

NATAN ROBERTO DE BARROS

Desenvolvimento de blendas poliméricas de látex-alginato e látex-colágeno
para aplicação em engenharia de tecidos

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Aluno: Natan Roberto de Barros

Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano

Araraquara

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

B277d Barros, Natan Roberto de
Desenvolvimento de blendas poliméricas de látex-
alginato e látex-colágeno para aplicação em engenharia de
tecidos / Natan Roberto de Barros. – Araraquara : [s.n.], 2020
143 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Rondinelli Donizetti Herculano

1. Látex. 2. Engenharia tecidual. 3. Regeneração tecidual
guiada. 4. Cicatrização. 5. Materiais biomédicos. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "DESENVOLVIMENTO DE BLENDS POLIMÉRICAS DE LÁTEX-ALGINATO E LÁTEX-COLÁGENO PARA APLICAÇÃO EM ENGENHARIA DE TECIDOS"

AUTOR: NATAN ROBERTO DE BARROS

ORIENTADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof.^a Dr.^a ANDRÉA MARCIA MARCACCINI

Departamento de Odontologia / Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP - Ribeirão Preto

Prof. Dr. RICARDO JOSÉ MENDONÇA

Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM - Uberaba

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI

Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. REINALDO MARCHETTO

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 20 de maio de 2020

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Natan Roberto de Barros

Nome em citações bibliográficas: Barros, NR; Barros, N.R.; N.R. Barros; De Barros, NR.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara

Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 - s/n - Campos Ville - Araraquara/SP - CEP 14800-903

(Núcleo de Proteomica).

FORMAÇÃO ACADEMICA/TITULAÇÃO

- Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), Instituto de Química, Araraquara-SP, Brasil.

Março 2016 – Maio 2020: Doutorado em Biotecnologia

- Universidade Estadual Paulista ‘Júlio de Mesquita Filho’ (UNESP), Instituto de Química, Araraquara-SP, Brasil.

Março 2014 – Fevereiro 2016: Mestrado em Biotecnologia

- Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA), Assis-SP, Brasil.

Fevereiro 2010 – Janeiro 2014 Bacharel em Química industrial; e Licenciatura em Química.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

- Estágio na University of California, Los Angeles (UCLA).

Novembro 2018 – Outubro 2019: **Visiting Researcher** “A Multifunctional Human Skin-on-a-chip Platform with Bioprinted Vessel Network, 3D Dermis, and Multilayered Epidermis Skin Model”

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

ALMEIDA, G. F. B. et al. Controlled drug delivery system by fs-laser micromachined biocompatible rubber latex membranes. **Applied Surface Science**, v. 506, p. 144762, 2020.

ASHAMMAKHI, N. et al. Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. **Materials Today Bio**, v. 1, p. 100008, 2019.

ASHAMMAKHI, N. et al. Gut-on-a-chip: Current progress and future opportunities. **Biomaterials**, p. 120196, 2020.

BARROS, N. R. DE et al. Diclofenac Potassium Transdermal Patches Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. **Journal of Materials**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

BARROS, N. R. DE et al. Natural rubber latex: Development and in vitro characterization of a future transdermal patch for enuresis treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66, n. 17, p. 871–876, 2017.

BORGES, F. et al. Casearia sylvestris Swartz Extract Release Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 12, p. 1420–1430, 2014.

BORGES, F. A. et al. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 39, 2017.

DE BARROS, N. R. et al. Oxytocin Sustained Release Using Natural Rubber Latex Membranes. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 22, n. 4, 2016.

DE BARROS, N. R. et al. Natural rubber latex biodevice as controlled release system for chronic wounds healing. **Biomedical Physics and Engineering Express**, v. 4, n. 3, 2018.

DE BARROS, N. R. et al. Natural latex-glycerol dressing to reduce nipple pain and healing the skin in breastfeeding women. **Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)**, v. 25, n. 4, p. 461–468, jul. 2019.

DIAS MURBACH, H. et al. Ciprofloxacin release using natural rubber latex membranes as carrier. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, 2014.

FETAH, K. et al. The emergence of 3D bioprinting in organ-on-chip systems. **Progress in Biomedical Engineering**, 2019.

FLORIANO, J. et al. Physical, Chemical and Biological Characterization of Natural Rubber Latex Membranes Loaded with Cordia verbenacea DC. Extract. **Current Traditional Medicine**, v. 04, 27 abr. 2018a.

FLORIANO, J. F. et al. Ketoprofen Loaded in Natural Rubber Latex Transdermal Patch for Tendinitis Treatment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 6, p. 2281–2289, 2018b.

GARMS, B. et al. Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2017.

GARMS, B. C. et al. Novel polymeric dressing to the treatment of infected chronic wound. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 0123456789, 2019.

MIRANDA, M. C. R. et al. Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 28, n. 18, p. 2117–2130, 2017.

MIRANDA, M. C. R. et al. Evaluation of peptides release using a natural rubber latex biomembrane as a carrier. **Amino acids**, v. 50, n. 5, p. 503–511, maio 2018.

MORISE, B. T. et al. Scopolamine loaded in natural rubber latex as a future transdermal patch for sialorrhoea treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 68, n. 13, p. 788–795, set. 2019.

NUNES, L. V. et al. Lactic acid production from submerged fermentation of broken rice using undefined mixed culture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, 2017.

SEYEDMAHMOUD, R. et al. **Three-Dimensional Bioprinting of Functional Skeletal Muscle Tissue Using Gelatin Methacryloyl-Alginate Bioinks** *Micromachines*, 2019.

ZANCANELA, D. C. et al. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. November 2017, p. 576–582, 2019.

Trabalhos completos publicados em anais e eventos científicos

K. M. Romeira; F. A. Borges; BARROS, N. R.; J. L. F. Cinman; R. G. da Silva; R. D. Herculano. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E MECÂNICAS DE BIOMEMBRANAS DE LÁTEX NATURAL COM EXTRATO VEGETAL. In: **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica CBEB 2014**, 2014, Uberlândia. Biomateriais e Engenharia de Tecidos, 2014.

ROMEIRA, K. M.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; J. L. F. Cinman; SILVA, R. G.; Herculano, R. D. EVALUATION OF PHYSICAL/CHEMICAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF NATURAL LATEX BIOMEMBRANES WITH VEGETABLE EXTRACT. In: **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, 2014, Uberlândia. XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica, 2014.

Trabalhos publicados em anais e eventos científicos

BARROS, N. et al. BB. O látex natural como sistema de liberação sustentada de diclofenaco de potássio. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 37, n. 3, 2016.

BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; Cilli, E. M.; Herculano, R. D. Desmopressin sustained release by natural rubber latex membranes. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2015.

BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; Cilli, E. M.; Herculano, R. D. Desmopressin sustained release by natural rubber latex membranes. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2015.

BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; CHAGAS, P. A. M.; GEMEINDER, J. L. P.; Herculano, R. D. Natural rubber latex as Diclofenac Potassium carrier system. In: **9th Brazilian-German Workshop on Applied Surface Science**, 2016, São Sebastião. 9th BrazilianGerman Workshop on Applied Surface Science, 2016.

BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; CHAGAS, P. A. M.; GEMEINDER, J. L. P.; Herculano, R. D. Natural rubber latex as Diclofenac Potassium carrier system. In: 9th BrazilianGerman Workshop on Applied Surface Science, 2016, São Sebastião. **9th BrazilianGerman Workshop on Applied Surface Science**, 2016.

BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; CHAGAS, P. A. M.; GEMEINDER, J. L. P.; Herculano, R. D. O látex natural como sistema de liberação controlada de diclofenaco de potássio. In: **VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**, 2016, Araraquara. VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/School of Pharmaceutical Sciences, 2016. v. 37.

BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; CHAGAS, P. A. M.; GEMEINDER, J. L. P.; Herculano, R. D. O látex natural como sistema de liberação controlada de diclofenaco de potássio. In: **VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia**, 2016, Araraquara. VI Congresso Científico da UNESP e II Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas/School of Pharmaceutical Sciences, 2016. v. 37.

BARROS, N. R.; NORBERTO, A. M. Q.; MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; MARCELINO, M. Y.; GARMS, B. C.; Herculano, R. D. Scopolamine transdermal patches using natural rubber latex biomembranes to treat swallowing. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2016.

BARROS, N. R.; NORBERTO, A. M. Q.; MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; MARCELINO, M. Y.; GARMS, B. C.; Herculano, R. D. Scopolamine transdermal patches using natural rubber latex biomembranes to treat swallowing. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2016.

BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; MARCELINO, M. Y.; TOLEDO, K. A.; Herculano, R. D. Production of a porous natural rubber latex biomembrane. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2015.

BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; MARCELINO, M. Y.; TOLEDO, K. A.; Herculano, R. D. Production of a porous natural rubber latex biomembrane. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2015.

BORGES, F. A. et al. Use of the NRL as scaffold to the osteoblast MC3T3-E1 for bone regeneration. In: **XIV Brazil MRS Meeting. Anais**. Brazil: 2015 Disponível em: http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:49075684

BOTEGA, C.; SANTOS, R. S.; BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; BORGES, F. A.; MARCELINO, M. Y.; Herculano, R. D. Comparison of drug delivery in dynamic and static prototypes using natural rubber latex as matrix. In: XIV Brazil MRS Meeting, 2015, Rio de Janeiro. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015.

BOTEGA, C.; SANTOS, R. S.; BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; BORGES, F. A.; MARCELINO, M. Y.; Herculano, R. D. Comparison of drug delivery in dynamic and static prototypes using natural rubber latex as matrix. In: XIV Brazil MRS Meeting, 2015, Rio de Janeiro. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015.

CANAAN, J. M. M.; DE BARROS, N. R.; HERCULANO, R. D. BB. Avaliação do potencial antioxidante da soja e derivados. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 40, n. 3, 2019.

DA SILVA, T. V. et al. BB. Desenvolvimento de um adesivo à base de látex para tratamento de infecções fúngicas dérmicas. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, v. 40, n. 3, 2019.

GARMS, B. C.; FRADE, M. A. C.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; Herculano, R. D. Evaluation of mechanical properties and moxifloxacin release in latex membrane for dermal applications. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2015.

GARMS, B. C.; FRADE, M. A. C.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; Herculano, R. D. Evaluation of mechanical properties and moxifloxacin release in latex membrane for dermal applications. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2015.

MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; MENDONCA, R. J.; Herculano, R. D.; Cilli, E. M. Study of controlled release of peptide A1 Hylina using natural rubber látex biomembrane as scaffold. In: **8vo Congreso Latinoamericanode Órganos Artificiales, Biomaterialese Ingeniería de Tejidos**, 2014, Rosario. 8vo Congreso Latinoamericanode Órganos Artificiales, Biomaterialese Ingeniería de Tejidos, 2014.

MIRANDA, M. C. R.; BORGES, F. A.; BARROS, N. R.; MENDONCA, R. J.; Herculano, R. D.; Cilli, E. M. Study of controlled release of peptide A1 Hylina using natural rubber látex biomembrane as scaffold. In: **8vo Congreso Latinoamericanode Órganos Artificiales, Biomaterialese Ingeniería de Tejidos**, 2014, Rosario. 8vo Congreso Latinoamericanode Órganos Artificiales, Biomaterialese Ingeniería de Tejidos, 2014.

SANTOS, R. S.; BOTEAGA, C.; BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; MARCELINO, M. Y.; BORGES, F. A.; Herculano, R. D. Analysis of incorporation and glycerol release on natural latex biomembrane for treatment of mammary injuries. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil MRS Meeting, 2016.

SANTOS, R. S.; BOTEAGA, C.; BARROS, N. R.; MIRANDA, M. C. R.; GARMS, B. C.; MARCELINO, M. Y.; BORGES, F. A.; Herculano, R. D. Analysis of incorporation and glycerol release on natural latex biomembrane for treatment of mammary injuries. In: XIV Brazil MRS Meeting, 2015, Rio de Janeiro. In: **XIV Brazil MRS Meeting**, 2016.

TANAKA, J. L.; BARROS, N. R.; HERCULANO, R. D. BB. Desenvolvimento de um novo adesivo polimérico para tratamento de queimaduras. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, 2019.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Palmieri, D.A.; BARROS, N. R. Participação em banca de Ricardo Soares dos Santos. Análise da incorporação e da liberação do glicerol por biomembranas de látex natural para tratamento de feridas mamárias. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

9th BrazilianGerman Workshop on Applied Surface Science. Natural rubber latex as Diclofenac Potassium carrier system. 2016. (Oficina).

XIV Brazil MRS Meeting. Scopolamine transdermal patches using natural rubber latex biomembranes to treat swallowing. 2015. (Congresso).

XIV Brazil MRS Meeting. Use of the NRL as scaffold to the osteoblast MC3T3-E1 for bone regeneration. 2015. (Congresso).

XIV Brazil MRS Meeting. Evaluation of mechanical properties and moxifloxacin release in latex membrane for dermal applications. 2015. (Congresso).

XIV Brazil MRS Meeting. Analysis of incorporation and glycerol release on natural latex biomembrane for treatment of mammary injuries. 2015. (Congresso).

XIV Brazil MRS Meeting. Desmopressin sustained release by natural rubber latex membranes. 2015. (Congresso).

XIV Brazil MRS Meeting. Production of a porous natural rubber latex biomembrane. 2015. (Congresso).

XIV Brazil MRS Meeting. Comparison of drug delivery in dynamic and static prototypes using natural rubber latex as matrix. 2015. (Congresso).

8vo Congreso Latinoamericano de Órganos Artificiales, Biomateriales e Ingeniería de Tejidos. Study of controlled release of peptide A1 Hyline using natural rubber latex biomembrane as scaffold. 2014. (Congresso).

XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica CBEB 2014. 1. Avaliação das propriedades físico-químicas e mecânicas de biomembranas de látex natural com extrato vegetal. 2014. (Congresso).

14ª SEMANA DE QUÍMICA "TECNOLOGIA QUÍMICA E EMPREENDEDORISMO". 2013. (Seminário).

13ª SEMANA DE QUÍMICA "NANOTECNOLOGIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS". 2012. (Seminário).

12ª SEMANA DE QUÍMICA. 2011. (Seminário).

11ª SEMANA DE QUÍMICA "FITOQUÍMICA E NOVOS MATERIAIS". 2010. (Seminário).

ORIENTAÇÕES

Jean Lucas Tanaka. Estudo da incorporação e liberação de sulfadiazina de prata por membranas de látex natural. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. (Orientador).

Agradecimentos

Aos meus pais, por me terem dado educação, valores e por me terem ensinado a andar. Ao meu pai, por me ensinar que não se deve desistir de seus sonhos. À minha mãe, amor incondicional. Mãe, você que me gerou e me alfabetizou, ensinando-me a ler, viu como aprendi direitinho? A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

A todos os meus familiares. Não citarei nomes, para não me esquecer de ninguém. Mas há aquelas pessoas especiais que diretamente me incentivaram.

Aos modelos em que procuro me espelhar sempre: vô José Roberto (in memoriam) e vô Celso de Barros (in memoriam), amor incondicional eterno, e por me terem ensinado a ser humilde, na essência da palavra. Que falta vocês me fazem! Vó Zilda Roberto e vó Rosenei de Barros pela garra, perseverança e por todo o amor.

Às minhas irmãs, por todo o amor, carinho e força que me deram durante esta importante etapa de minha vida.

Aos amigos que Deus colocou em minha vida e escolhi para conviver incluindo todos os integrantes do Grupo de Biomateriais e Bioengenharia – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP de Araraquara, e do laboratório de Proteômica da mesma instituição, não citarei nomes para não me esquecer de ninguém.

Ao Professor Dr. Rondinelli Donizetti Herculano, meu orientador e exemplo, tanto profissional quanto social, e principalmente por toda confiança e paciência que teve comigo. Quando “crescer”, eu quero ser como você.

Com vocês, queridos, divido a alegria desta experiência.

À CAPES e à FAPESP pelas bolsas concedidas.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O látex de natural, extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, pode estimular a regeneração tecidual, isso ocorre pela formação de capilares sanguíneos que aumentam a vascularização no local de sua aplicação. No entanto, a aplicação do látex natural encontra desafios como o aumento do exsudato quando aplicado em feridas diabéticas, a necessidade de remoção cirúrgica quando utilizado como implante, entre outros. Portanto, é necessário o desenvolvimento de matrizes que apresentem a característica do látex natural de estímulo da regeneração tecidual, aliada à outras propriedades, tais como a absorção de fluídos em aplicações no tratamento de lesões exsudativas, aumento da degradabilidade do material em tratamentos onde o implante é necessário, e o fornecimento de nutrientes que auxiliem na regeneração dos tecidos. O presente trabalho apresenta os resultados do desenvolvimento e caracterização membranas composta por látex natural, alginato e colágeno. Por meio de técnicas padrões de caracterização de biomateriais, foi observado que, devido às suas propriedades mecânicas, químicas e biológicas, membrans híbridas compostos por bNRL, alginato e colágeno mostram uma grande promessa para o tratamento de feridas dérmicas como úlceras diabéticas. A biocompatibilidade das membrans e a capacidade de criar um ambiente favorável ao redor do leito da ferida são características-chave que contribuem para o seu valor em facilitar e acelerar a regeneração de tecidos.

Palavras-Chaves: látex natural, engenharia de tecidos, regeneração tecidual, cicatrização, biomaterial.

ABSTRACT

Natural latex from the rubber tree *Hevea brasiliensis* can stimulate tissue regeneration, this occurs by the formation of blood capillaries that increase vascularization at the site of its application. However, the application of natural latex faces challenges such as increased exudate when applied to diabetic wounds, the need for surgical removal when used as an implant, among others. Therefore, it is necessary to develop matrices that have the characteristic of natural latex to stimulate tissue regeneration, combined with other properties, such as fluid absorption in applications in the treatment of exudative lesions, increased material degradability in treatments where the implant it is necessary, and the supply of nutrients that assist in tissue regeneration. The present work presents the results of the development and characterization of membranes composed of natural latex, alginate, and collagen. Through standard techniques for characterizing biomaterials, it was observed that, due to their mechanical, chemical, and biological properties, membranes composed of bNRL, alginate, and collagen show great promise for the treatment of dermal wounds such as diabetic ulcers. The biocompatibility of the membranes and the ability to create a favorable environment around the wound bed are key characteristics that contribute to its value in facilitating and accelerating tissue regeneration.

Keywords: natural rubber latex, tissue engineering, tissue regeneration, healing, biomaterial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da composição e organização das partículas de borracha suspensas no NRL líquido.....	21
Figura 2: Estrutura molecular do polímero de borracha natural poli(cis-1,4-isopreno).....	22
Figura 3: Micrografias de um segmento do esôfago cervical de cães 7 dias pós-operatório da utilização de implantes de NRLb como substituto parcial. A) grupo NRLb, B) grupo controle.	23
Figura 4: Aplicação de membranas de NRLb sobre a membrana cório-alantóide de embriões de galinha.	24
Figura 5: Evolução do reparo tecidual de úlceras de pressão durante tratamento com utilização de membranas de NRLb como curativo oclusivo.	25
Figura 6: Radiografias de calvárias de coelhos 120 dias pós-operatório. A) NRLb como barreira oclusiva, B) controle, sem uso de barreira oclusiva.....	26
Figura 7: Alginato de Sódio. A) O alginato de sódio é extraído de algas marrons. B) Na presença de íons divalentes, como o cálcio, a reticulação reversível acontece, dando origem ao hidrogel de alginato.....	28
Figura 8: Colágeno. A) Regiões do corpo onde o colágeno é essencial. B) Sequência de aminoácidos que compõem o colágeno.....	32
Figura 9: Produção das membranas de NRLb: da extração do NRL à polimerização das membranas.....	37
Figura 10: Esquema ilustrativo do teste de citotoxicidade por MTT.	42
Figura 11: Membranas de NRLb-alginato.	43
Figura 12: Espectros comparativos de FTIR para as membranas de NRLb: (A) alginato puro e membranas NRLb-alginato, (B) colágeno puro e membranas NRLb-colágeno.....	46
Figura 13: Perfil de tração mecânica para o NRLb puro e para o NRLb com diferentes concentrações de alginato.....	48
Figura 14: Perfil de tração mecânica para o NRLb puro e para o NRLb com diferentes concentrações de colágeno.	50
Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura da superfície e do interior de membranas de NRLb com alginato. (Ampliações de 300, 2000 e 6000x).....	52
Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura da superfície e do interior de membranas de NRLb com colágeno. (ampliações de 300, 2000 e 6000x).	54

Figura 17: Cinética e grau de intumescimento para o NRLb puro e para o NRLb com diferentes concentrações de alginato: (A) Cinética de intumescimento NRLb-alginato, (B) Grau de intumescimento NRLb-alginato.	57
Figura 18: Cinética de intumescimento NRLb-colágeno.....	59
Figura 19: Comparativo do perfil de permeabilidade ao vapor de água apresentado pelas membranas de NRLb e NRLb-alginato.....	61
Figura 20: Comparativo do perfil de permeabilidade ao vapor de água apresentado pelas membranas de NRLb e NRLb-colágeno.	63
Figura 21: Perda de massa de membranas de NRLb após 120 dias: (A) NRLb-alginato, (B) NRLb-colágeno.....	65
Figura 22: Espectros de infravermelho pós perda de massa: (A) NRLb, (B) NRLb-alginato 5%, (C) NRLb-alginato 10%, (D) NRLb-alginato 15%.	67
Figura 23: Espectros de infravermelho pós perda de massa: (A) NRLb-colágeno 5%, (B) NRLb-colágeno 10%, (C) NRLb-colágeno 15%.....	69
Figura 24: Resistência mecânica pós perda de massa: (A) NRLb, (B) NRLb-alginato 5%, (C) NRLb-alginato 10%, (D) NRLb-alginato 15%.....	71
Figura 25: Resistência mecânica pós perda de massa: (A) NRLb-colágeno 5%, (B) NRLb-colágeno 10%, (C) NRLb-colágeno 15%.....	72
Figura 26: Atividade metabólica celular pós 24 horas de incubação com eluatos: (A) fibroblastos, (B) queratinócitos.	74
Figura 27: Atividade metabólica celular pós 24 horas de incubação com diferentes concentrações de Alginato e Colágeno:	75
Figura 32: Influência na proliferação celular em fibroblastos em 72 horas de incubação com eluatos: (A) NRLb-alginato, (B) NRLb-colágeno.	79
Figura 33: Influência na proliferação celular em queratinócitos em 72 horas de incubação com eluatos em 100%: (A) NRLb-alginato, (B) NRLb-colágeno.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de UTS no ponto de ruptura e módulo de Young obtidos para o ensaio de tração mecânica para membranas de NRLb e NRLb-alginato.	48
Tabela 2: Valores de UTS no ponto de ruptura e módulo de Young obtidos para o ensaio de tração mecânica para membranas de NRLb e NRLb-colágeno.....	50
Tabela 3: Taxa de Transferência de Vapor de Água para membranas de NRLb e NRLb-alginato.	62
Tabela 4: Taxa de Transferência de Vapor de Água para membranas de NRLb e NRLb-colágeno.	64
Tabela 5: Resistência mecânica pós perda de massa NRLb-alginato.....	70
Tabela 6: Resistência mecânica pós perda de massa NRLb-colágeno.	70
Tabela 7: Influência dos eluatos de membranas NRLb, NRLb-alginato e NRLb-colágeno na taxa de proliferação de fibroblastos e queratinócitos.....	82
Tabela 8: Influência da presença de alginato e colágeno, em diferentes concentrações, na proliferação de fibroblastos e queratinócitos.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

ATR - Attenuated total reflection (reflexão total atenuada)

CLT - Consolidação das Leis do Trabalho

DMEM - Dulbecco's modified eagle médium (meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

FTIR - Fourier-transform infrared spectroscopy (infravermelho por transformada de Fourier)

GI - Grau de intumescimento

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MTT - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo)

NRL - Natural rubber látex (látex de borracha natural)

NRLb - Natural rubber látex biomedical (látex de borracha natural biomédico)

PBS - Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

TTVA - Taxa de transmissão de vapor d'água

TVA - Transmissão de vapor d'água

UR - Umidade relativa

UTS - Ultimate tensile strength

VEGF - Vascular endothelial growth fator (fator de crescimento endotelial vascular)

CCK-8 - Kit-8 de contagem celular por atividade metabólica (Cell Counting Kit-8)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Látex Natural	21
1.1.1. O látex natural e a angiogênese	23
1.1.2. O látex natural em terapias regenerativas	24
1.2. Alginato	27
1.2.1. Uso do alginato em curativos de feridas	29
1.3. Colágeno	31
1.3.1. Uso do colágeno em curativos de feridas.....	32
2. OBJETIVO	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1. Confeção das membranas	36
3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	38
3.3. Resistência Mecânica	38
3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
3.5. Intumescimento (Grau de Hidratação)	39
3.6. Perda de massa (degradação)	39
3.7. Permeabilidade ao vapor de água	40
3.9. Citotoxicidade indireta	40
3.10. Proliferação celular	42
3.11. Análise estatística	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Confeção das membranas	43
4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier	44
4.3. Ensaio Mecânico	47
4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura	51
4.5. Intumescimento	55
4.6. Permeabilidade ao vapor de água	60
4.7. Perda de massa	64
4.7.1. Perda de massa em submersão aquosa.....	64
4.7.2. FTIR – pós perda de massa	66
4.7.3. Resistência mecânica – pós perda de massa.....	70
4.8. Citotoxicidade indireta	73
4.10. Influência na proliferação celular	77

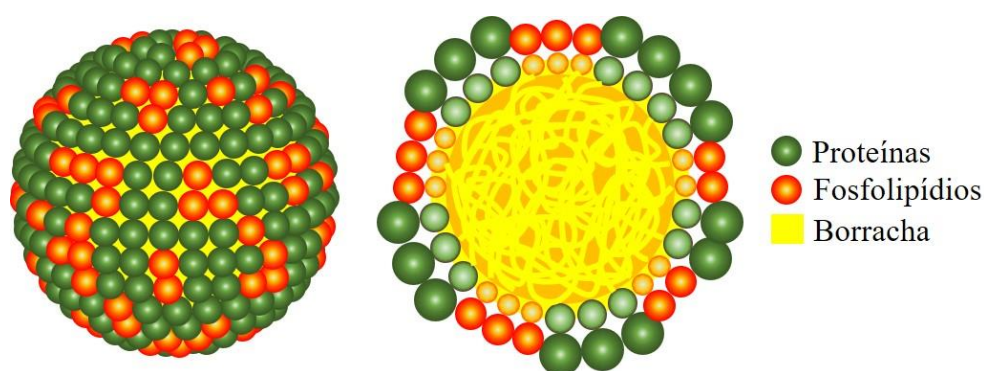
4.10.1. Fibroblastos	78
4.10.2. Queratinócitos.....	80
5. CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXO I.....	98
ANEXO II.....	100
ANEXO III	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Látex Natural

O látex de borracha natural (Natural Rubber Latex – NRL) é extraído da seringueira *Hevea brasiliensis*, uma árvore originária da bacia hidrográfica do Rio Amazonas (HERCULANO et al., 2009). No momento da extração, o NRL é encontrado em sua forma líquida, uma suspensão coloidal de partículas de borracha, estas partículas são envolvidas e estabilizadas por uma fina camada de fosfolipídios e proteínas (**Figura 1**). As partículas de borracha são estabilizadas em suspensão pela repulsão eletrostática das cargas presentes nas moléculas de proteínas e fosfolipídios. Quando a estabilidade da suspensão coloidal é comprometida - isso pode acontecer pela diminuição do pH da suspensão, pela evaporação da água ou pela ação de bactérias que secretam ácidos orgânicos - as partículas de borracha coalescem dando origem ao coagulado de látex, ou látex sólido. A coagulação do NRL é evitada pela adição de hidróxido de amônio, que faz a manutenção do pH em valores acima de 10,0 e contribui para a inibição do crescimento bacteriano. As partículas de borracha presentes no NRL representam 30-45% do volume total e 90% do peso seco do látex. (NAWAMAWAT et al., 2011).

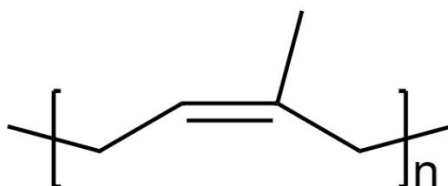
Figura 1: Esquema da composição e organização das partículas de borracha suspensas no NRL líquido.



Fonte: Adaptado de NAWAMAWAT et al., 2011.

A borracha natural consiste principalmente de poli(*cis*-1,4-isopreno) (**Figura 2**), e é um material muito utilizado pelas indústrias para a fabricação de pneus, luvas, balões, peças para equipamentos médicos e odontológicos (HERCULANO et al., 2010; NAWAMAWAT et al., 2011). Esse material é bem aceito devido as suas características físicas tais como elasticidade, plasticidade, resistência mecânica e propriedade de isolamento elétrico.

Figura 2: Estrutura molecular do polímero de borracha natural poli(*cis*-1,4-isopreno).

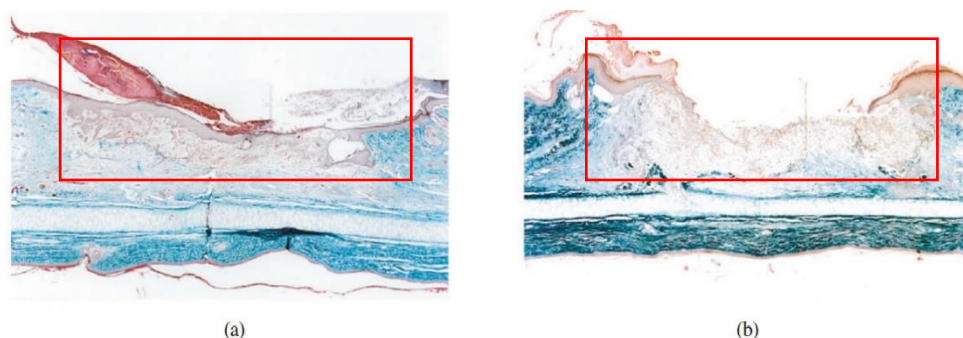


Fonte: Autoria própria.

As pessoas podem desenvolver alergia ao NRL pelo uso repetitivo de produtos onde o látex está presente, como luvas, drenos, torniquetes, cateteres urinários, adesivos curativos, preservativos, fraldas, absorventes, entre outros (ALLARCON et al., 2003). Para que seja possível sua utilização em aplicações biológicas, é necessário que o látex utilizado seja o Látex Biomédico (Natural Rubber Latex biomedical – NRLb). O método de preparo deste látex evita a utilização de produtos químicos como os carbamatos e o enxofre (PINHO et al., 2004). Além disto, algumas proteínas presentes no NRL ainda podem causar reações alérgicas, por este motivo se faz necessário a centrifugação do NRL a 8000g. Quando o NRL é centrifugado, as proteínas solúveis precipitam juntamente da fase mais densa do NRL (soro), tornando possível a remoção das proteínas que são responsáveis pelas reações alérgicas (DE BARROS et al., 2016).

Uma das primeiras aplicações biológicas do NRLb foi realizada por Mrue et al. (2004), os autores utilizaram membranas de NRLb como prótese de um segmento do esôfago cervical de cães. Neste estudo o NRLb funcionaria apenas como uma prótese. No entanto, como pode ser observado na **Figura 3**, para o grupo NRLb (a) houve o reparo tecidual muito mais organizado quando comparado ao grupo controle (b), mostrando que o NRLb teve propriedade indutora da regeneração tecidual. Além de ter sido totalmente eliminado nas fezes dos animais dez dias após o implante, dando lugar à formação de um “neo-esôfago” (MRUE et al., 2004).

Figura 3: Micrografias de um segmento do esôfago cervical de cães 7 dias pós-operatório da utilização de implantes de NRLb como substituto parcial. A) grupo NRLb, B) grupo controle.



Fonte: (MRUE et al., 2004).

1.1.1. O látex natural e a angiogênese

Angiogênese é o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura existente. O reconhecimento por parte da comunidade médica e científica, de que o controle da angiogênese pode ter valor terapêutico, estimulou grande interesse dos pesquisadores nas últimas 5 décadas. O estímulo da angiogênese pode ser terapêutico em cardiopatia isquêmica, doença arterial periférica e na cicatrização de feridas. Por outro lado, diminuir ou inibir a angiogênese pode auxiliar em tratamentos de câncer, condições oftálmicas, artrite reumatoide e outras doenças (FOLKMAN, 2006).

Em um estudo, realizado por Alves (2003), membranas de NRLb foram aplicadas sobre a membrana cório-alantóide de embriões de galinha (pulmão primitivo) para analisar o estímulo de atividade angiogênica causada por vários clones deste material. O autor observou que nos locais onde o NRLb estava em contato com a membrana cório-alantóide, houve a indução da angiogênese (**Figura 4**), conseqüentemente aumentando a densidade de capilares sanguíneos (ALVES, 2003).

Figura 4: Aplicação de membranas de NRLb sobre a membrana cório-alantóide de embriões de galinha.



Fonte: (ALVES, 2003).

Mendonça et al. (2009), por coagulação ácida, fizeram uma extração das proteínas do soro do NRLb. Os autores avaliaram os efeitos da utilização deste soro na permeabilidade vascular, angiogênese e cicatrização de feridas. Os resultados obtidos mostraram que o soro de NRL proporcionou um efeito angiogênico evidente e foi eficaz no aumento da permeabilidade vascular. Além disso, o material acelerou significativamente a cicatrização de feridas. Os autores também demonstraram que o soro fervido e tratado com proteases perdeu essas atividades (MENDONÇA et al., 2010). Com este estudo, os autores deixaram fortes evidências de que proteínas presentes no soro do NRLb são responsáveis pelas atividades observadas para este material.

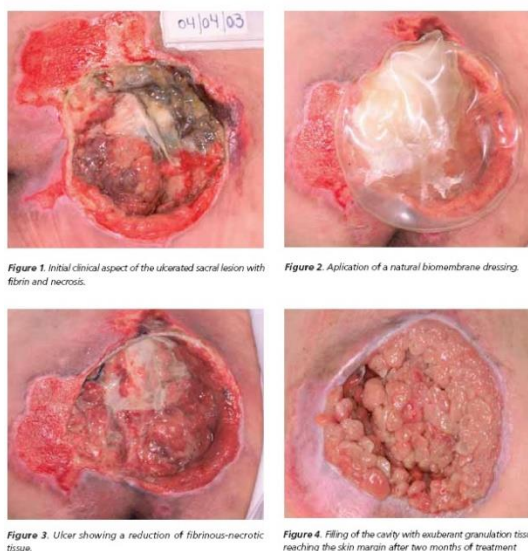
1.1.2. O látex natural em terapias regenerativas

Sader et al. (2000), avaliaram o comportamento de membranas de NRLb como substituto parcial do pericárdio de cães. Durante a pesquisa três grupos foram avaliados: (A) um pequeno pedaço do pericárdio foi removido e reimplantado imediatamente; (B) um pequeno pedaço do pericárdio foi removido e substituído por um de NRLb com 0,3 mm de espessura; (C) um pequeno pedaço do pericárdio foi removido e substituído por um de NRLb com 0,7 mm de espessura. Em 50% dos animais do grupo B e C houve completa regeneração do pericárdio. Por outro lado, para o grupo A foi observado um quadro de regeneração irregular do pericárdio. Segundo os autores, os resultados obtidos mostraram que as membranas de NRLb foram eficientes na substituição parcial do pericárdio de cães (SADER et al., 2000).

Em um estudo de grande impacto social realizado por Frade et al. (2004), devido às propriedades de indução da angiogênese e da regeneração tecidual anteriormente reportadas, membranas de NRLb foram aplicadas sobre úlceras diabéticas como material indutor da

cicatrização (FRADE et al., 2004). Além deste trabalho, em 2006, Frade também reportou resultados da aplicação de curativos de NRLb na cicatrização de úlceras de pressão. A **Figura 5** mostra que antes da aplicação das membranas de NRLb, as úlceras de pressão eram profundas e apresentavam tecido necrótico. Com a aplicação das membranas de NRLb como curativo oclusivo, houve a diminuição do tecido necrosado. A aplicação das membranas de NRLb estimulou a proliferação celular, acelerando o surgimento de tecido granular que atingiu a margem da pele após 2 meses de tratamento contínuo (FRADE et al., 2006).

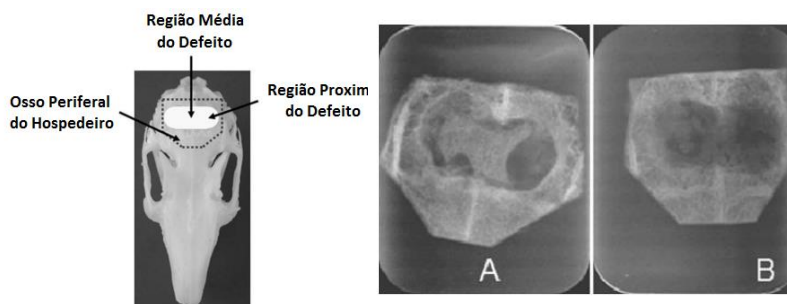
Figura 5: Evolução do reparo tecidual de úlceras de pressão durante tratamento com utilização de membranas de NRLb como curativo oclusivo.



Fonte: (FRADE et al., 2006).

Ereno et al. (2010), empregaram membranas de NRLb como barreira oclusiva na regeneração óssea guiada em calvária de coelhos (ERENO et al., 2010). Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a barreira oclusiva de NRLb proporcionou uma ossificação intramembranosa das bordas para o centro, confirmando a formação de hidroxiapatita por ressonância paramagnética eletrônica. Além disso, após 120 dias havia tecido duro e o material permaneceu intacto (**Figura 6**). Apesar dos resultados satisfatórios relacionados a formação óssea pela membrana de NRLb, seria necessária uma cirurgia de remoção do biomaterial.

Figura 6: Radiografias de calvárias de coelhos 120 dias pós-operatório. A) NRLb como barreira oclusiva, B) controle, sem uso de barreira oclusiva.



Fonte: (ERENO et al., 2010).

O maior interesse da aplicação de NRLb está em sua aplicação no tratamento de feridas agudas ou crônicas. Todas as feridas, no momento da lesão, são consideradas agudas. Acidentes, traumas e cirurgias são situações que podem gerar feridas agudas. Cortes cirúrgicos, queimaduras, lacerações e abrasão, são alguns exemplos de feridas agudas. Algumas vezes, a cascata de eventos que leva ao fechamento da ferida é quebrada em algum ponto, fazendo com que a cicatrização leve muito mais tempo para ser completada ou mesmo que ela não aconteça, feridas que se enquadram nessa situação são chamadas de crônicas. Alguns autores indicam que toda ferida com mais de 6 meses é considerada crônica. Geralmente, estão associadas a doenças pré-existentes, como diabetes e insuficiência venosa. São exemplos de feridas crônicas as lesões por pressão, feridas do pé diabético, feridas infectadas, úlceras varicosas, entre outras (CHABY et al., 2007; UBBINK et al., 2008).

A utilização do NRLb no tratamento de feridas crônicas traz a possibilidade de aliar baixo custo junto do estímulo biológico da regeneração do tecido pelo aumento da vascularização na região da lesão. Embora poucas pesquisas tenham sido realizadas a respeito das propriedades biológicas do NRLb, são notórias as vantagens de sua utilização em terapias de regeneração tecidual. No entanto, se faz necessário o desenvolvimento de matrizes que apresentem as características provenientes do NRLb de estímulo da regeneração tecidual aliadas a outras propriedades de interesse na aplicação deste material, seja em regeneração de tecidos cutâneos, como também em aplicações que se faz necessário o implante do material. Propriedades de grande interesse podem ser citadas, tais como a absorção de fluídos em aplicações no tratamento de lesões exsudativas, aumento da degradabilidade do material em tratamentos onde o implante do material é necessário, e o fornecimento de nutrientes que auxiliem na regeneração dos tecidos, tais como peptídeos e aminoácidos provenientes de fontes

de colágeno. No desenvolvimento de matrizes de NRLb que também apresentem estas propriedades, a utilização de materiais de origem natural e de comprovada biocompatibilidade são excelentes alternativas, dois exemplos destes materiais são o alginato de sódio e o colágeno, assim como seus produtos de degradação (e.g. peptídeos e aminoácidos).

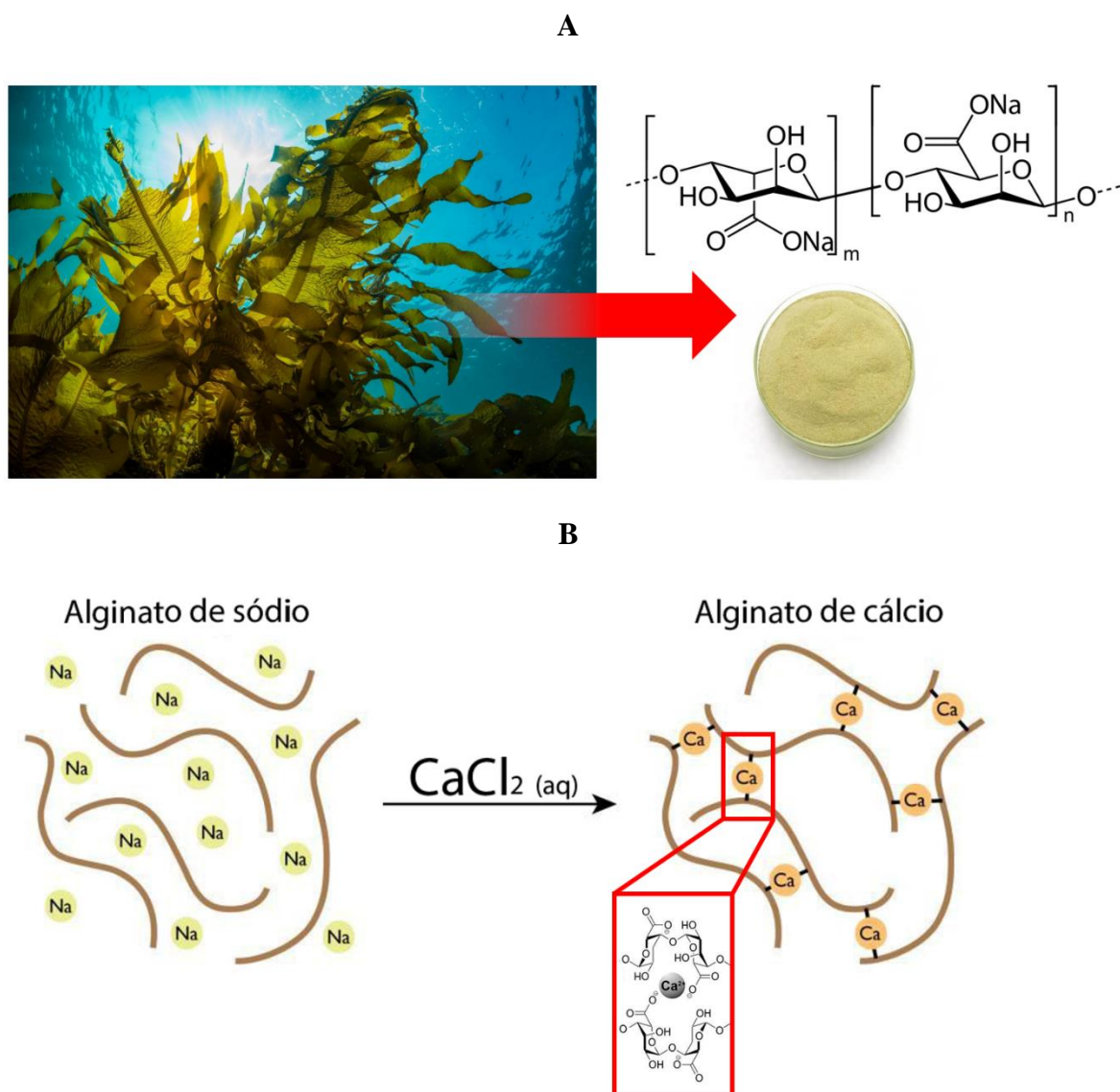
O alginato é um biomaterial que encontrou inúmeras aplicações na engenharia biomédica devido às suas propriedades, incluindo biocompatibilidade e facilidade de gelificação. Os hidrogéis de alginato têm sido particularmente atraentes em aplicações de cicatrização de feridas, administração de medicamentos e engenharia de tecidos até o momento, uma vez que esses géis mantêm semelhança estrutural com as matrizes extracelulares nos tecidos e podem ser manipulados para desempenhar várias funções críticas (LEE; MOONEY, 2012). Também com propriedades que tornam interessante a sua aplicação em medicina regenerativa, o colágeno, com sua ampla distribuição em tecidos conjuntivos moles e duros, é a proteína animal mais abundante. *In vitro*, o colágeno natural pode ser moldado em scaffolds tridimensionais altamente organizados, intrinsecamente biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos por aplicação exógena e dotados de alta resistência à tração. Esses atributos tornam o colágeno e seus derivados, alguns dos materiais mais utilizados para aplicações de cicatrização de feridas e engenharia de tecidos (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014).

1.2. Alginato

O alginato é um polímero aniônico de ocorrência natural, tipicamente obtido a partir de algas marinhas marrons, como *Laminaria digitata* e *Macrocystis pyrifera*. Os alginatos são copolímeros lineares de dois monômeros, ácido α -L-gulurônico (G) e ácido β -D-manurônico (M) (**Figura 7A**), associados por ligações 1,4-glicosídicas formando o ácido algínico que não é solúvel em água, mas cujos sais de sódio, potássio e amônio são (LEE; MOONEY, 2012). O alginato tem sido extensivamente investigado e utilizado para muitas aplicações biomédicas, devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, custo relativamente baixo e gelificação moderada pela adição de cátions divalentes como Ca^{2+} (**Figura 7B**) (WEE; GOMBOTZ, 1998). Os hidrogéis de alginato podem ser preparados por vários métodos de reticulação, e sua semelhança estrutural com matrizes extracelulares de tecidos vivos permite amplas aplicações na cicatrização de feridas, entrega de agentes bioativos como drogas e proteínas, e transplante

de células. Os curativos com alginato mantêm um microambiente fisiologicamente úmido, minimizam a infecção bacteriana no local da ferida e facilitam a cicatrização.

Figura 7: Alginato de Sódio. A) O alginato de sódio é extraído de algas marrons. B) Na presença de íons divalentes, como o cálcio, a reticulação reversível acontece, dando origem ao hidrogel de alginato.



Fonte: A) (PRISCILA DA SILVA, 2018) Kelps, formações de algas pardas (feófitas). Foto: divedog/Shutterstock.com. B) modificado de (SCIENCE & FOOD, 2013).

1.2.1. Uso do alginato em curativos de feridas

O tratamento de feridas agudas e crônicas é uma necessidade crucial em muitas facetas da medicina, e os curativos à base de alginato oferecem muitas características vantajosas. Os curativos tradicionais para feridas (por exemplo, gaze) fornecem principalmente uma função de barreira - manter a ferida seca, permitindo a evaporação dos exsudatos e evitando a entrada de patógenos (BOATENG et al., 2008). Por outro lado, curativos modernos (por exemplo, curativos de alginato) fornecem um ambiente úmido e facilitam a cicatrização (QUEEN et al., 2004). Os curativos de alginato são tipicamente produzidos por reticulação iônica de uma solução de alginato com íons cálcio para formar um gel, seguido de processamento para formar folhas porosas liofilizadas (isto é, espuma) e curativos fibrosos. Os curativos de alginato na forma seca absorvem o fluido da ferida para re-gelificar, e os géis podem fornecer água a uma ferida seca, mantendo um microambiente fisiologicamente úmido e minimizando a infecção bacteriana no local da ferida. Essas funções também podem promover a formação de tecido de granulação, epitelização rápida e cicatrização (LEE; MOONEY, 2012).

Os curativos de alginato são considerados não-oclusivos a semi-oclusivos, altamente absorventes e feitos para gerenciar quantidades moderadas a grandes de exsudato. À medida que o alginato absorve o líquido, é convertido em um gel que fornece umidade ao leito da ferida (WIETLISBACH, 2014). Também ajudam a promover um novo crescimento da pele durante o processo de cicatrização, garantindo que a área da ferida permaneça úmida. Isso incentiva o desbridamento natural por meio de enzimas, que complementa o tratamento fornecido pelos profissionais em um ambiente clínico. O processo de desbridamento remove a pele morta ou danificada, promovendo um ambiente mais saudável para as feridas, que ajuda na cicatrização (SWEENEY; MIRAFITAB; COLLYER, 2012).

Em um estudo *in vivo*, pioneiro, realizado por Oliver e Blane em 1950, da hemostasia com alginatos absorvíveis na prática neurocirúrgica, os autores demonstram em seus resultados que o alginato é hemostático e absorvível em várias proporções, além de se mostrar um material não tóxico apresentando sucesso clínico. Os autores apelaram para uma atenção especial a este material devido as suas propriedades físicas e químicas, além da variação de concentrações e versatilidade geral, que poderiam tornar o alginato um importante material em técnicas cirúrgicas modernas (OLIVER; BLAINE, 1950). Além disso, Doyle et al. (1996), realizaram um estudo *in vitro* da utilização do alginato de cálcio para a cicatrização de úlceras cutâneas. Segundo os autores, os resultados obtidos sugerem que o alginato de cálcio testado pode

melhorar alguns aspectos celulares da cicatrização normal de feridas (DOYLE et al., 1996). Wang et al. (2002), também realizaram estudos utilizando o alginato para a cicatrização, o trabalho consistiu no estudo de um complexo polieletrólito de alginato-quitosana em cloreto de cálcio. Os autores concluíram que, com base em sua biocompatibilidade e eficácia de cicatrização de feridas, a membrana quitosana-alginato pode ser considerada uma alternativa para aplicações de cura para feridas (WANG et al., 2002).

Os resultados do desenvolvimento e caracterização de um curativo composto por quitosana e alginato de cálcio também foram publicados por Zhao et al. (2019). Os autores avaliaram a citotoxicidade e a propriedade antibacteriana *in vitro* usando CCK-8 e o método de halo de inibição. Os estudos de cicatrização de feridas foram realizados em um modelo de ferida de pele de espessura total em ratos. O curativo desenvolvido mostrou boas propriedades hidratantes e antibacterianas sem citotoxicidade. Além de inibir a inflamação diminuindo a interleucina-6 e promover a angiogênese aumentando o fator de crescimento VEGF (ZHAO et al., 2019a).

Um curativo funcional de alginato de sódio com propriedade de liberar H₂S foi desenvolvido por Zhao et al. (2019), a estratégia utilizada foi a incorporação de uma molécula, doadora de H₂S dependente de pH, na esponja de alginato. O curativo resultante proporcionou um ambiente de cicatrização úmido e protetor e foi capaz de liberar H₂S consistentemente sob condições de pH ácido, absorvendo o exsudato na interface da ferida. O estudo celular *in vitro* indicou que o curativo não apenas exibe boa citocompatibilidade, mas também melhora a proliferação e migração de fibroblastos. Além disso, os efeitos do curativo na cicatrização de feridas foram avaliados usando um modelo de defeito dérmico de espessura total *in vivo*, que revelou que o curativo pode melhorar significativamente o processo de cicatrização com a formação aprimorada de tecido de granulação, epitelização, deposição de colágeno e angiogênese, devido ao H₂S liberado (ZHAO et al., 2019b).

Muitos outros trabalhos envolvendo alginato no desenvolvimento de materiais para medicina regenerativa foram reportados (MOHANDAS et al., 2015; SAARAI et al., 2012; SINGH; SINGH, 2012; STRACCIA et al., 2015; YU et al., 2016). Além dos estudos científicos, vários curativos comerciais de alginato estão disponíveis no mercado, alguns exemplos são: Algicell™ (Derma Sciences) AlgiSite M™ (Smith & Nephew), Comfeel Plus™ (Coloplast), Kaltostat™ (ConvaTec), Sorbsan™ (UDL Laboratories), e Tegagen™ (3M Healthcare).

1.3. Colágeno

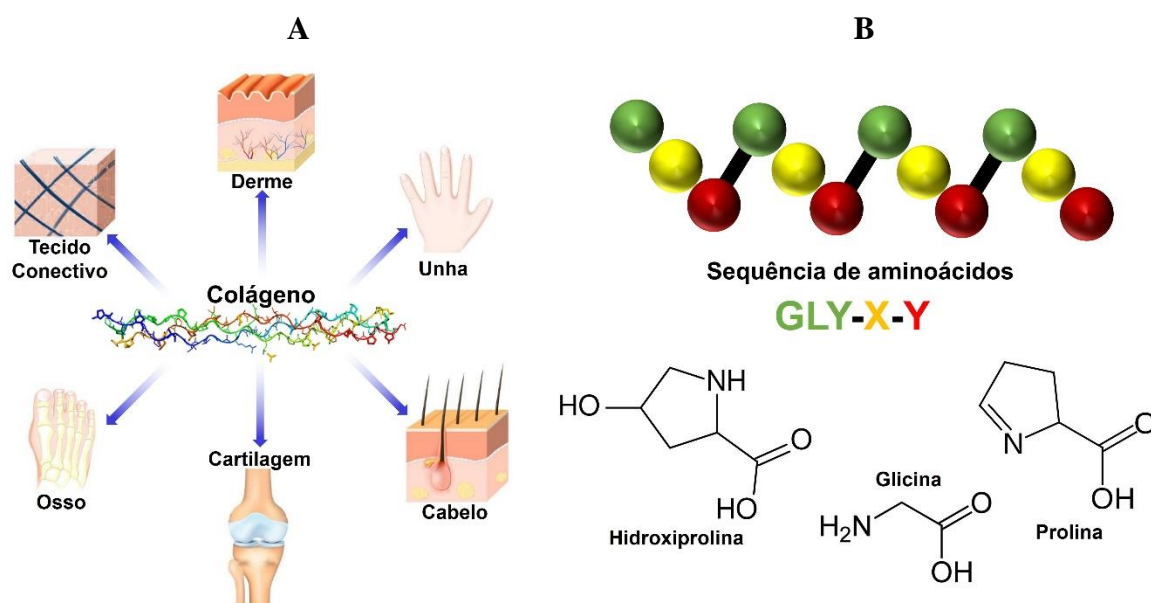
O colágeno está presente na pele, ossos, dentes, tendões, vasos sanguíneos e cartilagens (**Figura 8A**), o colágeno é uma proteína fibrosa que corresponde a 30% das proteínas totais e 6% em peso de todo o corpo humano (HUGGINS, 1957). Em combinação com sais de cálcio o colágeno é responsável pela estrutura rígida dos ossos, e em combinação com outra proteína, a elastina, formam estruturas mais flexíveis, as quais são essenciais, por exemplo, para a aorta e os pulmões (BRETT, 2015). Os biomateriais baseados em colágeno estimulam e recrutam células específicas, como macrófagos e fibroblastos, ao longo da cascata de cicatrização para melhorar e influenciar a cicatrização de feridas (FLECK; SIMMAN, 2010).

O colágeno é composto por uma hélice tripla, geralmente consiste em duas cadeias idênticas ($\alpha 1$) e uma cadeia adicional um pouco diferente em sua composição química ($\alpha 2$). A sequência de aminoácidos mais comum do colágeno são glicina-prolina-X e glicina-X-hidroxiprolina, onde X pode qualquer aminoácido que não seja glicina, prolina ou hidroxiprolina (SZPAK, 2011). Além disso, colágeno e seus produtos de degradação, os peptídeos e aminoácidos, são quimicamente atrativos para vários tipos de células (**Figura 8B**), possuindo assim um papel bem delineado na cicatrização de feridas, com propriedades biológicas e hemostáticas capazes de lhe conferirem características de polímero biocompatível, atóxico, imunogênico, biodegradável e de alta resistência à tensão (FLECK; SIMMAN, 2010; RANGARAJ; HARDING; LEAPER, 2011; SILVER et al., 1993). O colágeno é um polímero com estrutura, propriedades físicas, químicas e imunológicas bem elucidadas. Particularmente, o colágeno tipo I, dentre todos é o mais conhecido e estudado acerca da sua utilização como biomaterial (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014).

Com ampla aplicabilidade no campo da cicatrização de feridas, o colágeno tem se mostrado um importante biomaterial. Entretanto as membranas de colágeno puro podem apresentar limitações decorrentes de sua baixa força mecânica, fraca barreira ao vapor de água, alta solubilidade em água e rápida biodegradabilidade (BRETT, 2015; BUNYARATAVEJ; WANG, 2001). Quando aplicadas sobre feridas, as membranas de colágeno podem sofrer ações enzimáticas decorrente da presença de gelatinases e outras proteases, fazendo com que sejam mais rapidamente absorvidas pelo organismo (BUNYARATAVEJ; WANG, 2001; RUSZCZAK, 2003; SAI K; BABU, 2000). Neste trabalho, os materiais desenvolvidos levaram em sua composição o colágeno hidrolisado. Este tipo de colágeno disponível comercialmente, passa por um processo de hidrólise parcial, ou seja, a grande cadeia proteica se quebra em um

ponto, agregando uma molécula de água em sua estrutura. O colágeno hidrolisado é composto, portanto, por cadeias de peptídeos e aminoácidos provenientes da hidrólise parcial do colágeno nativo.

Figura 8: Colágeno. A) Regiões do corpo onde o colágeno é essencial. B) Sequência de aminoácidos que compõem o colágeno.



Fonte: A) Adaptado de (SARAH HECKLER, 2018); B) Adaptado de (DREAMSTIME, [s.d.]).

1.3.1. Uso do colágeno em curativos de feridas

Filmes de colágeno têm sido utilizados na cicatrização de feridas e na engenharia de tecidos, principalmente como barreira. Filmes com espessura de 0,1 a 0,5 mm podem ser produzidos a partir de soluções de colágeno e secos ao ar. Como vantagem adicional, os filmes feitos de materiais biodegradáveis, como o colágeno, demonstram uma liberação lenta de medicamentos encapsulados. Os filmes carregados proporcionam fácil esterilização e tornam-se maleáveis após a hidratação, sem comprometer sua resistência mecânica. (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014).

O colágeno desempenha um papel central em muitos procedimentos cirúrgicos pré e pós-operatórios. Devido à sua baixa antigenicidade e biocompatibilidade inerente à maioria dos tecidos endógenos, o colágeno natural tem sido frequentemente usado para reparo cirúrgico

(VAN DER LAAN et al., 1991). Por serem práticos e facilmente remodelados devido à sua estrutura simples, uniformidade relativa e disponibilidade abundante, os curativos à base de colágeno também são utilizados há muito tempo para cobrir queimaduras e tratar úlceras (PETERS, 1980). Eles têm uma vantagem prática e econômica distinta em comparação aos fatores de crescimento e aos tratamentos baseados em células. Uma forma não convencional que consiste em colágeno aviário em pó é eficaz para acelerar a cicatrização crônica de feridas. O pó promove o recrutamento celular, a ativação da fase de inflamação da cicatrização e o suporte para o crescimento de novos tecidos (THIMSEN-WHITAKER; BARROW; FEREE, 1992).

Pitaro et al. (1987), realizaram um estudo utilizando membranas de colágeno para cicatrização. Os resultados indicaram que as membranas de colágeno impediram a migração apical do epitélio durante os estágios iniciais de cicatrização e são colonizadas por células do tecido conjuntivo e incorporadas no tecido conjuntivo cicatrizante (PITARU et al., 1987). Rho, et al. (2006), avaliaram o emprego de nanofibras de colágeno tipo I em feridas abertas em roedores. Os resultados obtidos para o grupo controle após uma semana estava coberto por tecido desvitalizado e abaixo desta camada uma densa infiltração de leucócitos polimorfonucleares e proliferação de fibroblastos foram identificados. Por outro lado, para o grupo tratado com a nanofibra de colágeno, após uma semana, o tecido desvitalizado estava ausente e havia uma proeminente proliferação de capilares jovens e fibroblastos. No estágio avançado de cicatrização em 4 semanas não foram identificadas diferenças significantes entre o grupo controle e o grupo nanofibra de colágeno. Estes resultados demonstraram que as nanofibras de colágeno tipo I são aceleradores muito eficazes no estágio inicial do processo de cicatrização (RHO et al., 2006).

Algumas peles comerciais, substitutos dérmicos e curativos como Alloderm™ (derme humana), Amniograph™ (membrana amniótica), Integra® (scaffold acelular de colágeno-GAG) e Oasis™ (pele suína) são usados para aplicações médicas.

Mesmo com diversos trabalhos onde o colágeno tenha sido utilizado no desenvolvimento de matrizes para aplicações de medicina regenerativa, a maioria se baseia em colágeno com estrutura macromolecular praticamente intacta. A estrutura helicoidal tripla do colágeno é muito estável contra a degradação enzimática, sendo quase que exclusivamente digerido pelas metaloproteinases da matriz (MMPs), um grupo de endopeptidases que metabolizam especificamente as proteínas do tecido conjuntivo (BOURDOULOUS et al., 1998). Nos ossos e cartilagens, o colágeno também pode ser clivado pela catepsina K (AGUDA et al., 2014). As MMPs vertebrais dividem o colágeno helicoidal triplo tipo I em $\frac{1}{4}$ a $\frac{3}{4}$ em

exatamente uma posição entre Gly 775 e Ile 776 (KÜHN, 1987). Cury et al. (2019) realizaram um estudo da utilização de proteínas purificadas do NRLb como recobrimento em suturas. Os autores observaram para os grupos tratados com a fração proteica purificada do NRLb, independentemente da técnica da sutura, uma diminuição na expressão de MMP-2 e um aumento na síntese de colágeno, principalmente do tipo I. Os autores sugerem que a ação da fração proteica do NRLb seja mediada por células imunes (CURY et al., 2019). Pensando em diminuir a necessidade de ação proteolítica das MMPs, foi decidido utilizar o colágeno hidrolisado no desenvolvimento das membranas de NRLb com colágeno.

Com base nos assuntos discutidos, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de duas blendas, uma composta por NRLb e alginato e outra por NRLb e colágeno para aplicações em iniciativas focadas em terapias regenerativas e/ou engenharia de tecidos. Nos parágrafos seguintes são descritos os materiais e métodos utilizados durante a pesquisa, seguido da apresentação dos resultados e pertinentes discussões a par dos dados coletados, finalizando com conclusões que se baseiam tanto nos resultados obtidos quanto das informações disponíveis na literatura.

2. OBJETIVO

O objetivo principal desta tese de Doutorado foi desenvolver e caracterizar membranas de látex natural funcionalizadas com alginato e colágeno para aplicações em terapias regenerativas e/ou em engenharia de tecidos.

Para isto os seguintes objetivos gerais foram definidos:

- Desenvolvimento de membranas a base de NRLb funcionalizadas com alginato e colágeno.
- Caracterização físico-química pelas técnicas: Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de Varredura, Resistência Mecânica, Intumescimento, Perda de massa (degradação) e permeabilidade ao vapor de água.
- Caracterização biológica pelas técnicas: Atividade metabólica indireta; Adesão e proliferação celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O NRLb utilizado neste projeto de pesquisa foi adquirido da BDF Comércio de Produtos Agrícolas LTDA, Guarantã - SP. O produto é obtido da mistura de dois clones: RRIM 600 e PB 235. Depois da extração, o NRL é mantido em fase líquida através da adição de hidróxido de amônio corrigindo a acidez e estabilizando o meio ao pH igual a 10,20. Após adição do hidróxido de amônio, o material é então centrifugado a 8000g para se obter o NRLb. Para a confecção das membranas, foram utilizados alginato de sódio de média viscosidade (Synth) e colágeno hidrolisado de origem bovina tipo 1 (Farmácia Santa Paula – Araraquara/SP).

Para os ensaios *in vitro*, fibroblastos de origem dérmica NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658) e queratinócitos de origem epidérmica HEKa (ATCC® PCS-200-011™) foram cultivados em meio de cultivo celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (ThermoFisher) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (ThermoFisher) e 1% (v/v) de antibiótico e antimicótico Pen Strep (ThermoFisher). Tampão fosfato salino (Dulbecco's phosphate-buffered saline – PBS), tripsina-EDTA (0,25%), e kit de atividade metabólica celular MTT foram obtidos da Gibco – ThermoFisher.

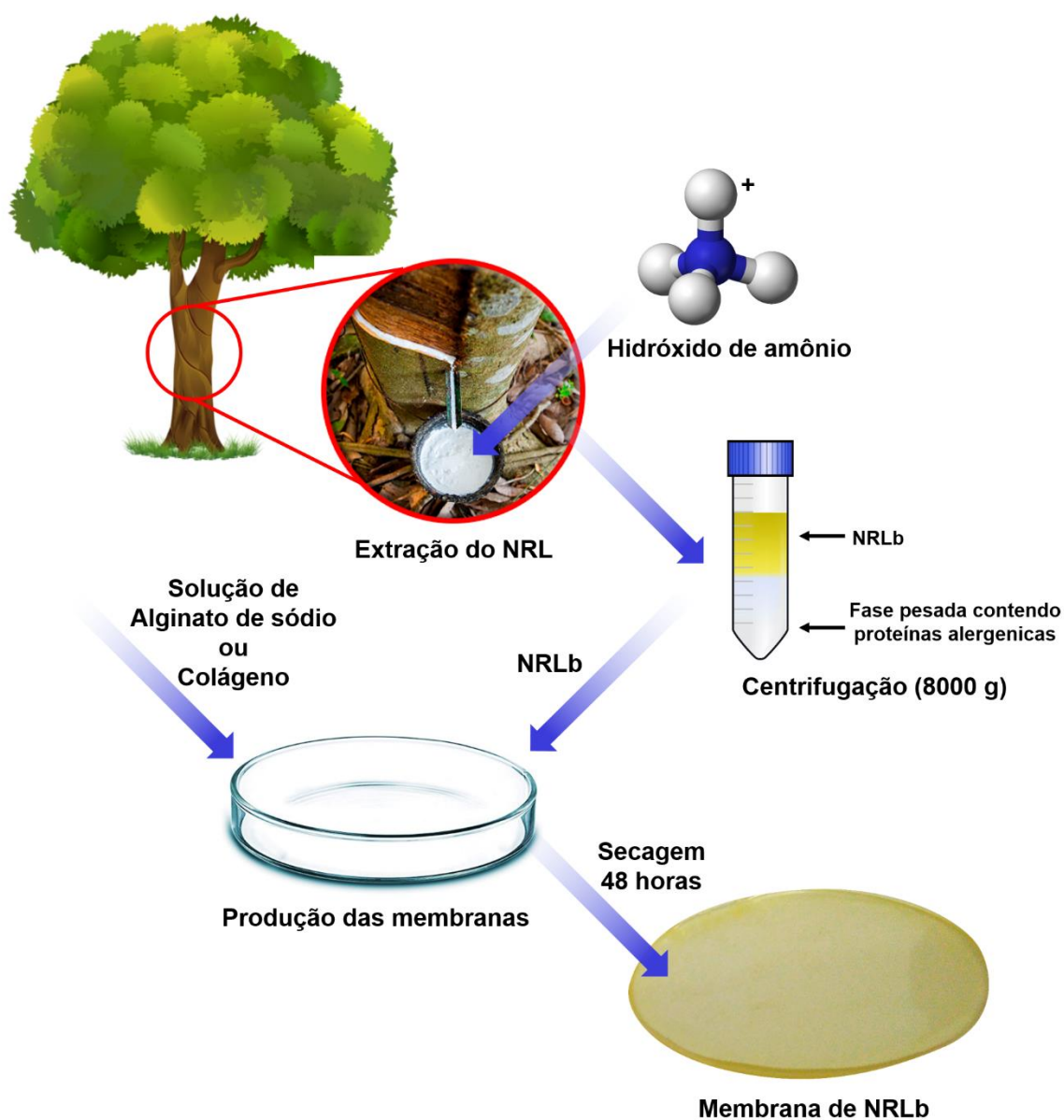
3.1. Confecção das membranas

Para a confecção das membranas de NRLb com alginato ou colágeno, soluções de NRLb-alginato e NRLb-colágeno foram depositadas em placas circulares de silicone (diâmetro: 60,0±0,5 mm) e o sistema mantido em temperatura ambiente (25°C) protegido da luz. A partir da evaporação da água e amônia contidos no NRLb (aproximadamente 48 h) a mistura se polimeriza dando origem às membranas (BARROS et al., 2015; DE BARROS et al., 2018, 2019; HERCULANO et al., 2009). A **Figura 9** mostra o passo-a-passo desde a extração do NRLb até as membranas prontas.

As membranas à base de NRLb-alginato e NRLb-colágeno foram confeccionadas com base em testes preliminares de proporções H₂O:NRLb (v/v) para a obtenção de membranas uniformes e livres de defeitos. Para as membranas com alginato, 62,5; 125; e 187,5 mg de alginato foram dissolvidos em 3,75 mL de água deionizada e adicionados 1,9 mL de NRLb para se obter, após evaporação da água e amônia, membranas com, respectivamente, 5, 10 e 15% de alginato em massa. Para as membranas com colágeno, os mesmos valores de massa

foram utilizados, no entanto foi necessário diminuir o volume de água utilizado para se obter membranas uniformes, para isto, 62,5; 125; e 187,5 mg de colágeno foram dissolvidos em 1,25 mL de água deionizada e adicionados 1,9 mL de NRLb para se obter membranas com, respectivamente, 5, 10 e 15% de colágeno em massa.

Figura 9: Produção das membranas de NRLb: da extração do NRL à polimerização das membranas.



Fonte: Autoria própria.

3.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Esta técnica foi utilizada por permitir a identificação de grupos funcionais (aminas, amidas, anéis aromáticos, álcoois, fenóis, entre outros), além de proporcionar o estudo de possíveis interações entre o NRLb e os produtos utilizados (BORGES et al., 2015; CESAR et al., 2020; DIAS MURBACH et al., 2014; HERCULANO et al., 2011). Os espectros foram registrados na região compreendida entre 4000 e 400 cm^{-1} , por 32 varreduras em resolução de 4 cm^{-1} , pelo método de ATR (Refletância Total Atenuada) em um Espectrofotômetro FTIR – TENSOR 27/BRUKER (fonte HeNe, detector DLaTGS), localizado no Grupo de Bioengenharia e Biomateriais da FCF/UNESP de Araraquara.

3.3. Resistência Mecânica

Os ensaios de tração foram realizados em triplicata em um DL2000 EMIC equipado com célula de carga de 50 kgf a uma velocidade de 500 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$ (de acordo com a ASTM D412). As amostras foram alongadas até a ruptura à temperatura ambiente (25°C), e o módulo de elasticidade - Módulo de Young - foi avaliado calculando a inclinação da curva tração×deformação correspondente na região linear (0-10% de deformação) (XIAO et al., 2011; INDRANI; LUKITOWATI; YULIZAR, 2017; ZAMAN et al., 2011)

3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de MEV foi utilizada por permitir a observação da morfologia da superfície das amostras, o tamanho e a distribuição dos compostos no material (BOATENG et al., 2008; KAMOUN; KENAWY; CHEN, 2017; MIR et al., 2018). As imagens de MEV foram obtidas nas ampliações de 300×, 2000× e 6000× utilizando um Microscópio de Varredura de Alta Resolução (FEG-MEV; JEOL modelo 7500F) com 2 kV, ângulo do feixe 35° e ouro foi utilizado como material condutor para o recobrimento das amostras. O equipamento é localizado no Laboratório de Microscopia Avançada (LMA) no prédio Multiusuários do Instituto de Química da UNESP – Araraquara.

3.5. Intumescimento (Grau de Hidratação)

Para a caracterização do grau de intumescimento (GI), Amostras previamente pesadas foram incubadas em 50 mL de PBS (pH = 7,4) à 37°C, após hidratação por períodos determinados (30, 60, 90, 120 min e 24 h), as amostras foram removidas e rapidamente secas com papel de filtro para remover o excesso de água da superfície e imediatamente pesadas. O GI foi avaliado no tempo a partir da variação de massa das amostras, empregando a **Equação 1** (AKTURK et al., 2011; JAYAKUMAR et al., 2012; TANODEKAEW et al., 2004). A capacidade das amostras em absorver água foi determinada para prever o volume de fluido absorvido pelo material quando em contato com feridas exsudativas (DABIRI; DAMSTETTER; PHILLIPS, 2016; GUO et al., 2018; PARIKH et al., 2010).

Equação (1)
$$GI = \frac{(M_i - M_0) \times 100}{M_0}$$
 , onde:

GI = grau de intumescimento (%),

M_0 = massa inicial,

M_i = massa úmida no tempo.

3.6. Perda de massa (degradação)

Para a análise de perda de massa, amostras foram submersas em 100 mL de PBS (pH 7,4) e incubadas à 37°C ao abrigo da luz. A degradação das amostras no tempo foi avaliada com base na variação de massa das amostras secas, diferenças no perfil mecânico e por observação dos espectros de FTIR antes e após a perda de massa nos intervalos de 15, 30, 60 e 120 dias (ESKANDARINIA et al., 2020; ROTTMAR et al., 2015).

3.7. Permeabilidade ao vapor de água

Para a avaliação da permeabilidade de vapor de água, frascos de vidro foram preenchidos com 5,0 mL de água deionizada (100 % de Umidade Relativa (UR)) e entre a parte superior do frasco e a tampa (com abertura) foram inseridas amostras com diâmetro e espessura aferidos (diâmetro: 1,66 mm; espessura: 1,0 mm). Cada conjunto foi então inserido em dessecador com sílica gel (0 % UR), e a massa verificada por até 4 dias (DENG et al., 2018; HASSAN et al., 2018; WOODROOF et al., 2015). Os testes foram realizados em triplicata e a TVA (Transmissão de Vapor d'água) calculado conforme a **Equação 2**. As análises de permeabilidade ao vapor de água foram realizadas segundo a normativa UNE 92226 EXP. Frascos vazios foram utilizados como controle.

Equação (2)
$$TVA = \frac{TTVA \times x}{AP_0(UR^1 - UR^2)}$$
 , onde:

TTVA = taxa de transmissão de vapor d'água que resulta a partir do declive do perfil de perda de massa em função do tempo,

x = espessura da membrana (mm),

A = área da película exposta à permeabilidade (m²),

P₀ = pressão de vapor d'água pura (3,159 KPa a 25 °C),

(UR¹-UR²) = gradiente de UR

3.9. Citotoxicidade indireta

Fibroblastos (NIH 3T3) e queratinócitos (HEKa) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antimicótico e antibiótico, e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. As células foram dissociadas ao atingirem a confluência de 70-80% utilizando solução de tripsina-EDTA. (0,25% (p/v) Tripsina – 0,53 mM EDTA) (BIGLARI et al., 2019; XIAO et al., 2011; ZHAO et al., 2016).

A avaliação da citotoxicidade indireta foi realizada via cálculo da atividade metabólica celular utilizando o ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo). O ensaio de MTT é um indicador sensível e confiável da atividade metabólica celular. O ensaio

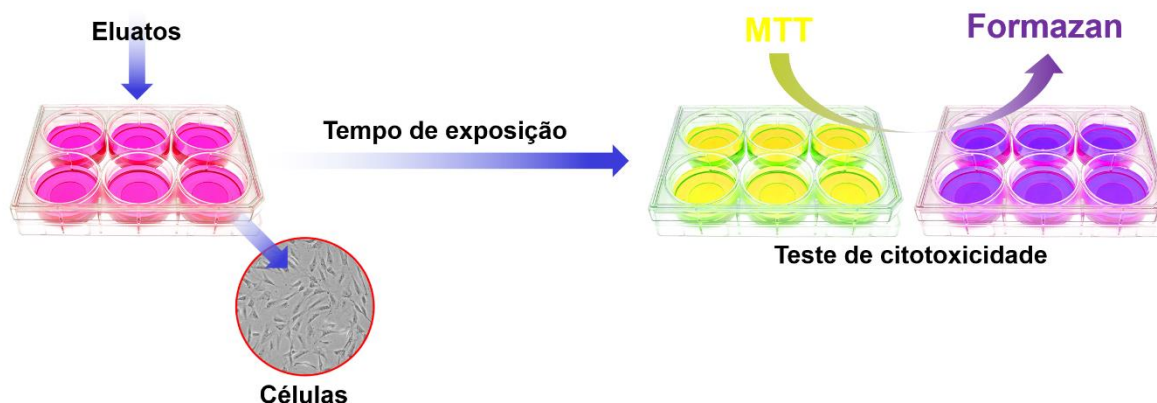
baseia-se na redução de MTT, um corante amarelo de tetrazólio solúvel em água, principalmente pelas desidrogenases mitocondriais, em cristais de formazan de cor púrpura. O produto formazan é analisado espectrofotometricamente (550 nm) após dissolução em DMSO (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Em termos biológicos, sabe-se que um curativo ideal não deve liberar produtos tóxicos e nem mesmo causar reações adversas, o que pode, em primeira instância, ser avaliado através de testes *in vitro* da citotoxicidade. Para a avaliação da citotoxicidade dos materiais desenvolvidos, foram utilizados fibroblastos e queratinócitos. Os extratos das amostras, necessários para a realização da análise de citotoxicidade indireta, foram obtidos com base na norma ISO 10993-12 (EN-ISO-10993-12, 2008). As membranas foram submersas em meio de cultivo na proporção de 0.2 g de amostra por mL de meio de cultivo e incubadas por 48 horas a 37°C. Para os ensaios, foram utilizados como controles: negativo (sem tratamento) extrato de fragmentos da própria placa de cultura de células (poliestireno); e positivo (tratamento citotóxico) solução de fenol a 0,5%. Os testes foram realizados a partir dos extratos das amostras e suas respectivas diluições conforme a norma ISO 10993-5 (EM-ISSO-10993-5, 2009). Controle negativo padronizado como 100% de atividade metabólica.

A **Figura 10** ilustra os passos realizados para o ensaio de citotoxicidade. De forma resumida, as células são semeadas na placa de cultivo celular e mantidas em condições de cultivo por 24 h, o meio de cultivo é substituído pelos eluatos das amostras e o sistema mantido em condições de cultivo por mais 24 h. Após o tempo de exposição, os eluatos são totalmente removidos, e o reagente de MTT adicionado. Em 2-4 h de exposição ao MTT, o produto formazan é diluído em DMSO e analisado espectrofotometricamente (550 nm).

Por se tratar de um método espectrofotométrico, o comparativo da densidade óptica pode ser utilizado para a descrição dos resultados. Os valores da atividade metabólica foram expressos em relação ao grupo controle (100% de atividade metabólica). Onde, atividade metabólica inferior a 75% pode indicar citotoxicidade, e atividade metabólica superior a 100% pode indicar consumo dos compostos adicionados como fonte de carbono ou estímulo da proliferação celular.

Figura 10: Esquema ilustrativo do teste de citotoxicidade por MTT.



Fonte: Autoria própria.

3.10. Proliferação celular

Para a avaliação da influência das amostras na proliferação celular, células suspensas em meio de cultivo foram semeadas na densidade de 10^3 células/cm² em placas de 12 poços e mantidas por 24 horas para adesão. Posteriormente, as células foram expostas aos eluatos das amostras, sendo estes renovados diariamente. A proliferação celular foi então acessada pelo método de MTT, relacionando a densidade óptica e o número de células metabolicamente ativas (HARISHKUMAR et al., 2013; REHMAN et al., 2019).

Os valores para atividade metabólica celular para a análise de citotoxicidade indireta foram expressos em porcentagem em relação ao controle negativo (poliestireno da própria placa de cultura de células), e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.11. Análise estatística

Os resultados são mostrados como a média das triplicadas e o desvio padrão. As diferenças estatísticas foram realizadas por one-way ANOVA com $p < 0,05$; e post-hoc Tukey HSD com $p < 0,01$ para significância estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Confeção das membranas

A formação das membranas de NRLb, NRLb-alginato e NRLb-colágeno por polimerização surge da coalescência das partículas individuais de NRLb, que são normalmente mantidas separadas por forças estabilizadoras (eletrostáticas e/ou estéricas) resultantes dos grupos terminais da cadeia polimérica carregada ou surfactante/polímero adsorvido (compostos naturalmente presentes no NRLb). Essas forças (e outras que resistem à deformação das partículas) podem ser superadas com a evaporação da fase contínua (água) e diminuição do pH com a evaporação da amônia (STEWART; HEARN; WILKINSON, 2000). Utilizando moldes circulares, produzidos em silicone, foram obtidas membranas com 60 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Na **Figura 11**, membranas compostas por NRLb com alginato.

Figura 11: Membranas de NRLb-alginato.



Fonte: Autoria própria.

4.2. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

As análises de FTIR foram realizadas para confirmar a incorporação do alginato e do colágeno ao NRLb, e verificar possíveis alterações quanto ao surgimento ou extinção de bandas de absorção na região do infravermelho, este fenômeno daria indícios de instabilidade dos compostos quando incorporados ao NRLb. No entanto, não foram observadas bandas adicionais de absorção no infravermelho, assim como a extinção de bandas características para o NRLb, alginato e colágeno.

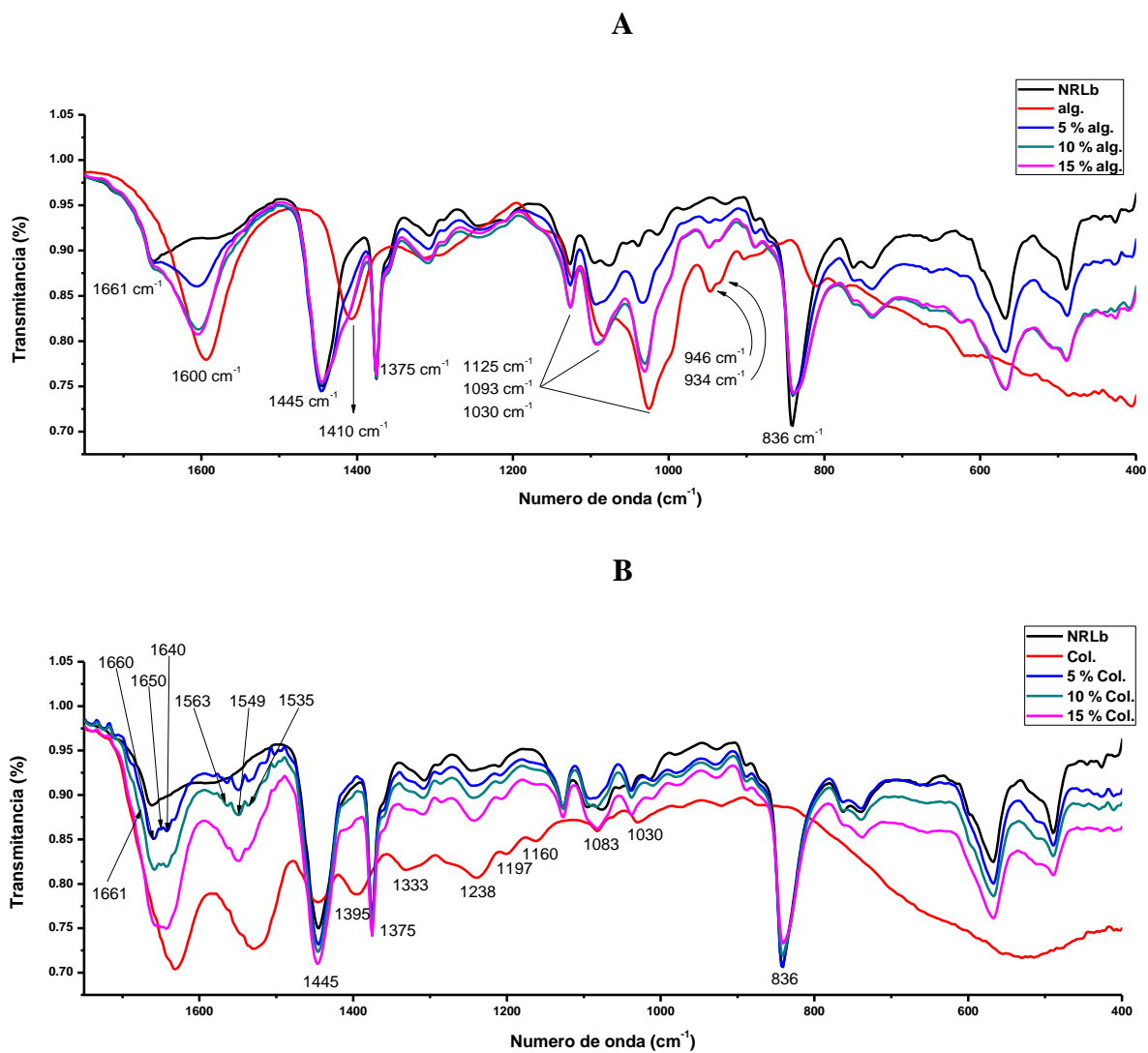
Como pode ser visto nas **Figuras 12A e 12B**, os espectros resultantes da incorporação do alginato e do colágeno ao NRLb apresentam tanto bandas características de absorção para o NRLb quanto para os compostos incorporados, sendo possível identificar, inclusive, o aumento da absorção para bandas em comum entre os dois materiais.

A **Figura 12A** mostra os espectros de infravermelho para as membranas de NRLb e NRLb-alginato, onde pode-se identificar absorções características para o poli(*cis*-1,4-isopreno): 1661 cm^{-1} deformação de C=C; 1447 cm^{-1} deformação angular de CH₂; 1375 cm^{-1} deformação angular de CH₃; e 836 cm^{-1} de C-H fora do plano, sendo esta absorção a mais importante para a identificação do NRL, pois caracteriza a função R₂C=CHR (*cis*-1,4). Além destas, porém não mostradas na figura, o espectro de infravermelho para o NRLb também apresenta as seguintes bandas de absorção: 2960 cm^{-1} deformação de CH₃; 2916 e 2852 cm^{-1} deformação de CH₂ (BORGES et al., 2015; DE BARROS et al., 2018; HERCULANO et al., 2010; HERCULANO et al., 2011).

O espectro de FTIR para o alginato de sódio apresenta as bandas em torno de 1030 cm^{-1} (estiramento C-O-C) atribuídas à sua estrutura sacarídica. Além disso, as bandas de 1600 e 1410 cm^{-1} são atribuídas a picos de alongamento assimétricos e simétricos de grupos de sal carboxilato (LI et al., 2008). O espectro de FTIR para o colágeno, na **Figura 12B**, apresenta bandas características de amidas I e II em 1650 e 1560 cm^{-1} , estas bandas são típicas de proteínas. Além disso, por se tratar de material comercial, de processo com menor rigor comparado à reagentes de laboratório, bandas em torno de 1030 e 1083 cm^{-1} , que surgem das absorções $\nu(\text{C-O})$ e $\nu(\text{C-O-C})$ das porções de carboidratos também podem ser observadas. As bandas de absorção em torno de 1445, 1395, 1333, 1238 e 1197 cm^{-1} são atribuídas às absorções características do colágeno $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{C-N})$ e $\delta(\text{N-H})$ (BELBACHIR et al., 2009).

Com os resultados obtidos pela análise de FTIR, como não foram observados surgimento ou extinção de bandas de absorção, pode-se concluir que o alginato e o colágeno foram satisfatoriamente incorporados ao NRLb, não apresentando indícios prévios quanto a instabilidade dos compostos após incorporação.

Figura 12: Espectros comparativos de FTIR para as membranas de NRLb: (A) alginato puro e membranas NRLb-alginato, (B) colágeno puro e membranas NRLb-colágeno.



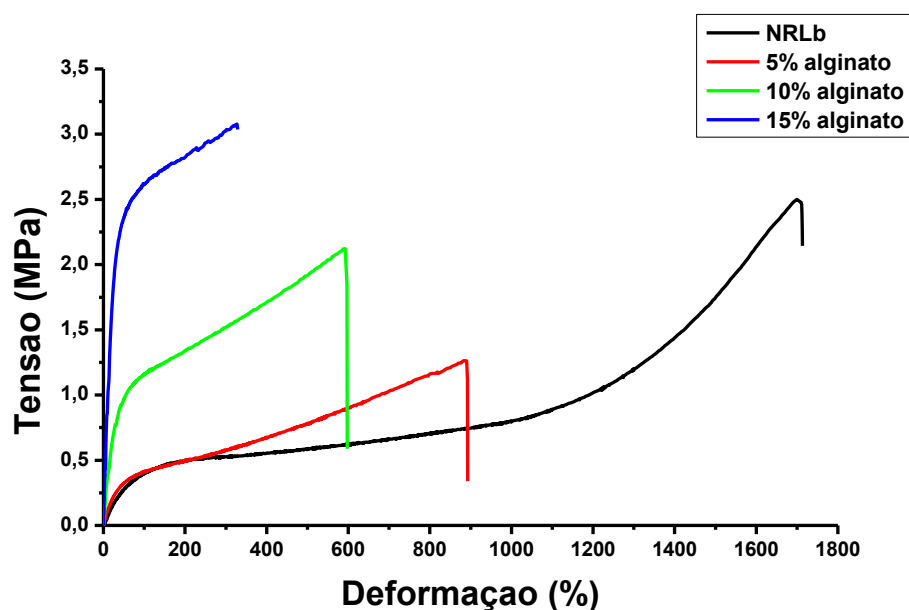
Fonte: Autoria própria.

4.3. Ensaio Mecânico

A análise de resistência a tração mecânica foi realizada para avaliar as mudanças no comportamento mecânico das membranas de NRLb antes e após a incorporação das diferentes concentrações de alginato e de colágeno. Foram utilizados corpos de prova com 1 mm de espessura, retangulares nas dimensões 15x44 mm.

A **Figura 13** mostra o perfil de tensão do NRLb puro e do NRLb com diferentes proporções de alginato. A partir dos dados obtidos pode-se identificar a resistência à tração final (UTS) de 2,50 MPa para o NRLb puro e de 1,26; 2,12; e 3,06 MPa para o NRLb-alginato nas concentrações de 5; 10; e 15% respectivamente, além da deformação máxima de 1715% para o NRLb puro e 892; 600; e 327% para o NRLb-alginato nas concentrações de 5; 10; e 15% respectivamente. Utilizando a parte linear do gráfico apresentado na **Figura 13**, pode-se calcular os coeficientes angulares das retas obtidas para cada amostra, representando o módulo de Young - O módulo de Young ou módulo de elasticidade é um parâmetro mecânico que proporciona uma medida da rigidez de um material sólido. Para as amostras de NRLb puro o módulo observado foi de 0,65 MPa e para o NRLb-alginato nas concentrações de 5; 10; e 15% os módulos observados foram, respectivamente, 1,05; 3,42; e 8,65 MPa (**Tabela 1**).

Figura 13: Perfil de tração mecânica para o NRLb puro e para o NRLb com diferentes concentrações de alginato.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1: Valores de UTS no ponto de ruptura e módulo de Young obtidos para o ensaio de tração mecânica para membranas de NRLb e NRLb-alginato.

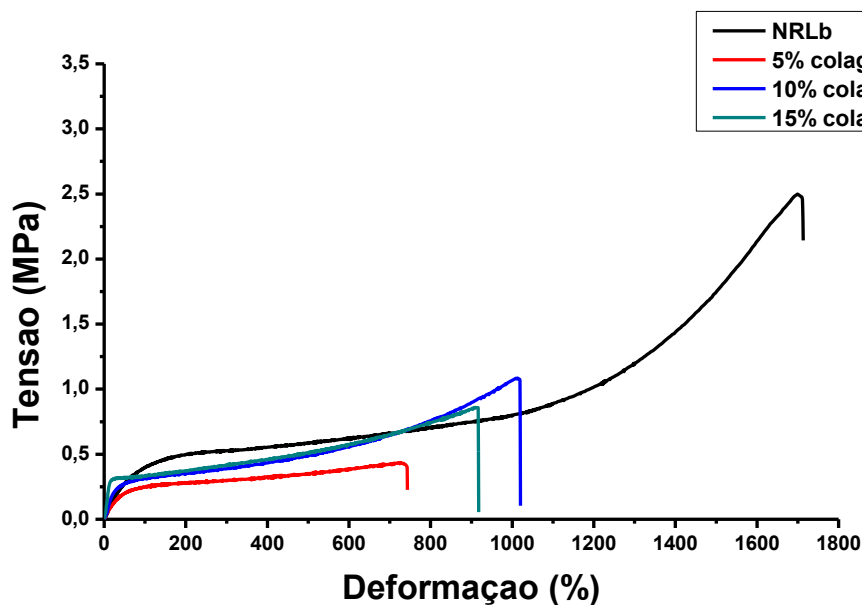
Propriedades mecânicas		
	UTS (MPa)	Módulo de Young (Mpa)
NRLb	2,50	0,65
NRLb-alginato 5%	1,26	1,05
NRLb-alginato 10%	2,12	3,42
NRLb-alginato 15%	3,06	8,65

Comparando os resultados obtidos pode-se notar que a UTS para o NRLb diminui com a adição de alginato em proporções de até 10% em massa. Por outro lado, as membranas com 15% de alginato apresentaram maior UTS quando comparadas as membranas de NRLb puro (**Figura 13**).

Os valores obtidos para o módulo de Young mostram que o NRLb perde elasticidade quando alginato é adicionado em sua preparação, sendo necessário maior força para a deformação da amostra.

A **Figura 14** mostra o perfil de tensão do NRLb puro e do NRLb com diferentes concentrações de colágeno. Com os dados obtidos pode-se identificar a UTS de 2,50 MPa para o NRLb puro e de 0,43; 1,07; e 0,86 MPa para o NRLb-colágeno nas concentrações de 5; 10; e 15% respectivamente. Além da deformação máxima de 1715 % para o NRLb puro e 743; 1020; e 917 % para o NRLb-colágeno nas concentrações de 5; 10; e 15% respectivamente. O módulo de Young observado para o NRLb puro foi de 0,65 MPa e para o NRLb-colágeno nas concentrações de 5; 10; e 15% os módulos observados foram, respectivamente, 0,61; 0,86; e 2,14 MPa (**Tabela 2**).

Figura 14: Perfil de tração mecânica para o NRLb puro e para o NRLb com diferentes concentrações de colágeno.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2: Valores de UTS no ponto de ruptura e módulo de Young obtidos para o ensaio de tração mecânica para membranas de NRLb e NRLb-colágeno.

Propriedades mecânicas		
	UTS (MPa)	Módulo de Young (Mpa)
NRLb	2,50	0,65
NRLb-colágeno 5%	0,43	0,61
NRLb-colágeno 10%	1,07	0,86
NRLb-colágeno 15%	0,86	2,14

Comparando os resultados obtidos pode-se notar que a UTS para o NRLb diminui com a adição de 5% de colágeno (**Figura 14A**). Por outro lado, as membranas com 10 e 15% de colágeno apresentaram maior UTS quando comparadas a membrana de NRLb com 5% de colágeno.

Os valores obtidos para o módulo de Young (**Figura 14B**) mostram que o NRLb, assim como para o alginato, perde elasticidade quando colágeno é adicionado em sua preparação, sendo necessário maior força para a deformação da amostra.

O valor do módulo de Young da pele humana nativa varia de **0,01 a 50MPa**, enquanto a UTS da pele humana varia de aproximadamente **1 a 40MPa** (JIN; PRABHAKARAN; RAMAKRISHNA, 2011). Nota-se que os intervalos de valores encontrados para o módulo de Young e UTS para a pele nativa, são intervalos amplos, tornando fácil a obtenção de valores de características mecânicas para as amostras de NRLb que se encaixem nestes intervalos.

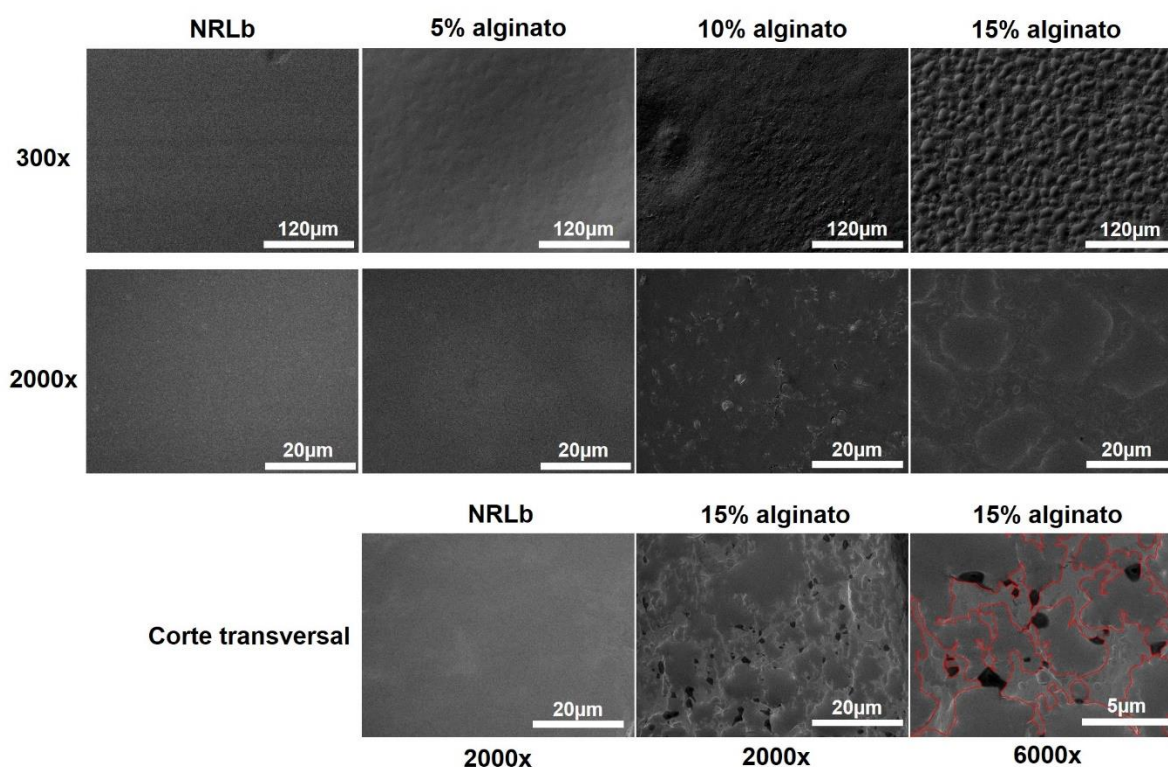
Outros autores também avaliaram as alterações no comportamento mecânico de membranas de NRLb quando submetidas à tração mecânica. Murbach et al. (2014) descobriram que a adição de ciprofloxacina ao NRLb torna o material mais rígido e quebradiço, com menor deformação plástica (DIAS MURBACH et al., 2014), mesmo resultado foi observado por Garms et al. (2017) na avaliação do mesmo material (GARMS et al., 2017). A perda de elasticidade para membranas de NRLb quando adicionados diferentes compostos também foi observada por Floriano et al. (2018) na adição de cetoprofeno (FLORIANO et al., 2018), e por Zancanela et al. (2017) na adição de extratos de própolis (ZANCANELA et al., 2017). No entanto, alguns materiais proporcionam o aumento da elasticidade de membranas de NRLb, como o caso do trabalho realizado por Barros et al. (2019) na utilização de glicerol na produção de membranas de NRLb para utilização como curativo úmido no alívio da dor e desconforto de mamilo em mulheres que estão em período de amamentação (DE BARROS et al., 2019).

4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

Imagens de MEV foram utilizadas com finalidade de caracterizar a superfície e o interior das membranas quanto à presença de poros ou de estruturas cristalinas. A **Figura 15** apresenta as imagens obtidas para as membranas de NRLb com 5, 10 e 15% de alginato em ampliações de 300, 2000 e 6000x. Nas membranas de NRLb com 5% de alginato, nota-se uma superfície homogênea e ausente de poros e de formações cristalinas. Nas membranas de NRLb com 10% de alginato, observa-se o surgimento de formações cristalinas. Na superfície das

membranas de NRLb com 15% de alginato, observa-se o surgimento de estruturas que se assemelham a gotículas de água em uma superfície lisa. A formação destas estruturas deve-se à elevada concentração de alginato na membrana, proporcionando a formação de aglomerados de alginato.

Figura 15: Microscopia eletrônica de varredura da superfície e do interior de membranas de NRLb com alginato. (Ampliações de 300, 2000 e 6000x).



Fonte: Autoria própria.

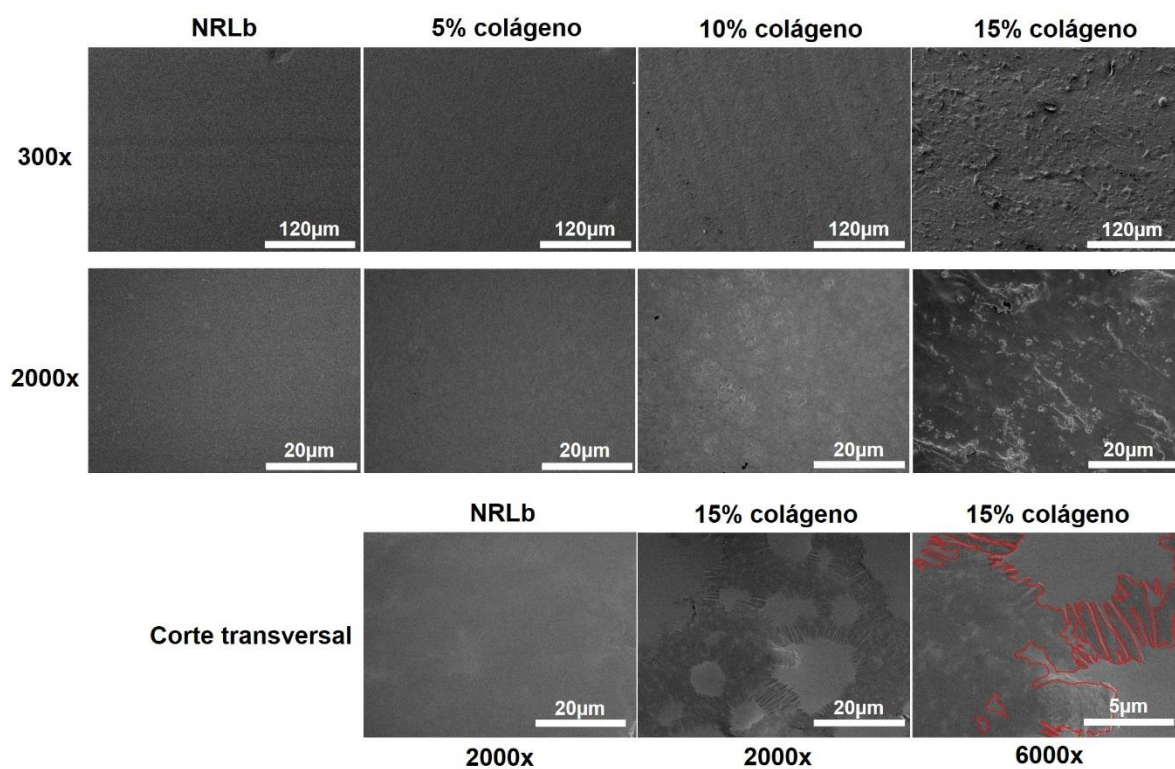
A **Figura 16** apresenta as imagens obtidas para as membranas de NRLb com 5, 10 e 15% de colágeno em ampliações de 300, 2000 e 6000x. Nas membranas de NRLb com 5% de colágeno, nota-se uma superfície homogênea e ausente de poros e de formações cristalinas. Nas membranas de NRLb com 10% de colágeno, observa-se o surgimento de formações cristalinas. Na superfície das membranas de NRLb com 15% de colágeno, observa-se o surgimento de estruturas sólidas devido à grande concentração de colágeno na membrana. As imagens obtidas do interior das membranas revelam a formação de aglomerados do colágeno.

A formação de aglomerados de alginato ou de colágeno na superfície das membranas, não é um problema para aplicações em cicatrização de feridas. O alginato rapidamente absorve o exsudado gerado na região da lesão dando lugar ao hidrogel macio e hidratado, mantendo o

leito da ferida com a umidade necessária e em níveis controlados para que o processo cicatricial ocorra de maneira satisfatória. No caso das membranas produzidas com NRLb e colágeno, por se tratar de colágeno hidrolisado, os cristais de colágeno presentes no material são rapidamente dissolvidos pelos fluídos presentes na ferida, proporcionando um aumento dos peptídeos e aminoácidos necessários para a síntese do novo colágeno.

A ausência de poros observada na superfície das membranas corrobora com os resultados apresentados por Herculano et al. (2010), o autor avaliou as diferenças morfológicas proporcionadas pela variação da temperatura durante a polimerização de membranas de NRLb. Foi observado que o número e as dimensões dos poros em membranas de NRLb são inversamente proporcionais à temperatura de polimerização, ou seja, para se obter maior número de poros e em dimensões maiores, é necessário a utilização de baixas temperaturas no processo de polimerização das membranas (HERCULANO et al., 2010). Temperaturas inferiores a temperatura ambiente ($<25^{\circ}\text{C}$) favorecem a formação de poros, o que pode proporcionar diversas características ao material, como aumento da taxa de transferência de vapor de água, aumento da taxa de liberação de compostos em aplicações de liberação sustentada, entre outros (BORGES et al., 2017).

Figura 16: Microscopia eletrônica de varredura da superfície e do interior de membranas de NRLb com colágeno. (ampliações de 300, 2000 e 6000x).



Fonte: Autoria própria.

Outros autores também reportaram resultados a respeito da morfologia superficial de membranas de NRLb pura ou carregadas com compostos de interesse farmacológico (DE BARROS et al., 2019). Morise et al. (2018), reportaram os resultados do desenvolvimento de um sistema de liberação à base de NRLb para o tratamento de Sialorréia. Por análise de imagem da superfície do material, demonstraram que membranas de NRLb polimerizadas em temperatura ambiente (25°C) não apresentam poros e nem formações de cristais na superfície das amostras. Por outro lado, quando os autores carregaram as membranas de NRLb com escopolamina, as amostras apresentaram a formação de cristais do fármaco na superfície do material (MORISE et al., 2019). Além deste, Borges et al. (2017) publicaram resultados muito interessantes sobre a influência da morfologia superficial de membranas de NRLb na adesão de osteoblastos. Neste trabalho, os autores realizaram a variação da morfologia superficial pela variação da temperatura de polimerização das amostras, mesma metodologia descrita por Herculano et al. em 2010 (HERCULANO et al., 2010). Os resultados confirmaram a relação inversa na temperatura de polimerização e a densidade de poros, com a formação de poros apenas em membranas polimerizadas em temperaturas abaixo de 0°C. Além disso, os autores demonstraram que as membranas com alta densidade de poros, produzidas em temperatura de -20°C, proporcionaram condições favoráveis para a adesão de osteoblastos e a produção de matriz extracelular na superfície das amostras (BORGES et al., 2017).

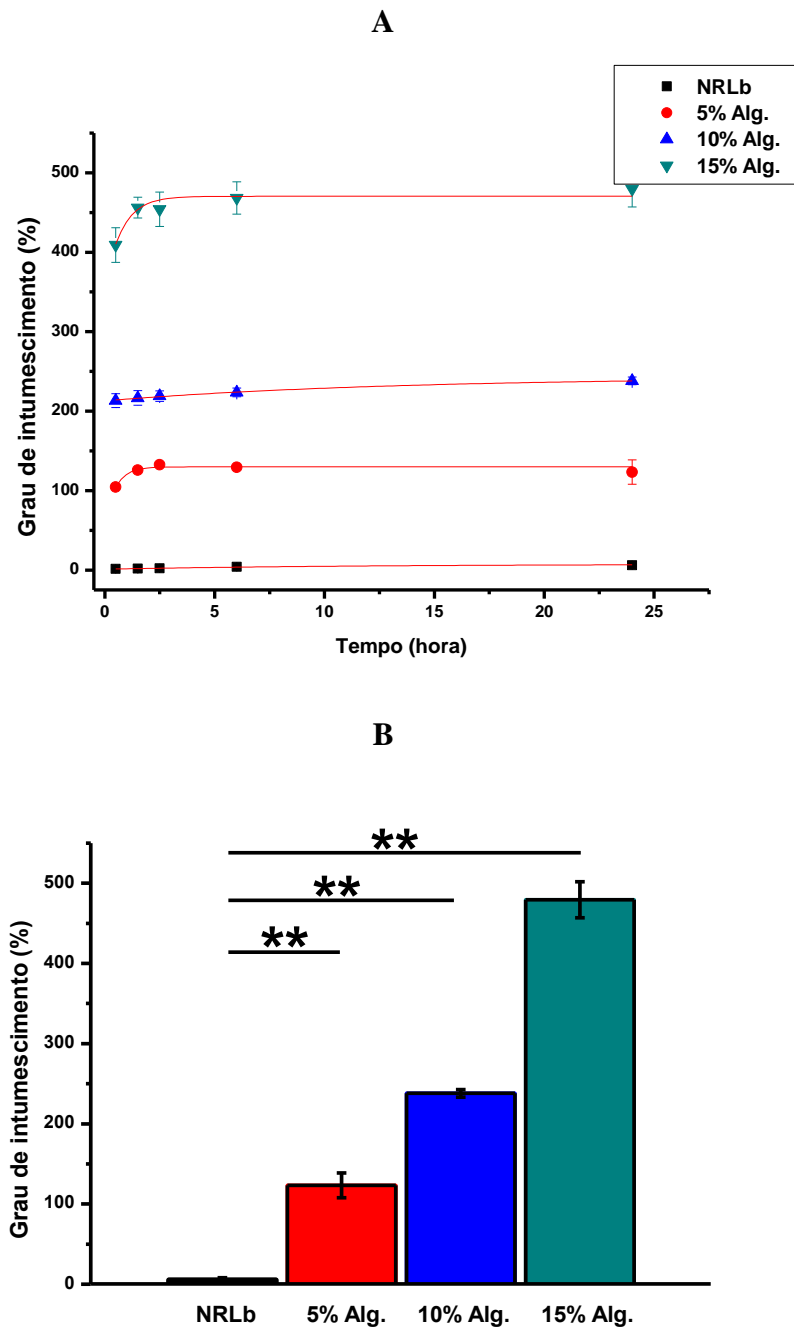
4.5. Intumescimento

Um parâmetro importante para a avaliação de curativos de feridas é a capacidade de absorção de água. A cinética de intumescimento para o NRLb puro e para o NRLb com alginato em diferentes concentrações é apresentado na **Figura 17A e B**. Os resultados mostram que a membrana de NRLb puro tem a capacidade de absorver até 6,1% (g/g) da sua massa em água em um período de 24 horas, enquanto as membranas contendo alginato possuem a capacidade de absorver grandes quantidades de água por unidade de massa. As membranas com 5% de alginato podem absorver até 123,2%, enquanto as membranas com 10% de alginato absorvem até 238,0%, e as membranas com 15% de alginato absorvem até 479,5% de sua massa em água no período de 24 horas. Estes resultados estão em linha com as observações feitas durante a obtenção das imagens de MEV, onde foi possível verificar a formação de regiões com alta concentração de alginato, o que pode ter influenciado de forma favorável a absorção de água. Além disso, a alta capacidade de absorção de fluídos apresentada pelas membranas de NRLb

produzidas com alginato sugerem que estas membranas podem ser satisfatoriamente aplicadas em feridas exsudativas. Os resultados observados para o aumento do GI com o aumento da concentração de alginato, corrobora com os resultados encontrados por Samanta e Ray (2014), Os autores avaliaram características físico-químicas como o GI de hidrogéis de rede semi-interpenetrantes de alginato de sódio e poliacrilamida, os resultados demonstraram que os hidrogéis com 8% de alginato foram capazes de absorver até 1200% da sua massa inicial (SAMANTA; RAY, 2014). Com resultados semelhantes, Pasparakis e Bouropoulos (2006), fizeram um estudo do GI de partículas de alginato de cálcio, e os resultados demonstraram que as partículas de alginato de cálcio foram capazes de absorver até 1200% de sua massa inicial quando submersas em água e até 900% quando submersas em PBS (PASPARAKIS; BOUROPOULOS, 2006). Além destes, Algisite, um curativo composto por alginato de cálcio e disponível comercialmente, também apresenta alto GI, sendo capaz de absorver 1282% de sua massa inicial (PARIKH et al., 2010).

Os trabalhos citados acima mostram que formulações compostas inteiramente por alginato podem absorver até 1200% de sua massa. Nossos resultados, no entanto, mostram que membranas com 15% de alginato podem absorver até 479,5% de sua massa. Esta observação se justifica pelo fato de o alginato compor uma pequena fração do material (máx. 15%).

Figura 17: Cinética e grau de intumescimento para o NRLb puro e para o NRLb com diferentes concentrações de alginato: (A) Cinética de intumescimento NRLb-alginato, (B) Grau de intumescimento NRLb-alginato.



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

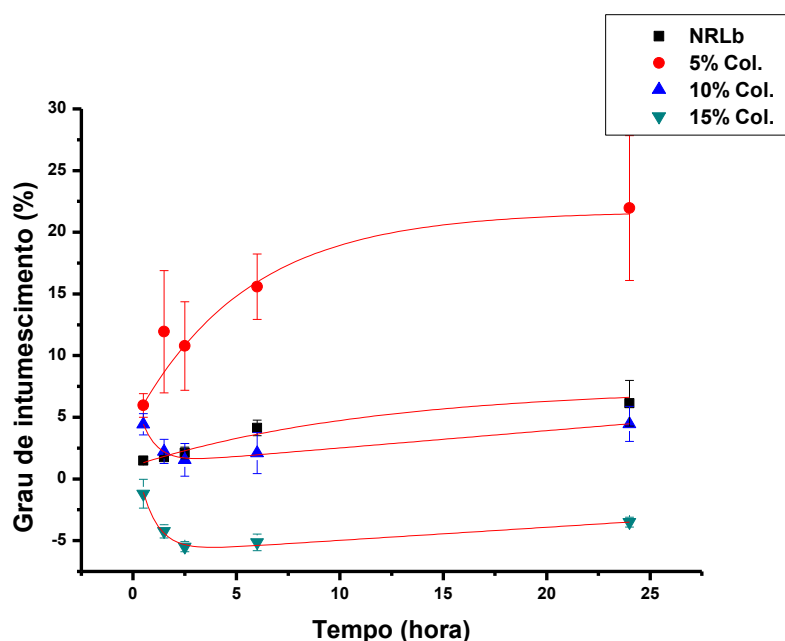
O NRLb, no entanto, apresenta baixo GI quando comparado com materiais que possuam o alginato em sua composição. A baixa capacidade de absorção das membranas de NRLb puro se deve ao fato de maior parte de sua composição ser o poli(*cis*-1,4-isopreno), um polímero hidrofóbico, o que diminui a capacidade de o material absorver água. Além disso, o NRLb é um material complexo e possui em sua composição uma grande quantidade compostos naturais como proteínas e fosfolipídios provenientes da seringueira, apresentando assim, menor absorção de água devido a presença de moléculas que proporcionam a reticulação entre as cadeias poliméricas, diminuindo a entrada de água na estrutura (DE BARROS et al., 2016). Além disso, as membranas de NRLb foram polimerizadas em temperatura ambiente (25°C), o que proporciona a baixa densidade de poros no material, desta forma, diminuindo o GI. Segundo os resultados apresentados por Herculano et al. (2010), o número, tamanho e distribuição de poros nas membranas de NRL variam de acordo com a temperatura de polimerização, bem como sua morfologia geral. A relação entre temperatura de polimerização e a densidade de poros observada pelos autores mostrou-se inversamente proporcional (HERCULANO et al., 2010). A caracterização do GI de membranas de NRLb também foi avaliada por Barros et al. (2016), neste trabalho também foram desenvolvidas membranas de NRLb, porém o método de polimerização utilizado se diferencia. Utilizando nitrogênio líquido, os autores congelaram as amostras ainda hidratadas, e posteriormente removeram o conteúdo aquoso por liofilização. Por meio deste método, foi possível obter membranas de NRLb com alta densidade de poros, favorecendo o aumento do GI. Para as membranas de NRLb polimerizadas durante liofilização, o GI observado foi de 100% da massa inicial (DE BARROS et al., 2016).

A cinética de intumescimento para as membranas de NRLb com colágeno em diferentes concentrações é apresentado na **Figura 18**. A capacidade de absorção para as membranas com colágeno se diferencia de forma muito distinta dependendo da concentração de colágeno na membrana. As membranas com 5% de colágeno apresentam maior capacidade de absorção que as membranas de NRLb puro, podendo absorver até 21,9% de sua massa em água. No entanto, as membranas com 10% e 15% de colágeno apresentam capacidade de absorção inferiores aos resultados apresentados pelas membranas de NRLb puro, no período avaliado. As membranas com 10% de colágeno em sua composição apresentaram capacidade de absorção de 4,4% de sua massa em água no período de 24 horas. Porém, uma observação deve ser feita, no início do ensaio, no tempo de 30 min, a capacidade de absorção observada também foi de 4,4%, diminuindo para 1,54% no tempo 2,5 horas e voltando a aumentar para 4,4% até o fim do experimento em 24 horas. As membranas contendo 15% de colágeno em sua composição

apresentaram o mesmo comportamento que as membranas com 10% de colágeno durante os ensaios de absorção de água. Os resultados negativos demonstram que as membranas com 15% de colágeno perdem massa em proporção maior do que absorvem água. No início do experimento, no tempo de 30 min, as membranas perdem 1,2% da sua massa, e continuam perdendo até 5,5% até o tempo de 2,5 horas, após este período, as membranas param de perder massa e começam a absorver água, absorvendo até 2% de sua massa original em água até o período de 24 horas.

Uma vez que, o colágeno hidrolisado, adicionado na produção das membranas com NRLb não foi reticulado, a literatura disponível a respeito de materiais compostos por colágeno não se compara ao utilizado neste trabalho. Os trabalhos disponíveis tratam da caracterização, num todo, de hidrogéis ou de colágeno descelularizado ou de colágeno hidrolisado e reticulado.

Figura 18: Cinética de intumescimento NRLb-colágeno.



Todos os dados foram apresentados como a média±desvio padrão.

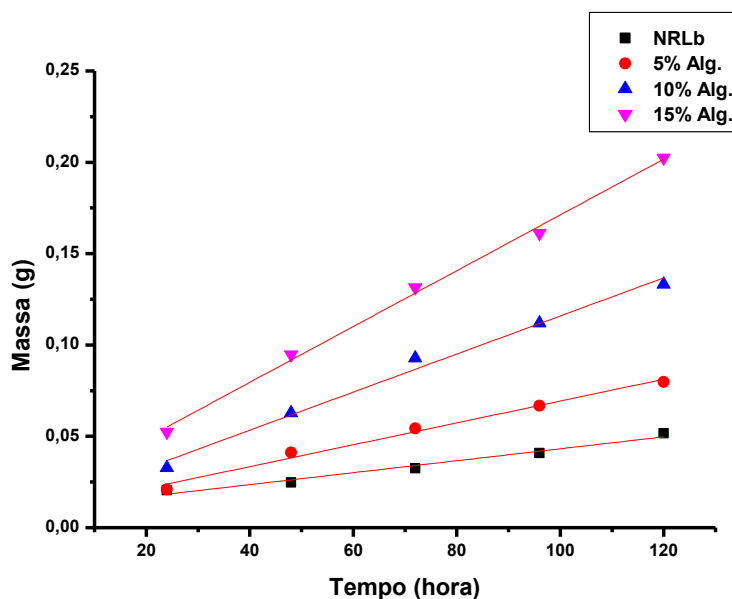
Fonte: Autoria própria.

4.6. Permeabilidade ao vapor de água

Outra propriedade fundamental para um curativo dérmico ideal é a permeabilidade ao vapor de água, uma vez que o teor de umidade é essencial para disponibilizar um ambiente adequado para o processo de cicatrização. Grandes coeficientes de permeabilidade possibilitam criar esse ambiente porque evitam a desidratação e o acúmulo de exsudatos extras (SOBHANIAN et al., 2019). Nesse sentido, a TTVA e a TVA das membranas de NRLb com alginato e com colágeno também foram determinados e listados na **Tabela 3**.

Analisando a **Figura 19**, pode ser observado que a taxa de permeabilidade de vapor de água para as membranas de NRLb puro é constante, de acordo com a equação $y = 0,01 + 3,27 \times 10^{-4}x$ (R-Square: 0,97). Esta relação linear, da quantidade de vapor de água permeado no tempo, também foi observada para as membranas de NRLb com alginato (**Figura 19A**), de acordo com as equações $y = 0,009 + 5,98 \times 10^{-4}x$ (R-Square: 0,98) para as membranas com 5% de alginato, $y = 0,011 + 1,04 \times 10^{-3}x$ (R-Square: 0,98) para as membranas com 10% de alginato, e $y = 0,018 + 1,53 \times 10^{-3}x$ (R-Square: 0,99) para as membranas com 15% de alginato. Analisando a **Tabela 3**, concluímos que mesmo as amostras de NRLb puro e NRLb com alginato terem apresentado relações lineares de permeabilidade ao vapor de água, a presença de alginato aumenta a TVA. Em particular, as amostras com 5%, 10% e 15% de alginato mostraram um aumento da taxa de permeabilidade de 182,8%, 318,0% e 467,9%, respectivamente, quando comparadas ao NRLb puro, mostrando que membranas produzidas com alginato podem ser consideradas semi- ou não-oclusivas.

Figura 19: Comparativo do perfil de permeabilidade ao vapor de água apresentado pelas membranas de NRLb e NRLb-alginato.



Todos os dados foram apresentados como a média±desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

Utilizando a **Equação 2**, com os valores de TTVA obtidos por meio da inclinação da curva resultante da cinética de transmissão de vapor d'água por 4 dias, pode-se calcular a TVA (**Tabela 3**), que expressa a massa de vapor d'água permeada no tempo por unidade de área. A análise dos valores de TVA é importante, pois esta considera medidas, como a espessura e a área do material utilizado, que servem para padronizar os valores obtidos para a TTVA. Similarmente aos valores obtidos para a TTVA, a TVA para as amostras de NRLb com alginato se intensifica com a adição do polissacarídeo. Portanto, as membranas de NRLb-Alginato possuem propriedades adequadas para manter um equilíbrio entre a preservação e a evaporação da umidade.

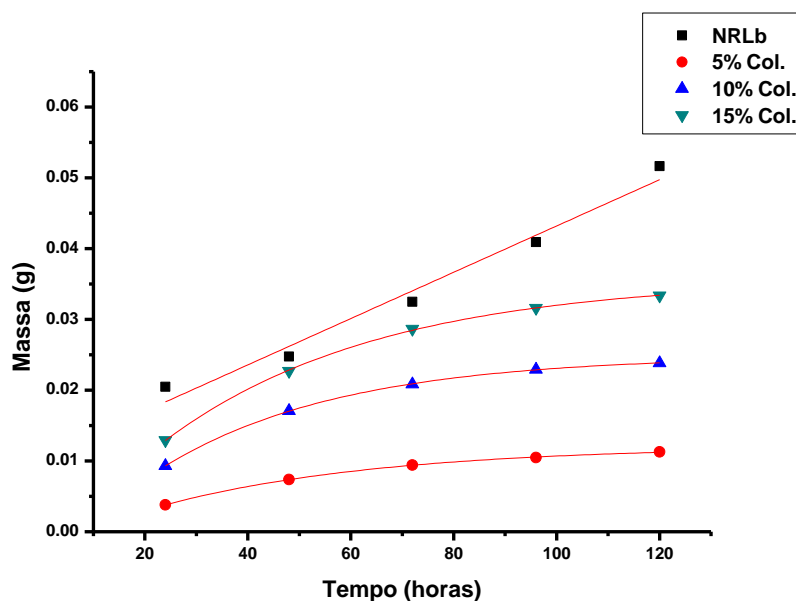
Tabela 3: Taxa de Transferência de Vapor de Água para membranas de NRLb e NRLb-alginato.

	TTVA (g/h)	TVA (g.mm/m ² .h.KPa)
NRLb	$3,27 \times 10^{-4}$	$4,78 \times 10^{-4}$
NRLb-alginato 5%	$5,98 \times 10^{-4}$	$8,75 \times 10^{-4}$
NRLb-alginato 10%	$1,04 \times 10^{-3}$	$1,52 \times 10^{-3}$
NRLb-alginato 15%	$1,53 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-3}$

Por se tratar de um material de propriedades mecânicas que podem ser moduladas de acordo com as condições utilizadas durante o seu preparo, o alginato de sódio, assim como variações deste, é amplamente investigado no desenvolvimento de biomateriais para aplicações em medicina regenerativa. Similarmente aos resultados observados para as membranas de NRLb com diferentes concentrações de alginato, pesquisadores por todo o mundo também verificaram o aumento da TVA com o aumento da concentração de alginato na composição de biomateriais (HO et al., 2020; MONTASER et al., 2016; MUNHOZ et al., 2019; REZVANIAN; AMIN; NG, 2016; SOBHANIAN et al., 2019).

A mesma relação linear de permeabilidade ao vapor de água observada para as amostras de NRLb puro e NRLb-alginato não foi observada para as membranas de NRLb produzidas com colágeno (**Figura 20B**). De acordo com as seguintes equações, as membranas com colágeno apresentaram um decaimento exponencial da TTVA. Para as membranas com 5% de colágeno $y = -0,014 \times \exp\left(-\frac{x}{42,889}\right) + 0,012$ (R-Square: 0,99); para as membranas com 10% de colágeno $y = -0,03 \times \exp\left(-\frac{x}{34,955}\right) + 0,024$ (R-Square: 0,99); e para as membranas com 15% de colágeno $y = -0,04 \times \exp\left(-\frac{x}{41,91}\right) + 0,035$ (R-Square: 0,99).

Figura 20: Comparativo do perfil de permeabilidade ao vapor de água apresentado pelas membranas de NRLb e NRLb-colágeno.



Todos os dados foram apresentados como a média±desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

Pelo fato de a cinética de permeabilidade ao vapor d'água observado para as membranas de NRLb com colágeno apresentar comportamento de decaimento exponencial da TTVA (**Tabela 4**), os valores que se obtêm para a TVA são negativos, e, portanto, não representam a realidade. É como se o conteúdo de colágeno hidrolisado presente nas membranas as tornassem mais compactas, diminuindo assim a TVA. No entanto, durante o teste utilizado, as amostras não entram em contato direto com o conteúdo líquido, o que não é a realidade quando aplicados em sistemas biológicos. Durante a aplicação das amostras, em feridas dérmicas por exemplo, o colágeno hidrolisado será facilmente solubilizado e difundido para o interior da ferida, aumentando a concentração de nutrientes, e conseqüentemente diminuindo a quantidade de colágeno no curativo, o que poderá manter ou aumentar a TTVA.

Tabela 4: Taxa de Transferência de Vapor de Água para membranas de NRLb e NRLb-colágeno.

	TTVA (g/h)	TVA (g.mm/m ² .h.KPa)
NRLb	$3,27 \times 10^{-4}$	$4,78 \times 10^{-4}$
NRLb-colágeno 5%	$-0,014 \times \exp\left(-\frac{x}{42,889}\right)$	-
NRLb-colágeno 10%	$-0,03 \times \exp\left(-\frac{x}{34,955}\right)$	-
NRLb-colágeno 15%	$-0,04 \times \exp\left(-\frac{x}{41,91}\right)$	-

4.7. Perda de massa

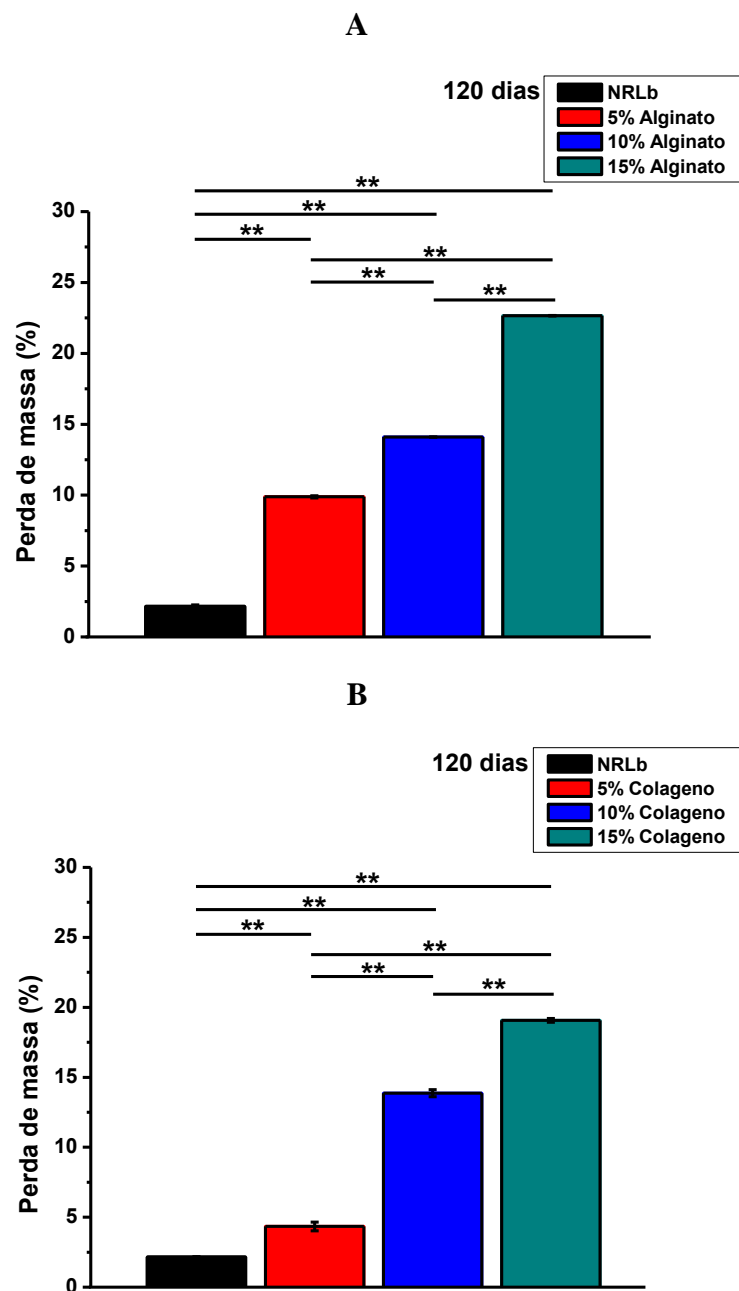
4.7.1. Perda de massa em submersão aquosa

Para o ensaio de perda de massa, as amostras foram imersas em PBS e armazenadas em estufa sob temperatura constante de 37°C. Após 15, 30, 60 e 120 dias, amostras foram retiradas da estufa, lavadas em água destilada para retirar possíveis deposições de sais na superfície das amostras, e secas em estufa e dessecador. Com as amostras secas, o valor da massa final foi subtraído da massa inicial para o cálculo de perda de massa em porcentagem.

A **Figura 21A** apresenta os resultados obtidos da perda de massa das amostras produzidas com alginato. As amostras que apresentaram maior perda de massa foram aquelas produzidas com 15% de alginato, com até 22,6% de perda no período máximo avaliado (120 dias). As membranas com 5% de alginato perderam 4,7x quando comparados os valores obtidos para as membranas controle de NRLb, enquanto as membranas com 10 e 15% de alginato perderem respectivamente 6,7 e 10,8x.

A **Figura 21B** apresenta os resultados obtidos da perda de massa das amostras produzidas com colágeno. As amostras que apresentaram maior perda de massa foram aquelas produzidas com 15% de colágeno, com até 18,9% de perda no período máximo avaliado (120 dias). As membranas com 5% de colágeno perderam 2,0x quando comparados os valores obtidos para as membranas controle de NRLb, enquanto as membranas com 10 e 15% de colágeno perderem respectivamente 6,6 e 9,0x.

Figura 21: Perda de massa de membranas de NRLb após 120 dias: (A) NRLb-alginato, (B) NRLb-colágeno.



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

Saijun et al. (2009) avaliaram a perda de massa do NRL e obtiveram valores de cerca de 1% durante 90 dias de imersão em água (SAIJUN et al., 2009). Com resultados semelhantes, Cesar et al. (2020), avaliaram a perda de massa de membranas de NRLb produzidas com ácido polilático. Os autores observaram uma perda de massa equivalente de aproximadamente 0,6%

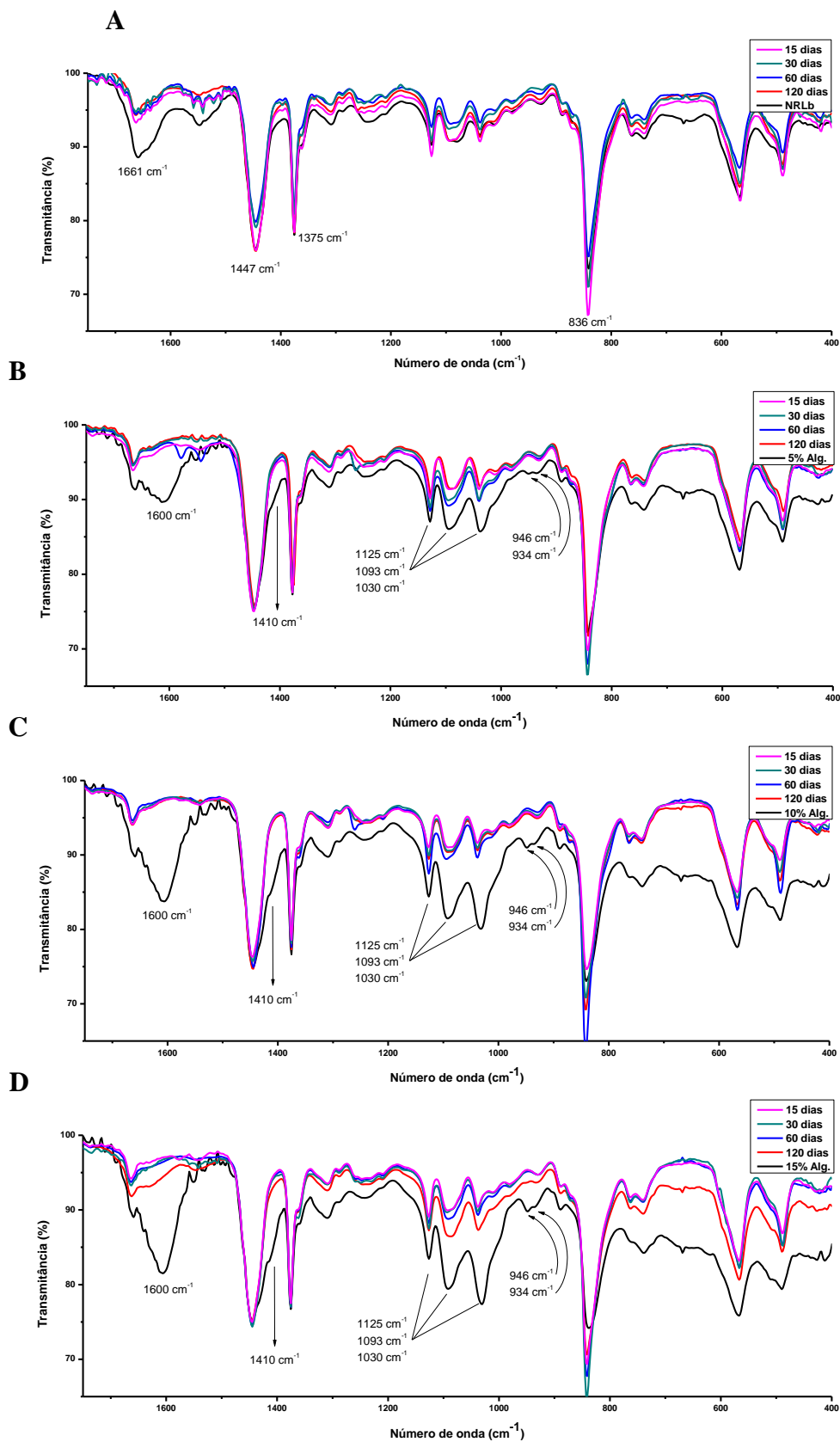
da massa inicial após 120 dias de experimento, para membranas produzidas apenas com NRLb. O resultado inferior da perda de massa encontrada pelos autores, quando comparado aos resultados apresentados no presente trabalho, se justifica pelo fato de os autores não terem utilizado o NRLb em sua forma natural. Para a confecção das membranas, os autores, inicialmente polimerizaram o NRLb por evaporação e em seguida dissolveram o conteúdo hidrofóbico do material utilizando diclorometano, para então produzirem as membranas apenas com o extrato hidrofóbico do NRLb (CESAR et al., 2020).

4.7.2. FTIR – pós perda de massa

Após o período de incubação para a análise de perda de massa, as amostras foram novamente avaliadas pela técnica de infravermelho. Como observado anteriormente na **Figura 12**, as principais bandas para o NRLb são: 1661 cm^{-1} C=C de alcenos; 1447 cm^{-1} deformação angular de CH_2 ; 1375 cm^{-1} deformação angular de CH_3 ; e 836 cm^{-1} de C-H fora do plano referente ao (*cis*-1,4) $\text{R}_2\text{C}=\text{CHR}$. Após a análise de perda de massa, a banda que apresentou maior redução em sua intensidade foi a banda em 1661 cm^{-1} (**Figura 22A**), dando indícios de que a perda de massa das membranas de NRLb se deve principalmente devido a liberação de compostos que apresentam ligações C=C, como o poli(*cis*,1-4 isopreno).

Para as amostras produzidas com alginato (**Figura 8A**), as principais bandas de absorção no infravermelho são: 1030 cm^{-1} (estiramento C-O-C) atribuídas à sua estrutura sacarídica, 1600 e 1410 cm^{-1} são atribuídas a picos de alongamento assimétricos e simétricos de grupos de sal carboxilato. As **Figuras 22B, C e D** mostram os espectros no infravermelho após o ensaio de perda de massa. Pode ser observado grande diminuição das bandas no espectro de FTIR características para o alginato após análise de perda de massa, mostrando que parte da perda de massa é devido ao desprendimento de alginato presente na matriz.

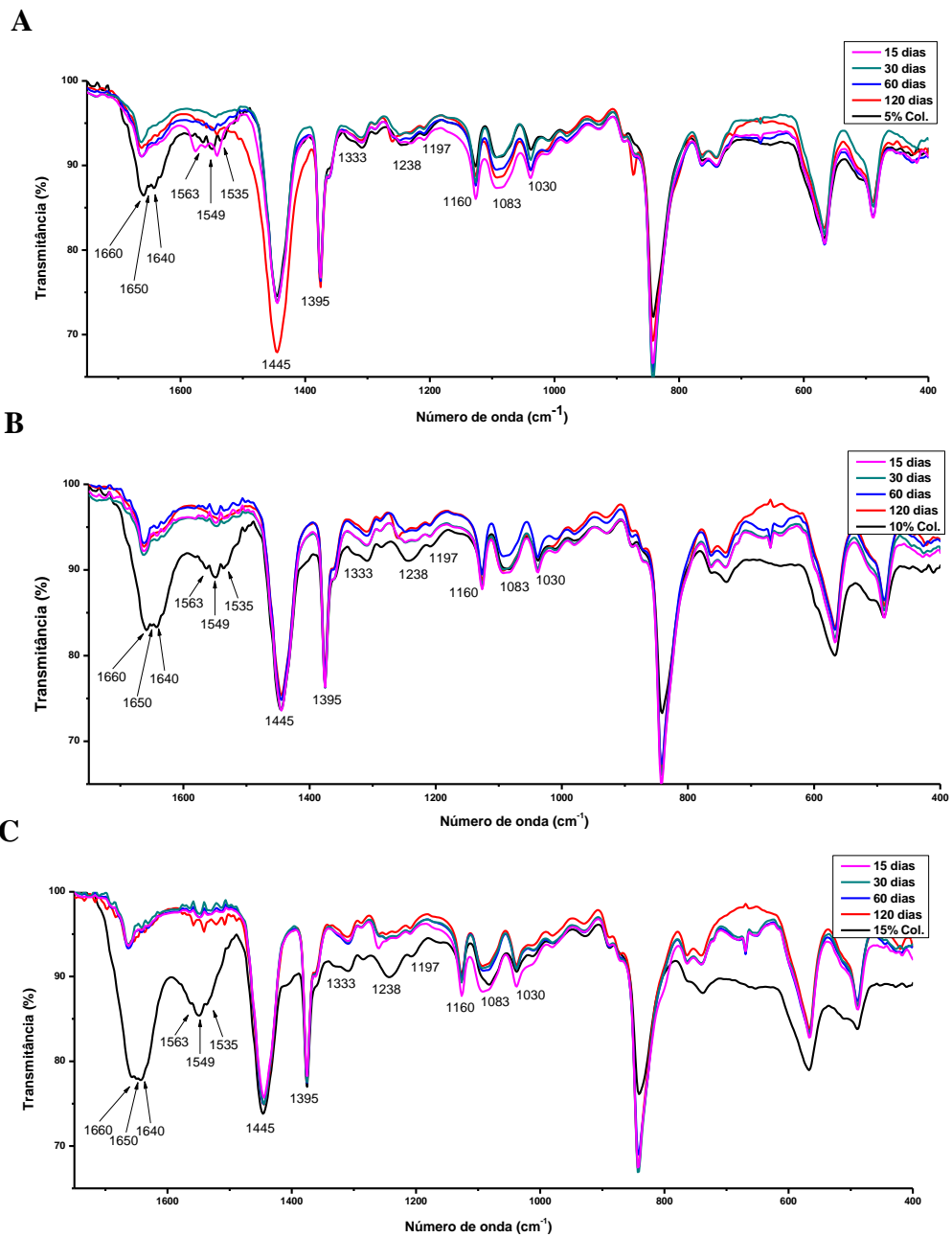
Figura 22: Espectros de infravermelho pós perda de massa: (A) NRLb, (B) NRLb-alginato 5%, (C) NRLb-alginato 10%, (D) NRLb-alginato 15%.



Fonte: Autoria própria.

Para as amostras produzidas com colágeno (**Figura 8B**), apresenta bandas características de amidas I e II em 1650 e 1560 cm^{-1} , estas bandas são típicas de proteínas. Além disso, por se tratar de material comercial, de processo com menor rigor comparado à reagentes de laboratório, bandas em torno de 1030 e 1083 cm^{-1} , que surgem das absorções $\nu(\text{C-O})$ e $\nu(\text{C-O-C})$ das porções de carboidratos também podem ser observadas. As bandas de absorção em torno de 1445, 1395, 1333, 1238 e 1197 cm^{-1} são atribuídas às absorções características do colágeno $\delta(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{C-N})$ e $\delta(\text{N-H})$. As **Figuras 23A, B e C** mostram os espectros no infravermelho para membranas NRLb-colágeno após o ensaio de perda de massa, onde pode ser observado a diminuição das bandas características do colágeno, concluindo que parte da perda de massa é devido ao desprendimento de colágeno presente na matriz.

Figura 23: Espectros de infravermelho pós perda de massa: (A) NRLb-colágeno 5%, (B) NRLb-colágeno 10%, (C) NRLb-colágeno 15%.



Fonte: Autoria própria.

4.7.3. Resistência mecânica – pós perda de massa

O ensaio de resistência mecânica pós perda de massa foi realizado para obter resultados prévios sobre o comportamento dos materiais desenvolvidos quando utilizados como implantes.

As **Tabelas 5 e 6** apresentam os dados de resistência a tração mecânica das membranas produzidas apenas com NRLb, com alginato e com colágeno. Todas as amostras apresentaram redução da UTS no ponto de ruptura após o período de 120 dias do ensaio de perda de massa. A perda de resistência mais expressiva foi para as membranas de NRLb sem aditivos em sua produção, com uma redução de 87,6% da UTS (**Figura 24A**).

Tabela 5: Resistência mecânica pós perda de massa NRLb-alginato.

		Alginato							
		NRLb		5%		10%		15%	
		UTS	Def.	UTS	Def.	UTS	Def.	UTS	Def.
		(MPa)	(mm)	(MPa)	(mm)	(MPa)	(mm)	(MPa)	(mm)
0 dias		2,50	376	1,26	196	2,12	130	3,06	72
120 dias		0,31	195	0,52	135	0,95	268	0,69	192

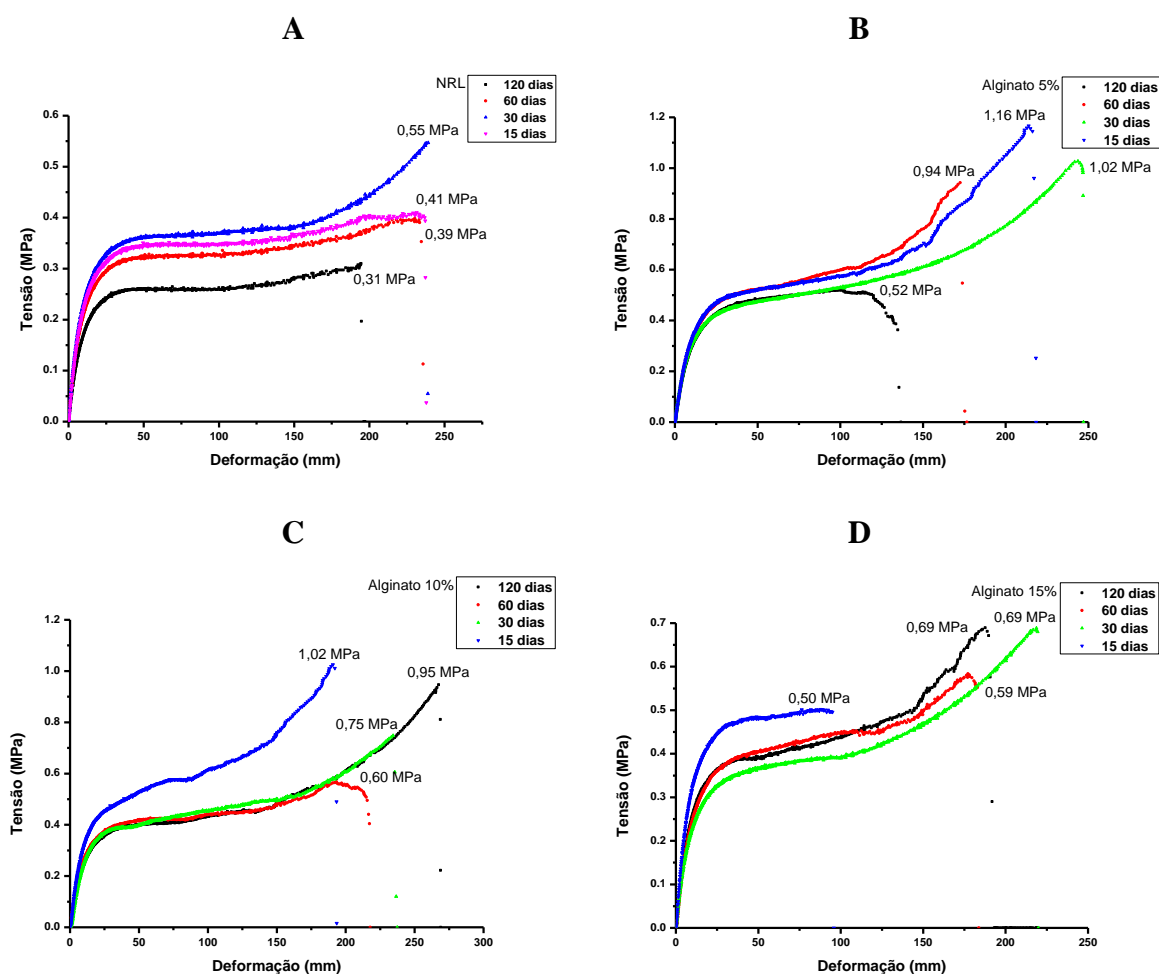
Tabela 6: Resistência mecânica pós perda de massa NRLb-colágeno.

		Colágeno							
		NRLb		5%		10%		15%	
		UTS	Def.	UTS	Def.	UTS	Def.	UTS	Def.
		(MPa)	(mm)	(MPa)	(mm)	(MPa)	(mm)	(MPa)	(mm)
0 dias		2,50	376	0,43	162	1,07	222	0,86	201
120 dias		0,31	195	0,20	165	0,43	192	0,38	174

As amostras produzidas com 5, 10 e 15% de alginato apresentaram, respectivamente, redução de 58,7; 55,2; e 77,5% da UTS após 120 dias de incubação (**Figuras 24B, C e D**).

A redução na resistência a tração mecânica já era esperada, uma vez que, com a perda de massa das amostras por mecanismos de degradação como dissolução e erosão, o material passa a apresentar defeitos estruturais que propiciam a ruptura da amostra com menor força.

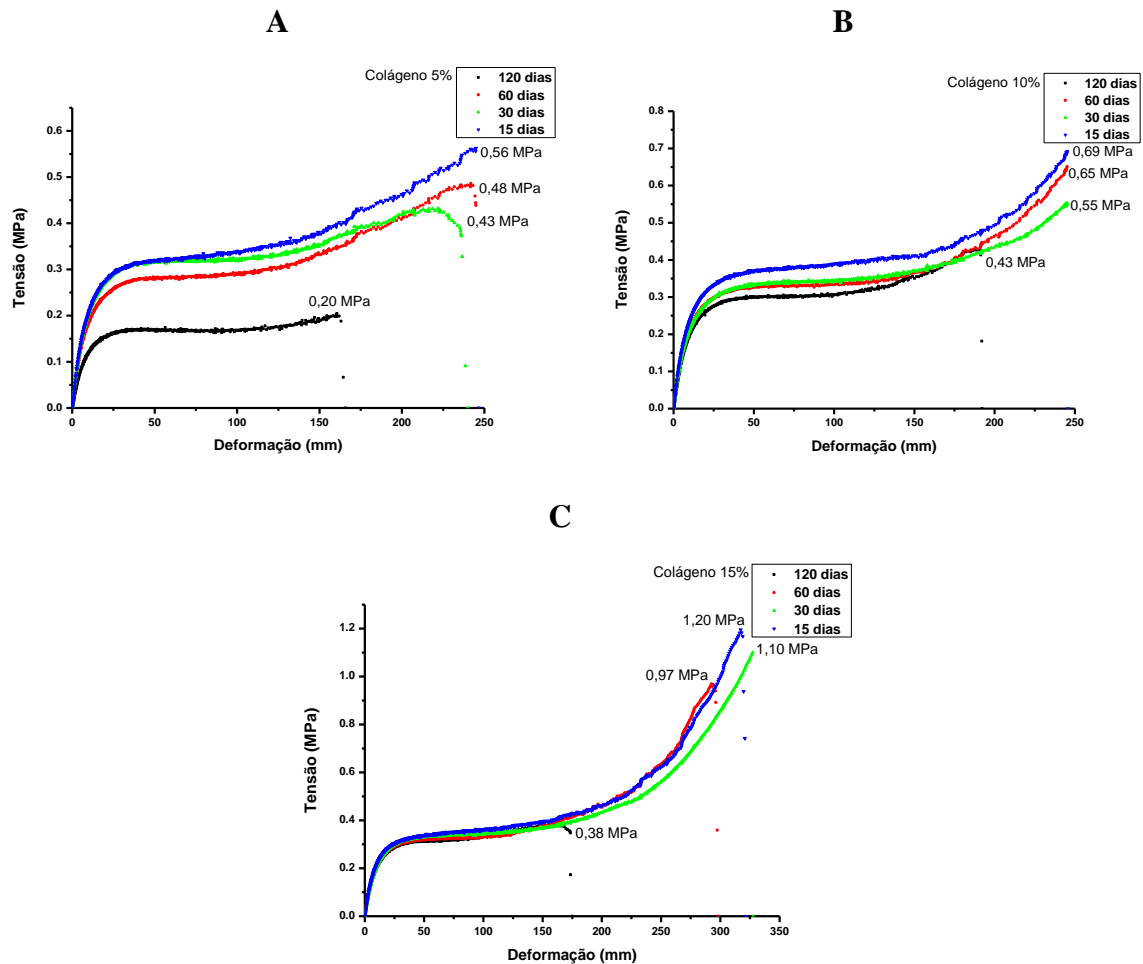
Figura 24: Resistência mecânica pós perda de massa: (A) NRLb, (B) NRLb-alginato 5%, (C) NRLb-alginato 10%, (D) NRLb-alginato 15%.



Fonte: Autoria própria.

As amostras produzidas com 5, 10 e 15% de colágeno apresentaram, respectivamente, redução de 53,5; 59,8; e 55,8% da UTS após 120 dias de incubação (**Figuras 25A, B e C**).

Figura 25: Resistência mecânica pós perda de massa: (A) NRLb-colágeno 5%, (B) NRLb-colágeno 10%, (C) NRLb-colágeno 15%.



Fonte: Autoria própria.

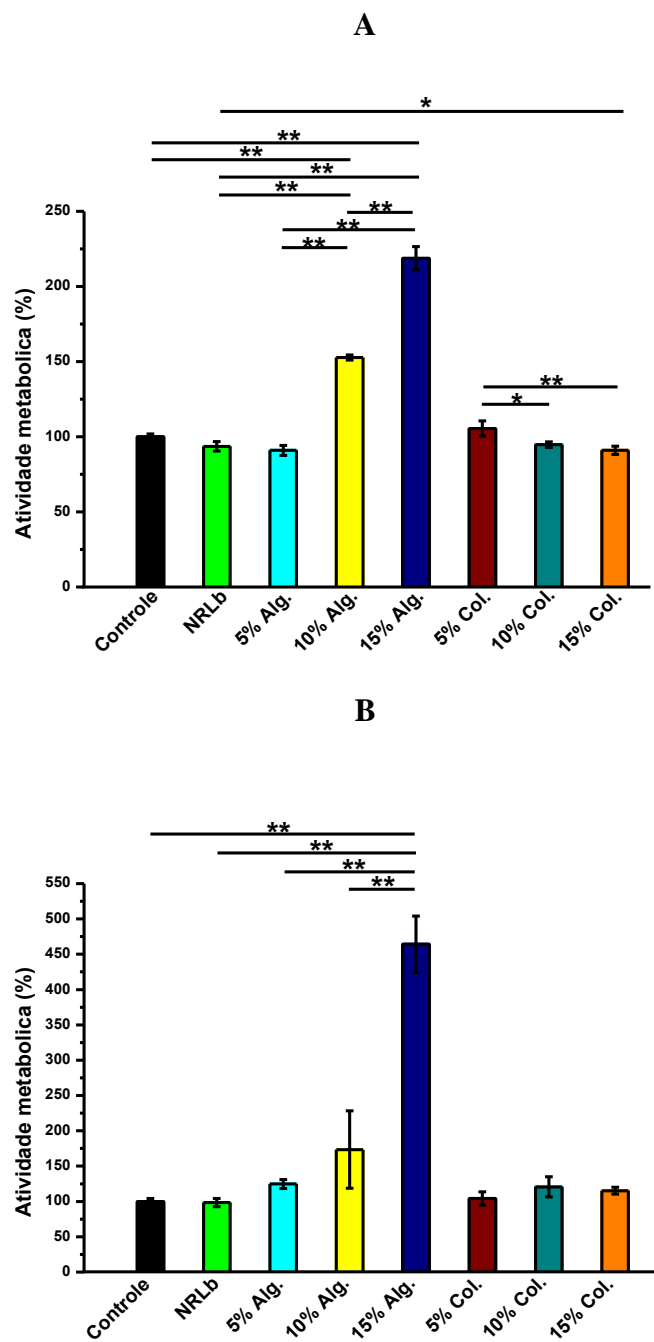
4.8. Citotoxicidade indireta

Os ensaios *in vitro* permitem avaliar a citotoxicidade do material nas células e são essenciais no desenvolvimento de biomateriais, tanto na obtenção de informações sobre a degradação do material, resistência mecânica ao longo do tempo e se os materiais lixiviam substâncias tóxicas que afetam a viabilidade das células. Três ensaios principais para avaliar a biocompatibilidade e toxicidade *in vitro* incluem difusão, extração e método direto de contato biomaterial-célula. Estudos de extração (ou seja, eluição, diluição do extrato) também são empregados para observar qualquer relação linear entre citotoxicidade celular e concentração de biomaterial extraído. A concentração limite do eluato de material em citotoxicidade mínima e máxima pode ser investigada com células sendo expostas ao eluato de material diluído em série e avaliando a viabilidade celular após o período de incubação. Geralmente, as células na área alvo da aplicação são candidatos ao teste de diluição do eluato (JABBARI, 2010).

Para os eluatos de todas as membranas avaliadas, tanto em fibroblastos como em queratinócitos, a atividade metabólica observada foi maior que 87% (**Figura 26**), determinando que membranas NRLb, NRLb-alginato e NRLb-colágeno são biocompatíveis para aplicações que envolvam ambos fibroblastos e queratinócitos.

Além disso, para os ensaios realizados com membranas NRLb-alginato, resultados muito superiores ao controle foram observados. Membranas NRLb-alginato com 15% de alginato em massa apresentaram atividade metabólica de 218% para fibroblastos (**Figura 26A**) e expressivos 464% para queratinócitos (**Figura 26B**). Este resultado demonstra não apenas que membranas NRLb-alginato são biocompatíveis, mas que também auxiliam na proliferação celular.

Figura 26: Atividade metabólica celular pós 24 horas de incubação com eluatos: (A) fibroblastos, (B) queratinócitos.

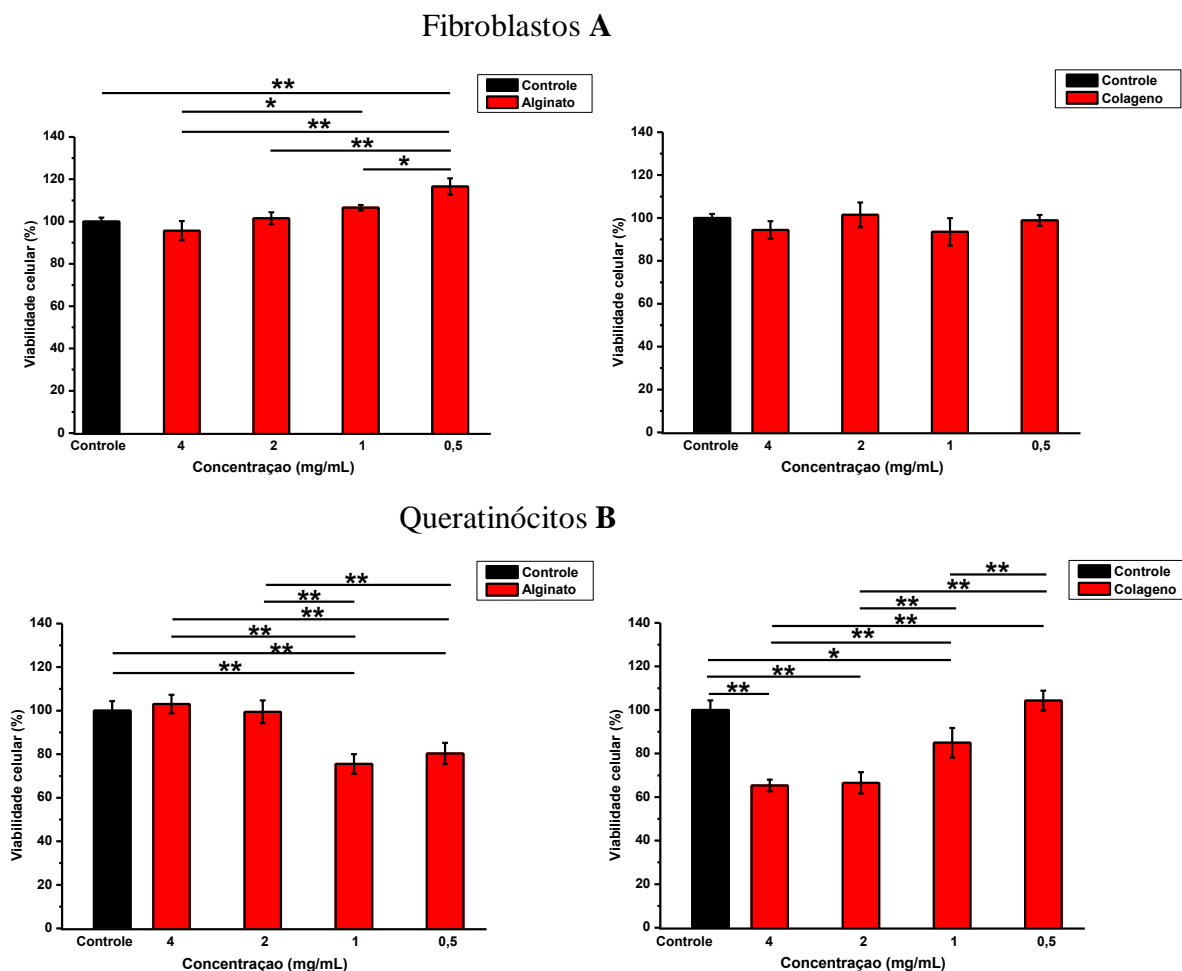


Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

A **Figura 27** mostra o resultado da atividade metabólica de fibroblastos e queratinócitos expostos à diferentes concentrações de alginato e de colágeno (0,5-4 mg/mL). Os resultados demonstraram que, quando expostas ao alginato, a atividade metabólica celular é muito próxima ao controle poliestireno. Os resultados observados para diferentes concentrações de colágeno demonstram que a atividade metabólica de fibroblastos é mantida nas concentrações avaliadas (**Figura 27A**). No entanto, em queratinócitos, em altas concentrações de colágeno (<2 mg/mL) a atividade metabólica celular foi comprometida (**Figura 27B**). A perda de atividade metabólica celular pode ter ocorrido pela diminuição do pH do meio de cultivo com a adição do colágeno hidrolisado (mudança de coloração, de avermelhado para amarelo).

Figura 27: Atividade metabólica celular pós 24 horas de incubação com diferentes concentrações de Alginato e Colágeno:



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

Furuya et al. (2017) avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de NRL para aplicações em engenharia de tecidos ósseos. Os autores utilizaram pré-osteoblastos (MC3T3-E1), células muito sensíveis ao NRLb. Os resultados demonstraram que em concentração superior a 10,0 µg/mL, as nanopartículas de NRLb melhoram a atividade metabólica de MC3T3-E1 na faixa de 130-150% em comparação com o controle. O valor estimado de IC50 para as células MC3T3-E1 foi de 3,99 mg/mL. Desta forma, os autores identificaram que a melhor concentração das nanopartículas de NRL para pré-osteoblastos é de 320 µg/mL (FURUYA et al., 2017).

Miranda et al. (2017) também avaliaram a citotoxicidade *in vitro* do NRL aplicado em osteoblastos. Os autores utilizaram o mesmo método de extração de eluatos citado no presente trabalho. As amostras avaliadas se diferenciavam na variação da densidade de poros por variação do volume de água durante o processo de polimerização das membranas por liofilização. Os resultados demonstraram que sem diluição, os eluatos foram tóxicos para todas as amostras. No entanto, houve uma redução significativa na citotoxicidade observada quando os eluatos foram diluídos para concentrações variando de 80-40% em meio de cultivo (MIRANDA et al., 2017). O resultado encontrado por Miranda et al. (2017) é muito semelhante ao encontrado por Borges et al. (2017), que também avaliou a citotoxicidade *in vitro* de membranas de NRL, polimerizadas em diferentes temperaturas, quando aplicadas em osteoblastos (BORGES et al., 2017).

Com resultados distintos, Zancanela et al. (2019), também avaliaram a citotoxicidade *in vitro* de membranas de NRLb, porém, desta vez em fibroblastos (NIH-3T3). Os autores utilizaram o método de avaliação indireta da citotoxicidade, utilizando eluatos das amostras desenvolvidas. Quando não diluídos, a viabilidade celular observada foi de $92.56 \pm 6.52\%$, mostrando que o NRLb não é citotóxico para fibroblastos. Além disso, a atividade metabólica celular aumentou para $101.52 \pm 6.47\%$ e $120.63 \pm 8.84\%$ quando os eluatos foram diluídos para 50 e 30%, respectivamente (ZANCANELA et al., 2019).

4.10. Influência na proliferação celular

A proliferação celular é definida pela passagem das células pelas quatro fases do ciclo celular e pelo número de células que estão ativamente em ciclo, conhecida como fração de crescimento (MOONEY; LEIN; MILLER, 2013). A proliferação e migração celular são eventos essenciais para o recrutamento celular para o local de tecidos lesionados e pode ser fortemente influenciada por fatores de crescimento ou pela presença de compostos que podem influenciar a expressão destas biomoléculas. A avaliação da proliferação celular pode ser usada para avaliar a saúde celular normal, medir respostas a insultos tóxicos ou como uma ferramenta de prognóstico e diagnóstico em vários tipos de câncer. No estudo e desenvolvimento de biomateriais para uso em terapias regenerativas também é necessário que haja uma avaliação da influência destes materiais, seja na proliferação na superfície do biomaterial, como também na proliferação influenciada pela exposição aos compostos eluídos no meio.

Os marcadores disponíveis para avaliação da proliferação celular, normalmente analisam os níveis ou síntese de DNA (BrdU, IdU e CldU, EdU), metabolismo celular (MTT, XTT, WST-1) ou proteínas específicas da proliferação (PCNA, Ki67, MCM-2) (KEE et al., 2002; KURKI et al., 1986). O ensaio de MTT pode ser utilizado para medir a taxa de proliferação celular e, inversamente, quando eventos metabólicos levam à apoptose ou necrose, a redução na viabilidade celular. Para cada tipo de célula é estabelecida a relação linear entre o número de células e o sinal produzido, permitindo assim a quantificação precisa das mudanças na taxa de proliferação (OKA et al., 1992; VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

A cicatrização externa de feridas é um processo de várias etapas que envolve vários tipos de células, incluindo queratinócitos epidérmicos, fibroblastos dérmicos, células endoteliais e células nervosas periféricas. A reepitelização é uma etapa crucial durante a cicatrização de feridas, que envolve a migração e proliferação de queratinócitos da epiderme circundante e apêndices, como folículos capilares e glândulas sudoríparas (HUNT; HOPF; HUSSAIN, 2000; MARTIN, 1997) Após a lesão, os queratinócitos na margem da ferida começam a proliferar atrás das células em migração ativa, resultando em um epitélio denso e hiperproliferativo, visto como camadas de células migratórias nas margens da ferida. Pensa-se que esses eventos sejam regulados principalmente por receptores de fatores de crescimento, integrinas, matriz extracelular e MMPs (ANDRADE et al., 2011; MORASSO; TOMICANIC, 2005; SANTORO; GAUDINO, 2005; WERNER; GROSE, 2003). Centenas de

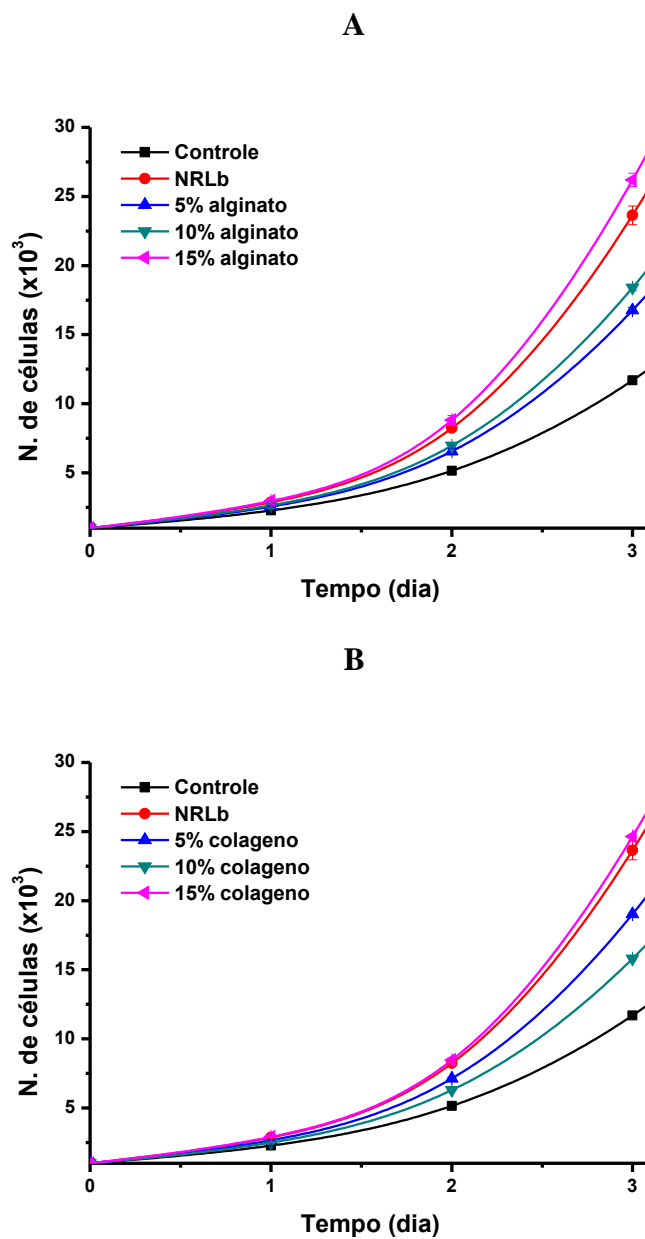
biomateriais desenvolvidos para aplicações em terapias regenerativas são avaliados quanto a sua influência na proliferação celular (MURRAY et al., 2019; TABRIZ; DOUROUMIS; BOATENG, 2020; WANG et al., 2020).

Para a avaliação da influência das amostras na proliferação celular, fibroblastos e queratinócitos foram semeados em placas de 12 poços na densidade de 10^3 células/cm² (foi necessário utilizar densidade reduzida de células para proporcionar densidade óptica no intervalo de detecção do método), após 24 horas em condições de cultura, as células foram expostas aos eluatos das amostras NRLb, NRLb-alginato e NRLb-colágeno.

4.10.1. Fibroblastos

A taxa de proliferação de fibroblastos é positivamente influenciada por eluatos das amostras de NRLb, com um acréscimo de 59% na taxa de proliferação (**Figura 32**). Para as amostras de NRLb-alginato 5% e 10% e NRLb-colágeno 5% e 10%, a proliferação de fibroblastos também é favorecida, porém em proporções menores comparadas ao NRLb. Para as amostras de NRLb-alginato 15% e NRLb-colágeno 15%, a taxa de proliferação de fibroblastos é favorecida em 62%, resultado muito próximo ao observado para as amostras de NRLb sem adição de alginato ou colágeno. Assim, os resultados da taxa de proliferação de fibroblastos em presença de eluatos de NRLb e NRLb com alginato ou colágeno demonstram que a presença de alginato ou colágeno não proporcionam aumento significativo na taxa de proliferação de fibroblastos comparado aos resultados observados para eluatos de NRLb.

Figura 28: Influência na proliferação celular em fibroblastos em 72 horas de incubação com eluatos: (A) NRLb-alginato, (B) NRLb-colágeno.



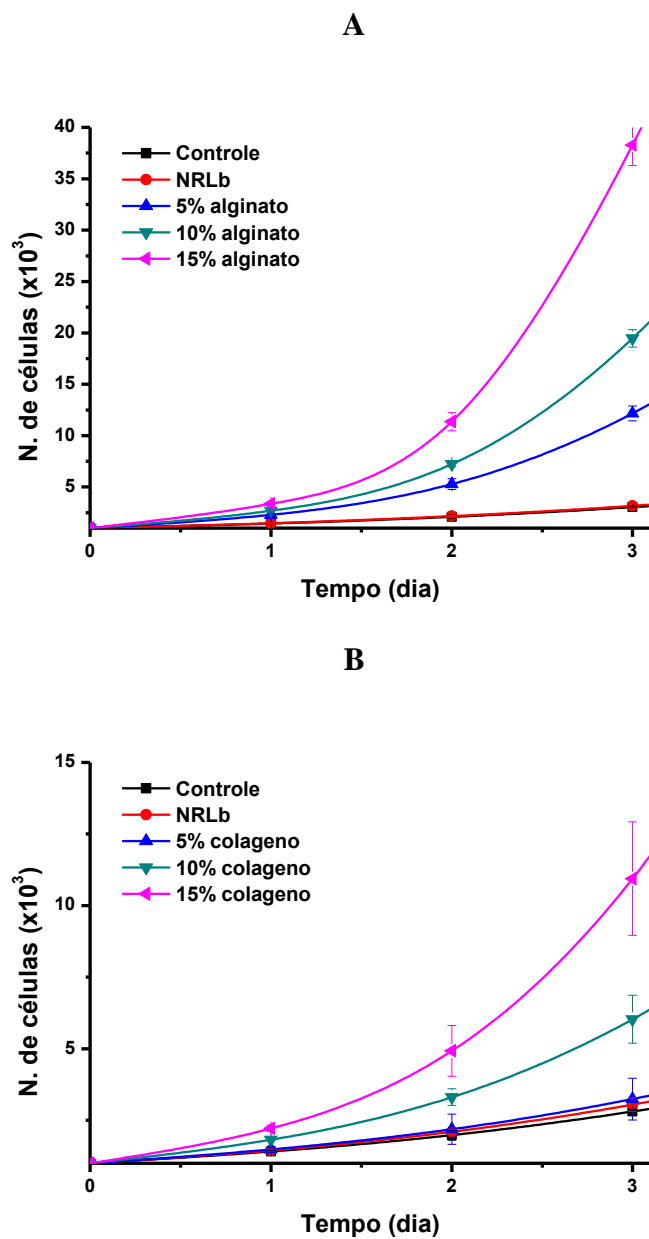
Todos os dados foram apresentados como a média \pm desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

4.10.2. Queratinócitos

Aos resultados que se referem à proliferação de queratinócitos na presença de eluatos de NRLb e NRLb com alginato ou colágeno, a presença de NRLb não apresentou diferença na taxa de proliferação comparada ao controle (**Figura 33**). Por outro lado, a presença de alginato ou colágeno demonstraram expressivo aumento da taxa de proliferação para queratinócitos. Para eluatos NRLb-alginato 15% a taxa de proliferação aumentou 192% em relação ao controle, enquanto eluatos NRLb-colágeno 15% aumentaram 77%. A **Tabela 7** mostra a taxa de proliferação de fibroblastos e queratinócitos para todas as membranas avaliadas.

Figura 29: Influência na proliferação celular em queratinócitos em 72 horas de incubação com eluatos em 100%: (A) NRLb-alginato, (B) NRLb-colágeno.



Todos os dados foram apresentados como a média \pm desvio padrão.

Fonte: Autoria própria.

Tabela 7: Influência dos eluatos de membranas NRLb, NRLb-alginato e NRLb-colágeno na taxa de proliferação de fibroblastos e queratinócitos.

Taxa da proliferação celular (%)		
	Fibroblastos	Queratinócitos
<i>Controle</i>	128	45
<i>NRLb</i>	187	47
<i>NRLb-alginato 5%</i>	154	130
<i>NRLb-alginato 10%</i>	164	167
<i>NRLb-alginato 15%</i>	191	237
<i>NRLb-colágeno 5%</i>	167	48
<i>NRLb-colágeno 10%</i>	151	82
<i>NRLb-colágeno 15%</i>	191	122

Os valores correspondentes à taxa de proliferação celular representam o coeficiente angular médio obtido das curvas de proliferação celular para cada amostra.

A influência da presença apenas de alginato e de colágeno, em diferentes concentrações, na proliferação celular também foi avaliada. A **Tabela 8**, fornece a taxa de proliferação a cada 24 horas na presença dos compostos. A proliferação de fibroblastos foi beneficiada pelo aumento na concentração de alginato, aumentando até 121% para 2 mg/mL, comparado ao controle poliestireno. A presença de colágeno também beneficiou a proliferação de fibroblastos, porém, de forma distinta. A proliferação celular foi beneficiada em concentrações mais baixas de colágeno, aumentando em até 54% para 0,5 mg/mL. A proliferação de queratinócitos foi beneficiada pela presença de alginato, com maior influência em baixas concentrações do polissacarídeo, aumentando até 65%, na concentração de 0,5 mg/mL, em relação ao controle. A proliferação de queratinócitos foi beneficiada pelo aumento da concentração de colágeno, na concentração de 4 mg/mL teve um incremento de 55% da taxa de proliferação observada para o controle poliestireno.

Tabela 8: Influência da presença de alginato e colágeno, em diferentes concentrações, na proliferação de fibroblastos e queratinócitos.

Taxa da proliferação celular (%)		
	Fibroblastos	Queratinócitos
<i>Controle</i>	128	45
<i>Alg. 4 mg/mL</i>	204	48
<i>Alg. 2 mg/mL</i>	249	69
<i>Alg. 1 mg/mL</i>	183	98
<i>Alg. 0,5 mg/mL</i>	152	110
<i>Col. 4 mg/mL</i>	149	100
<i>Col. 2 mg/mL</i>	145	86
<i>Col. 1 mg/mL</i>	177	64
<i>Col. 0,5 mg/mL</i>	182	42

Os valores correspondentes à taxa de proliferação celular representam o coeficiente angular médio obtido das curvas de proliferação celular para cada amostra.

Os resultados para a análise de proliferação de fibroblastos (**Figura 32**) e queratinócitos (**Figura 33**) na presença de eluatos de membranas NRLb, NRLb-alginato e NRLb-colágeno demonstram que a adição de alginato ou de colágeno nas membranas, não proporciona incremento na taxa de proliferação de fibroblastos em relação aos resultados observados para as amostras produzidas apenas com NRLb. No entanto, a taxa de proliferação para fibroblastos é positivamente influenciada por eluatos de NRLb puro. Para a taxa de proliferação de queratinócitos, a presença de eluatos de NRLb puro não proporciona alterações da taxa de proliferação. No entanto, quando alginato ou colágeno são adicionados nas membranas de NRLb, a taxa de proliferação para queratinócitos é fortemente favorecida.

Floriano et al. (2014) realizaram o estudo da biocompatibilidade de NRL extraído de cinco diferentes clones de seringueira (RRIM 600, PB 235, GT1, PR 255 e IAN 873), comparando a influência da adição, ou não, de hidróxido de amônio para a conservação do NRL. Para os estudos foram realizados testes *in vitro* com células de fibroblastos (linhagem NIH-3T3) e *in vivo* com coelhos adultos da Nova Zelândia. Os resultados observados pelos autores, revelaram que o NRL produzido a partir dos cinco clones avaliados são biocompatíveis e não são genotóxicos, a depender do cuidado durante o processamento. A adição de produtos químicos, como o hidróxido de amônio, durante o processamento pode afetar a

biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* dos tecidos moles. Mostrando que a extração de látex sem o uso de conservantes é o método mais adequado para a produção de biomateriais. Dos cinco clones estudados, RRIM 600 e IAN 873 produziram maior proliferação celular, sugerindo que diferentes clones têm bioatividade diferente (FLORIANO et al., 2014). Vale ressaltar que neste estudo, os autores realizaram centrifugação de 1500 rpm, apenas para a remoção de partículas sólidas provenientes da etapa de extração, não deixando claro se as proteínas alergênicas são também removidas nesta etapa do processo (para a remoção das proteínas alergênicas, utilizando uma centrífuga com raio de no mínimo 30 cm, seriam necessário 5000 rpm para se garantir 8000 g).

Siqueira et al. (2019), realizaram estudos de géis de alginato-nanocelulose para aplicações biomédicas, além de caracterizações físico-químicas, propriedades de crescimento celular também foram avaliadas. Fibroblastos (linhagem L929) foram utilizados para os testes *in vitro*. Os ensaios realizados mostraram que o crescimento celular não foi favorecido quando eluatos de alginato de cálcio estavam presentes, apresentando um crescimento celular igual ou próximo ao apresentado pelo controle (SIQUEIRA et al., 2019).

Liu et al. investigaram os efeitos de hidrolisados de colágeno de origem bovina na proliferação e diferenciação de osteoblastos (MC3T3-E1). Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a proliferação celular foi beneficiada após o tratamento com diferentes concentrações de hidrolisado de colágeno bovino. A melhor concentração foi de 3 mg/mL, aumentando significativamente a porcentagem de células MC3T3-E1 na fase G2/S. Além disso, a mineralização foi significativamente aumentada para as células MC3T3-E1 após tratamento por 14 ou 21 dias. Juntando todas essas descobertas, os autores concluíram que o hidrolisado de colágeno bovino aumentou a proliferação de osteoblastos, e desempenhou um papel importante na diferenciação e formação de matriz mineralizada (LIU et al., 2014).

Em um outro trabalho sobre compostos de hidrólise do colágeno, Ohara, et al (2010) avaliaram a influência de peptídeos derivados de colágeno nos componentes dérmicos da matriz extracelular e proliferação celular em culturas de fibroblastos dérmicos de origem humana. De todos peptídeos do colágeno avaliados pelos autores, o dipeptídeo prolina-hidroxiprolina (Pro-Hyp) aumentou a proliferação celular em 150%, e a síntese de ácido hialurônico em 380% em uma dosagem de 200 nmol/mL (OHARA et al., 2010).

5. CONCLUSÃO

Neste estudo, desenvolvemos membranas poliméricas compostas por NRLb, alginato e colágeno, para futuras aplicações em regeneração tecidual. Durante a realização deste trabalho, pudemos observar que a modificação das membranas de NRLb com alginato ou colágeno proporciona alterações em suas propriedades físico-químicas, tais como: a formação de cristais no interior e superfície do material, diminuição da UTS e elasticidade, aumento na absorção de fluídos em até 479,5% (NRLb- alginato 15%), incremento ou diminuição da TTVA. Além disso, após a perda de massa sob exposição à fluidos (120 dias), há perda da UTS pela perda de poli(cis-1,4-isopreno), e perda de massa intensificada pela perda de alginato e colágeno. Os ensaios *in vitro* mostraram que, em aplicações onde fibroblastos e/ou queratinócitos estão presentes, alguns aspectos como a proliferação celular será beneficiada podendo acelerar o processo regenerativo. Devido às suas características mecânicas, químicas e biológicas, membranas híbridas compostas por NRLb, alginato e colágeno, apresentam grande promessa em terapias regenerativas como a cicatrização de ferida crônicas. A biocompatibilidade das membranas e a habilidade de criar um ambiente favorável no local se sua aplicação são pontos chave que contribuem para o seu valor em facilitar e acelerar a regeneração de tecidos biológicos.

RECONHECIMENTOS

Esta Tese de Doutorado foi patrocinada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o número de contrato 2017/02518-8. As opiniões e conclusões contidas neste documento são de responsabilidade dos autores e não devem ser interpretadas como representando as políticas oficiais, expressas ou implícitas, pelas agências de fomento citadas.

REFERÊNCIAS

- AGUDA, A. H. et al. Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 49, p. 17474–17479, dez. 2014.
- AKTURK, O. et al. Evaluation of sericin/collagen membranes as prospective wound dressing biomaterial. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 279–288, 2011.
- ALVES, M. C. O.; GRAEFF, C. F. DE O. P. P.-R. P. **Teste de angiogênese estimulada por membranas de látex natural**, 2003.
- ANDRADE, T. A. M. et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 44, n. 10, p. 1036–1047, out. 2011.
- BARROS, N. R. DE et al. Diclofenac Potassium Transdermal Patches Using Natural Rubber Latex Biomembranes as Carrier. **Journal of Materials**, v. 2015, p. 1–7, 2015.
- BELBACHIR, K. et al. Collagen types analysis and differentiation by FTIR spectroscopy. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 395, n. 3, p. 829–837, out. 2009.
- BIGLARI, S. et al. Simulating Inflammation in a Wound Microenvironment Using a Dermal Wound-on-a-Chip Model. **Advanced Healthcare Materials**, v. 8, n. 1, p. 1801307, 1 jan. 2019.
- BOATENG, J. S. et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 8, p. 2892–2923, ago. 2008.
- BORGES, F. A. et al. Natural rubber latex coated with calcium phosphate for biomedical application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 26, n. 17, p. 1256–1268, 22 nov. 2015.
- BORGES, F. A. et al. Application of natural rubber latex as scaffold for osteoblast to guided bone regeneration. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 39, 2017.
- BOURDOULOUS, S. et al. Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression. **The Journal of cell biology**, v. 143, n. 1, p. 267–276, out. 1998.
- BRETT, D. A Review of Collagen and Collagen-based Wound Dressings. **Wounds : a**

compendium of clinical research and practice, v. 20, p. 347–356, 6 maio 2015.

BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H.-L. Collagen Membranes: A Review. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 2, p. 215–229, 1 fev. 2001.

CESAR, M. B. et al. Development and Characterization of Natural Rubber Latex and Polylactic Acid Membranes for Biomedical Application. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 1, p. 220–230, 2020.

CHABY, G. et al. Dressings for Acute and Chronic Wounds: A Systematic Review. **Archives of Dermatology**, v. 143, n. 10, p. 1297–1304, 1 out. 2007.

CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R. T. Review collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, v. 101, n. 8, p. 821–833, ago. 2014.

CIPRIANI FRADE, M. A. et al. Management of diabetic skin wounds with a natural latex biomembrane. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 32, n. 4, p. 157–162, 2004.

CURY, D. P. et al. Application of a Purified Protein From Natural Latex and the Influence of Suture Type on Achilles Tendon Repair in Rats. **The American journal of sports medicine**, v. 47, n. 4, p. 901–914, mar. 2019.

DABIRI, G.; DAMSTETTER, E.; PHILLIPS, T. Choosing a Wound Dressing Based on Common Wound Characteristics. **Advances in wound care**, v. 5, n. 1, p. 32–41, 1 jan. 2016.

DE BARROS, N. R. et al. Oxytocin Sustained Release Using Natural Rubber Latex Membranes. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 22, n. 4, 2016.

DE BARROS, N. R. et al. Natural rubber latex biodevice as controlled release system for chronic wounds healing. **Biomedical Physics and Engineering Express**, v. 4, n. 3, 2018.

DE BARROS, N. R. et al. Natural latex-glycerol dressing to reduce nipple pain and healing the skin in breastfeeding women. **Skin research and technology : official journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)**, v. 25, n. 4, p. 461–468, jul. 2019.

DENG, A. et al. Electrospinning of in situ crosslinked recombinant human collagen peptide/chitosan nanofibers for wound healing. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 8, p. 2197–

2208, 2018.

DIAS MURBACH, H. et al. Ciprofloxacin Release Using Natural Rubber Latex Membranes as Carrier. **International Journal of Biomaterials**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

DOYLE, J. W. et al. Effects of calcium alginate on cellular wound healing processes modeled in vitro. **Journal of biomedical materials research**, v. 32, n. 4, p. 561–568, dez. 1996.

DREAMSTIME. **Collagen Estrutura molecular**. Disponível em: <<https://pt.dreamstime.com/collagen-estrutura-molecular-image128770034>>. Acesso em: 27 abr. 2020.

DUARTE, M. A. H. et al. Metronidazole release using natural rubber latex as matrix. **Materials Research**, v. 13, n. 1, p. 57–61, 2010.

EN-ISO-10993-12. Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials. **ISO 10993-12:2008**, 2008.

ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 95, n. 3, p. 932–939, dez. 2010.

ESKANDARINIA, A. et al. A Novel Bilayer Wound Dressing Composed of a Dense Polyurethane/Propolis Membrane and a Biodegradable Polycaprolactone/Gelatin Nanofibrous Scaffold. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3063, 2020.

FLECK, C. A.; SIMMAN, R. Modern collagen wound dressings: function and purpose. **The Journal of the American College of Certified Wound Specialists**, v. 2, n. 3, p. 50–54, 2010.

FLORIANO, J. F. et al. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 2, p. 461–470, 2014.

FLORIANO, J. F. et al. Ketoprofen Loaded in Natural Rubber Latex Transdermal Patch for Tendinitis Treatment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 6, p. 2281–2289, 2018.

FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annu. Rev. Med.**, v. 57, p. 1–18, 2006.

FRADE, M. A. C. et al. A natural biomembrane as a new proposal for the treatment of pressure ulcers. **Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana**, v. 34, n. 3, p. 137–142, 2006.

- FURUYA, M. et al. Evaluation on Cytotoxicity of Natural Rubber Latex Nanoparticles and Application in Bone Tissue Engineering. **e-Journal of Soft Materials**, v. 12, p. 1–10, 2017.
- GARMS, B. et al. Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 1–10, 2017.
- GUO, Y. et al. Anisotropic swelling wound dressings with vertically aligned water absorptive particles. **RSC Advances**, v. 8, n. 15, p. 8173–8180, 2018.
- HARISHKUMAR, M. et al. Revealing the Mechanism of *In Vitro* Wound Healing Properties of *Citrus tamurana* Extract. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 963457, 2013.
- HASSAN, A. et al. Development of Anti-bacterial PVA/Starch Based Hydrogel Membrane for Wound Dressing. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 1, p. 235–243, 2018.
- HERCULANO, R. D. et al. **Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR)** *Materials Research sciELO* , , 2009.
- HERCULANO, R. D. et al. On the release of metronidazole from natural rubber latex membranes. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 272–275, mar. 2011.
- HO, T. C. et al. Gelatin-sodium alginate based films with Pseuderanthemum palatiferum (Nees) Radlk. freeze-dried powder obtained by subcritical water extraction. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 24, p. 100469, 2020.
- HUGGINS, M. L. The structure of collagen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 43, n. 2, p. 209, 1957.
- HUNT, T. K.; HOPF, H.; HUSSAIN, Z. Physiology of wound healing. **Advances in skin & wound care**, v. 13, n. 2 Suppl, p. 6–11, 2000.
- INDRANI, D. J.; LUKITOWATI, F.; YULIZAR, Y. Preparation of Chitosan/Collagen Blend Membranes for Wound Dressing: A Study on FTIR Spectroscopy and Mechanical Properties. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 202, p. 12020, 2017.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Biological evaluation of medical devices (ISO 10993-5) International Standard ISO 10993-5 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods**, 2009.

JABBARI, E. **Biologically-responsive hybrid biomaterials: a reference for material scientists and bioengineers.** [s.l.] World Scientific, 2010.

JAYAKUMAR, G. C. et al. Scleraldehyde as a stabilizing agent for collagen scaffold preparation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1482–1489, 2012.

JIN, G.; PRABHAKARAN, M. P.; RAMAKRISHNA, S. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 8, p. 3113–3122, 2011.

KAMOUN, E. A.; KENAWY, E.-R. S.; CHEN, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 3, p. 217–233, 2017.

KEE, N. et al. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 115, n. 1, p. 97–105, 2002.

KÜHN, K. **The classical collagens: Types I, II, and III.** In “**Structure and Function of Collagen Types**”(R. Mayne and RE Burgeson, Eds.)Academic Press, Orlando, FL, , 1987.

KURKI, P. et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. **Experimental Cell Research**, v. 166, n. 1, p. 209–219, 1986.

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

LI, P. et al. Chitosan-alginate nanoparticles as a novel drug delivery system for nifedipine. **International journal of biomedical science : IJBS**, v. 4, n. 3, p. 221–228, set. 2008.

LIU, J. et al. Bovine Collagen Peptides Compounds Promote the Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 Pre-Osteoblasts. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99920, 13 jun. 2014.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5309, p. 75–81, abr. 1997.

MEDINA-ALARCÓN, K. et al. Characterization and Microbiological Application of Ciprofloxacin Loaded in Natural Rubber Latex Membranes. v. 15, p. 1–10, 21 nov. 2017.

MENDONCA, R. J. et al. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherapy**

research : PTR, v. 24, n. 5, p. 764–768, maio 2010.

MIR, M. et al. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. **Progress in Biomaterials**, v. 7, n. 1, p. 1–21, 2018.

MIRANDA, M. C. R. et al. Porosity effects of natural latex (*Hevea brasiliensis*) on release of compounds for biomedical applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 28, n. 18, p. 2117–2130, 2017.

MOHANDAS, A. et al. Exploration of alginate hydrogel/nano zinc oxide composite bandages for infected wounds. **International journal of nanomedicine**, v. 10, n. Suppl 1, p. 53, 2015.

MONTASER, A. S. et al. Preparation and characterization of alginate/silver/nicotinamide nanocomposites for treating diabetic wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 739–747, 2016.

MOONEY, S. M.; LEIN, P. J.; MILLER, M. W. Chapter 28 - Fetal Alcohol Spectrum Disorder: Targeted Effects of Ethanol on Cell Proliferation and Survival. In: RUBENSTEIN, J. L. R.; RAKIC, P. B. T.-N. C. D. AND F. IN THE B. (Eds.). Oxford: Academic Press, 2013. p. 521–537.

MORASSO, M. I.; TOMIC-CANIC, M. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. **Biology of the cell**, v. 97, n. 3, p. 173–183, mar. 2005.

MORISE, B. T. et al. Scopolamine loaded in natural rubber latex as a future transdermal patch for sialorrhoea treatment. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 68, n. 13, p. 788–795, set. 2019.

MRUE, F. et al. **Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane Materials Research** scielo , , 2004.

MUNHOZ, D. R. et al. Alginate films functionalized with silver sulfadiazine-loaded [Mg-Al] layered double hydroxide as antimicrobial wound dressing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 504–510, 2019.

MURRAY, R. Z. et al. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. **Burns & trauma**, v. 7, p. 2, 25 jan. 2019.

- NAWAMAWAT, K. et al. Surface nanostructure of *Hevea brasiliensis* natural rubber latex particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 390, n. 1, p. 157–166, 2011.
- OHARA, H. et al. Collagen-derived dipeptide, proline-hydroxyproline, stimulates cell proliferation and hyaluronic acid synthesis in cultured human dermal fibroblasts. **The Journal of Dermatology**, v. 37, n. 4, p. 330–338, 1 abr. 2010.
- OKA, M. et al. A Modified Colorimetric MTT Assay Adapted for Primary Cultured Hepatocytes: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 9, p. 1472–1473, 1 jan. 1992.
- OLIVER, L. C.; BLAINE, G. Haemostasis with absorbable alginates in neurosurgical practice. **The British journal of surgery**, v. 37, n. 147, p. 307–310, jan. 1950.
- PARIKH, D. V et al. Absorption and swelling characteristics of silver (I) antimicrobial wound dressings. **Textile Research Journal**, v. 81, n. 5, p. 494–503, 8 set. 2010.
- PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 323, n. 1, p. 34–42, 2006.
- PETERS, W. J. Biological dressings in burns--a review. **Annals of plastic surgery**, v. 4, n. 2, p. 133–137, fev. 1980.
- PINHO, E. C. C. M. DE et al. **Uso experimental da biomembrana de látex na reconstrução conjuntival** *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia* scielo , , 2004.
- PITARU, S. et al. Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. **Journal of Periodontal Research**, v. 22, n. 4, p. 331–333, 1 jul. 1987.
- PRISCILA DA SILVA. **Algas pardas**. Disponível em:
<<https://www.infoescola.com/biologia/algas-pardas/>>.
- QUEEN, D. et al. A dressing history. **International wound journal**, v. 1, n. 1, p. 59–77, abr. 2004.
- RANGARAJ, A.; HARDING, K.; LEAPER, D. Role of collagen in wound management. **Wounds**, v. 7, 1 jun. 2011.

REHMAN, S. R. U. et al. Reduced Graphene Oxide Incorporated GelMA Hydrogel Promotes Angiogenesis For Wound Healing Applications. **International journal of nanomedicine**, v. 14, p. 9603–9617, 5 dez. 2019.

REZVANIAN, M.; AMIN, M. C. I. M.; NG, S.-F. Development and physicochemical characterization of alginate composite film loaded with simvastatin as a potential wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 295–304, 2016.

RHO, K. S. et al. Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1452–1461, 2006.

ROTTMAR, M. et al. In vitro investigations of a novel wound dressing concept based on biodegradable polyurethane. **Science and technology of advanced materials**, v. 16, n. 3, p. 34606, 20 maio 2015.

RUSZCZAK, Z. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1595–1611, 2003.

SAARAI, A. et al. On the characterization of sodium alginate/gelatine-based hydrogels for wound dressing. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 126, n. S1, p. E79–E88, 25 out. 2012.

SADER, S. L. et al. **Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural** *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* scielo , , 2000.

SAI K, P.; BABU, M. Collagen based dressings — a review. **Burns**, v. 26, n. 1, p. 54–62, 2000.

SAIJUN, D. et al. Water absorption and mechanical properties of water-swellaable natural rubber. **Sonklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 31, n. 5, p. 561, 2009.

SAMANTA, H. S.; RAY, S. K. Synthesis, characterization, swelling and drug release behavior of semi-interpenetrating network hydrogels of sodium alginate and polyacrylamide. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 666–678, 2014.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304, n. 1, p. 274–286, 2005.

SARAH HECKLER. **Supplement Round Up: Collagen Peptides**. Disponível em:

<<https://www.theenduranceedge.com/2018/08/collagen-peptides/>>.

SCIENCE & FOOD. **Deconstructed Apple Pie**. Disponível em:

<<https://scienceandfooducla.wordpress.com/2013/06/11/deconstructed-apple-pie/>>.

SILVER, F. et al. **Collagen-based wound dressing and method for applying same** Google Patents, , 23 mar. 1993.

SINGH, R.; SINGH, D. Radiation synthesis of PVP/alginate hydrogel containing nanosilver as wound dressing. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 23, n. 11, p. 2649–2658, nov. 2012.

SIQUEIRA, P. et al. Three-Dimensional Stable Alginate-Nanocellulose Gels for Biomedical Applications: Towards Tunable Mechanical Properties and Cell Growing. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 1, jan. 2019.

SOBHANIAN, P. et al. Development of nanofibrous collagen-grafted poly (vinyl alcohol)/gelatin/alginate scaffolds as potential skin substitute. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 977–987, 2019.

STEWART, P. A.; HEARN, J.; WILKINSON, M. C. An overview of polymer latex film formation and properties. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 86, n. 3, p. 195–267, 2000.

STRACCIA, M. C. et al. Alginate hydrogels coated with chitosan for wound dressing. **Marine drugs**, v. 13, n. 5, p. 2890–2908, maio 2015.

SWEENEY, I. R.; MIRAFTAB, M.; COLLYER, G. A critical review of modern and emerging absorbent dressings used to treat exuding wounds. **International wound journal**, v. 9, n. 6, p. 601–612, 2012.

SZPAK, P. Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. **Journal of Archaeological Science**, v. 38, n. 12, p. 3358–3372, 2011.

TABRIZ, A. G.; DOUROUMIS, D.; BOATENG, J. **3D Printed Scaffolds for Wound Healing and Tissue Regeneration** **Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications**: Wiley Online Books., 2 mar. 2020. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1002/9781119433316.ch17>>

- TANODEKAEW, S. et al. Preparation of acrylic grafted chitin for wound dressing application. **Biomaterials**, v. 25, n. 7, p. 1453–1460, 2004.
- THIMSEN-WHITAKER, K.; BARROW, P.; FEREE, K. Novel wound care yields positive results. **Ostomy/wound management**, v. 38, n. 4, p. 36- 39,41,43-44, maio 1992.
- UBBINK, D. T. et al. A systematic review of topical negative pressure therapy for acute and chronic wounds. **BJS (British Journal of Surgery)**, v. 95, n. 6, p. 685–692, 1 jun. 2008.
- VAN DER LAAN, J. S. et al. TFE-plasma polymerized dermal sheep collagen for the repair of abdominal wall defects. **The International journal of artificial organs**, v. 14, n. 10, p. 661–666, out. 1991.
- VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: **Cancer cell culture**. [s.l.] Springer, 2011. p. 237–245.
- WANG, F. et al. Akermanite bioceramic enhances wound healing with accelerated reepithelialization by promoting proliferation, migration, and stemness of epidermal cells. **Wound Repair and Regeneration**, v. 28, n. 1, p. 16–25, 1 jan. 2020.
- WANG, L. et al. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. **Journal of biomedical materials research**, v. 63, n. 5, p. 610–618, 2002.
- WEE; GOMBOTZ. Protein release from alginate matrices. **Advanced drug delivery reviews**, v. 31, n. 3, p. 267–285, maio 1998.
- WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 835–870, jul. 2003.
- WIETLISBACH, C. M. 21 - Wound Care. In: COOPER, C. B. T.-F. OF H. T. (SECOND E. (Ed.). St. Louis: Mosby, 2014. p. 206–218.
- WOODROOF, A. et al. Evolution of a Biosynthetic Temporary Skin Substitute: A Preliminary Study. **Eplasty**, v. 15, p. e30–e30, 20 jul. 2015.
- XIAO, W. et al. Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 6, p. 2384–2393, jun. 2011.
- YU, W. et al. Design of a novel wound dressing consisting of alginate hydrogel and

simvastatin-incorporated mesoporous hydroxyapatite microspheres for cutaneous wound healing. **RSC Advances**, v. 6, n. 106, p. 104375–104387, 2016.

ZAMAN, H. U. et al. Physico-mechanical properties of wound dressing material and its biomedical application. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 7, p. 1369–1375, 2011.

ZANCANELA, D. C. et al. Physical, chemical and antimicrobial implications of the association of propolis with a natural rubber latex membrane. **Materials Letters**, v. 209, p. 39–42, 2017.

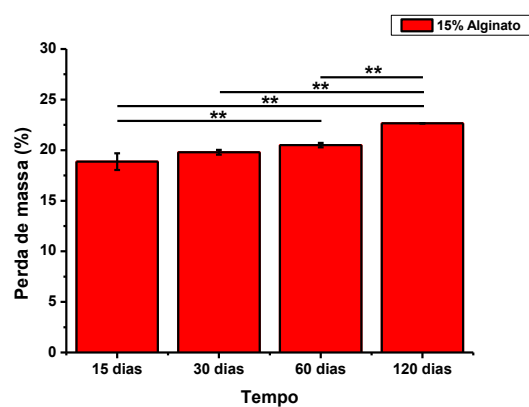
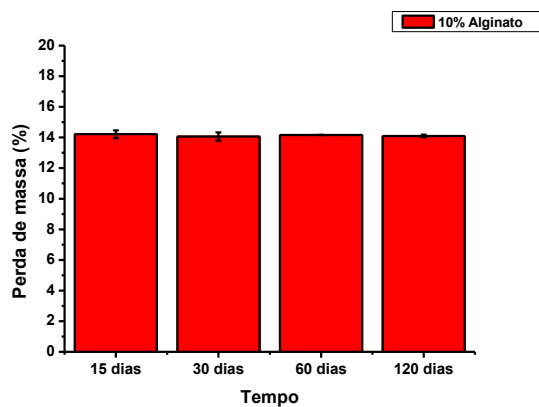
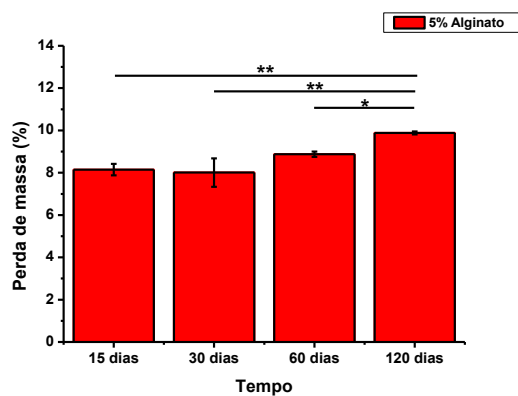
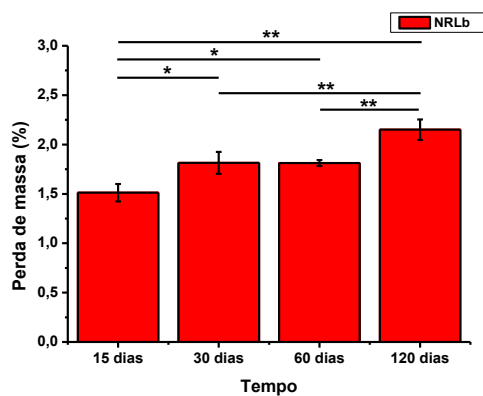
ZANCANELA, D. C. et al. Natural rubber latex membranes incorporated with three different types of propolis: Physical-chemistry and antimicrobial behaviours. **Materials Science and Engineering C**, v. 97, n. November 2017, p. 576–582, 2019.

ZHAO, W.-Y. et al. Chitosan-calcium alginate dressing promotes wound healing: A preliminary study. **Wound Repair and Regeneration**, v. n/a, n. n/a, 23 dez. 2019a.

ZHAO, X. et al. A hydrogen sulfide-releasing alginate dressing for effective wound healing. **Acta Biomaterialia**, 2019b.

ANEXO I

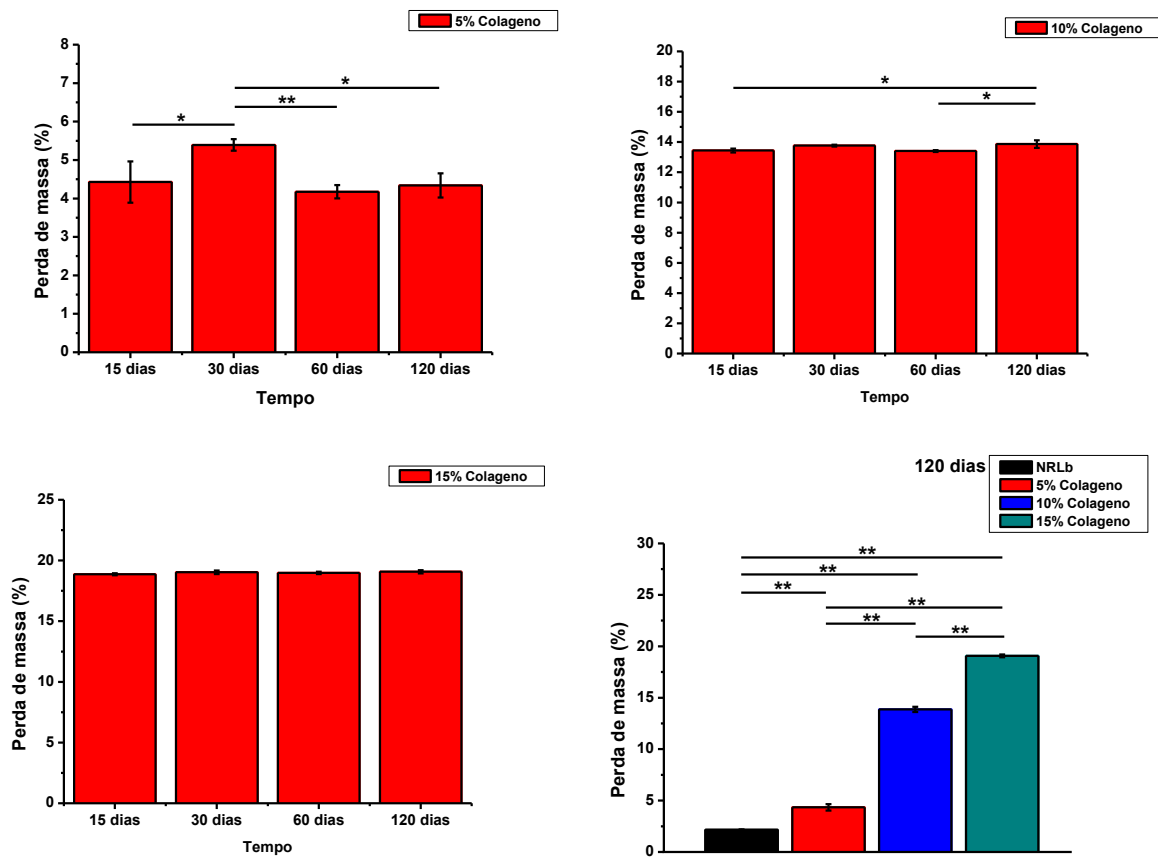
Perda de massa para as membranas confeccionada em NRLb e alginato



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

Perda de massa para as membranas confeccionada em NRLb e colágeno



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

ANEXO II

Metodologia para avaliação da adesão celular

Para a avaliação da influência das amostras na adesão celular, as células foram suspensas nos eluatos e semeadas na densidade de 10^4 células/cm² em placas de 96 poços. As análises foram realizadas nos períodos de 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a semeadura das células. Após cada intervalo o meio foi removido e os poços lavados com PBS para remoção das células não aderidas. O comparativo da adesão celular entre as amostras e o controle foi também acessado pelo método de MTT. Comparando a densidade óptica observada para o controle negativo (padronizado como 100% de adesão em cada ponto no tempo), foram obtidos valores correspondentes ao número de células aderidas a placa de cultivo para cada grupo em estudo.

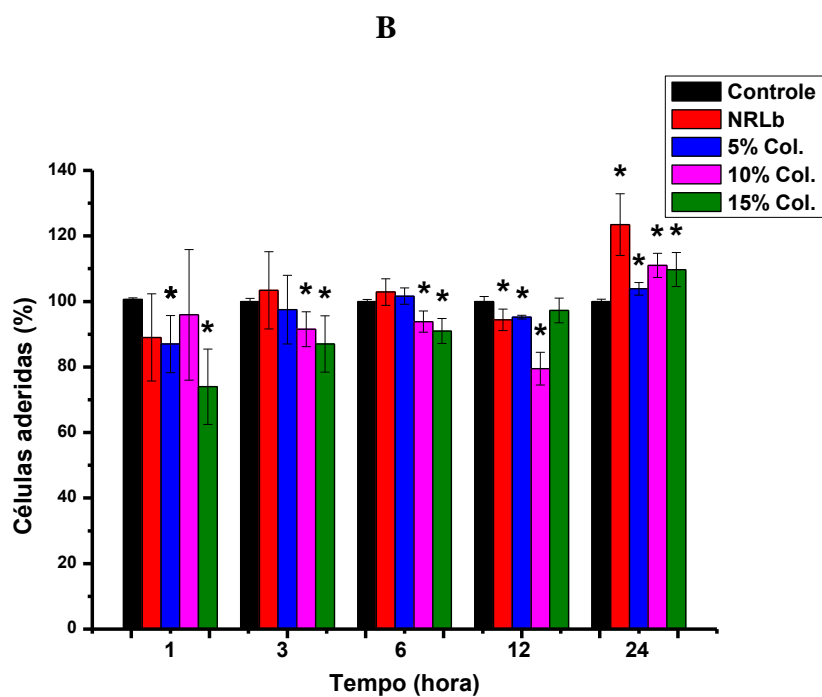
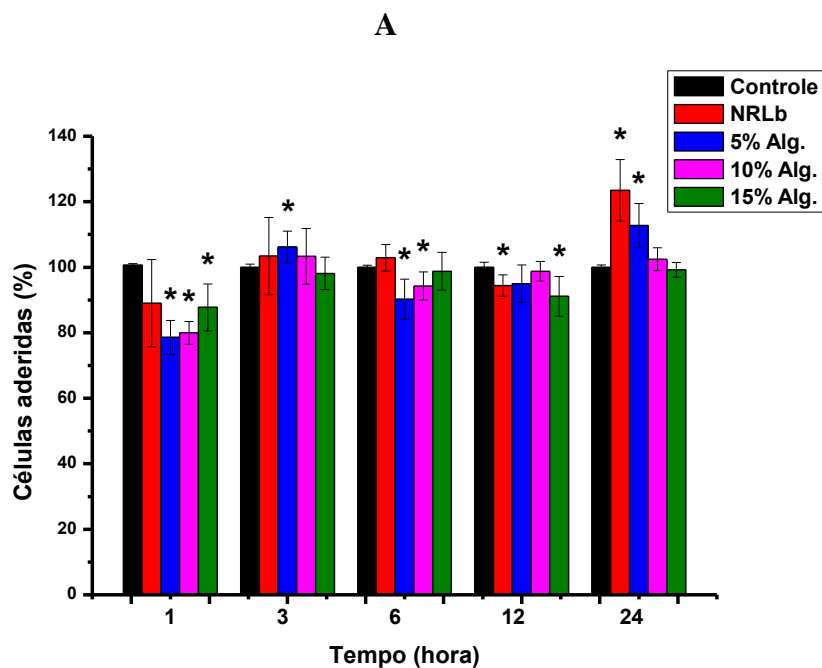
Resultados para as análises da influência na adesão celular

Fibroblastos

Para a avaliação da influência das amostras na adesão celular, fibroblastos e queratinócitos foram suspensos nos eluatos em meio de cultivo e semeados em densidade de 10^4 células/cm² em placas de 96 poços. As análises foram realizadas nos períodos de 1, 3, 6, 12 e 24 horas após a semeadura das células.

Os resultados observados para a influência das amostras na adesão celular de fibroblastos (**Figuras 1 e 2**) mostram que na primeira hora de experimento há grande dispersão de resultados, onde os menores valores observados são 78% para NRLb-alginato 5% e 74% para NRLb-colágeno 15%. Porém, em 24 horas de exposição, o NRL proporcionou um incremento na proliferação celular. A presença de alginato diminuiu a quantidade de fibroblastos aderidos na primeira hora de experimento. No entanto, após 6 horas de exposição, não há diferença no número de células aderidas em comparação ao controle.

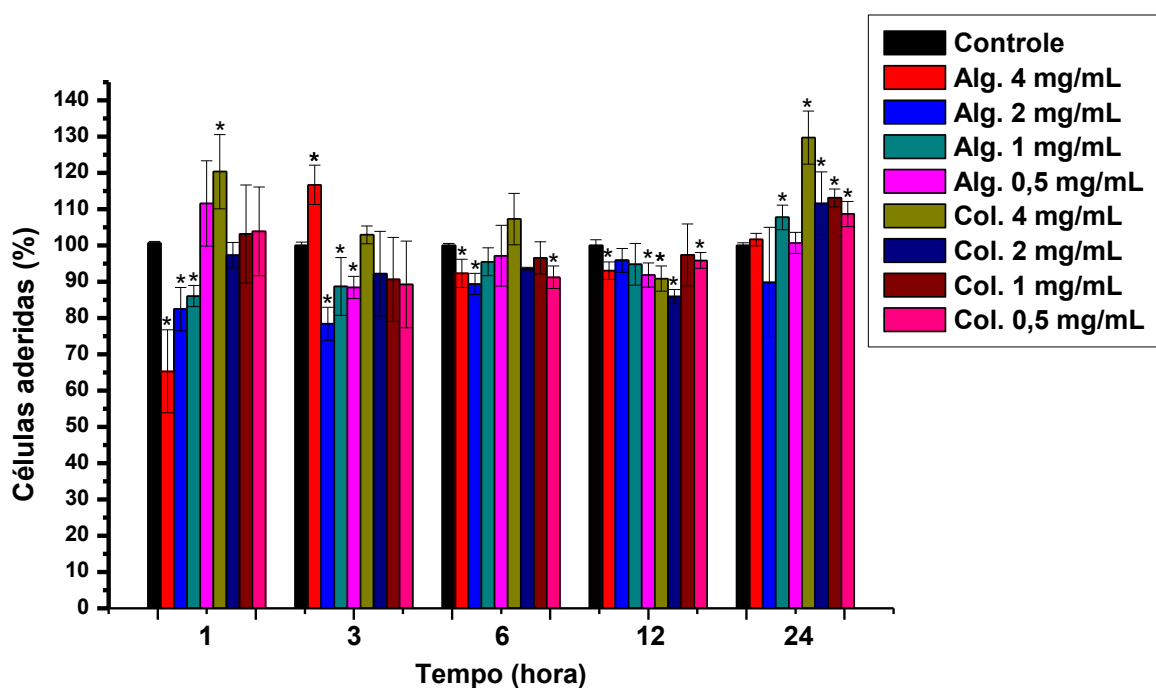
Figura 1: Influência na adesão celular em fibroblastos em 24 horas de incubação com eluatos em 100%: (A) NRLb-alginato, (B) NRLb-colágeno. (% em relação ao controle)



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

Figura 30: Influência na adesão celular em fibroblastos em 24 horas de incubação com diferentes concentrações de alginato e colágeno. (% em relação ao controle)



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

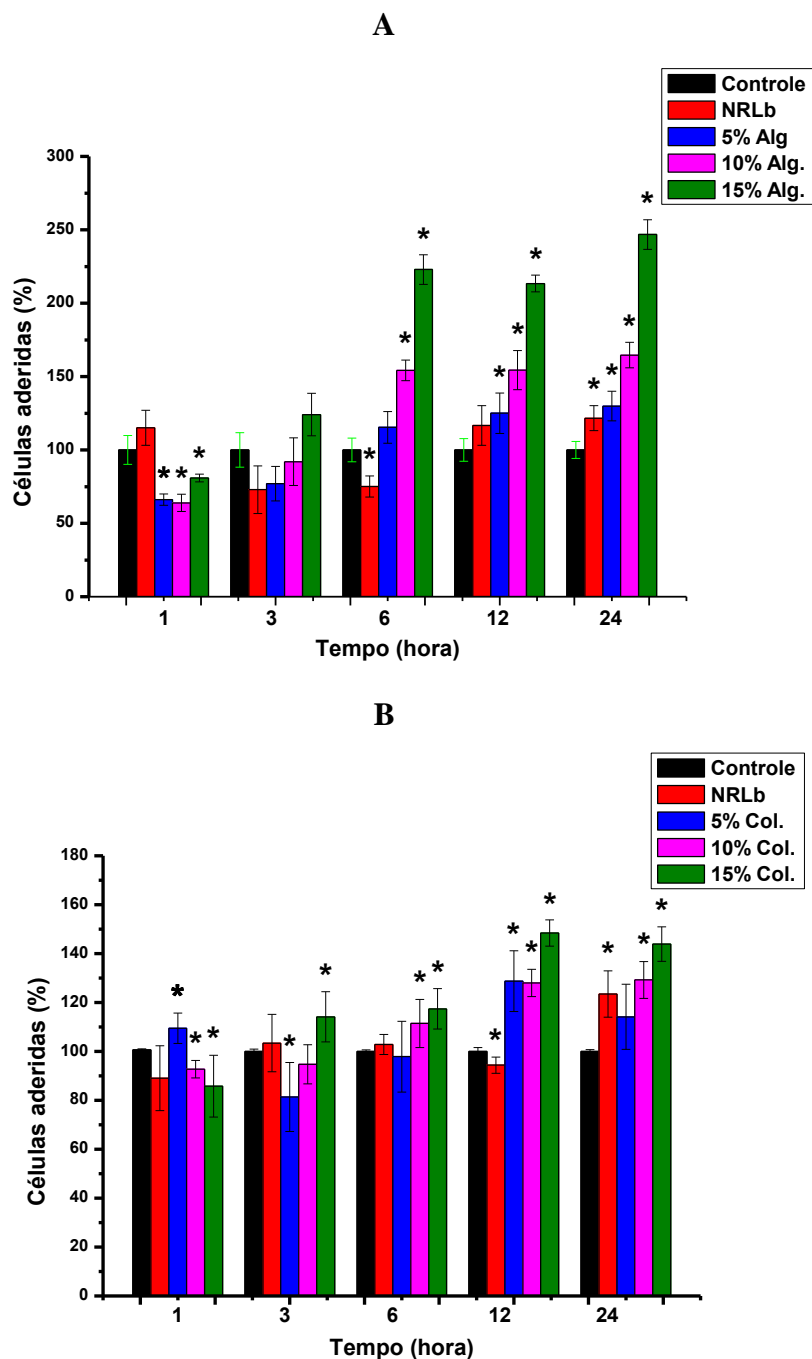
Fonte: Autoria própria.

Queratinócitos

Os resultados observados para a influência das amostras na adesão celular de queratinócitos (**Figuras 3 e 4**) mostram que na primeira hora de experimento, a adesão das células é influenciada pela concentração de alginato nas membranas, com valores observados de 65%, 64% e 79% para as amostras NRLb-alginato 5%, 10% e 15%, respectivamente, em número de células aderidas em relação ao controle. Por outro lado, após 6 horas de experimento, o número de células para as mesmas amostras supera os valores observados para o controle, atingindo 115%, 154% e 222% para as amostras NRLb-alginato 5%, 10% e 15%, respectivamente. O resultado observado mostra que mesmo havendo influência no número de células aderidas durante a primeira hora de experimento, as amostras contendo alginato influenciam intensamente, e de forma positiva, a proliferação de queratinócitos após 6 horas de exposição. Para os queratinócitos, assim como para fibroblastos, em eluatos de NRLb-colágeno, na primeira hora de experimento há grande dispersão do número de células aderidas. No entanto, após 12 horas de experimento o número de células aderidas supera os valores

observados para o controle, com 128% para as amostras NRLb-colágeno 5% e 10%, e 149% para NRLb-colágeno 15%.

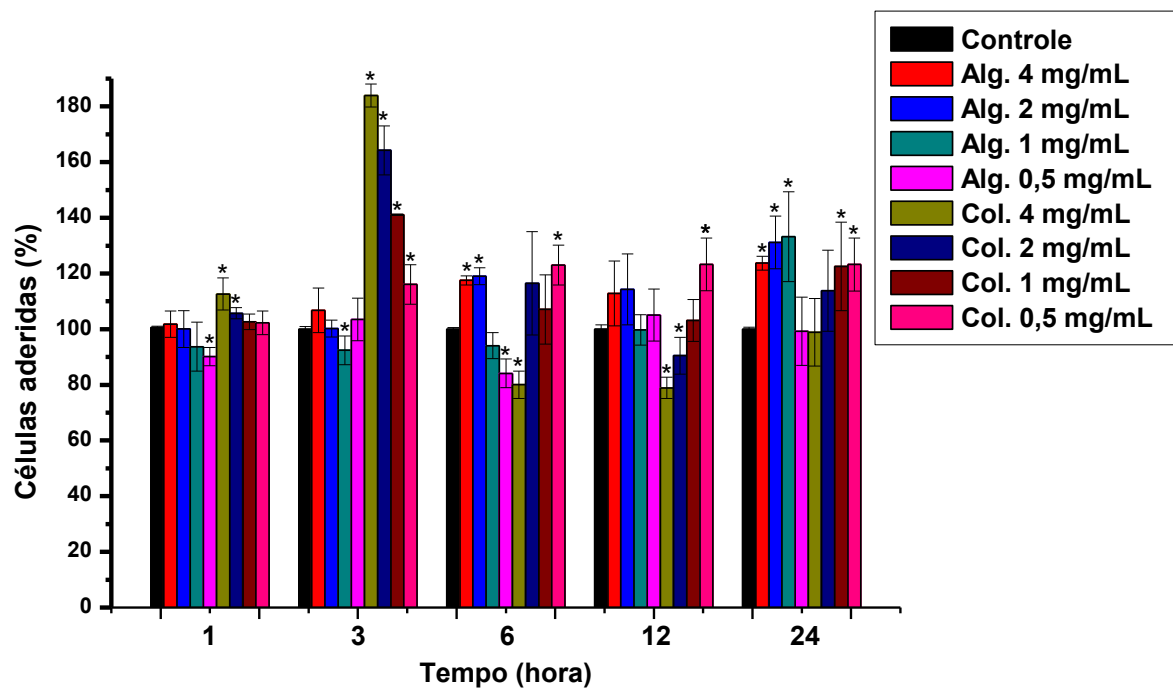
Figura 31: Influência na adesão celular em queratinócitos em 24 horas de incubação com eluatos em 100%: (A) NRLb-alginato, (B) NRLb-colágeno. (% em relação ao controle)



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

Figura 4: Influência na adesão celular de queratinócitos em 24 horas de incubação com diferentes concentrações de alginato e colágeno. (% em relação ao controle)



Teste de Tukey: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Fonte: Autoria própria.

ANEXO III

A Multifunctional Human Skin-on-a-chip Platform with Bioprinted Vessel Network, 3D Dermis, and Multilayered Epidermis Skin Model

Uma plataforma multifuncional de pele humana-sobre-um-chip com rede bioimpressa de vasos, derme 3D e epiderme em multicamadas

Neste artigo, apresentamos um modelo de pele *in vitro* que se assemelha fisiologicamente à estrutura da pele *in vivo*, construindo camadas de endotélio bioimpresso, derme 3D e epiderme em multicamadas. Pela otimização de biotintas para células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), condições de cultura para fibroblastos dérmicos humanos (hDFs) e técnica de multicamadas para queratinócitos (KCs), ficou provado que a estratégia de design permite a construção de um modelo de pele com a presença (1) de canais de meio de cultivo perfundidos para fornecer nutrientes e eliminar resíduos metabólicos, (2) interações hDF-HUVEC para imitar o nicho da derme *in vivo* e (3) interface ar-líquido gerando um gradiente de nutrientes do microcanal de meio de cultivo inferior para a camada epidérmica. Além disso, a plataforma foi empregada para criar um modelo de câncer de pele humano e atacar as células cancerígenas pela entrega transdérmica de drogas usando microagulhas, provando a capacidade de monitorar e tratar doenças relacionadas à pele.

A plataforma é baseada na otimização de cada camada da pele e montando-as em um modelo de pele fisiologicamente relevante - será extensivamente adequada para modelar a cicatrização de feridas e doenças de pele que possam ser monitoradas de maneira confiável, e em tempo real, com alta produtividade. De fato, o sistema de câncer de pele em chip será muito útil para monitorar metástases de câncer de pele, porque foi observado que o gradiente de nutrientes das redes vasculares internas com perfusão fornece um forte impulso para a invasão de células de melanoma incorporadas. Essa estratégia proposta não se limita ao uso de linhagens celulares para construir o modelo de pele, mas é aplicável às células primárias necessárias para a realização de terapia individualizada.

A Multifunctional Human Skin-on-a-chip Platform with Bioprinted Vessel Network, 3D Dermis, and Multilayered Epidermis Skin Model

Natan R. Barros, Hanjun Kim, Marcus J. Goudie, KangJu Lee, Praveen Bandaru, Ethan A. Banton, Einollah Sarikhani, Wujin Sun, Shiming Zhang, Hyun-Jong Cho, Martin C. Hartel Serge Ostrovidov, Samad Ahadian, Saber M. Hussain, Nureddin Ashammakhi, Mehmet R. Dokmeci, Rondinelli D. Herculano, Junmin Lee, Ali Khademhosseini**

N. Barros, Dr. H. Kim, Dr. M. J. Goudie, Dr. K. Lee, P. Bandaru, E. A. Banton, E. Sarikhani, Dr. W. Sun, Dr. S. Zhang, Prof. H-J Cho, M. C. Hartel Dr. S. Ahadian, Prof. N. Ashammakhi, Prof. M.R. Dokmeci, Dr. J. Lee, Prof. A. Khademhosseini

Department of Bioengineering, Henry Samueli School of Engineering and Applied Sciences, University of California-Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA

E-mail: junmin@ucla.edu & khademh@ucla.edu

N. R. Barros, Dr. H. Kim, Dr. M. Goudie, Dr. K. Lee, P. Bandaru, E. A. Banton, E. Sarikhani, Dr. W. Sun, Dr. S. Zhang, Prof. H-J Cho, M. C. Hartel, Prof. S. Ostrovidov, Dr. S. Ahadian, Prof. N. Ashammakhi, Prof. M.R. Dokmeci, Dr. J. Lee, Prof. A. Khademhosseini

Center for Minimally Invasive Therapeutics (C-MIT), University of California-Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA

Dr. S. Hussain

U.S. Air Force Research Laboratory 711th Human Performance Wing, Airman Systems Directorate, Bioeffects Division, Molecular Bioeffects Branch (USAFRL/711HPW/RHDJ)N. R.

Barros, Prof. R. D. Herculano.

Bioprocess and Biotechnology Department, São Paulo State University (Unesp), School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, Km 01 Araraquara-Jau Road, 14801-902 Araraquara, SP, Brazil

N. R. Barros, Prof. R. D. Herculano.

São Paulo State University (Unesp), Institute of Chemistry, Araraquara, 55 Prof. Francisco Degni Street, 14800-060 Araraquara, SP, Brazil

Prof. H-J Cho,

College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Republic of Korea

Prof. S. Ostrovidov, Prof. N. Ashammakhi, Prof. M.R. Dokmeci, Prof. A. Khademhosseini Department of Radiological Sciences, University of California-Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA

Prof. A. Khademhossein

Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Henry Samueli School of Engineering and Applied Sciences, University of California-Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA

Prof. A. Khademhosseini

California NanoSystems Institute (CNSI), University of California Los Angeles, CA 90095, USA

Prof. A. Khademhosseini

Jonsson Comprehensive Cancer Centre, University of California, Los Angeles, CA
90095, USA

Keywords: skin-on-a-chip, tissue engineering, bioprinting, skin cancer, microneedle

The skin serves a substantial number of physiological purposes and is exposed to numerous biological agents and chemical substances owing to its large surface area and accessibility. Yet, current *in vitro* skin systems relying on simple models are limited in emulating the multifaceted functions of skin. Thus, *in vitro* models that can physiologically resemble skin frameworks and reliably show functional feedbacks of human skin are required. Here, we have developed an improved skin model that consists of bioprinted endothelial cells, three-dimensional (3D) dermis, and multilayered epidermis using bioengineered hydrogel-based materials and techniques. Analysis of the mechanical properties of gelatin methacryloyl (GelMA)-based bioinks mixed with different portions of alginate revealed bioprinted endothelium could be better modeled to optimize cell viability with a mixture of 7.5% GelMA and 2% alginate. It has been shown that matrix stiffness plays a crucial role in modulating produced levels of Pro-Collagen I alpha 1 and matrix metalloproteinase 1 in human dermal fibroblasts, as well as affecting cell viability and proliferation in the 3D dermis layer. Moreover, seeding human keratinocytes with a gelatin coating multiple times proves helpful in reducing culture time to create multilayered epidermis while maintaining keratinocyte viability. The developed platform could be used for creating a skin cancer model and simulating cancer therapy through microneedle-mediated transdermal drug delivery. This skin-on-a-chip model also has the potential to serve as an *in vitro* representation of complex skin diseases, toxicity and drug screening model.

1. Introduction

The skin provides a physiological barrier to protect internal organs from temperature variations, mechanical impacts, micro-organisms, various chemicals, and a considerable number of other physiological functions.^[1–5] It is composed of three main components: the epidermis, the dermis, and the hypodermis. (1) The epidermis contains four to five sheets of epithelial cells to form keratinized stratified squamous epithelium. (2) The dermis is made up of two connective tissues that form an interconnected mesh of collagenous and elastin fibers created by dermal fibroblasts (DFs). Blood and lymph vessels inside the dermis supply nutrients to the skin and interact with the DFs. (3) The hypodermis is well vascularized and mainly made up of fat, blood vessels, and nerves.^[6–8] These different skin layers provide unique microenvironments where each layer can communicate with other layers directly and indirectly to contribute to their specialized functions.^[9–15] The skin can also be exposed to various chemicals and biological agents capable of inducing skin conditions including inflammation, allergies, and even cancer.^[6] For these reasons, having a reproducible and physiologically-relevant skin model will not only help reliably predict functional responses of the human skin, but also potentially help realize individualized drug treatment of skin-related diseases.

Given the substantial need to assess the toxicity and efficacy of certain materials and drugs to the skin, animal models have been employed to investigate the development and progression of skin-related diseases.^[5,16–18] However, outcomes in preclinical animal studies that do not correlate to responses in humans has been a major limitation in translating findings between species.^[5,16] To address this limitation, efforts have been made to build *in vitro* skin models by recapitulating important *in vivo* characteristics using human cell cultures for various applications.^[6,19–26] Since the first report of human skin-like constructs published by Bell

et al. in the early 1980s,^[27] different *in vitro* skin models have been developed and commercialized.^[28–32] However, many of these models cannot reproduce complex human skin structures because they employ conventional 2D cultures with only one of the skin's layers in static culture systems without perfusion.

Recent advances in microfluidic systems have allowed the modeling of tissues and organs referred to as organ-on-a-chip. Among these technologies, the development of skin-on-a-chip systems have the potential to offer relevant physiological models for studying diseases and drug evaluation.^[17,25,26,33–35] For example, Abaci *et al.* developed a platform that could be used to maintain human skin equivalents for three weeks with proliferating keratinocytes (KCs).^[17] The small scale of the design led not only to a 36-fold reduction in the quantity of required culture medium and cells compared to conventional Transwell cultures but also showed structures similar to those of *in vivo* skin. In another study, Ramaan *et al.* described a miniaturized *in vitro* 3D skin model with immune competence using immortalized human KCs and leukemic monocyte lymphoma cells. This study demonstrated that the perfusion of culture media to cells notably enhanced the formation of tight junctions compared to static cultures.^[34] However, it is important to build a physiologically relevant skin model with good 3D cellular organization and natural tissue architectures since key *in vitro* functions and characteristics could be varied with different tissue frameworks. Thus, recapitulating native skin architectures *in vitro* would provide improved accuracy in therapeutic development. For instance, a recent study conducted by Sriram *et al.* developed a human skin equivalent by employing a fibrin-based dermal matrix combined with a fluidic system. It was shown that perfusion and precise control of the microenvironment enabled enhanced epidermal morphogenesis, differentiation, and barrier function.^[36] Nevertheless, a simple, time-efficient, robust, reliable and scalable skin-on-a-chip platform is required for applications in physical therapies including physically exfoliating treatments that target localized skin problems.

The present work highlights an improved skin model consisting of bioprinted endothelium, 3D dermis, and multilayered epidermis in a perfused microfluidic device using bio-engineered hydrogel-based materials and techniques. Its construction is based on the optimization of each layer of the skin and assembling them into a physiologically relevant skin model. The platform was further employed in a human skin cancer model in which the cancer cells were targeted by transdermal drug delivery using microneedles (MNs).

2. Results and Discussions

2.1. Skin-on-a-chip Setup and Strategy

The skin provides a unique microenvironment where cells in different layers can interact with each other, and gradients of nutrients from internal vascular networks with perfusion contribute to the functional specification of each skin layer (**Figure 1A**). To explore the development and progression of skin-related diseases and assess the efficacy of drug treatments, a simple and time-efficient but robust, reliable and scalable skin-on-a-chip platform of physiologically relevant skin structures was developed (**Figure 1B**). The skin model was designed to work in an on-chip device fabricated with a polydimethylsiloxane (PDMS) chamber for perfusion of media, a porous polyester membrane (0.4 μm pores), and a PDMS skin chamber; all components were assembled via oxygen plasma bonding (**Figure 1C and D**). The upper chamber containing skin layers and lower micro-channeled media chamber were separated by the porous membrane. The physiologically relevant skin model was fabricated by combination of: (1) bioprinted endothelial cells in gelatin methacryloyl (GelMA)-alginate bioinks on the porous membrane, allowing DF-endothelial cell interactions and facilitating diffusion of media (internal vascular networks), (2) a 3D dermis equivalent by encapsulating human DFs (hDFs) in

GelMA hydrogels with tunable stiffness, and (3) multilayered epidermis obtained on the dermis layer by seeding KCs multiple times with gelatin coating to shorten the incubation time and obtain a thick epidermis. After 24 h of submerged culture, the media in the upper skin chamber was removed, and the media flow in the lower microchannel was activated to create an air-liquid interface which generates a nutrient gradient from lower media microchannel to the epidermis layer. In addition, the proposed skin-on-a-chip model allows direct and indirect communications between cells in the different layers. Furthermore, this platform could be multifunctional as demonstrated by the creation of a human skin cancer model and treating the cancer cells through transdermal drug delivery using MNs (Figure 1F).

2.2. GelMA-Alginate Bioinks for Bioprinted Endothelium: Printability, Mechanical Properties, and Cell Viability

Previous studies have shown that media perfusion through microfluidic compartments plays a crucial role in a sustained supply of nutrients and in the elimination of metabolic wastes to mimic the function of blood vessels *in vivo*.^[37–39] Building a skin model with complex cell–cell interactions (*e.g.* physical and chemical interactions between hDFs) and physiologically relevant frameworks is critical for the development of new therapies. Moreover, 3D bioprinting technologies combined with organ-on-a-chip platforms could enable the fabrication of better, more physiologically relevant human tissue models.^[40,41] To this end, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in biocompatible GelMA/Alginate bioinks were 3D bioprinted onto a porous membrane to mimic the native tissue structure and formulate direct and indirect hDF–HUVEC communications. First, bioinks containing GelMA and alginate hydrogels were prepared.^[42] GelMA, a semi-synthetic hydrogel consisting of gelatin conjugated with methacryla-

amide or methacrylate groups, was selected to be the major component of the bioinks for bioprinting of endothelial cells.^[42] This hydrogel provided an optimal biological microenvironment to the cells with shape fidelity and stability at physiological temperature in addition to being quickly photocrosslinked.^[43] However, it was reported that bioprinting of pure GelMA bioinks could only be achieved at medium-to-high concentrations due to their low viscosity at room or higher temperatures.^[44] Nevertheless, there are several ways to increase the viscosity of GelMA bioinks such as (1) lowering temperature (inducing the physical gel formation)^[45] or (2) adding additional sacrificial materials to enhance the viscosity.^[42] In this study, alginate as a sacrificial material was supplemented to GelMA-based bioinks to increase their viscosity. Various compositions of GelMA/alginate bioinks were examined in terms of printability, gellation, and rheological behaviors to optimize their mechanical properties. First, the bioink printability with varying compositions was assessed under continuous flow through the bioprinting nozzles. From the tested compositions, 5% GelMA with 5-6% alginate, 7.5% GelMA with 2-6% alginate, and 10% GelMA with 1-2% alginate were smoothly extruded at room temperature to form uniform structures *via* 23G needles (Figure 2A and 2B). However, only 7.5% GelMA with 2% alginate and 10% GelMA with 2% alginate could be gelled after photocrosslinking, while other bioink compositions with large portions of alginate were not gellable likely due to the disruption of GelMA crosslinking with the alginate (Figure 2C). It was also shown on a large scale construct that the printed GelMA-based bioinks retained their proper shapes and dimensions (Figure 2D).

Next, the viscosities of the various bioink compositions were examined by rheological measurements at room temperature, before and after photocrosslinking. (Figure 2E and 2F). This is in line with a study by Seyedmahmoud *et al.* employing GelMA/alginate bioinks for 3D bioprinting of skeletal muscle tissues.^[46] Pre-polymer solutions of 10% GelMA with higher than 3% of alginate were too viscous to be extruded through the nozzle, while 7.5%

GelMA with 1% alginate was not viscous enough to have stable printed geometries (Figure 2B). Rheological moduli obtained for crosslinked 7.5% GelMA with 2% alginate, 10% GelMA with 1% alginate, and 10% GelMA with 2% alginate were enhanced using increased concentration of GelMA (7.5% GelMA with 2% alginate < 10% GelMA with 2% alginate) and decreased concentration of alginate (10% GelMA/1% alginate > 10% GelMA/2% alginate) (Figure 2G-I). This is due to the fact that GelMA is the only material to be crosslinked whereas alginate, a sacrificial material used to enhance the viscosity of the bioink, will be washed away after crosslinking.^[42] In addition, these crosslinked bioinks were sufficiently perfusable when internal and external pressures were applied. This result corresponds to a previous study by Nemati *et al.* demonstrating the support of alginate-gelatin hydrogels for improved angiogenic behaviors of endothelial cells, suggesting alginate-gelatin encapsulation could induce angiogenic responses *in vivo* and *in vitro*.^[47]

Further compression tests were performed, demonstrating that the compressive moduli of the crosslinked bioinks were worsened by increased concentration of alginate (no ionic crosslink), which corresponds to the rheological properties of each bioink (Figure 2J). To examine the biocompatibility of 3D GelMA-alginate bioinks, the viability of HUVECs was evaluated on day 1, 4, and 7 in culture. Cells cultured in softer GelMA-alginate bioinks (GelMA 7.5%/alginate 2%: ~14 kPa and GelMA 10%/alginate 2%: ~48 kPa) exhibited significantly higher levels of viability compared to those cultured in the stiffer bioinks (GelMA 10%/alginate 1%: ~90 kPa) (Figure 2K and 2L). Based on these cell viability results, the bioink formulation of 7.5% GelMA with 2% alginate was chosen for bioprinting the internal vascular networks to be integrated in the skin model with hDF-HUVEC interactions.

2.3. GelMA Hydrogel Selection for 3D Dermis Layer

It is known that matrix stiffness plays a critical role in regulating cellular functions,^[48-52] and physiologically relevant stiffness is highly desired for better modeling of engineered tissues.^[53-57] To determine the best concentration of GelMA hydrogels to design the dermis layer, rheological properties of 5, 7.5 and 10% GelMA hydrogels were assessed. Rheological moduli of GelMA hydrogels increased with increasing concentration of GelMA (5% < 7.5% < 10%) (**Figure 3A-C**). Compressive stress-strain results also indicated a positive association between compressive moduli and GelMA concentrations (~19 kPa for 5%, ~51 kPa for 7.5%, and ~82 kPa for 10% GelMA) (Figure 3D). These outcomes are in agreement with those obtained by Zhao *et al.*, where an increased crosslinking density of GelMA at higher concentrations plays a role in the enhancement of compressive moduli.^[57] Since the ability of cells to grow in 3D hydrogels is of essential value for tissue development,^[58-60] the viability of DFs was assessed by measuring the number of live/dead cells cultured in different concentrations of GelMA for 1, 4 and 7 days. Cells cultured in GelMA hydrogels displayed high viabilities regardless of the hydrogel stiffness (over 75% on 1, 4 and 7 days), demonstrating the biocompatibility of GelMA hydrogels even after photocrosslinking (Figure 3E and F). The proliferation level of hDFs cultured in GelMA hydrogels with different concentrations was assessed by Ki-67 staining for cells on 1, 4 and 7 days in culture. A greater number of Ki-67 positive cells were detected when cultured in 7.5% GelMA hydrogels on 7 days (~39%, ~50%, and ~45% for 5%, 7.5%, and 10% GelMA, respectively). In addition, the analysis of F-actin staining in hDFs cultured in 5% and 7.5% GelMA revealed that cells spread more in 7.5% GelMA, which is in agreement with the proliferation results.

hDFs are a critical component of skin due to their collagen synthesis, which provides elasticity and strength to the skin.^[61] However, in aged dermis, the production of matrix met-

alloproteinases (MMPs) increases to degrade fibrillar type I, II and III collagen, and the resultant fragmentation of the collagen fibrils may be correlated with reduced fibroblasts stretch and mechanical tension.^[62,63] Therefore, matrices that support high production of Pro-Collagen and lower secretion of MMPs by hDFs are desired for the engineering of the dermis layer. To evaluate how the mechanical properties of GelMA hydrogels influence the functionalities of hDFs, production levels of Pro-Collagen I alpha 1 (Pro-Coll α 1) and MMP-1 were assessed for hDFs cultured in different GelMA hydrogel concentrations for 14 days (Figure 3G). Cells cultured in 7.5% GelMA showed higher levels of Pro-Coll α 1 production compared to those cultured in 5% and 10% GelMA (Figure 3J). Moreover, cells cultured in 7.5% GelMA tended to produce lower levels of MMP-1 compared to those cultured in the other conditions (Figure 3K). Considering the increase in cell viability over the time, the relative level of Ki-67 positive cells, and the Pro-Coll α 1/MMP1 ratio, the 7.5% GelMA concentration was selected for modeling of hDFs in the 3D dermis layer.

2.4. Multilayered Epidermis: Multiple Seeding of KCs with Gelatin Coating

Epidermal tissue, largely composed of multilayered keratinocytes, should be cultured at an air–liquid interface to mimic natural conditions found in the human epidermis.^[64,65] Previous skin-on-a-chip platforms used one layer of KCs, and it took several weeks to generate multilayered structures.^[37,57,66] To shorten the culture time to create multilayered KCs, a multi-seeding method was employed as depicted in **Figure 4A**. Briefly, KCs were seeded on the dermis layer (2 h incubation), and then a gelatin solution (1% w/v in growth media) was added to thinly cover the attached cells. This gelatin layer allowed new KCs to easily attach to the previously seeded layers. To assess the efficiency of the multi-layering technique, three different seeding conditions (1, 3, and 5 times) were evaluated (Figure 4B-D). KCs of the

1st, 3rd, and 5th seeding were labeled with a green cell tracker, and those of the 2nd and 4th seeding were labeled with a red cell tracker to identify the different cell layers formed. Analysis of confocal images for assessing the height of KC layers indicated that the height of KCs seeded 1, 3 and 5 times were ~62, ~104, and ~137 μm , respectively (Figure 4E). Compared to the thickness of KCs seeded 1 time (~62 μm), the thickness of different conditions (seeding 3 times: ~104 μm and 5 times: ~137 μm) showed ~1.7- and ~2.2-times thicker epidermis layer, respectively (Figure 4F). After 7 days of submerged culture without air-liquid interface, multilayered KCs were highly viable irrespective of the seeding times (Figure 4G). These findings suggest that by using the multilayering technique for KCs, epidermis layers of ~137 μm thickness could be obtained simply and in a short time, eliminating the need to culture a KCs monolayer at air-liquid interface for 6 weeks to acquire over 100 μm thickness of epidermis layers as reported by Zhao et al.^[57]

2.5. 3D Organization of Skin Layers on-a-chip

It was demonstrated that (1) the bioink composed of GelMA 7.5%/alginate 2% was printable and gellable while maintaining viability of HUVECs for 7 days, leading to the generation of bioprinted internal vessel networks allowing HUVEC-hDF interactions, (2) the matrix stiffness played a critical role in regulating production levels of Pro-Coll α 1 and MMP1 in hDFs as well as viability and proliferation of hDFs when constructing the optimized 3D dermis layer, and (3) seeding KCs multiple times with gelatin coating between seedings shortened the culture time to create thicker epidermal layers while maintaining viability of KCs. Next, all the skin layers were combined inside a PDMS microfluidic device (Figure 5A). First, the layer of HUVECs was bioprinted with the GelMA 7.5%/alginate 2% bioink onto the porous membrane. Then, 7.5% GelMA hydrogels encapsulating hDFs were prepared on the layer of

internal vascular networks. Lastly, KCs were seeded five times with gelatin coating between to get the multilayered epidermis. After 24 h incubation, the epidermis layers were cultured at air-liquid interface under perfusion. To visualize the different cell layers in the skin model, HUVECs, HDFs, and KCs were labeled with blue, red, and green cell trackers, respectively, before cell seeding (Figure 5B). It was observed that each layer did not mixed and exhibited a good organization, as designed. Cross-sectional images indicated that the *in vitro* skin model had ~1200 μm in total height consisting of the bioprinted HUVECs layer (~200 μm), the 3D cultured HDFs (~800-1000 μm), and the multilayered KCs (~200 μm) (Figure 5C and D). Thus, the microfluidic platform allows for the culture of a complex engineered skin model formed by (1) a bioprinted microvessels layer, (2) a 3D dermis layer, and (3) a multilayered epidermis with good cellular organization and viability. This skin-on-a-chip model may prove to be a multifunctional platform potentially enabling the reconstruction of *in vitro* skin disease models and therapeutic drug screening.

2.6. Skin-on-a-chip as a Skin Cancer Model for Application of MNs

Microneedling, a minimally invasive therapeutic technique, is a relatively new treatment option in dermatology.^[67,68] This technique has been employed for an extensive range of indications such as skin rejuvenation, scars, and drug delivery.^[69-71] With the growing interest of MNs in precision medicine applications, a physiologically-relevant skin model mimicking the *in vivo* structures is required to reliably predict functional responses to injected drugs using MNs. To demonstrate the developed skin-on-a-chip model and confirm its usefulness in skin disease modeling and physical therapy applications including microneedling, it was proposed to apply MNs for drug delivery against skin melanoma cells. Unlike previous skin models based on 2D and 3D cultures which have difficulties in testing transdermal drug delivery using MNs, the

developed skin-on-a-chip model in this study can be an excellent substitution for real skin tissue. To demonstrate this, a skin cancer model was established using the platform of skin-on-a-chip, and drug-loaded MNs were applied to target the cancers. B16F10 murine melanoma cells are widely employed as a model for human skin cancer due to their highly tumorigenic and metastatic potentials.^[72] A layer of B16F10 murine melanoma cells was embedded in the middle of the dermis layer located 400-500 μm from the epidermis surface (**Figure 6A**). For delivering anti-cancer drugs to the skin cancer model, a GelMA MN patch was prepared as previously reported by Luo *et al.*^[43] Briefly, GelMA prepolymer solutions containing doxorubicin (DOX) were filled into a MN mold and crosslinked by UV radiation before solidification by drying at room temperature. The MNs with sharp tips (~ 300 μm diameter and ~ 650 μm height) were uniform in shape and size (Figure 6B). To prove that MNs could penetrate the proposed model and reach the embedded skin cancer cell layer, the insertion of drug-free GelMA MNs was monitored with blue tracker-labeled B16F10 cells (Figure 6C). Microindentation including uneven surfaces and a puncture caused by MNs in the cancer layer were observed. Then, DOX- loaded MNs were patched to the skin cancer model and removed after 3 h of incubation. Uniform penetration of MNs into the model at ~ 600 μm depth was observed, indicating that the MNs can reach the layer of melanoma cells for localized drug delivery (Figure 6D).

Before investigating localized and efficient drug delivery to melanoma cells using the DOX-loaded GelMA MNs, the viability of cells across the skin cancer model was assessed (Figure 6E). Interestingly, it was observed that the gradient of nutrients from the internal vascular networks with perfusion provided a strong drive for invasion of B16F10 cells (labeled with a blue cell tracker) toward the media flow in the lower microchannel (Figure 6F). Moreover, it was noted that with the air-liquid interface, a large number of live and dead KCs were present in the epidermis layer while minimal effect on survival of hDFs and B16F10 cells was

observed in the dermis layer. To evaluate the efficacy of microneedling for the treatment of skin cancers, three different conditions were prepared as follows (Figure 6G): (i) The skin models were incubated with DOX-containing media where DOX could be perfused from the lower microchannel to the skin layers. DOX-induced cell death was visualized with the red fluorescent dye Ethidium Homodimer-1, and the results showed that the patterns of cell death matched with the gradient of nutrients in which DOX was transported. Consequently, few dead melanoma cells were observed with drug delivery from the medium microchannel. MN insertion tests were also performed (ii) without (as a control) and (iii) in the presence of DOX. After the insertion of DOX-free or -loaded MNs for 3 h, the MNs were removed and dead cells (stained with EthD-1) were overlapped with blue tracker-labeled melanoma cancer cells (Figure 6H). As expected, DOX-free MNs with minimal invasion led to minor damage and cell death. On the other hand, the skin models punched with DOX-loaded GelMA MNs showed a radial cell death gradient from the MNs to the surrounding tissue, and a massive and localized cell death was observed at the melanoma layer. These results using the proposed reliable and scalable skin-on-a-chip platform are comparable to the outcomes from *in vivo* animal studies using MN techniques.^[73-77] Furthermore, the skin-on-a-chip platform in this study may be applicable to *in vitro* skin models (with/without diseases) for various therapeutic or cosmetic developments and may eventually replace animal models.

3. Conclusion

This work presents an *in vitro* skin model physiologically resembling *in vivo* skin structure by constructing layers of bioprinted endothelial cells, 3D dermis, and multilayered epidermis. By optimizing bioinks for HUVECs, culturing conditions for hDFs, and applying KCs in multiple layers, this design strategy facilitated building better skin models to include: (1)

a perfused media channel to supply nutrients and eliminate metabolic waste products, (2) hDF-HUVEC interactions to mimic the *in vivo* dermis niche, and (3) an air-liquid interface generating a nutrient gradient from lower media microchannel to the epidermis layer. Furthermore, a skin cancer model was designed to demonstrate the possibility of drug delivery to localized cancer cells using MNs. It is expected this platform will be extensively suitable for modeling wound healing and skin diseases that could be reliably monitored in real-time and in a high-throughput manner. It was observed that the gradient of nutrients from internal vascular networks with perfusion provided a strong drive for invasion of embedded melanoma cells, which could prove useful for monitoring metastasis of skin cancers. This proposed strategy is not limited to the use of cell lines to build skin models as it can incorporate the primary cells required for realizing individualized therapy.

4. Experimental Section

Cells and Materials: Human dermal fibroblast cells (PCS-201-012TM, ATCC), Human epidermal keratinocyte cells (PCS-200-011TM, ATCC) and Mus musculus skin melanoma cells (B16F10) were cultured using Dulbecco's modified eagle medium (ThermoFisher) with 10% fetal bovine serum (ThermoFisher) and 1% penicillin streptomycin (ThermoFisher), Human umbilical vascular endothelium cells (PCS-100-010TM, ATCC) were cultured in Endothelial Cell Growth Medium 2 supplemented with Growth Medium 2 SupplementMix (PromoCell, C- 22011). Type A porcine skin gelatin, methacrylic anhydride, PI (2-hydroxy-4-(2- hydroxyethoxyethoxy)-2-methylpropylphenone), low viscosity alginic acid, formaldehyde solution (4% v/v), Triton X-100 and bovine serum albumin were obtained from Sigma-Aldrich. Live/Dead cell viability kit, Alexa Fluor® 568 phalloidin, DAPI, Ki-67 antibody, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS; GIBCO), and stainless-steel catheter connectors (23G)

were purchased from Thermo Fisher Scientific. Human Pro-Collagen I alpha 1 (ab229389) and Human MMP1 (ab100603) ELISA kits were purchased from abcam. Polydimethylsiloxane (PDMS; Sylgard) and DOX hydrochloride were purchased from Dow Corning and Oakwood Chemical, respectively. Tubing (Cole-Parmer Microbore Tubing, 0.020" × 0.060"OD) was purchased from Cole-Parmer.

Preparation of GelMA: High methacrylated gelatin was made as reported previously.^[78] Briefly, type A porcine skin gelatin (10% (w/v)) was added into PBS at 60 °C and fully dissolved with stirring. Methacrylic anhydride was added (0.5 mL/min in a rate) to the gelatin solution (at 50 °C) with stirring to reach the target volume. The mixed solution was allowed to react for 1 h. The reaction was stopped by diluting 5 times with additional warm PBS (40 °C), flowed by dialysis against distilled water (12–14 kDa cut-off dialysis tubing) for 1 week at 40 °C. During the dialysis, salts and methacrylic acid were removed. A white porous foam was generated by lyophilizing the solution for 1 week and kept at –80 °C until further use. The GelMA hydrogels were prepared after freeze-drying GelMA macromer mixed into PBS with 0.5% (w/v) photoinitiator (PI) at 80 °C until completely dissolved (~20 min).

Preparation of Bioinks and Bioprinting Procedure: Bioinks were prepared with a mixture of GelMA (5, 7.5 and 10%) and alginate (0-6%) in PBS with 0.5% PI at 80 °C until entirely dissolved. Syringe filters (0.22 µm) were used to filter all solutions. These solutions were stored at 4 °C and warmed at 37 °C for 30 min to use. The bioprinting was done using an Inkredible 3D Bioprinter (CELLINK+). Sterile amber UV-protected cartridges were loaded with bioinks and kept at 4 °C for 10 min for gelation prior bioprinting, after the bioprinting process the 3D structures were immediately photocrosslinked at 25 mW/cm² for 3 min.

Characterization of Bioinks and hDFs Matrice: Printability of bioinks was evaluated based upon their smooth extrusion through 23G needles to form equivalent structures. The varying preparations of bioinks (GelMA and GelMA/alginate) were extruded, and the bioprinted structures were qualitatively analyzed by images for their shape after extrusion. The hydrogel's rheological properties were assessed with a rotational rheometer (MCR 302, Anton Paar). The GelMA and GelMA/alginate hydrogels measurements were carried out using a parallel plate (8 mm diameter) gap of 15 mm and at a constant temperature of 25 °C. The gap was chosen based on the desired approximate thickness for on-a-chip samples. For the compression test, the hydrogels were pipetted to a circular PMMA mold (8 mm diameter × 1.5 mm thickness). Then, they were exposed to 25 mW/cm² of UV for 3 min. The compressive strength of the samples was obtained at a rate of 2 mm/min using Instron (5943, USA) at room temperature. The compressive modulus was evaluated by calculating the slope of the stress-strain curve corresponding in the linear region (0–10% strain).^[79]

Generation of Multilayered Keratinocyte Layers: The *in vitro* multilayered epidermis was obtained by multiple seeding steps. KCs at 10⁶ cells/mL were seeded on the GelMA layer and allowed to attach the surface for 2 h, after the cell attachment the media was replaced by 1% w/v porcine skin gelatin in growth media and incubated for 30 min to obtain a thin gelatin-coated layer, thus preparing the surface for a new KCs seeding.

Biochemical Assay and Immunofluorescence: A Live/Dead Cell Viability Kit was employed to obtain cell viability in culture (days 1, 4, and 7) based on the vendor's instructions. For F-actin, DAPI, and Ki-67 staining, cells cultured in the model were fixed on 1, 4, and 7 days

using 4% paraformaldehyde (PFA) solution for 20 min at room temperature, followed by washing three times. Then, 0.1% Triton X-100 in PBS was added for 30 min, and 3% BSA in PBS was added to prevent nonspecific binding for 1 h at room temperature. Cells were stained with F-actin at 1:200 dilution, DAPI at 1:1000 dilution and Ki-67 at 1:250 dilution in PBS for 20 min in a humidity chamber, followed by washing three times with PBS. Immunofluorescence microscopy was performed using an inverted fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer 5 microscope) or a confocal microscope (BC LSM880).

Protein detection using ELISA: To obtain the profile of Human Pro-Collagen I alpha 1 and Human MMP1 proteins in the culture supernatants of hDFs cultured in different GelMA concentrations (5, 7.5 and 10%), the specific Enzyme-Linked Immunosorbent ELISA kits from abcam were employed. The samples were obtained after culturing hDFs in GelMA hydrogels for 14 days and kept at -20°C. The ELISA procedures for Human Pro-Collagen I alpha 1 required that 50 µL of standard or sample be put into the wells, then 50 µL of antibody mixture was also added before incubating the plate at room temperature for 1 h on a shaker at 400 rpm. After incubation, the wells were washed three times with 350 µL of 1× Wash Buffer PT, then 100 µL of CatchPoint HRP Development Solution was added. After 10 min incubation on a shaker at 400 rpm (protected from light), the fluorescence was measurement at Ex/cut-off/Em 530/570/590 nm in a plate reader SpectraMax M2^e. For Human MMP1, 100 µL of standard or samples were added to each well and kept overnight at 4°C on a shaker at 400 rpm. Then, the wells were washed 4 times using 100 µL of 1× Wash Solution, followed by adding 100 µL of 1× Biotinylated MMP1 Detection Antibody and incubating for 1 h at room temperature on a shaker at 400 rpm. The washing step was repeated after incubation, and 100 µL of 1× HRP- Streptavidin solution was added and left at room temperature for 45 min on a shaker at 400 rpm. After incubation, the washing step was repeated, and then

the plate incubated for 30 min at room temperature after adding 100 μL of TMB One-Step Substrate Reagent in no light conditions on a shaker at 400 rpm. Lastly, the absorbance was immediately measured at 450 nm in a plate reader after adding stop solution (50 μL).

Fabrication of Skin-on-a-chip: The skin-on-a-chip device was fabricated using PDMS with a soft lithography technique. The aligned upper well and lower microchannel were separated by a TC-treated polyester membrane with 0.4 μm pores size. The upper and lower PDMS layers were prepared by molding PDMS prepolymer (10:1 ratio of PDMS and curing agent) on a microfabricated mold made of PMMA and curing the polymer at 75 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. After peeling the PDMS layers from the PMMA molds, the surface of the PDMS layer was treated with oxygen plasma (at 300 W for 2 min, 20 sccm O_2 flow and 0.65 mbar pressure) (Plasma Etch, Inc. PE- 25). The plasma-treated surfaces were then immediately bonded. To control flow of culture medium, tubing was connected from fluid medium and pump sources to the lower microfluidic channel using Stainless Steel Catheter Connectors. After the PDMS devices sterilization by ethanol 70% for 2 h and UV light exposure for 30 min, the HUVECs layer was bioprinted on the polyester porous membrane at a density of 13×10^6 cells/mL and immediately photocrosslinked at 25 mW/cm^2 for 30 s to prevent the GelMA hydrogels from mixing, then the hDFs in GelMA at a density of 8×10^6 cells/mL was poured on the bioprinted structure and photocrosslinked at the same conditions for 3 min. The multilayered keratinocyte was obtained by multiple seeding steps as described above. After 24 h incubation, to start an air-liquid interface, the media from the top chamber was removed and the media flow in the lower microchannel was activated (5 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Preparation of Drug-Loaded GelMA MNs: DOX-loaded GelMA MNs was prepared as described previously by Luo *et al.*^[43] Briefly, 400 mg of GelMA was melted in 1.5 mL of PBS

at 80 °C. Then, 0.5 mL of DOX (400 µg/mL) and 0.5% of PI were mixed into the solution at 50 °C with stirring. The GelMA-DOX solution was added onto the mold of PDMS MNs, followed by sonication for 1h at 40 °C. The mold with the solution was exposed to 350 mW/cm² UV for 30 s. The fabricated MNs were dried for 24 h in the dark and manually detached from the mold.

Microscopy Data Analysis. ImageJ software was used for analysis of immunofluorescence images. The total number of live/dead cells were assessed for at least 3 replicates of each condition by using ImageJ. Similarly, the % of Ki-67 positive cells (at least 3 replicates) was obtained by counting cell nuclei stained by DAPI (total cell number) in the presence of Ki-67 staining (proliferative cells) with thresholds after subtracting backgrounds by using ImageJ.

Statistical Analysis: At least 3 different samples were imaged to obtain the average values and standard deviation (s.d.) unless otherwise specified. One-way ANOVA comparisons tests were achieved in all statistical analyses. Statistics with a value of $p < 0.05$ were considered significant.

Acknowledgements

Research was sponsored by the Office of the Secretary of Defense through the Advanced Regenerative Manufacturing Institute (ARMI BioFabUSA) and was accomplished under Agreement Number W911NF-17-3-003. The views and conclusions contained in this document are those of the authors and should not be interpreted as representing the official policies, either expressed or implied, of the Office of the Secretary of Defense or the U.S. Government.

The U.S. Government is authorized to reproduce and distribute reprints for Government purposes notwithstanding any copyright notation here. N.B. thanks the support of São Paulo Research Foundation – FAPESP program in Brazil – award no. (2018/11861-0). M.G. would like to thank the Oak Ridge Institute for Science and Education and Air Force Research Laboratories (USAFRL/711HPW/RHDJ) for funding this research.

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Revised: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online: ((will be filled in by the editorial staff))

References

- [1] A. Pupovac, B. Senturk, C. Griffoni, K. Maniura-Weber, M. Rottmar, S. L. McArthur, *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1701405.
- [2] M. H. Mohammadi, B. Heidary Araghi, V. Beydaghi, A. Geraili, F. Moradi, P. Jafari, M. Janmaleki, K. P. Valente, M. Akbari, A. Sanati-Nezhad, *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 2459.
- [3] S. Huan, B. D. Mattos, R. Ajdary, W. Xiang, L. Bai, O. J. Rojas, *Adv. Funct. Mater.* **2019**, *29*, 1902990.
- [4] S. Biglari, T. Y. L. Le, R. P. Tan, S. G. Wise, A. Zambon, G. Codolo, M. De Bernard, M. Warkiani, A. Schindeler, S. Naficy, P. Valtchev, A. Khademhosseini, F. Dehghani, *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8*, 1801307.
- [5] Q. Zhang, L. Sito, M. Mao, J. He, Y. S. Zhang, X. Zhao, *Microphysiological Syst.* **2018**, *1*, 1.
- [6] M. Wufuer, G. H. Lee, W. Hur, B. Jeon, B. J. Kim, T. H. Choi, S. H. Lee, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1.
- [7] A. C. CHANG, B. H. LIU, P. L. SHAO, J. D. LIAO, *J. Microsc.* **2017**, *267*, 265.
- [8] V. Carrer, C. Alonso, M. A. Oliver, L. Coderch, *Drug Test. Anal.* **2018**, *10*, 1528.
- [9] M. Cork, *J. Dermatolog. Treat.* **1997**, *8*, S7.
- [10] C. Pellevoisin, C. Bouez, J. Cotovio, Marques, A. P.; Pirraco, R. P.; Cerqueira, M. T.; Reis, R. L. B. T.-S. T. M., Eds.; Academic Press: Boston, 2018; pp. 3–37.
- [11] L. F. Santamaria Babi, R. Moser, M. T. Perez Soler, L. J. Picker, K. Blaser, C. Hauser, *J. Immunol.* **1995**, *154*, 1543 LP.
- [12] J. E. Lai-Cheong, J. A. McGrath, *Medicine (Baltimore)*. **2013**, *41*, 317.
- [13] E. McLafferty, C. Hendry, F. Alistair, *Nurs. Stand.* **2012**, *27*, 35.
- [14] P. H. Hoeger, C. C. Enzmann, *Pediatr. Dermatol.* **2002**, *19*, 256.

- [15] M. Venus, J. Waterman, I. McNab, *Surg.* **2010**, 28, 469.
- [16] L. J. van den Broek, L. I. J. C. Bergers, C. M. A. Reijnders, S. Gibbs, *Stem Cell Rev. Reports* **2017**, 13, 418.
- [17] H. E. Abaci, K. Gledhill, Z. Guo, A. M. Christiano, M. L. Shuler, *Lab Chip* **2015**, 15, 882.
- [18] A. Petrova, A. Celli, L. Jacquet, D. Dafou, D. Crumrine, M. Hupe, M. Arno, C. Hobbs, A. Cvorov, P. Karagiannis, L. Devito, R. Sun, L. C. Adame, R. Vaughan, J. A. McGrath, T. M. Mauro, D. Ilic, *Stem Cell Reports* **2014**, 2, 675.
- [19] V. Hutter, S. B. Kirton, D. Y. S. Chau, Marques, A. P.; Pirraco, R. P.; Cerqueira, M. T.; Reis, R. L. B. T.-S. T. M., Eds.; Academic Press: Boston, 2018; pp. 353–373.
- [20] N. Mori, Y. Morimoto, S. Takeuchi, *Biomaterials* **2017**, 116, 48.
- [21] M. E. L. Lago, M. T. Cerqueira, R. P. Pirraco, R. L. Reis, A. P. Marques, Marques, A. P.; Pirraco, R. P.; Cerqueira, M. T.; Reis, R. L. B. T.-S. T. M., Eds.; Academic Press: Boston, 2018; pp. 327–352.
- [22] S. Lee, S.-P. Jin, Y. K. Kim, G. Y. Sung, J. H. Chung, J. H. Sung, *Biomed. Microdevices* **2017**, 19, 22.
- [23] H. J. Song, H. Y. Lim, W. Chun, K. C. Choi, J. H. Sung, G. Y. Sung, *J. Ind. Eng. Chem.* **2017**, 56, 375.
- [24] L. Koch, A. Deiwick, S. Schlie, S. Michael, M. Gruene, V. Coger, D. Zychlinski, A. Schambach, K. Reimers, P. M. Vogt, B. Chichkov, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, 109, 1855.
- [25] I. Maschmeyer, A. K. Lorenz, K. Schimek, T. Hasenberg, A. P. Ramme, J. Hübner, M. Lindner, C. Drewell, S. Bauer, A. Thomas, N. S. Sambo, F. Sonntag, R. Lauster, U. Marx, *Lab Chip* **2015**, 15, 2688.

- [26] I. Wagner, E. M. Materne, S. Brincker, U. Süßbier, C. Frädlich, M. Busek, F. Sonntag, D. A. Sakharov, E. V. Trushkin, A. G. Tonevitsky, R. Lauster, U. Marx, *Lab Chip* **2013**, *13*, 3538.
- [27] E. Bell, H. Ehrlich, D. Buttle, T. Nakatsuji, *Science (80-.)*. **1981**, *211*, 1052.
- [28] F. Grinnell, *Prog. Clin. Biol. Res.* **1976**, *9*, 227.
- [29] M. J. Bissell, H. G. Hall, G. Parry, *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 31.
- [30] J. Yang, A. Balakrishnan, S. Hamamoto, C. W. Beattie, T. K. Das Gupta, S. R. Wellings, S. Nandi, *Exp. Cell Res.* **1986**, *167*, 563.
- [31] C. Q. Lin, M. J. Bissell, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **1993**, *7*, 737.
- [32] N. Ali, M. Hosseini, S. Vainio, A. Taïeb, M. Cario-André, H. R. Rezvani, *Br. J. Dermatol.* **2015**, *173*, 391.
- [33] B. Ataç, I. Wagner, R. Horland, R. Lauster, U. Marx, A. G. Tonevitsky, R. P. Azar, G. Lindner, *Lab Chip* **2013**, *13*, 3555.
- [34] Q. Ramadan, F. C. W. Ting, *Lab Chip* **2016**, *16*, 1899.
- [35] I. Maschmeyer, T. Hasenberg, A. Jaenicke, M. Lindner, A. K. Lorenz, J. Zech, L.-A. Garbe, F. Sonntag, P. Hayden, S. Ayehunie, R. Lauster, U. Marx, E.-M. Materne, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *95*, 77.
- [36] G. Sriram, M. Alberti, Y. Dancik, B. Wu, R. Wu, Z. Feng, S. Ramasamy, P. L. Bigliardi, M. Bigliardi-Qi, Z. Wang, *Mater. Today* **2018**, *21*, 326.
- [37] G. Sriram, M. Alberti, Y. Dancik, B. Wu, R. Wu, Z. Feng, S. Ramasamy, P. L. Bigliardi, M. Bigliardi-Qi, Z. Wang, *Mater. Today* **2018**, *21*, 326.
- [38] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gómez-Sjöberg, R. M. T. Fleming, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 218.
- [39] E. W. K. Young, D. J. Beebe, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1036.

- [40] K. Fetah, P. Tebon, M. J. Goudie, J. Eichenbaum, L. Ren, N. Barros, R. Nasiri, S. Ahadian, N. Ashammakhi, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini, *Prog. Biomed. Eng.* **2019**.
- [41] N. Ashammakhi, S. Ahadian, C. Xu, H. Montazerian, H. Ko, R. Nasiri, N. Barros, A. Khademhosseini, *Mater. Today Bio* **2019**, *1*, 100008.
- [42] I. Pepelanova, K. Kruppa, T. Scheper, A. Lavrentieva, *Bioeng. (Basel, Switzerland)* **2018**, *5*, 55.
- [43] Z. Luo, W. Sun, J. Fang, K. Lee, S. Li, Z. Gu, M. R. Dokmeci, A. Khademhosseini, *Adv. Healthc. Mater.* **2019**, *8*, 1801054.
- [44] G. Ying, N. Jiang, C. Yu, Y. S. Zhang, *Bio-Design Manuf.* **2018**, *1*, 215.
- [45] W. Liu, M. A. Heinrich, Y. Zhou, A. Akpek, N. Hu, X. Liu, X. Guan, Z. Zhong, X. Jin, A. Khademhosseini, Y. S. Zhang, *Adv. Healthc. Mater.* **2017**, *6*.
- [46] R. Seyedmahmoud, B. Çelebi-Saltik, N. Barros, R. Nasiri, E. Banton, A. Shamloo, N. Ashammakhi, R. M. Dokmeci, S. Ahadian, Three-Dimensional Bioprinting of Functional Skeletal Muscle Tissue Using Gelatin Methacryloyl-Alginate Bioinks. *Micromachines* **2019**, *10*.
- [47] S. Nemati, A. Rezaabakhsh, A. B. Khoshfetrat, A. Nourazarian, C. Biray Avci, B. Goker Bagca, H. Alizadeh Sardroud, M. Khaksar, M. Ahmadi, A. Delkhosh, E. Sokullu, R. Rahbarghazi, *Biotechnol. Bioeng.* **2017**, *114*, 2920.
- [48] B. N. Mason, J. P. Califano, C. A. Reinhart-King, Bhatia, S. K., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2012; pp. 19–37.
- [49] Y. Qiu, A. F. Bayomy, M. V Gomez, M. Bauer, P. Du, Y. Yang, X. Zhang, R. Liao, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2015**, *308*, H990.
- [50] Y.-C. Yeh, J.-Y. Ling, W.-C. Chen, H.-H. Lin, M.-J. Tang, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15008.

- [51] Z. Razinia, P. Castagnino, T. Xu, A. Vázquez-Salgado, E. Puré, R. K. Assoian, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16499.
- [52] A. M. Handorf, Y. Zhou, M. A. Halanski, W.-J. Li, *Organogenesis* **2015**, *11*, 1.
- [53] D. E. Discher, P. Janmey, Y.-L. Wang, *Science* **2005**, *310*, 1139.
- [54] J. Schöneberg, F. De Lorenzi, B. Theek, A. Blaeser, D. Rommel, A. J. C. Kuehne, F. Kießling, H. Fischer, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10430.
- [55] K. Duval, H. Grover, L.-H. Han, Y. Mou, A. F. Pegoraro, J. Fredberg, Z. Chen, *Physiology (Bethesda)*. **2017**, *32*, 266.
- [56] S. Caddeo, M. Boffito, S. Sartori, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2017**, *5*, 40.
- [57] X. Zhao, Q. Lang, L. Yildirimer, Z. Y. Lin, W. Cui, N. Annabi, K. W. Ng, M. R. Dokmeci, A. M. Ghaemmaghami, A. Khademhosseini, *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 108.
- [58] G. Davey, M. Buzzai, R. K. Assoian, *J. Cell Sci.* **1999**, *112* (Pt 2), 4663.
- [59] C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber, *Science* **1997**, *276*, 1425.
- [60] S. Bourdoulous, G. Orend, D. A. MacKenna, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 267.
- [61] H. Freiburger, D. Grove, A. Sivarajah, S. R. Pinnell, *J. Invest. Dermatol.* **1980**, *75*, 425.
- [62] J. M. Freije, I. Diez-Itza, M. Balbin, L. M. Sanchez, R. Blasco, J. Tolivia, C. Lopez-Otin, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16766.
- [63] G. J. Fisher, T. Quan, T. Purohit, Y. Shao, M. K. Cho, T. He, J. Varani, S. Kang, J. J. Voorhees, *Am. J. Pathol.* **2009**, *174*, 101.
- [64] L. I. Bernstam, F. L. Vaughan, I. A. Bernstein, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **1986**, *22*, 695.
- [65] J. J. Nordlund, P. W. Askenase, *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *81*, 28.

- [66] Q. Lang, Y. Ren, Y. Wu, Y. Guo, X. Zhao, Y. Tao, J. Liu, H. Zhao, L. Lei, H. Jiang, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 27183.
- [67] R. Dhurat, A. Sharma, A. Goren, S. Daruwalla, M. Situm, M. Kovacevic, *Dermatol. Ther.* **2019**, *32*, e12897.
- [68] P. Dardano, M. Battisti, I. Rea, L. Serpico, M. Terracciano, A. Cammarano, L. Nicolais, L. De Stefano, *Adv. Ther.* **2019**, *2*, 1900036.
- [69] A. Singh, S. Yadav, *Indian Dermatol. Online J.* **2016**, *7*, 244.
- [70] J. Y. Hong, T.-R. Kwon, J. H. Kim, B. C. Lee, B. J. Kim, *J. Cosmet. Dermatol.* **2019**, *0*.
- [71] E. Schoenberg, M. O'Connor, J. V Wang, S. Yang, N. Saedi, *J. Cosmet. Dermatol.* **2019**, *0*.
- [72] J. Lee, A. A. Abdeen, K. L. Wycislo, T. M. Fan, K. A. Kilian, *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 856.
- [73] A. K. Jain, C. H. Lee, H. S. Gill, *J. Control. Release* **2016**, *239*, 72.
- [74] C. Wang, Y. Ye, G. M. Hochu, H. Sadeghifar, Z. Gu, *Nano Lett.* **2016**, *16*, 2334.
- [75] J. Pan, W. Ruan, M. Qin, Y. Long, T. Wan, K. Yu, Y. Zhai, C. Wu, Y. Xu, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1117.
- [76] Y. W. Naguib, A. Kumar, Z. Cui, *Acta Pharm. Sin. B* **2014**, *4*, 94.
- [77] Y. Hao, Y. Chen, M. Lei, T. Zhang, Y. Cao, J. Peng, L. Chen, Z. Qian, *Adv. Ther.* **2018**, *1*, 1800008.
- [78] A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen, H. Berghmans, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 31.
- [79] W. Xiao, J. He, J. W. Nichol, L. Wang, C. B. Hutson, B. Wang, Y. Du, H. Fan, A. Khademhosseini, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2384.

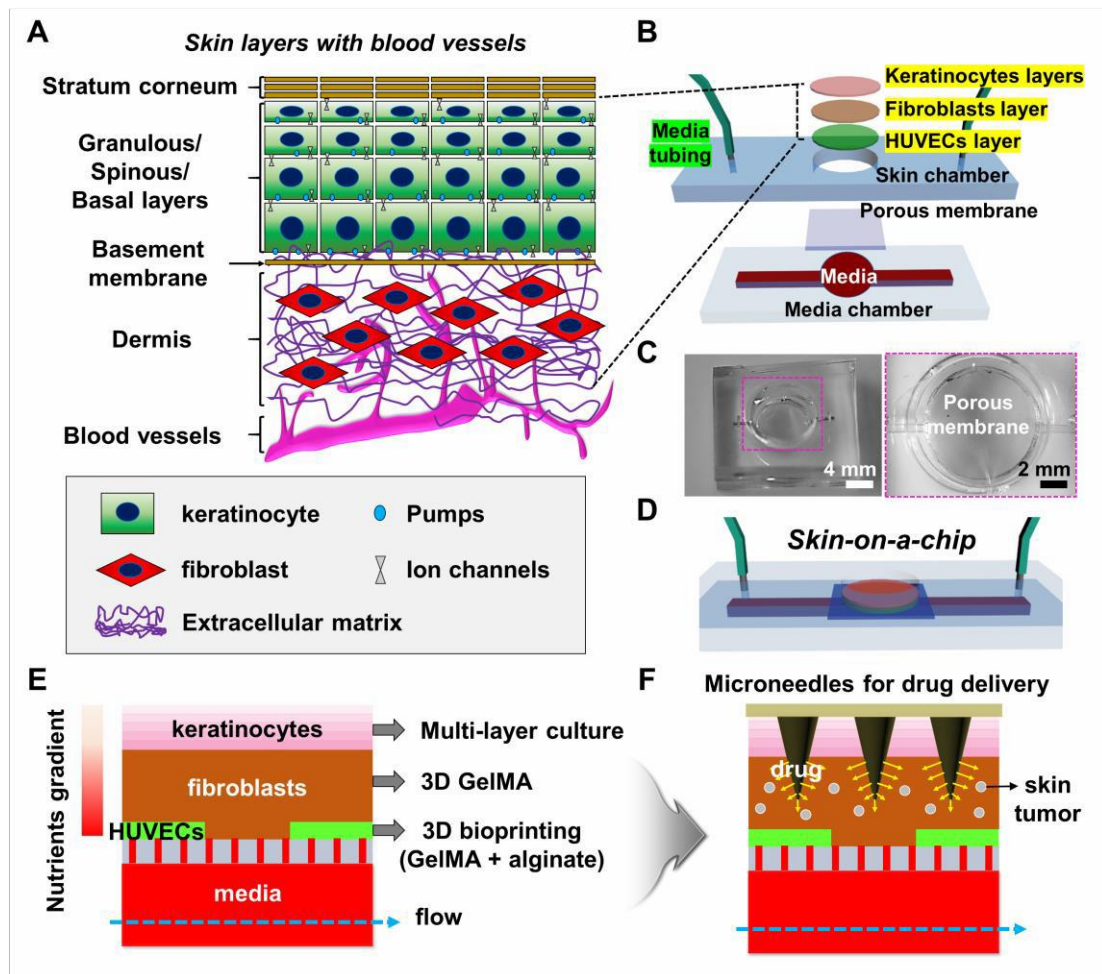


Figure 1. Skin-on-a-chip setup and strategy. A) Schematic displaying the organization of skin layers. B) Schematic diagram of the 3D Skin-on-a-chip model set-up. C) Photograph of a PDMS chip and porous membrane between skin and media chambers. D) Schematic representation of the assembled skin-on-a-chip system. E) Schematic showing the cross-sectional structure of proposed skin model on-a-chip platform. F) Schematic showing the application of MNs for transdermal drug delivery to cancer cells in the skin cancer model-on-a-chip.

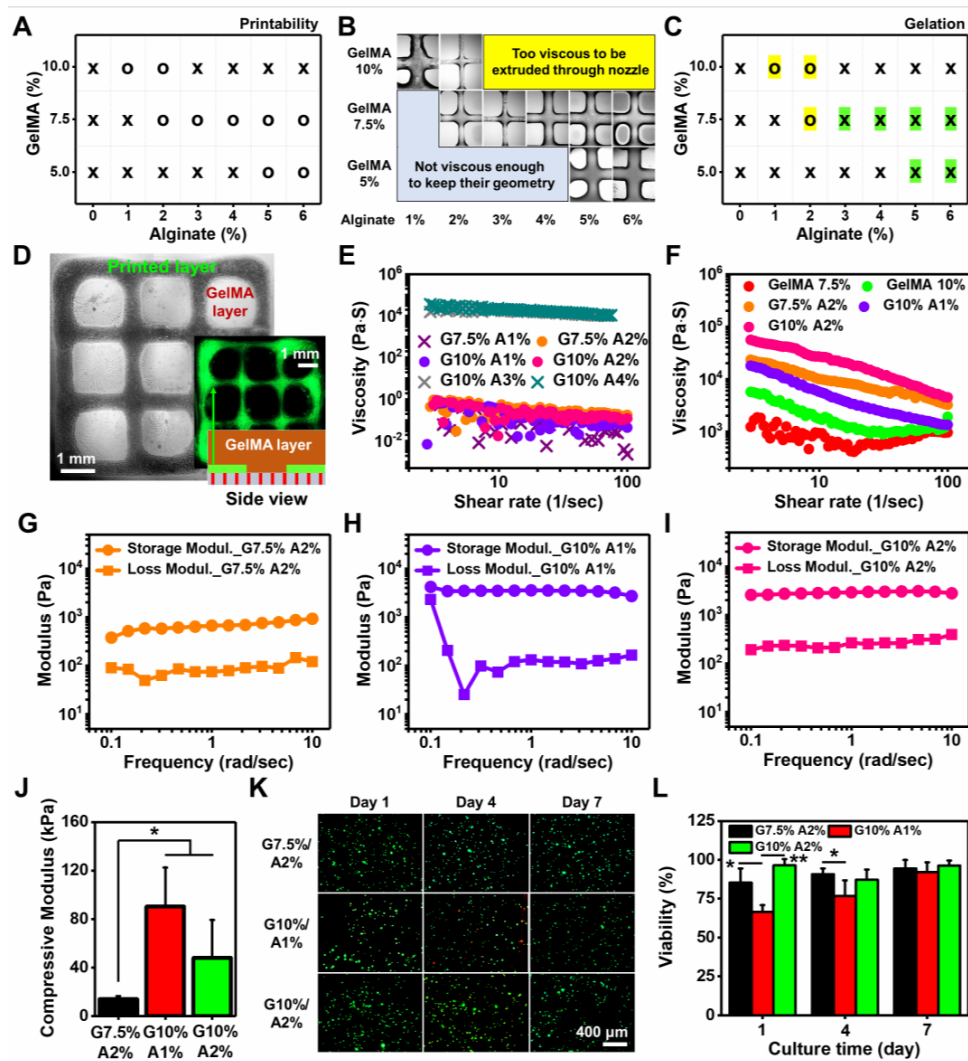


Figure 2. Optimization of GelMA-alginate bioinks for building internal vessel networks. A) Printability mapping of GelMA-based bioinks; o: printable, x: non-printable. B) Representative images showing printed constructs. C) Gelation mapping of GelMA-based bioinks; o: gellable, x: non-gellable after photo-crosslinking. D) Representative optical and fluorescence images to display the printed construction. Viscosity measurements of GelMA-based E) bioinks and F) crosslinked-gels at various concentrations. Representative rheological behaviors of G) GelMA 7.5%/alginate 2%, H) GelMA 10%/alginate 1%, and I) GelMA 10%/alginate 2%. J) Compressive modulus of photocrosslinked GelMA-based bioinks. K) Representative immunofluorescence images of live/dead HUVECs in GelMA-based bioinks. Calcein-AM (live in green) and ethidium homodimer-1 (dead in red) L) Quantitative viability of HUVECs cultured in bioinks for 1, 4 and 7 days * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, ANOVA. Error bars are standard deviation.

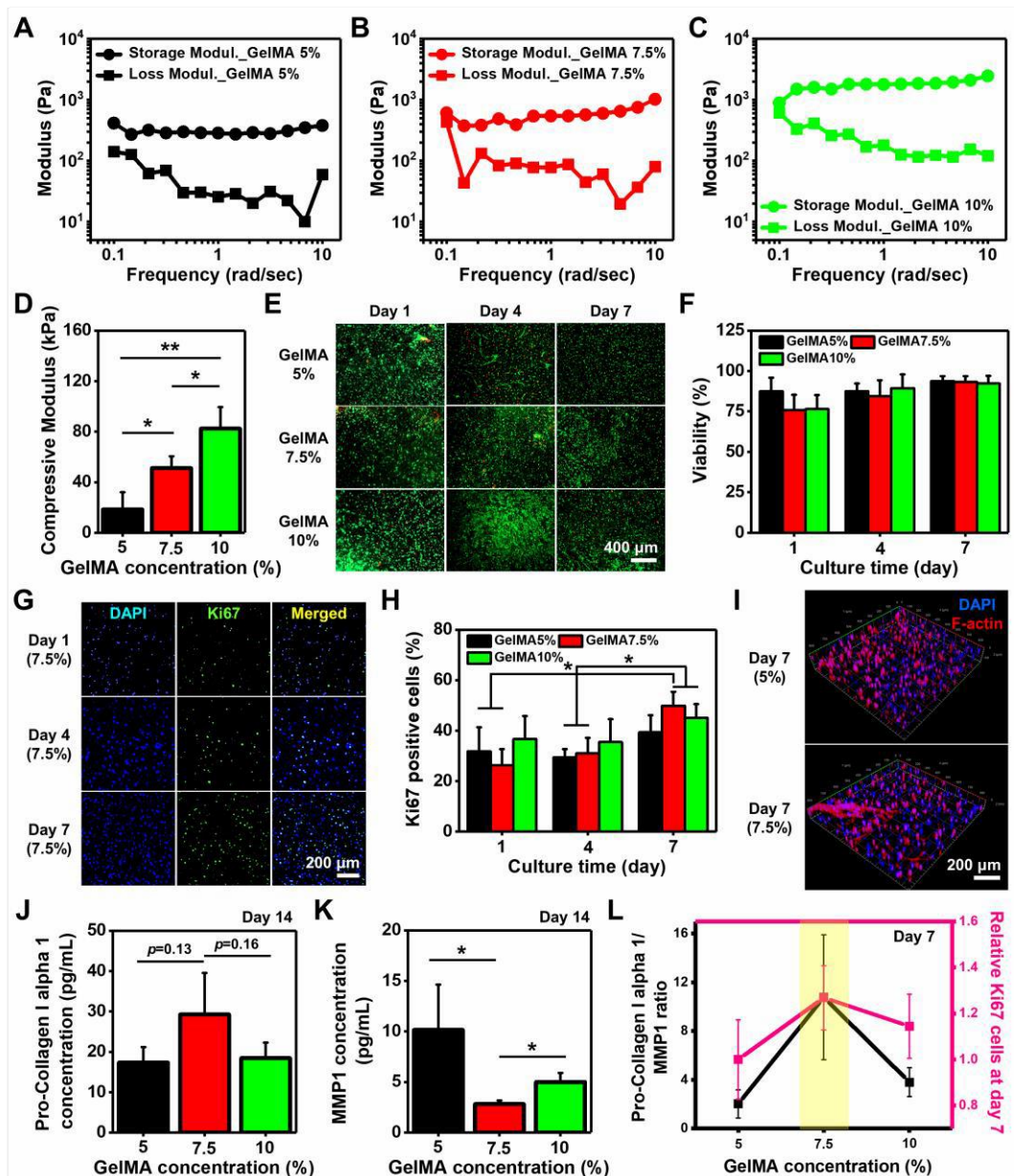


Figure 3. Selection of GelMA hydrogels with tunable mechanical properties for better modeling of 3D dermis layer. Representative rheological behaviors of A) 5%, B) 7.5%, and C) 10% crosslinked GelMA hydrogels. D) Compressive modulus of GelMA hydrogels in different concentrations. E) Representative immunofluorescence live/dead images of hDFs cultured in different concentrations of GelMA hydrogels for 1, 4, 7 days. Calcein-AM (live, green) and Ethidium Homodimer-1 (dead, red). F) Quantitative viability of hDFs on day 1, 4 and 7. G) Representative immunofluorescence images of hDFs stained with Ki-67. Cells were cultured in 7.5% GelMA. Nuclei: DAPI and Ki-67: green. H) Quantification of Ki-67-positive cells on day 1, 4 and 7. I) Representative confocal images of hDFs encapsulated in

various GelMA hydrogel concentrations with DAPI (blue) and F-actin (red) staining. J) Quantification of Pro-Collagen I alpha 1 production and K) MMP1 secretion by hDFs cultured in 5, 7.5, and 10% GelMA hydrogels for 14 days. L) Comparison between the production ratio of Pro-Collagen I alpha 1 versus MMP1 and relative Ki-67 positive cells at day 7 as a function of the concentration of GelMA hydrogels. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, ANOVA. Error bars are standard deviation.

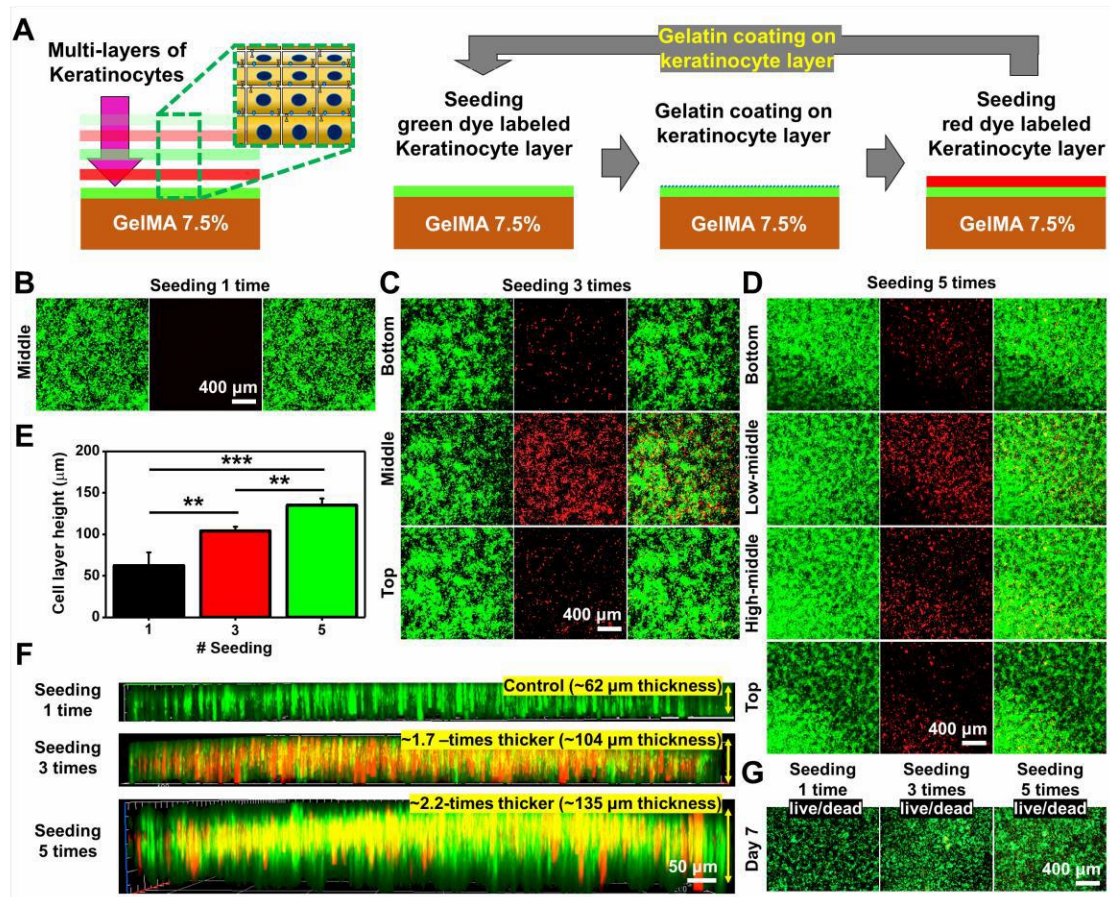


Figure 4. Creating *in vitro* multilayered epidermis to shorten culturing time. A) Schematic representation showing the concept of multilayering KCs with gelatin coating on GelMA hydrogel: first layer seeding -> gelatin coating -> second layer seeding and repeating the steps. Representative confocal images of *in vitro* epidermis layers seeding KCs B) 1×, C) 3×, and D) 5×. KCs at the 1st, 3rd, and 5th seeding were stained in green, and those at 2nd and 4th seeding were stained in red. E) Quantification of height of cell layers from confocal observation. F) Representative z-stacked confocal images of KCs seeded 1, 3, and 5× on GelMA hydrogels.

G) Representative immunofluorescence live/dead images of KCs seeded multiple times on 7 days. Calcein-AM (live, green) and ethidium homodimer-1 (dead, red). ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$, ANOVA. Error bars are standard deviation.

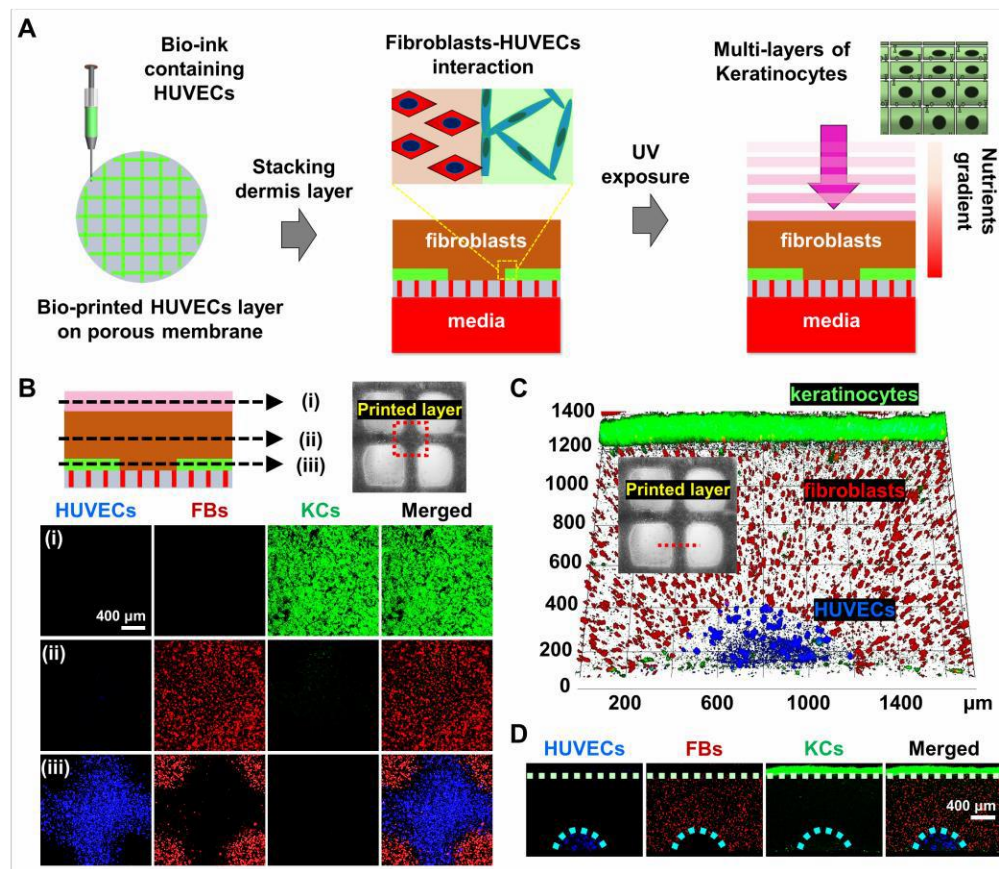


Figure 5. 3D organization of skin layers on-a-chip with perfusion. A) Schematic diagram of skin-on-a-chip fabrication: from endothelial cells bioprinting to multilayered epidermis formation. B) Confocal observation at different 3D skin equivalent sections (i) epidermis (ii) dermis (iii) dermis/endothelium. C) A representative 3D cross-sectional confocal image showing the structure of fabricated skin layers. D) Representative confocal images of the 3D *in vitro* skin model. KCs: green, hDFs: red, HUVECs: blue.

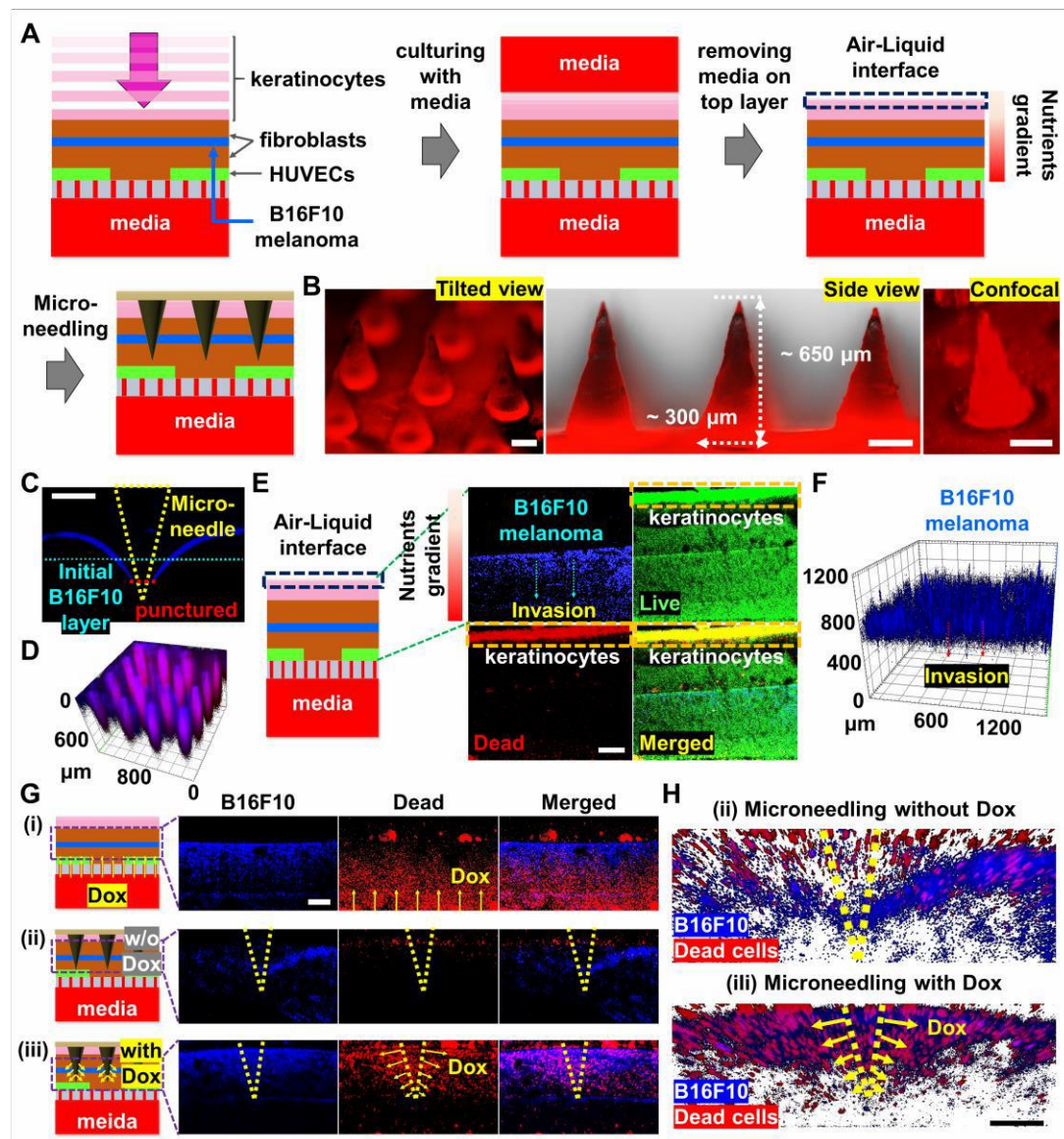


Figure 6. Skin cancer model and transdermal drug delivery *via* MNs to localized cancer cells. A) Schematic diagram of 3D Skin cancer-on-a-chip fabrication and DOX-loaded GelMA MNs application. B) Representative images of DOX-loaded GelMA MNs, tilted view, side view, and 3D construction from multi confocal imaging. C) A representative cross-sectional confocal image of the 3D skin cancer model with inserted MNs, note that the layer of melanoma cells has been reached and punctured. D) 3D z-stacked confocal view from DOX-loaded GelMA MNs punctured on the 3D skin cancer model. E) Representative cross-sectional live/dead images of the 3D skin cancer model after 24 h of air-liquid interface culturing. Invasion of melanoma cells (blue) directed to the media microchannel direction was observed. F) A representative of z-stacked confocal image of melanoma cells invading to the media microchannel. G) Representative cross-sectional confocal images of skin cancer cells under three conditions: (i) with Dox, (ii) without Dox, and (iii) with Dox. H) Representative cross-sectional confocal images of skin cancer cells under two conditions: (ii) Microneedling without Dox and (iii) Microneedling with Dox, showing B16F10 melanoma cells and dead cells.

models. (i) DOX perfused through the media microchannel (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), (ii) Dox-free GelMA MNs (as a control) punctured on the 3D skin cancer model, (iii) DOX-loaded GelMA MNs punctured on the 3D skin cancer model. H) Representative z-stacked cross-sectional images of melanoma layers in the dermis layer without or with the presence of DOX, (ii) DOX-free GelMA MNs, (iii) DOX-loaded GelMA MNs.

An *in vitro* skin model physiologically resembling *in vivo* skin structure is developed by constructing layers of bioprinted endothelial cells, 3D dermis, and multilayered epidermis. The proposed skin-on-a-chip platform can be also used for creating a human skin cancer model and shows the possibility of drug delivery to localized cancer cells using microneedles, proving the capability to monitor and treat skin-related diseases.

Keywords: skin-on-a-chip, tissue engineering, bioprinting, skin cancer, microneedling

M. R. Barros, H. Kim, M. Gouidie, K. Lee, P. Bandaru, E. A. Banton, E. Sarikhani, W. Sun, S. Zhang, H. Cho, S. Ostrovidov, S. Ahadian, S. M. Hussain, N. Ashammakhi, M. R. Dokmeci,

R. D. Herculano, J. Lee*, A. Khademhosseini*

A Multifunctional Human Skin-on-a-chip Platform with Bioprinted Vessel Network, 3D Dermis, and Multilayered Epidermis Skin Model

