos, também foram amplamente pesquisados para essa aplicação. A policaprolactona, o ácido polilático e o álcool polivinílico reuniram 49, 47 e 10 estudos, respectivamente. Esses materiais foram empregados em dispositivos médicos funcionalizados e no tratamento de infecções associadas a implantes e próteses, possivelmente devido à maior resistência mecânica desses polímeros sintéticos.

Materiais inorgânicos como a hidroxiapatita e o beta fosfato tricálcico foram investigados em 27 e 13 estudos, respectivamente. Aplicações em tecidos ósseos infectados e implantes ortopédicos foram exploradas, demonstrando rigidez, porosidade e composição química semelhante ao tecido. A fabricação de protótipos

altamente porosos possibilita a infiltração celular e a recuperação adequada do tecido ósseo (ADHIKARI *et al.*, 2021; ALVES *et al.*, 2023; AYDOGDU *et al.*, 2019a, b; ZHONGXING *et al.*, 2021). Além disso, ligas metálicas foram pesquisadas para utilização em implantes e próteses ósseas, devido sua notória robustez mecânica. Outros materiais, como resinas, grafeno, proteínas e alguns polímeros menos usuais, também foram objetos de pesquisa, embora com menor expressividade. Isso pode estar associado a menor oferta e disseminação desses materiais.

As substâncias adicionadas aos biomateriais 3D foram classificadas em antimicrobianos comerciais, produtos naturais, compostos metálicos e outras substâncias. Entre todos os compostos testados, vancomicina, prata e suas nanopartículas foram os mais investigados. A pesquisa de biomateriais impressos tridimensionalmente com vancomicina está fortemente relacionada ao avanço da resistência bacteriana, conforme evidenciado pelo preocupante aumento de infecções provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) (TURNER, Nicholas A. *et al.*, 2019). Ademais, a prata é um metal notoriamente reconhecido por sua atividade antimicrobiana. Porém, devido seu potencial nocivo, nanoformulações também são pensadas a fim de reduzir toxicidade e melhorar a entrega (DENG; DENG; XIE, 2017; PUTRA *et al.*, 2022). Outros compostos como gentamicina, ciprofloxacino, peptídeos e nanopartículas de cobre também foram amplamente explorados (DYDAK *et al.*, 2018; KARAMAT-ULLAH *et al.*, 2021; MAITY *et al.*, 2021; ZUNIGA, 2018). Ainda, outras substâncias que não foram classificadas entre antimicrobianos comerciais, produtos naturais e compostos metálicos foram agrupadas em outra categoria. Anti-inflamatórios, por exemplo, foram investigados quanto seu potencial antimicrobiano (SHAH, Parth N *et al.*, 2018; VIVERO-LOPEZ *et al.*, 2021; WANG, Hui *et al.*, 2020). A dexametasona foi incorporada em protótipos 3D de biovidro para aplicação ortopédica e demonstrou significativa atividade contra *S. aureus* em testes *in vivo* (WANG, Hui *et al.*, 2020).

De maneira favorável, extensa investigação foi realizada quanto a variadas substâncias com potencial antimicrobiano. Entretanto, diferentes técnicas de avaliação do espectro de atividade foram realizadas. Métodos como ensaio de halo de inibição, concentração inibitória mínima, contagem de unidades formadoras de colônia, ensaios *in vivo* e *ex vivo* foram performados. Protocolos da CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) e EUCAST (*European Committee on Antimicrobial*

Susceptibility Testing) e adaptações destas diretrizes laboratoriais foram utilizados (ILHAN *et al.*, 2020; REN *et al.*, 2022). Porém, alguns artigos não especificaram o protocolo utilizado, impondo entraves na reprodutibilidade do estudo. Dessa forma, a falta de padronização dos ensaios de investigação da atividade antimicrobiana inviabilizou a comparação de resultados, limitando o presente trabalho.

Os microrganismos testados contra biomateriais e dispositivos médicos 3D abrangeram bactérias, fungos e vírus. Notavelmente, as bactérias foram mais exploradas, incluindo *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* e espécies resistentes à meticilina de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Entre os fungos e vírus, *Candida albicans* e SARS-CoV-2 foram os mais investigados, com 17 e 4 estudos, respectivamente (AFGHAH *et al.*, 2020; KARABULUT *et al.*, 2023; PACHO *et al.*, 2023; SULTAN *et al.*, 2019; VAŇKOVÁ *et al.*, 2020; WELCH *et al.*, 2021). Observa-se que investigações mais elaboradas foram conduzidas para o reino protista, incluindo testes *in vivo* e *ex vivo* para avaliar o potencial antimicrobiano de biomateriais e dispositivos 3D (CHEN, Xibao *et al.*, 2019; NINAN *et al.*, 2021; VAN HENGEL, I. A.J. *et al.*, 2020; VAN HENGEL, Ingmar A.J. *et al.*, 2017). No entanto, não foi observado o mesmo para fungos e vírus, limitando-se apenas a testes *in vitro*. Além disso, a reduzida variedade de espécies de fungos e vírus testados destaca uma lacuna na atenção dada a esses patógenos, sugerindo que há áreas inexploradas nos estudos de biomateriais.

Através desta revisão de literatura, foi possível observar que biomateriais e dispositivos médicos 3D são extensivamente investigados para aplicações em engenharia de tecidos, medicina regenerativa, ortopedia, infecções associadas a próteses e tratamento de tecidos infectados. Além disso, constatou-se que o material influencia diretamente na aplicação do produto e no método de impressão 3D utilizado. A incorporação de substâncias antimicrobianas também está relacionada com as metodologias de impressão utilizadas e com as infecções objetos de estudo. Por fim, tornou-se evidente a existência de áreas carentes de investigação, como a notável escassez de biomateriais com propriedades antifúngicas, indicando uma área promissora de estudo para a prospecção de melhores cenários no tratamento de infecções microbianas.

Dessa forma, a revisão proporcionou suporte para o desenvolvimento de um hidrogel imprimível tridimensionalmente para o manejo tópico da criptococose

cutânea, uma das manifestações clínicas da infecção provocada por *Cryptococcus* spp.. A inovadora aplicação da tecnologia de impressão 3D neste estudo revela um apelo científico e clínico no que diz respeito à terapêutica de uma infecção fúngica que acomete tanto indivíduos imunossuprimidos quanto imunocompetentes. Ademais, nota-se que, até o presente momento, não há disponibilidade de uma abordagem tópica no esquema terapêutico vigente. Nesse sentido, a impressão 3D demonstra ser uma ferramenta interessante na produção de formas farmacêuticas personalizáveis e que evitam a manipulação pelo paciente. Assim, o curativo é idealizado, fabricado e entregue acabado – protegendo o produto final de manuseios inapropriados e proporcionando a aplicação correta do protótipo sobre a ferida.

Após a escolha minuciosa de polímeros naturais com adequada biocompatibilidade e desempenho mecânico, conforme reconhecido em literatura, realizou-se a preparação dos hidrogéis poliméricos. Posteriormente, procedeu-se para a etapa de impressão dos géis. A técnica de extrusão de semissólidos foi utilizada no presente estudo empregando uma impressora 3D *Biotechnology Solutions Genesis™* (São Paulo, Brasil). Para a obtenção de maior dureza e resistência do protótipo final, o hidrogel constituído de quitosana e alginato de sódio foi reticulado fisicamente com solução aquosa de cloreto de cálcio, em duas concentrações, como ilustrado na Figura 4. Dessa forma, três sistemas de reticulação foram preparados: sem reticulação e com reticulação (100 mM e 300 mM). Além disso, o antifúngico comercial cetoconazol foi adicionado à formulação, totalizando, finalmente, seis sistemas: sem cetoconazol, três níveis de reticulação e com cetoconazol, três níveis de reticulação.



Figura 4. Representação esquemática das etapas de obtenção do hidrogel 3D

A escolha do cetoconazol foi feita visando um tratamento acessível em custo para o sistema público de saúde, sugerindo o aprimoramento do regime terapêutico vigente utilizando um fármaco já comercializado e compreendido quanto ao seu perfil de segurança, espectro de atividade e utilização. Ademais, o cetoconazol é notoriamente empregado em dermatofitoses, infecções fúngicas superficiais. Nesse contexto, além da atividade anti-*Cryptococcus neoformans* corroborada no presente estudo, sugere-se a potencial atividade do hidrogel desenvolvido contra outros agentes de etiologia fúngica.

Após a determinação do complexo polimérico e seus sistemas, procedeu-se à caracterização físico-química do hidrogel. Os ensaios reológicos evidenciaram o comportamento previsto do material – um gel pseudoplástico que manifesta um comportamento sólido em repouso, com um módulo elástico superior ao viscoso. Em uma determinada tensão de cisalhamento, observa-se um ponto de cruzamento, ou *crossover*, no qual o módulo viscoso supera o elástico ($G'' > G'$) (AMORIM *et al.*, 2021; ÖHRLUND, 2018). Através de ensaios como curva de fluxo, varredura de amplitude e varredura de frequência foi possível determinar características reológicas do hidrogel desenvolvido, bem como relacionar estas informações com a printabilidade do material, averiguada previamente à reologia. O ensaio de varredura de frequência, conduzido sob condições de linearidade viscoelástica, mostrou que o módulo elástico se sobressaiu o viscoso ao longo de todo experimento – indicando estabilidade da matriz polimérica. Isto provavelmente está relacionado com a formação de complexos polieletrólitos que mantêm as cadeias poliméricas firmes através de interações eletrostáticas. Estes complexos já são objeto de estudos para aplicações em liberação modificada de fármacos e recuperação de tecidos (LI, Xiaoxia *et al.*, 2009; MAIZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2021).

Através da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), foi possível observar as bandas clássicas dos polímeros naturais utilizados neste estudo, assim como o efeito da reticulação iônica nas cadeias poliméricas. Além disso, um dos espectros de FTIR indicou a ausência da banda característica de um dos polímeros, possivelmente devido à formação de complexos reticulante-fármaco em altas concentrações do agente de reticulação. Ademais, a formação destes complexos pode estar potencialmente envolvida na alteração da liberação do fármaco, o que requer avaliações futuras para a compreensão deste comportamento e

possíveis alternativas na mudança deste perfil. A análise termogravimétrica (TGA) evidenciou que a reticulação proporcionou maior estabilidade térmica para os hidrogéis sem fármaco. No entanto, observou-se um comportamento oposto em algumas faixas de temperatura para os hidrogéis com antifúngico. Isso pode estar relacionado à formação de complexos reticulante-fármaco, incorporados à malha polimérica. Como resultado, a perda de água é mais evidente e sua evaporação mais rápida em comparação aos géis puros. Entretanto, uma vez que toda a água foi eliminada, nota-se que os hidrogéis com maior nível de reticulação apresentam maior estabilidade térmica, o que é esperado devido a presença das interações iônicas.

Quanto ao intumescimento dos hidrogéis, foi possível observar menores níveis de intumescimento para hidrogéis mais reticulados. Este fenômeno ocorre devido a formação de pontos de reticulação e menor capacidade de absorção de água pela rede polimérica devido ao menor espaçamento entre as cadeias dos polímeros. Este evento é bem descrito na literatura e, como esperado, foi relatado para os hidrogéis com e sem fármaco (DING *et al.*, 2020; KHAN; RANJHA, 2014; NASUTION *et al.*, 2022). No entanto, para os géis sem reticulação, observou-se que aquele que continha cetoconazol resistiu ao intumescimento por mais tempo do que o gel puro. Esse evento pode estar relacionado à incorporação do antifúngico na rede polimérica, intercalando-se entre as cadeias e provocando maior resistência ao inchamento. Neste contexto, a reticulação pode afetar a liberação do cetoconazol, o que destaca a necessidade de futuras investigações acerca do perfil de liberação do hidrogel desenvolvido.

Visualizando a microarquitetura interna dos hidrogéis obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se que a reticulação e a adição do fármaco alteraram a estrutura do material. Os géis não reticulados apresentaram microestruturas ricas em poros, extremamente rugosas e interconectadas. No entanto, os géis reticulados exibiram menos rugosidade, poros e uma superfície que pode sugerir maior fragilidade do material, tornando-o mais quebradiço. Além disso, o gel com fármaco e maior nível de reticulação apresenta uma estrutura que se destaca entre os demais materiais. Este fenômeno pode estar relacionado com a formação de complexos fármaco-reticulante, uma vez que essa estrutura não foi visualizada nos demais hidrogéis.

Quanto a atividade antifúngica, realizou-se algumas modificações no protocolo M44-A da CLSI, não padronizado para *Cryptococcus* spp. Dessa forma, utilizou-se uma cepa ATCC (*American Type Culture Collection*) de *Candida parapsilosis* e um isolado clínico de *Candida albicans* como controles do disco de antifúngico e para fins de comparação – uma vez que o protocolo é padronizado para estas espécies. De maneira positiva, os hidrogéis contendo fármaco demonstraram notável atividade contra as cepas *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (B3501, sorotipo D) e *C. neoformans* var. *grubii* (H99, sorotipo A). No entanto, os hidrogéis puros não demonstraram atividade. Ademais, observou-se que durante o tempo de incubação utilizado (48 h) não foi observada diferença visual no halo de inibição considerando a reticulação dos géis. Este resultado demonstra que, apesar da reticulação “encapsular” o fármaco entre as cadeias poliméricas, sua liberação ocorre em um tempo de até 2 dias. Assim, o hidrogel desenvolvido no presente trabalho apresenta potencial para aplicação no manejo tópico da criptococose cutânea.

Por fim, o ensaio de citotoxicidade demonstrou que o material desenvolvido não apresentou toxicidade contra a linhagem celular V79, modelo saudável de fibroblasto pulmonar de hamster chinês (ONOT *et al.*, 1991). Embora tenham sido observadas diferenças por meio da análise estatística ($p < 0,05$), biomateriais são considerados potencialmente tóxicos pela ISO 10993-5 quando há uma redução superior a 30% na viabilidade celular (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2022), que não foi observada. As diferenças estatísticas podem estar relacionadas ao elevado grau de inchamento, levando a remoção de nutrientes essenciais para a manutenção celular e, conseqüentemente, redução da viabilidade. A formação de complexos reticulante-fármaco é outro fator que pode estar envolvido na redução da viabilidade celular. No entanto, maiores investigações precisam ser realizadas para compreender o atual perfil de toxicidade do hidrogel. A utilização de linhagens celulares epiteliais, por exemplo, prospectaria de forma mais fidedigna o potencial de aplicação do material – o tecido cutâneo.

De maneira geral, o material demonstrou propriedades notáveis para aplicação em tecidos infectados por *Cryptococcus neoformans*. Investigações mais aprofundadas como ensaios de liberação, genotoxicidade, infecção *in vivo*, avaliação da atividade anti-biofilme e sua remoção podem contribuir na comprovação da eficácia

do hidrogel para que, futuramente, estudos clínicos possam utilizar o biomaterial antifúngico desenvolvido neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Em síntese, a revisão sistemática apresentada neste trabalho relevou que as principais aplicações de biomateriais 3D com atividade antimicrobiana abrangem a regeneração de tecidos, ortopedia e revestimento de próteses. Os materiais predominantemente estudados, tais como policaprolactona, ácido polilático, quitosana e hidroxiapatita, destacaram-se pela incorporação eficiente de substâncias antimicrobianas como vancomicina, peptídeos, prata e nanopartículas. No entanto, as investigações destes dispositivos concentraram-se principalmente no combate de bactérias. Nesse contexto, destaca-se o hidrogel 3D aqui desenvolvido, cuja inovação se evidencia pela proposta de alternativas para a criptococose cutânea, infecção fúngica de difícil tratamento. Este biomaterial demonstrou bom desempenho de impressão, propriedade correlacionada de maneira interessante com seu comportamento reológico. Ademais, as propriedades espectroscópicas e térmicas evidenciaram o efeito da reticulação sobre o material, assim como o ensaio de intumescimento, sugerindo potencial aplicação em sistemas de liberação modificada. A incorporação do imidazólico ao hidrogel revelou uma atividade antifúngica notável frente às cepas de *Cryptococcus neoformans*. Adicionalmente, a biocompatibilidade do material – observada para a linhagem celular V79, salienta uma característica fundamental no desenvolvimento de dispositivos médicos e biomateriais. Os resultados encontrados delineiam não apenas o potencial terapêutico do hidrogel desenvolvido, mas também indicam direções promissoras para pesquisas no âmbito dos biomateriais fabricados por impressão 3D. Neste sentido, investigações quanto a liberação do cetoconazol, perfil citotóxico frente a linhagem celular epitelial, atividade anti-biofilme e sua remoção e adesão do biomaterial estabelecem perspectivas do presente trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, J.; PERWEZ, M. S.; DAS, A.; SAHA, P. Development of hydroxyapatite reinforced alginate–chitosan based printable biomaterial-ink. **Nano-Structures and Nano-Objects**, vol. 25, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2020.100630>.
- AFGHAH, F.; ULLAH, M.; SEYYED MONFARED ZANJANI, J.; AKKUS SUT, P.; SEN, O.; EMANET, M.; SANER OKAN, B.; CULHA, M.; MENCELOGLU, Y.; YILDIZ, M.; KOC, B. 3D printing of silver-doped polycaprolactone-poly(propylene succinate) composite scaffolds for skin tissue engineering. **Biomedical Materials (Bristol)**, vol. 15, nº 3, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab7417>.
- AGRAWAL, A.; HUSSAIN, C. M. 3D-Printed Hydrogel for Diverse Applications: A Review. **Gels**, vol. 9, nº 12, p. 960, 7 dez. 2023. DOI 10.3390/gels9120960. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2310-2861/9/12/960>.
- ALVES, A. P. N.; ARANGO-OSPINA, M.; OLIVEIRA, R. L. M. S.; FERREIRA, I. M.; DE MORAES, E. G.; HARTMANN, M.; DE OLIVEIRA, A. P. N.; BOCCACCINI, A. R.; DE SOUSA TRICHÊS, E. 3D-printed β -TCP/S53P4 bioactive glass scaffolds coated with tea tree oil: Coating optimization, in vitro bioactivity and antibacterial properties. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, vol. 111, nº 4, p. 881–894, 1 abr. 2023. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35198>.
- AMORIM, P. A.; D'ÁVILA, M. A.; ANAND, R.; MOLDENAERS, P.; VAN PUYVELDE, P.; BLOEMEN, V. Insights on shear rheology of inks for extrusion-based 3D bioprinting. **Bioprinting**, vol. 22, 1 jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2021.e00129>.
- ASLANYAN, L.; SANCHEZ, D. A.; VALDEBENITO, S.; EUGENIN, E. A.; RAMOS, R. L.; MARTINEZ, L. R. The crucial role of biofilms in *Cryptococcus neoformans* survival within macrophages and colonization of the central nervous system. **Journal of Fungi**, vol. 3, nº 1, 1 mar. 2017. <https://doi.org/10.3390/jof3010010>.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ISO 10993-5 Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos - Prática Padrão para Testes de Citotoxicidade In Vitro. 2022. .
- ASTM. Standard terminology for additive manufacturing technologies. **ASTM International F2792-12a**, , p. 1–9, 2012. .

AWAD, A.; FINA, F.; TRENFIELD, S. J.; PATEL, P.; GOYANES, A.; GAISFORD, S.; BASIT, A. W. 3D printed pellets (Miniprintlets): A novel, multi-drug, controlled release platform technology. **Pharmaceutics**, vol. 11, nº 4, 1 abr. 2019. DOI

10.3390/pharmaceutics11040148. Disponível em:

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040148>. Acessado em: 6 ago. 2023.

AYDOGDU, M. O.; ONER, E. T.; EKREN, N.; ERDEMIR, G.; KURUCA, S. E.; YUCA, E.; BOSTAN, M. S.; EROGLU, M. S.; IKRAM, F.; UZUN, M.; GUNDUZ, O.

Comparative characterization of the hydrogel added PLA/ β -TCP scaffolds produced by 3D bioprinting. **Bioprinting**, vol. 13, 1 mar. 2019a.

<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00046>.

AYDOGDU, M. O.; ONER, E. T.; EKREN, N.; ERDEMIR, G.; KURUCA, S. E.; YUCA, E.; BOSTAN, M. S.; EROGLU, M. S.; IKRAM, F.; UZUN, M.; GUNDUZ, O.

Comparative characterization of the hydrogel added PLA/ β -TCP scaffolds produced by 3D bioprinting. **Bioprinting**, vol. 13, 1 mar. 2019b.

<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2019.e00046>.

AYYOUBI, S.; CERDA, J. R.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, R.; KNIEF, P.; LALATSA, A.; HEALY, A. M.; SERRANO, D. R. 3D printed spherical mini-tablets: Geometry versus composition effects in controlling dissolution from personalised solid dosage forms.

International Journal of Pharmaceutics, vol. 597, 15 mar. 2021. DOI

10.1016/j.ijpharm.2021.120336. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120336>. Acessado em: 6 ago. 2023.

BAE, S. K.; PARK, S. J.; SHIM, E. J.; MUN, J. H.; KIM, E. Y.; SHIN, J. G.; SHON, J. H. Increased oral bioavailability of itraconazole and its active metabolite, 7-

hydroxyitraconazole, when coadministered with a vitamin C beverage in healthy participants. **Journal of Clinical Pharmacology**, vol. 51, nº 3, p. 444–451, mar. 2011. <https://doi.org/10.1177/0091270010365557>.

BAES, H.; CUTSEMB, J. Van. **Primary Cutaneous Cryptococcosis**. [S. l.: s. n.], 1985.

BAI, J.; WANG, H.; GAO, W.; LIANG, F.; WANG, Z.; ZHOU, Y.; LAN, X.; CHEN, X.; CAI, N.; HUANG, W.; TANG, Y. Melt electrohydrodynamic 3D printed poly (ϵ -caprolactone)/polyethylene glycol/roxithromycin scaffold as a potential anti-infective

implant in bone repair. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 576, 25 fev. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118941>.

BANERJEE, U.; GUPTA, K.; VENUGOPAL, P. **A case of prosthetic valve endocarditis caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans***. [S. l.: s. n.], 1997. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article/35/2/139/937734>.

BERGONZI, C.; BIANCHERA, A.; REMAGGI, G.; OSSIPRANDI, M. C.; ZIMETTI, F.; MARCHI, C.; BERNINI, F.; BETTINI, R.; ELVIRI, L. Biocompatible 3d printed chitosan-based scaffolds containing α -tocopherol showing antioxidant and antimicrobial activity. **Applied Sciences (Switzerland)**, vol. 11, nº 16, 2 ago. 2021. <https://doi.org/10.3390/app11167253>.

BERNARD E. BEYT; STEPHEN R. WALTMAN. Cryptococcal Endophthalmitis after Corneal Transplantation. 1978. <https://doi.org/10.1056/NEJM197804132981506>.

BRASIL. Lei nº 9.279 de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Presidência da República Casa Civil, Subchefia para Assuntos Jurídicos**, 1996. .

BRAUN, D. K.; JANSSEN, D. A.; MARCUS, J. R.; KAUFFMAN, C. A. **Cryptococcal Infection of a Prosthetic Dialysis Fistula**. [S. l.: s. n.], 1994.

BRITES, A.; FERREIRA, M.; BOM, S.; GRENHO, L.; CLAUDIO, R.; GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H.; MARTO, J.; SANTOS, C. Fabrication of antibacterial and biocompatible 3D printed Manuka-Gelatin based patch for wound healing applications. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 632, 5 fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122541>.

CASADEVALL, A.; COELHO, C.; CORDERO, R. J. B.; DRAGOTAKES, Q.; JUNG, E.; VIJ, R.; WEAR, M. P. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, vol. 10, nº 1, p. 822–831, 1 jan. 2019. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1431087>.

CERECERES, S.; LAN, Z.; BRYAN, L.; WHITELEY, M.; WILEMS, T.; GREER, H.; ALEXANDER, E. R.; TAYLOR, R. J.; BERNSTEIN, L.; COHEN, N.; WHITFIELD-CARGILE, C.; COSGRIFF-HERNANDEZ, E. Bactericidal activity of 3D-printed hydrogel dressing loaded with gallium maltolate. **APL Bioengineering**, vol. 3, nº 2, 2020. <https://doi.org/10.1063/1.5088801>.

CHARLIER, C.; NIELSEN, K.; DAOU, S.; BRIGITTE, M.; CHRETIEN, F.; DROMER, F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, vol. 77, nº 1, p. 120–127, jan. 2009. <https://doi.org/10.1128/IAI.01065-08>.

CHEN, B.; HUANG, L.; MA, R.; LUO, Y. 3D printed hollow channeled hydrogel scaffolds with antibacterial and wound healing activities. **Biomedical Materials (Bristol)**, vol. 18, nº 4, 1 jul. 2023. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/acd977>.

CHEN, F.; SONG, Z.; GAO, L.; HONG, H.; LIU, C. Hierarchically macroporous/mesoporous POC composite scaffolds with IBU-loaded hollow SiO₂ microspheres for repairing infected bone defects. **Journal of Materials Chemistry B**, vol. 4, nº 23, p. 4198–4205, 2016. <https://doi.org/10.1039/c6tb00435k>.

CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 27, nº 4, p. 980–1024, 1 out. 2014. <https://doi.org/10.1128/CMR.00126-13>.

CHEN, X.; GAO, C.; JIANG, J.; WU, Y.; ZHU, P.; CHEN, G. 3D printed porous PLA/nHA composite scaffolds with enhanced osteogenesis and osteoconductivity in vivo for bone regeneration. **Biomedical Materials (Bristol)**, vol. 14, nº 6, 9 set. 2019. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab388d>.

CHOI, F. D.; JUHASZ, M. L. W.; ATANASKOVA MESINKOVSKA, N. Topical ketoconazole: a systematic review of current dermatological applications and future developments. **Journal of Dermatological Treatment**, vol. 30, nº 8, p. 760–771, 17 nov. 2019. <https://doi.org/10.1080/09546634.2019.1573309>.

CLÁUDIA RACHID COSTA; FERNANDA BEATRIZ DUARTE LULI; JOSÉ ROBERTO CARNEIRO; ALESSANDRA MARQUES CARDOSO. **Infecções fúngicas em pacientes HIV positivos: revisão da literatura sobre criptococose e histoplasmose**. [S. l.: s. n.], 2014.

COX, S. C.; JAMSHIDI, P.; EISENSTEIN, N. M.; WEBBER, M. A.; HASSANIN, H.; ATTALLAH, M. M.; SHEPHERD, D. E. T.; ADDISON, O.; GROVER, L. M. Adding functionality with additive manufacturing: Fabrication of titanium-based antibiotic eluting implants. **Materials Science and Engineering C**, vol. 64, p. 407–415, 1 jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.04.006>.

CROITORU-SADGER, T.; MIZRAHI, B.; YOGEV, S.; SHABTAY-ORBACH, A. Two-component cross-linkable gels for fabrication of solid oral dosage forms. **Journal of Controlled Release**, vol. 303, p. 274–280, 10 jun. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.04.021>.

DENG, L.; DENG, Y.; XIE, K. AgNPs-decorated 3D printed PEEK implant for infection control and bone repair. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 160, p. 483–492, 1 dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.061>.

DING, H.; GENG, J.; LU, Y.; ZHAO, Y.; BAI, B. Impacts of crosslinker concentration on nanogel properties and enhanced oil recovery capability. **Fuel**, vol. 267, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117098>.

DYDAK, K.; JUNKA, A.; SZYMCZYK, P.; CHODACZEK, G.; TOPORKIEWICZ, M.; FIJAŁKOWSKI, K.; DUDEK, B.; BARTOSZEWICZ, M. Development and biological evaluation of Ti6Al7Nb scaffold implants coated with gentamycin-saturated bacterial cellulose biomaterial. **PLoS ONE**, vol. 13, n° 10, 1 out. 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205205>.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Guideline on Quality of Oral Modified Release Products**. Londres: [s. n.], 2014. Disponível em: www.ema.europa.eu.

FAYYAZBAKHS, F.; KHAYAT, M. J.; LEU, M. C. 3D-Printed Gelatin-Alginate Hydrogel Dressings for Burn Wound Healing: A Comprehensive Study. **International Journal of Bioprinting**, vol. 8, n° 4, p. 274–291, 2022.

<https://doi.org/10.18063/ijb.v8i4.618>.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, R.; STTATS, L.; JESUS, J. A.; DEA-AYUELA, M. A.; BOLÁS-FERNÁNDEZ, F.; BALLESTEROS, M. P.; LAURENTI, M. D.; PASSERO, L. F. D.; LALATSA, A.; SERRANO, D. R. Topical Delivery of Amphotericin B Utilizing Transferosomes for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. 4 fev. 2021. [S. l.]: MDPI AG, 4 fev. 2021. p. 26. <https://doi.org/10.3390/iecp2020-08669>.

FOURMANN, O.; HAUSMANN, M. K.; NEELS, A.; SCHUBERT, M.; NYSTRÖM, G.; ZIMMERMANN, T.; SIQUEIRA, G. 3D printing of shape-morphing and antibacterial anisotropic nanocellulose hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, vol. 259, 1 maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117716>.

FU, M. S.; COELHO, C.; DE LEON-RODRIGUEZ, C. M.; ROSSI, D. C. P.; CAMACHO, E.; JUNG, E. H.; KULKARNI, M.; CASADEVALL, A. Cryptococcus neoformans urease affects the outcome of intracellular pathogenesis by modulating phagolysosomal pH. **PLoS Pathogens**, vol. 14, nº 6, 1 jun. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007144>.

GAO, W.; ZHANG, Y.; RAMANUJAN, D.; RAMANI, K.; CHEN, Y.; WILLIAMS, C. B.; WANG, C. C. L.; SHIN, Y. C.; ZHANG, S.; ZAVATTIERI, P. D. The status, challenges, and future of additive manufacturing in engineering. **CAD Computer Aided Design**, vol. 69, p. 65–89, 1 dez. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cad.2015.04.001>.

GARCIA, L. G. S.; GUEDES, G. M. de M.; DA SILVA, M. L. Q.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SIDRIM, J. J. C.; CORDEIRO, R. de A.; ROCHA, M. F. G.; VIEIRA, R. S.; BRILHANTE, R. S. N. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, vol. 195, p. 662–669, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.091>.

GOLÈ NE NEUVILLE, S.; OISE DROMER, F.; MORIN, O.; DUPONT, B.; RONIN, O.; LORTHOLARY, O.; CRYPTOCOCCOSIS, F.; GROUP, S. **Primary Cutaneous Cryptococcosis: A Distinct Clinical Entity**. [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/36/3/337/353592>.

GRANIER, F.; KANITAKIS, J.; HERMIER, C.; ZHU, Y. Y.; THIVOLET, J.; LYON, F. Localized cutaneous cryptococcosis successfully treated with ketoconazole. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 1987. .

GRAYBILL, J. R.; WILLIAMS, D. M.; CUTSEM, E. Van; DRUTZ, D. J. Combination Therapy of Experimental Histoplasmosis and Cryptococcosis with Amphotericin B and Ketoconazole. **REVIEWS OF INFECTIOUS DISEASES**, vol. 2, nº 4, 1980. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/>.

GUPTA, S.; PAUL, K.; KAUR, S. Diverse species in the genus *Cryptococcus*: Pathogens and their non-pathogenic ancestors. **IUBMB Life**, vol. 72, nº 11, p. 2303–2312, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1002/iub.2377>.

GUSHIKEN, A. C.; SAHARIA, K. K.; BADDLEY, J. W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, vol. 35, nº 2, p. 493–514, 1 jun. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.03.012>.

GUTIERREZ, E.; BURDILES, P. A.; QUERO, F.; PALMA, P.; OLATE-MOYA, F.; PALZA, H. 3D Printing of Antimicrobial Alginate/Bacterial-Cellulose Composite Hydrogels by Incorporating Copper Nanostructures. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, vol. 5, nº 11, p. 6290–6299, 11 nov. 2019.

<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01048>.

HAN, G.; KWON, S.; SONG, H.; JEON, J. Disseminated cryptococcosis presenting as cellulitis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, vol. 83, nº 1, p. 89–91, 1 jan. 2017. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.192959>.

HARRIS, J.; LOCKHART, S.; CHILLER, T. Cryptococcus gattii: Where do we go from here? **Medical Mycology**, vol. 50, nº 2, p. 113–129, fev. 2012.

<https://doi.org/10.3109/13693786.2011.607854>.

HE, Y.; LUCKETT, J.; BEGINES, B.; DUBERN, J. F.; HOOK, A. L.; PRINA, E.; ROSE, F. R. A. J.; TUCK, C. J.; HAGUE, R. J. M.; IRVINE, D. J.; WILLIAMS, P.; ALEXANDER, M. R.; WILDMAN, R. D. Ink-jet 3D printing as a strategy for developing bespoke non-eluting biofilm resistant medical devices. **Biomaterials**, vol. 281, 1 fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121350>.

HULL, C. W. **Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. US4575330 A**. [S. l.: s. n.], 1986. Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/US4575330A/en>. Acessado em: 6 ago. 2023.

IBRAHIM, H. K.; SOROUR, R. M. H.; SALAH AD-DIN, I. Application of mathematical modelling to alginate chitosan polyelectrolyte complexes for the prediction of system behavior with Venlafaxine HCl as a model charged drug. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 30, nº 10, p. 1507–1520, 1 out. 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.07.013>.

IDRISS, H.; ELASHNIKOV, R.; RIMPELOVÁ, S.; VOKATÁ, B.; HAUŠILD, P.; KOLSKÁ, Z.; LYUKATOV, O.; ŠVORČÍK, V. Printable resin modified by grafted silver nanoparticles for preparation of antifouling microstructures with antibacterial effect. **Polymers**, vol. 13, nº 21, 1 nov. 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13213838>.

ILHAN, E.; CESUR, S.; GULER, E.; TOPAL, F.; ALBAYRAK, D.; GUNCU, M. M.; CAM, M. E.; TASKIN, T.; SASMAZEL, H. T.; AKSU, B.; OKTAR, F. N.; GUNDUZ, O. Development of Satureja cuneifolia-loaded sodium alginate/polyethylene glycol scaffolds produced by 3D-printing technology as a diabetic wound dressing material. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 161, p. 1040–1054, 15 out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.086>.

INZANA, J. A.; TROMBETTA, R. P.; SCHWARZ, E. M.; KATES, S. L.; AWAD, H. A. **3D printed bioceramics for dual antibiotic delivery to treat implant-associated bone infection Corresponding Author Hani A HHS Public Access**. [S. l.: s. n.], [s. d.].

IYER, K. R.; REVIE, N. M.; FU, C.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 19, nº 7, p. 454–466, 1 jul. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00511-0>.

JAMRÓZ, W.; SZAFRANIEC, J.; KUREK, M.; JACHOWICZ, R. 3D Printing in Pharmaceutical and Medical Applications – Recent Achievements and Challenges. **Pharmaceutical Research**, vol. 35, nº 9, 1 set. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2454-x>.

JARVIS, J. N.; HARRISON, T. S. **HIV-associated cryptococcal meningitis**. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: <http://journals.lww.com/aidsonline>.

JIANG, G.; LI, S.; YU, K.; HE, B.; HONG, J.; XU, T.; MENG, J.; YE, C.; CHEN, Y.; SHI, Z.; FENG, G.; CHEN, W.; YAN, S.; HE, Y.; YAN, R. A 3D-printed PRP-GelMA hydrogel promotes osteochondral regeneration through M2 macrophage polarization in a rabbit model. **Acta Biomaterialia**, vol. 128, p. 150–162, 1 jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.04.010>.

JIN, L.; QI, H.; GU, X.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; MAO, S. Effect of Sodium Alginate Type on Drug Release from Chitosan-Sodium Alginate-Based In Situ Film-Forming Tablets. **AAPS PharmSciTech**, vol. 21, nº 2, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1549-y>.

JOHANNSSON, B.; CALLAGHAN, J. J. Prosthetic hip infection due to *Cryptococcus neoformans*: case report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, vol. 64, n° 1, p. 76–79, maio 2009. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.01.005>.

JOHNSON, M. M.; GAJUREL, K. Disseminated cryptococcosis with cutaneous manifestation. **Transplant Infectious Disease**, vol. 23, n° 1, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1111/tid.13412>.

KAITH, B. S.; SINGH, A.; SHARMA, A. K.; SUD, D. Hydrogels: Synthesis, Classification, Properties and Potential Applications—A Brief Review. **Journal of Polymers and the Environment**, vol. 29, n° 12, p. 3827–3841, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10924-021-02184-5>.

KARABULUT, H.; ULAG, S.; DALBAYRAK, B.; ARISAN, E. D.; TASKIN, T.; GUNCU, M. M.; AKSU, B.; VALANEZHAD, A.; GUNDUZ, O. A Novel Approach for the Fabrication of 3D-Printed Dental Membrane Scaffolds including Antimicrobial Pomegranate Extract. **Pharmaceutics**, vol. 15, n° 3, 1 mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030737>.

KARAMAT-ULLAH, N.; DEMIDOV, Y.; SCHRAMM, M.; GRUMME, D.; AUER, J.; BOHR, C.; BRACHVOGEL, B.; MALEKI, H. 3D Printing of Antibacterial, Biocompatible, and Biomimetic Hybrid Aerogel-Based Scaffolds with Hierarchical Porosities via Integrating Antibacterial Peptide-Modified Silk Fibroin with Silica Nanostructure. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, vol. 7, n° 9, p. 4545–4556, 13 set. 2021. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.1c00483>.

KARYGIANNI, L.; REN, Z.; KOO, H.; THURNHEER, T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. **Trends in Microbiology**, vol. 28, n° 8, p. 668–681, 1 ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>.

KHAN, S.; RANJHA, N. M. Effect of degree of cross-linking on swelling and on drug release of low viscous chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels. **Polymer Bulletin**, vol. 71, n° 8, p. 2133–2158, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00289-014-1178-2>.

KIM, S. J.; LEE, J. C.; KO, J. Y.; LEE, S. H.; KIM, N. A.; JEONG, S. H. 3D-printed tablets using a single-step hot-melt pneumatic process for poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 595, 15 fev. 2021. DOI

10.1016/j.ijpharm.2021.120257. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120257>. Acessado em: 6 ago. 2023.

KRAKOS, A.; CIEŚLAK, A.; HARTEL, E.; ŁABOWSKA, M. B.; KULBACKA, J.; DETYNA, J. 3D bio-printed hydrogel inks promoting lung cancer cell growth in a lab-on-chip culturing platform. **Microchimica Acta**, vol. 190, nº 9, 1 set. 2023.

<https://doi.org/10.1007/s00604-023-05931-8>.

KUMARI, S.; BARGEL, H.; SCHEIBEL, T. Recombinant Spider Silk–Silica Hybrid Scaffolds with Drug-Releasing Properties for Tissue Engineering Applications.

Macromolecular Rapid Communications, vol. 41, nº 1, 1 jan. 2020.

<https://doi.org/10.1002/marc.201900426>.

KUSHAWAHA, A.; MOBARAKAI, N.; PARIKH, N.; BEYLINSON, A. Cryptococcus neoformans meningitis in a diabetic patient - The perils of an overzealous immune response: A case report. **Cases Journal**, vol. 2, nº 11, nov. 2009.

<https://doi.org/10.1186/1757-1626-2-209>.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E.; BACILLI-SPORUS J KWON-CHUNG, C. K.; BENNETT, J. E.; RHODES, J. C.; VAN LEEUWENHOEK MICROBIOL SEROL, A. J. **Improved Diagnostic Medium for Separation of Cryptococcus neoformans var. neoformans (Serotypes A and D) and Cryptococcus neoformans var. gattii (Serotypes B and C) A decision to divide Cryptococcus neoformans into two species, C. neoformans and C. bacillisporus (1), was reversed when a recent critical study on physiological, morphological, and pathological characteristics of. [S. l.: s. n.], 1982.**

LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens**, vol. 2, nº 2, p. 288–356, 13 maio 2013. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>.

LI, J.; WU, C.; CHU, P. K.; GELINSKY, M. 3D printing of hydrogels: Rational design strategies and emerging biomedical applications. **Materials Science and Engineering R: Reports**, vol. 140, 1 abr. 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.mser.2020.100543>.

LI, L.; WANG, L.; SHAO, Y.; NI, R.; ZHANG, T.; MAO, S. Drug release characteristics from chitosan-alginate matrix tablets based on the theory of self-assembled film.

International Journal of Pharmaceutics, vol. 450, n° 1–2, p. 197–207, 25 jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.052>.

LI, N.; KHAN, S. B.; CHEN, S.; AIYITI, W.; ZHOU, J.; LU, B. Promising New Horizons in Medicine: Medical Advancements with Nanocomposite Manufacturing via 3D Printing. **Polymers**, vol. 15, n° 20, 1 out. 2023. <https://doi.org/10.3390/polym15204122>.

LI, P.; FU, L.; LIAO, Z.; PENG, Y.; NING, C.; GAO, C.; ZHANG, D.; SUI, X.; LIN, Y.; LIU, S.; HAO, C.; GUO, Q. Chitosan hydrogel/3D-printed poly(ϵ -caprolactone) hybrid scaffold containing synovial mesenchymal stem cells for cartilage regeneration based on tetrahedral framework nucleic acid recruitment. **Biomaterials**, vol. 278, 1 nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121131>.

LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X. Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. **Polymer Degradation and Stability**, vol. 94, n° 1, p. 1–6, jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2008.10.017>.

LIGON, S. C.; LISKA, R.; STAMPFL, J.; GURR, M.; MÜLHAUPT, R. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. **Chemical Reviews**, vol. 117, n° 15, p. 10212–10290, 9 ago. 2017. DOI 10.1021/acs.chemrev.7b00074. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00074>. Acessado em: 6 ago. 2023.

LIU, C.; WANG, Z.; WEI, X.; CHEN, B.; LUO, Y. 3D printed hydrogel/PCL core/shell fiber scaffolds with NIR-triggered drug release for cancer therapy and wound healing. **Acta Biomaterialia**, vol. 131, p. 314–325, 1 set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.07.011>.

LIU, J.; TAGAMI, T.; OZEKI, T. Fabrication of 3D-printed fish-gelatin-based polymer hydrogel patches for local delivery of pegylated liposomal doxorubicin. **Marine Drugs**, vol. 18, n° 6, 1 jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/md18060325>.

LIU, M.; ZHU, J.; SONG, X.; WEN, Y.; LI, J. Smart Hydrogel Formed by Alginate-g-Poly(N-isopropylacrylamide) and Chitosan through Polyelectrolyte Complexation and Its Controlled Release Properties. **Gels**, vol. 8, n° 7, 1 jul. 2022. <https://doi.org/10.3390/gels8070441>.

LOUREIRO, J.; MIGUEL, S. P.; GALVÁN-CHACÓN, V.; PATROCINIO, D.; PAGADOR, J. B.; SÁNCHEZ-MARGALLO, F. M.; RIBEIRO, M. P.; COUTINHO, P. Three-Dimensionally Printed Hydrogel Cardiac Patch for Infarct Regeneration Based on Natural Polysaccharides. **Polymers**, vol. 15, nº 13, 1 jul. 2023.

<https://doi.org/10.3390/polym15132824>.

LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 64, p. 353–367, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017>.

MA, J.; WU, J.; ZHANG, H.; DU, L.; ZHUANG, H.; ZHANG, Z.; MA, B.; CHANG, J.; WU, C. 3D Printing of Diatomite Incorporated Composite Scaffolds for Skin Repair of Deep Burn Wounds. **International Journal of Bioprinting**, vol. 8, nº 3, p. 163–175, 2022. <https://doi.org/10.18063/IJB.V8I3.580>.

MAHARUBIN, S.; HU, Y.; SOORIYAARACHCHI, D.; CONG, W.; TAN, G. Z. Laser engineered net shaping of antimicrobial and biocompatible titanium-silver alloys. **Materials Science and Engineering C**, vol. 105, 1 dez. 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110059>.

MAHER, S.; LINKLATER, D.; RASTIN, H.; LIAO, S. T. Y.; MARTINS DE SOUSA, K.; LIMA-MARQUES, L.; KINGSHOTT, P.; THISSEN, H.; IVANOVA, E. P.; LOSIC, D. Advancing of 3D-Printed Titanium Implants with Combined Antibacterial Protection Using Ultrasharp Nanostructured Surface and Gallium-Releasing Agents. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, vol. 8, nº 1, p. 314–327, 10 jan. 2022.

<https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.1c01030>.

MAITY, N.; MANSOUR, N.; CHAKRABORTY, P.; BYCHENKO, D.; GAZIT, E.; COHN, D. A Personalized Multifunctional 3D Printed Shape Memory-Displaying, Drug Releasing Tracheal Stent. **Advanced Functional Materials**, vol. 31, nº 50, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1002/adfm.202108436>.

MAIZ-FERNÁNDEZ, S.; BARROSO, N.; PÉREZ-ÁLVAREZ, L.; SILVÁN, U.; VILAS-VILELA, J. L.; LANCEROS-MENDEZ, S. 3D printable self-healing hyaluronic acid/chitosan polycomplex hydrogels with drug release capability. **International**

Journal of Biological Macromolecules, vol. 188, p. 820–832, 1 out. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.022>.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*

. **Microbiology Spectrum**, vol. 3, nº 3, 18 jun. 2015.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mb-0006-2014>.

MAY, R. C.; STONE, N. R. H.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K.

Cryptococcus: From environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews**

Microbiology, vol. 14, nº 2, p. 106–117, 1 fev. 2016.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>.

MEDARIS, L. A.; PONCE, B.; HYDE, Z.; DELGADO, D.; ENNIS, D.; LAPIDUS, W.;

LARRISON, M.; PAPPAS, P. G. Cryptococcal osteomyelitis: A report of 5 cases and

a review of the recent literature. **Mycoses**, vol. 59, nº 6, p. 334–342, 1 jun. 2016.

<https://doi.org/10.1111/myc.12476>.

MENDOZA, G.; REGIEL-FUTYRA, A.; TAMAYO, A.; MONZON, M.; IRUSTA, S.; DE

GREGORIO, M. A.; KYZIOŁ, A.; ARRUEBO, M. Chitosan-based coatings in the

prevention of intravascular catheter-associated infections. **Journal of Biomaterials**

Applications, vol. 32, nº 6, p. 725–737, 1 jan. 2018.

<https://doi.org/10.1177/0885328217739199>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Criptococose. [s. d.]. Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/criptococose>. Acessado em: 19 dez. 2023a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Flucitosina para o tratamento de pacientes com meningite criptocócica e demais formas de neurocriptococose. 2021a. Disponível em:

<https://www.gov.br/conitec/pt->

[br/midias/consultas/relatorios/2021/Sociedade/20210602_resoc249_flucitosina_meningite_final.pdf](https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2021/Sociedade/20210602_resoc249_flucitosina_meningite_final.pdf). Acessado em: 22 jan. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde incorpora medicamento para

meningite criptocócica. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no**

Sistema Único de Saúde, 2021b. Disponível em: [http://antigo-](http://antigo-conitec.saude.gov.br/ministerio-da-saude-incorpora-medicamento-para-meningite-criptococica)

[conitec.saude.gov.br/ministerio-da-saude-incorpora-medicamento-para-meningite-criptococica](http://antigo-conitec.saude.gov.br/ministerio-da-saude-incorpora-medicamento-para-meningite-criptococica). Acessado em: 20 dez. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.conass.org.br/wp-content/uploads/2022/01/RENAME-2022.pdf>. Acessado em: 22 jan. 2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SUS ganha novo teste para diagnóstico de meningite criptocócica. 2021c. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde**. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2021/junho/sus-ganha-novo-teste-para-diagnostico-de-meningite-criptococica>. Acessado em: 19 dez. 2023b.

MOHAPATRA, L.; DIXIT, N.; AGRAWAL, I.; KAR, B. R.; SINGH, B. S. T. P. Comparison of Efficacy and Safety between Super-bioavailable Itraconazole and Conventional Itraconazole in the Treatment of Tinea Infection of Glabrous Skin – A Randomised Observer-blinded Pilot Study. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, vol. 17, nº 3, p. 1776–1782, 1 set. 2023. <https://doi.org/10.22207/JPAM.17.3.42>.

MONTOYA, M. C.; MAGWENE, P. M.; PERFECT, J. R. Associations between cryptococcus genotypes, phenotypes, and clinical parameters of human disease: A review. **Journal of Fungi**, vol. 7, nº 4, 1 abr. 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7040260>.

MOSLEM, M.; FATAHINIA, M.; KIASAT, N.; MAHMOUDABADI, A. Z. Predominance of cryptococcus neoformans var. Grubii in ahvaz, molecular identification and evaluation of virulence factors. **Jundishapur Journal of Microbiology**, vol. 13, nº 11, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.5812/jjm.112408>.

MOSTAFAEI, A.; ELLIOTT, A. M.; BARNES, J. E.; LI, F.; TAN, W.; CRAMER, C. L.; NANDWANA, P.; CHMIELUS, M. Binder jet 3D printing—Process parameters, materials, properties, modeling, and challenges. **Progress in Materials Science**, vol. 119, 1 jun. 2021. DOI 10.1016/j.pmatsci.2020.100707. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2020.100707>. Acessado em: 6 ago. 2023.

NANOFFF, P.; TAHA, M.; MUGISHA, P.; NENOFF, P.; SAYED, E. Subcutaneous and Deep Fungus Infections In book :Pigmented Ethnic Skin and Imported dermatoses. **Pigmented Ethnic Skin and Imported Dermatoses**, 2018. DOI

10.1007/978-3-319-69422-1-6. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/327222095>.

NARCISO, F.; CARDOSO, S.; MONGE, N.; LOURENÇO, M.; MARTIN, V.; DUARTE, N.; SANTOS, C.; GOMES, P.; BETTENCOURT, A.; RIBEIRO, I. A. C. 3D-printed biosurfactant-chitosan antibacterial coating for the prevention of silicone-based associated infections. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 230, 1 out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113486>.

NASUTION, H.; HARAHAP, H.; DALIMUNTHER, N. F.; GINTING, M. H. S.; JAAFAR, M.; TAN, O. O. H.; ARUAN, H. K.; HERFANANDA, A. L. Hydrogel and Effects of Crosslinking Agent on Cellulose-Based Hydrogels: A Review. **Gels**, vol. 8, nº 9, 1 set. 2022. <https://doi.org/10.3390/gels8090568>.

NIE, R.; SUN, Y.; LV, H.; LU, M.; HUANGFU, H.; LI, Y.; ZHANG, Y.; WANG, D.; WANG, L.; ZHOU, Y. 3D printing of MXene composite hydrogel scaffolds for photothermal antibacterial activity and bone regeneration in infected bone defect models. **Nanoscale**, vol. 14, nº 22, p. 8112–8129, 12 maio 2022. <https://doi.org/10.1039/d2nr02176e>.

NINAN, N.; JOSEPH, B.; VISALAKSHAN, R. M.; BRIGHT, R.; DENOUAL, C.; ZILM, P.; DALVI, Y. B.; PRIYA, P. V.; MATHEW, A.; GROHENS, Y.; KALARIKKAL, N.; VASILEV, K.; THOMAS, S. Plasma assisted design of biocompatible 3D printed PCL/silver nanoparticle scaffolds: In vitro and in vivo analyses. **Materials Advances**, vol. 2, nº 20, p. 6620–6630, 21 out. 2021. <https://doi.org/10.1039/d1ma00444a>.

NIZIOŁ, M.; PALECZNY, J.; JUNKA, A.; SHAVANDI, A.; DAWIEC-LIŚNIEWSKA, A.; PODSTAWCZYK, D. 3d printing of thermoresponsive hydrogel laden with an antimicrobial agent towards wound healing applications. **Bioengineering**, vol. 8, nº 6, 1 jun. 2021. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8060079>.

NOGUCHI, H.; MATSUMOTO, T.; KIMURA, U.; HIRUMA, M.; KUSUHARA, M.; IHN, H. **Cutaneous Cryptococcosis**. [S. l.: s. n.], 2019.

ÖHRLUND, Å. Evaluation of Rheometry Amplitude Sweep Cross-Over Point as an Index of Flexibility for HA Fillers. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, vol. 08, nº 02, p. 47–54, 2018. <https://doi.org/10.4236/jcdsa.2018.82008>.

ONOT, M. R.; DE ANGELIS~, I.; FORTUNATI~, E.; REOOTANI, D.; BTA~CM~, V.; TIOZZO, R.; ZUCCOT, F. **CHOICE AND STANDARDIZATION OF TEST PROTOCOLS IN CYTOTOXICOLOGY: A MULTICENTRE APPROACH.** [S. l.: s. n.], 1991.

PACHO, M. O.; DEENEY, D.; JOHNSON, E. A.; BRAVO, B. N.; PATEL, K.; LATTA, M. A.; BELSHAN, M. A.; GROSS, S. M. Characterization of Ag-Ion Releasing Zeolite Filled 3D Printed Resins. **Journal of Functional Biomaterials**, vol. 14, n° 1, 1 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/jfb14010007>.

PERI, A. M.; ROSSIO, R.; TAFURI, F.; BENZECRY, V.; GRANCINI, A.; REDA, G.; BANDERA, A.; PEYVANDI, F. Atypical primary cutaneous cryptococcosis during ibrutinib therapy for chronic lymphocytic leukemia. **Annals of Hematology**, vol. 98, n° 12, p. 2847–2849, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00277-019-03837-1>.

PUTRA, N. E.; LEEFLANG, M. A.; DUCRET, V.; PATRULEA, V.; FRATILA-APACHITEI, L. E.; PERRON, K.; YE, H.; ZHOU, J.; APACHITEI, I.; ZADPOOR, A. A. Preventing Antibiotic-Resistant Infections: Additively Manufactured Porous Ti6Al4V Biofunctionalized with Ag and Fe Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 23, n° 21, 1 nov. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms232113239>.

RAJASINGHAM, R.; SMITH, R. M.; PARK, B. J.; JARVIS, J. N.; GOVENDER, N. P.; CHILLER, T. M.; DENNING, D. W.; LOYSE, A.; BOULWARE, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, vol. 17, n° 8, p. 873–881, 1 ago. 2017. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30243-8).

RAJESH, N. U.; COATES, I.; DRISKILL, M. M.; DULAY, M. T.; HSIAO, K.; ILYIN, D.; JACOBSON, G. B.; KWAK, J. W.; LAWRENCE, M.; PERRY, J.; SHEA, C. O.; TIAN, S.; DESIMONE, J. M. 3D-Printed Microarray Patches for Transdermal Applications. **JACS Au**, vol. 2, n° 11, p. 2426–2445, 28 nov. 2022. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00432>.

RANDHAWA, H. S.; PALIWAL, D. K. **Occurrence and Significance of Cryptococcus neoformans in the Oropharynx and on the Skin of a Healthy Human Population.** [S. l.: s. n.], 1977.

RASTIN, H.; RAMEZANPOUR, M.; HASSAN, K.; MAZINANI, A.; TUNG, T. T.; VREUGDE, S.; LOSIC, D. 3D bioprinting of a cell-laden antibacterial polysaccharide hydrogel composite. **Carbohydrate Polymers**, vol. 264, 15 jul. 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117989>.

RATHORE, S. S.; SATHIYAMOORTHY, J.; LALITHA, C.; RAMAKRISHNAN, J. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. **Microbial Pathogenesis**, vol. 166, 1 maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105521>.

REES, D. A. POLYSACCHARIDE SHAPES AND THEIR INTERACTIONS-SOME RECENT ADVANCES. **Pure and Applied Chemistry**, vol. 53, p. 1–14, 1981. .

REN, J.; MURRAY, R.; WONG, C. S.; QIN, J.; CHEN, M.; TOTSIKA, M.; RIDDELL, A. D.; WARWICK, A.; RUKIN, N.; WOODRUFF, M. A. Development of 3D Printed Biodegradable Mesh with Antimicrobial Properties for Pelvic Organ Prolapse.

Polymers, vol. 14, nº 4, 1 fev. 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14040763>.

ROUDBARY, M.; VAHEDI-SHAHANDASHTI, R.; SANTOS, A. L. S. dos; ROUDBAR MOHAMMADI, S.; ASLANI, P.; LASS-FLÖRL, C.; RODRIGUES, C. F. Biofilm formation in clinically relevant filamentous fungi: a therapeutic challenge. **Critical Reviews in Microbiology**, vol. 48, nº 2, p. 197–221, 2022.

<https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1950121>.

SABIITI, W.; MAY, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Future Microbiology**, vol. 7, nº 11, p. 1297–1313, nov. 2012. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.102>.

SCHOELLER, J.; ITEL, F.; WUERTZ-KOZAK, K.; GAISER, S.; LUISIER, N.; HEGEMANN, D.; FERGUSON, S. J.; FORTUNATO, G.; ROSSI, R. M. pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complexes on electrospun PLGA nanofibers for controlled drug release. **Nanomaterials**, vol. 11, nº 7, 1 jul. 2021.

<https://doi.org/10.3390/nano11071850>.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Nota Informativa Nº 9/2022-**

CGDR/DCCI/SVS/MS. Brasília, Brasil: [s. n.], 2022. Disponível em:

https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/notas-informativas/2022/sei_ms-0030218535-nota-informativa.pdf. Acessado em: 22 jan. 2024.

SEOANE-VIAÑO, I.; JANUSKAITE, P.; ALVAREZ-LORENZO, C.; BASIT, A. W.; GOYANES, A. Semi-solid extrusion 3D printing in drug delivery and biomedicine: Personalised solutions for healthcare challenges. **Journal of Controlled Release**, vol. 332, p. 367–389, 10 abr. 2021. DOI 10.1016/j.jconrel.2021.02.027. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.02.027>. Acessado em: 6 ago. 2023.

SHAH, N. B.; SHOHAM, S.; NAYAK, S. Cryptococcus neoformans Prosthetic Joint Infection: Case Report and Review of the Literature. **Mycopathologia**, vol. 179, nº 3–4, p. 275–278, 1 abr. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9847-0>.

SHAH, P. N.; MARSHALL-BATTY, K. R.; SMOLEN, J. A.; TAGAEV, J. A.; CHEN, Q.; RODESNEY, C. A.; LE, H. H.; GORDON, V. D.; GREENBERG, D. E.; CANNON, C. L. Antimicrobial Activity of Ibuprofen against Cystic Fibrosis-Associated Gram-Negative Pathogens. 2018. DOI 10.1128/AAC. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC>.

SHARMA, P. K.; CHOUDHURY, D.; YADAV, V.; MURTY, U. S. N.; BANERJEE, S. 3D printing of nanocomposite pills through desktop vat photopolymerization (stereolithography) for drug delivery reasons. **3D Printing in Medicine**, vol. 8, nº 1, dez. 2022. <https://doi.org/10.1186/s41205-022-00130-2>.

SHI, K.; SLAVAGE, J. P.; MANIRUZZAMAN, M.; NOKHODCHI, A. Role of release modifiers to modulate drug release from fused deposition modelling (FDM) 3D printed tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 597, 15 mar. 2021. DOI 10.1016/j.ijpharm.2021.120315. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120315>. Acessado em: 6 ago. 2023.

SINGH, N.; SIFRI, C. D.; SILVEIRA, F. P.; MILLER, R.; GREGG, K. S.; HUPRIKAR, S.; LEASE, E. D.; ZIMMER, A.; STEPHEN DUMMER, J.; SPAK, C. W.; KOVAL, C.; BANACH, D. B.; SHROFF, M.; LE, J.; OSTRANDER, D.; AVERY, R.; EID, A.; RAZONABLE, R. R.; MONTERO, J.; ... SUN, H. Y. Cryptococcosis in patients with cirrhosis of the liver and posttransplant outcomes. **Transplantation**, vol. 99, nº 10, p. 2132–2141, 2015. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000690>.

SIVARAJ, V.; KULASEGARAM, R.; RICKABY, W.; DWYER, E. Rare presentation of cutaneous cryptococcosis in advanced HIV. **BMJ Case Reports**, vol. 11, nº 1, 2018. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-227247>.

SULTAN, A. S.; RIZK, A. M.; VILA, T.; JI, Y.; MASRI, R.; JABRA-RIZK, M. A. Digital design of a universal rat intraoral device for therapeutic evaluation of a topical formulation against Candida-associated denture stomatitis. **Infection and Immunity**, vol. 87, nº 12, 1 dez. 2019. <https://doi.org/10.1128/IAI.00617-19>.

TABASSUM, S.; RAHMAN, A.; HEREKAR, F.; MASOOD, S. Cryptococcal meningitis with secondary cutaneous involvement in an immunocompetent host. **Journal of Infection in Developing Countries**, vol. 7, nº 9, p. 680–685, set. 2013. <https://doi.org/10.3855/jidc.2622>.

TALEBIAN, S.; SHIM, I. K.; FOROUGH, J.; ORIVE, G.; VINE, K. L.; KIM, S. C.; WALLACE, G. G. 3D-printed coaxial hydrogel patches with mussel-inspired elements for prolonged release of gemcitabine. **Polymers**, vol. 13, nº 24, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.3390/polym13244367>.

TAN, Y. J. N.; YONG, W. P.; LOW, H. R.; KOCHHAR, J. S.; KHANOLKAR, J.; LIM, T. S. E.; SUN, Y.; WONG, J. Z. E.; SOH, S. Customizable drug tablets with constant release profiles via 3D printing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 598, 1 abr. 2021. DOI 10.1016/j.ijpharm.2021.120370. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120370>. Acessado em: 6 ago. 2023.

TAVAKOLI, S.; KLAR, A. S. Advanced hydrogels as wound dressings. **Biomolecules**, vol. 10, nº 8, p. 1–20, 1 ago. 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10081169>.

TEMFACK, E.; BOYER-CHAMMARD, T.; LAWRENCE, D.; DELLIERE, S.; LOYSE, A.; LANTERNIER, F.; ALANIO, A.; LORTHOLARY, O. New Insights Into Cryptococcus Spp. Biology and Cryptococcal Meningitis. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, vol. 19, nº 10, 1 out. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11910-019-0993-0>.

TOPLIS, B.; BOSCH, C.; SCHWARTZ, I. S.; KENYON, C.; BOEKHOUT, T.; PERFECT, J. R.; BOTHA, A. The virulence factor urease and its unexplored role in the metabolism of Cryptococcus neoformans. **FEMS Yeast Research**, vol. 20, nº 4, 2020. <https://doi.org/10.1093/FEMSYR/FOAA031>.

TSEGAY, F.; ELSHERIF, M.; ALAM, F.; BUTT, H. Smart 3D Printed Auxetic Hydrogel Skin Wound Dressings. **ACS Applied Bio Materials**, vol. 5, n° 12, p. 5545–5553, 19 dez. 2022. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00388>.

TULLY, J. J.; MELONI, G. N. A Scientist's Guide to Buying a 3D Printer: How to Choose the Right Printer for Your Laboratory. **Analytical Chemistry**, vol. 92, n° 22, p. 14853–14860, 17 nov. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03299>.

TURNER, N. A.; SHARMA-KUINKEL, B. K.; MASKARINEC, S. A.; EICHENBERGER, E. M.; SHAH, P. P.; CARUGATI, M.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 17, n° 4, p. 203–218, 1 abr. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>.

TURNER, R. D.; WINGHAM, J. R.; PATERSON, T. E.; SHEPHERD, J.; MAJEWSKI, C. Use of silver-based additives for the development of antibacterial functionality in Laser Sintered polyamide 12 parts. **Scientific Reports**, vol. 10, n° 1, 1 dez. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57686-4>.

UNAGOLLA, J. M.; JAYASURIYA, A. C. Drug transport mechanisms and in vitro release kinetics of vancomycin encapsulated chitosan-alginate polyelectrolyte microparticles as a controlled drug delivery system. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 114, p. 199–209, 1 mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.012>.

VAN DAELE, R.; SPRIET, I.; WAUTERS, J.; MAERTENS, J.; MERCIER, T.; VAN HECKE, S.; BRÜGGEMANN, R. Antifungal drugs: What brings the future? 57., 1 jun. 2019. **Medical Mycology** [...]. [S. l.]: Oxford University Press, 1 jun. 2019. vol. 57, p. S328–S343. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz012>.

VAN HENGEL, I. A.J.; TIEROLF, M. W. A. M.; VALERIO, V. P. M.; MINNEBOO, M.; FLUIT, A. C.; FRATILA-APACHITEI, L. E.; APACHITEI, I.; ZADPOOR, A. A. Self-defending additively manufactured bone implants bearing silver and copper nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry B**, vol. 8, n° 8, p. 1589–1602, 28 fev. 2020. <https://doi.org/10.1039/c9tb02434d>.

VAN HENGEL, Ingmar A.J.; RIOOL, M.; FRATILA-APACHITEI, L. E.; WITTEBOUMA, J.; FARRELL, E.; ZADPOOR, A. A.; ZAAT, S. A. J.; APACHITEI, I.

Selective laser melting porous metallic implants with immobilized silver nanoparticles kill and prevent biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Biomaterials, vol. 140, p. 1–15, 1 set. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.030>.

VAŇKOVÁ, E.; KAŠPAROVÁ, P.; KHUN, J.; MACHKOVÁ, A.; JULÁK, J.; SLÁMA, M.; HODEK, J.; ULRYCHOVÁ, L.; WEBER, J.; OBROVÁ, K.; KOSULIN, K.; LION, T.; SCHOLTZ, V. Polylactic acid as a suitable material for 3D printing of protective masks in times of COVID-19 pandemic. **PeerJ**, vol. 8, 29 out. 2020.

<https://doi.org/10.7717/peerj.10259>.

VIVERO-LOPEZ, M.; XU, X.; MURAS, A.; OTERO, A.; CONCHEIRO, A.; GAISFORD, S.; BASIT, A. W.; ALVAREZ-LORENZO, C.; GOYANES, A. Anti-biofilm multi drug-loaded 3D printed hearing aids. **Materials Science and Engineering C**, vol. 119, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111606>.

WANG, H.; DENG, Z.; CHEN, J.; QI, X.; PANG, L.; LIN, B.; ADIB, Y. T. Y.; MIAO, N.; WANG, D.; ZHANG, Y.; LI, J.; ZENG, X. A novel vehicle-like drug delivery 3D printing scaffold and its applications for a rat femoral bone repairing in vitro and in vivo.

International Journal of Biological Sciences, vol. 16, n° 11, p. 1821–1832, 2020.

<https://doi.org/10.7150/ijbs.37552>.

WANG, X.; QI, J.; ZHANG, W.; PU, Y.; YANG, R.; WANG, P.; LIU, S.; TAN, X.; CHI, B. 3D-printed antioxidant antibacterial carboxymethyl cellulose/ε-polylysine hydrogel promoted skin wound repair. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 187, p. 91–104, 30 set. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.115>.

WELCH, J. L.; XIANG, J.; MACKIN, S. R.; PERLMAN, S.; THORNE, P.; O'SHAUGHNESSY, P.; STRZELECKI, B.; AUBIN, P.; ORTIZ-HERNANDEZ, M.; STAPLETON, J. T. Inactivation of Severe Acute Respiratory Coronavirus Virus 2 (SARS-CoV-2) and Diverse RNA and DNA Viruses on Three-Dimensionally Printed Surgical Mask Materials. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, vol. 42, n° 3, p. 253–260, 1 mar. 2021. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.417>.

YANG, C.; HUANG, Y.; ZHOU, Y.; ZANG, X.; DENG, H.; LIU, Y.; SHEN, D.; XUE, X. *Cryptococcus* escapes host immunity: What do we know? **Frontiers in Cellular and**

Infection Microbiology, vol. 12, 13 out. 2022.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1041036>.

YAO, Z. R.; LIAO, W.; CHEN, R. Management of cryptococcosis in non-HIV-related patients. **Medical Mycology**, vol. 43, nº 3, p. 245–251, maio 2005.

<https://doi.org/10.1080/13693780410001731628>.

YAP, Y. L.; WANG, C.; SING, S. L.; DIKSHIT, V.; YEONG, W. Y.; WEI, J. Material jetting additive manufacturing: An experimental study using designed metrological benchmarks. **Precision Engineering**, vol. 50, p. 275–285, 1 out. 2017. DOI 10.1016/j.precisioneng.2017.05.015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.precisioneng.2017.05.015>. Acessado em: 6 ago. 2023.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, vol. 10, nº 1, p. 490–501, 1 jan. 2019. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1614383>.

ZHANG, B.; TEOH, X. Y.; YAN, J.; GLEADALL, A.; BELTON, P.; BIBB, R.; QI, S. Development of combi-pills using the coupling of semi-solid syringe extrusion 3D printing with fused deposition modelling. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 625, 25 set. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122140>.

ZHANG, J.; THAKKAR, R.; ZHANG, Y.; MANIRUZZAMAN, M. Structure-function correlation and personalized 3D printed tablets using a quality by design (QbD) approach. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 590, 30 nov. 2020. DOI 10.1016/j.ijpharm.2020.119945. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119945>. Acessado em: 6 ago. 2023.

ZHANG, M.; ZHAO, X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 162, p. 1414–1428, 1 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311>.

ZHANG, Q.; ZHOU, X.; DU, H.; HA, Y.; XU, Y.; AO, R.; HE, C. Bifunctional Hydrogel-Integrated 3D Printed Scaffold for Repairing Infected Bone Defects. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, vol. 9, nº 8, p. 4583–4596, 14 ago. 2023. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.3c00564>.

ZHAO, J.; QIU, P.; WANG, Y.; WANG, Y.; ZHOU, J.; ZHANG, B.; ZHANG, L.; GOU, D. Chitosan-based hydrogel wound dressing: From mechanism to applications, a

review. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 244, 31 jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125250>.

ZHAO, X.; WEI, W.; NIU, R.; LI, Q.; HU, C.; JIANG, S. 3D Printed Intragastic Floating and Sustained-Release Tablets with Air Chambers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 111, nº 1, p. 116–123, 1 jan. 2022. DOI 10.1016/j.xphs.2021.07.010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.07.010>. Acessado em: 6 ago. 2023.

ZHONGXING, L.; SHAOHONG, W.; JINLONG, L.; LIMIN, Z.; YUANZHENG, W.; HAIPENG, G.; JIAN, C. Three-dimensional printed hydroxyapatite bone tissue engineering scaffold with antibacterial and osteogenic ability. **Journal of Biological Engineering**, vol. 15, nº 1, 1 dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13036-021-00273-6>.

ZHOU, G.; LU, Y.; ZHANG, H.; CHEN, Y.; YU, Y.; GAO, J.; SUN, D.; ZHANG, G.; ZOU, H.; ZHONG, Y. A novel pulsed drug-delivery system: Polyelectrolyte layer-by-layer coating of chitosan-alginate microgels. **International Journal of Nanomedicine**, vol. 8, p. 877–887, 2 mar. 2013. <https://doi.org/10.2147/IJN.S38144>.

ZUNIGA, J. M. 3D printed antibacterial prostheses. **Applied Sciences (Switzerland)**, vol. 8, nº 9, 14 set. 2018. <https://doi.org/10.3390/app8091651>.