

Universidade de São Paulo

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Denisse Esther Mallaupoma Camarena

**Construção de epiderme equivalente em matrizes poliméricas para
avaliação de ensaios bioquímicos**

Versão da Tese Corrigida

São Paulo

17 de maio de 2021

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

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

M252c	Mallaupoma Camarena, Denisse Esther Construção de epiderme equivalente em matrizes poliméricas para avaliação de ensaios bioquímicos / Denisse Esther Mallaupoma Camarena. - São Paulo, 2021. 151 p.
	Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Catalani, Luiz Henrique Coorientador: Maria-Engler, Silvy Stuchi
	1. eletrofiacção. 2. pele in vitro. 3. epiderme in vitro. 4. corrosão cutânea. 5. irritação cutânea . I. T. II. Catalani, Luiz Henrique, orientador. III. Maria-Engler, Silvy Stuchi , coorientador.



Universidade de São Paulo
Instituto de Química

"Construção de epiderme equivalente em matrizes poliméricas para
avaliação de ensaios bioquímicos"

DENISSE ESTHER MALLAUPOMA CAMARENA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências - no Programa de Química.

Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani
(Orientador e Presidente)

APROVADO(A) POR:

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri
IQ - USP

Profa. Dra. Lorena Rigo Gaspar Cordeiro
FCFRP - USP

Profa. Dra. Marize Campos Valadares
UFG

SÃO PAULO
10 de setembro de 2021

Denisse Esther Mallaupoma Camarena

**Construção de epiderme equivalente em matrizes poliméricas para
avaliação de ensaios bioquímicos**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutora em Ciências (Química).

Orientador: Luiz Henrique Catalani

Co-orientadora: Silvyia Stuchi Maria-Engler

São Paulo
2021

Dedico este trabalho à memória de minha tia Hedis Mallaupoma Reyes, uma pessoa doce, inteligente e forte. Ela soube me esperar sempre com muita ilusão cada vez que eu viajava para o Peru. Ela sabia minhas comidas, frutas e doces preferidos. Ela sempre comemorou junto comigo cada alegria e cuidou de mim nos momentos tristes. Minha madrinha de ouro!

AGRADECIMENTOS

Tudo o que eu consigo expressar com palavras aqui é curto em relação à imensa gratidão que tenho no coração.

Início agradecendo a Deus, por ser a energia presente em cada momento de minha vida. Por ser meu grande Mestre nas diferentes matizes da vida.

Agradeço a minha melhor amiga, minha mãe e anjo, Nerida Esther Camarena Ames, por ser meu exemplo de amor, doçura, coragem, perseverança e luta, por ter me ensinado a respeitar meus princípios. Ao meu pai Christian Mallaupoma Reyes, por ser exemplo de superação e me demonstrar que as pessoas conseguem se superar a cada dia se elas quiserem. Ao meu irmão Miguel Angel, por ser sempre meu exemplo de pessoa apaixonada pela carreira, por ser quem me mostrou como ensinar com paciência, passo a passo. Ao meu irmão Christian Javier, por me ensinar a sorrir sempre, por me motivar com sua energia sempre positiva e lutar pelos objetivos. A minha prima Lenna (minha *roomie* desde o 2020), por me motivar em cada experiência culinária e ter um coração muito bonzinho. A toda minha família (tias, tios, primos, primas, sobrinhos, sobrinhas), por sempre estarem presentes na minha vida, pelos conselhos compartilhados e estarem na torcida. O que seria de mim sem vocês, minha linda família?

Ao meu companheiro e melhor amigo, meu noivo Genaro, por todo o amor, paciência (muita), alegria e conselhos. Por segurar minha mão nos momentos difíceis e pular de alegria nas minhas conquistas. À família toda dele, que me adotou como filha, irmã, sobrinha e tia.

Ao professor Luiz Henrique Catalani, meu orientador no doutorado, pela oportunidade de me permitir ser parte de sua equipe no Laboratório de Biomateriais Poliméricos. Eu admiro muito sua entrega à ciência, seu olhar crítico e questionador, sempre pronto para escutar cada ponto com argumentação. Obrigada por ter as palavras certas nos momentos certos – isso fez com que eu exigisse cada vez mais de mim mesma. Eu agradeço pelas nossas conversas e por todos os desafios, os quais foram uma enorme motivação para mim.

À minha co-orientadora, a professora Silvyta Stuchi Maria-Engler, por ter me recebido como parte de seu time no Grupo de Biologia da Pele e Melanoma. Eu admiro muito sua dedicação, comprometimento e exigência com você e toda sua equipe. Por ser líder, amiga e mãe cientista, por ser exemplo de honestidade e luta. Por exigir em todos o

nível “Padrão ouro”. Agradeço infinitamente cada ensinamento, conversa, conselho e mensagem aguardando as novidades.

Aos professores da USP que me conheceram quando eu os procurava por e-mail ou na porta de suas salas ou laboratórios para fazer alguma pergunta. Aos professores: Denise Freitas Siqueira Petri, Susana Inés Córdoba de Torresi, Liliana Marzoratti, Iolanda Midea Cuccovia, Massuo Jorge Kato, Ana Campa, Mario Hiroyuki Hirata. Em especial à Profa. Silvia Berlanga de Moraes Barros, por separar seu tempo para mim e perguntar como eu estava indo na pesquisa, por sempre receber minhas perguntas com muito entusiasmo e me mostrar seu raciocínio lógico na busca por respostas, por ser uma grande inspiração para mim.

A meu querido pessoal do Laboratório de Biomateriais Poliméricos, muitos já saíram do laboratório, outros chegaram. Agradeço em especial a: Nayara, minha amiga querida, por todas nossas conversas e tempo compartilhado, por procurar entender sempre a fundo mais que o formato de minhas palavras; Giovanne, por como o tempo nos ensinou a aprender um com o outro, te considero meu irmãozinho; Laura, a nossa Baronesa, por sua boa energia, alegria e disposição no momento de explicar algum tema; Isabela, a nossa Princesa, sempre com brilho nos olhos quando se fala de ciência, por me brindar com seu belo tempo para ler meus escritos e me ajudar com as correções de português; Gilvan, ficou pouco tempo no laboratório, mas foi muito legal conhecê-lo; Raphael, sobreviveu nas minhas mãos como IC no tempo da reforma do laboratório, menino fantástico com fome de ter novos conhecimentos; Danilo, que menino mais educado, cavalheiro, inteligente e gentil com todo mundo; Michelle, por ser muito prestativa e estar sempre aí quando te procuramos; Raja, a gente chegou se entender só com o olhar; Joaquim Matheus (super Joca), por ser mais que nosso super e querido técnico, é nosso amigo, sempre nos motivando quando temos algum plano favorável para nosso laboratório; Felipe Barbosa, por nos auxiliar nas correrias quando da procura de reagentes e materiais, você sempre soube como falar com cada um de nós. Minha querida turma, nossos laços se fortaleceram cada dia, considero vocês minha família, porque com todas nossas semelhanças e diferenças, sempre torcemos um pelo outro, sempre procuramos nos ajudar. Lembrem-se de que podem contar comigo sempre.

A todo belo pessoal do Grupo de Biologia da Pele e Melanoma, o laboratório das lindas Silvias (Silvy Stuchi, Silvia Berlanga, Silvia Romano). Todos me acolheram

muito bem e cuidaram de mim super bem desde o dia que entrei no laboratório de vocês. Admiro o trabalho super profissional de cada um. Agradeço em especial à Silvia Romano, por cuidar do bom trabalho no laboratório, por ser muito exigente com cada protocolo e se preocupar com todos nós. À minha querida amiga Claudia, por ser como ela é, por nossas parcerias em cada programação do trabalho, pela confiança e todas as nossas conversas. À Larissa Sekimoto, pela amizade e por compartilhar de seus conhecimentos com todos aqueles que a procuram, por ser aquela cientista exigente consigo mesma e que procura um trabalho bem feito, pelas horas e horas em que o trabalho na sala de cultura coincidia. À Adriana, uma IC sensacional, minha amiga e *roomie*, eu sempre te admiro por ser tão jovem e resolvida, agradeço por cada conversa, risada e cafezinho compartilhado. À Larissa Carvalho, meu respeito e admiração sempre, você consegue lidar com diferentes assuntos de pesquisas e ainda assim fica com tempinho para responder nossas perguntas. À Julia Bagatin, por ser muito amiga da galera toda, por ter aquele bom astral. À Julia Rezende, por toda sua super organização em cada coisa que inicia ou quer fazer (experimentos, eventos, comemorações, surpresas). À Erika, por me permitir conhecer um pouco de sua história inspiradora em nossas idas ao HU para incluir e cortar amostras. À Iasmin, por aquela emoção e preocupação por aprender coisas novas e desafiadoras, sempre exigindo de si ser melhor. À Ylana, por sempre se dar bem com todo mundo e ter um tempinho dentro de sua agenda lotada. Ao Rodrigo, menino educado e inteligente que vai chegar longe no mundo da pesquisa. Aos meninos que já saíram do laboratório, mas levarei sempre em minha mente e coração: Luis, Stephanie, Barbara, Danny, Michelle, Julianna. *Skin Biology Laboratory*, contem comigo sempre.

A todo o pessoal do Laboratório de Histologia do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário que me conheceu e sempre foi muito gentil comigo, cada vez que eu ia lá para trabalhar com minhas amostras. Em especial para: Andrea Peixoto e Marco Santoni, muita gratidão pelos conselhos, dicas e ensinamentos, por serem meus mestres e amigos. À Risorilda e Arlete, por responder cada uma de minhas mensagens quando eu perguntava por seus horários e pelo uso do micrótomo, por me receberem sempre com um sorriso.

Aos técnicos da Central Analítica do Instituto de Química, sempre prontos a responder todas as nossas perguntas em relação a algum equipamento ou tipo de amostra. Em especial: à Michele Rocha pelas explicações e conversas da análise térmica, à Vania

Bueno Silva por ser aquele anjo que está pronta para ajudar, e ao Alfredo Duarte, que no começo parecia bravo pela seriedade, mas esteve sempre aí para me auxiliar no SEM.

Aos técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Edson Naoto Makiyama, Fabiana Teixeira, Cristina Moreno Fajardo, Maurício dos Santos, Silene Migliorini, pela ajuda sempre que os procurei.

Agradeço aos funcionários da seção de pós-graduação, pelo excelente trabalho. Em especial: Milton Cesar Santos Oliveira e Vanderlei Paes de Oliveira, por sempre responderem meus muitos e-mails e tirarem minhas dúvidas, por sempre me receberem com um sorriso e serem sempre atenciosos - além de saberem que eu chegava com perguntas como sempre.

Ao Paulo Antonio Monteiro da Silva, as taxas de bancada me levaram a conhecê-lo, agradeço pela sua gentileza e por cada uma de suas respostas para minhas inúmeras perguntas.

À Fatima Maria de Jesus Joaquim Mazzine e Fernanda Dib Cordeiro, pela oportunidade de conhecê-las e os “ois” com sorrisos no rosto.

À Katia Tsai, pela amizade e preocupação de saber se os amigos se encontravam bem.

Ao meu querido amigo Jorge Luis Torrejón Matos, por sempre compartilhar seus conhecimentos do mundo da estatística e gerar um espaço na sua agenda para nossas conversas matemáticas.

Aos funcionários da USP toda, por, em conjunto, fazerem com que tudo seja possível.

Às agências de fomento à pesquisa, Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Agradeço a cada pessoa que conheci neste doutorado, fora e dentro da USP, todos foram e são importantes. Eu continuaria citando mais nomes, mas aí nunca terminaria.

“Behind every success there is effort, behind the effort there is passion and behind the passion there are people with the courage to try.”

Arthur B. McDonald

(Estocolmo, 10 de dezembro de 2015)

Mallaupoma-Camarena, Denisse Esther. **Construção de epiderme equivalente em matrizes poliméricas para avaliação de ensaios bioquímicos**. 2021. 151p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Química em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo a construção de epiderme humana *in vitro* sobre arcabouços de matriz de polímeros sintéticos sem colágeno. Esses arcabouços foram obtidos de malhas, as quais foram fabricadas utilizando-se a técnica de eletrofição. Os polímeros usados foram o poli (tereftalato de etileno), o poli (tereftalato de butileno) e o náilon 6,6. As malhas eletrofiadas foram caracterizadas em função de suas morfologias, distribuição de diâmetro de fibras, propriedades térmicas, porosidade e ângulo de contato. A avaliação *in vitro* da viabilidade das células (fibroblastos ou queratinócitos) cultivadas sobre malhas revelaram aumento da viabilidade de 1 para 7 dias. Para as construções epidérmicas *in vitro* foram seguidos dois protocolos: modelos de pele de completa (derme e epiderme) e epiderme humana reconstruída (RHE). Após as construções *in vitro*, suas morfologias foram caracterizadas por análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina). Os resultados revelaram que a construção RHE sobre malhas eletrofiadas de náilon 6,6 (N-RHE) apresenta morfologia semelhante à da epiderme humana. No modelo N-RHE, a presença de proteínas expressas na estratificação (citoqueratina 10 e 14, involucrina e loricrina) foi confirmada por imunohistoquímica e análise de *Western blotting*. Finalmente, a aplicabilidade do modelo N-RHE como plataforma para a realização de ensaios de corrosão e irritação cutânea foi avaliada segundo as diretrizes sugeridas pela OECD para modelos *in vitro* epidérmicos. Conclui-se que o modelo N-RHE apresenta estratificação adequada e funcionalidade específica, semelhante aos modelos clássicos de epiderme reconstruída, representando uma plataforma promissora na avaliação do potencial de irritação/corrosão dérmica de produtos químicos, uma vez que foram constatados apenas danos típicos relacionados à exposição da pele com substâncias corrosivas e/ou irritantes, avaliados por ensaios de viabilidade relativa e análise histológica.

Palavras-chave: eletrofição, pele *in vitro*, epiderme *in vitro*, corrosão/irritação cutânea

Mallaupoma-Camarena, Denisse Esther. **Construction of epidermal equivalent in polymeric scaffolds for evaluation of biochemical assays**. 2021. 151p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Química em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

ABSTRACT

This study aimed at the construction of human epidermis *in vitro* on scaffolds made of synthetic polymers collagen free. These scaffolds were obtained from meshes, which were produced using the electrospinning techniques. The polymers used were polyethylene terephthalate, polybutylene terephthalate, and nylon 6,6. Electrospun meshes were characterized by their morphology, fiber diameter distribution, thermal properties, porosity, and contact angle. *In vitro* evaluation of cell viability (fibroblasts or keratinocytes) cultivated onto the meshes revealed increased viability from 1 to 7 days. For the *in vitro* epidermal constructs, two protocols were followed: full-thickness skin and reconstructed human epidermis (RHE) models. After *in vitro* constructs, their morphologies were analyzed by histological analysis (hematoxylin and eosin staining). The results revealed that the RHE construct on nylon 6,6 electrospun meshes (N-RHE) presents morphology similar to that of the human epidermis. In the N-RHE model, the presence of proteins involved in the epidermis stratification process (cytokeratin 10 e 14, involucrin, and loricrin) was confirmed by immunohistochemistry and Western Blotting analysis. Finally, the applicability of the N-RHE model as a platform to perform corrosion and skin irritation assays was evaluated according to the guidelines suggested by the OECD for *in vitro* epidermal models. It is concluded that the N-RHE model presents adequate stratification and specific functionality, similar to the classic models of reconstructed epidermis, representing a promising platform for assessing the dermal irritation/corrosion potential of chemicals, as only typical damages related to skin exposure to corrosive and/or irritant substances were found, as assessed by relative viability tests and histological analysis.

Keywords: electrospinning, skin *in vitro*, epidermis *in vitro*, skin corrosion/irritation

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele.....	26
Figura 2 - Representação esquemática de fibroblastos dérmicos normais.....	27
Figura 3 - Diferenciação epidérmica.....	29
Figura 4 - Reconstrução <i>in vitro</i> de pele humana.....	32
Figura 5 - Fluxograma do protocolo geral de corrosão cutânea.....	40
Figura 6 - Fluxograma do ensaio de irritação cutânea em modelo de pele <i>in vitro</i>	44
Figura 7 - Geometrias de arcabouços.....	48
Figura 8 - Sistemas de eletrofição.....	50
Figura 9 - Possíveis aplicações de malhas eletrofiadas como arcabouços.....	52
Figura 10 -Diagrama esquemático da instalação para eletrofição.....	61
Figura 11 -Diagrama esquemático do sistema de pesagem para determinar porosidade [133]	63
Figura 12 -Micrografias SEM e histogramas das malhas de PET.....	77
Figura 13 -Histogramas das malhas de PET.....	80
Figura 14 -Avaliação da normalidade da distribuição de dados em malhas 30% PET.....	82
Figura 15 - <i>Boxplot</i> da distribuição de diâmetros de fibra de malhas 30% PET.....	83
Figura 16 -Micrografias SEM e histogramas das malhas de PBT.....	85
Figura 17 -Histogramas das malhas de PBT.....	87
Figura 18 -Avaliação da normalidade da distribuição de dados em malhas 20% PBT.....	88
Figura 19 - <i>Boxplot</i> da distribuição de diâmetros de fibra de malhas 20% PBT.....	89
Figura 20 -Micrografias SEM e histogramas das malhas de N6/6.....	90
Figura 21 -Avaliação da normalidade da distribuição de dados em malhas N6/6.....	91
Figura 22 - <i>Boxplot</i> da distribuição de diâmetros de fibra de malhas N6/6.....	92
Figura 23 -Análise térmica das malhas 30PET: (A) Curvas de TGA e (B) Curvas de DSC	95
Figura 24 -Análise térmica das malhas 20PBT: (A) Curvas de TGA e (B) Curvas de DSC	98
Figura 25 -Análise térmica das malhas 12,5N6/6: (A) Curvas de TGA e (B) Curvas de DSC	101
Figura 26 -Viabilidade celular de fibroblastos nas malhas eletrofiadas.....	106
Figura 27 -Fotomicrografia de análise histológica de fibroblastos nas malhas eletrofiadas	107
Figura 28 -Micrografias SEM da cultura de fibroblastos nas malhas eletrofiadas.....	108
Figura 29 -Viabilidade celular de queratinócitos nas malhas eletrofiadas.....	109
Figura 30 -Fotomicrografia de análise histológica de queratinócitos nas malhas eletrofiadas.....	110
Figura 31 -FTSs reconstruídos sobre matriz de colágeno e sobre malhas eletrofiadas.....	111
Figura 32 -RHEs reconstruídos sobre (A) malhas de N6/6 e (B) matriz de colágeno.....	112
Figura 33 -Imunohistoquímica da epiderme humana reconstruída.....	116

Figura 34 -Fotomicrografias de análise histológica e imunohistoquímica de PCL-RHE	
117	
Figura 35 -Avaliação <i>in vitro</i> de corrosão cutânea de modelos RHE.....	119
Figura 36 -Avaliação <i>in vitro</i> de irritação cutânea dos modelos RHE	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ferramentas e parâmetros para avaliar a qualidade estrutural das peles reconstruídas [43]	33
Tabela 2 - Lista de organizações de validação de métodos alternativos [50, 51]	34
Tabela 3 - Modelos comerciais de pele <i>in vitro</i> (FTS e RHE)	36
Tabela 4 - Categorias de danos na pele, por corrosão ou irritação, segundo a GHS da UN [67] 38	
Tabela 5 - Métodos alternativos de irritação/corrosão da pele, aceitos pelo CONCEA ¹ , que entraram em vigor em 2019	38
Tabela 6 - Dosagens de produtos químicos para o ensaio de corrosão cutânea em modelos RHE	39
Tabela 7 - Principais componentes do método de corrosão em modelos validados	41
Tabela 8 - Dosagens de produtos químicos para ensaio de irritação cutânea em modelos RHE 43	
Tabela 9 - Parâmetros do protocolo adaptados para RHE comerciais, com métodos validados e reconhecidos pela OECD, para ensaio de irritação cutânea <i>in vitro</i> 46	
Tabela 10 - Composição de arcabouços de alguns modelos comerciais de pele <i>in vitro</i> 49	
Tabela 11 - Exemplos de resposta celular em ensaios <i>in vitro</i> em arcabouços poliméricos e sua possibilidade na regeneração cutânea	53
Tabela 12 - Exemplos de polímeros eletrofiados, avaliados <i>in vivo</i> com resultados promissores para engenharia de tecidos da pele	54
Tabela 13 - Porcentagem de polímeros usados na preparação de soluções poliméricas em diferentes proporções em misturas de solventes.	60
Tabela 14 - Parâmetros ¹ estabelecidos no processo de eletrofição do PET, PBT e N6/6 61	
Tabela 15 - Porosidade das malhas eletrofiadas	93
Tabela 16 - Comportamento térmico das malhas eletrofiadas 30PET, obtidas por DSC 96	
Tabela 17 - Comportamento térmico das malhas eletrofiadas 20PBT, obtidas por DSC 99	
Tabela 18 - Comportamento térmico das malhas eletrofiadas 20PBT, obtidas por DSC 102	
Tabela 19 - Ângulo de contato, Energia de superfície e seus componentes em superfícies lisas de 30PET, 20PBT e 12,5N6/6	103
Tabela 20 - RHE reconstruídos sobre matriz de colágeno e sobre malha eletrofiada de náilon 113	
Tabela 21 - Comparação dos resultados com a categoria dos reagentes segundo a UN GHS 122	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcF	ácido fórmico
A	área
BraCVAM	<i>Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
CN	controle negativo
CP	controle positivo
C/P	ceroso/pegajoso
cg	com agitação
DPBS	solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco
DCM	diclorometano
D _a	densidade aparente da amostra
DPX	meio de inclusão para histología
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
d	distancia
D _r	densidade “real” da amostra
d ₀	densidade do líquido
d _L	densidade do ar
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EB	Estrato basal
EE	Estrato espinhoso
EG	Estrato granuloso
EC	Estrato córneo
ECM	Matriz extracelular
EGF	fatores de crescimento epidérmico
e	espessura da amostra
EPH	equivalentes de pele humana
FLG	filagrina
FTS	<i>Full thickness skin</i>
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals</i>
HFP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
H ₀	hipótese nula

h	altura
HE	hematoxilina e eosina
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IVL	involucrina
Inc:	37 °C, 5% CO ₂ , 95% humidade relativa
IIQ	intervalo interquartil
ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
JacVAM	<i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i>
KRT	citoqueratina
KGM	KGM TM Gold Keratinocyte Growth Medium BulletKit TM
KS	Kolmogorov-Smirnov
KocVAM	<i>Korean Center for the Validation of Alternative Methods</i>
KP	queratinócitos
LOR	loricrina
L	liquido
MW	pesos moleculares
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
ME	uso de malha estéril na aplicação do reagente
MSC	células-tronco mesenquimais
Mv	Peso molecular viscosimétrico
Mn	Peso molecular médio numérico
M ₂	massa da amostra no líquido
m/v	massa volume
M ₁	massa da amostra da amostra no ar
N6/6	poli (N, N'-hexametenadipinadida)
N-FTS	pele humana completa reconstruída sobre malha de 12,5N6/6
N-RHE	controle de epiderme humana reconstruída sobre malha 12,5N6/6
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OD	densidade óptica
[OD] _{Substancia teste}	densidade óptica após tratamento com uma substancia teste
[OD] _{CN}	densidade óptica após ser exposta ao controle negativo

PLLCL	poli(L-láctico)- <i>co</i> -poli(3-caprolactona)
PCL	policaprolactona
PET	poli(tereftalato de etileno)
PBT	poli(tereftalato de butileno)
PET-FTS	pele humana completa reconstruída sobre malha de 30PET
PBT-FTS	pele humana completa reconstruída sobre malha de 20PBT
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
P ₂₅	primeiro quartil
P ₅₀	segundo quartil
P ₇₅	terceiro quartil
PU	poliuretano
PVA	álcool polivinílico
RHE	<i>Reconstructed Human Epidermis</i>
RAFT-FTS	meio específico para modelo de pele completa
RAFT-RHE	meio específico para modelo epidérmico
RT	fluxo ventilado
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
SS	semi sólido
S	sólido
sg	sem agitação
SDS	dodecil sulfato de sódio
SD	desvio padrão
SFB	soro fetal bovino inativado
TG	<i>test guidelines</i>
t _{MTT}	tempo de incubação do MTT
T _{MTT}	temperatura de incubação do MTT
t-T	tempo e temperatura de extração
TGA	Termogravimetria
T _g	transição vítrea
T _m	temperatura de fusão
T _c	temperatura de cristalização
T _B	temperatura da transição de Brill

UN	<i>United Nations</i>
USP-FTS	controle de pele humana completa reconstruída
USP-RHE	controle de epiderme humana reconstruída
v	volume
VR	viabilidade relativa
V _{mf}	volume de meio fresco
VR	viabilidade relativa
W	massa
X _c	grau de cristalinidade
x1000	aumento 1000 vezes
xg	força centrífuga relativa
ϕ	diâmetro
ΔH _m	entalpia de fusão
ΔH _m ⁰	calor de fusão de equilíbrio (entalpia de fusão de amostra 100% cristalina do mesmo polímero)
ΔH _c	entalpia de cristalização
Θ	ângulo de contato
γ ^{LW}	contribuições dispersivas Lifshitz-van del Waals
γ ⁻	contribuição polar – doador de elétrons
γ ⁺	contribuição polar – aceitor de elétrons
20% PET	malhas produzidas a partir de soluções com 20% (m/v) de PET
30% PET	malhas produzidas a partir de soluções com 30% (m/v) de PET
10% PBT	malhas produzidas a partir de soluções com 10% (m/v) de PBT
20% PBT	malhas produzidas a partir de soluções com 20% de PBT
12,5% N6/6	malha produzida a partir de soluções com 12,5% (m/v) de N6/6
30PET	malha obtida de soluções de 30% de PET em HFP:DCM (7:3)
20PBT	malha obtida de soluções de 20% de PBT em HFP:DCM (7:3)
12,5N6/6	malha obtida de soluções de 12,5% de PET em AcF:CHCl ₃ (7,5:2,5)
ε	constante dielétrica
α	nível de significância

3D ambiente tridimensional
 β -ACT beta actina

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Modelos <i>in vitro</i> para avaliação de risco TOXICOLÓGICO de produtos químicos.....	23
1.2	Pele 25	
1.2.1	Derme 26	
1.2.2	Epiderme.....	27
1.3	Pele <i>in vitro</i>	29
1.3.1	Modelo de pele <i>in vitro</i>	30
1.3.2	Aplicabilidade dos modelos de pele <i>in vitro</i>	34
1.3.3	Corrosão e irritação cutânea.....	37
1.4	Biomateriais e ARCABOUÇOS.....	47
1.5	Eletrofiação.....	49
1.5.1	Eletrofiação na engenharia de tecidos.....	50
2	OBJETIVOS.....	56
2.1	Objetivo geral.....	56
2.2	Objetivos específicos.....	56
2.2.1	Obtenção e caracterização das malhas eletrofiadas para uso como arcabouço celular 56	
2.2.2	Construção e caracterização de epidermes <i>in vitro</i> com e sem presença de derme 56	
2.2.3	Aplicabilidade do modelo epidérmico.....	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1	Materiais e fontes celulares.....	58
3.2	Métodos.....	59
3.2.1	Fabricação de malhas poliméricas por eletrofiação.....	59
3.2.2	Caracterização das malhas eletrofiadas.....	61
3.2.3	Acondicionamento das malhas eletrofiadas para cultivo celular.....	65
3.2.4	Detecção de <i>Mycoplasma sp.</i>	65
3.2.5	Ensaio de viabilidade celular.....	66
3.2.6	Construção de modelos <i>in vitro</i> de pele humana.....	67
3.2.7	Controle de qualidade das construções <i>in vitro</i>	68
3.2.8	Aplicabilidade do modelo de pele reconstruída.....	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1	PRODUÇÃO e caracterização das malhas eletrofiadas.....	73
4.1.1	Morfologia e diâmetro das fibras.....	75
4.1.2	Porosidade das malhas.....	92
4.1.3	Ensaio térmico.....	93
4.1.4	Ângulo de contato das superfícies poliméricas.....	102
4.2	PRODUÇÃO DE PELE.....	104
4.2.1	Cultura de fibroblastos nas malhas eletrofiadas.....	105
4.2.2	Cultura de queratinócitos nas malhas eletrofiadas.....	108
4.2.3	Construção de pele completa (epiderme com derme).....	110

4.2.4	Construção de epiderme.....	112
4.3	APLICABILIDADE DO MODELO EPIDÉRMICO RHE.....	117
4.3.1	Corrosão cutânea.....	118
4.3.2	Irritação cutânea.....	120
5	CONCLUSÕES.....	123
REFERÊNCIAS		124
CV resumido		146

1 INTRODUÇÃO

1.1 MODELOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE RISCO TOXICOLÓGICO DE PRODUTOS QUÍMICOS

Com o decorrer do tempo e o crescente papel dos produtos químicos no cotidiano, houve uma crescente preocupação com relação às avaliações do impacto sobre a saúde humana. Desde o início do século 19, as pesquisas com pequenos animais surgiram também como abordagens mais complexas de testes de segurança [1]. Qualquer novo produto químico nas indústrias farmacêutica, cosmética ou agro, deve gerar e registrar dados sobre sua segurança. Os resultados obtidos são validados por agências reguladoras que determinam a periculosidade desses produtos para a saúde e auxiliam na avaliação dos riscos relacionados à exposição a essas substâncias [2].

Os ensaios em animais vivos (*in vivo*) têm a vantagem da complexidade dos sistemas com centenas de tecidos e todas as reações metabólicas e interações fisiológicas envolvidas após a exposição a algum produto químico - independentemente do custo tecnológico a isso atribuído. Mesmo com tamanha vantagem, ainda assim esses ensaios possuem limitações, como qualquer modelo de estudo. Apesar de a correlação entre as respostas de animais e humanos ser, em geral, considerada de moderada a boa, existem diferenças entre as espécies, o que seria um impedimento na capacidade de se utilizar dados de animais para prever as reações em humanos. Essas capacidades limitadas de respostas podem se apresentar em diferentes bioensaios, exemplo: câncer, toxicidade aguda, irritação ocular, irritação cutânea e toxicidade reprodutiva [1].

A morte inevitável de animais, além das preocupações éticas, iniciou questionamentos sobre o uso de dados de interpretação complexa, devido ao fato de que existiam experimentos que se concentravam nos resultados patológicos e não na base fisiológica inerente dos efeitos adversos – como é o caso, por exemplo, do uso de altas dosagens (altos níveis de exposição) [3] – o que poderia levar a cenários irrealistas de exposição. Rietjens e Alink [3] sugeriram que um melhor modo de contribuir com a avaliação de risco e segurança é definir os efeitos dos produtos químicos nos organismos vivos em níveis de exposição fisiologicamente relevantes, sendo possível, assim, gerar

conhecimento sobre os possíveis efeitos adversos e também benéficos dos produtos químicos.

Os ensaios *in vitro* foram ganhando importância para estimar resultados e fazer uma melhor seleção nas dosagens *in vivo*, como o que é feito em pesquisas que usam animais para a avaliação do potencial toxicológico e/ou carcinogênico de produtos químicos [4, 5]. Os modelos *in vitro* são úteis não apenas para fornecer informação da importância das concentrações a serem usadas, mas também sobre o modo de ação dos produtos químicos [6].

Com os avanços da ciência, as abordagens *in vitro* ganharam importância. Surgiu uma forte necessidade nas ciências cosméticas, farmacológicas e toxicológicas de substituir os testes em animais por métodos alternativos confiáveis, na identificação de perigos à saúde [1, 7]. A toxicologia regulatória considera tais abordagens importantes e úteis, especialmente nas áreas de genotoxicidade e na identificação de perigos na toxicidade tóxica [1]. Os ensaios *in vitro* das aplicações tóxicas tornaram-se mais importantes com o apoio das legislações europeias que baniram o uso de testes de produtos químicos em animais [7]. Os testes de cosméticos em animais foram totalmente proibidos na União Europeia em março de 2013 [8]. Quando se pensa em ensaios *in vitro*, relacionam-se desde culturas convencionais de monocamadas 2D de células (células cultivadas em placas) até modelos com arquiteturas mais complexas em 3D que tentam mimetizar o alvo de estudo.

Para que cada método seja considerado confiável, a abordagem precisa passar pelo processo de validação. Entre as organizações responsáveis por essa tarefa, pode-se mencionar o *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), na União Europeia, e *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM) nos EUA. As diretrizes dos modelos alternativos que estejam validados e aprovados são disponibilizadas pela ISO (International Organization for Standardization), OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) ou ECVAM.

A OECD é uma organização internacional que promove políticas destinadas ao bem-estar econômico e da sociedade, sendo uma das principais instituições reguladoras em nível mundial. Entre suas políticas estão as regulamentações, sendo uma delas a aprovação e padronização de testes científicos, conhecidas como as *test guidelines* (TGs)

da OECD. Essas TGs da OECD são métodos-padrões internacionalmente aceitos para avaliar os efeitos de produtos químicos na saúde humana e no meio ambiente. Atualmente são encontrados aproximadamente 150 métodos de testes acordados internacionalmente, os quais compreendem modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* importantes na avaliação da segurança de produtos químicos [9, 10].

Entre os desafios dos modelos *in vitro*, destaca-se a necessidade de avaliações pré-clínicas de novas plataformas terapêuticas. Modelos preditivos *in vitro* de pele humana são necessários para avaliar eficácia, adsorção e segurança [11]. Embora os sistemas de cultura de células bidimensionais (2D) tenham sido usados principalmente para estudar a morfologia celular e as interações moleculares, bem como a descoberta de drogas e terapia regenerativa, os sistemas de cultura tridimensionais (3D) fornecem uma representação melhor das estruturas complexas, de forma a apresentar morfologia e fisiologia semelhante aos sistemas *in vivo*, como é o caso da pele [12].

1.2 PELE

A pele é um órgão que forma parte do sistema tegumentar [13]. Esse sistema, além da pele, está constituído por anexos como pelo, unhas e glândulas sebáceas. A pele, que é a maior e a mais externa estrutura do corpo, tem diferentes funções, como a função de barreira, que é a principal responsável pela proteção contra danos ambientais externos. Para além disso, a pele também regula a temperatura e umidade do corpo, bem como funções sensoriais [14–18]. Duas seções compõem principalmente a pele: derme e epiderme [19] (Figure 1).

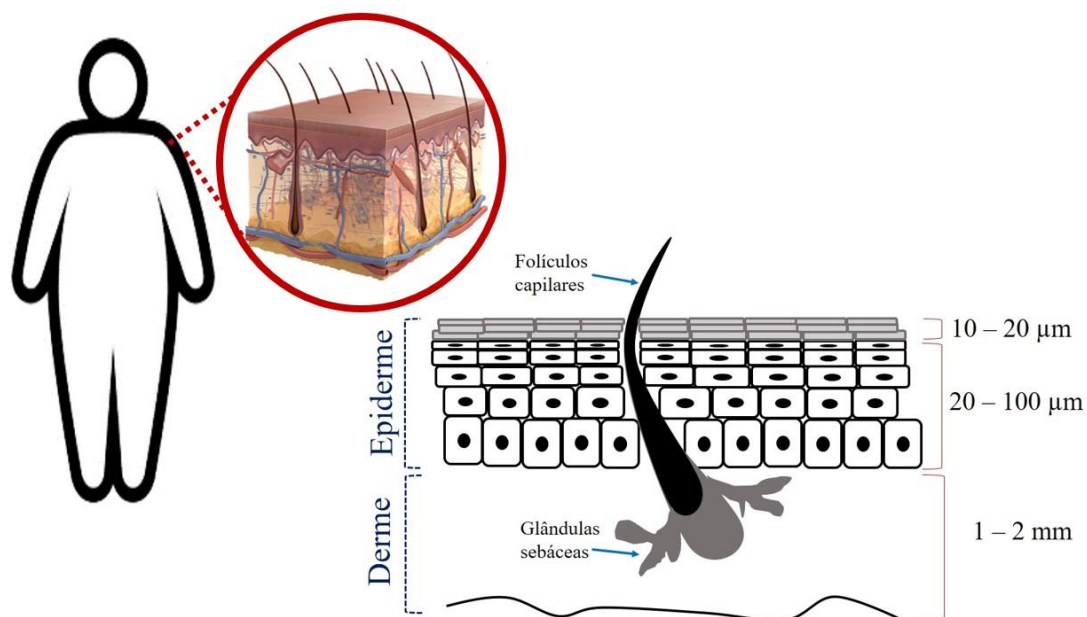


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da pele

1.2.1 Derme

O principal tipo de célula na derme é o fibroblasto. Os fibroblastos são células mesenquimais presentes na maioria dos tecidos, geralmente conhecidas por desempenhar funções importantes no suporte estrutural do mesmo (fibras de colágeno e elastina) e pela capacidade de secretar fatores de crescimento [18, 20, 21]. É relatado na literatura que os fibroblastos podem apresentar heterogeneidade em tamanho, taxa de proliferação, produção de componentes da matriz extracelular, fatores de crescimento e moléculas de adesão [22]. Essas características revelam a heterogeneidade dos fibroblastos, a qual pode ser explicada por suas distintas origens embrionárias - pode ser própria dos diferentes tecidos ou dos diferentes locais do corpo [21]. Os fibroblastos dérmicos estão constituídos pelo menos por duas subpopulações celulares diferentes: fibroblastos papilares e reticulares [22].

A derme da pele humana é rica em fibras de colágeno (principalmente tipo I e III) [23] e possui espessura de 1-2 mm [24], sendo composta pela derme papilar e derme reticular [20] (Figura 2). A derme papilar (camada superior), com alta densidade celular, é uma camada fina (300-400 µm) [22] com fibras finas de colágeno [18]. A derme reticular (camada inferior) apresenta maior espessura do que a derme papilar e encontra-se densamente embalada com colágeno, apresentando, assim, menor densidade celular quando comparada à derme papilar [20, 23].

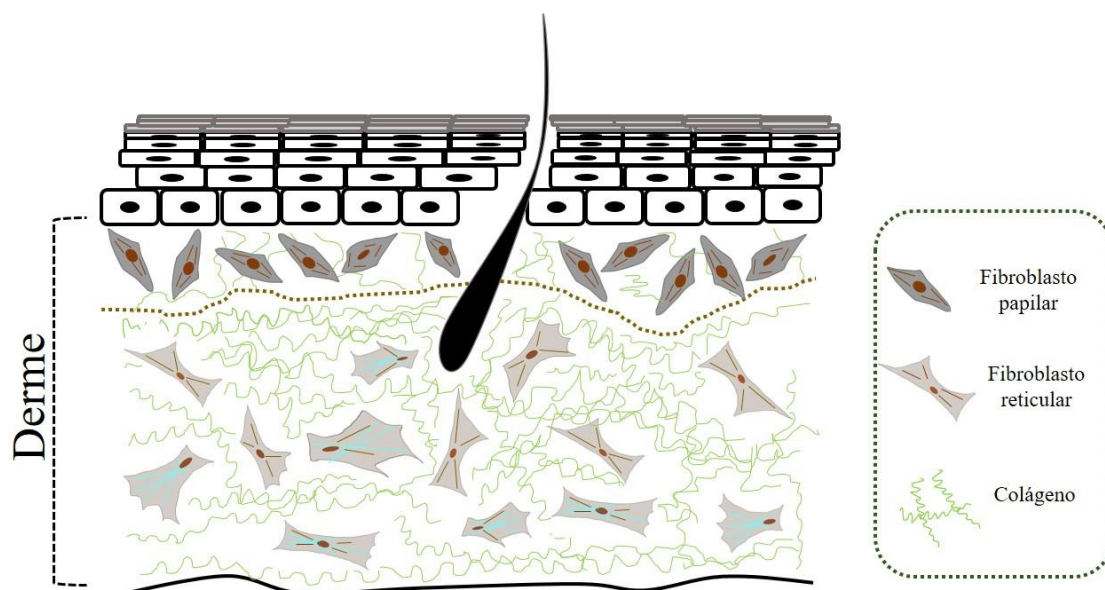


Figura 2 - Representação esquemática de fibroblastos dérmicos normais

1.2.2 Epiderme

A epiderme é a região mais externa da pele, constituída principalmente por queratinócitos estratificados, em proliferação e diferenciação, originando assim quatro camadas distintas [15, 19]. As camadas epidérmicas recebem os nomes de estratos epidérmicos, estes são:

- i. Estrato basal (EB), onde acontece a renovação dos queratinócitos em proliferação;
- ii. Estrato espinhoso (EE), associado ao início do processo de diferenciação celular, normalmente tem 5 a 10 camadas de células de espessura [25];
- iii. Estrato granuloso (EG), no qual acontece a diferenciação terminal dos queratinócitos; aqui, os queratinócitos contém um grande número de grânulos que armazenam lipídios precursores (glicosilceramidas, esfingomiéline e fosfolipídeos), os quais serão processados enzimaticamente para produzir ceramidas e ácidos graxos livres no estrato mais externo da epiderme, este estrato varia em espessura de 1 a 10 camadas [25];
- iv. Estrato córneo (EC), finalmente a geração de pilhas de queratinócitos mortos (corneócitos) com juntas lipídicas (ceramidas e ácidos graxos livres) [15, 26].

Os EB, EE e EG constituem a epiderme viável (espessura: 20-100 μm) [15, 24, 27], o EC que é o produto final do processo de diferenciação é classificado como a parte

inviável da epiderme (espessura 10-20 μm) [15, 24, 27]. O EC pode chegar a ter de 6 até 45 camadas celulares dependendo da região do corpo [28]. Ya-Xian et al. conseguiram determinar o número de camadas de células do estrato córneo na pele normal em diferentes regiões da anatomia do corpo: a pele facial apresenta 9 ± 2 camadas de células, couro cabeludo (12 ± 2), pescoço (10 ± 2), tronco (13 ± 4), genital (6 ± 2), extremidades (15 ± 4), palmas das mãos e solas (47 ± 24) [28].

A geração dos estratos epidérmicos é resultado do processo de maturação dos queratinócitos, que leva em consideração características como a mudança morfológica e bioquímica. No processo, os queratinócitos sintetizam proteínas estruturais e catalíticas que dependem da diferenciação, incluindo as queratinas, involucrina, filagrina e transglutaminase [29] (Figura 3).

As alterações morfológicas dos queratinócitos se relacionam com a composição do citoesqueleto. O citoesqueleto é uma rede proteica que fornece suporte estrutural para a manutenção da forma da célula [30]. Essa rede depende de três tipos principais de conjuntos de proteínas: microfilamentos (constituídos por actinas), microtúbulos (constituídos por tubulinas) e filamentos intermediários (associação específica de subunidades, monômeros de proteína) [30, 31]. A presença de proteínas no citoesqueleto, suas associações específicas, sua posição dentro da célula e os locais de ligação específicos ao longo dos filamentos e microtúbulos, além das possibilidades de polimerização (reversível) em filamentos, são características dinâmicas que permitem que o citoesqueleto se reorganize em resposta a diferentes condições (migração celular, fixação, divisão) [30, 31].

As queratinas epiteliais, também chamadas de citoqueratinas (KRT), são proteínas dos filamentos intermediários do citoesqueleto [32]. As KRT podem ser encontradas com massas moleculares (MW) entre 40 a 70 kDa [33]. Na epiderme saudável, existem quatro tipos principais de KRT com MW de 50, 56.5, 58 e 65-67 kDa [29, 33]. As KRT são categorizadas em pares de acordo com sua co-expressão: (i) Par sintetizado por células basais (MW de 50 kDa/ 58 kDa) e (ii) Par sintetizado por células suprabasais (MW de 56.5 kDa/ 65-67 kDa) [33].

Na proliferação dos queratinócitos basais, são sintetizadas principalmente duas citoqueratinas: KRT5 e KRT14, as quais fazem parte do citoesqueleto das células epiteliais. Alguns queratinócitos do estrato basal migram e se proliferam, originando o

estrato espinhoso, onde após a perda da atividade mitótica são sintetizadas enzimas. Nesse ponto, inicia-se a produção de um novo conjunto de produtos estruturais próprios do processo de cornificação [34]. As KRT expressas pelos queratinócitos suprabasais são KRT1 e KRT10. Essas proteínas são alguns dos primeiros produtos sintetizados no processo de cornificação, substituindo as estruturas formadas pela KRT5 e KRT14 do citoesqueleto. Os queratinócitos expressam outras proteínas em estágios avançados. Esses eventos conseguem promover o rearranjo do citoesqueleto até o colapso dos queratinócitos. Em paralelo, outras proteínas estruturais, incluindo involucrina (IVL) e loricrina (LOR), são sintetizadas e reticuladas por enzimas (transglutaminases) para reforçar o envelope cornificado [34, 35].

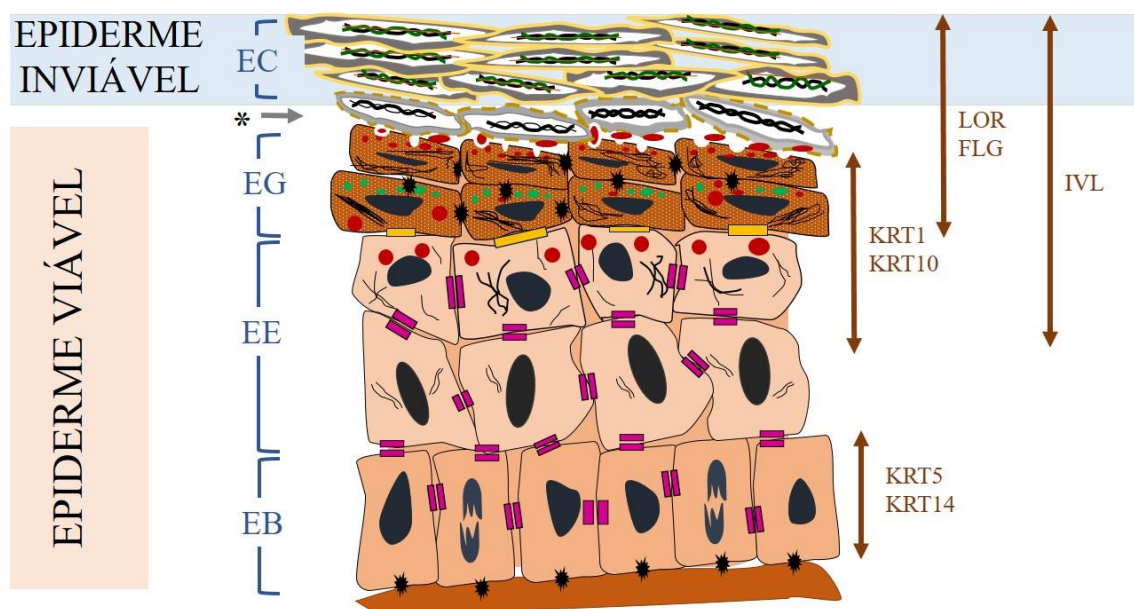


Figura 3 - Diferenciação epidérmica

O principal tipo celular na epiderme é o queratinócito. Os queratinócitos se diferenciam e geram diferentes estágios, conhecidos como estratos (indicados à esquerda). EB: estrato basal, EE: estrato espinhoso, EG: estrato granular, EC: estrato córneo, * transição ES-EC. Os queratinócitos expressam diferentes proteínas no processo de diferenciação (indicados à direita). Citoqueratina 5 (KRT5), citoqueratina 14 (KRT14), citoqueratina 1 (KRT1), citoqueratina 10 (KRT10), involucrina (IVL), filagrina (FLG) e loricrina (LOR).

1.3 PELE *IN VITRO*

A cultura celular na obtenção de pele *in vitro* começou pela procura da obtenção de enxertos para regeneração ou curativos de pele. Green et al. [36], Bell et al. [37], Hefton et al. [38] e Thivolet et al. [39] são alguns dos pesquisadores que promoveram um começo importante para o início da geração de pele *in vitro* [40]. As melhoras na

construção e mimetização celular na obtenção de pele *in vitro* com estruturas mais complexas (3D) foram possíveis pela engenharia de tecidos [41].

Com os conhecimentos obtidos na construção de pele *in vitro* e os ensaios estabelecidos para avaliação de risco, surgiu uma forte necessidade nas ciências cosméticas, farmacológicas e toxicológicas de substituir os testes em animais por métodos alternativos confiáveis, na identificação de perigos à saúde [1, 7], necessidade que se mostrou crescente após a Diretiva 2003/15/CE [42].

Uma dessas alternativas desde então foi promover o desenvolvimento de reconstruções de pele *in vitro* (modelos de pele *in vitro*), as quais se foram aperfeiçoando com uso exclusivo de células humanas a fim de se obter respostas mais fidedignas. Essas construções são chamadas de pele humana reconstruída, pele equivalente, epiderme equivalente ou modelo de pele humana [43]. Esses modelos *in vitro* nas aplicações tópicas tornaram-se mais importantes com o apoio das legislações europeias que baniram o uso de testes de produtos químicos em animais [7]. Como supracitado, os testes de cosméticos em animais foram totalmente proibidos na União Europeia em 2013 [8], enquanto no Brasil essa política é aplicada desde 2019.

1.3.1 Modelo de pele *in vitro*

A obtenção de um modelo de pele *in vitro* envolve diferentes etapas, segundo a escolha da reconstrução de pele que se procura desenvolver. Inicia-se na escolha dos tipos celulares a serem trabalhados (exemplo: células primárias, senescentes, imortalizadas), estabelecimento dos protocolos, reconstrução *in vitro* do tecido, até a caracterização que garanta a obtenção de um produto equivalente à pele.

A reconstrução *in vitro* de pele humana baseia-se no uso de fibroblastos e queratinócitos humanos, como mostrado na Figura 4. Esses modelos de pele *in vitro* podem ser classificados, de forma geral, em dois tipos [44–47]:

- i. Pele de espessura total (FTS – *Full thickness skin*): Consiste em duas camadas, sendo uma primeira camada dérmica composta por fibroblastos humanos embutidos num arcabouço e uma segunda camada composta por queratinócitos cultivados no topo da derme produzida (Figura 4A).

- ii. Epiderme humana reconstruída (RHE – *Reconstructed Human Epidermis*): Contém apenas queratinócitos cultivados diretamente num arcabouço, simulando uma epiderme, com ausência da camada dérmica (Figura 4B).

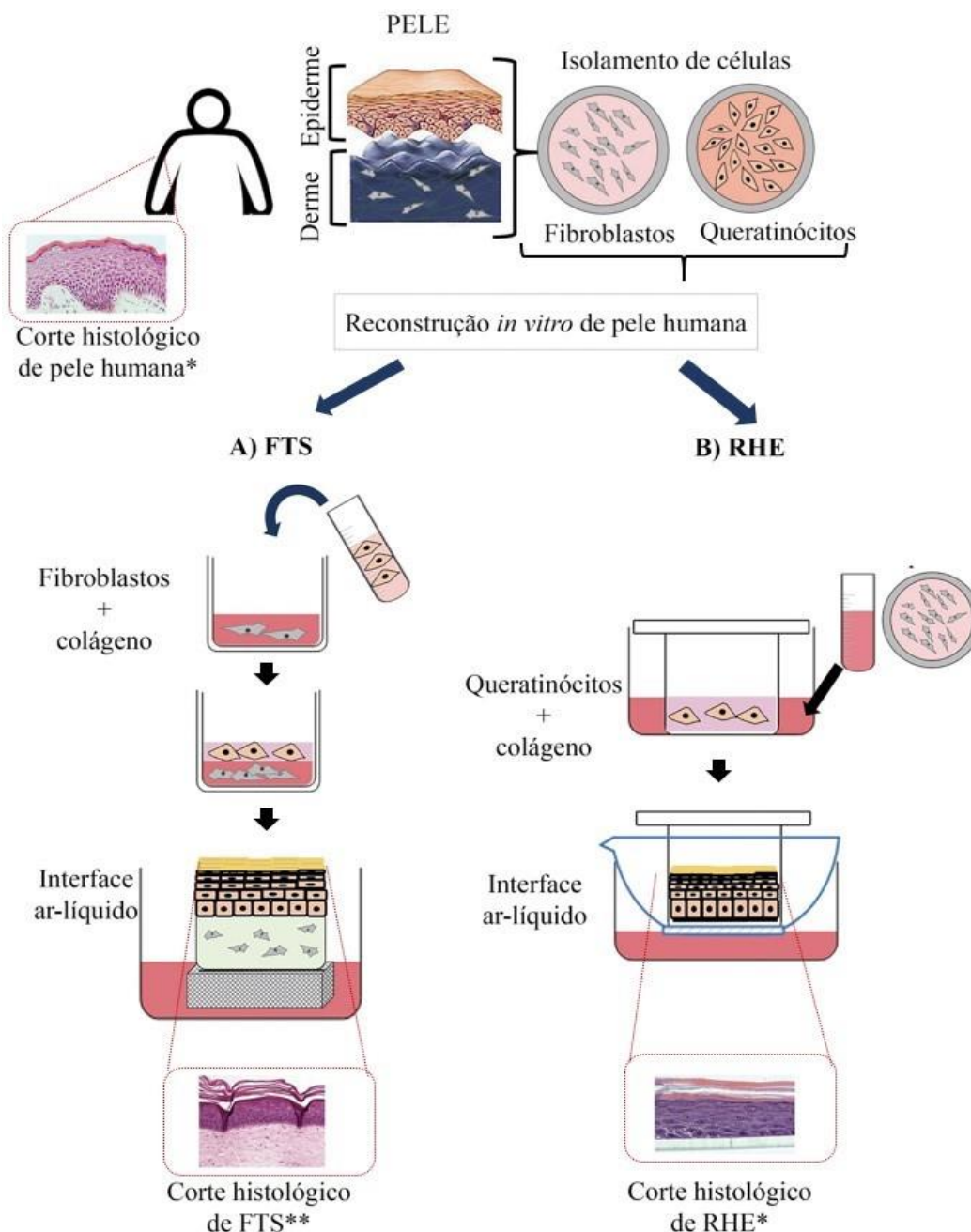


Figura 4 - Reconstrução *in vitro* de pele humana

(A) Pele de espessura total (FTS) - na primeira etapa da reconstrução *in vitro*, é construído o equivalente dérmico, o qual consiste na cultura de fibroblastos num arcabouço (exemplo: colágeno tipo I, muito usado), seguindo-se da sementeira dos queratinócitos. Após 24 horas, toda a estrutura construída é transferida para uma interface ar-líquido, onde é mantida aproximadamente por 2 semanas. (B) Epiderme humana reconstruída (RHE) - preparação das células epidérmicas (queratinócitos) num arcabouço (exemplo: colágeno tipo iv); após 24 horas o sistema é transferido para uma interface ar-líquido, os fibroblastos são mantidos em cultura num sistema separado e coleta-se o meio para suplementar o meio de cultura da construção epidérmica. Aqui são apresentados os cortes histológicos da pele humana, FTS e RHE como comparativo morfológico. Imagens histológicas: *Pedrosa et al. [48], ** Catarino et al. [44].

Dada a heterogeneidade das características celulares, pela diversidade genética dos doadores e as variantes nos protocolos, qualquer modelo de pele reconstruída deve replicar o que é visto na pele. Um modelo deve ser capaz de responder a estímulos que indiquem mudanças equivalentes às testadas na pele [43]. Na Tabela 1, são mostrados os parâmetros para avaliação da qualidade estrutural da pele *in vitro*, assim como os ensaios a serem feitos com os resultados esperados na caracterização.

Tabela 1 - Ferramentas e parâmetros para avaliar a qualidade estrutural das peles reconstruídas [43]

Parâmetro	Ensaio essenciais	Resultado esperado
Morfologia	Histologia (Coloração hematoxilina e eosina ou equivalente)	<p>Para FTS e RHE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Número de camadas de células que se aproximam da epiderme <i>in vivo</i>. - Achatamento de queratinócitos e presença de grânulos de querato-hialina no estrato granuloso. - Múltiplas camadas do estrato córneo ortoceratótico (camada córnea sem núcleos). <p>Adicional para FTS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Núcleos da derme indicando fibroblastos.
Estratificação	Imunohistoquímica/Imunofluorescência	<p>Para FTS e RHE</p> <p>Dois marcadores por estrato indicando a estratificação adequada</p> <p><u>Estrato basal:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Células proliferativas: exemplo Ki67 - Positivo para KRT5 ou KRT14 - Negativo para KRT1 ou KRT10 <p><u>Estratos suprabasais:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Positivo para KRT1 ou KRT10 - Marcadores de diferenciação terminal: exemplo, IVL, LOR, FLG <p>Adicional para FTS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Proteínas da membrana basal

FTS: Pele de espessura total, RHE: Epiderme humana reconstruída, Ki67: proteína produzida em células proliferativas, KRT: citoqueratina, IVL: involucrina, LOR: lorricrina, FLG: filagrina.

Dependendo da pesquisa e do processo a ser avaliado, os modelos podem incluir informações mais especializadas [43].

1.3.2 Aplicabilidade dos modelos de pele *in vitro*

Existe uma diversidade de modelos *in vitro* de pele (FTS e RHE), muitos deles adaptados segundo as necessidades de se demonstrar sua utilidade num método de teste válido. Um método de teste válido é aquele que possui relevância e confiabilidade suficiente para uma determinada finalidade e que se baseia em princípios cientificamente sólidos. É importante saber que um método de teste nunca é válido em um sentido absoluto, mas apenas em relação a um propósito definido [49]. Não obstante, para que um método alternativo *in vitro* seja reconhecido pelos órgãos reguladores, é preciso que seja validado [50]. A validação é o processo pelo qual a confiabilidade e a relevância de uma determinada abordagem, método, procedimento ou avaliação são estabelecidas para um propósito definido [49].

Na Tabela 2, apresentamos uma lista das organizações regionais dedicadas a validações de métodos alternativos [50]. Após estudos de validação que demonstrem a utilidade e a aplicabilidade de um método de teste, este pode ser considerado para adoção por agências reguladoras [49]. Nessa última etapa, o método alternativo e os dados gerados serão revisados por algum órgão regulador (exemplo, OECD) para avaliar se o potencial de previsão é considerado aceitável para os usos propostos; caso o seja, é então possível que esse método seja adotado pela OECD como parte de uma das TGs [9, 49].

Tabela 2 - Lista de organizações de validação de métodos alternativos [50, 51]

Pais	Nome	Acrônimo	Criação
União Europeia	<i>European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing</i>	EURL-ECVAM ou ECVAM	1991
Estados Unidos	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>	ICCVAM	1994
Japão	<i>Japanese Center for the Validation of Alternative Methods</i>	JacVAM	2005
Coréia	<i>Korean Center for the Validation of Alternative Methods</i>	KocVAM	2009
Brasil	<i>Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods</i>	BraCVAM	2013

Vários métodos alternativos de testes *in vitro* foram desenvolvidos com base nos modelos de pele FTS e RHE para avaliar diferentes desfechos toxicológicos (corrosão/irritação cutânea, penetração na pele, fototoxicidade, genotoxicidade, sensibilização, etc.) [50], entendimento dos mecanismos funcionais na avaliação de

liberação de drogas por via transdérmica [52], ou para avaliação de fotodano e fotoproteção [45]. Entre os diferentes interesses de estudo, é importante mencionar a existência de modelos de pele com doenças (psoríase, melanoma, microrganismos patogênicos, vírus) ou lesões mecânicas, com a finalidade de elucidar os processos complexos envolvidos e melhorar as terapias [47].

Na atualidade, existem muitos modelos de pele *in vitro* disponíveis comercialmente, para análise de risco (exemplo: EpiSkinTM, EpiDermTMSCT, SkinEthicTMRHE, epiCS®, LabCyte EPIMODEL24 etc.) [47]. Esses modelos demonstraram alta similaridade morfológica com a pele humana, assim como detecção das proteínas relevantes no processo de diferenciação [11]. Pelas características de qualidade dos modelos comerciais, muitos são utilizados para diferentes ensaios. Existem apenas duas diretrizes da OECD direcionadas para testes alternativos em modelos *in vitro* de pele (corrosão/ irritação) [53, 54] (Tabela 3).

Tabela 3 - Modelos comerciais de pele *in vitro* (FTS e RHE)

Produto / Fabricante	Células	Derme	Método de teste (Diretrizes)	Referência
EpiSkin™ (SM) / SkinEthic, França- L'Oréal	Queratinócitos	Não	Corrosão (OECD TG 431) Irritação (OECD TG 439) Exposição UV Dano de DNA Adesão bacteriana Permeabilidade	[47, 53–58]
SkinEthic™RHE / SkinEthic, França- L'Oréal	Queratinócitos	Não	Corrosão (OECD TG 431) Irritação (OECD TG 439) Exposição UV Dano de DNA Adesão bacteriana Permeabilidade	[11, 53–55, 58]
EpiDerm™SCT / MatTek Corp., EUA	Queratinócitos	Não	Corrosão (OECD TG 431) Irritação (OECD TG 439) Fototoxicidade Genotoxicidade	[11, 47, 53–55, 59]
epiCS® /Phenion®, Henkel, Alemanha	Queratinócitos	Não	Corrosão (OECD TG 431) Irritação (OECD TG 439)	[11, 47, 53–55, 60]
LabCyte EPI- MODEL24 / J-TEC, Japão	Queratinócitos	Não	Corrosão (OECD TG 431) Irritação (OECD TG 439)	[11, 47, 53, 54, 61]
Skin+® /SterLab, França	Queratinócitos	Não	Irritação (OECD TG 439)	[54, 62]
EpiDerm-FT™ / MatTek Corp., EUA	Queratinócitos	Sim	Antienvhecimento Cicatrização de feridas Hidratação da pele Proteção UV	[47, 56, 59]
T-Skin™ / SkinEthic, França	Queratinócitos Fibroblastos	Sim	Exposição UV Danos de DNA Permeabilidade	[58]
Phenion® FT / Henkel, Alemanha	Queratinócitos Fibroblastos	Sim	Toxicologia Irradiação UV e IR Permeabilidade	[47, 56, 60]
Psoriasis / MatTek Corp., EUA	Queratinócitos Fibroblastos psoriáticos	Sim	Triagem de drogas antipsoríase Pesquisa de doença de psoríase	[56, 59]
Melanoma / MatTek Corp., EUA	Melanoma humano Queratinócitos Fibroblastos	Sim	Invasão tumoral e triagem de drogas antimelanoma.	[56, 59]

No Brasil, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) emitiu uma resolução (Resolução normativa N°17, de 3 de julho de 2014)

que dispôs o reconhecimento de métodos alternativos validados que tenham por finalidade a redução, substituição ou o refinamento do uso de animais em atividades de pesquisa [63]. Os métodos alternativos reconhecidos são os validados internacionalmente e publicados pela OECD. Em 2014, o CONCEA reconheceu 17 métodos alternativos agrupados nos 7 desfechos [64] e, em 2016, reconheceu 7 métodos alternativos adicionais que foram agrupados em 4 desfechos [65]. Dessa forma, os artigos N°4 e 5 de ambas as resoluções (Resolução normativa N°18, de 24 de setembro de 2014 e a N° 31, de 18 de agosto de 2016) entraram em vigor em 2019 e 2021, respectivamente. Nessa lista de métodos alternativos, estão os ensaios de corrosão e irritação usando modelos de pele *in vitro*.

1.3.3 Corrosão e irritação cutânea

Uma substância química ou a mistura de duas ou mais podem ser associadas a diferentes riscos pelas propriedades intrínsecas de gerar um efeito nocivo específico. No caso de exposição à pele, esses efeitos nocivos podem causar corrosão ou irritação [66]. Em termos regulatórios, a corrosão cutânea se refere a produção de danos irreversíveis na pele manifestada como necrose, enquanto a irritação cutânea refere-se à produção de danos reversíveis na pele após exposição a algum material [53, 54, 67].

Segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals* - GHS) definido por *United Nations* (UN), as substâncias se classificam em 3 categorias, conforme apresentado na Tabela 4. A categoria 1 (corrosão cutânea) pode ser dividida em três subcategorias (1A, 1B e 1C), quando alguma instituição exigir. Categoria 2 corresponde à irritação cutânea. Categoria 3 corresponde à irritação cutânea leve. Dito isso, o GHS considera uma substância corrosiva para a pele quando esta gera destruição nos tecidos cutâneos, ou seja, uma necrose visível através da epiderme até a derme, em animais submetidos a até 4 horas de exposição. Uma substância é irritante para a pele quando produz lesões reversíveis na pele, como consequência da aplicação por um tempo de até 4 horas.

Tabela 4 - Categorias de danos na pele, por corrosão ou irritação, segundo a GHS da UN [67]

Categorias	Características	Corrosivo em ≥ 1 de 3 animais		
		Subcategorias	Exposição	Observação
Categoria 1	Corrosivo	1A	$t \leq 3$ min	≤ 1 h
		1B	$3 \text{ min} < t \leq 1\text{h}$	≤ 14 dias
		1C	$1\text{h} < t \leq 4\text{h}$	≤ 14 dias
Categoria 2	Irritante			
Categoria 3*	Irritante moderado			

* Reconhecido ou exigido segundo a instituição. Sob a diretriz da TG431 da OECD, a categoria 3 é considerada como não categorizada, ou seja não irritante.

Essa classificação construída com os dados de ensaios normalizados com animais responde a dados fornecidos pela diretriz TG 404 da OECD, ensaio validado e aceito internacionalmente na classificação de uma substância corrosiva ou irritante para a pele. A avaliação do potencial irritante ou corrosivo na pele tem feito uso de animais há muitos anos. Esse tipo de ensaio possui uma versão atualizada e usa um máximo de três animais [68]. No entanto, na atualidade, existem os métodos alternativos que tentam substituir os testes em animais, sendo que dois deles fazem uso de modelos de pele reconstruída (Tabela 5).

Tabela 5 - Métodos alternativos de irritação/corrosão da pele, aceitos pelo CONCEA¹, que entraram em vigor em 2019

Método <i>in vivo</i>	Método alternativo
OECD TG 404	OECD TG 430 Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Método de teste de resistência elétrica transcutânea (TER)
	OECD TG 431 Corrosão cutânea <i>in vitro</i> : Método de teste de epiderme humana reconstruída (RHE)
	OECD TG 435 Método de Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i> para corrosão da pele
	OECD TG 439 Irritação cutânea <i>in vitro</i> : Método de teste de epiderme humana reconstruída

¹ Principal informação relatada no artigo N° 14 da resolução 18 de 2014 da CONCEA [64]. Informação complementada com o relatado nas TGs da OECD [53, 54, 69, 70]

OECD TG 431 é o método alternativo para avaliar o potencial de corrosão de produtos químicos na pele. Essa diretriz fornece um procedimento *in vitro* que permite a identificação de produtos corrosivos ou não, de acordo com a GHS da UN [53]. Essa guia (TG 431) aborda o ponto final da corrosão da pele, usando o modelo de RHE, obtido a partir de células humanas.

Na aplicação química, segundo a TG 431, devem ser utilizadas pelo menos duas réplicas de tecido para cada produto químico a ser avaliado. Na Tabela 6, é apresentada a proporção de produtos químicos líquidos e sólidos a serem usados na aplicação tópica, a qual será chamada de “tratamento”. A quantidade de produto aplicada no tratamento deve cobrir uniformemente a superfície da epiderme, evitando o uso em excesso.

Tabela 6 - Dosagens de produtos químicos para o ensaio de corrosão cutânea em modelos RHE

Replicas	Produtos químicos					
	Líquidos			Sólidos		
≥ 2	≥ 70 µL/ cm ²			≥ 30 mg/cm ²		
	Suficiente para cobrir homogeneamente			Suficiente para cobrir homogeneamente		
	<u>Exemplo</u>			<u>Exemplo</u>		
	φ (mm)	A (cm ²)	v (µL) *	φ (mm)	A (cm ²)	w (mg)*
	6.5	0.33	≥ 23,1	6.5	0.33	≥ 9,9
	12	1.12	≥ 78,4	12	1.12	≥ 33,6
	24	4.67	≥ 326,9	24	4.67	≥ 140,1

Adaptado de TG 431 [53].

φ: diâmetro, A: área, v: volume.

No fluxograma da Figura 5, descrevemos de forma geral a aplicação do teste químico segundo a TG 431. Após aplicação do produto químico em estudo, a viabilidade celular do modelo RHE é avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), como sugerido pela OECD [53]. O ensaio MTT mede a capacidade que as células metabolicamente ativas possuem para reduzir o MTT a (e,z)-5-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-1,3-difenil-formazan (formazan) [71].

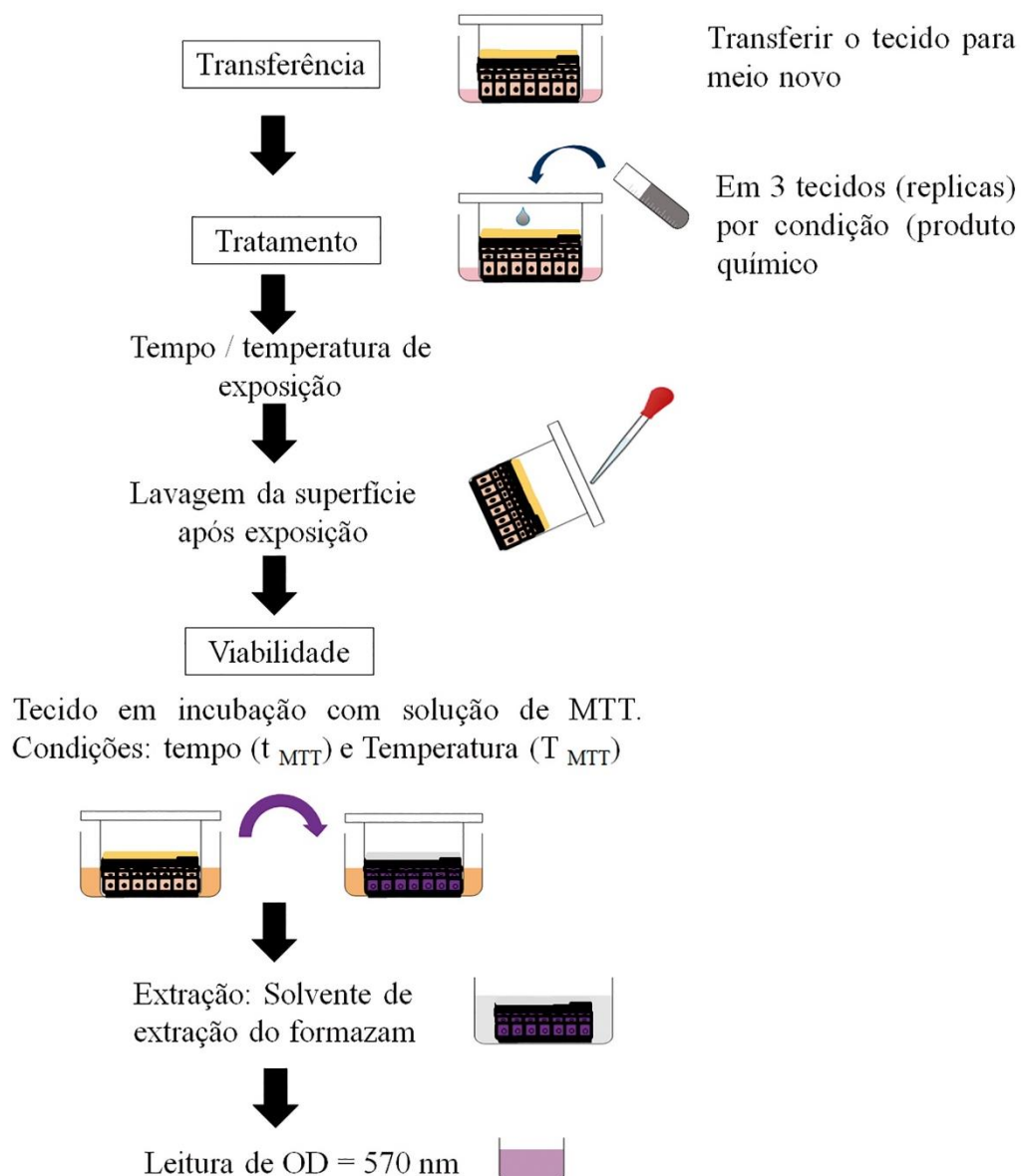


Figura 5 - Fluxograma do protocolo geral de corrosão cutânea
 t_{MTT} : tempo de incubação do MTT; T_{MTT} : temperatura de incubação do MTT.

Dependendo do modelo RHE estabelecido, é adaptado o método para o teste de corrosão, porém podem ser encontradas algumas ligeiras diferenças experimentais, como na Tabela 7, que apresenta os cinco métodos de teste em RHE comerciais (EpiSkinTM SM, EpiDermTM SCT, Skin EthicTM RHE, epiCS®, LabCyte EPI-MODEL24 SCT) validados e incluídos na TG 431.

Tabela 7 - Principais componentes do método de corrosão em modelos validados

	EpiSkin™ [53, 72]	EpiDerm™SCT [53, 73]	SkinEthic™RHE [53, 72]	epiCS® [53, 74]	LabCyte [53, 75]
A	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,6 cm ²	0,3 cm ²
Tratamento: Aplicação química (L ou SS ou S ou C/P ou C)					
CN	50 µL NaCl _{aq} ^a	50 µL H ₂ O	40 µL H ₂ O	50 µL H ₂ O	50 µL H ₂ O
CP	50 µL CH ₃ COOH	50 µL KOH _{aq} ^b	40 µL KOH _{aq} ^b	50 µL KOH _{aq} ^b	50 µL KOH _{aq} ^b
L	50 ± 3 µL * (131,6 µL/cm ²)	50 µL ^c (79,4 µL/cm ²)	40 ± 3 µL ^{*,d} (80 µL/cm ²)	50 µL ^{*,d} (83,3 µL/cm ²)	50 µL * (166,7 µL/cm ²)
SS	--	50 µL (79,4 µL/cm ²)	--	50 µL (83,3 µL/cm ²)	--
S	20 ± 2 mg (52,6 mg/cm ²) e 100 µL NaCl _{aq} ^a	25 µL H ₂ O e 25 mg (39,7 mg/cm ²)	20 ± 2 µL H ₂ O e 20 ± 3 mg (40 mg/cm ²)	25 mg (41,7 mg/cm ²) e 25 µL H ₂ O	50 ± 2 mg (166,7 mg/cm ²) e 50 µL H ₂ O
C/P	50 ± 2 mg (131,6 mg/cm ²) ^d	C: 8 mm ** e 15 µL H ₂ O	20 ± 3 mg (40 mg/cm ²) ^d	8 mm ** e 15 µL H ₂ O	--
Tempo / temperatura de exposição					
	3 min, 60 min e 240 min / RT	3 min / RT 60 min / Inc	3 min / RT 60 min / Inc	3 min / RT 60 min / Inc	3 min / RT 60 min / Inc
Enxaguar: Lavagem após exposição					
	25 mL de 1x PBS (~2mL por enxágue)	1x PBS 20 vezes com fluxo suave	1x PBS 20 vezes com fluxo suave	1x PBS 20 vezes com fluxo suave	1x PBS 10 vezes com fluxo suave
Viabilidade: Ensaio de MTT					
MTT	2 mL (0,3 mg/mL)	300 µL (1 mg/mL)	300 µL (1 mg/mL)	300 µL (1 mg/mL)	500 µL (0,5 mg/mL)
t _{MTT}	180 min	180 min	180 min	180 min	180 min
T _{MTT}	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
Extração: Solvente de extração do formazam					
	Isopropanol acidificado	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol
	500 µL Tecido ⁱ	2 mL Tecido ⁱⁱ	1,5 mL Tecido ⁱⁱ	2 mL Tecido ⁱⁱ	300 µL Tecido ⁱ
t - T	<i>Overnight</i> -RT protegido da luz	<i>Overnight</i> -RT ^{sg} ou 120 min-RT ^{cg}	<i>Overnight</i> -RT ^{sg} ou 120 min-RT ^{cg}	<i>Overnight</i> -RT ^{sg} ou 120 min- RT ^{cg}	<i>Overnight</i> -RT protegido da luz
Leitura de OD = 570 nm					

A: área da superfície superior; CN: controle negativo; CP: controle positivo; L: líquido; SS: semi sólido; S: sólido; C/P: ceroso/pegajoso; t_{MTT}: tempo de incubação do MTT; T_{MTT}: temperatura de incubação do MTT; t - T: tempo e temperatura de extração; * ou viscoso; a NaCl aq (9 g/L); b KOH aq (8 N); c com e sem malha de náilon, para cobrir a superfície superior após aplicação química; d usar malha de náilon, para cobrir a superfície superior após aplicação química; **: aplicação homogeneizada na superfície; RT: fluxo ventilado, 18-28 °C; Inc: 37 °C, 5% CO₂, 95% humidade relativa; i: isolado totalmente imerso; ii: sem retirar da inserção, solvente na parte superior e inferior; sg: sem agitação; cg: com agitação; OD: densidade óptica.

Os critérios de aceitabilidade de cada um dos métodos descritos acima (Tabela 7) são apresentados na guia TG 431, na qual são levados em consideração 3 pontos [53]:

- i. A densidade óptica (OD) média do tecido tratado com o controle negativo está sempre num intervalo, próprio da resposta ao ensaio em cada modelo RHE;
- ii. A viabilidade média que se espera após o tempo de tratamento com o controle positivo quando comparado com o controle negativo, a qual será chamada mais a frente como viabilidade relativa (VR), apresenta um limite superior;
- iii. Valor máximo de variação entre VRs de réplicas.

O guia de teste (TG 439) fornecido pela OECD na identificação de perigo de produtos químicos irritantes aborda o ponto final de irritação da pele. Esse guia baseia-se no teste sobre uma construção *in vitro* que mimetiza melhor as propriedades bioquímicas e fisiológicas das partes superiores da pele humana (a epiderme), ou seja, sobre as construções de RHE. A TG 439 foi atualizada em 2019, quando incluíram dois métodos de teste usando os modelos RHE (epiCS[®] e Skin+[®]) [54].

Segundo o descrito nas diretrizes da TG 439 da OECD na aplicação do teste químico, devem ser utilizadas pelo menos três réplicas para cada produto químico e para os controles, por cada experimento independente. A quantidade do produto químico a ser aplicada sobre a superfície epidérmica deve ser suficiente para cobrir uniformemente toda a superfície, evitando o uso de dose em excesso. Na Tabela 8, são apresentados os intervalos sugeridos da dosagem para produtos líquidos e sólidos. Adicionalmente mostramos exemplos para serem entendidas as quantidades por unidade de área, supondo que os modelos epidérmicos desenvolvidos possuam superfícies circulares.

Tabela 8 - Dosagens de produtos químicos para ensaio de irritação cutânea em modelos RHE

Replicas	Produtos químicos	
	Líquidos	Sólidos
≥ 3	$26 \mu\text{L}/\text{cm}^2 \leq v/A \leq 83 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ Suficiente para cobrir homogeneamente	$26 \text{mg}/\text{cm}^2 \leq w/A \leq 83 \text{mg}/\text{cm}^2$ Suficiente para cobrir homogeneamente
<u>Exemplo</u>		
	ϕ (mm)*	A (cm ²) v (μL) ou w (mg)
	6.5	0.33 $8,6 \leq v$ ou $w \leq 27,4$
	12	1.12 $29,1 \leq v$ ou $w \leq 93$
	24	4.67 $121,4 \leq v$ ou $w \leq 387,6$

Adaptado de TG 439 [54]

v: volume; A:área; w: massa; ϕ : diâmetro; * supondo que a construção *in vitro* possui superfície superior circular.

Após aplicação do produto químico em estudo, é importante obter resultados da viabilidade celular dos modelos RHE. Mas é essencial que a medição da viabilidade não seja realizada imediatamente após a exposição à substância química, visto que os modelos precisam de um tempo de incubação pós-tratamento. Esse tempo permite a recuperação de efeitos citotóxicos fracos. 42 horas de incubação pós-tratamento é considerado o tempo de recuperação ideal [54].

Na Figura 6, mostramos um fluxograma que descreve de forma geral cada etapa da aplicação do teste químico sobre uma RHE. Após o tempo incubação para gerar o RHE, o tecido é transferido para um meio novo, onde começa o tratamento. Deve-se salientar que o termo “tratamento” fará referência à aplicação tópica de algum produto químico sobre a superfície superior do RHE, da qual se espera algum efeito de dano ou não ao tecido. Após o tratamento, incubação e lavagem do tecido, o teste químico é finalizado com a determinação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT.

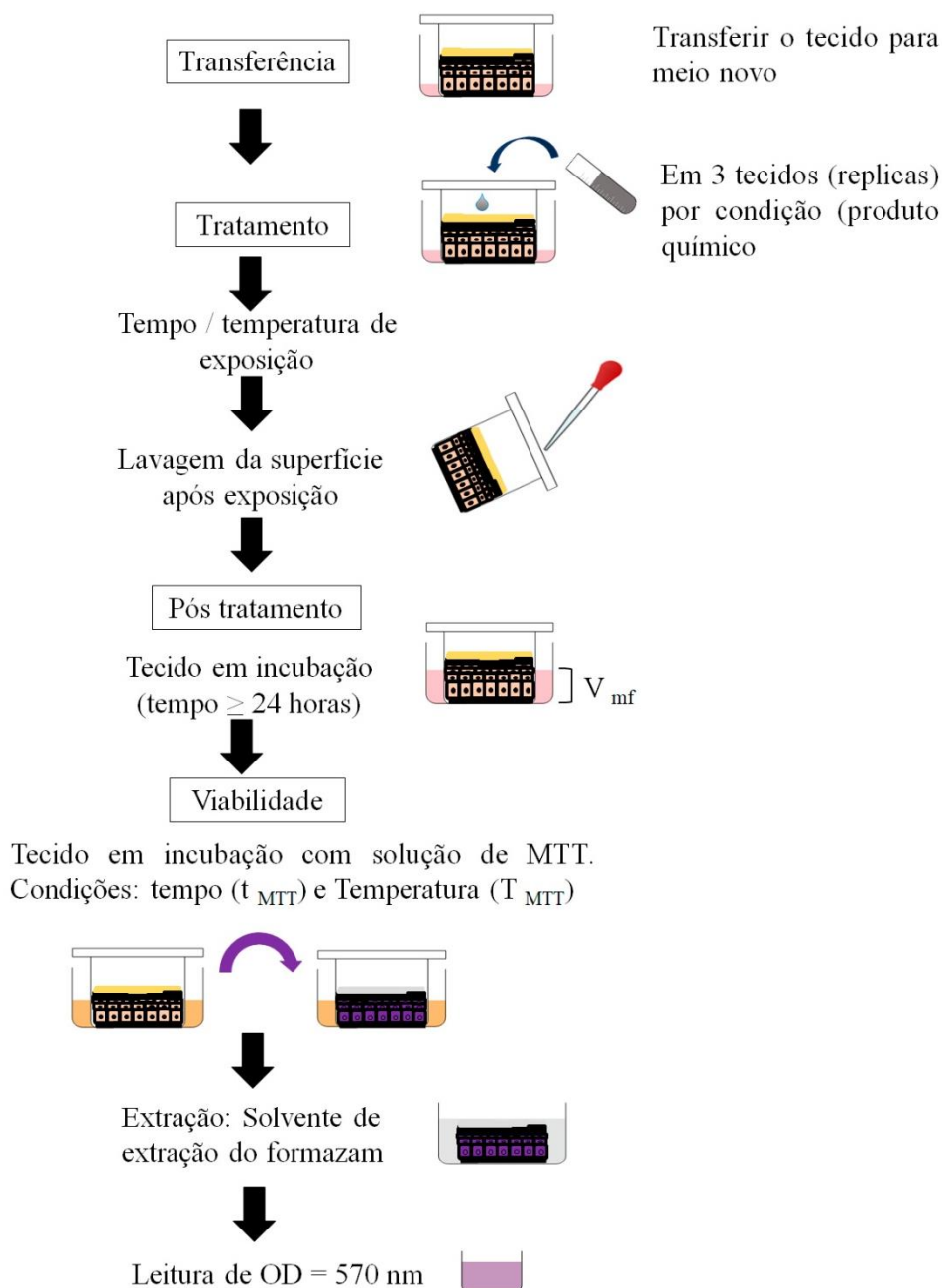


Figura 6 - Fluxograma do ensaio de irritação cutânea em modelo de pele in vitro.

V_{mf} : meio fresco; t_{MTT} : tempo de incubação do MTT; T_{MTT} : temperatura de incubação do MTT; OD: densidade óptica.

Dependendo do modelo de RHE, o protocolo é ajustado. Porém é relatado que, dependendo dos métodos de teste RHE usados, o período e as condições podem variar, como mostrados na Tabela 9.

Entre as substâncias a serem aplicadas na RHE, é importante o uso do controle negativo e positivo como comparativos e referências, para sabermos se os tecidos respondem dentro da faixa de aceitação. É importante mencionar isso, visto que os usuários do modelo RHE devem garantir que cada lote usado atenda aos critérios de controle negativo. Existe o que se chama de faixa de aceitabilidade (limite superior e inferior) para os valores de OD do controle negativo, e cada modelo responderá a esse intervalo. Os modelos comerciais validados e que estão dentro da diretriz de irritação cutânea, em geral, possuem OD de controle negativo no ensaio MTT $\geq 0,6$ (limite de aceitação inferior). As substâncias químicas sugeridas como controle negativo são água ou PBS. O controle positivo sugerido é o dodecil sulfato de sódio (SDS) aquoso a 5 %, o qual deve refletir sua capacidade como produto que gera irritação cutânea.

Na TG de irritação cutânea, estão incluídos os parâmetros do protocolo, adaptados para cada um dos métodos de teste de modelos comerciais (EpiSkinTM SM, EpiDermTM SIT EPI-200, SkinEthic RHETM, LabCyte EPI-MODEL 24 SIT, epiCS®, Skin+®) (Tabela 9).

Tabela 9 - Parâmetros do protocolo adaptados para RHE comerciais, com métodos validados e reconhecidos pela OECD, para ensaio de irritação cutânea *in vitro*

	EpiSkin™(SM) [48, 54, 76]	EpiDerm™ SIT (EPI200) [54, 77]	SkinEthic RHE™ [48, 54, 76]	LabCyte EPIModel24-SIT [48, 54, 78]	epiSC® [54, 79]	Skin+® [54, 62]
A	0,38 cm ²	0,63 cm ²	0,5 cm ²	0,3 cm ²	0,6 cm ²	0,5 cm ²
Tratamento: Aplicação química (L ou S)						
CN	PBS	DPBS	PBS	AD	DPBS	PBS
CP	SDS 5%	SDS 5%	SDS 5%	SDS 5%	SDS 5%	SDS 5%
L	10µL (26 µL/cm ²)	30 µL (47 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)	25 µL (83 µL/cm ²)	30 µL (50 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)
S	10 mg (26 mg/cm ²)	25 mg* (47 mg/cm ²)	16 mg (32 mg/cm ²)	25 mg (83 mg/cm ²)	30 µL (50 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)
	+	+	+	+	+	+
ME	AD (5 µL) Não	DPBS (25 µL) Depende	AD (10 µL) Sim	AD (25 µL) Não	DPBS (50 µL) Sim	AD (10 µL) Sim
Tempo / temperatura de exposição						
	15 min/ RT	1° 25 min/RT; 2° 35 min/ Inc 60 min total	42 min/ RT	15 min/ RT	20 min/ RT	20 min/ RT
Enxaguar: Lavagem após exposição						
	PBS	DPBS	PBS	PBS	DPBS	PBS
Pós tratamento: Incubação (37 °C)						
	42 ± 1h	24 ± 2h e 18 ± 2h	42 ± 1h	42 ± 1h	24 ± 2h 18 ± 2h	42 ± 1h
<i>v_{mf}</i>	2 mL	0,9 mL x 2	2 mL	1 mL	1 mL	2 mL
Viabilidade: Ensaio de MTT						
MTT	-- (0,3 mg/mL)	600 µL (1 mg/mL)	300 µL (1 mg/mL)	500 µL (0,5 mg/mL)	300 µL (1 mg/mL)	300 µL (0,5 mg/mL)
<i>t_{MTT}</i>	3h ± 5 min	3h ± 5 min	3h ± 5 min	3h ± 5 min	3h ± 5 min	3h ± 5 min
<i>T_{MTT}</i>	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc	Inc
Extração: Solvente de extração do formazam						
	Isopropanol acidulado 500 µL; 4h ou <i>Overnight</i> 5 °C	Isopropanol 2 mL; 2h (20-22 °C)	Isopropanol 1,5 µL; 2h (20-22 °C)	Isopropanol 300 µL (<i>Overnight</i>)	Isopropanol 2 mL; 2 ± 0,5 h 4-8 °C	Isopropanol 800 µL-3h/ 700 µL-2h 20-22 °C
Leitura de OD = 570 nm						

A: área da superfície superior; CN: controle negativo; CP: controle positivo; L: líquido; S: sólido; ME: uso de malha estéril na aplicação do reagente; DPBS: Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco; *t_{MTT}*: tempo de incubação do MTT; *T_{MTT}*: temperatura de incubação do MTT; RT: fluxo ventilado, 18-28 °C; Inc: 37 °C, 5% CO₂, 95% humidade relativa; *Quantidade medida com colher calibrada; AD: água destilada; *v_{mf}*: volume do meio novo; OD: densidade óptica.

1.4 BIOMATERIAIS E ARCABOUÇOS

Os modelos tridimensionais de pele humana reconstruída mencionados anteriormente, assim como outras construções de cultura celular, são o resultado da engenharia de tecidos. Essa ciência surgiu como um novo conceito que estuda a produção de tecidos a partir de células e materiais de fonte natural e/ou sintéticas [47, 80]. A engenharia de tecido atende aos pontos de construção *in vitro* de tecido bioartificial e as modificações *in vivo* do crescimento e função celular. Os tecidos ou órgãos obtidos não só fornecem soluções clínicas, como também podem ser usados como “modelos” para estudar interações célula-célula ou célula-tecido, migrações celulares, toxicidade de substâncias químicas e outros mecanismos biológicos [80].

A resposta biológica entre as células e o arcabouço, além de ser controlada pelas propriedades do material, irá depender das características morfológicas do arcabouço, podendo influenciar no processo de adesão, proliferação e ativação celular. Dependendo da tecnologia e do processo de fabricação, podem ser obtidos arcabouços com diferentes arquiteturas, com distribuição aleatória ou sob medida dos poros [81].

Na Figura 7, é apresentada uma visão geral de algumas arquiteturas - a serem obtidas por diferentes técnicas sobre diferentes materiais - usadas na engenharia de tecidos em construções de arcabouços. Para que uma construção seja considerada arcabouço, deve apresentar biocompatibilidade, demonstrando ser um ambiente propício para que as células se adiram, migrem, proliferem e desenvolvam suas funções metabólicas [82]. A composição dos arcabouços é variada, pois eles podem ser produzidos a partir de materiais naturais ou sintéticos, com diferentes características de biodegradabilidade [83].

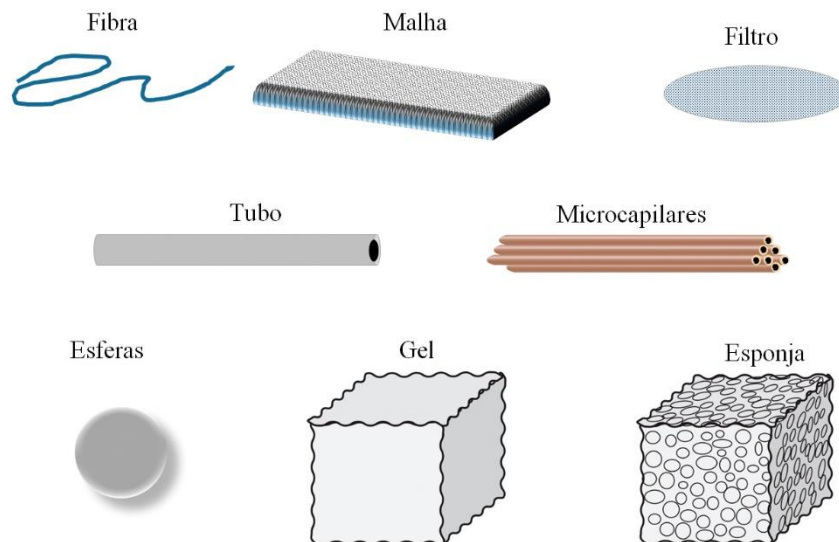


Figura 7 - Geometrias de arcabouços

Adaptado de Freshney [83]

Das muitas geometrias existentes, construídas por diferentes técnicas com diferentes materiais, exemplo: raíom, náilon, vidro, colágeno, silicone, policarbonato, nitrato de celulose, acetato de celulose, cerâmica, poli (ácido glicólico), poli (ácido láctico).

Reforçando o que foi comentado anteriormente, podemos adicionar que a engenharia de tecidos deve relacionar dois pontos iniciais: o material adequado e a técnica de fabricação. Entre os materiais, existem muitas possibilidades, como polímeros, cerâmicas e metais, os quais foram e são muito estudados como arcabouços [84]. Assim como a escolha dos materiais, a escolha da técnica de fabricação possui um papel importante na determinação das propriedades do arcabouço para sua aplicação de destino. Existem diferentes técnicas, entre elas podemos mencionar a chamada de *solvent casting* com lixiviação de partículas, moldagem por fusão, por geração de espuma de gás, por separação de fase induzida termicamente, prototipagem rápida, eletrofiação, impressão tridimensional em leito de pó, modelagem de deposição fundida, etc. [85–88].

Na engenharia de tecidos, modelos *in vitro* disponíveis no mercado, podem ser encontrados a partir de peles construídas sobre hidrogéis de colágeno ou membranas de policarbonato, na Tabela 10 mencionamos alguns exemplos. Os biomateriais usados como matriz presente nos arcabouços são de origem natural e sintética. O colágeno é muito usado em aplicações de engenharia de tecidos tanto *in vivo* como *in vitro*, por ser reabsorvível, e geralmente é de origem bovina ou suína. Os polímeros sintéticos são usados amplamente na fabricação de dispositivos médicos, como suprimentos

descartáveis, implantes, sistemas de distribuição de medicamentos e estruturas de engenharia de tecidos [89].

Tabela 10 - Composição de arcabouços de alguns modelos comerciais de pele *in vitro*

Modelo	Características do arcabouço	Referência
EpiSkin™ (SM)	Hidrogel de colágeno tipo I, III e filme de colágeno IV	[55, 90]
SkinEthic™RHE	Filtros de policarbonato	[91, 92]
EpiDerm™ (EPI-200)	Membranas de policarbonato	[55, 93]
epiCS®	Membranas de policarbonato	[47, 55, 74]
EpiDerm-FT™	Colágeno em membrana de policarbonato	[94]
T-Skin™	Colágeno tipo I	[95]
Phenion® FT	Colágeno	[47]

Os polímeros, como biomateriais, possuem a vantagem da capacidade de fabricação de peças de diferentes formatos e tamanhos, em comparação com metais e cerâmicas. Os biomateriais poliméricos não-biodegradáveis que são usados comumente não são destinados originalmente para uso biomédico [89].

Neste trabalho, escolhemos trabalhar com polímeros sintéticos não-biodegradáveis, uma vez que com o uso de polímeros sintéticos, não há possibilidade de transmissão patogênica ou resposta imune [96]. Por outro lado, a produção de arcabouços para engenharia de tecidos não é restrita para polímeros não-biodegradáveis [97]. E como procuramos produzir arcabouços com a porosidade suficiente para nossa construção *in vitro*, escolhemos a técnica de fabricação da eletrofiação.

1.5 ELETROFIAÇÃO

A eletrofiação é uma técnica amplamente usada, versátil e industrialmente viável. Trata-se de uma maneira barata a partir da qual podem ser produzidas fibras contínuas ultrafinas com diâmetros em escala de dezenas de micrômetros até centenas de nanômetros [98–101].

O processo de fiação usa forças eletrostáticas para produzir as fibras a partir de soluções poliméricas condutoras (ou fundidos). Para se chegar a essa construção, são indispensáveis uma fonte de alta tensão para criar um campo elétrico e direcionar um jato da solução polimérica, uma seringa que contenha a solução polimérica com uma agulha conectada a um dos polos da fonte, assim como um coletor no extremo do outro polo da fonte (Figura 8). Assim, quando uma tensão elétrica é aplicada no líquido que escoar da

agulha, cargas eletrostáticas se acumulam na superfície do fluxo que sai [102]. Na sequência, o efeito do campo elétrico sobre o líquido carregado supera as forças de tensão superficial, dando origem a um cone alongado (Cone de Taylor) em direção ao coletor [99, 102]. O caminho do jato formado pode ser complexo e está sujeito a instabilidades induzidas por cargas elétricas, como na ausência de uma solução com soluto polimérico, situação em que o líquido finalmente se atomiza, gerando minúsculas gotículas (eletropulverização). Entretanto, quando o soluto é um polímero em altas concentrações, a viscosidade da solução polimérica irá se opor a quebra do jato em gotículas [102]. Isso produz um fio de solução polimérica que percorrerá um caminho instável eletricamente, podendo gerar elongações e flexões até ser depositado no coletor.

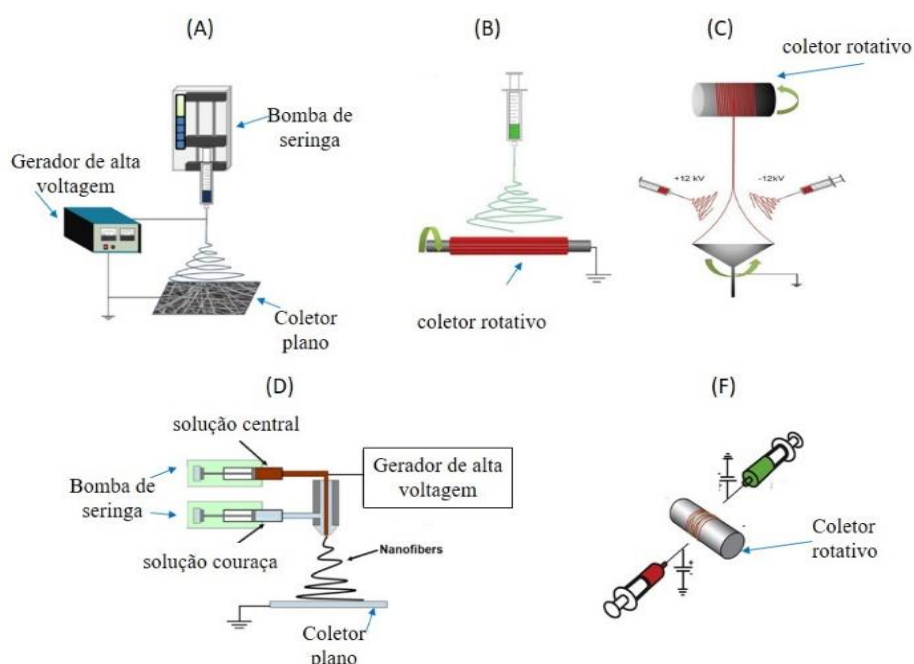


Figura 8 - Sistemas de eletrofição

Adaptado de Xie et al. [103].

Representação de alguns tipos de coletores e injetores de solução polimérica. (A) Eletrofição tradicional, (B) eletrofição sobre coletor cilíndrico, (C) eletrofição de spray duplo, (D) eletrofição coaxial e (E) eletrofição dupla sobre coletor cilíndrico.

1.5.1 Eletrofição na engenharia de tecidos

A eletrofição é uma das estratégias utilizadas pela engenharia de tecidos na medicina regenerativa. A engenharia de tecidos tem como foco principal a fabricação de arcabouços para mimetizar a matriz extracelular (ECM) [101, 104]. Sabe-se que reparar e regenerar tecidos e órgãos usando biomateriais, células e fatores de crescimento sobre

uma estrutura que imite arquitetura hierárquica e as propriedades da ECM de tecidos nativos continua sendo um enorme desafio [105].

Por ser a eletrofiação capaz de produzir estruturas fibrosas com características topográficas em micro e nano escala com poros interconectados, trata-se de uma técnica muito útil, visto que as malhas produzidas mimetizam a arquitetura das matrizes extracelulares naturais dos tecidos, auxiliando na adesão, proliferação, infiltração celular, difusão dos nutrientes vitais das células, facilitando assim a formação de tecido funcional artificial [106–108]. Os polímeros usados podem ser sintéticos ou naturais, com diferentes características de degradação, segundo a aplicação de interesse, exemplo: policaprolactona, poli(N-isopropilacrilamida), poli(ácido glicólico) poliestireno, poli(vinil acetato), poli(láctico), colágeno, quitosana, gelatina, poli(etileno-*co*-acetato de vinil), poli(etileno-*co*-álcool vinílico) [109, 110].

A produção de malhas eletrofiadas com diferentes características (em termos de diâmetro, alinhamento e composição das fibras) fornece um amplo espectro de possibilidades no sentido de obtenção de ECMs de diferentes órgãos, considerando a topografia de micro a nanoescala que pode afetar o comportamento celular e subsequentemente a produção do tecido. Existem arcabouços eletrofiados com estruturas para engenharia de tecido neural, vascular, ósseo, de tendões e ligamentos, cartilagem e tecidos da pele, como por exemplo os reportados por Sensini et al. [111] para mimetizar a estrutura do tendão com poli(ácido L-láctico)/colágeno eletrofiado e por Kook et al. [112] para reconstruir tecido cardiovascular usando fibras de policaprolactona num meio de fibrina. Yao et al. [113], por sua vez, demonstraram que a mistura de nanofibras de policaprolactona /poli(ácido láctico) consegue diferenciar células-tronco em osteoblastos para a formação de osso craniano (Figura 9).

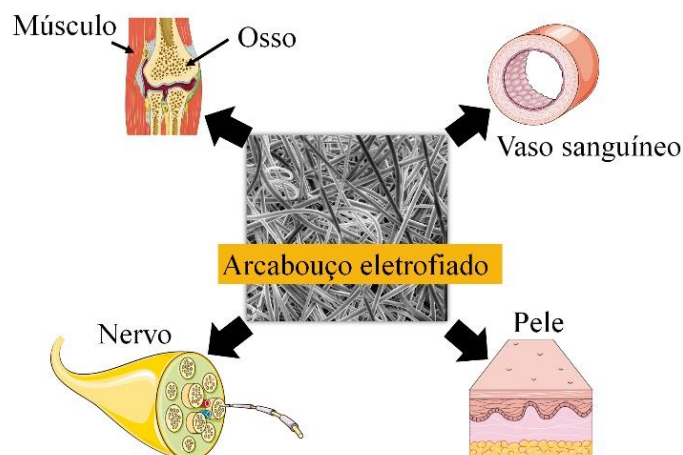


Figura 9 - Possíveis aplicações de malhas eletrofiadas como arcabouços
 Adaptado de Ding et al. [108]
 As características das malhas eletrofiadas são importantes no seu uso na engenharia de tecidos.

Neste trabalho vamos focar na utilização da eletrofiação para produções de peles.

1.1.1.1 Arcabouços eletrofiados para a engenharia de tecidos da pele

Na engenharia de tecidos, a eletrofiação tem sido usada como uma abordagem para gerar diferentes arcabouços para pele, com a finalidade de obter curativos em feridas ou enxertos. Existem pesquisas que tentam entender o comportamento das células da pele e os efeitos das fibras (composição, morfologia) e a estrutura dos arcabouços eletrofiados (porosidade, distribuição), no seu objetivo de se aproximar à ECM [106]. Podem ser encontrados ensaios *in vitro* e/ou ensaios *in vivo*, como observaremos, mencionando alguns desses tipos de trabalhos.

Entre os ensaios *in vitro* (Tabela 11), apresentamos alguns polímeros e tipos celulares usados em pesquisas que procuraram entender as respostas de células da pele em arcabouços eletrofiados. Em alguns casos, recorreram à diferenciação a partir de células-tronco mesenquimais (MSC), como mostrado por Jin et al. [114], os quais usaram MSC da medula óssea em arcabouços de poli(L-láctico)-*co*-poli(ε-caprolactona)/colágeno tipo I (PLLCL/Colágeno). Os autores demonstraram a diferenciação das células MSC para a linhagem epidérmica, confirmando a expressão de marcadores de diferenciação de queratinócitos, e o resultado pode ser aplicado na cicatrização de feridas e reconstituição da pele.

Outros tipos de pesquisas estudam a proliferação de fibroblastos na estrutura fibrosa, como o realizado por Gautam et al. [115] em arcabouços produzidos com três polímeros, policaprolactona (PCL)/gelatina/colágeno tipo I, variando a porcentagem de colágeno tipo I, os autores acreditam que este tipo de arcabouço pode ser um potencial candidato para aplicações de cicatrização de feridas e engenharia de tecidos da pele. Hosseinzadeh et al. [116] investigaram a diferenciação epitelial e a expressão de proteínas do co-cultivo de MSC (adiposo) e queratinócitos humanos em uma estrutura eletrofiada de náilon carregado com *B. vulgaris*. Os autores demonstraram que o compósito fibroso promove adesão, proliferação e diferenciação de queratinócitos e células tronco-mesenquimais. Em outro trabalho, Ranjbarvan et al. [117] trabalharam com PCL eletrofiado revestido por plaquetas e relatam que o uso de plaquetas nas fibras eletrofiadas aumenta a biocompatibilidade e molhabilidade do arcabouço, assim como a adesão celular e a expressão de marcadores de queratinócitos; em geral, recomendam o uso de seu produto para cicatrização de feridas.

Tabela 11 - Exemplos de resposta celular em ensaios *in vitro* em arcabouços poliméricos e sua possibilidade na regeneração cutânea

Matriz	Células	Resultados de	Referencia
PLLCL/colágeno tipo I	MSC da medula óssea	Diferenciação das células MSC para queratinócitos	[114]
PCL/gelatina/colágeno tipo I	Fibroblastos de camundongo L99	Aumento de proliferação	[115]
Náilon 66 / <i>B. vulgaris</i>	MSC (adiposo) e queratinócitos epidérmico humanos,	Melhora adesão celular, proliferação e diferenciação	[116]
PCL/plaquetas	Queratinócitos epidérmicos humanos	Aumento da adesão e expressão celular	[117]

Informações obtidas de pesquisas desenvolvidas por diferentes autores (última coluna à direita).

PLLCL: poli(L-láctico)-co-poli(3-caprolactona); PLC: policaprolactona; MSC: células-tronco mesenquimais.

Nos ensaios *in vitro* com aplicação *in vivo* dos arcabouços poliméricos (Tabela 12), apresentamos três trabalhos muito interessantes como exemplos. Tchemtchoua et al. [118] desenvolveram um curativo a base de quitosana, procurando melhorar a cicatrização de feridas cutâneas. Foram investigadas 3 possibilidades morfológicas (filmes, fibras e esponja) de quitosana para avaliá-las como curativos de lesões cutâneas.

Com relação a esse estudo, nos ensaios *in vitro*, foram usados três tipos de células da pele (fibroblastos humanos, células endoteliais microvasculares e queratinócitos) e concluíram que estruturas de fibras são um substrato muito melhor para adesão, crescimento e diferenciação dos três tipos celulares do que os outros tipos de dispositivos de quitosana (filme, esponja).

Nos ensaios *in vivo*, foram feitos implantes de esponja e material eletrofiado de quitosana em feridas geradas em camundongos, estudo a partir do qual conseguiram demonstrar que os arcabouços eletrofiados promoveram a recuperação mais rápida e mais bem estruturada nas feridas porque conseguiram regenerar a espessura total da pele. Assim, os autores concluem que arcabouços eletrofiados de quitosana são biomateriais promissores para muitas aplicações em engenharia de tecidos e curativos, especialmente para o tratamento de úlceras profundas [118].

Sheikholeslam et al. [119] demonstraram que um tipo de arcabouço de gelatina/poliuretano (PU) é um ambiente favorável na proliferação de fibroblastos humanos e, aplicado como substituto acelular na pele de camundongos feridos, após 14 dias, as feridas se fecham, demonstrando-se infiltração celular na região do implante do arcabouço, evidenciando seu potencial na regeneração cutânea.

Asiri et al. [98] desenvolveram fibras eletrofiadas de álcool polivinílico (PVA) na presença de fatores de crescimento epidérmico (EGF) e/ou fator de crescimento de fibroblastos (FGF), com o intuito de aumentar a atividade biológica do arcabouço.

Tabela 12 - Exemplos de polímeros eletrofiados, avaliados *in vivo* com resultados promissores para engenharia de tecidos da pele

Matriz	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Referencia
Quitosana	Fibroblastos, células endoteliais microvasculares e queratinócitos nos arcabouços tipo filme, esponja e eletrofiado	Implante de arcabouços tipo esponja e eletrofiados nas feridas de camundongos.	[118]
Gelatina/PU	Fibroblastos dérmicos humanos nos arcabouços	<i>Arcabouço</i> livre de células na ferida de camundongo	[119]
EGF/FGF/ PVA	Fibroblastos dérmicos humanos nos arcabouços	<i>Arcabouço</i> livre de células na queimadura de rato	[98]

Informações obtidas de pesquisas desenvolvidas por diferentes autores (última coluna à direita)
 PU: poliuretano; EGF: fator de crescimento epidérmico; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; PVA: álcool polivinílico

Embora muitas pesquisas tenham sido desenvolvidas para avaliar o efeito dos arcabouços eletrofiados *in vivo* na regeneração da epiderme e da derme, não foram encontradas na literatura construções de pele *in vitro* em materiais eletrofiados como plataforma de ensaios químicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral construir tecido epidérmico a partir de células humanas cultivadas em uma estrutura polimérica sintética eletrofiada. Avaliando-se as melhores condições para a produção de fibras poliméricas favoráveis na etapa do cultivo celular, procura-se a obtenção de uma epiderme equivalente com uma ampla faixa de tempo de vida de prateleira. O produto não é destinado como material substituto da pele em implantes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Obtenção e caracterização das malhas eletrofiadas para uso como arcabouço celular

Abordar os métodos para a produção e caracterização das malhas sintéticas de poli(tereftalato de etileno) (PET), poli(tereftalato de butileno) (PBT) e poli(N,N'-hexametilenadipinamida) (N6/6 ou náilon 6,6). Produzir as malhas por eletrofição para a geração da membrana basal na primeira parte do desenvolvimento da epiderme equivalente. As principais caracterizações são: Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Termogravimetria (TGA), porosidade e ângulo de contato.

2.2.2 Construção e caracterização de epidermes *in vitro* com e sem presença de derme

Elaborar protocolos para produção de construções FTS e RHE sobre as malhas eletrofiadas. A principal caracterização para avaliar a morfologia do tecido produzido é a análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina). A detecção das proteínas que deve expressar uma epiderme devidamente diferenciada foi feita utilizando-se imunohistoquímica e *Western Blotting*.

2.2.3 Aplicabilidade do modelo epidérmico

Testar substâncias químicas corrosivas ou irritantes sobre o modelo *in vitro* construído. Em seguida, avaliar as respostas do modelo epidérmico para o estabelecimento de sua aplicabilidade como modelo preditivo para ensaios de corrosão ou irritação. São seguidos os protocolos estabelecidos pela OECD para testes cutâneos de corrosão e irritação.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E FONTES CELULARES

Poli (tereftalato de etileno) (PET) (Mv ~ 18 kg/mol, Número do produto: 200255, Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, EUA), poli(tereftalato de butileno) (PBT) (Mv ~ 38 kg/mol, Número do produto: 190942, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), poli (N,N'-hexametilenadipinamida) (N6/6 ou náilon 6,6) (Mn ~ 35 kg/mol, Número do produto: 429171, St. Louis, MO, Sigma-Aldrich), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) (\geq 99%, Número do produto: 105228, St. Louis, MO, Sigma-Aldrich, EUA), diclorometano (DCM) (EMPARTA ® ACS, Número do produto: 1.07020, Merck, Darmstadt, Alemanha), clorofórmio anidro (para HPLC, \geq 99,9%, Número do produto: 650498, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ácido fórmico (AcF) (98– 100%, UN-No. 1779, Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido acético (Product Number: 1,00063, Merck, Darmstadt, Alemanha).

Fibroblastos e queratinócitos (células humanas) foram as células estudadas. Ambas as células foram isoladas de amostras de prepúcio doadas pelo Hospital da Universidade de São Paulo (Brasil). As células humanas foram isoladas como previamente descrito por Pennacchi *et al.*[120], sob aprovação do Comitê de Ética Local (Processo HU CEP nº 943/09, SISNEP CAAE 0062.0.1.98.000-9). Resumidamente, o prepúcio foi lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo os antibióticos penicilina-estreptomicina (Pen-Strep; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Cada amostra doada foi limpa e fragmentada antes da digestão com 4 mg/mL de dispase II (Roche, Life Sciences, Branford, CT, EUA) durante a noite a 4 °C. Em seguida, a derme e a epiderme foram separadas mecanicamente uma da outra. A derme foi subsequentemente incubada com 1 mg/mL de colagenase (Gibco, Life Technologies) por 6 h em temperatura ambiente para induzir a liberação de fibroblastos de colágeno. A epiderme foi incubada com 0,05% de tripsina-EDTA por 15 min a 37 °C para promover a dissociação celular. Os fibroblastos removidos da derme e os queratinócitos removidos da epiderme foram centrifugados a

1500x g por 3 min e semeados com meios de cultura específicos, conforme descrito abaixo [120].

Queratinócitos epidérmicos humanos normais e fibroblastos foram cultivados em meio de crescimento específico para cada tipo de célula e mantidos em incubadora a 37 °C contendo 7,5% e 5% de CO₂, respectivamente [44]. Células de queratinócitos foram cultivadas em KGM™ Gold Keratinocyte Growth Medium BulletKit™ (KGM, Lonza, Walkersville, MD, EUA) suplementado com isoproterenol 10⁻⁶ M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Os fibroblastos foram cultivados em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Life Technologies, Indianapolis, IN, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB, Gibco, Life Technologies) e antibióticos (25 µg/mL de sal de ampicilina sódica e 100 estreptomicina µg/mL, Gibco Life Technologies, Grand Carlsbad, CA, EUA).

Outros compostos químicos usados foram o dodecil sulfato de sódio (SDS) (grau biotecnológico, VWR Life Science Solon, OH, EUA), DL- ácido láctico (Ph. Eur., Número do produto: 69775, Fluka, Steinheim, Alemanha), ácido acético glacial (ACS, ISO, Reag. Ph. Eur., Número do produto: 1.00063, Merck, Darmstadt, Alemanha), NaCl (EMSURE®, ACS, ISSO, Reag. Ph. Eur., Número do produto: 1.06404, Merck, Darmstadt, Alemanha) e KOH da Merck (Darmstadt, Alemanha). Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, 98%, Número do produto: 135038), Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e álcool isopropílico (Labsynth, Diadema, SP, Brasil).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Fabricação de malhas poliméricas por eletrofição

Os polímeros para construir as malhas foram submetidos a secagem por 24 horas a 45°C e colocados no dessecador. A eletrofição é a técnica escolhida para fabricar as malhas poliméricas. As soluções poliméricas foram preparadas com os solventes apropriados (Tabela 13). Testaram-se diferentes porcentagens massa/volume (m/v) dos polímeros, assim como diferentes proporções de misturas de solventes. Adaptamos o protocolo segundo as informações obtidas de pesquisas que trabalharam com esses polímeros [121, 122, 131, 123–130].

Para o trabalho com PET e PBT, foram testadas três porcentagens massa/ volume (m/v) para o PET e PBT, com três proporções de mistura de solventes HFP:DCM (Tabela 13). Para a obtenção das soluções, as misturas polímero-solvente foram mantidas sob agitação magnética à temperatura de 19 ± 2 °C, por 24 h.

No caso de N6/6, foi obtida malha eletrofiada com 12,5 % m/v do polímero, na mistura de solventes AcF:CHCl₃ (Tabela 13). Para a obtenção da solução, foram necessárias 48 h de agitação.

Tabela 13 - Porcentagem de polímeros usados na preparação de soluções poliméricas em diferentes proporções em misturas de solventes.

Concentração da solução (m/v) %	Mistura de solvente (solvente 1: solvente 2)
PET	HFP
10%, 20%, 30%	HFP:DCM (7:3) HFP:DCM (1:1)
PBT	HFP
10%, 20%, 30%	HFP:DCM (7:3) HFP:DCM (1:1)
N6/6 (12,5%)	AcF:CHCl ₃ (7,5:2,5)

PET: Poli (tereftalato de etileno); PBT: poli (tereftalato de butileno); N6/6: náilon 6,6; HFP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; DCM: diclorometano; AcF: ácido fórmico.

Para cada caso, as soluções de eletrofição foram colocadas em uma seringa de 10 mL (HSW® NORM-JECT®, Tuttlingen, Alemanha) acoplada a uma agulha de 20 gauge (7748-06-n720, HAMILTON), a seringa foi adaptada com uma bomba (Bomba de infusão PHD 2000, HARVARD Apparatus, Holliston, MA, EUA) para controlar a taxa de saída da solução polimérica, e o sistema foi alimentado por uma fonte de alta tensão (Série EH, GLASSMAN High Voltage, Inc., High Bridge, NJ, EUA). Na Figura 10, é apresentado um diagrama esquemático do sistema de eletrofição utilizado. A Tabela 14 mostra as condições experimentais e os parâmetros do processo. As fibras poliméricas foram coletadas sobre um coletor estático plano.

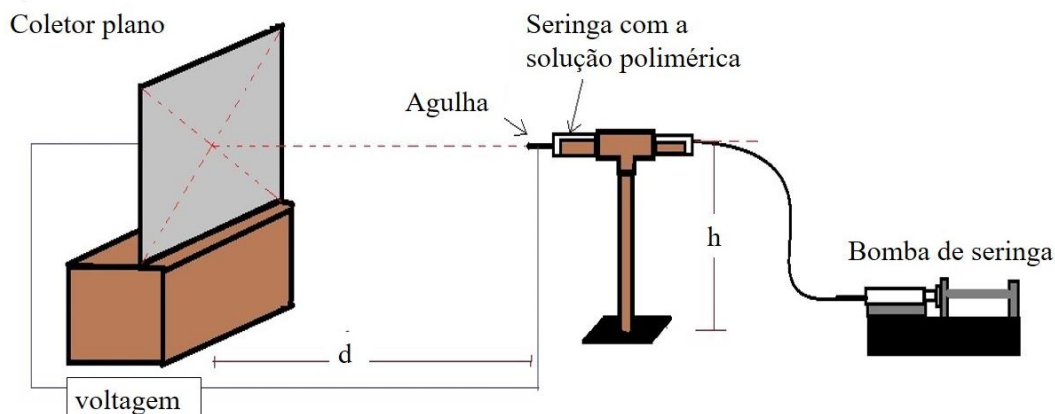


Figura 10 - Diagrama esquemático da instalação para eletrofição
 d: distância entre agulha e coletor, h: altura de fixação da seringa.

Tabela 14 - Parâmetros¹ estabelecidos no processo de eletrofição do PET, PBT e N6/6

Polímero	Parâmetros do processo				Coletor
	Voltagem (kV)	Vazão da solução (mL.h ⁻¹)	d (cm)	h (cm)	
PET	20	12	30	20	Plano
PBT	20	12	30	20	Plano
N6/6 (12,5%)	20	2	19	22	Plano

¹ Parâmetros ambientais compartilhados: 54% (± 2) de umidade, 19 °C (± 2) temperatura.
 d: Distância da agulha ao coletor; h: distância entre a base e a agulha.

3.2.2 Caracterização das malhas eletrofiadas

3.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia das fibras poliméricas foi obtida por SEM. As malhas foram fixadas em fitas de carbono sobre suportes de alumínio e recobertas com ouro por meio de um metalizador *Sputter Cressington 208HR coater*. As micrografias das amostras foram obtidas em um Microscópio Eletrônico de Varredura *JCM-5000 NeoScope* sob voltagem de aceleração de 5 e 10 kV.

3.2.2.2 Distribuição de diâmetro das fibras

Em paralelo às avaliações morfológicas, foram avaliadas as distribuições do diâmetro das fibras das malhas poliméricas das micrografias obtidas por SEM. Os diâmetros das fibras foram obtidos usando o software *AxionVision SE64 REL.4.9.1* (Carl Zeiss, EUA). As distribuições foram feitas usando o software *Microcal Origin 6.0* (OriginLab Corporation, Massachusetts, EUA).

A distribuição do diâmetro das fibras foi avaliada pelo ajuste da distribuição normal de Gauss com o teste de normalidade de Kolmogorov-Smimov e Lilliefors, usando o software *Statistica 12* (StatSoft, Round Rock, TX, EUA). Se o valor- $p \geq 0,05$, se aceita a hipótese de ser uma distribuição normal, caso contrário a hipótese é rejeitada. Sendo assim uma melhor representação dos dados de diâmetro por diagramas de caixa (*Boxplot*) para avaliar a média é o intervalo interquartil (IQR) usando o software *GraphPad Prism 8*.

3.2.2.3 Porosidade das malhas

A porosidade das malhas foi determinada segundo o método de Sreedhara e Tata [132]. Essa metodologia consiste em determinar a relação de densidades, mostrando quanto a presença de ar na membrana afeta a densidade “real” da malha. A medida da massa da malha foi realizada em um kit *Density KIT* (Mettler Toledo, Switzerland) para determinar a densidade de sólidos e líquidos (Figura 11). Na Figura 11-A, pode-se observar onde se coloca a amostra no kit, para determinar a massa do sólido no ar, a fim de que seja calculada a densidade aparente do sólido com a equação 1. Na Figura 11-B, é apresentado o modo da pesagem do sólido em um líquido, com esse dado pode-se calcular a densidade “real” do sólido, utilizando-se a equação 2.

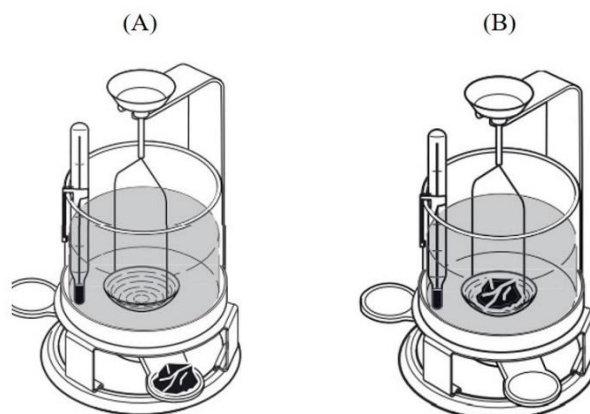


Figura 11 - Diagrama esquemático do sistema de pesagem para determinar porosidade [133]

(A) pesagem da massa no ar e (B) pesagem da massa em um líquido

$$D_a = \frac{M_1}{(e \times A)} \quad [1]$$

Sendo: D_a : densidade aparente da amostra, M_1 : massa da amostra no ar, e : espessura da amostra, A : área da amostra. Entendendo-se como amostra uma porção de malha.

$$D_r = \left[\frac{M_1}{(M_1 - M_2)} \right] \times (d_0 - d_L) + d_L \quad [2]$$

Sendo: D_r : densidade “real” da amostra, M_1 : massa da amostra no ar, M_2 : massa da amostra no líquido, d_0 : densidade do líquido, d_L densidade do ar. Entendendo-se como amostra uma porção de malha.

Para determinar a porosidade, utilizou-se a equação 3 [132], na qual são usados os resultados obtidos pelas equações 1 e 2.

$$Porosidade = \left[1 - \left(\frac{D_a}{D_r} \right) \right] \times 100 \quad [3]$$

3.2.2.4 Propriedades Térmicas

As análises termogravimétricas das malhas foram realizadas usando uma balança termogravimétrica (TGA Q-500, TA Instruments, EUA). Foram pesados entre 1 e 3 mg de cada amostra em suporte de platina e os ensaios foram programados a uma razão de aquecimento de 10 °C/min de 0 até 700 °C. A vazão de nitrogênio na balança foi mantida em 40 mL/min e a vazão de ar sintético no forno foi de 60 mL/min.

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) foi realizada utilizando-se um equipamento de DSC da marca TA Instruments Q20 disponível no Laboratório da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras eletrofiadas foram aquecidas de 0 a 400 °C num cadinho de alumínio, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera dinâmica de ar e N₂ com vazão de 50 mL/min.

Com os dados obtidos no primeiro aquecimento por DSC e tratados pelo software TA Explorer, calculamos o grau de cristalinidade (X_c) do polímero eletrofiado, usando a seguinte relação [134–136]:

$$X_c = \left(\frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \right) \times 100 \quad [4]$$

Onde ΔH_m , entalpia de fusão da malha eletrofiada; ΔH_m^0 , calor de fusão de equilíbrio (entalpia de fusão de amostra 100% cristalina do mesmo polímero): PET ($\Delta H_m^0 = 136$ J/g) [137], PBT ($\Delta H_m^0 = 140$ J/g) [138] e náilon 66 ($\Delta H_m^0 = 190,5$ J/g) [139].

3.2.2.5 Ângulo de contato e energia de superfície

As medidas de ângulo de contato (Θ) foram realizadas pelo método de gota séssil, utilizando-se um goniômetro óptico de ângulo de contato (Tantec CAM-PLUS MICRO).

A energia superficial dos polímeros (γ_s) foi calculada para superfícies lisas de PET, PBT e N6/6 obtidas pela técnica de *Spin Coating*. Para o cálculo da γ_s , foi usada a abordagem de van Oss et al. [140]. Os componentes da energia de superfície são o resultado da interação interfacial e descrevem as características superficiais do material estudado e entende-se que as interações em nível molecular são as responsáveis das forças adesivas e coesivas. Essas podem ser agrupadas em interações de Lifshitz-van der Waals (ou dispersivas) e interações polares (ou interações ácido-base) [140]. Como componentes da energia superficial, são apresentados como: γ^{LW} que é o componente dispersivo da energia de superfície, associada as forças de Liftzshitz van der Waals (apolar), γ^+ é o componente polar relacionado com a aceitação de elétrons (ácido), γ^- é o componente polar relacionado com a doação de elétrons (base).

Cada termo da γ_s (γ_s^+ , γ_s^- , γ_s^{LW}) foi determinado realizando-se medições de Θ nos filmes finos de PET, PBT e N6/6 realizado com gotículas (5 μ L) de três líquidos (um apolar e dois polares) com parâmetros de tensão de superfície conhecidos (γ_L^+ , γ_L^- , γ_L^{LW}). Usou-se água Milli-Q ($\gamma_L = 72.8$; $\gamma_L^{LW} = 21.8$; $\gamma_L^+ = 25.5$; $\gamma_L^- = 25.5$) [141],

glicerol ($\gamma_L = 64$; $\gamma_L^{LW} = 34$; $\gamma_L^+ = 3.92$; $\gamma_L^- = 57.4$) [141] e diodometano ($\gamma_L = 50.8$; $\gamma_L^{LW} = 50.8$; $\gamma_L^+ = 0$; $\gamma_L^- = 0$) [141].

Para determinar as componentes polares (γ^- , γ^+) e dispersiva (γ^{LW}) da γ_S utilizou-se a equação 5 e a equação 6.

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2(\gamma_S^{LW} \times \gamma_L^{LW})^{1/2} + 2(\gamma_S^+ \times \gamma_L^-)^{1/2} + 2(\gamma_S^- \times \gamma_L^+)^{1/2} \quad [5]$$

$$\gamma_S = \gamma_S^{LW} + 2(\gamma_S^+ \times \gamma_S^-)^{1/2} \quad [6]$$

Sendo: θ o ângulo de contato medido e os subscritos “S” e “L” denotam fases sólidas ou líquidas.

3.2.3 Acondicionamento das malhas eletrofiadas para cultivo celular

As malhas foram cortadas em discos de 1,1 cm de diâmetro. Em seguida, os discos foram limpos por submersão em álcool 70° (dentro do fluxo laminar). Após evaporação do álcool, foram esterilizados por irradiação com luz UV-C germicida (comprimento de onda dominante: 254 nm) por 10 minutos cada lado do disco. Seguidamente, os discos (PET, PBT, N6/6) foram fixados numa placa de 24 poços com auxílio de anéis de aço de aproximadamente 1,6 cm de diâmetro. Em seguida, adicionou-se DMEM e, então, os discos foram mantidos na incubadora por um tempo mínimo de 24 horas. Depois desse tempo, a solução foi retirada e foram realizados os diferentes cultivos celulares.

3.2.4 Detecção de *Mycoplasma sp.*

Como parte do controle de qualidade das células, foi realizado o monitoramento da contaminação por *Mycoplasma sp.* A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é sensível, segura, rápida e específica na detecção desse procaríoto. O protocolo seguido é aquele utilizado no Laboratório de Citopatologia Clínica da Escola de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil.

Para a realização desse ensaio (por amostra), foi coletado 1 mL de sobrenadante da cultura celular mantida por pelo menos 48h em incubação. Em seguida, primeiro centrifugou-se (1 minuto a 200 xg, 25 °C) o coletado, e então, retirou-se 2 µL do sobrenadante (mantido entre -3 °C e 0 °C) para identificar a presença de contaminação por *Mycoplasma sp.*

Neste ensaio, utilizamos iniciadores para amplificar parte da unidade 16s do rRNA de qualquer espécie do gênero *Mycoplasma sp.* A sequência foi amplificada por PCR usando dois *primers* Myc1(5'-GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG-3'), Myc2 (5'-CGG ATA ACG GIT GCS ACC TAT-3'). A mistura de reação de PCR de 2 μ L, incluiu 12,2 μ L de água MillQ autoclavada, incluiu 2 μ L de tampão livre de magnésio 10x (Promega, Reino Unido), 1,2 μ L (50 mM) de MgCl₂ (Promega), 1 μ L (10 μ M) de Myc1, 1 μ L (10 μ M) de Myc2, 0,4 μ L (10 mM) de dNTP (mistura de nucleotídeos dTTP, dATP, dCTP, dGTP) e 0,2 μ L (5U/ μ L) de Taq DNA polimerase (Promega). As condições de PCR foram desnaturação inicial a 1 ciclo a 94 °C por 7 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 1 minuto, continuando com extensão a 72 °C por 1,5 minutos, seguido por uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. O produto de PCR foi analisado para o fragmento de 270 pb [142] por eletroforese em gel de agarose a 2% (m/v) agarose em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA). A contaminação avaliada por PCR foi monitorada através de utilizações de controles positivos e negativos da reação.

3.2.5 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT, estimando o potencial metabólico das células [71, 143]. Para começar esse ensaio, primeiramente as amostras que estavam em incubação foram lavadas com PBS. Em seguida, foram incubadas com uma solução de MTT por 3 h (37 °C em 5% de CO₂). Na sequência, as amostras foram lavadas com PBS para eliminar o MTT que não reagiu, e foram transferidas para uma placa nova (com poços). Para extrair o formazam presente nas amostras, adicionou-se isopropanol [144] e manteve-se agitação por 2 horas em agitador de balanço (Vari Mix Platform Rocker; Thermo Scientific). Finalmente, de cada solução de formazam foram transferidos 200 μ L a placas com 96 poços para a leitura a 570 nm [145] com um leitor de placas (BioTek-Synergy HT). Os dados foram expressos como absorbâncias.

A viabilidade celular de fibroblastos e queratinócitos foi avaliada separadamente. Em cada caso celular e sobre cada tipo polimérico, as células foram semeadas sobre diferentes malhas. Cada tipo celular foi mantido segundo seus meios correspondentes, conforme descrito anteriormente (seção 1.8). A avaliação da viabilidade foi feita nos dias 1 e 7 após iniciada a cultura celular. Neste ensaio, foi usado 1 mL de MTT de 1 mg/mL

(por poço, numa placa com 24 poços), e a quantidade de isopropanol usada para a extração do formazam foi de 1 mL por poço.

Nos modelos *in vitro*, também foi avaliada a viabilidade celular por MTT, com a finalidade de saber qual seria a resposta do modelo após ser exposto a uma substância que poderia gerar dano cutâneo, detalhado nas próximas seções. Este ensaio foi realizado de acordo com a OECD [53, 54]. Nesta avaliação, é importante comentar que é indispensável o uso de um controle negativo (modelo não-danificado), ao qual se atribui 100% de viabilidade. Os cálculos de viabilidade relativa (VR) foram realizados em relação à OD desse controle [44, 146].

$$VR = \left(\frac{[OD]_{\text{substancia teste}}}{[OD]_{CN}} \right) \times 100 \quad [7]$$

Sendo que $[OD]_{\text{Substancia teste}}$ e $[OD]_{CN}$ correspondem às densidades ópticas obtidas do formazam produzido nos modelos *in vitro* após tratamentos com uma substância-teste e controle negativo, respectivamente, uma substância-teste e controle negativo.

No ensaio de viabilidade por MTT, é imprescindível fazer as seguintes considerações em relação à solução de MTT:

- i. Solução estoque de MTT (5 mg/mL): A solução foi preparada no mínimo 24 horas antes de ser usada. 1 mL de PBS foi utilizado para solubilizar cada 5 mg de MTT. Após a dissolução, a solução foi filtrada (filtro de 0,22 μm) e armazenada a 4 °C sob abrigo da luz [147].
- ii. Solução de MTT de 1 mg/mL é apenas diluída no momento de ser aplicada como meio de incubação. A cada 1 mL da solução estoque (5 mg/mL), são utilizados 4 mL de meio de cultura sem soro (DMEM) para a diluição.

3.2.6 Construção de modelos *in vitro* de pele humana

O desenvolvimento de modelos *in vitro* de pele foi dividido em dois níveis: i) construção de equivalente de pele completa (derme e epiderme) e ii) construção de equivalente de epiderme humana (ausência de derme).

Equivalente de pele completa – o protocolo usado para a construção de equivalente de pele em malhas eletrofiadas foi baseado e adaptado do protocolo que descreve a produção do modelo USP-FTS [44]. A construção da derme foi realizada semeando $1,5 \times 10^5$ fibroblastos na superfície do disco polimérico num meio DMEM:SFB

(9:1), seguida de incubação (37 °C com 5% de CO₂) por 24 horas. Depois, para a construção da epiderme, 2,5 x 10⁵ queratinócitos foram semeados sobre a cultura de fibroblastos, a co-cultura foi mantida submersa em RAFT-FTS: meio KGM (1:1) [44, 48] por 24 horas (37 °C, 5% de CO₂). Seguidamente, a co-cultura foi levada à interface ar-líquido por 11 dias (37 °C, 5% de CO₂). O meio RAFT-FTS é específico para modelo de pele completa. Como descrito por Catarino et al. [44], é uma mistura de DMEM, Ham's-F12, SFB e suplementos (toxina colérica, insulina, apo-transferrina, hidrocortisona 21-hemisuccinato, fator de crescimento epidérmico).

Equivalente de epiderme humana - o protocolo usado para a construção de equivalente de epiderme em malhas eletrofiadas foi baseado e adaptado do protocolo que descreve a produção do modelo USP-RHE [44, 48]. Antes da cultura celular, os discos poliméricos foram colocados em insertos (Corning 3460 Transwell ®- ϕ 12 mm-porosidade de 0,4 μ m). 2,5 x 10⁵ queratinócitos foram semeados na superfície do disco polimérico. As células foram submersas numa mistura de meio suplementado KGM: RAFT-RHE (1:1) [44, 48] por 24 horas (37 °C, 5% de CO₂), seguido por 11 dias na interface ar-líquido. O meio RAFT-RHE é específico para produção de modelo epidérmico. Como descrito por Catarino et al., trata-se de uma mistura de DMEM:HAM (3:1) com suplementos (insulina, hidrocortisona, transferrina, toxina colérica, TGF- α , EGF) e 5% de meio condicionado obtido dos fibroblastos [44].

3.2.7 Controle de qualidade das construções *in vitro*

3.2.7.1 Histologia e imunohistoquímica

Todas as amostras caracterizadas por histologia ou imunohistoquímica foram previamente lavadas, fixadas, desidratadas, incluídas em parafina e cortadas. O processo em detalhes pode ser descrito da seguinte forma: após a incubação, as amostras foram lavadas com PBS e fixadas por imersão em formaldeído tamponado neutro a 10% (v/v) por 4 h a 4 °C [148–151] – formaldeído tamponado neutro a 10% (v/v): por cada 10 mL de solução de formaldeído (36,5 – 38% de teor de HCHO; Synth) foi utilizado 90 mL de PBS. Posteriormente, as amostras foram desidratadas (em etanol e xilol) e incluídas em parafina. Para cada caso, cortes histológicos com espessura de 3 μ m foram obtidos com um micrótomo rotativo semimotorizado Leica RM2245 (Leica Biosystems Inc., Buffalo

Grove, IL, EUA), cada corte foi coletado em lâmina de vidro (porta-objetos 76 x 26 mm) - recomenda-se 3 cortes por lâmina. As lâminas com os cortes foram colocadas em estufa a 70 °C por 3 horas para fixar cada corte na superfície do vidro. Em seguida, foram desparafinadas (imersas em xilol) e hidratadas (imersas em concentrações decrescentes de etanol) e enxaguadas em água, como detalhado antes do tratamento histológico e imunohistoquímico.

Para a análise histológica, as lâminas contendo os cortes em parafina foram imersas em xilol (2 vezes, primeiro 1 minuto e depois 2 minutos) e hidratadas em etanol absoluto (2 vezes, 10 minutos), etanol 95 ° (1 vez, 20 minutos) e água destilada (1 vez, 1 minuto). Depois de hidratado o material, inicia-se a coloração dos tecidos com hematoxilina e eosina (HE). As amostras foram submersas em hematoxilina Harris (1 vez, 1 minuto), enxaguadas com água (submersas 1 vez, 10 minutos), submersas em eosina (1 vez, 4 minutos). Seguiu-se com a desidratação, passando as amostras por etanol 70 ° (1 vez, 10 minutos), etanol 95 ° (1 vez, 10 minutos), etanol absoluto (3 vezes, 20 minutos) e xilol (2 vezes, primeiro 20 minutos e depois 1 minuto). Finalmente os tecidos corados foram fixados com uma lamínula (24 x 60 mm) e com DPX (meio de inclusão para histologia, Sigma-Aldrich).

Para a análise imunohistoquímica, as lâminas com as amostras coletadas depois do corte no micrótomo, foram submersas em xilol (2 vezes, 4 minutos), etanol absoluto (3 vezes, 2 minutos), etanol 90 ° (1 vez, 2 minutos), etanol 70 ° (1 vez, 2 minutos), etanol 50 ° (1 vez, 2 minutos) e água (2 vezes, 2 minutos). Depois da hidratação das amostras, iniciou-se o experimento para a marcação imunohistoquímica com o kit- EnVision Flex (High pH, Dako Omnis, Santa Clara, CA, EUA).

A recuperação do antígeno foi realizada com tampão Tris/EDTA (pH 9) por 5 minutos a 95 °C obtido a partir da mistura EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x): água destilada (1:49). As lavagens das amostras foram realizadas com tampão obtido a partir da diluição de EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x): água (1:19). O bloqueio com peroxidase foi feito com EnVision FLEX Peroxidase-Blocking, solução pronta do kit, adicionando-se a quantidade necessária sobre cada amostra (~1 gota). Para o bloqueio com albumina, usou-se uma solução de albumina bovina (BSA) de 2% (m/v) em PBS.

As imunomarcações foram realizadas com diferentes anticorpos primários: anticorpo monoclonal de camundongo [LL002] para KRT14 (Abcam 7800), diluição 1:200; anticorpo monoclonal de coelho [EP 1607IHCY] para KRT10 (Abcam 76318), diluição 1:150; anticorpo policlonal de coelho para LOR (Abcam 85679), diluição 1:100 e anticorpo policlonal de coelho para IVL (Abcam 27495). O kit comercial com anticorpo secundário de cabra contra imunoglobulinas de coelho e camundongo (EnVision FLEX/HRP) foi usado em combinação com 3,3'-diaminobezidina (DAB; EnVision Flex DAB + Chromogen) de acordo com as instruções do fabricante. Após a revelação com DAB, procedeu-se com a coloração com hematoxilina, seguida da desidratação das amostras (processo inverso da hidratação) e a fixação das lamínulas com DPX.

Todas as imagens foram observadas no AxiosKop 40 Carl Zeiss e fotografadas com câmera Zeiss AxioCam MRc5 usando o programa AxioVision, versão 4.8 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para a aquisição de imagens. Todas as seções de pele *in vitro* foram comparadas com o modelo de controle USP-RHE ou USP-FTS [44].

3.2.7.2 Western Blotting

Após a incubação, as amostras foram lavadas com PBS. Em seguida, as células dos tecidos foram lisadas, de acordo ao relatado por Hieda et al. [152]. Depois, do extrato celular foi determinada a quantidade total de proteínas, com o kit Pierce BCATM (Thermo Fisher Scientific, EUA). Então, realizou-se a eletroforese, 40 µg de proteína total foi colocada por poço num gel de poliacrilamida (8%, 12% ou 15%, segundo a massa molecular da proteína de interesse) sob condições redutoras. Procedeu-se com a transferência para membranas de fluoreto de polivinilideno (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). As membranas foram bloqueadas com BSA a 3% (m/v) diluído em TBS-Tween 20 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20) [152] por 1 hora a temperatura ambiente antes de iniciar a incubação com os anticorpos (12 h a 4 °C).

Os anticorpos usados para sondar as proteínas expressas foram: contra KRT 14 (Abcam ab7800) diluído 1:1000, contra KRT10 (Abcam ab76318) diluído 1:1000, contra IVL (Abcam ab27495) diluído 1:1000, contra LOR (Abcam ab85679) diluído 1:1000 e contra β-actina (Abcam ab8227) diluído 1:2000. Terminado o tempo de incubação, as membranas foram lavadas com TBS-Tween 20 e incubadas por 1 h em temperatura

ambiente com o anticorpo secundário correspondente (exemplo: se o anticorpo da proteína de interesse foi produzida em coelho, utilizou-se anticorpo secundário de coelho). As bandas das proteínas foram detectadas por um sistema quimioluminescente.

3.2.8 Aplicabilidade do modelo de pele reconstruída

Na avaliação da aplicabilidade dos modelos *in vitro* construídos, seguiram-se os protocolos da OEDC do teste de corrosão e irritação. Esses testes foram realizados em triplicata por cada ensaio independente e foram dois os experimentos independentes realizados (n=2). Os dados numéricos obtidos foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

3.2.8.1 Teste de corrosão

A aplicabilidade do modelo *in vitro* para corrosão cutânea foi avaliada tendo como base a descrita na OECD TG 431 [53]. Das substâncias listadas na diretriz, três foram escolhidas: NaCl (0,9 %) (controle negativo), ácido acético glacial (controle positivo) e ácido DL láctico (substância-teste). Neste ensaio, é considerado como dano de corrosão sobre o modelo *in vitro* quando o valor da VR (seção 3.2.6) é menor ou igual a 50%. A aplicação das substâncias foi realizada topicamente na superfície do modelo *in vitro* após os 11 dias de incubação sob interface ar-líquido. Primeiro, cada modelo foi transferido para uma nova placa (12 poços) contendo 300 µL de meio novo. Em seguida, 50 µL de substâncias (corrosivas ou não corrosivas) foram aplicadas na superfície da epiderme e mantidas em incubação por 60 minutos (37 °C, 5% de CO₂). Após o tempo de incubação as amostras foram lavadas com PBS (20 vezes), seguidamente foram separadas as amostras, algumas para a caracterização histológica (seção 3.2.8.1) e outras foram submetidas ao ensaio de MTT para determinar a VR (seção 3.2.6).

3.2.8.2 Teste de irritação

A aplicabilidade do modelo *in vitro* para irritação cutânea foi avaliada tendo como base o descrito na OECD TG439 [54]. A superfície dos modelos *in vitro* foi exposta a PBS (controle negativo), SDS 5% (m/v) (controle positivos), KOH 5% (m/v) e isopropanol. Neste ensaio, é considerado como dano irritante sobre o modelo *in vitro*

quando o valor da VR é menor ou igual a 50%. Os ensaios de irritação sobre modelos *in vitro* iniciaram-se após os 11 dias de incubação ar-líquido da construção *in vitro*, cada modelo foi transferido para uma nova placa (12 poços) contendo 300 µL de meio fresco. Na sequência, em cada modelo adicionou-se na superfície 30 µL da substância-teste, o tempo de exposição de cada tratamento químico foi de 20 minutos sob a temperatura do fluxo laminar (19 – 25 °C). Em seguida, cada tecido foi lavado com PBS (20 vezes) e transferido para uma nova placa (6 poços) contendo 1 mL de meio fresco e posteriormente o sistema foi incubado (37 °C, 5% de CO₂) por 42 horas. Após o tempo de incubação (pós-tratamento), as amostras foram lavadas com PBS antes de qualquer caracterização (como as histológicas (seção 3.2.8.1) e as de determinação de VR por MTT (seção 3.2.6)).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, mostramos o desenvolvimento da obtenção de modelos epidérmicos *in vitro* baseados na dispensa de colágeno como arcabouço, uma vez que o colágeno é um material descelularizado que traz variabilidade da fonte (doador animal). Em seu lugar, propomos o uso de polímeros sintéticos eletrofiados. Acreditamos que, evitando o uso de proteína animal, aumentamos a capacidade preditiva do modelo com relação à sua resposta para tecidos humanos. Além disso, os polímeros sintéticos são materiais altamente reprodutíveis e isentos de informação biológica. O uso da eletrofição como técnica de processamento versátil e barata pode facilitar e aumentar a produção de possíveis arcabouços.

Este trabalho está estruturado em três partes: (i) Produção e caracterização das malhas eletrofiadas, (ii) Construção e caracterização de pele *in vitro*, (iii) Avaliação da aplicabilidade da pele *in vitro*. As características das montagens celulares na obtenção de tecidos dependem das características dos arcabouços poliméricos viáveis, garantindo a qualidade da construção *in vitro* para que seja considerado um modelo de pele. Além disso, a relevância do modelo *in vitro* foi demonstrada por sua resposta como plataforma para realização de testes de irritação e corrosão cutânea.

4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MALHAS ELETROFIADAS

Como relatado anteriormente, as malhas eletrofiadas são amplamente usadas na engenharia de tecidos, principalmente por suas características como arcabouços tridimensionais fibrosos. Essas características podem auxiliar na fixação, infiltração e migração celular [110, 153], assim como facilitar a difusão dos nutrientes vitais para as células e o controle do comportamento das suas fases que podem influenciar as características biológicas [98]. Pesquisas demonstraram a excelente capacidade de crescimento celular em arcabouços eletrofiados, os quais devido às arquiteturas fibrosas se assemelham a matrizes celulares naturais [154, 155], facilitando assim a possibilidade de formação de tecidos funcionais artificiais pela versatilidade da técnica na obtenção de diferentes estruturas fibrosas [107, 108, 156]. Além da composição química do polímero eletrofiado, as características topográficas das fibras nos arcabouços

eletrofiados, a geometria, a porosidade, a distribuição e/ou alinhamento podem influenciar as respostas celulares, fornecendo opções de ECM, a fim de que sejam gerados diferentes tecidos (exemplo: de tecido ósseo, vascular, muscular e epitelial) [157–159].

A produção das malhas eletrofiadas é afetada por diferentes fatores, os quais podem ser controlados e precisam de delineamento de parâmetros. Tais fatores estão classificados em parâmetros de solução (como a concentração de polímero, solvente e condutividade), de processo (tensão aplicada, distância da ponta ao coletor e taxa de fluxo) e ambientais (umidade e temperatura, dependendo da composição da solução eletrofiada) [98, 99]. Ajustando e controlando devidamente esses parâmetros, pode ser garantida a obtenção de fibras eletrofiadas sem contas, um artefato clássico da eletrofiação [98, 154].

Das opções de uso dos polímeros sintéticos e naturais que podem ser usados na eletrofiação, a primeira classe possui amplas opções para obtenção de fibras de distintas propriedades mecânicas, condições experimentais facilmente alcançadas e são materiais de custo baixo. Os polímeros sintéticos escolhidos são classificados como bioestáveis, biocompatíveis, são usados amplamente na biomedicina [160–162] e apresentam taxa de degradação maior do que 24 meses [163–166].

São três os polímeros sintéticos escolhidos (PET, PBT e N6/6) na produção de malhas eletrofiadas para desafiar as características ideais das superfícies de colágeno normalmente usadas na construção de modelos de pele *in vitro*. A produção das malhas foi acompanhada pela caracterização morfológica com a finalidade de se estabelecer os parâmetros na obtenção de fibras livres de contas, seguida da compreensão da distribuição de dados das malhas obtidas. As análises térmicas foram utilizadas na avaliação comparativa, podendo indicar as estabilidades relativas frente a processos degradativos ambientais. Também foi realizada a avaliação do ângulo de contato pelo método de gota sésil, com a finalidade de associar esse valor obtido com a energia superficial dos materiais poliméricos.

4.1.1 Morfologia e diâmetro das fibras

Sabe-se que são muitos os parâmetros a serem determinados numa eletrofiação, porém este trabalho se baseou em experiências prévias relatadas em trabalhos anteriores que utilizaram PET [121, 122, 167], PBT [123, 124] e N6/6 [125–131].

Após extenso estudo, fixamos e ajustamos os parâmetros a serem avaliados para se obter malhas eletrofiadas. Os parâmetros que fixamos são os de processo (tensão aplicada, distância da ponta ao coletor e a taxa de fluxo), como mencionado na seção 3.2.1. Dos parâmetros de solução, ajustamos a concentração dos polímeros e a proporção dos solventes. Em relação as concentrações de PET e PBT, preparamos soluções de 10%, 20% e 30% (m/v), e 12,5 % para o N6/6. Os solventes escolhidos foram HFP ou HFP/DCM, como solventes para obtenção das soluções poliméricas de PET e PBT, e o AcF/CHCl₃ na preparação da solução de N6/6.

Um ponto importante na geração da solução polimérica é a escolha dos solventes, visto que esses influenciam significativamente a capacidade de fiação da solução [99]. HFP foi utilizado para solubilizar PET e PBT, e ácido fórmico, para solubilizar o N6/6. DCM e/ou clorofórmio foram usados com finalidades diferentes para cada polímero (PET, PBT e N6/6). O PET e o PBT foram solubilizados em HFP ou na mistura HFP:DCM (nas proporções de 7:3 e 1:1). Neste caso, as misturas foram realizadas apenas com a finalidade de diminuir o uso do HFP como solvente polimérico, semelhante ao demonstrado por Veleirinho et al. [121] na eletrofiação de PET. Por outro lado, na preparação da solução de N6/6, optou-se por usar a mistura AcF/CHCl₃, uma mistura testada que não produz contas nas fibras [168–170].

No que tange à eletrofiação de soluções de PET, não se observou a formação de fibras das soluções de 10% (m/v) de PET nem em HFP e nem no sistema HFP:DCM, concordando com o relatado por Veleirinho et al. [121], o qual justifica a não fiação da solução de PET (10% m/v) devido à baixa viscosidade da solução, gerando um efeito de eletropulverização. Em todas as malhas produzidas a partir da solução de 20% (m/v) de PET em HFP e HFP:DCM (com proporções de 7:3 e 1:1) (Figura 12A-C) e da de 30% (m/v) de PET em HFP:DCM (1:1) (Figura 12F) houve formação de contas (setas amarelas). O aumento da concentração polimérica leva ao aumento do emaranhamento entre as cadeias de polímero, de forma que podem ser obtidos tempos de relaxamentos de tensão mais longos no jato. Como resultado, isso reduz a descontinuação do jato durante

a eletrofição e, conseqüentemente, torna mais provável a obtenção de fibras livres de contas [99, 154].

As micrografias SEM nas malhas de PET (Figura 12) revelam a presença de fibras mais finas nas malhas obtidas das soluções de 20% (m/v) de PET (20% PET) quando comparadas com as malhas obtidas das soluções 30% (m/v) de PET (30% PET). Como esperado e descrito na literatura, quanto maior concentração do polímero na solução, maiores serão os diâmetros das fibras [171], porque maior é a quantidade de massa polimérica que pode ser transferida no jato, conforme mostrado anteriormente [121]. Por outro lado, a presença de algumas contas apenas na malha 30% PET, HFP:DCM (1:1) pode ser consequência da influência da maior tensão superficial dos solventes (DCM: 27,2 mN/m e HFP: 16,1 mN/m) [99], afetando o estiramento da superfície do jato carregado. A tensão superficial dos solventes contribui para a tensão superficial da solução a ser eletrofiada, e entende-se que, se a tensão superficial de uma solução aumenta, o processo de eletrofição pode ser inibido devido à instabilidade dos jatos, o que pode gerar contas [99].

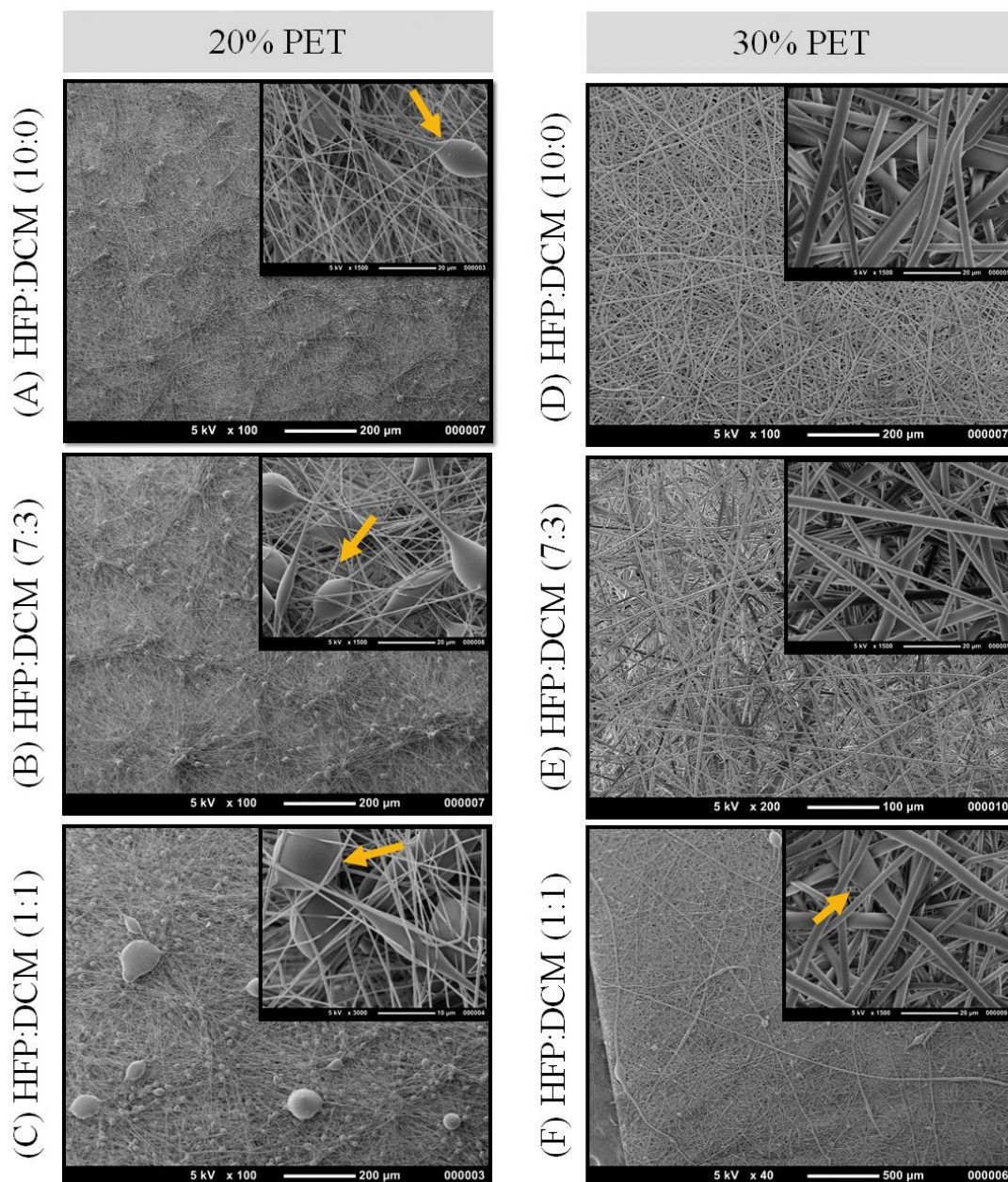


Figura 12 - Micrografias SEM e histogramas das malhas de PET

As setas em amarelo indicam a presença de contas.

HFP:DCM ($v_1:v_2$) é a mistura de HFP com DCM, os números mostrados entre parêntesis indicam as proporções dos volumes dos solventes misturados para a preparação da solução polimérica.

v_1 : corresponde ao HFP e v_2 : corresponde ao DCM

Após a avaliação morfológica de cada tipo de malha PET, a partir das micrografias de SEM foram medidos os diâmetros das fibras nas malhas eletrofiadas e foram construídos os histogramas.

O histograma é comumente utilizado como exploração gráfica para análise estatística com a finalidade de representar e analisar a distribuição de dados [172]. A representação dos dados inclui dois parâmetros: (i) a medida de tendência central e (ii) a medida da dispersão [173]. A medida da tendência central é o valor mais representativo ou típico para um conjunto de dados, entende-se como a direção para o valor mais central do conjunto de dados (representado pela média, mediana ou moda) [174]. A medida de dispersão inclui o desvio padrão, variância, erro padrão e intervalo de confiança [173]. Muitos trabalhos em eletrofiação usam os histogramas para representar a distribuição dos diâmetros das fibras, indicando o diâmetro médio. Acredita-se que partem do princípio de que a distribuição dos dados é normal, porque não apresentam um teste formal de normalidade. É importante demonstrar se uma distribuição é normal, porque do contrário, não podemos tirar conclusões precisas sobre a realidade.

Como partida da análise de dados, iniciamos com a representação típica de histogramas, que é a primeira etapa da avaliação da normalidade de nosso conjunto de dados (diâmetros das fibras). Assim, examinando o histograma teremos noção dos indícios de assimetrias, existência de descontinuidade de dados ou picos multimodais [175]. Da Figura 13, observa-se que, os histogramas das malhas 20% PET (Figura 13A, Figura 13B e Figura 13C) e as de 30% PET (Figura 13D, Figura 13E, Figura 13F) apresentam uma distribuição unimodal, mostrando uma distorção à esquerda (indícios de assimetria que sugerem uma distribuição não-normal). Características semelhantes são observadas no reportado por Veleirinho et al. [121] para malhas de PET, mostrando que distribuições de diâmetros das fibras possuem características unimodais com indícios de assimetria. Mas essas características podem ser controladas com os parâmetros a serem escolhidos no processo de eletrofiação. Como mostrado por Jafari et al. [176] na procura de arcabouços de malhas de PET, os dados apresentaram distribuição de diâmetros de fibras com características unimodais e indícios de simetria.

Observa-se que as malhas do tipo 20% PET (Figura 13A, Figura 13B, Figura 13C) possuem fibras de diâmetro médio em torno de 0,5 μm . Pelas características que evidenciam seus respectivos histogramas (indícios de assimetria), não é correto avaliar a variância (σ^2) como indicador de medida de dispersão. Porém podemos afirmar que 85% da população de dados é melhor representada pelo valor de 0,5 μm e 15% das fibras nas malhas possuem diâmetros entre 0,25 – 0,75 μm . Também podemos afirmar que as fibras

de 20% PET possuem dimensões menores quando comparadas com as fibras de 30% PET (Figura 13D, Figura 13E, Figura 13F), como justificado pelo aumento da concentração do polímero.

Dos histogramas das malhas de 30% PET, observamos uma maior dispersão de diâmetros das fibras naquelas obtidas apenas com HFP (Figura 13D, sistema HFP: DCM (10:0)), com média de 3,2 μm (diâmetro entre 0.7 – 12.8 μm). O diâmetro médio ($\sim 2 \mu\text{m}$) e a dispersão das fibras diminuiram nas malhas obtidas em presença de DCM (Figura 13E e Figura 13F). Esse comportamento pode estar relacionado com a constante dielétrica (ϵ); essa propriedade dos solventes nos fornece informação da possível susceptibilidade elétrica das soluções quando submetidas a um campo elétrico [177], como mostrado por Wannatong et al. [177], relacionando a maior ϵ com o aumento da massa através do transporte das soluções do jato. A ϵ do DCM ($\epsilon = 9,1$ [99]) é menor que a do HFP ($\epsilon = 16,7$ [99]), porém a presença de DCM nas soluções poliméricas (no sistema HFP:DCM) está relacionada com um ϵ intermediário que leva à formação de fibras mais finas.

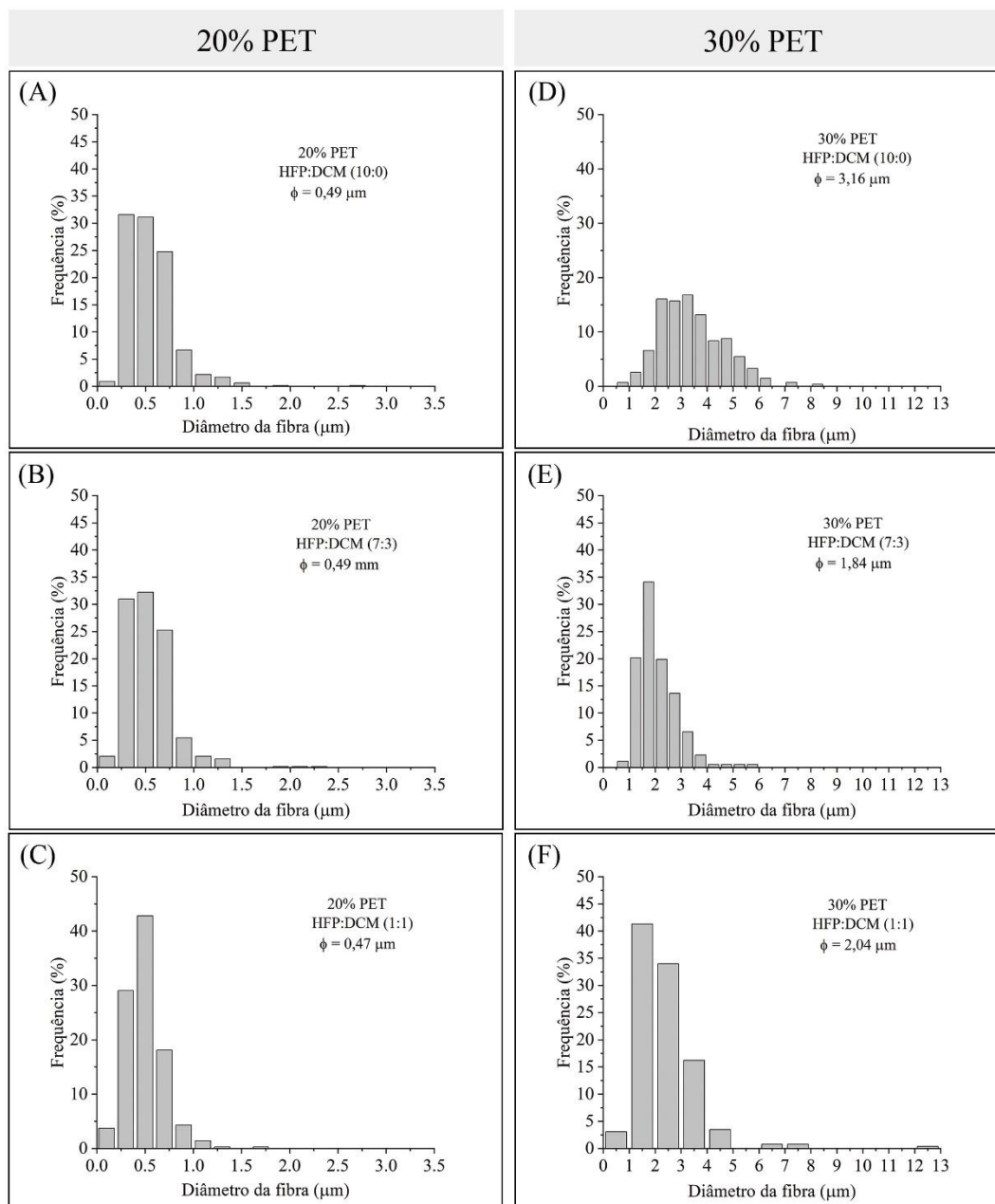


Figura 13 - Histogramas das malhas de PET

HFP:DCM ($v_1:v_2$) é a mistura de HFP com DCM, os números mostrados entre parêntesis indicam as proporções dos volumes dos solventes misturados para a preparação da solução polimérica. v_1 : corresponde ao HFP e v_2 : corresponde ao DCM.

Para cada tipo de malha, os diâmetros foram medidos a partir de oito micrografias SEM analisadas de oito locais diferentes de malha eletrofiada (cada malha com dimensões de 15x15 cm). Um total de 400 medições foram realizadas (50 medições de cada imagem).

ϕ : diâmetro médio das fibras

Como comentado anteriormente, a apresentação da distribuição de dados apenas pelo método gráfico é subjetiva, uma vez que mesmo que os métodos gráficos sejam úteis para verificar a normalidade dos dados, eles são incapazes de fornecer evidências conclusivas formais de que a suposição normal é válida [172]. Portanto, são necessários

testes estatísticos analíticos (testes de hipótese) para confirmar a conclusão obtida por algum método gráfico (histogramas, Q-Q plot ou box plot) [172, 174]. Assim, selecionamos as malhas livres de contas, ou seja, as 30% PET obtidas com apenas HFP e as com HFP:DCM (7:3).

Trabalhamos com o teste analítico de Kolmogorov-Smirnov (KS). O correto uso do teste KS é seu uso em conjunto com o teste de Lilliefors (ou chamado de teste KS corrigido com o teste de Lilliefors), que garante minimizar os riscos de se aceitar erroneamente a hipótese nula (H_0). Adicionalmente, é importante mencionar que a quantidade de dados tem grande influência: quanto maior o número de dados a serem avaliados por esse teste, menor é a probabilidade de erros, como verificado por Blain [178], o qual sugere o uso de mais de 30 dados.

O teste normalidade de KS-Lilliefors foi avaliado (usando o software *Statistica*) de forma que, para um nível de significância (α), se valor-p é menor que α , recusa-se a H_0 (H_0 : distribuição é normal), porém a distribuição seria não-normal [174, 179–181].

Na Figura 14, são apresentados os resultados da avaliação da normalidade das malhas 30% PET (sem contas), acompanhados de cada valor-p (com $\alpha = 0,05$) após os dados serem submetidos ao teste KS e, em paralelo, ao teste KS-Lilliefors. Para melhor compreensão visual, os dados são apresentados como um histograma (acompanhado de sua respectiva curva normalizada) e o gráfico de probabilidade normal (Normal P-plot). Assim, cada um desses métodos gráficos é importante, porque nos permitem entender visualmente a presença de valores empíricos (experimentais) comparados com os dados normais esperados. Dito isso, é possível chegar à conclusão de que as distribuições dos diâmetros para 30% PET em HFP:DCM(10:0) (Figura 13A) e HFP:DCM (7:3) (Figura 14B), por terem valor-p menor que 0,01 ($p < 0,05$, se recusa a H_0) segundo o teste KS-Lilliefors, não representam uma distribuição normal. Avaliando-se os histogramas e o gráfico Normal P-Plot (Figura 14A e Figura 14B), observou-se a mesma resposta de distribuição não-normal na repetição da condição HFP:DCM (7:3) (Figura 14C) e na alternativa HFP:CHCl₃ (7:3) (Figura 14D). Esta última mistura de solvente produz malhas sem diferença aparente com relação às obtidas da solução de 30% de PET em HFP:DCM (7:3), sendo essa uma possibilidade de uso.

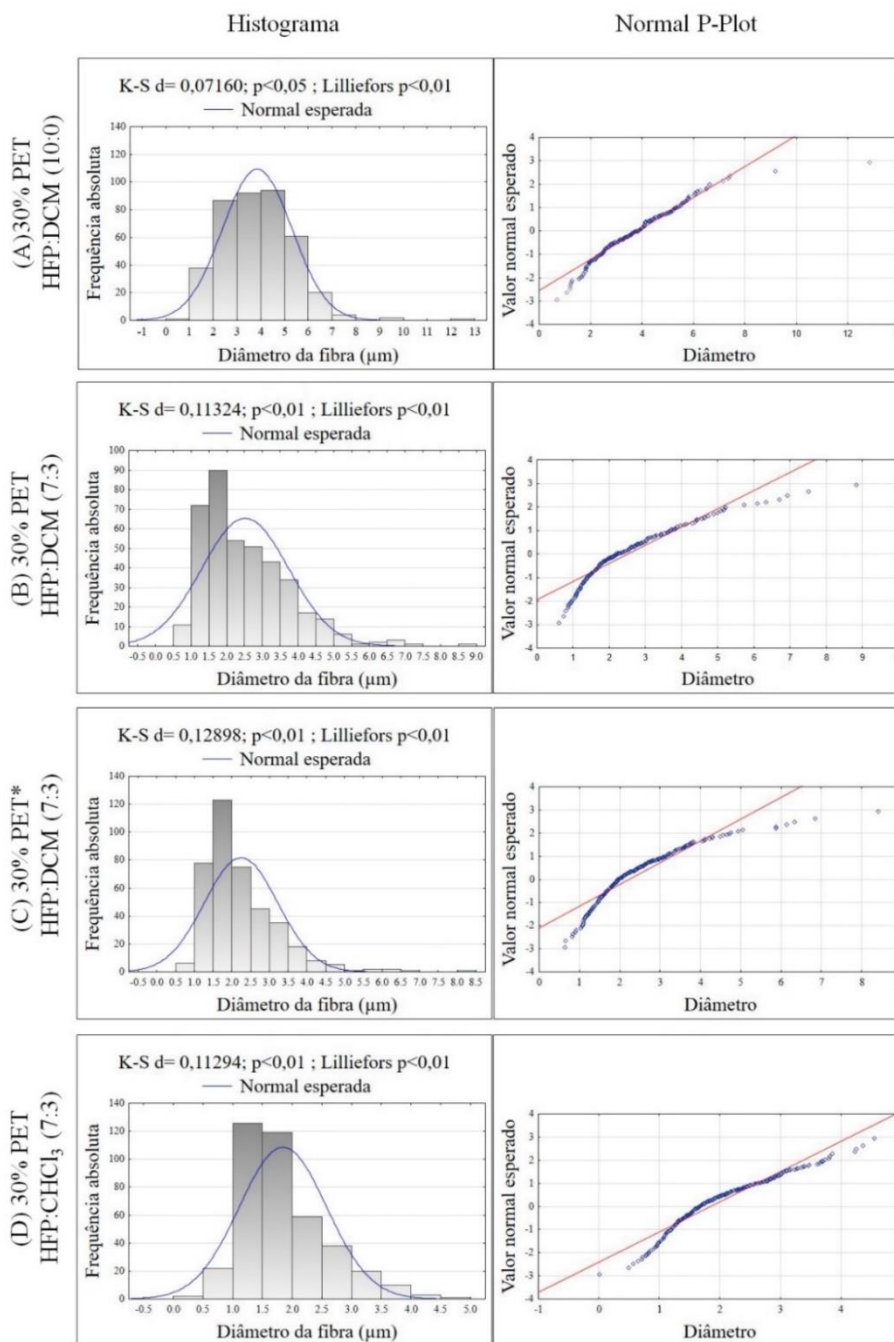


Figura 14 - Avaliação da normalidade da distribuição de dados em malhas 30% PET

*Repetição

A análise mostrada aqui foi apenas para as malhas de PET livres de contas valor-p, representado como “p”

K-S: teste Kolmogorov-Smirnov, se p-valor for menor que 0,05 ($\alpha = 0,05$) se recusa a hipótese nula (H_0), ou seja, os dados não seguem uma distribuição normal.

Linha azul no histograma: normal esperada, é a curva de Gauss caso os dados tivessem uma distribuição normal.

Normal P-Plot: Gráfico de probabilidade-probabilidade, compara a distribuição empírica (valores experimentais, pontos azuis) com uma função teórica (valor normal esperado, linha reta vermelha). Quando dados obtidos apresentam comportamento semelhante da reta do valor normal esperado, pode-se interpretar que a distribuição de dados mostra um padrão de normalidade

Demonstrado que os dados de diâmetros das fibras não apresentam uma distribuição normal, o *Boxplot* torna-se uma alternativa para representar melhor a distribuição dos diâmetros das fibras (Figura 15). Na Figura 15, pode-se interpretar que a condição A (30% PET/ HFP:DCM, 10:0, com $P_{25}= 2,71 \mu\text{m}$) revela que cerca de 25% das fibras apresenta diâmetro menor que $2,71 \mu\text{m}$. Enquanto que as outras condições B, C e D (com P_{75} próximo deste valor) revelam que existem quase 75% de dados com diâmetros menores que $2,71 \mu\text{m}$. Em relação à representação dos dados por *Boxplot* em todos os casos apresentados na Figura 15, a medida de tendência central pode ser representada pela mediana (P_{50}) e a medida da dispersão fornecida pode ser representada pelo valor do intervalo interquartil (IIQ). Dos resultados de IIQ das condições A, B, C e D (Figura 15), as malhas 30% PET em apenas HFP apresentam uma maior dispersão de diâmetros das fibras (IIQ= $2,05 \mu\text{m}$) quando comparadas com as obtidas da mistura HFP:DCM (7:3) ou HFP:CHCl₃ (7:3). Pela menor dispersão e menor uso de HFP, escolhemos trabalhar apenas com as malhas 30% PET obtidas de HFP:DCM (7:3), a qual designaremos apenas como 30PET.

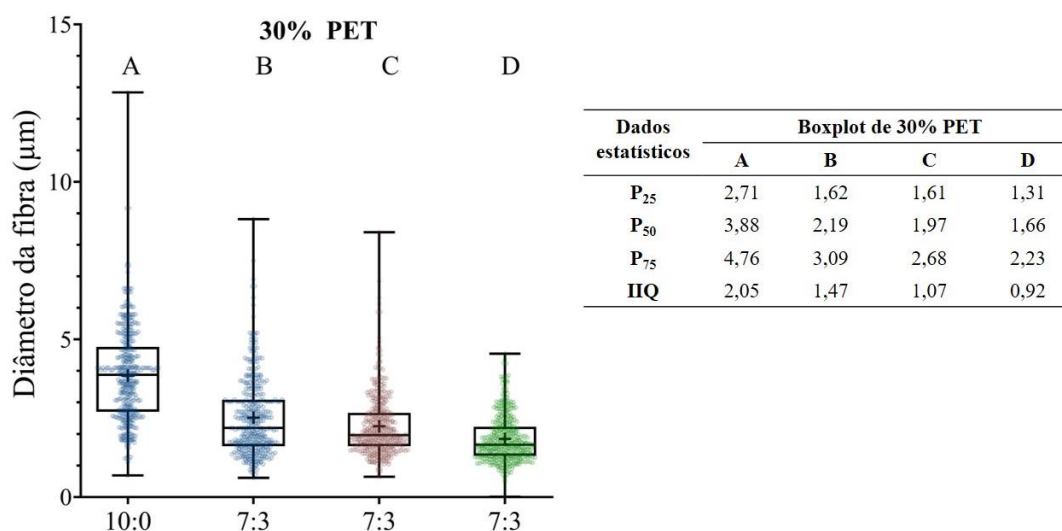


Figura 15 - *Boxplot* da distribuição de diâmetros de fibra de malhas 30% PET

P_{25} : primeiro quartil, P_{50} : segundo quartil, P_{75} : terceiro quartil, IIQ: intervalo interquartil, $IIQ = P_{75} - P_{25}$.
 A: 30% PET/ HFP:DCM (10:0), B: 30% PET/ HFP:DCM (7:3), C: repetição de 30% PET/ HFP:DCM (7:3), D: 30% PET/ HFP:CHCl₃ (7:3).

Nas malhas de PBT, aplicam-se os mesmos critérios de análise feitos (morfologia, histograma, teste de normalidade e *Box-plot*) com o PET. Foram preparadas soluções de 10% de PBT em três proporções de HFP:DCM (10:0; 7:3 e 1:1), da mesma forma para soluções de 20 e 30% de PBT, tendo sido possível eletrofiar todas as soluções. Do

contrário, as de 30% de PBT por conta da dificuldade de serem cortadas (muito rígidas) não foram caracterizadas, bem como tiveram sua possibilidade de uso também descartada.

As micrografias SEM nas malhas de PBT (Figura 16) revelam a presença de fibras mais finas nas malhas obtidas das soluções de 10% de PBT (10% PBT) quando comparadas com as malhas obtidas das soluções 20% de PBT (20% PBT). Nota-se que foram obtidas fibras com menor concentração de polímero PBT (10% e 20%) quando comparado com o PET (20% e 30%); isso se justifica pela maior massa molar de PBT ($M_v \sim 38$ kg/mol), que é quase o dobro do PET ($M_v \sim 18$ kg/mol). A massa molar do polímero pode ser relacionada ao número de emaranhamentos de cadeias de polímero em uma solução, conseguindo assim prever a possibilidade de se obter fibras de soluções menos concentradas com polímeros de maior massa molar [99].

A massa molar do polímero também influencia na geração de contas, como estudado por Gupta et al. [182]. Esses autores demonstraram que, quanto maior a massa molar do poli(metacrilato de metila) eletrofiado, menor a possibilidade de geração de contas. Geralmente, polímeros de alta massa molar fornecem soluções com maior viscosidade, possuindo maior estabilidade do jato no momento da eletrofiação [99]. Entendendo-se assim por que as malhas 20% PBT (Figura 16D, Figura 16E e Figura 16F) não apresentam contas, diferentemente das malhas 20% PET (Figura 12D, Figura 12E e Figura 12F). Nas malhas de PBT, a presença das contas é observada na Figura 16, correspondente a 10% PBT, sinalizada com setas amarelas.

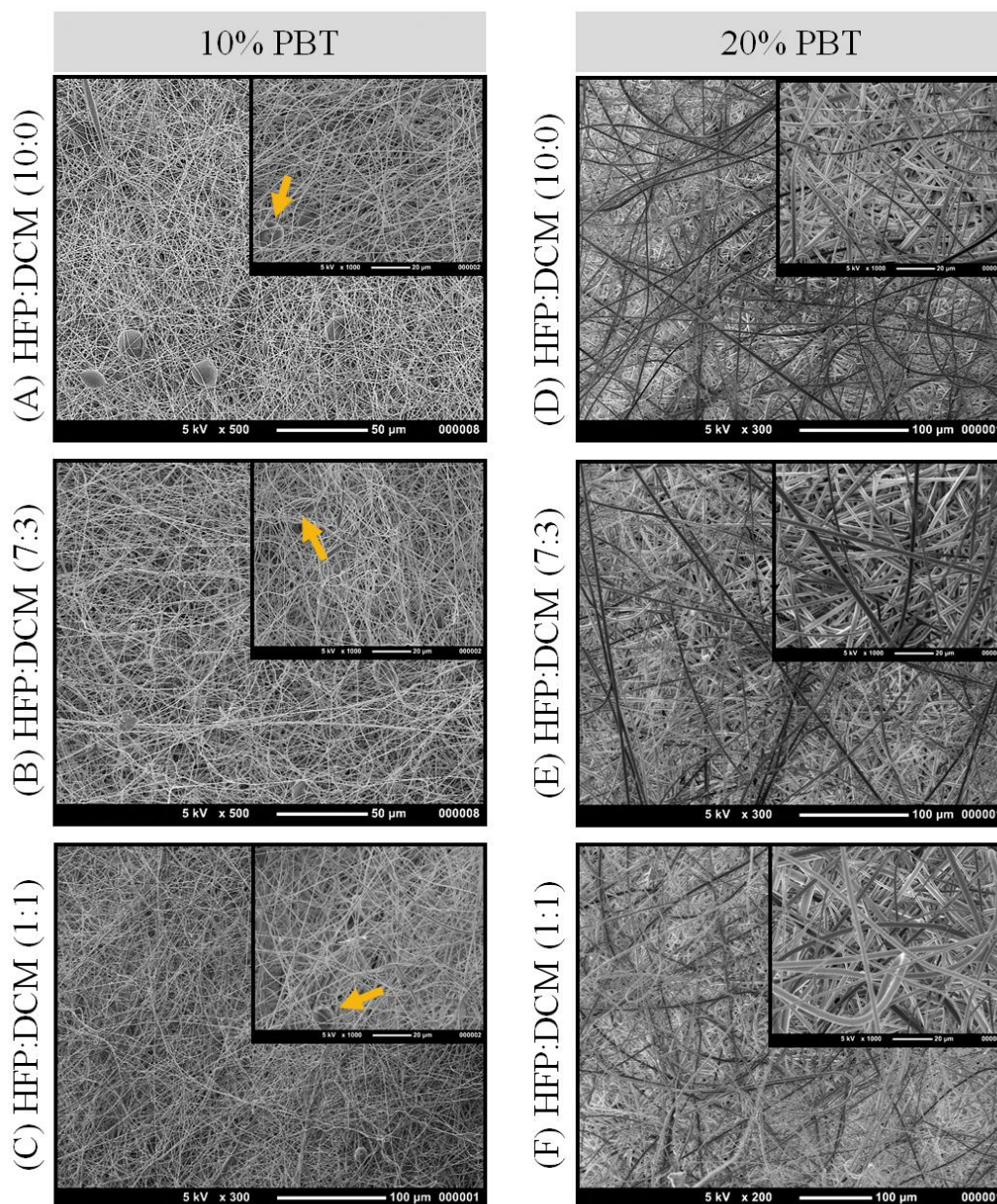


Figura 16 - Micrografias SEM e histogramas das malhas de PBT

As setas em amarelo indicam a presença de contas.

HFP:DCM ($v_1:v_2$) é a mistura de HFP com DCM, os números mostrados entre parêntesis indicam as proporções dos volumes dos solventes misturados para a preparação da solução polimérica.

v_1 : corresponde ao HFP e v_2 : corresponde ao DCM

Em todos os histogramas apresentados na Figura 17, são observadas distribuições monomodais, mostrando distorção à esquerda (indícios de assimetria que sugere uma distribuição não-normal). Os diâmetros das fibras nas malhas 10% PBT não superam os $2,5 \mu\text{m}$ e estão em torno de $0,5 \mu\text{m}$ (Figura 17A, Figura 17B e Figura 17C) e apresentam uma distribuição semelhante, independentemente das proporções de HFP:DCM usados. As maiores fibras são observadas, como esperado, nas malhas obtidas de soluções com

maior porcentagem de polímero (20% PBT) (Figura 17D, Figura 17E e Figura 17F), entre 2 e 4,5 μm , com diâmetro médio (~ 1 ; ~ 2 e 1,5 μm) diferente em cada mistura HFP:DCM (10:0; 7:3 e 1:1). Das chamadas malhas 20% PBT (Figura 17) obtidas apenas de HFP (Figura 17D), aproximadamente 60% dos diâmetros é melhor representado pelo valor médio (1,04 μm); em HFP:DCM (7:3) (Figura 17E), $\sim 70\%$ dos diâmetros são representados por 1,89 μm e no caso de HFP:DCM (1:1) (Figura 17F), 60% dos dados por 1,54 μm . Vale dizer que as malhas obtidas com a solução HFP:DCM (1:1) foram descartadas por apresentarem problemas de manuseio no momento de remover a malha do coletor (Figura 16F). Então, foi feita a avaliação da normalidade nas malhas obtidas de 20% de PBT em HFP e em HFP:DCM (7:3), pois estas se mostraram livres de contas e de fácil manipulação.

Com relação ao teste de normalidade dos dados para as malhas de PBT, na Figura 18, os resultados do teste KS-Lilliefors indicam valor-p menor que 0,01 ($p < \alpha$, para $\alpha = 0,05$) o que leva a recusar a H_0 , e, assim, conclui-se que as distribuições não são normais - concordante com o observado nas suas respectivas representações gráficas (Histograma com curva normal e Normal P-plot) dos dados empíricos vs seus dados normais.

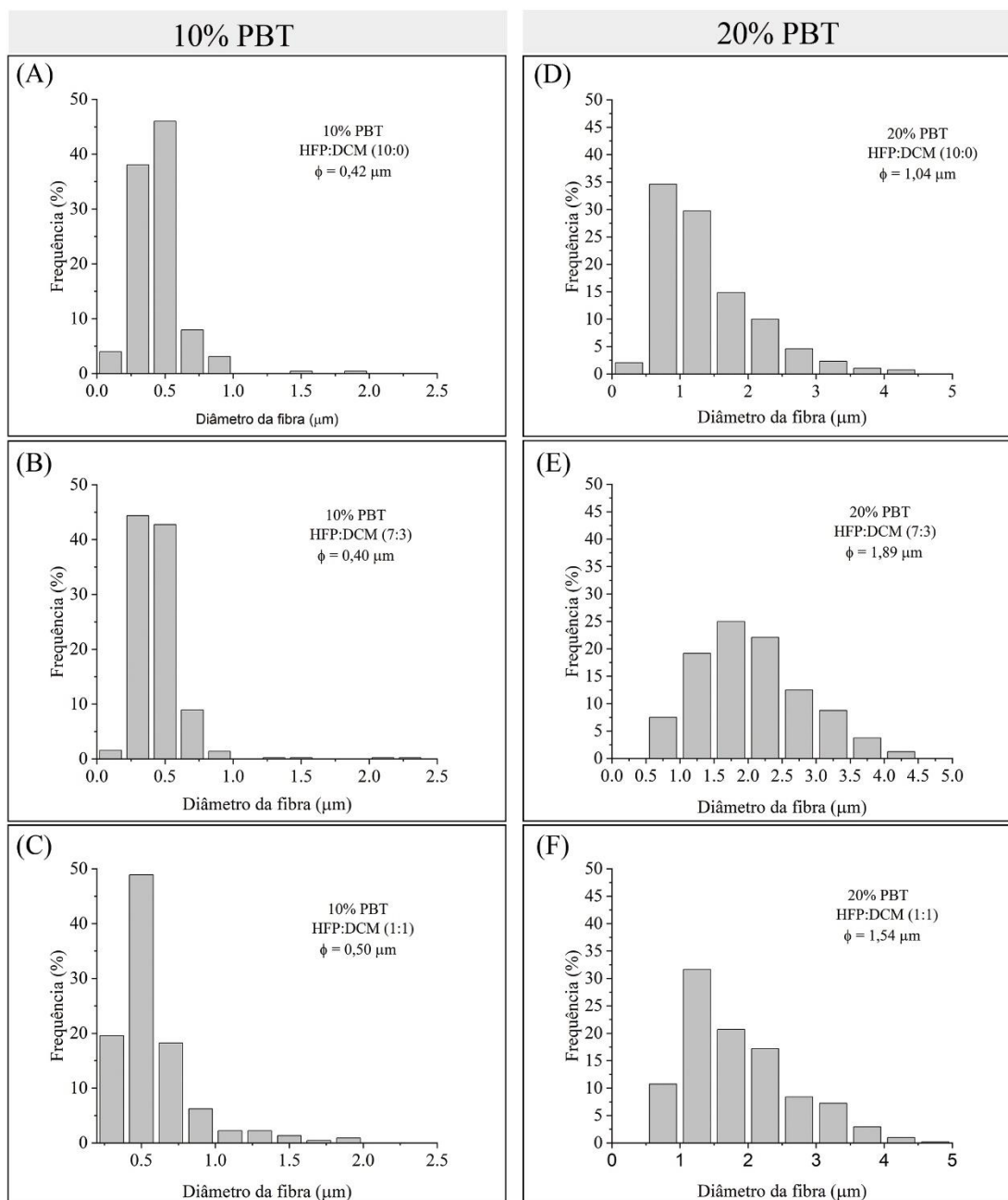


Figura 17 - Histogramas das malhas de PBT

HFP:DCM ($v_1:v_2$) é a mistura de HFP com DCM, os números mostrados entre parêntesis indicam as proporções dos volumes dos solventes misturados para a preparação da solução polimérica. v_1 : corresponde ao HFP e v_2 : corresponde ao DCM

Para cada tipo de malha, os diâmetros foram medidos a partir de oito micrografias SEM analisadas de oito locais diferentes de malha eletrofiada (cada malha com dimensões de 15x 15 cm). Um total de 400 medições foram realizadas (50 medições de cada imagem).

ϕ : diâmetro médio das fibras

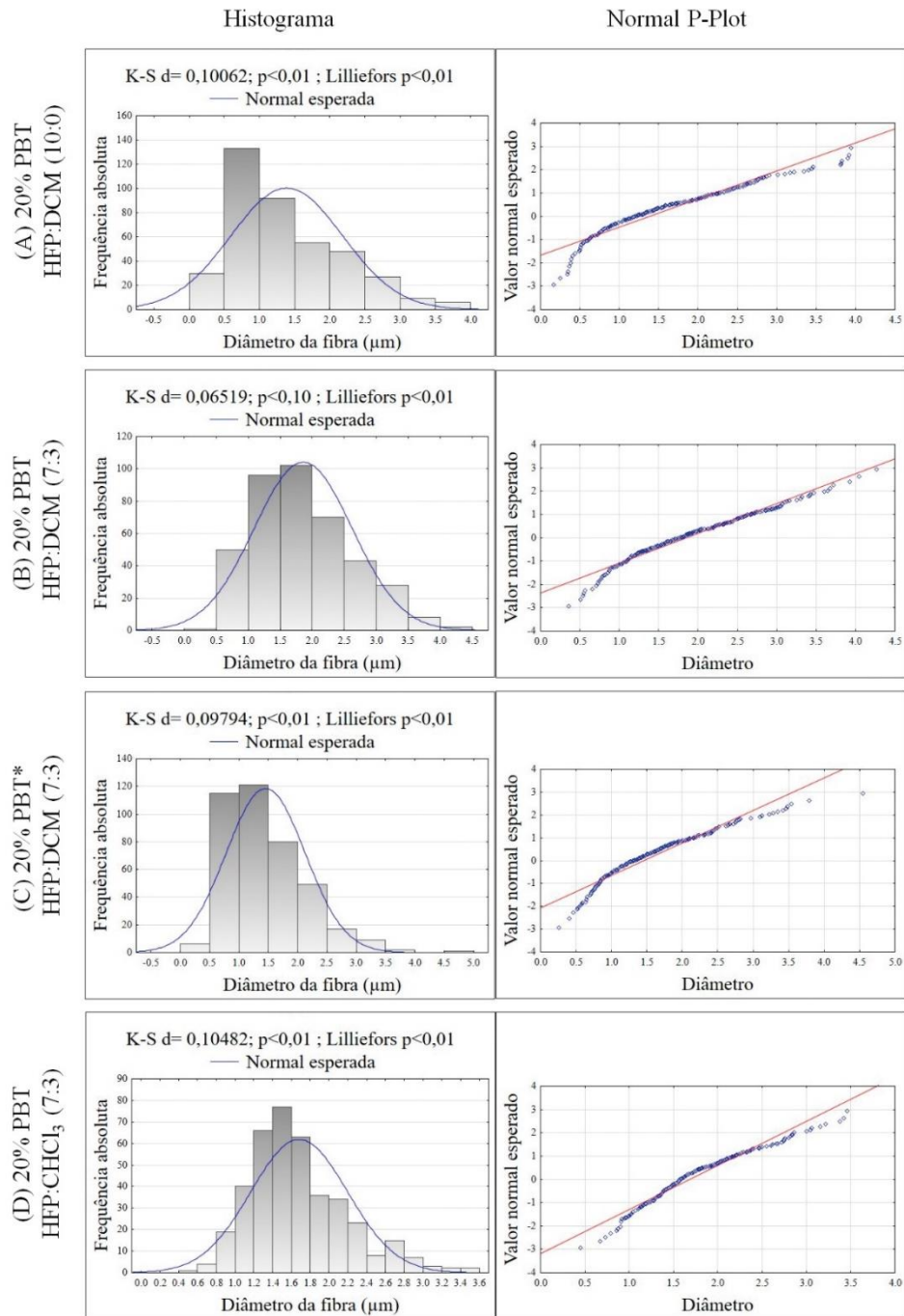


Figura 18 - Avaliação da normalidade da distribuição de dados em malhas 20% PBT

*Repetição

K-S: teste Kolmogorov-Smirnov, se p for menor que 0,05 (nível de significância) se recusa a hipótese nula (H_0), ou seja, os dados não seguem uma distribuição normal.

Linha azul no histograma: normal esperada, é a curva de Gauss caso os dados tivessem uma distribuição normal.

Da representação *Boxplot* (Figura 19) construída com os diâmetros avaliados na Figura 18, observamos que os diâmetros possuem medidas de tendência central $\sim 1,5 \mu\text{m}$ e medida da dispersão semelhantes, próximas a $1 \mu\text{m}$, o que nos sugere que apresentam distribuições que podem ser consideradas semelhantes. Em consequência desses resultados, optamos por trabalhar com a solução que possui menor proporção de HFP na produção das malhas 20% PBT (HFP:DCM (7:3)), a qual designaremos apenas como 20PBT.

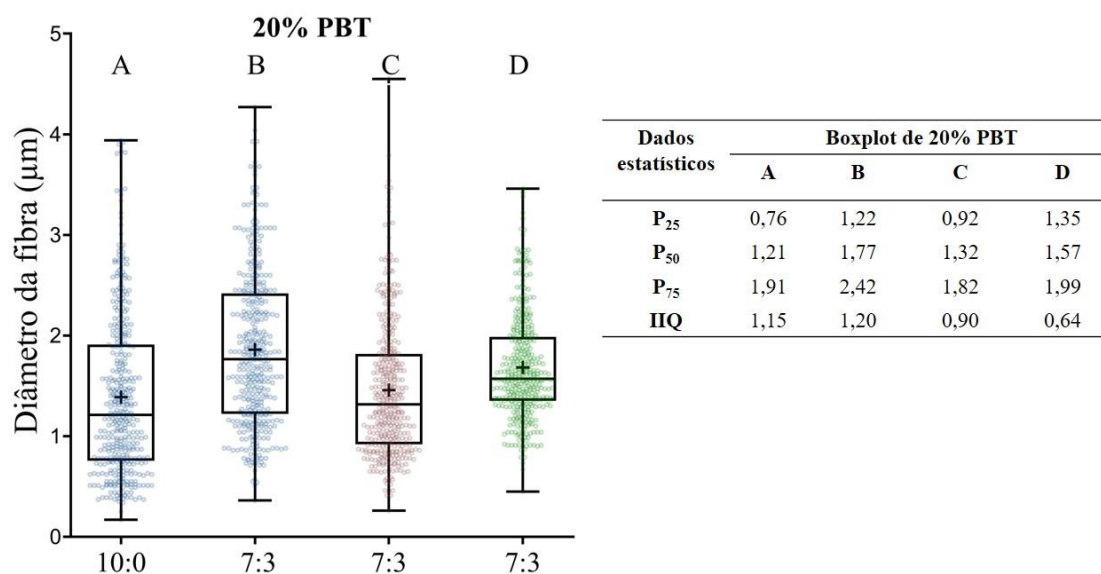


Figura 19 - *Boxplot* da distribuição de diâmetros de fibra de malhas 20% PBT

P₂₅: primeiro quartil, P₅₀: segundo quartil, P₇₅: terceiro quartil, IIQ: intervalo interquartil, IIQ= P₇₅-P₂₅.

A: 20% PBT/ HFP:DCM (10:0), B: 20% PBT/ HFP:DCM (7:3), C: repetição de 20% PBT/ HFP:DCM (7:3), D: 20% PBT/ HFP:CHCl₃ (7:3).

Com o N6/6, conseguimos estabelecer os parâmetros de eletrofiiação com coletor plano, para soluções de 12,5% de N6/6 em ácido fórmico com clorofórmio (AcF:CHCl₃). As micrografias obtidas por SEM (Figura 20A) para estas malhas (12,5N6/6) nos permitem observar uma superfície com espaçamentos menores entre as fibras, quando comparadas às obtidas para PET (Figura 12) e PBT (Figura 16). Na Figura 20, além do SEM, que nos revela presença de fibras muito finas livres de contas, é apresentado o histograma (Figura 20B), o qual nos sugere uma distribuição normal por sua aparente simetria em $0,11 \mu\text{m}$. De fato, podemos afirmar a partir do histograma que as fibras apresentam diâmetros na faixa de $0,05 - 0,25 \mu\text{m}$, sendo que aproximadamente 35% dos

dados possuem diâmetros em torno de $0,11 \mu\text{m}$. Para avaliar a reprodutibilidade dos resultados, três repetições experimentais na obtenção das malhas de N6/6 foram avaliadas com o teste da normalidade, os resultados são apresentados na Figura 21.

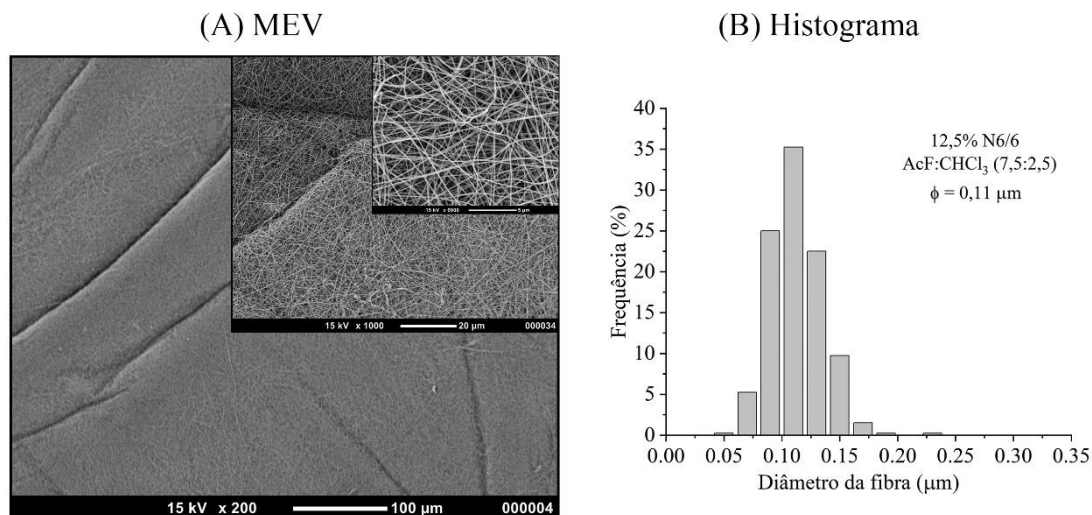


Figura 20 - Micrografias SEM e histogramas das malhas de N6/6 SEM das malhas apresentado juntamente ao histograma dos diâmetros das fibras. ϕ : diâmetro médio das fibras

Com relação à aplicação do teste de normalidade KS-Lilliefors (Figura 21), demonstrou-se que os dados não representam uma distribuição normal (valor-p menor que o nível de significância de 0,05), concordante com o observado entre a comparação gráfica do histograma e a curva normal esperada (linha azul), assim como o valor experimental do gráfico Normal P-plot comparado com o valor normal esperado (curva vermelha). Após a demonstração de que a aparente distribuição normal (julgada pela simetria do histograma da Figura 20) é uma suposição incorreta, nas três repetições, continuamos com a representação dos dados por *Boxplot* (Figura 22).

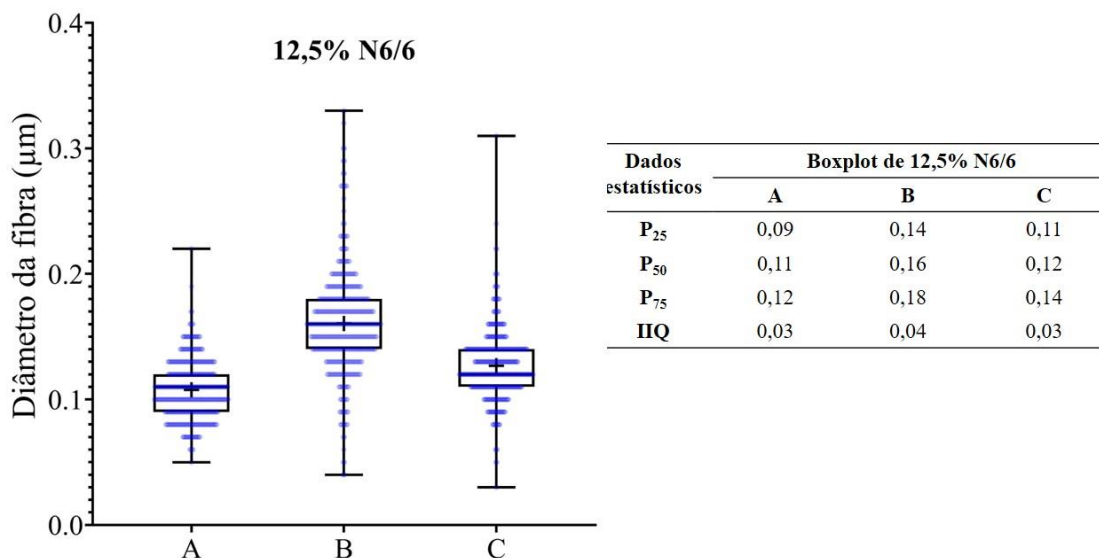


Figura 22 - *Boxplot* da distribuição de diâmetros de fibra de malhas N6/6
P₂₅: primeiro quartil, P₅₀: segundo quartil, P₇₅: terceiro quartil, IIQ: intervalo interquartil, IIQ= P₇₅-P₂₅.
A,B,C: repetições.

4.1.2 Porosidade das malhas

A porosidade é uma propriedade dos materiais relacionada ao volume, entendida como a medida do espaço vazio, quantificada como a relação entre o volume dos poros e o volume total de um material [183]. As porosidades das malhas eletrofiadas foram calculadas através da relação das densidades como explicado na seção 3.2.2.3. Este valor tenta determinar de modo aproximado a relação do espaço total (volume) produzido entre as fibras e o volume do material.

Os resultados são apresentados na Tabela 15, revelando porosidades próximas a 80%. As espessuras das malhas de 12,5N6/6 são as mais finas entre os três polímeros, seguidas pelas malhas de 20PBT que são 0,6 vezes mais finas que as de 30PET. Os valores de porosidade dessas malhas não podem ser relacionados pelas características de suas fibras por se tratar de materiais (polímeros) diferentes. Não se aplica o critério usado por outros pesquisadores, os quais identificaram a relação entre o diâmetro das fibras, os espaçamentos entre elas e sua relação com a porosidade em malhas, a exemplo do relatado por Soliman et al. [184] em malhas de PCL obtidas por eletrofição, e também por Aerts et al. [185] em malhas de fibras de titânio obtidas por compressão.

Tabela 15 - Porosidade das malhas eletrofiadas

Malha	Área (mm ²)	e (mm)	Porosidade (%)
30PET	268	0.45 ± 0,07	77 ± 1
20PBT	268	0.29 ± 0,04	80 ± 1
12,5N6/6	268	0.07 ± 0.01	82 ± 2

As malhas foram cortadas em quadrados de aproximadamente 16 x16 mm
e: espessura das malhas

30PET: malha obtida de soluções de 30% de PET em HFP:DCM(7:3)

20PBT: malha obtida de soluções de 20% de PBT em HFP:DCM (7:3)

12,5N6/6: malha obtida de soluções de 12,5% de N6/6 em AcF:CHCl₃ (7,5:2,5)

4.1.3 Ensaios térmicos

Os principais processos de degradação no ambiente natural são as degradações em condições hidrolíticas e fotolíticas [186]. Os PET, PBT e N6/6 são polímeros comumente utilizados na indústria e, conhecidamente, possuem taxas de degradação extremamente lentas – o que se configura como sendo uma das justificativas em nossa escolha. Assim, consegue-se garantir maior tempo de vida de prateleira das malhas. Ainda assim, realizaram-se ensaios para acompanhar a estabilidade e comportamento térmico das malhas eletrofiadas.

Algumas propriedades físicas podem ser caracterizadas com ajuda da análise térmica. A análise térmica abrange um grupo de métodos analíticos que realiza suas medidas em função da temperatura [187]. Neste estudo, trabalhamos com termogravimetria (TGA) e calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Os polímeros eletrofiados geram fibras que podem apresentar características amorfas ou semicristalinas diferenciadas ao polímero antes do processamento [188]. Sabe-se que o processamento de um polímero pode influenciar nas propriedades mecânicas e estabilidade térmica [189], como demonstrado por Kim et al. [190] na eletrofiação de PET em diferentes tensões elétricas (10, 13 e 15 kV), obtendo algumas diferenças nos valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c), temperatura de fusão (T_m), entalpia de fusão (ΔH_m) das malhas quando comparados com o polímero puro, mas poucas diferenças entre as mesmas malhas. Essas questões também foram discutidas por Wang et al. [188] com o PBT eletrofiado, tendo sido verificada a presença de cristalinidade nas fibras [188, 191–193]. Duhovic et al.

[139], por sua vez, observou algumas diferenças nas propriedades térmicas (T_m , ΔH_m) do náilon 6,6 segundo seu processamento (fio têxtil e filme).

As propriedades térmicas das malhas eletrofiadas fornecidas pelo DSC foram determinadas no primeiro ciclo (primeiro aquecimento) e não a partir do terceiro ciclo (segundo aquecimento). A análise no segundo aquecimento é muito comum para determinar as propriedades de polímeros, com a finalidade de remover a influência do histórico térmico e a recristalização heterogênea [134, 194]. No entanto, isso é o contrário do que queremos observar, uma vez que pretendemos entender a história térmica das malhas recém-eletrofiadas e compará-las com malhas eletrofiadas mantidas por três anos em nosso estoque experimental.

Nas Figuras 23, Figura 24 e Figura 25, observam-se os termogramas (TGA e DSC) das malhas 30PET, 20PBT e 12,5N6/6, respectivamente. Para cada tipo de malha, foram apresentados dois resultados, comparando as malhas antigas (em estoque por dois anos) com as novas (produzidas quando da realização desses ensaios).

A TGA das malhas 30PET (antigas e novas) (Figura 23A) mostra perda de massa de 1,9 e 8,5% (primeiro estágio), entre 75-110 °C devido à perda de água. Resultados similares para PET foram reportados por Lubna et al. [195]. Detectam-se perdas mais significativas de 85 e 77% que abrange faixas mais amplas de temperatura (350-500°C) semelhante ao mostrado por Kim et al. em PET eletrofiado (85% de perda de massa, no mesmo intervalo) [190], sendo esse o único estágio que apresenta seu TGA. Portanto, pode-se observar a partir do TGA que não houve alteração da degradação térmica entre as malhas 30PET.

Das propriedades obtidas por DSC das malhas 30PET (Figura 23B), observam-se que os termogramas apresentam a inflexão característica da T_g , seguida do processo exotérmico de cristalização a frio e finalmente o processo endotérmico de fusão, concordante ao relatado na literatura para PET (eletrofiado e não) [190]. Na Tabela 16, são apresentados os dados de temperaturas e entalpias envolvidos em cada processo antes mencionado, para as malhas 30PET.

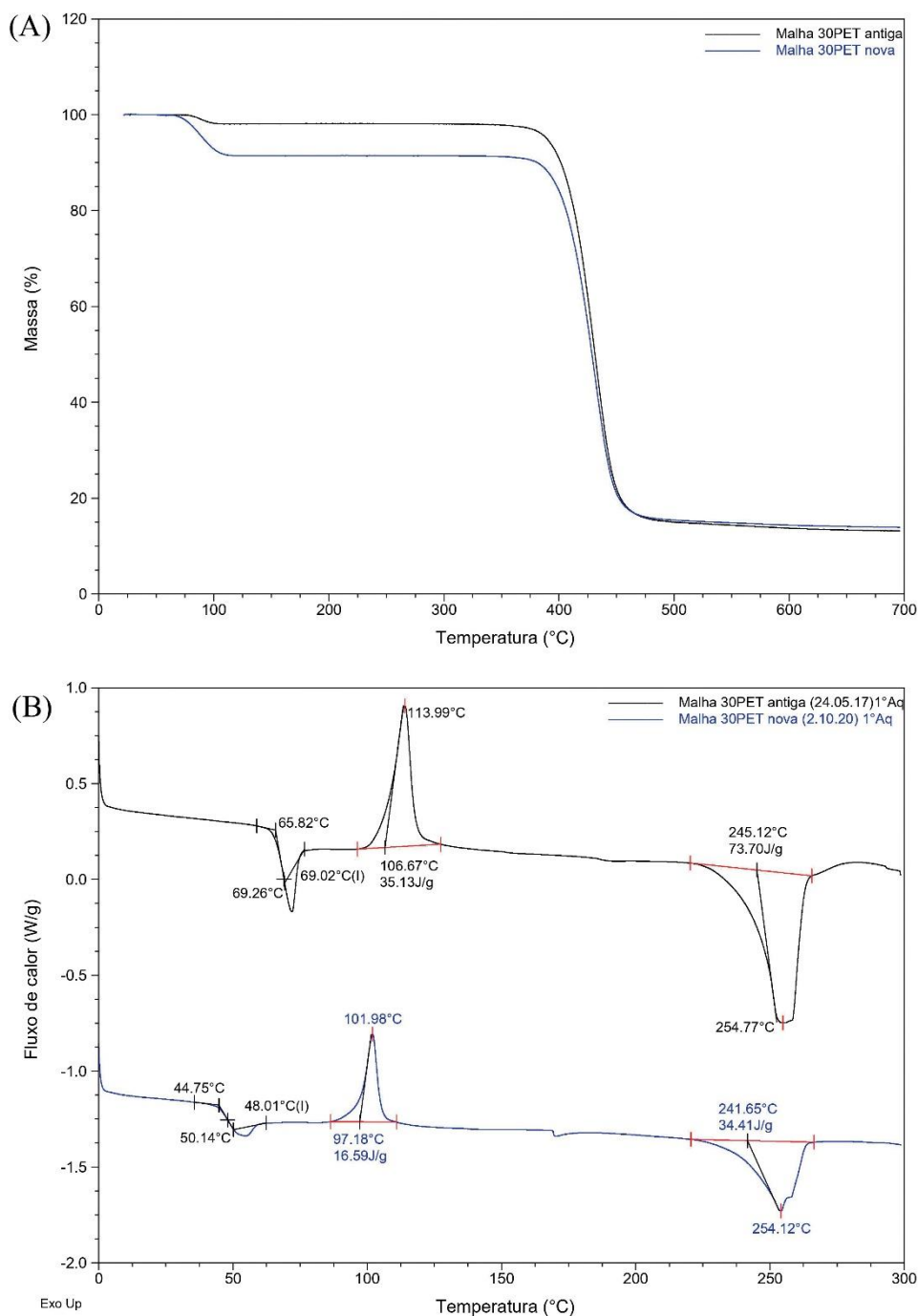


Figura 23 - Análise térmica das malhas 30PET: (A) Curvas de TGA e (B) Curvas de DSC

Curvas pretas e azuis correspondem as malhas antigas e novas respectivamente.

Malhas antigas são as malhas mantidas em estoque por dois anos comparadas com malhas produzidas

Curvas de DSC são as curvas do primeiro aquecimento.

Em cada curva DSC observa-se: inflexão (Tg), pico exotérmico (cristalização), pico endotérmico (fusão)

Tabela 16 - Comportamento térmico das malhas eletrofiadas 30PET, obtidas por DSC

Malha	Transição vítrea	Cristalização		Fusão		X _c %
	T _g (°C)	T _c (°C)	ΔH _c (J/g)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	
Antiga	69,3	114,0	35,1	254,8	73,7	54
Nova	48,0	102,0	16,5	254,1	34,4	25

T_g: temperatura de transição vítrea, T_c: temperatura de cristalização, T_m: temperatura de fusão, ΔH_c: entalpia de cristalização, ΔH_m: entalpia de fusão, X_c: cristalinidade

A observação da T_g nas malhas de 30PET é esperada por ser própria da característica do polímero semicristalino. Adicionalmente, sabe-se que o PET possui uma estrutura chamada fase mesomórfica que é uma estrutura intermediária entre a estrutura amorfa e cristalina. A fase mesomórfica pode atuar como precursora da cristalização a temperaturas maiores do que a T_g. Quando o PET é eletrofiado induz a orientação molecular, a qual converte as fibras num agente para desencadear a morfologia do cristal da matriz [137, 196, 197]. Dito isso, poderíamos justificar a diferença do maior valor de T_g nas malhas 30PET(antigas) quando comparadas com as novas, por uma presença de fase metaestável mais complexa, induzida provavelmente pelo tempo, o que poderia ter contribuído em uma maior interação de reorientação (fase mesomórfica mais complexa). Concordante com este achado, observam-se os valores ΔH_c (35,1 J/g), ΔH_m (73,7 J/g) maiores na malha mais antiga de 30PET, relacionando-se com seu maior valor de cristalinidade (54%). Por outro lado, os valores de T_c e T_m mantiveram-se quase semelhantes, independentemente do tempo de envelhecimento da malha, sendo ~101 e 245 °C respectivamente. Esses valores de T_c e T_m de malhas eletrofiadas estão na faixa do reportado por Wang et al. [196] no seu trabalho com malhas eletrofiadas de PET (14 - 26 kg/mol).

As respostas obtidas por TGA e DSC para as malhas de 20PBT são apresentadas na Figuras 24A e 24B respectivamente. Dos termogramas, observam-se respostas semelhantes quando comparadas as malhas antigas e novas, com degradação térmica entre 325 - 450 °C (como relatado por Saeed et al.[198]) com perda de massa em torno de 95%, gerando resíduos de 7,4% (20PBT antiga) e 2,7% (20PBT nova). Portanto, pode-se observar a partir do TGA que não houve alteração no intervalo de degradação térmica entre as duas malhas 20PBT.

Da Figura 24B, observa-se que os termogramas DSC das malhas 20PBT aparentam ser semelhantes, revelando presença da transição vítrea, um evento endotérmico (fusão) e um evento exotérmico após terminar a fusão. O evento exotérmico (225-275 °C) é reportado em alguns trabalhos com PBT, justificando sua presença como resultado de uma reação de cura do material [199]. Por outro lado, nota-se diferença das curvas DSC nas malhas 20PBT quando comparadas com as apresentadas do 30PET (Figura 23B), pela ausência do evento exotérmico da cristalização a frio. Essas diferenças foram semelhante aos resultados reportados por Wang et al. [188], os quais compararam as capacidades de nucleação nas malhas de PET e PBT, demonstrando que são desenvolvidas mais áreas amorfas no PET do que no PBT após o processo de eletrofiação, origem das diferentes taxas de cristalização desses polímeros (PBT>PET).

No aquecimento das malhas 20PBT da análise por DSC, foram obtidos valores de T_g em torno de 55 °C (Tabela 17), resultando maior que o reportado por Cozza et al. [192] (49 °C). Dos valores apresentados na Tabela 17, note-se que a T_m em ambos os tipos de malha 20PBT é a mesma (~212 °C) com valores muito próximos de ΔH_m (entre 46,7 e 50,1 J/g) sugerindo a não reorganização das regiões amorfas em regiões cristalinas com o tempo. O valor de X_c das malhas 20PBT é ~ 34%, muito próximo ao reportado por Wang et al. (39%) em malhas de PBT com diâmetro médio de 0,6 μm e polímero com massa molar de 40 kg/mol [188].

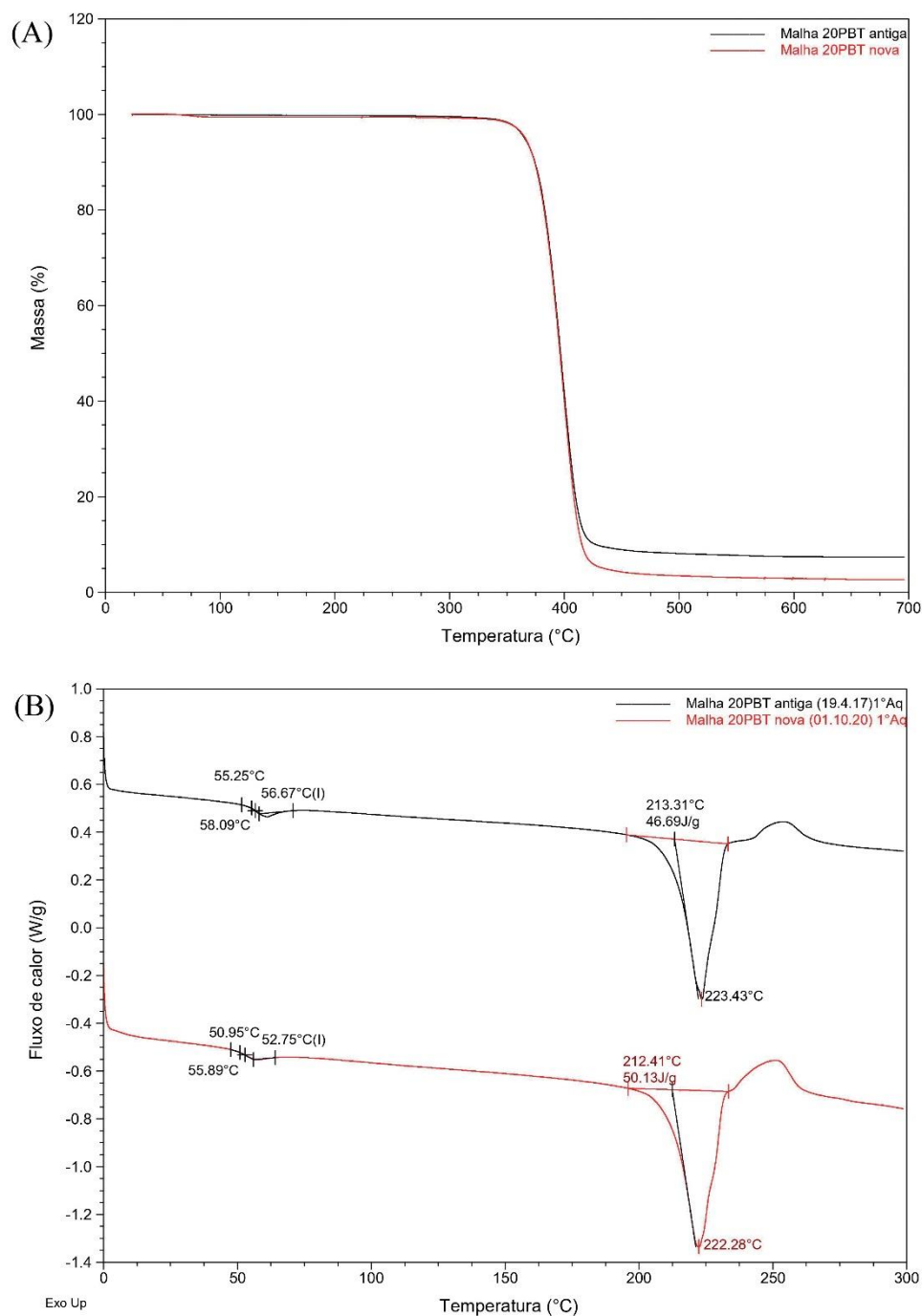


Figura 24 - Análise térmica das malhas 20PBT: (A) Curvas de TGA e (B) Curvas de DSC

Curvas pretas e vermelhas correspondem as malhas antigas e novas respectivamente.

Malhas antigas são as malhas mantidas em estoque por dois anos comparadas com malhas produzidas

Curvas de DSC são as curvas do primeiro aquecimento.

Em cada curva DSC observa-se: inflexão (T_g), pico endotérmico (fusão)

Tabela 17 - Comportamento térmico das malhas eletrofiadas 20PBT, obtidas por DSC

Malha	Transição vítrea	Fusão		X _c %
	T _g (°C)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	
Antiga	56,7	223,4	46,7	33,4
Nova	52,8	222,3	50,1	35,8

T_g: temperatura de transição vítrea, T_c: temperatura de cristalização, T_m: temperatura de fusão, ΔH_c: entalpia de cristalização, ΔH_m: entalpia de fusão, X_c: cristalinidade

Finalmente, da caracterização por análise térmica como parte do monitoramento dos três tipos de malhas eletrofiadas, apresenta-se na Figura 24 os termogramas (TGA e DSC) obtidos das malhas 12,5N6/6.

A TGA (Figura 25A) revela a presença de três eventos principais (nas malhas 12,5N6/6) com o aumento da temperatura. Além de se apresentar o termograma TGA, mostramos suas respectivas derivadas das curvas para melhor visualização e acompanhamento da interpretação dos resultados da análise, visto que se trata de um perfil mais complexo quando comparado com os termogramas (TGA) dos outros polímeros (malhas).

O primeiro evento é relacionado com a liberação de solventes voláteis ou água adsorvida do meio ambiente (25-60°C). O segundo evento (150-270°C), com uma perda de menos de 1% de massa, pode ser associado à liberação de oligômeros de baixo peso molecular, como relatado por Vahabi et al. [200] em TGA de poliamidas. O último evento, associado à degradação térmica da poliamida, iniciou-se em 300 °C e terminou em ~500 °C para ambas as malhas (antigas e novas). No entanto, nessa última faixa de temperatura (300-500 °C), percebe-se que os termogramas apresentam diferente taxa de perda de massa quando comparados para uma mesma temperatura, sendo a perda maior para a malha 12,5N6/6 (nova), o que indica uma maior estabilidade térmica na malha antiga.

É conhecido da literatura que poliamidas 66 reticulam muito facilmente durante a degradação térmica ou termo-oxidativa. A reticulação é relacionada com a polimerização das ligações insaturadas criadas pela ligação alquimida, gerando estruturas mais estáveis termicamente segundo Vahabi et al. [200], refletindo-se na diminuição da taxa de perda da massa a partir de 450 °C. Aquela temperatura associada ao início da degradação de estruturas mais complexas (produto de reticulações) é observada nas malhas 12,5N6/6 (Figura 25A, sinalizada com setas pretas) em 459 °C (malha antiga) e 440 °C (malha

nova). Esses resultados sugerem a geração de estruturas mais estáveis na reticulação para as malhas antigas.

No DSC das malhas 12,5N6/6 (Figura 25B), observa-se a presença de duas transições, semelhante ao apresentado por Simal et al. [201] e dos Santos et al. [202] na caracterização de estruturas de fibras de náilon 6,6. A primeira transição pode estar associada a três processos: transição Brill, endoterma pré-fusão e evaporação do solvente residual [202]. A transição de Brill mostra uma transição de fase polimórfica, que no náilon 6,6 se relaciona com a transição da estrutura tricíclica (fase alfa) para pseudoexagonal em 162 °C [203]. Feldman et al. [203] menciona que a transição de Brill de um material com maior nível de orientação cristalina e ordem de empacotamento, apresenta maior T_B (temperatura de transição de Brill), e náilon 6,6 cristalizado apresenta valores de $T_B \sim 160-225^\circ\text{C}$. Dito isso, na Figura 24B, nota-se (nas caixas amarelas) que as temperaturas (T_B) associadas à transição de Brill são diferentes, sendo maior na malha antiga quando comparada com a malha nova (dados apresentados na Tabela 18), sugerindo que, com o passar do tempo, induz-se um maior nível de orientação cristalina nas malhas desse tipo de polímero.

A outra transição observada (Figura 25B) é a de fusão das malhas de 12,5N6/6. Observou-se que ambas (antiga e nova) apresentam dois processos endotérmicos com $T_{m1} \sim 255^\circ\text{C}$ e $T_{m2} \sim 261^\circ\text{C}$, que são valores próximos ao reportado por Guerrini et al. [125] em DSC de malhas eletrofiadas de náilon. A presença dos dois picos de fusão são atribuídos à formação de estruturas com diferentes fases cristalinas: no primeiro evento, (fusão de pico menor) é considerada a presença de um cristal imperfeito (absorvendo ΔH_{m1} para fundir), enquanto o segundo evento de fusão corresponde a uma fase mais organizada (fase alfa) - este último, por sua vez, funde-se utilizando ΔH_{m2} [125]. Segundo Guerrini et al. [125], um dos fatores que pode induzir a cristalização de náilon na produção de malhas eletrofiadas é a facilidade do alinhamento das macromoléculas do náilon 6,6 para formar fortes ligações de hidrogênio entre as moléculas, sendo coerente com o trabalho descrito por Wu et al. [204], que demonstra que a presença de fase alfa cristalina é induzida após um processo de alongamento ou tensão.

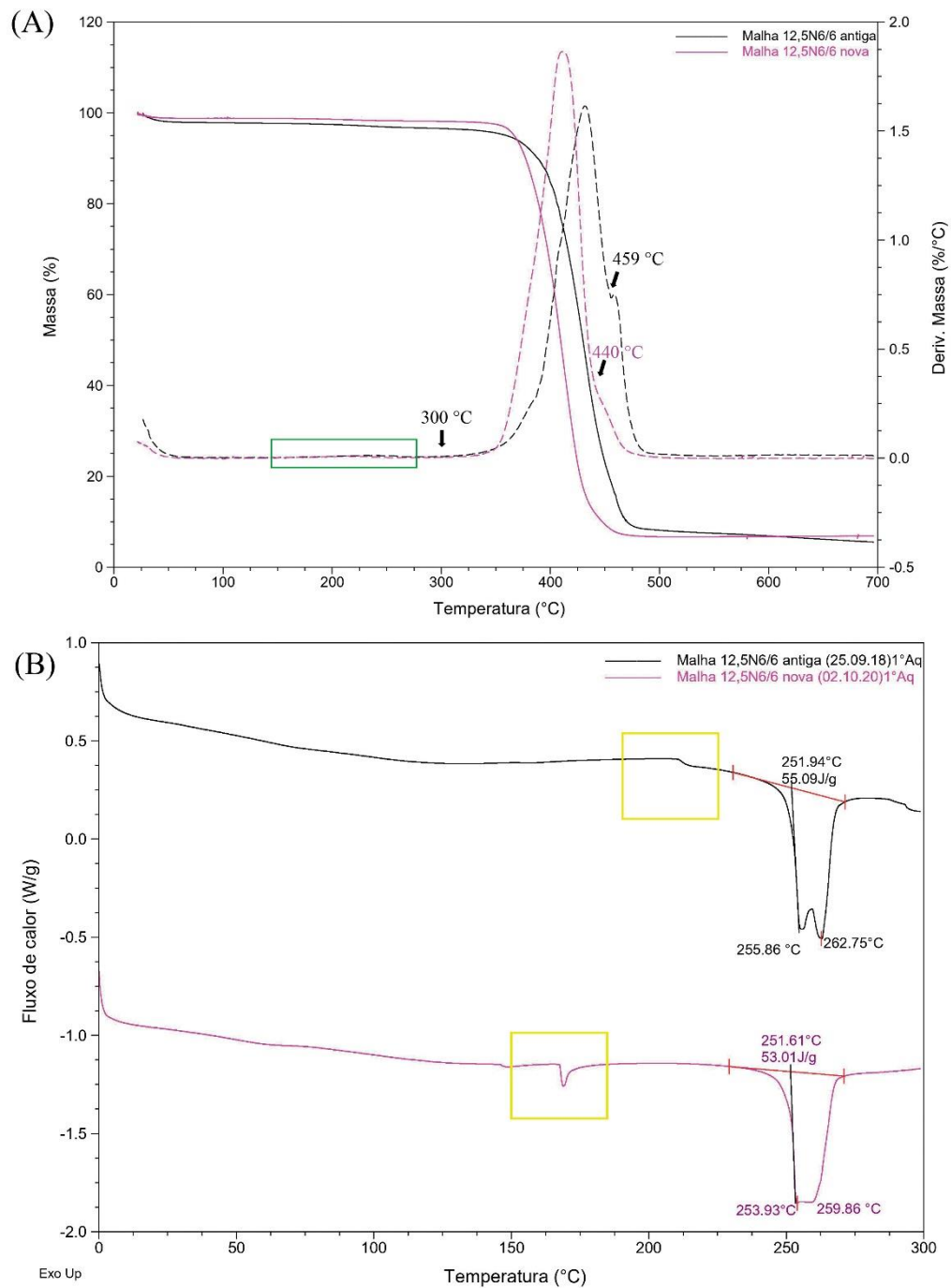


Figura 25 - Análise térmica das malhas 12,5N6/6: (A) Curvas de TGA e (B) Curvas de DSC

Curvas pretas e azuis correspondem as malhas antigas e novas respectivamente.

Malhas antigas são as malhas mantidas em estoque por dois anos comparadas com malhas produzidas
Curvas de DSC são as curvas do primeiro aquecimento.

Tabela 18 - Comportamento térmico das malhas eletrofiadas 20PBT, obtidas por DSC

Malha	Transição Brill		Fusão		X _c %
	T _B (°C)	T _{m1} e T _{m2} (°C)	ΔH _{m1} + ΔH _{m2} (J/g)		
Antiga	212	256 e 263	55,9		55,9
Nova	~168	254 e 260	53,0		53,0

T_B: temperatura de transição de Brill, T_m: temperatura de fusão, ΔH_m: entalpia de fusão, X_c: cristalinidade

O grau de cristalinidade foi determinado a partir das entalpias de fusão (Tabela 18), obtendo-se valores muito próximos entre as malhas (antiga e nova) e sendo maior ao reportado para poliamidas eletrofiadas M_w > 29 kg/mol e fibras de diâmetro ~ 0,5 μm [125]. Esses resultados sugerem que o tempo em estoque das malhas não tem influência significativa sobre a cristalinidade.

4.1.4 Ângulo de contato das superfícies poliméricas

Sabe-se que o ângulo de contato (Θ) medido em superfícies absorventes, porosas, rugosas gera questionamentos, uma vez que essas características podem diminuir o ângulo “real”, visto que a gota pode ser embebida pela superfície estudada [205]. Entendemos também que o ângulo de contato nos fornece informação da molhabilidade da superfície, que é a capacidade de uma gota de líquido se espalhar naquela superfície [206]. A molhabilidade pode ser entendida como uma propriedade produto das interações intermoleculares que caracterizam o grau de espalhamento em uma superfície sólida por uma gota de líquido, estando relacionada às componentes de tensão superficial do líquido e às propriedades físico-químicas da superfície.

Conhecer as propriedades da superfície do material para compreender sua relação com as respostas celulares é importante. O tipo de interação (célula-material) é dependente das propriedades dos materiais, como topografia, hidrofobicidade ou hidrofobicidade, química e energia de superfície [207]. Atualmente, é aceita a generalização na qual a adesão, propagação e/ou diferenciação de células em superfícies poliméricas está relacionada aos componentes da energia de superficial do sólido (γ_s^{LW} e/ou γ_s⁻ e/ou γ_s⁺).

Para esta caracterização, preparamos filmes finos com as soluções poliméricas (mesmas concentrações e condições das soluções eletrofiadas). Os filmes foram obtidos por recobrimento por centrifugação (*spin coating*).

Na Tabela 19, são apresentados os valores dos ângulos de contato obtidos com água Milli-Q, glicerol e CH_2I_2 , em superfícies dos filmes de 30PET, 20PBT e 12,5N6/6, junto com os valores da energia de superfície (Υ_s), assim como seus respectivos componentes (Υ^{LW} , Υ^- , Υ^+). O valor de Υ_s de cada superfície polimérica é próxima de 48,8 mJ/m^2 . Da mesma forma, o valor da componente Υ^{LW} de cada um está em torno de 47,6 mJ/m^2 . Por outro lado, dos valores polares ácido (Υ^+) - base (Υ^-) se observa que em cada um dos polímeros predomina o parâmetro básico, sendo 5,49 mJ/m^2 (30PET), 9,99 mJ/m^2 (20PBT) e 31,67 mJ/m^2 (12,5N6/6). Esses resultados podem indicar a importância de se relacionar o comportamento celular com as interações intermoleculares na superfície em que o cultivo será realizado. Como demonstrado por De Bartolo et al. [208] na seleção de membranas poliméricas (com e sem modificação) que possam ser citocompatíveis, avaliou-se o comportamento celular (adesão e comportamento metabólico) e sua relação com os parâmetros da energia de superfície. A partir de seus dados de adesão celular, encontrou-se uma correlação entre a síntese de ureia e o parâmetro básico (Υ_s^-) da tensão superficial da membrana polimérica. As células sintetizavam mais ureia com o aumento do valor do Υ_s^- .

Nossos resultados foram obtidos em superfícies planas, mas sabe-se que, ao mudar a topografia, essas interações podem ser intensificadas com possíveis acréscimos na adesão, proliferação ou diferenciação celular.

Tabela 19 - Ângulo de contato, Energia de superfície e seus componentes em superfícies lisas de 30PET, 20PBT e 12,5N6/6

Filme	$\Theta_{\text{H}_2\text{O}}$ (°)	Θ_{glicerol} (°)	$\Theta_{\text{CH}_2\text{I}_2}$ (°)	Υ^{LW} (mJ/m^2)	Υ^- (mJ/m^2)	Υ^+ (mJ/m^2)	Υ_s (mJ/m^2)
30PET	75,8 ± 1,3	62,4 ± 1,8	20,6 ± 3,0	47,56	5,49	0,08	48,80
20PBT	71,2 ± 1,6	63,2 ± 2,8	16,8 ± 5,4	48,49	9,99	0,03	49,53
12,5N6/6	50,2 ± 2,6	55,6 ± 2,3	23,4 ± 1,9	46,69	31,67	0,04	48,13

Θ : ângulo de contato, (Υ^{LW} , Υ^- , Υ^+): componentes da energia superficial dos sólidos, composta pelas contribuições dispersivas Lifshitz-van del Waals (Υ^{LW}) e polares (Υ^- , Υ^+); Υ^+ :aceptor de elétrons; Υ^- : doador de elétrons.

Filmes produzidos por *spin coating* a partir das mesmas soluções poliméricas usadas na eletrofiiação.

Por se tratar de polímeros diferentes (PET, PBT, N6/6) não faremos uma comparação direta entre eles, mas podemos mencionar que conseguimos demonstrar nos próximos resultados a existência de adesão, proliferação e diferenciação celular sobre as malhas eletrofiadas.

4.2 PRODUÇÃO DE PELE

Um dos objetivos deste estudo foi produzir peles humanas *in vitro* sobre malhas eletrofiadas com a finalidade de fornecer modelos epidérmicos tridimensionais. Esses modelos são conhecidos na literatura como equivalentes de pele humana (EPH) [7]. As EPHs podem ser FTS ou RHE. O modelo FTS é composto pela derme (presença de fibroblastos) e epiderme (presença de queratinócitos estratificados até gerar estrato córneo) [7, 209], enquanto o modelo RHE não possui derme [210, 211]. As EPHs se tornaram uma opção muito importante para avaliar os riscos de produtos tópicos, por serem construções que mimetizam a organização, diferenciação, função e composição celular da pele nativa [212].

Além da influência química, as características físicas dos arcabouços podem influenciar na morfologia, migração e diferenciação celular [107, 213]; por exemplo, num arcabouço fibroso, a orientação das fibras pode influenciar na viabilidade e proliferação das células, modificando a orientação celular no desenvolvimento do tecido [214]. Porém, para obter informação prévia do comportamento celular em nossas malhas antes de seguir os protocolos para construção de EPHs, avaliamos a viabilidade e proliferação das células (fibroblastos e queratinócitos) em cultura sobre as malhas de 30PET, 20PBT e 12,5N6/6.

Sob o contexto recém exposto e seguindo os protocolos específicos para construções EPHs sobre as malhas, a morfologia dos tecidos foi avaliada por histologia com coloração HE. Para comparar as construções como possíveis modelos de FTS e RHE, essas devem possuir morfologia de pele humana - conforme foi comprovado nos modelos que usamos como nossas referências-controle (USP-FTS e USP-RHE) [44, 48]. O parâmetro morfológico é um controle de qualidade crítico descrito nas diretrizes da OECD [54].

Também é importante mencionar que todas as culturas de fibroblastos e queratinócitos utilizadas neste estudo se encontram livres de contaminação dos seguintes micro-organismos: *Treponema pallidum*, *Herpes vírus simplex 1*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV (vírus da imunodeficiência humana), citomegalovírus, vírus de hepatite B e vírus de hepatite C [215]. Esse é um ensaio próprio do controle de qualidade do banco de células doador. Antes de iniciar cada ensaio *in vitro* deste trabalho, as células foram testadas para *Mycoplasma sp.*, e todas as células se mostraram livres desse micro-organismo.

4.2.1 Cultura de fibroblastos nas malhas eletrofiadas

Na obtenção de informação do comportamento dos fibroblastos nas malhas eletrofiadas (30PET, 20PBT e 12,5N6/6), avaliamos a viabilidade celular (ensaio de MTT) e acompanhamos a proliferação das células (histologia).

A Figura 26 mostra o perfil da viabilidade celular dos fibroblastos semeados nas malhas eletrofiadas e direto na placa de cultura. A viabilidade celular apresenta uma tendência de aumento com o tempo de cultura em todas as superfícies. Com este ensaio, não pretendemos estabelecer uma comparação entre as respostas nas malhas, no entanto queremos saber a resposta celular após 1 e 7 dias de cultura. Pode-se observar que a resposta de viabilidade sobre as diferentes malhas apresenta diferentes leituras quando comparadas com a resposta sobre a placa, justificável por se tratar de polímeros e topografias distintas. Sabe-se que as células respondem à dimensionalidade do ambiente onde se encontram [216–219], com diferenças notáveis entre as células em superfícies planas e aquelas presentes num ambiente tridimensional (3D) [218, 219], conforme demonstrado por Cukierman et al. no trabalho com fibroblastos humanos [216].

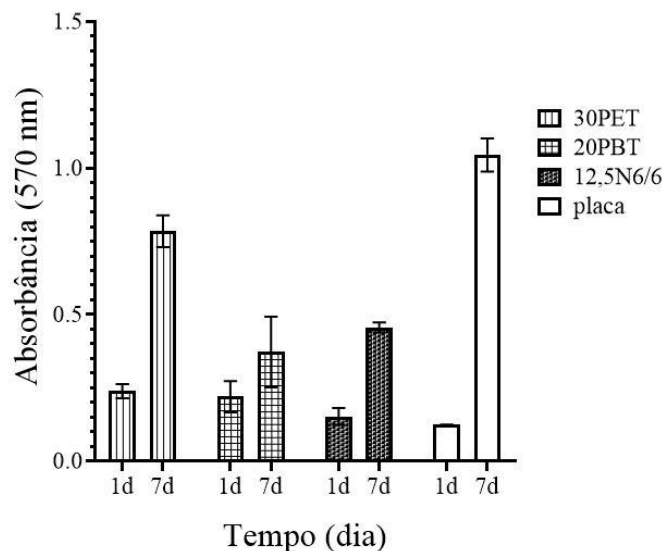


Figura 26 - Viabilidade celular de fibroblastos nas malhas eletrofiadas

As células semeadas sobre a superfície das malhas eletrofiadas (30PET, 20PBT e 12,5N6/6) e superfície de poços (placa de 24 poços) foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂, após de 1 dia (1d) e 7 dias (7d) de início da cultura foram avaliadas as viabilidades celulares.

É conhecido da literatura que a interação células-polímeros consiste em eventos iniciais (adesão e disseminação celular) e tardios (proliferação, diferenciação e função celular) [213]. Em consequência, poderíamos relacionar a resposta do primeiro dia a eventos iniciais (interação células-polímeros), podendo se compreender assim por que as leituras são maiores nas malhas, quando comparadas à placa.

Cukierman et al. [220] relata, por meio de comparação das composições moleculares das adesões celulares (célula-matriz), como adesões em matrizes 3D aumentam a atividade funcional das células quando comparadas àquelas 2D [216]. Após 7 dias, a resposta de viabilidade celular foi oposta, apresentando-se maior na placa. Entendemos esse resultado como próprio do processo de migração e proliferação celular sobre as fibras. Esta resposta não revela a quantidade de células presentes, mas revela como os aspectos espaciais afetam a transdução de sinal de fora para dentro das células, influenciando o comportamento celular.

Para explorar mais o comportamento dos fibroblastos nas malhas, trabalhamos na coloração HE após as culturas celulares de 1 e 7 dias. Como pode ser visto na Figura 27, podem-se observar as colorações próprias de marcação celular nas malhas de 30PET (Figura 27A) e 20PBT (Figura 27B) na parte superior, não sendo possível saber se as células permearam as malhas, porque as fibras se danificaram. Esses danos aconteceram

em malhas produzidas por poliésteres, as quais são solúveis em xilol. A exposição a este solvente ocorreu no processamento das amostras na desidratação antes da inclusão na parafina e no processo de coloração. No entanto, as malhas de náilon (12,5N6/6) não apresentaram danos e observa-se que os fibroblastos não permearam a malha.

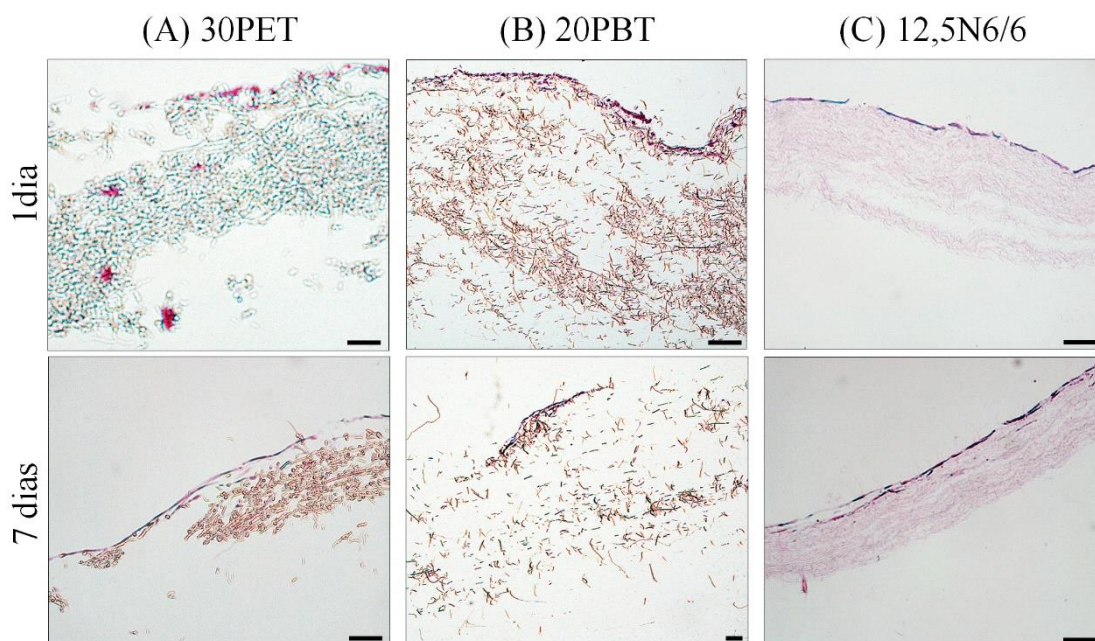


Figura 27 - Fotomicrografia de análise histológica de fibroblastos nas malhas eletrofiadas

Coloração de hematoxilina e eosina (amostras incluídas em parafina) após 1 dia e 7 dias de cultura celular nas malhas: (A) 30PET, (B) 20PBT e (C) 12,5N6/6. Barra: 50 μm .

Imagens de SEM foram analisadas para entender melhor o comportamento dos fibroblastos. Observa-se na Figura 28 as imagens da topografia das superfícies das malhas. Foram comparadas as malhas livres de células e as que foram semeadas com fibroblastos. Após a incubação, os fibroblastos aderidos começaram a se espalhar entre as fibras das malhas. Os resultados indicam que as malhas eletrofiadas suportam adesão (células ancoradas fixadas entre as fibras) e proliferação celular. A proliferação das células se torna mais perceptível quando são comparadas imagens do primeiro dia com as do dia sete, indicando citocompatibilidade dos materiais eletrofiados.

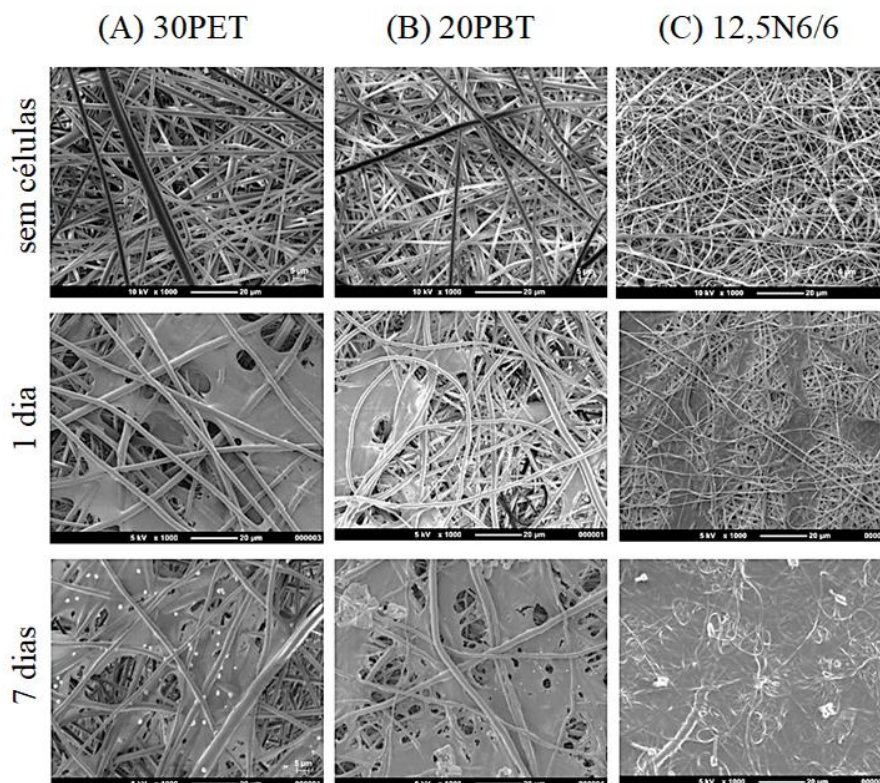


Figura 28 - Micrografias SEM da cultura de fibroblastos nas malhas eletrofiadas SEM comparativos entre as malhas (30PET, 20PBT e 12,5N6/6) livres de células com as que foram incubadas com fibroblastos (1 dia e 7 dias). Imagens: aumento x1000, barra: 20 μ m.

4.2.2 Cultura de queratinócitos nas malhas eletrofiadas

Para entender a resposta celular dos queratinócitos quando mantidos em cultura nas malhas eletrofiadas (com meio específico para esse tipo celular), estimamos seu potencial metabólico pelo ensaio de MTT e acompanhamos sua proliferação por coloração HE nos cortes histológicos após 1 e 7 dias.

Na Figura 29, são apresentados os perfis da viabilidade celular dos queratinócitos cultivados por 1 e 7 dias sobre as malhas eletrofiadas e sobre a superfície de placa de cultura. Observa-se em todas as superfícies que a viabilidade celular aumenta, sendo maior após 7 dias quando comparada com seu respectivo primeiro dia de cultura. No entanto, as respostas de viabilidade não possuem a mesma característica observada para os fibroblastos, quando comparamos malha com placa.

Para poder entender o comportamento de diferentes tipos celulares sobre um mesmo tipo de arcabouço, é importante saber que as taxas de proliferação de células

cultivadas de um sistema 2D para 3D além de serem diferentes e dependerem da matriz, dependem também da linhagem celular [220]. Wong et al. [221] demonstraram, para o caso dos queratinócitos testados em três superfícies diferentes, que significativamente mais queratinócitos aderiram em um desses tipos de superfície, o que levou provavelmente a uma maior proliferação; porém, isso não necessariamente fornece informação de uma proliferação mais acelerada. Também sabe-se que os queratinócitos possuem capacidade de diferenciação, a qual pode estar mais restrita numa placa [221].

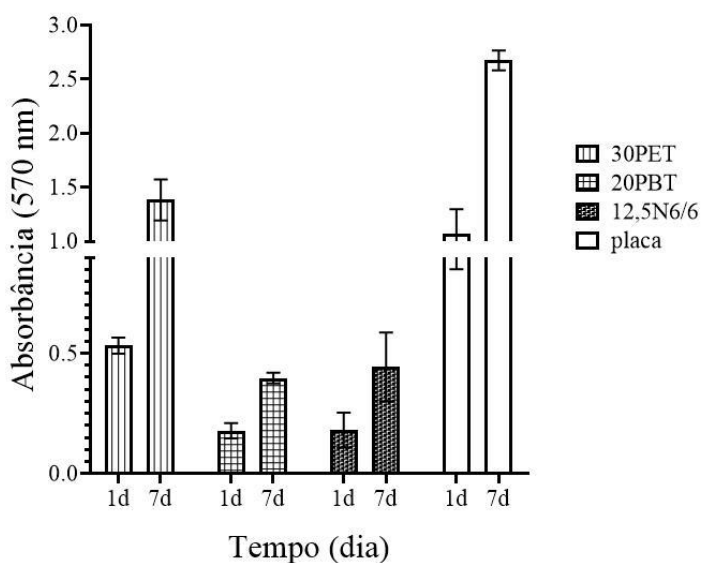


Figura 29 - Viabilidade celular de queratinócitos nas malhas eletrofiadas

As células semeadas sobre a superfície das malhas eletrofiadas (30PET, 20PBT e 12,5N6/6) e superfície de poços (placa de 24 poços) foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂, após 1 dia (1d) e 7 dias (7d) de início de cultura foram avaliadas as viabilidades celulares

Os queratinócitos semeados nas malhas eletrofiadas também foram caracterizados por histoquímica (coloração HE) (Figura 30). Estas células se aderiram nas fibras, espalhando e proliferando com o tempo (de 1 a 7 dias). Percebe-se que os danos no processamento das malhas de poliésteres (Figura 30A e Figura 30B) não impediram o aumento dos queratinócitos. Em contraste, não podemos assegurar a profundidade de permeação das células entre os poros gerados pelos espaçamentos das fibras. Na Figura 30C, é mais que evidente a proliferação dos queratinócitos com o aumento dos dias.

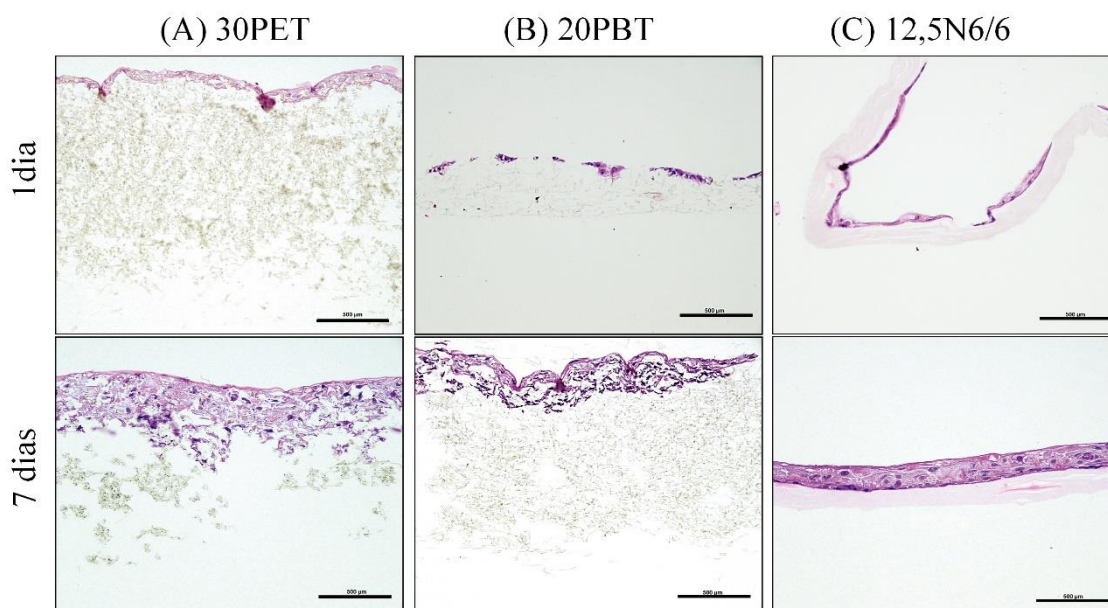


Figura 30 - Fotomicrografia de análise histológica de queratinócitos nas malhas eletrofiadas

Coloração de hematoxilina e eosina (amostras incluídas em parafina) após 1 dia e 7 dias de cultura celular nas malhas: (A) 30PET, (B) 20PBT e (C) 12,5N6/6. Barra: 500 μm .

Observa-se que os queratinócitos, tais quais os fibroblastos, não atravessam a espessura da malha 12,5N6/6, visto que as células são suficientemente grandes a ponto de não conseguirem migrar pelo caminho poroso. É oportuno mencionar que Wong et al. demonstraram que os queratinócitos, dependendo da superfície nas quais são cultivados, apresentam diferentes tamanhos, com colônia de células de áreas menores do que 2000 μm^2 , 4000 μm^2 ou 6000 μm^2 [221].

4.2.3 Construção de pele completa (epiderme com derme)

Os fibroblastos e queratinócitos foram semeados nas malhas (30PET, 20PBT e 12,5N6/6) para assim poder avaliar a influência das malhas eletrofiadas nas construções de FTS, seguindo o detalhado na seção 3.2.6. Após 11 dias de incubação na interface da co-cultura (fibroblastos-queratinócitos), foi demonstrada a geração de tecido epitelial nas malhas eletrofiadas (30PET, 20PBT e 12,5N6/6) e comparados com o FTS-controle (USP-FTS).

As imagens obtidas após análise histológica (coloração HE) são mostradas na Figura 31. O modelo USP-FTS (Figura 31A) foi construído como referência de qualidade, tendo sido considerado o controle para a construção do FTS. Os FTSs construídos nas

malhas eletrofiadas foram nomeados segundo o polímero da malha, com a finalidade de encurtar as nomeações: PET-FTS (FTS usando malha PET), PBT-FTS (FTS usando malha de PBT) e N-FTS (FTS usando malha de N6/6). O resultado da análise histológica revela a presença de derme e epiderme, claramente delimitadas (linhas pretas pontilhadas), com presença de fibroblastos (setas verdes) e queratinócitos (setas amarelas), respectivamente. Nas regiões epidérmicas, observa-se presença de estrato córneo.

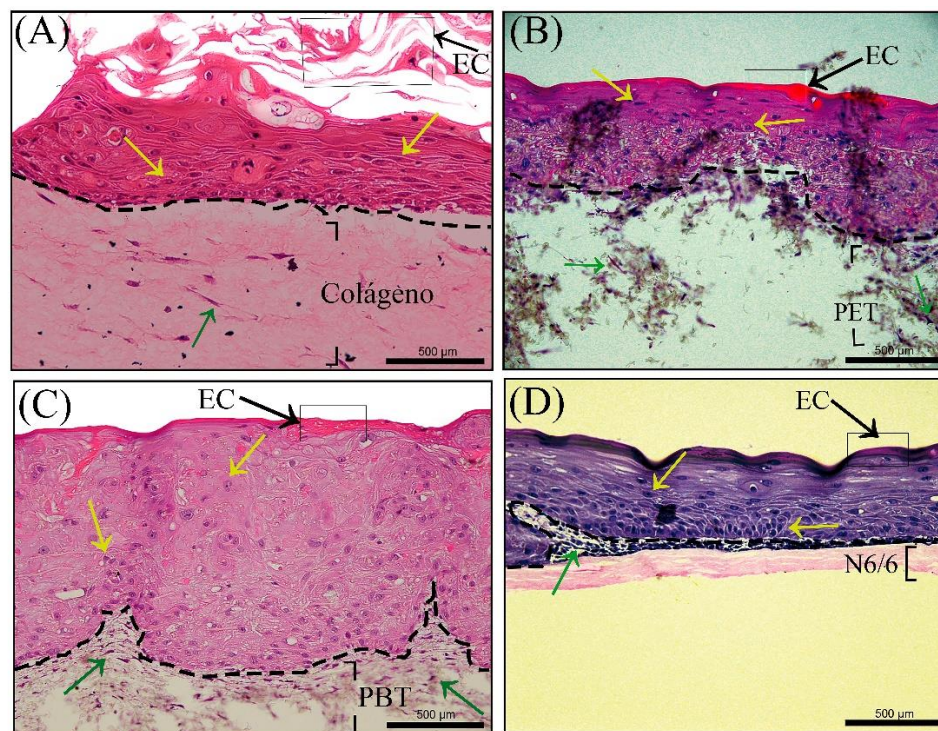


Figura 31 - FTSs reconstruídos sobre matriz de colágeno e sobre malhas eletrofiadas

Fotomicrográffas da análise histológica (coloração HE) das FTSs, construídas nas malhas eletrofiadas de PET, PBT e N6/6, nomeadas como (A) PET-FTS, (B) PBT-FTS e (C) N-FTS respectivamente. Fibroblastos (mostrados por setas verdes), queratinócitos (mostrados por setas amarelas), separação entre derme e epiderme (representadas por linhas pontilhadas pretas). EC: estrato córneo (mostrado por setas pretas). Ampliação= 20x, barra= 500 µm.

A análise morfológica revela a interação das células com as malhas, indicando a existência de adesão e proliferação de fibroblastos. Observa-se permeação dos fibroblastos entre as fibras das malhas de PET (Figura 31B) e PBT (Figura 31C). A permeação de fibroblastos não foi observada nas malhas de N6/6 (Figura 31D), provavelmente devido ao menor tamanho dos poros das malhas, como mencionado antes.

Nas regiões que representam a epiderme, os queratinócitos não apresentam estratificação adequada apenas no PBT-FTS (Figura 31C). No entanto, PET-FTS (Figura 31A) e N-FTS (Figura 31C) apresentam estratificação organizada na região epidérmica. Observou-se que as malhas de PET e PBT sofreram danos no processamento histológico devido ao grau de solubilidade destes com o xilol, o que levou ao uso alternativo de dodecano para atenuar os danos. As imagens PET-FTS ainda não foram ótimas como esperado, visto que os danos das malhas de PET no processamento histológico foram apenas atenuados, mas ainda são observados.

O N-FTS apresenta-se como um modelo promissor. Ainda assim, para superar a distribuição não homogênea dos fibroblastos proliferados na superfície das malhas de náilon, foi proposta a construção do modelo RHE (seção seguinte).

4.2.4 Construção de epiderme

As construções do tipo RHE são epidermes morfologicamente diferenciadas, caracterizadas pela presença de queratinócitos estratificados. Na Figura 32, observamos as imagens histológicas dos produtos obtidos após seguir o protocolo de construção RHE (seção 3.2.6) sobre a malha de náilon (Figura 32A). A Figura 32B mostra o controle construído pelo protocolo USP-RHE [44, 48]. Pelas características da construção sobre a malha de náilon - que apresenta claramente a estrutura típica formada por estrato córneo, granuloso, espinhoso e basais - demonstramos que a morfologia responde ao modelo RHE (Figura 32).

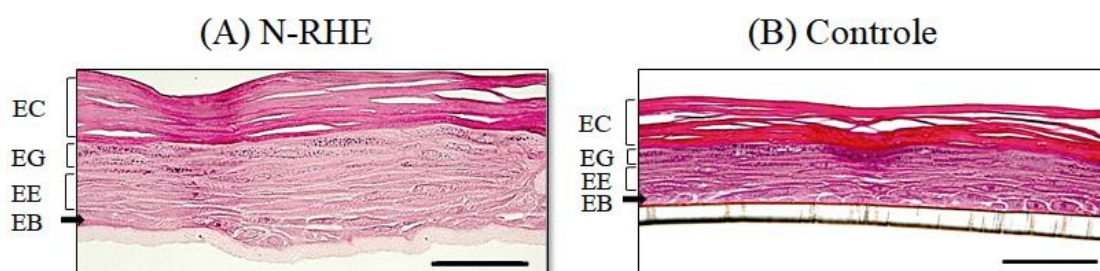


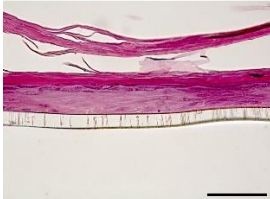
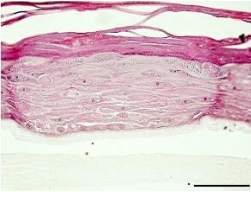

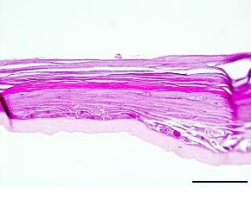
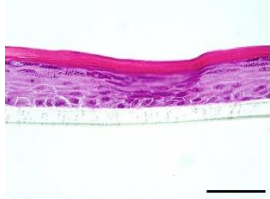
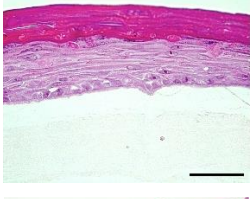

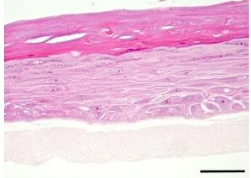


Figura 32 - RHEs reconstruídos sobre (A) malhas de N6/6 e (B) matriz de colágeno

Fotomicrografias da análise histológica (coloração HE) das RHEs. N-RHE: RHE construído em malha de náilon, Controle: RHE construído sobre colágeno (USP-RHE), EC: estrato córneo, EG: estrato granular, EE: estrato espinhoso, EB: estrato basal. Barra= 50 µm.

Na Tabela 20, apresentam-se de forma resumida os números de experimentos independentes realizados nas construções do modelo N-RHE, bem como os resultados do uso de diferentes combinações de pacientes doadores de queratinócitos em malhas de náilon com características 12,5N6/6 produzidas em diferentes tempos. Com as imagens histológicas adicionadas como informação visual, demonstramos a contínua obtenção de modelos N-RHE.

Tabela 20 - RHE reconstruídos sobre matriz de colágeno e sobre malha eletrofiada de náilon

N°	KP	Controle (Colágeno)	N-RHE	Malha
1	KP119 KP126			N25.7
2	KP128 KP126			N25.9
3	KP128 KP125			N25.7
4	KP128 KP124			N25.9
5	KP128 KP124			N31.8

N°: experimentos independentes, KP: queratinócitos de pacientes (#119, #124, #125, #126, #128), Controle: RHE controle (USP-RHE), N-RHE: RHE construído em malha de náilon nos parâmetros 12,5N6/6, Malha: Malhas tipo 12,5N6/6 produzidas em diferentes datas (25.7.18, 25.9.18, 31.8.19). Barra= 50 µm.

Sabe-se que os queratinócitos presentes na pele são responsáveis pela construção da barreira protetora, separando o organismo do meio externo. Essa barreira é formada

por duas estruturas distintas nas quais os queratinócitos são montados: um sistema com filamentos compostos por citoqueratina (KRT) e outra por involucrina (IVL) com outras proteínas. Essa sequência de eventos de produção de componentes estruturais na barreira epidérmica faz parte do processo de diferenciação [29]. Na diferenciação epidérmica, os queratinócitos da camada basal migram, proliferam-se e diferenciam-se até gerar a camada córnea. Todas essas etapas são sequenciais e em cada uma delas são expressas proteínas específicas [34].

As características de estratificação dos modelos epidérmicos foram avaliadas pela detecção de proteínas específicas expressas pelos queratinócitos no processo de diferenciação epidérmica por imunohistoquímica (Figura 33A) e *Western Blotting* (Figura 33B).

Na Figura 33A, observam-se as imagens obtidas pela imunocoloração de quatro proteínas diferentes. A caracterização imunohistoquímica dos RHEs cultivados por 11 dias na interface ar-líquido mostrou a expressão de duas proteínas: KRT14, que é característica nos queratinócitos basais (estrato basal), e KRT10 expressa na camada suprabasal. A coloração imunohistoquímica também revelou a expressão de LOR e IVL (estrato granuloso e estrato espinhoso superior, respectivamente): esses marcadores de diferenciação terminal confirmam o sucesso do processo de cornificação do modelo epidérmico.

O anticorpo para KRT14 usado neste trabalho marca o estrato basal, espinhoso e granuloso, mas não marca o estrato córneo [95, 222]. O KRT10 não é sintetizado no estrato basal, mas foi usado para mostrar que o KRT14 produzido é expresso principalmente no estrato basal. Os controles negativos consistiram em células não tratadas com anticorpos primários, as células foram coradas apenas com hematoxilina.

Sabe-se que a epiderme humana é uma estrutura complexa, porque é composta por tecido estratificado. No processo de estratificação, os queratinócitos são submetidos a alterações citoarquiteturais desde o estrato basal até quando são queratinizados (cornificação). Neste estudo, a estratificação foi replicada por ensaio *in vitro*. Os modelos RHEs são constituídos por diferentes estratos, apresentando semelhança com os quatro estratos principais da epiderme humana nativa (basal, espinhoso, granular e cornificado). A expressão de biomarcadores confirmou a presença de proteínas de diferentes estágios da epiderme. Assim, demonstramos que nossa construção N-RHE representa

satisfatoriamente as características da epiderme humana, lembrando que este modelo não requer uso de colágeno como arcabouço.

Nossos resultados no modelo N-RHE estão de acordo com aqueles demonstrados por Pedrosa et al.[48] na caracterização morfológica do produto RHE e também com aqueles mostrados por Hieda et al. [152] na caracterização imunohistoquímica do modelo RHE.

A imunodeteção das proteínas também foi realizada por *Western Blotting* para corroborar a presença das proteínas produzidas na estratificação epidérmica [223]. Essa análise confirmou a expressão das proteínas nos RHEs (controle e N-RHE) (Figura 33B) e revelou bandas relatadas na literatura. As bandas com MW ~ 52 kDa [224–227] são relacionadas à expressão de KRT14, típica de queratinócitos proliferativos; ~ 56 kDa [224, 227–229] revela a expressão de KRT10 presente no estrato espinhoso; ~26 kDa revela a expressão da LOR [224–226, 230, 231]; e as bandas de IVL são de 68 kDa [152, 232], ~ 76 kDa [233], 120-140 kDa [224, 226, 227]. Sabe-se que o MW do IVL é de 68 kDa [152, 232], e as bandas adicionais são características de uma estrutura maior, devido à interação da involucrina com outras moléculas no processo de diferenciação, conforme mostrado por outros autores, de ~ 76 kDa [233] e 120-140 kDa [224, 226, 227].

A involucrina é uma proteína precursora da camada que envolve os corneócitos; no entanto, é gerada sob a superfície interna da membrana celular (nos queratinócitos) no processo de diferenciação e produção do estrato córneo. A IVL aparece pela primeira vez no citoplasma da célula e em seguida é reticulada pela transglutaminase com outras proteínas, gerando estruturas maiores [34, 232]. Por outro lado, não é estranho obter bandas de uma estrutura maior correspondendo à resposta de um anticorpo específico contra IVL.

É importante mencionar que na análise para revelar a expressão de LOR por *Western Blotting*, consegue ser obtida segundo o protocolo relatado na seção 3.2.7.2. Devido à pouca quantidade de amostra lisada, que tínhamos para revelar a LOR, apenas pôde ser percebida a presença da banda, mas acreditamos na importância de apresentá-la, para demonstrar sua expressão nos modelos RHE.

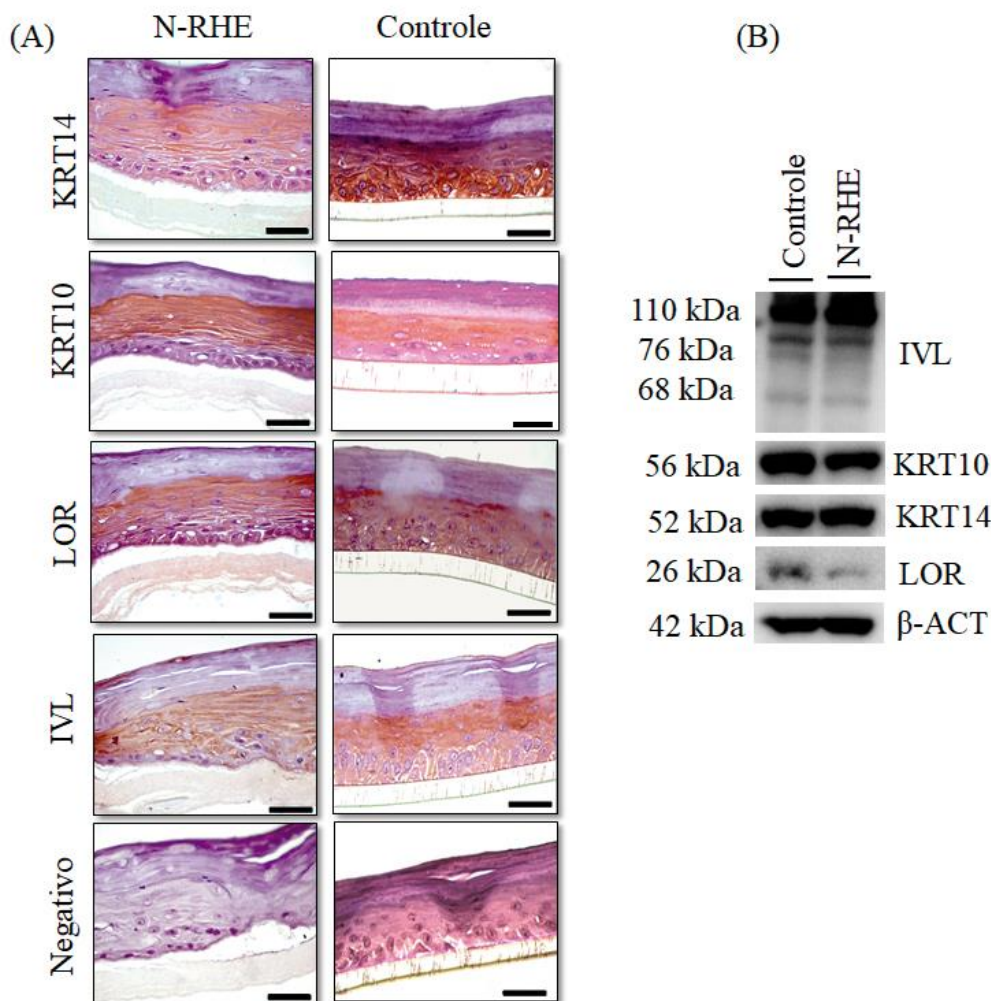


Figura 33 - Imunohistoquímica da epiderme humana reconstruída

Epiderme humana reconstruída (RHE) em que N-RHE é o modelo construído sobre malha N6/6 e o modelo controle USP-RHE. (A) Imunocoloração dos modelos RHE com expressão de KRT14, KRT10, LOR, IVL e negativo (livre de anticorpo primário), (B) Análise de *Western Blotting* para KRT14, KRT10, LOR, IVL e β -ACT. Ampliação= 50x. Barra= 50 μ m

Com a experiência obtida na produção do modelo N-RHE, e na procura de fornecer mais opções de construções de modelos RHE sobre malhas eletrofiadas, realizaram-se alguns ensaios com policaprolactona (PCL, Mw 80 kg/mol) eletrofiada (5,5% (m/v) PCL em DCM: dimetilformamida, coletor plano, 20 kV, taxa de fluxo de 12 mL/h). Sobre as malhas de PCL produzidas nessas condições, seguiu-se o protocolo da seção 3.2.6 para produzir RHE, com a variação de não ter sido utilizados insertos (Corning 3460 Transwell®- ϕ 12 mm- porosidade de 0,4 μ m); no seu lugar, foram usadas grades de metal como suporte das malhas.

A Figura 34 mostra as fotomicrografias da coloração histológica com HE (Figura 34A) e a marcação imunohistoquímica com anticorpos para expressão KRT14 (Figura 34B) e KRT10 (Figura 34C), demonstrando-se que é possível obter uma construção RHE sobre malhas de PCL.

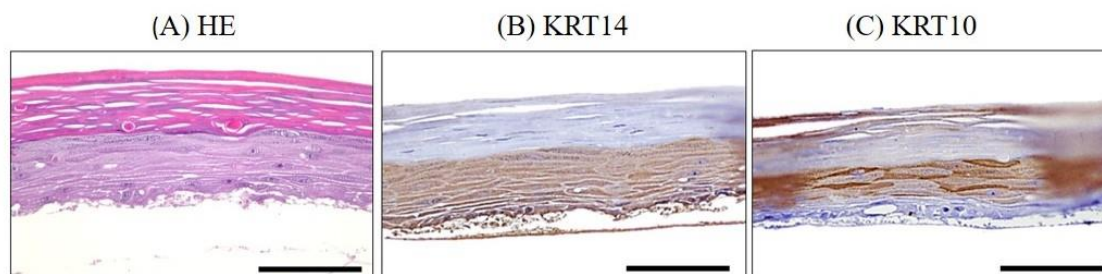


Figura 34 - Fotomicrografias de análise histológica e imunohistoquímica de PCL-RHE

Epiderme humana reconstruída em PCL (PCL-RHE). (A) Análise histológica de HE e imunocoloração de (B) KRT14, (C) KRT10. Barra= 100 μ m. O arcabouço usado para a cultura celular foi PCL eletrofiado 5,5% (m/v) PCL em DCM: dimetilformamida (6,6:2,9), eletrofiado a 20 kV, taxa de fluxo 12 mL/h.

É importante mencionar que são necessários estudos mais aprofundados como os realizados para o modelo N-RHE, mas o resultado obtido até o momento com as malhas de PCL nos revelam um futuro promissor no desenvolvimento de modelos PCL-RHE.

4.3 APLICABILIDADE DO MODELO EPIDÉRMICO RHE

EpisSkinTM, EpiDermTM, SkinEthicTM RHE, epiCS®, LabCyte EPI-MODEL24 SCT são alguns dos modelos comerciais usados para avaliar os danos à pele. Esses modelos *in vitro* são produzidos em suportes de diferentes materiais (filtros de policarbonato inerte, policarbonato com uma camada de colágeno) [92]. Esses modelos são reconhecidos pela OECD como plataformas para discriminar substâncias corrosivas e/ou irritantes. Conforme descrito pelo GHS da ONU, a corrosão da pele se refere a danos irreversíveis após exposição a substâncias químicas, manifestada como necrose visível através da epiderme e na derme [53], enquanto a irritação refere-se a dano reversível [54]. Nesta seção, procurou-se obter a resposta do modelo N-RHE quando submetido a substâncias que geram corrosão ou irritação na pele e assim saber se nosso modelo pode ser útil como plataforma de ensaio químico.

Semelhante à maioria dos modelos comerciais disponíveis, o modelo N-RHE é limitado como similar da pele autêntica devido à falta de apêndices, como estruturas de cabelo e glândulas. Acreditamos que o modelo N-RHE é robusto e flexível suficiente para suportar futuras modificações, de forma a se aproximar o mais fidedignamente à pele humana. O objetivo aqui é apresentar um novo produto, barato e confiável, comprometido com as diretrizes da OECD. Apesar disso, um entendimento completo do modelo deve ser desenvolvido, submetido ao teste por classes diferentes de compostos antes de seu uso comercial.

4.3.1 Corrosão cutânea

A importância do ensaio de corrosão foi determinar a capacidade preditiva do modelo N-RHE a ser usado para testes de corrosão cutânea *in vitro*, realizado de acordo com o sugerido pela OECD TG 431[53]. O potencial do modelo N-RHE refletiu-se nos valores de VR (Figura 35A) e nas características morfológicas (Figura 35B) após a aplicação tópica de substâncias químicas conhecidas por suas propriedades corrosivas na pele. Cloreto de sódio (0,9%), ácido acético e ácido láctico foram as substâncias avaliadas. No estágio inicial, três tecidos do modelo N-RHE foram incubados com as substâncias por 60 minutos, conforme o detalhado na seção 3.2.8.1. Comportamento semelhante dos valores de VR (Figura 35A) foi observado após o tratamento químico do modelo N-RHE em comparação com o modelo controle (USP-RHE). O tratamento com ácido acético produziu valores de VR de 3,7% e 5,7%, enquanto para o ácido láctico foram 10,9% e 8,8% para N-RHE e o controle, respectivamente. Resultados semelhantes de VR foram descritos para o modelo comercial EpisSkin (4,8% para ácido acético e 8,2% para ácido láctico) [234].

Após o tratamento químico, o dano tecidual foi acompanhado por avaliações morfológicas das imagens histológicas com coloração HE (Figura 35B). A morfologia do modelo N-RHE apresenta alterações devido à exposição de substâncias corrosivas (ácido acético e ácido láctico). As imagens mostram evidências de não-adesão entre as células dos estratos intermediários da epiderme (vacuolização) em relação aos modelos expostos com NaCl de 0,9% (substância não-corrosiva), considerado o controle negativo.

Portanto, a aplicabilidade do modelo N-RHE como plataforma para testes de corrosão cutânea foi demonstrada. A partir de nossos resultados, foi possível encontrar

semelhanças entre nosso modelo quando comparado aos modelos EpiSkin™, EpiDerm™ e SkinEthic™ RHE [44].

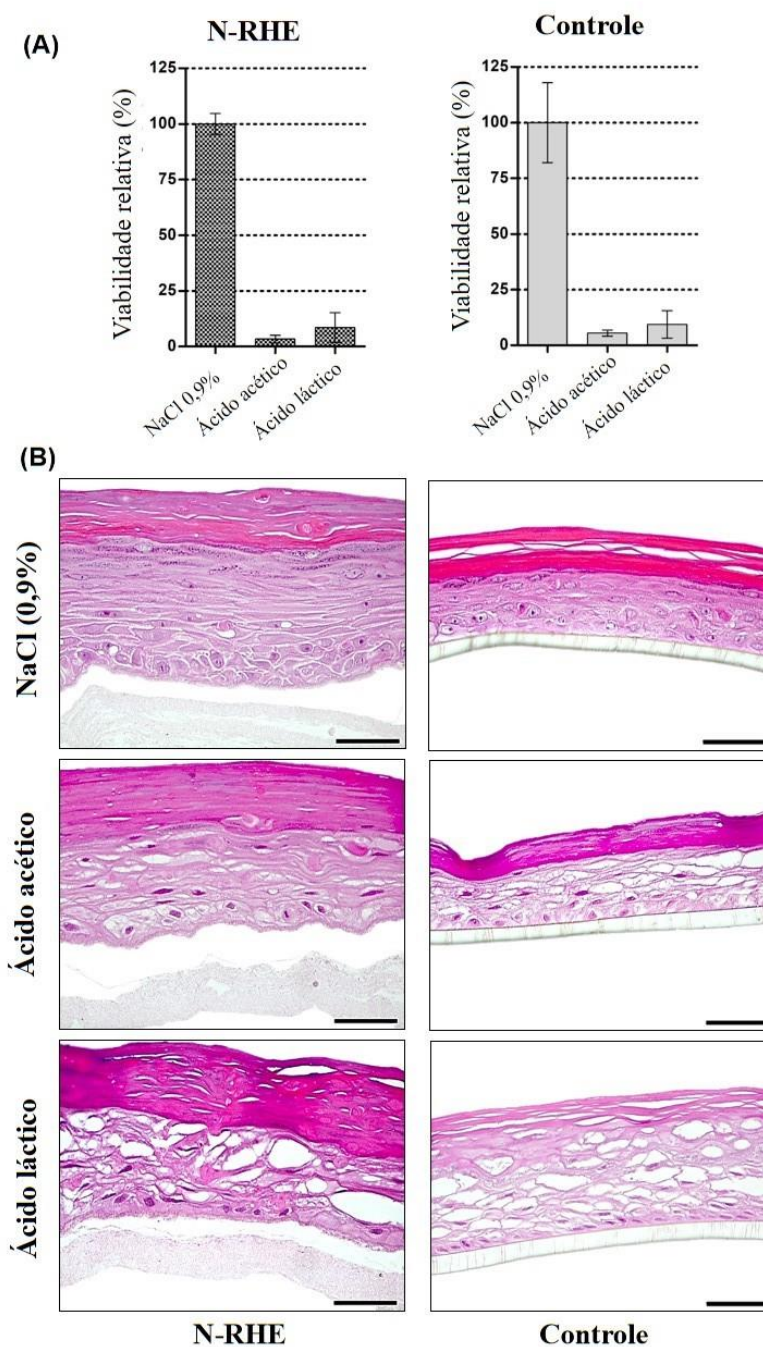


Figura 35 - Avaliação *in vitro* de corrosão cutânea de modelos RHE
 N-RHE: RHE construído em malha de náilon, Controle: RHE construído sobre colágeno (USP-RHE): (A) Viabilidade relativa, de acordo com OECD TG 431. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão dos experimentos independentes (n=2), cada um testado com três réplicas de tecidos diferentes; (B) análise histológica de seções de parafina, com cortes verticais, coradas com HE. Os resultados foram obtidos após exposição às substâncias: NaCl (0,9%), ácido acético e ácido láctico. Barra=50 μ m.

4.3.2 Irritação cutânea

Entre as substâncias químicas sugeridas pela OECD TG 439 [54], foram selecionadas PBS, solução de 5% de SDS e solução de 5% de KOH. O valor de VR de cada substância testada foi calculado em relação ao valor VR do controle negativo, estabelecido em 100%. PBS e a solução de SDS, como controles negativos e positivos, respectivamente, são classicamente usados como referência em testes de irritação da pele [50, 66]. Conforme estabelecido no OECD TG 439 [54], se o valor de VR após a exposição do tecido aos produtos químicos for menor ou igual a 50%, um modelo é considerado como responsivo ao dano de um produto irritante. Essa característica foi observada como resposta nos modelos (Figura 36), após tratamento com SDS e KOH. O modelo N-RHE apresentou valores de VR em torno de 6-10% para SDS e entre 4-21% para KOH.

Os resultados obtidos nesta avaliação de aplicabilidade do modelo N-RHE para teste de irritação foram semelhantes aos obtidos no modelo controle, conforme revelado pelos valores de VR (Figura 36A) e caracterização morfológica (Figura 36B). Além disso, os resultados obtidos são comparáveis aos descritos pelo GHS das UN em sua classificação de substâncias irritantes [54], como pode ser observado na Tabela 21. Assim, podemos determinar a similaridade do valor VR (SDS 5%) e o desvio padrão (SD) dos modelos epidérmicos comerciais [54] EpiSkinTM (VR<40%, SD≤18%), EpiDermTM SIT (VR<20%, SD≤18%), SkinEthicTM (VR< 40%, SD≤ 18%) e LabCyte EPI-MODEL24 SIT (VR<40%, SD≤18%) com nosso modelo N-RHE.

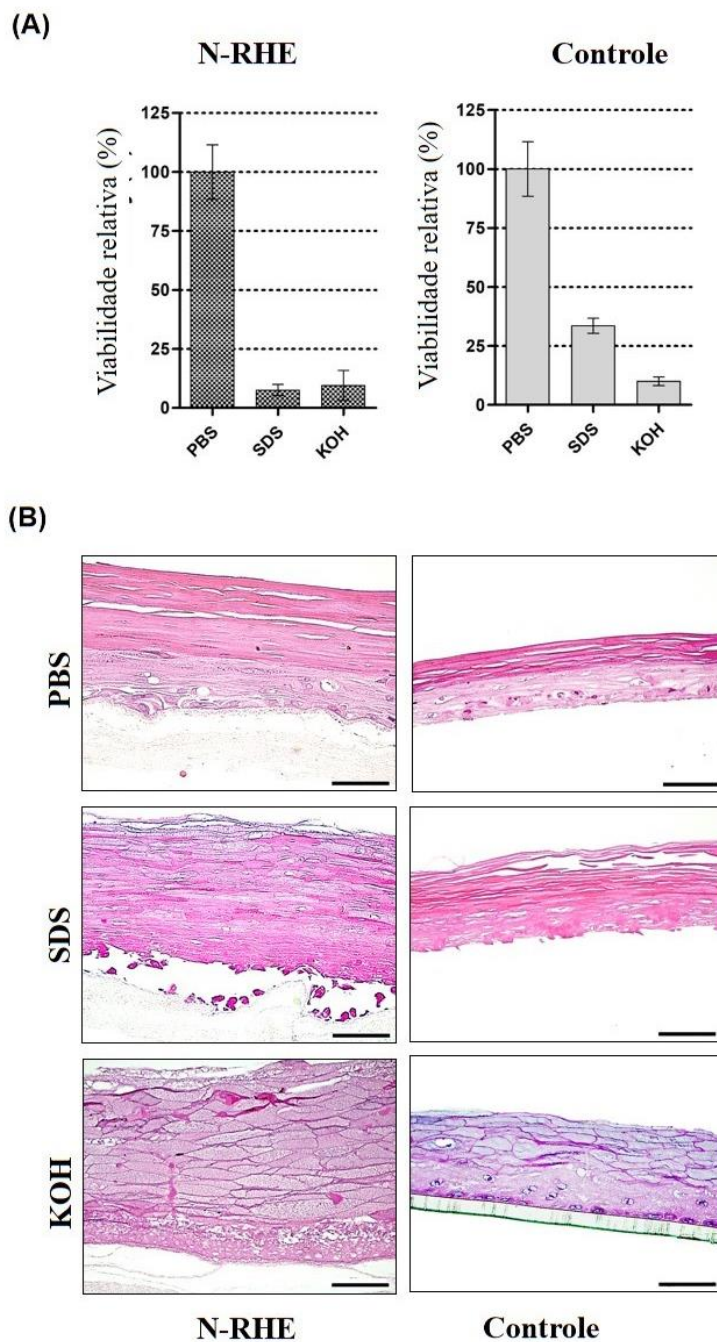


Figura 36 - Avaliação *in vitro* de irritação cutânea dos modelos RHE
 N-RHE: RHE construído em malha de náilon, Controle: RHE construído sobre colágeno (USP-RHE): (A) Viabilidade relativa, de acordo com OECD TG 439. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão dos experimentos independentes (n=2), cada um testado com três réplicas de tecidos diferentes; (B) análise histológica de seções de parafina, com cortes verticais, coradas com HE. Os resultados foram obtidos após exposição às substâncias: PBS, SDS (5%) e KOH (5%). Barra=50 μ m.

Tabela 21 - Comparação dos resultados com a categoria dos reagentes segundo a UN GHS

Substancia	Exp. ^a	VR _{N-RHE} (%)	N-RHE	VR _{controle} (%)	Controle	UN GHS Cat.
PBS		100		100		
SDS (5%)	1	5,8 ± 2,3	I	36,6 ± 0,8	I	I
	2	10,3 ± 1,8	I	30,6 ± 0,7	I	
KOH (5%)	1	4,0 ± 0,6	I	9,1 ± 0,9	I	I
	2	20,6 ± 2,1	I	11,5 ± 2,0	I	

Exp.: experimento; VR_{N-RHE}: viabilidade relativa no modelo N-RHE, VR_{controle}: viabilidade relativa no modelo controle, UN GHS= *United Nations Globally Harmonized System*, Cat.: categoria, I= irritante
^a experimento independente (por triplicata em cada um), os resultados são expressados como média ± desvio padrão.

A avaliação da organização estrutural do tecido por análise histológica de ambos os modelos RHEs mostra que os controles negativos (PBS) (Figura 36B) são comparáveis aos apresentados na Figura 32 e Figura 35B corroborando a ação não-prejudicial do PBS. Em contraste, a morfologia dos tecidos tratados com SDS e KOH (Figura 36B) revelou um alto grau de dano, desde a parte mais externa (estrato córneo) ao estrato basal, em resposta ao processo inflamatório. As irritações cutâneas são processos biológicos complexos nos quais as reações agudas são observadas após o contato imediato com a substância irritante (gera dermatite crônica) [54, 235]. Por outro lado, os danos irritantes são efeitos reversíveis para a pele [235]. Esses resultados estão diretamente relacionados aos valores VR<50%, característico de substâncias irritantes.

Esses resultados (VR e histologia) indicam que o modelo N-RHE é uma plataforma promissora para avaliar a irritação cutânea. No entanto, mais substâncias químicas devem ser testadas, conforme detalhado na lista fornecida pelo OECD TG 439 [54].

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que é viável a construção de peles *in vitro* sobre malhas eletrofiadas de PET, PBT e náilon livres de colágeno, confirmando-se que a morfologia da superfície de um arcabouço influencia na cultura celular (ancoragem celular, transporte de meio de cultura). Também foi demonstrado que a composição do material eletrofiado pode ser uma limitante no processamento histológico.

Conseguimos estabelecer as condições e parâmetros de obtenção das malhas eletrofiadas, demonstrando que as mesmas cumprem a função de arcabouços para cultura e co-cultura de fibroblastos e queratinócitos. Após compreendermos o comportamento das células na sua propagação, permeação e diferenciação nas construções FTS, direcionamos parte de nosso tralho na construção de modelo RHE sobre as malhas de náilon. Por essa razão, foi possível aprofundar mais nas caracterizações do N-RHE.

Os resultados deste trabalho mostram que conseguimos obter uma epiderme reconstruída sobre malhas de náilon eletrofiado, que apresenta organizadamente os estratos epidérmicos (basal, espinhoso, granuloso e córneo). Assim também, demonstramos sua aplicabilidade como plataforma para ensaios de corrosão e irritação.

Com isso, os objetivos deste trabalho foram alcançados com sucesso: (i) foram fabricadas malhas eletrofiadas com polímeros sintéticos, sem presença de artefatos (contas), demonstrando-se sua reprodutibilidade; (ii) foram produzidos construções *in vitro* com morfologias próximas as FTS com os três tipos de malhas poliméricas, com a obtenção bem sucedida do modelo RHE sobre malhas de náilon (N-RHE) e (iii) comprovou-se a aplicabilidade do modelo N-RHE como plataforma para testes de corrosão e irritação cutânea.

REFERÊNCIAS

- [1] Hartung, T.; Daston, G. Are In Vitro Tests Suitable for Regulatory Use? *Toxicol. Sci.*, **2009**, *111* (2). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp149>.
- [2] Burden, N.; Clift, M. J. D.; Jenkins, G. J. S.; Labram, B.; Sewell, F. Opportunities and Challenges for Integrating New In Vitro Methodologies in Hazard Testing and Risk Assessment. *Small*, **2021**. <https://doi.org/10.1002/sml.202006298>.
- [3] Rietjens, I. M. C. M.; Alink, G. M. Future of Toxicology Low-Dose Toxicology and Risk–Benefit Analysis. *Chem. Res. Toxicol.*, **2006**, *19* (8). <https://doi.org/10.1021/tx0601051>.
- [4] Chhabra, R. S.; Ress, N. B.; Harbell, J. W.; Curren, R. D. Evaluation of Some *In Vitro* Tests to Reduce and Replace the Sub-Acute Animal Toxicity Studies. *Altern. to Lab. Anim.*, **2004**, *32* (1_suppl). <https://doi.org/10.1177/026119290403201s21>.
- [5] Schrage, A.; Hempel, K.; Schulz, M.; Kollé, S. N.; van Ravenzwaay, B.; Landsiedel, R. Refinement and Reduction of Acute Oral Toxicity Testing: A Critical Review of the Use of Cytotoxicity Data. *Altern. to Lab. Anim.*, **2011**, *39* (3). <https://doi.org/10.1177/026119291103900311>.
- [6] MacGregor, J. T. In Vitro Human Tissue Models in Risk Assessment: Report of a Consensus-Building Workshop. *Toxicol. Sci.*, **2001**, *59* (1). <https://doi.org/10.1093/toxsci/59.1.17>.
- [7] Sriram, G.; Alberti, M.; Dancik, Y.; Wu, B.; Wu, R.; Feng, Z.; Ramasamy, S.; Bigliardi, P. L.; Bigliardi-Qi, M.; Wang, Z. Full-Thickness Human Skin-on-Chip with Enhanced Epidermal Morphogenesis and Barrier Function. *Mater. Today*, **2018**, *21* (4), 326–340. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.11.002>.
- [8] Adams, K.; Clemons, D.; Impelluso, L. C.; Lee, D.; Maguire, S.; Myers, A.; Petursson, C.; Schulingkamp, R.; Truba, K.; Wright, M. An IQ Consortium Perspective on The Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks Final Opinion on the Need for Nonhuman Primates in Biomedical Research, Production and Testing of Products and Devices (Update 2017). *Toxicol. Pathol.*, **2019**, *47* (5), 649–655. <https://doi.org/10.1177/0192623319857976>.
- [9] Bas, A.; Burns, N.; Gulotta, A.; Junker, J.; Drasler, B.; Lehner, R.; Aicher, L.; Constant, S.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. Understanding the Development, Standardization, and Validation Process of Alternative In Vitro Test Methods for Regulatory Approval from a Researcher Perspective. *Small*, **2021**. <https://doi.org/10.1002/sml.202006027>.
- [10] OECDiLibrary. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals <https://oecd-ilibrary-org.ez67.periodicos.capes.gov.br/environment/oecd-guidelines-for-the->

testing-of-chemicals_72d77764-en (accessed Feb 28, 2021).

- [11] Planz, V.; Lehr, C.-M.; Windbergs, M. In Vitro Models for Evaluating Safety and Efficacy of Novel Technologies for Skin Drug Delivery. *J. Control. Release*, **2016**, *242*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.002>.
- [12] Choudhury, S.; Das, A. Advances in Generation of Three-Dimensional Skin Equivalents: Pre-Clinical Studies to Clinical Therapies. *Cytotherapy*, **2021**, *23* (1). <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2020.10.001>.
- [13] Mitchell, B.; Sharma, R. The Integumentary, Skeletal and Muscular Systems. In *Embryology*; Elsevier, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3225-7.50007-5>.
- [14] Carlson, B. M. *Human Embryology & Developmental Biology, 6th Edition*; 2019.
- [15] van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. The Important Role of Stratum Corneum Lipids for the Cutaneous Barrier Function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **2014**, *1841* (3). <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.006>.
- [16] Carlson, B. M. Skin. In *The Human Body*; Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804254-0.00003-X>.
- [17] *Skin Barrier*; Elias, P. M., Feingold, K. R., Eds.; CRC Press, 2005. <https://doi.org/10.1201/b14173>.
- [18] Pissarenko, A.; Ruestes, C. J.; Meyers, M. A. Constitutive Description of Skin Dermis: Through Analytical Continuum and Coarse-Grained Approaches for Multi-Scale Understanding. *Acta Biomater.*, **2020**, *106*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.01.026>.
- [19] Kazem, S.; Linszen, E. C.; Gibbs, S. Skin Metabolism Phase I and Phase II Enzymes in Native and Reconstructed Human Skin: A Short Review. *Drug Discov. Today*, **2019**, *24* (9). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.06.002>.
- [20] Korosec, A.; Frech, S.; Gesslbauer, B.; Vierhapper, M.; Radtke, C.; Petzelbauer, P.; Lichtenberger, B. M. Lineage Identity and Location within the Dermis Determine the Function of Papillary and Reticular Fibroblasts in Human Skin. *J. Invest. Dermatol.*, **2019**, *139* (2). <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.07.033>.
- [21] Driskell, R. R.; Watt, F. M. Understanding Fibroblast Heterogeneity in the Skin. *Trends Cell Biol.*, **2015**, *25* (2). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.10.001>.
- [22] Stunova, A.; Vistejnova, L. Dermal Fibroblasts—A Heterogeneous Population with Regulatory Function in Wound Healing. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **2018**, *39*. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.01.003>.

- [23] Watt, F. M.; Fujiwara, H. Cell-Extracellular Matrix Interactions in Normal and Diseased Skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2011**, *3* (4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005124>.
- [24] Smijs, T.; Pavel. Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Sunscreens: Focus on Their Safety and Effectiveness. *Nanotechnol. Sci. Appl.*, **2011**. <https://doi.org/10.2147/NSA.S19419>.
- [25] Barbieri, J. S.; Wanat, K.; Seykora, J. Skin: Basic Structure and Function. In *Pathobiology of Human Disease*; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.03501-2>.
- [26] Janssens, M.; van Smeden, J.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Portale, G.; Caspers, P. J.; Vreeken, R. J.; Hankemeier, T.; Kezic, S.; Wolterbeek, R.; et al. Increase in Short-Chain Ceramides Correlates with an Altered Lipid Organization and Decreased Barrier Function in Atopic Eczema Patients. *J. Lipid Res.*, **2012**, *53* (12). <https://doi.org/10.1194/jlr.P030338>.
- [27] Olatunji, O.; Das, D. B. Drug Delivery Using Microneedles. In *Comprehensive Biotechnology*; Elsevier, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00501-8>.
- [28] Ya-Xian, Z.; Suetake, T.; Tagami, H. Number of Cell Layers of the Stratum Corneum in Normal Skin Relationship to the Anatomical Location on the Body, Age, Sex and Physical Parameters. *Arch. Dermatol. Res.*, **1999**, *291* (10), 555–559. <https://doi.org/10.1007/s004030050453>.
- [29] Eckert, R. L.; Rorke, E. A. Molecular Biology of Keratinocyte Differentiation. *Environ. Health Perspect.*, **1989**, *80*, 109–116. <https://doi.org/10.1289/ehp.8980109>.
- [30] Ng, I. C.; Pawijit, P.; Tan, J.; Yu, H. Anatomy and Physiology for Biomaterials Research and Development. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering*; Elsevier, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99876-3>.
- [31] Cytoskeleton. In *Medical Cell Biology*; Elsevier, 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370458-0.50008-6>.
- [32] Lee, O.-J.; Kang, H.-W.; Yun, S. J. Urine Cytology and Urinary Biomarkers. In *Bladder Cancer*; Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809939-1.00006-0>.
- [33] Eichner, R.; Sun, T. T.; Aebi, U. The Role of Keratin Subfamilies and Keratin Pairs in the Formation of Human Epidermal Intermediate Filaments. *J. Cell Biol.*, **1986**, *102* (5), 1767–1777. <https://doi.org/10.1083/jcb.102.5.1767>.
- [34] Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G. The Cornified Envelope: A Model of Cell Death in the Skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2005**, *6* (4), 328–340.

- <https://doi.org/10.1038/nrm1619>.
- [35] Nemes, Z.; Steinert, P. M. Bricks and Mortar of the Epidermal Barrier. *Exp. Mol. Med.*, **1999**, *31* (1), 5–19. <https://doi.org/10.1038/emm.1999.2>.
- [36] Green, H.; Kehinde, O.; Thomas, J. Growth of Cultured Human Epidermal Cells into Multiple Epithelia Suitable for Grafting. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1979**, *76* (11). <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5665>.
- [37] Bell, E.; Ehrlich, H.; Buttle, D.; Nakatsuji, T. Living Tissue Formed in Vitro and Accepted as Skin-Equivalent Tissue of Full Thickness. *Science (80-.)*, **1981**, *211* (4486). <https://doi.org/10.1126/science.7008197>.
- [38] Hefton, J.; Finkelstein, J.; Madden, M.; Thomas Shires, G. GRAFTING OF BURN PATIENTS WITH ALLOGRAFTS OF CULTURED EPIDERMAL CELLS. *Lancet*, **1983**, *322* (8347). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(83\)90392-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)90392-6).
- [39] Thivolet, J.; Faure, M.; Demidem, A.; Mauduit, G. LONG-TERM SURVIVAL AND IMMUNOLOGICAL TOLERANCE OF HUMAN EPIDERMAL ALLOGRAFTS PRODUCED IN CULTURE. *Transplantation*, **1986**, *42* (3). <https://doi.org/10.1097/00007890-198609000-00010>.
- [40] Parenteau, N. L.; Nolte, C. M.; Bilbo, P.; Rosenberg, M.; Wilkins, L. M.; Johnson, E. W.; Watson, S.; Mason, V. S.; Bell, E. Epidermis Generated in Vitro: Practical Considerations and Applications. *J. Cell. Biochem.*, **1991**, *45* (3). <https://doi.org/10.1002/jcb.240450304>.
- [41] Eaglstein, W. H.; Falanga, V. Tissue Engineering and the Development of Apligraf®, a Human Skin Equivalent. *Clin. Ther.*, **1997**, *19* (5). [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(97\)80043-4](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(97)80043-4).
- [42] EUROPEIA, U. DIRECTIVA 2003/15/CE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. *J. Of. da União Eur.*, **2003**.
- [43] van den Bogaard, E.; Ilic, D.; Dubrac, S.; Tomic-Canic, M.; Bouwstra, J.; Celli, A.; Mauro, T. Perspective and Consensus Opinion: Good Practices for Using Organotypic Skin and Epidermal Equivalents in Experimental Dermatology Research. *J. Invest. Dermatol.*, **2021**, *141* (1). <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.04.023>.
- [44] Catarino, C. M.; do Nascimento Pedrosa, T.; Pennacchi, P. C.; de Assis, S. R.; Gimenes, F.; Consolaro, M. E. L.; de Moraes Barros, S. B.; Maria-Enlger, S. S. Skin Corrosion Test: A Comparison between Reconstructed Human Epidermis and Full Thickness Skin Models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2018**, *125*, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.01.002>.
- [45] Abd, E.; Yousuf, S.; Pastore, M.; Telaprolu, K.; Mohammed, Y.; Namjoshi, S.; Grice, J.; Roberts, M. Skin Models for the Testing of Transdermal Drugs. *Clin.*

- Pharmacol. Adv. Appl.*, **2016**, Volume 8. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S64788>.
- [46] Yun, Y. E.; Jung, Y. J.; Choi, Y. J.; Choi, J. S.; Cho, Y. W. Artificial Skin Models for Animal-Free Testing. *J. Pharm. Investig.*, **2018**, 48 (2). <https://doi.org/10.1007/s40005-018-0389-1>.
- [47] Groeber, F.; Holeiter, M.; Hampel, M.; Hinderer, S.; Schenke-Layland, K. Skin Tissue Engineering - In Vivo and in Vitro Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.005>.
- [48] Pedrosa, T. do N.; Catarino, C. M.; Pennacchi, P. C.; Assis, S. R. de; Gimenes, F.; Consolaro, M. E. L.; Barros, S. B. de M.; Maria-Engler, S. S. A New Reconstructed Human Epidermis for in Vitro Skin Irritation Testing. *Toxicol. Vitro.*, **2017**, 42, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.03.010>.
- [49] OECD. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment. ENV/JM/MONO(2005)14. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2005\)14&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2005)14&doclanguage=en).
- [50] Pellevoisin, C.; Videau, C.; Briotet, D.; Grégoire, C.; Tornier, C.; Alonso, A.; Rigaudeau, A. S.; Bouez, C.; Seyler, N. SkinEthic™ RHE for in Vitro Evaluation of Skin Irritation of Medical Device Extracts. *Toxicol. Vitro.*, **2018**, 50, 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.008>.
- [51] BraCVAM. Brazilian Centre for the Validation of Alternative Methods https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=1188&Itemid=214 (accessed Mar 4, 2021).
- [52] Hausmann, C.; Zoschke, C.; Wolff, C.; Darvin, M. E.; Sochorová, M.; Kováčik, A.; Wanjiku, B.; Schumacher, F.; Tigges, J.; Kleuser, B.; et al. Fibroblast Origin Shapes Tissue Homeostasis, Epidermal Differentiation, and Drug Uptake. *Sci. Rep.*, **2019**, 9 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39770-6>.
- [53] OECD TG431. *Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Method*; OECD, 2019. <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>.
- [54] OECD TG439. *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method*; OECD, 2020. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>.
- [55] Almeida, A.; Sarmiento, B.; Rodrigues, F. Insights on in Vitro Models for Safety and Toxicity Assessment of Cosmetic Ingredients. *Int. J. Pharm.*, **2017**, 519 (1–2). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.024>.
- [56] Gordon, S. Non-Animal Models of Epithelial Barriers (Skin, Intestine and Lung) in Research, Industrial Applications and Regulatory Toxicology. *ALTEX*, **2015**, 32 (4). <https://doi.org/10.14573/altex.1510051>.

- [57] Rodrigues Neves, C.; Gibbs, S. Progress on Reconstructed Human Skin Models for Allergy Research and Identifying Contact Sensitizers; 2018. https://doi.org/10.1007/82_2018_88.
- [58] SkinEthic-Episkin. Models & Applications <https://www.episkin.com/> (accessed Mar 4, 2021).
- [59] MatTeK. Tissue Models <https://mattek.com/products/> (accessed Mar 4, 2021).
- [60] Henkel. Reconstructed Tissues - Phenion <https://www.phenion.com/> (accessed Mar 4, 2021).
- [61] Kojima, H.; Katoh, M.; Shinoda, S.; Hagiwara, S.; Suzuki, T.; Izumi, R.; Yamaguchi, Y.; Nakamura, M.; Kasahawa, T.; Shibai, A. A Catch-up Validation Study of an *in Vitro* Skin Irritation Test Method Using Reconstructed Human Epidermis LabCyte EPI-MODEL24. *J. Appl. Toxicol.*, **2014**, *34* (7). <https://doi.org/10.1002/jat.2937>.
- [62] Sterlab Laboratories. Skin+ ® -In vitro Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Epidermis (RHE Sterlab) mode- Version 5.0 <https://www.sterlab-store.com/wp-content/uploads/sop-sterlab-skin-irritation.pdf> (accessed Mar 14, 2021).
- [63] CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 3 DE JULHO DE 2014. *Diario Oficial da Uniao*. 2014, pp 51–52.
- [64] CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 18, DE 24 DE SETEMBRO DE 2014. *Diario Oficial da Uniao*. 2014, pp 9-.
- [65] CONCEA. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 31, DE 18 DE AGOSTO DE 2016. *Diario Oficial da Uniao*. 2016, pp 4-undefined.
- [66] Basketter, D.; Jírova, D.; Kandárová, H. Review of Skin Irritation/Corrosion Hazards on the Basis of Human Data: A Regulatory Perspective. *Interdiscip. Toxicol.*, **2012**, *5* (2), 98–104. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0017-2>.
- [67] United Nations (UN). Chapter 3.2 Skin Corrosion/ Irritation. In *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*; Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS); UN, 2019; pp 129–145. <https://doi.org/10.18356/f8fbb7cb-en>.
- [68] OECD TG404. *Test No. 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4; OECD, 2015. <https://doi.org/10.1787/9789264242678-en>.
- [69] OECD TG430. *Test No. 430: In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4; OECD, 2015. <https://doi.org/10.1787/9789264242739-en>.

- [70] OECD TG435. *Test No. 435: In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion*; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4; OECD, 2015. <https://doi.org/10.1787/9789264242791-en>.
- [71] Rai, Y.; Pathak, R.; Kumari, N.; Sah, D. K.; Pandey, S.; Kalra, N.; Soni, R.; Dwarakanath, B. S.; Bhatt, A. N. Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Hyperactivation Limits the Application of MTT Assay in the Estimation of Radiation Induced Growth Inhibition. *Sci. Rep.*, **2018**, *8* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>.
- [72] Episkin. Skin corrosion protocol: SkinEthic™ RHE and EpiSkin™ Small model <https://www.episkin.com/skin-corrosion> (accessed Mar 16, 2021).
- [73] MatTek. In Vitro EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT) <https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SCT-Skin-Corrosion-Test-Protocol-MK-24-007-0024.pdf> (accessed Mar 16, 2021).
- [74] Phenion®-Henkel. Standard Operating Procedure (Version 7.3). epiCS® Skin Corrosion Test (epiCS® SCT) <https://www.henkel.com/resource/blob/1125782/d5b82c89b4cff204f32f78cc9b0d4f0a/data/sop-epics-skin-corrosion-test-v21-02.pdf> (accessed Mar 16, 2021).
- [75] J-TEC. SKIN CORROSION TEST USING THE RECONSTRUCTED HUMAN MODEL “LABCYTE EPI-MODEL24” Ver. 1.6 https://jacvam.jp/files/list/01/01_03_E1.pdf (accessed Mar 16, 2021).
- [76] Episkin. Model skin irritation test method: Episkin (SM) and SkinEthic RHE <https://www.episkin.com/skin-irritation> (accessed Mar 13, 2021).
- [77] MatTek. Protocol-In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT) <https://www.mattek.com/wp-content/uploads/EPI-200-SIT-Skin-Irritation-MK-24-007-0023.pdf> (accessed Mar 13, 2021).
- [78] J-TEC. SKIN IRRITATION TEST USING THE RECONSTRUCTED HUMAN MODEL “LABCYTE EPI-MODEL 24” Ver. 8.3 <http://www.jpte.co.jp/english/business/LabCyte/Testprotocol.pdf> (accessed Mar 13, 2021).
- [79] Phenion®-Henkel. Standard Operating Procedure (Version 5.3)- SOP-epiCS® Skin Irritation Test (epiCS® SIT) <https://www.henkel.com/resource/blob/1125790/5560d04b678435c861758981ba78254d/data/sop-epics-skin-irritation-test-new-v21-01.pdf> (accessed Mar 14, 2021).
- [80] Verma, P.; Verma, V. Concepts of Tissue Engineering. In *Animal Biotechnology*; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00013-4>.
- [81] Carletti, E.; Motta, A.; Migliaresi, C. Chapter 2: Scaffolds for Tissue Engineering

- and 3D Cell Culture. In *3D Cell Culture Methods and Protocols*; 2011; pp 17–39. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2.
- [82] O'Brien, F. J. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. *Mater. Today*, **2011**, *14* (3). [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
- [83] R. Ian Freshney. Chapter 25: Three-Dimensional Culture. In *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp 481–495. <https://doi.org/10.1002/9780470649367.ch25>.
- [84] Okamoto, M. The Role of Scaffolds in Tissue Engineering. In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*; 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102563-5.00002-2>.
- [85] Mabrouk, M.; Beherei, H. H.; Das, D. B. Recent Progress in the Fabrication Techniques of 3D Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering C*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110716>.
- [86] Rey, D. F. V.; St-Pierre, J. P. Fabrication Techniques of Tissue Engineering Scaffolds. In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*; 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102563-5.00006-X>.
- [87] Ma, P. X. Scaffolds for Tissue Fabrication. *Mater. Today*, **2004**, *7* (5). [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00233-0](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00233-0).
- [88] Wahid, F.; Khan, T.; Hussain, Z.; Ullah, H. Nanocomposite Scaffolds for Tissue Engineering; Properties, Preparation and Applications. In *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery*; Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813741-3.00031-5>.
- [89] Lin, Q. Synthetic Non-Biodegradable Polymers. In *Introduction to Biomaterials*; CO-PUBLISHED WITH TSINGHUA UNIVERSITY PRESS, 2005. https://doi.org/10.1142/9789812700858_0011.
- [90] Roguet, R.; Cohen, C.; Dossou, K. G.; Rougier, A. Episkin, a Reconstituted Human Epidermis for Assessing in Vitro the Irritancy of Topically Applied Compounds. *Toxicol. Vitro.*, **1994**, *8* (2). [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(94\)90195-3](https://doi.org/10.1016/0887-2333(94)90195-3).
- [91] Rosdy, M.; Clauss, L. C. Terminal Epidermal Differentiation of Human Keratinocytes Grown in Chemically Defined Medium on Inert Filter Substrates at the Air-Liquid Interface. *J. Invest. Dermatol.*, **1990**, *95* (4). <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12555510>.
- [92] Netzlaff, F.; Lehr, C. M.; Wertz, P. W.; Schaefer, U. F. The Human Epidermis Models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An Evaluation of Morphology and Their Suitability for Testing Phototoxicity, Irritancy, Corrosivity, and Substance Transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **2005**, *60* (2), 167–178.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>.

- [93] Liebsch, M.; Traue, D.; Barrabas, C.; Spielmann, H.; Uphill, P.; Wilkins, S.; McPherson, J. P.; Wiemann, C.; Kaufmann, T.; Remmele, M.; et al. The ECVAM Prevalidation Study on the Use of Epiderm for Skin Corrosivity Testing. *ATLA Altern. to Lab. Anim.*, **2000**, *28* (3). <https://doi.org/10.1177/026119290002800309>.
- [94] Kubilus, J.; Hayden, P. J.; Ayehunie, S.; Lamore, S. D. K.; Servattalab, C.; Bellavance, K. L.; Sheasgreen, J. E.; Klausner, M. Full Thickness EpidermTM: A Dermal-Epidermal Skin Model to Study Epithelial-Mesenchymal Interactions. In *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*; 2004; Vol. 32. <https://doi.org/10.1177/026119290403201s12>.
- [95] Bataillon, M.; Lelièvre, D.; Chapuis, A.; Thillou, F.; Autourde, J. B.; Durand, S.; Boyera, N.; Rigaudeau, A. S.; Besné, I.; Pellevoisin, C. Characterization of a New Reconstructed Full Thickness Skin Model, t-SkinTM, and Its Application for Investigations of Anti-Aging Compounds. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, *20* (9). <https://doi.org/10.3390/ijms20092240>.
- [96] Guduric, V.; Fénelon, M.; Fricain, J.-C.; Catros, S. Membrane Scaffolds for 3D Cell Culture. In *Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes*; 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814225-7.00007-3>.
- [97] Khan, F.; Tanaka, M.; Ahmad, S. R. Fabrication of Polymeric Biomaterials: A Strategy for Tissue Engineering and Medical Devices. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015. <https://doi.org/10.1039/c5tb01370d>.
- [98] Asiri, A.; Saidin, S.; Sani, M. H.; Al-Ashwal, R. H. Epidermal and Fibroblast Growth Factors Incorporated Polyvinyl Alcohol Electrospun Nanofibers as Biological Dressing Scaffold. *Sci. Rep.*, **2021**, *11* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85149-x>.
- [99] Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol. Adv.*, **2010**, *28* (3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>.
- [100] Jun, I.; Han, H.-S.; Edwards, J.; Jeon, H. Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *19* (3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030745>.
- [101] Karuppuswamy, P.; Venugopal, J. R.; Navaneethan, B.; Laiva, A. L.; Sridhar, S.; Ramakrishna, S. Functionalized Hybrid Nanofibers to Mimic Native ECM for Tissue Engineering Applications. *Appl. Surf. Sci.*, **2014**, 322. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.10.074>.
- [102] Davis, F. J.; Mohan, S. D.; Ibraheem, M. A. Chapter 1. Introduction. In *Electrospinning: Principles, Practice and Possibilities* Editor: Geoffrey R Mitchell; Geoffrey R Mitchell, Ed.; 2015; pp 1–21.

<https://doi.org/10.1039/9781849735575-00001>.

- [103] Xie, X.; Chen, Y.; Wang, X.; Xu, X.; Shen, Y.; Khan, A. ur R.; Aldalbahi, A.; Fetz, A. E.; Bowlin, G. L.; El-Newehy, M.; et al. Electrospinning Nanofiber Scaffolds for Soft and Hard Tissue Regeneration. *J. Mater. Sci. Technol.*, **2020**, *59*. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.04.037>.
- [104] Cavo, M.; Serio, F.; Kale, N. R.; D'Amone, E.; Gigli, G.; del Mercato, L. L. Electrospun Nanofibers in Cancer Research: From Engineering of *in Vitro* 3D Cancer Models to Therapy. *Biomater. Sci.*, **2020**, *8* (18). <https://doi.org/10.1039/D0BM00390E>.
- [105] Jiang, T.; Carbone, E. J.; Lo, K. W.-H.; Laurencin, C. T. Electrospinning of Polymer Nanofibers for Tissue Regeneration. *Prog. Polym. Sci.*, **2015**, *46*. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.12.001>.
- [106] Li, H.; Xu, Y.; Xu, H.; Chang, J. Electrospun Membranes: Control of the Structure and Structure Related Applications in Tissue Regeneration and Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2* (34). <https://doi.org/10.1039/C4TB00913D>.
- [107] Wang, X.; Ding, B.; Li, B. Biomimetic Electrospun Nanofibrous Structures for Tissue Engineering. *Mater. Today*, **2013**, *16* (6), 229–241. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.06.005>.
- [108] Ding, J.; Zhang, J.; Li, J.; Li, D.; Xiao, C.; Xiao, H.; Yang, H.; Zhuang, X.; Chen, X. Electrospun Polymer Biomaterials. *Prog. Polym. Sci.*, **2019**, *90*, 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2019.01.002>.
- [109] Kenawy, E. R.; Layman, J. M.; Watkins, J. R.; Bowlin, G. L.; Matthews, J. A.; Simpson, D. G.; Wnek, G. E. Electrospinning of Poly(Ethylene-Co-Vinyl Alcohol) Fibers. *Biomaterials*, **2003**, *24* (6), 907–913. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00422-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00422-2).
- [110] Wade, R. J.; Burdick, J. A. Advances in Nanofibrous Scaffolds for Biomedical Applications: From Electrospinning to Self-Assembly. *Nano Today*, **2014**, *9* (6), 722–742. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.10.002>.
- [111] Sensini, A.; Gualandi, C.; Zucchelli, A.; Boyle, L. A.; Kao, A. P.; Reilly, G. C.; Tozzi, G.; Cristofolini, L.; Focarete, M. L. Tendon Fascicle-Inspired Nanofibrous Scaffold of Polylactic Acid/Collagen with Enhanced 3D-Structure and Biomechanical Properties. *Sci. Rep.*, **2018**, *8* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35536-8>.
- [112] Kook, Y. M.; Hwang, S.; Kim, H.; Rhee, K. J.; Lee, K.; Koh, W. G. Cardiovascular Tissue Regeneration System Based on Multiscale Scaffolds Comprising Double-Layered Hydrogels and Fibers. *Sci. Rep.*, **2020**, *10* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77187-8>.

- [113] Yao, Q.; Cosme, J. G. L.; Xu, T.; Miszuk, J. M.; Picciani, P. H. S.; Fong, H.; Sun, H. Three Dimensional Electrospun PCL/PLA Blend Nanofibrous Scaffolds with Significantly Improved Stem Cells Osteogenic Differentiation and Cranial Bone Formation. *Biomaterials*, **2017**, *115*. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.11.018>.
- [114] Jin, G.; Prabhakaran, M. P.; Ramakrishna, S. Stem Cell Differentiation to Epidermal Lineages on Electrospun Nanofibrous Substrates for Skin Tissue Engineering. *Acta Biomater.*, **2011**, *7* (8). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.04.017>.
- [115] Gautam, S.; Chou, C.-F.; Dinda, A. K.; Potdar, P. D.; Mishra, N. C. Surface Modification of Nanofibrous Polycaprolactone/Gelatin Composite Scaffold by Collagen Type I Grafting for Skin Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C*, **2014**, *34*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.09.043>.
- [116] Hosseinzadeh, S.; Soleimani, M.; Vossoughi, M.; Ranjbarvan, P.; Hamed, S.; Zamanlui, S.; Mahmoudifard, M. Study of Epithelial Differentiation and Protein Expression of Keratinocyte-Mesenchyme Stem Cell Co-Cultivation on Electrospun Nylon/ B. Vulgaris Extract Composite Scaffold. *Mater. Sci. Eng. C*, **2017**, *75*. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.101>.
- [117] Ranjbarvan, P.; Soleimani, M.; Samadi Kuchaksaraei, A.; Ai, J.; Faridi Majidi, R.; Verdi, J. Skin Regeneration Stimulation: The Role of PCL-Platelet Gel Nanofibrous Scaffold. *Microsc. Res. Tech.*, **2017**, *80* (5). <https://doi.org/10.1002/jemt.22821>.
- [118] Tchemtchoua, V. T.; Atanasova, G.; Aqil, A.; Filée, P.; Garbacki, N.; Vanhooteghem, O.; Deroanne, C.; Noël, A.; Jérôme, C.; Nusgens, B.; et al. Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. *Biomacromolecules*, **2011**, *12* (9), 3194–3204. <https://doi.org/10.1021/bm200680q>.
- [119] Sheikholeslam, M.; Wright, M. E. E.; Cheng, N.; Oh, H. H.; Wang, Y.; Datu, A. K.; Santerre, J. P.; Amini-Nik, S.; Jeschke, M. G. Electrospun Polyurethane–Gelatin Composite: A New Tissue-Engineered Scaffold for Application in Skin Regeneration and Repair of Complex Wounds. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2020**, *6* (1). <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.9b00861>.
- [120] Pennacchi, P. C.; De Almeida, M. E. S.; Gomes, O. L. A.; Faião-Flores, F.; De Araújo Crepaldi, M. C.; Dos Santos, M. F.; De Moraes Barros, S. B.; Maria-Engler, S. S. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. *Tissue Eng. - Part A*, **2015**. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2015.0009>.
- [121] Veleirinho, B.; Rei, M. F.; Lopes-Da-Silva, J. A. Solvent and Concentration Effects on the Properties of Electrospun Polyethylene Terephthalate Nanofiber Mats. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, **2008**, *46* (5).

- <https://doi.org/10.1002/polb.21380>.
- [122] Mahalingam, S.; Raimi-Abraham, B. T.; Craig, D. Q. M.; Edirisinghe, M. Solubility-Spinnability Map and Model for the Preparation of Fibres of Polyethylene (Terephthalate) Using Gyration and Pressure. *Chem. Eng. J.*, **2015**, *280*. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.114>.
- [123] Mathew, G.; Hong, J. P.; Rhee, J. M.; Leo, D. J.; Nah, C. Preparation and Anisotropic Mechanical Behavior of Highly-Oriented Electrospun Poly(Butylene Terephthalate) Fibers. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2006**, *101* (3). <https://doi.org/10.1002/app.23762>.
- [124] Mathew, G.; Hong, J. P.; Rhee, J. M.; Lee, H. S.; Nah, C. Preparation and Characterization of Properties of Electrospun Poly(Butylene Terephthalate) Nanofibers Filled with Carbon Nanotubes. *Polym. Test.*, **2005**, *24* (6). <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2005.05.002>.
- [125] Guerrini, L. M.; Branciforti, M. C.; Canova, T.; Bretas, R. E. S. Electrospinning and Characterization of Polyamide 66 Nanofibers with Different Molecular Weights. *Mater. Res.*, **2009**, *12* (2). <https://doi.org/10.1590/S1516-14392009000200012>.
- [126] De Ávila, J.; Ávila, A. F.; Triplett, M. H. Caracterização Morfológica de Nanomembranas de Poliamida-66 Dopadas Com Grafeno Obtidas Por Electrospinning. *Polimeros*, **2013**, *23* (1). <https://doi.org/10.1590/S0104-14282012005000077>.
- [127] Wang, Y. S.; Li, S. M.; Hsiao, S. T.; Liao, W. H.; Chen, P. H.; Yang, S. Y.; Tien, H. W.; Ma, C. C. M.; Hu, C. C. Integration of Tailored Reduced Graphene Oxide Nanosheets and Electrospun Polyamide-66 Nanofabrics for a Flexible Supercapacitor with High-Volume- and High-Area-Specific Capacitance. *Carbon N. Y.*, **2014**, *73*. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.02.043>.
- [128] Huang, Y. L.; Baji, A.; Tien, H. W.; Yang, Y. K.; Yang, S. Y.; Ma, C. C. M.; Liu, H. Y.; Mai, Y. W.; Wang, N. H. Self-Assembly of Graphene onto Electrospun Polyamide 66 Nanofibers as Transparent Conductive Thin Films. *Nanotechnology*, **2011**, *22* (47). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/47/475603>.
- [129] Hajiani, F.; Jeddi, A. A. A.; Gharehaghaji, A. A. An Investigation on the Effects of Twist on Geometry of the Electrospinning Triangle and Polyamide 66 Nanofiber Yarn Strength. *Fibers Polym.*, **2012**, *13* (2). <https://doi.org/10.1007/s12221-012-0244-3>.
- [130] Palazzetti, R.; Zucchelli, A.; Gualandi, C.; Focarete, M. L.; Donati, L.; Minak, G.; Ramakrishna, S. Influence of Electrospun Nylon 6,6 Nanofibrous Mats on the Interlaminar Properties of Gr-Epoxy Composite Laminates. *Compos. Struct.*, **2012**, *94* (2). <https://doi.org/10.1016/j.compstruct.2011.08.019>.

- [131] Alghoraibi, I. Fabrication and Characterization of Polyamide-66 Nanofibers via Electrospinning Technique: Effect of Concentration and Viscosity. *Int. J. ChemTech Res.*, **2015**, 7 (1).
- [132] Sreedhara, S. S.; Tata, N. R. A Novel Method for Measurement of Porosity in Nanofiber Mat Using Pycnometer in Filtration. *J. Eng. Fiber. Fabr.*, **2013**, 8 (4). <https://doi.org/10.1177/155892501300800408>.
- [133] METTLER TOLEDO. Density Kit.
- [134] Ahmed, A. K.; Atiqullah, M.; Pradhan, D. R.; Al-Harhi, M. A. Crystallization and Melting Behavior of I-PP: A Perspective from Flory's Thermodynamic Equilibrium Theory and DSC Experiment. *RSC Adv.*, **2017**, 7 (67). <https://doi.org/10.1039/c7ra06845j>.
- [135] Danek, M.; Lutomski, M.; Maniukiewicz, W.; Kozanecki, M. The Crystallinity of Poly(Butylene Terephthalate) in Mass-scale Extrusion Products as Seen by Differential Scanning Calorimetry. *Polym. Adv. Technol.*, **2021**, 32 (3). <https://doi.org/10.1002/pat.5176>.
- [136] Liberato, M. S.; Kogikoski, S.; Da Silva, E. R.; De Araujo, D. R.; Guha, S.; Alves, W. A. Polycaprolactone Fibers with Self-Assembled Peptide Micro/Nanotubes: A Practical Route towards Enhanced Mechanical Strength and Drug Delivery Applications. *J. Mater. Chem. B*, **2016**, 4 (8). <https://doi.org/10.1039/c5tb02240a>.
- [137] Strain, I. N.; Wu, Q.; Pourrahimi, A. M.; Hedenqvist, M. S.; Olsson, R. T.; Andersson, R. L. Electrospinning of Recycled PET to Generate Tough Mesomorphic Fibre Membranes for Smoke Filtration. *J. Mater. Chem. A*, **2015**, 3 (4). <https://doi.org/10.1039/c4ta06191h>.
- [138] Kuhnigk, J.; Raps, D.; Standau, T.; Luik, M.; Altstädt, V.; Ruckdäschel, H. Insights into the Bead Fusion Mechanism of Expanded Polybutylene Terephthalate (E-PBT). *Polymers (Basel)*, **2021**, 13 (4). <https://doi.org/10.3390/polym13040582>.
- [139] Duhovic, M.; Maitrot, P.; Fakirov, S. Polyamide 66 Polymorphic Single Polymer Composites. *Open Macromol. J.*, **2009**, 3 (1). <https://doi.org/10.2174/1874343900903010037>.
- [140] Van Oss, C. J.; Chaudhury, M. K.; Good, R. J. Interfacial Lifshitz-van Der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems. *Chem. Rev.*, **1988**, 88 (6). <https://doi.org/10.1021/cr00088a006>.
- [141] Kwok, D. Y. *The Usefulness of the Lifshitz-van Der Waals/Acid-Base Approach for Surface Tension Components and Interfacial Tensions*; 1999; Vol. 156.
- [142] Cristo, G. S. P.; Dos Santos, S. L. Utilização Da PCR Na Detecção de Mycoplasma Sp. Em Culturas de Células Contínuas e de Trypanosoma Cruzi. *Rev. Biol. e Ciências da Terra*, **2009**, 9 (1).

- [143] Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods*, **1983**, *65* (1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [144] Gasque, K. C. D. S.; Al-Ahj, L. P.; Oliveira, R. C.; Magalhães, A. C. Cell Density and Solvent Are Critical Parameters Affecting Formazan Evaluation in MTT Assay. *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, **2014**, *57* (3). <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014005000007>.
- [145] Sylvester, P. W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. *Methods Mol. Biol.*, **2011**, *716*. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-012-6_9.
- [146] Tavares, R. S. N.; Maria-engler, S. S.; Colepicolo, P.; Debonsi, H. M.; Schäferkorting, M.; Marx, U.; Gaspar, L. R.; Zoschke, C. Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on Inflammation, Homeostasis, and Metabolism. *Pharmaceutics*, **2020**, *12* (2), 1–11. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020136>.
- [147] Tolosa, L.; Donato, M. T.; Gómez-Lechón, M. J. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. In *Methods in Molecular Biology*; 2015; Vol. 1250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
- [148] Dossanova, A.; Lozovoy, V.; Manekenova, K.; Lozovaya, Y.; Seidakhmetov, M.; Dossanov, B.; Omarov, T.; Botabaeva, A.; Shakeeva, A.; Baubekov, Z. Histological and Morphological Characteristics of the Prepuce of Penis Skin Structure in Different Age Groups. *J. Pediatr. Urol.*, **2018**, *14* (3), 280.e1-280.e6. <https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2018.02.022>.
- [149] Hossy, B. H.; Leitão, A. A. da C.; Torres, R. B.; Ramos-e-Silva, M.; Miguel, N. C. de O.; de Pádula, M. Histological Observation of Hairless Mice Skin after Exposure to Simulated Solar Light: Comparison between the Histological Findings with Different Methodologies and 3R Principle Correlations. *Burns*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2017.08.011>.
- [150] Grossniklaus, H. E.; Waring IV, G. O.; Akor, C.; Castellano-Sanchez, A. A.; Bennett, K. Evaluation of Hematoxylin and Eosin and Special Stains for the Detection of Acanthamoeba Keratitis in Penetrating Keratoplasties. *American Journal of Ophthalmology*. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(03\)00322-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(03)00322-2).
- [151] Ozawa, A.; Sakaue, M. New Decolorization Method Produces More Information from Tissue Sections Stained with Hematoxylin and Eosin Stain and Masson-Trichrome Stain. *Ann. Anat.*, **2020**, *227*, 151431. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2019.151431>.
- [152] Hieda, D. S.; Anastacio da Costa Carvalho, L.; Vaz de Mello, B.; Aparecida de Oliveira, E.; Romano de Assis, S.; Wu, J.; Du-Thumm, L.; Viana da Silva, C. L.;

- Roubicek, D.; Maria-Engler, S. S.; et al. Air Particulate Matter Induces Skin Barrier Dysfunction and Water Transport Alteration on a Reconstructed Human Epidermis Model. *J. Invest. Dermatol.*, **2020**. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.03.971>.
- [153] Nikolova, M. P.; Chavali, M. S. Recent Advances in Biomaterials for 3D Scaffolds: A Review. *Bioact. Mater.*, **2019**, *4* (August 2019), 271–292. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>.
- [154] Haider, A.; Haider, S.; Kang, I. K. A Comprehensive Review Summarizing the Effect of Electrospinning Parameters and Potential Applications of Nanofibers in Biomedical and Biotechnology. *Arab. J. Chem.*, **2018**, *11* (8), 1165–1188. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>.
- [155] Teixeira, M. A.; Amorim, M. T. P.; Felgueiras, H. P. Poly(Vinyl Alcohol)-Based Nanofibrous Electrospun Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymers (Basel)*, **2019**, *12* (1). <https://doi.org/10.3390/polym12010007>.
- [156] Hoque, M. E.; Nuge, T.; Yeow, T. K.; Nordin, N. *Electrospun Matrices from Natural Polymers for Skin Regeneration*; Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816771-7.00005-3>.
- [157] Orr, S. B.; Chainani, A.; Hippensteel, K. J.; Kishan, A.; Gilchrist, C.; Garrigues, N. W.; Ruch, D. S.; Guilak, F.; Little, D. Aligned Multilayered Electrospun Scaffolds for Rotator Cuff Tendon Tissue Engineering. *Acta Biomater.*, **2015**, *24*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.010>.
- [158] Ingavle, G. C.; Leach, J. K. Advancements in Electrospinning of Polymeric Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. 2014. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2013.0276>.
- [159] Bridge, J. C.; Aylott, J. W.; Brightling, C. E.; Ghaemmaghami, A. M.; Knox, A. J.; Lewis, M. P.; Rose, F. R. A. J.; Morris, G. E. Adapting the Electrospinning Process to Provide Three Unique Environments for a Tri-Layered in Vitro Model of the Airway Wall. *J. Vis. Exp.*, **2015**, *2015* (101). <https://doi.org/10.3791/52986>.
- [160] Calori, I. R.; Braga, G.; de Jesus, P. da C. C.; Bi, H.; Tedesco, A. C. Polymer Scaffolds as Drug Delivery Systems. *Eur. Polym. J.*, **2020**, *129* (September 2019), 109621. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109621>.
- [161] Osuchowska, P. N.; Ostrowski, R.; Sarzyński, A.; Strzelec, M.; Mierczyk, Z.; Trafny, E. A. Microstructured Polyethylene Terephthalate (PET) for Microsieving of Cancer Cells. *Results Phys.*, **2019**, *15* (June), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2019.102612>.
- [162] Maitz, M. F. Applications of Synthetic Polymers in Clinical Medicine. *Biosurface and Biotribology*, **2015**, *1* (3), 161–176. <https://doi.org/10.1016/j.bsbt.2015.08.002>.

- [163] Andrady, A. L. Degradation of Plastics in the Environment. In *Plastics and Environmental Sustainability*; 2015. <https://doi.org/10.1002/9781119009405.ch6>.
- [164] Kundu, J.; Pati, F.; Hun Jeong, Y.; Cho, D. W. Biomaterials for Biofabrication of 3D Tissue Scaffolds. *Biofabrication: Micro- and Nano-fabrication, Printing, Patterning and Assemblies*. 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2852-7.00002-0>.
- [165] Padsalgikar, A. D. Introduction to Plastics. *Plastics in Medical Devices for Cardiovascular Applications*. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35885-9.00001-1>.
- [166] Langley-Hobbs, S. J. *Sutures and General Surgical Implants*; Elsevier Ltd, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4336-9.00010-X>.
- [167] Reneker, D. H.; Chun, I. Nanometre Diameter Fibres of Polymer, Produced by Electrospinning. *Nanotechnology*, **1996**, 7 (3), 216–223. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/7/3/009>.
- [168] Luo, C. J.; Stride, E.; Edirisinghe, M. Mapping the Influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions. *Macromolecules*, **2012**, 45 (11). <https://doi.org/10.1021/ma300656u>.
- [169] Sun, Z.; Deitzel, J. M.; Knopf, J.; Chen, X.; Gillespie, J. W. The Effect of Solvent Dielectric Properties on the Collection of Oriented Electrospun Fibers. *J. Appl. Polym. Sci.*, **2012**, 125 (4). <https://doi.org/10.1002/app.35454>.
- [170] Van Der Schueren, L.; De Schoenmaker, B.; Kalaoglu, Ö. I.; De Clerck, K. An Alternative Solvent System for the Steady State Electrospinning of Polycaprolactone. *Eur. Polym. J.*, **2011**, 47 (6). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2011.02.025>.
- [171] Huang, Z. M.; Zhang, Y. Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.*, **2003**, 63 (15). [https://doi.org/10.1016/S0266-3538\(03\)00178-7](https://doi.org/10.1016/S0266-3538(03)00178-7).
- [172] Yap, B. W.; Sim, C. H. Comparisons of Various Types of Normality Tests. *J. Stat. Comput. Simul.*, **2011**, 81 (12). <https://doi.org/10.1080/00949655.2010.520163>.
- [173] Krithikadatta, J. Normal Distribution. *J. Conserv. Dent.*, **2014**, 17 (1). <https://doi.org/10.4103/0972-0707.124171>.
- [174] Krithikadatta, J.; Valarmathi, S. Research Methodology in Dentistry: Part II -The Relevance of Statistics in Research. *Journal of Conservative Dentistry*. 2012. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.97937>.
- [175] Miot, H. A. Assessing Normality of Data in Clinical and Experimental Trials. *J.*

- Vasc. Bras.*, **2017**, *16* (2). <https://doi.org/10.1590/1677-5449.041117>.
- [176] Jafari, S.; Hosseini Salekdeh, S. S.; Solouk, A.; Yousefzadeh, M. Electrospun Polyethylene Terephthalate (PET) Nanofibrous Conduit for Biomedical Application. *Polym. Adv. Technol.*, **2020**, *31* (2). <https://doi.org/10.1002/pat.4768>.
- [177] Wannatong, L.; Sirivat, A.; Supaphol, P. Effects of Solvents on Electrospun Polymeric Fibers: Preliminary Study on Polystyrene. *Polym. Int.*, **2004**, *53* (11). <https://doi.org/10.1002/pi.1599>.
- [178] Blain, G. C. Revisiting the Critical Values of the Lilliefors Test: Towards the Correct Agrometeorological Use of the Kolmogorov-Smirnov Framework. *Bragantia*, **2014**, *73* (2), 192–202. <https://doi.org/10.1590/brag.2014.015>.
- [179] Real Statistics Using Excel. Lilliefors Test for Normality <https://www.real-statistics.com/tests-normality-and-symmetry/statistical-tests-normality-symmetry/lilliefors-test-normality/> (accessed Apr 29, 2021).
- [180] Real Statistics Using Excel. Kolmogorov-Smirnov Test for Normality-<https://www.real-statistics.com/tests-normality-and-symmetry/statistical-tests-normality-symmetry/kolmogorov-smirnov-test/> (accessed Apr 29, 2021).
- [181] Swiechowski, K.; Stegenta-Dabrowska, S.; Liszewski, M.; Babelowski, P.; Koziel, J. A.; Białowiec, A. Oxytree Pruned Biomass Torrefaction: Process Kinetics. *Materials (Basel)*, **2019**, *12* (20). <https://doi.org/10.3390/ma12203334>.
- [182] Gupta, P.; Elkins, C.; Long, T. E.; Wilkes, G. L. Electrospinning of Linear Homopolymers of Poly(Methyl Methacrylate): Exploring Relationships between Fiber Formation, Viscosity, Molecular Weight and Concentration in a Good Solvent. *Polymer (Guildf)*, **2005**, *46* (13). <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.021>.
- [183] Flóvenz, O.; Hersir, G. P.; Sæmundsson, K.; Ármannsson, H.; Friethriksson, T. Geothermal Energy Exploration Techniques. In *Comprehensive Renewable Energy*; 2012; Vol. 7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-087872-0.00705-8>.
- [184] Soliman, S.; Sant, S.; Nichol, J. W.; Khabiry, M.; Traversa, E.; Khademhosseini, A. Controlling the Porosity of Fibrous Scaffolds by Modulating the Fiber Diameter and Packing Density. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **2011**, *96A* (3). <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33010>.
- [185] Aerts, E.; Li, J.; Van Steenberghe, M. J.; Degrande, T.; Jansen, J. A.; Walboomers, X. F. Porous Titanium Fiber Mesh with Tailored Elasticity and Its Effect on Stromal Cells. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **2020**, *108* (5). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34556>.
- [186] Sang, T.; Wallis, C. J.; Hill, G.; Britovsek, G. J. P. Polyethylene Terephthalate Degradation under Natural and Accelerated Weathering Conditions. *European*

- Polymer Journal*. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109873>.
- [187] Gedde, U. W. Thermal Analysis of Polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **1990**, *16* (17). <https://doi.org/10.3109/03639049009058542>.
- [188] Wang, C.; Fang, C.-Y.; Wang, C.-Y. Electrospun Poly(Butylene Terephthalate) Fibers: Entanglement Density Effect on Fiber Diameter and Fiber Nucleating Ability towards Isotactic Polypropylene. *Polymer (Guildf.)*, **2015**, *72*. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.07.001>.
- [189] Schawe, J. E. K. Influence of Processing Conditions on Polymer Crystallization Measured by Fast Scanning DSC. *J. Therm. Anal. Calorim.*, **2014**, *116* (3). <https://doi.org/10.1007/s10973-013-3563-8>.
- [190] Kim, J. S.; Lee, D. S. Thermal Properties of Electrospun Polyesters. *Polym. J.*, **2000**, *32* (7). <https://doi.org/10.1295/polymj.32.616>.
- [191] Forouharshad, M.; Saligheh, O.; Arasteh, R.; Farsani, R. E. Manufacture and Characterization of Poly (Butylene Terephthalate) Nanofibers by Electrospinning. *J. Macromol. Sci. Part B*, **2010**, *49* (4). <https://doi.org/10.1080/00222341003609377>.
- [192] Cozza, E. S.; Ma, Q.; Monticelli, O.; Cebe, P. Nanostructured Nanofibers Based on PBT and POSS: Effect of POSS on the Alignment and Macromolecular Orientation of the Nanofibers. *Eur. Polym. J.*, **2013**, *49* (1). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.10.006>.
- [193] Catalani, L. H.; Collins, G.; Jaffe, M. Evidence for Molecular Orientation and Residual Charge in the Electrospinning of Poly(Butylene Terephthalate) Nanofibers. *Macromolecules*, **2007**, *40* (5). <https://doi.org/10.1021/ma061342d>.
- [194] Atiqullah, M.; Winston, M. S.; Bercaw, J. E.; Hussain, I.; Fazal, A.; Al-Harhi, M. A.; Emwas, A.-H. M.; Khan, M. J.; Hossain, A. Effects of a Vanadium Post-Metallocene Catalyst-Induced Polymer Backbone Inhomogeneity on UV Oxidative Degradation of the Resulting Polyethylene Film. *Polym. Degrad. Stab.*, **2012**, *97* (7). <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2012.03.042>.
- [195] Lubna, M. M.; Salem, K. S.; Sarker, M.; Khan, M. A. Modification of Thermo-Mechanical Properties of Recycled PET by Vinyl Acetate (VAc) Monomer Grafting Using Gamma Irradiation. *J. Polym. Environ.*, **2018**, *26* (1). <https://doi.org/10.1007/s10924-016-0922-0>.
- [196] Wang, C.; Lee, M.-F.; Wu, Y.-J. Solution-Electrospun Poly(Ethylene Terephthalate) Fibers: Processing and Characterization. *Macromolecules*, **2012**, *45* (19). <https://doi.org/10.1021/ma300121k>.
- [197] Keum, J. K.; Song, H. H. Thermal Deformations of Oriented Noncrystalline Poly (Ethylene Terephthalate) Fibers in the Presence of Mesophase Structure. *Polymer*

- (*Guildf.*), **2005**, *46* (3). <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.12.004>.
- [198] Saeed, K.; Park, S. Y.; Ali, N. Characterization of Poly(Butylene Terephthalate) Electrospun Nanofibres Containing Titanium Oxide. *Iran. Polym. J. (English Ed.)*, **2009**, *18* (8).
- [199] Natalia De Fátima Sánchez Arrieta. Evaluación de la Procesabilidad, Miscibilidad y Estabilidad Térmica de Mezclas de Polibutilen tereftalato y Poliéter imida <https://core.ac.uk/download/pdf/47250623.pdf> (accessed May 3, 2021).
- [200] Vahabi, H.; Lopez-Cuesta, J.-M.; Chivas-Joly, C. High-Performance Fire-Retardant Polyamide Materials. In *Novel Fire Retardant Polymers and Composite Materials*; Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100136-3.00006-6>.
- [201] Simal, A. L.; Martin, A. R. Structure of Heat-Treated Nylon 6 and 6.6 Fibers. I. The Shrinkage Mechanism. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1998**, *68* (3). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19980418\)68:3<441::AID-APP11>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19980418)68:3<441::AID-APP11>3.0.CO;2-Y).
- [202] Santos, C. R. dos; Bretas, R. E. S.; Branciforti, M. C.; Canova, T. Preparação e Caracterização de Nanofibras de Nanocompósitos de Poliamida 6,6 e Argila Montmorilonita. *Polímeros*, **2011**, *21* (5). <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000068>.
- [203] Feldman, A. Y.; Wachtel, E.; Vaughan, G. B. M.; Weinberg, A.; Marom, G. The Brill Transition in Transcrystalline Nylon-66. *Macromolecules*, **2006**, *39* (13). <https://doi.org/10.1021/ma060487h>.
- [204] Wu, Y.; Huang, A.; Fan, S.; Liu, Y.; Liu, X. Crystal Structure and Mechanical Properties of Uniaxially Stretched PA612/SiO₂ Films. *Polymers (Basel)*, **2020**, *12* (3). <https://doi.org/10.3390/polym12030711>.
- [205] Krainer, S.; Hirn, U. Contact Angle Measurement on Porous Substrates: Effect of Liquid Absorption and Drop Size. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126503>.
- [206] Agrawal, G.; Negi, Y. S.; Pradhan, S.; Dash, M.; Samal, S. K. Wettability and Contact Angle of Polymeric Biomaterials. In *Characterization of Polymeric Biomaterials*; Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100737-2.00003-0>.
- [207] Lourenço, B. N.; Marchioli, G.; Song, W.; Reis, R. L.; van Blitterswijk, C. A.; Karperien, M.; van Apeldoorn, A.; Mano, J. F. Wettability Influences Cell Behavior on Superhydrophobic Surfaces with Different Topographies. *Biointerphases*, **2012**, *7* (1). <https://doi.org/10.1007/s13758-012-0046-6>.
- [208] De Bartolo, L.; Morelli, S.; Bader, A.; Drioli, E. Evaluation of Cell Behaviour Related to Physico-Chemical Properties of Polymeric Membranes to Be Used in

- Bioartificial Organs. *Biomaterials*, **2002**, *23* (12). [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00383-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00383-0).
- [209] Brohem, C. A.; Da Silva Cardeal, L. B.; Tiago, M.; Soengas, M. S.; De Moraes Barros, S. B.; Maria-Engler, S. S. Artificial Skin in Perspective: Concepts and Applications. *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00786.x>.
- [210] do Nascimento Pedrosa, T.; De Vuyst, E.; Mound, A.; Lambert de Rouvroit, C.; Maria-Engler, S. S.; Poumay, Y. Methyl- β -Cyclodextrin Treatment Combined to Incubation with Interleukin-4 Reproduces Major Features of Atopic Dermatitis in a 3D-Culture Model. *Arch. Dermatol. Res.*, **2017**, *309* (1), 63–69. <https://doi.org/10.1007/s00403-016-1699-7>.
- [211] Poumay, Y.; Dupont, F.; Marcoux, S.; Leclercq-Smekens, M.; Hérin, M.; Coquette, A. A Simple Reconstructed Human Epidermis: Preparation of the Culture Model and Utilization in in Vitro Studies. *Arch. Dermatol. Res.*, **2004**, *296* (5), 203–211. <https://doi.org/10.1007/s00403-004-0507-y>.
- [212] Hewitt, N. J.; Edwards, R. J.; Fritsche, E.; Goebel, C.; Aeby, P.; Scheel, J.; Reisinger, K.; Ouédraogo, G.; Duche, D.; Eilstein, J.; et al. Use of Human in Vitro Skin Models for Accurate and Ethical Risk Assessment: Metabolic Considerations. *Toxicol. Sci.*, **2013**, *133* (2), 209–217. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft080>.
- [213] Chen, L.; Yan, C.; Zheng, Z. Functional Polymer Surfaces for Controlling Cell Behaviors. *Mater. Today*, **2018**, *21* (1). <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.07.002>.
- [214] Raeisdasteh Hokmabad, V.; Davaran, S.; Ramazani, A.; Salehi, R. Design and Fabrication of Porous Biodegradable Scaffolds: A Strategy for Tissue Engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2017**, *28* (16), 1797–1825. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1354674>.
- [215] Pedrosa, T. . Desenvolvimento de Epiderme Humana Reconstruída (RHE) Como Plataforma de Testes in Vitro Para Irritação, Sensibilização, Dermatite Atópica e Fotoimunossupressão, 2016, Vol. 1.
- [216] Cukierman, E. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* (80-.), **2001**, *294* (5547). <https://doi.org/10.1126/science.1064829>.
- [217] Harunaga, J. S.; Yamada, K. M. Cell-Matrix Adhesions in 3D. *Matrix Biol.*, **2011**, *30* (7–8). <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.06.001>.
- [218] Ehrig, S.; Schamberger, B.; Bidan, C. M.; West, A.; Jacobi, C.; Lam, K.; Kollmannsberger, P.; Petersen, A.; Tomancak, P.; Kommareddy, K.; et al. Surface Tension Determines Tissue Shape and Growth Kinetics. *Sci. Adv.*, **2019**, *5* (9). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9394>.

- [219] Foolen, J.; Yamashita, T.; Kollmannsberger, P. Shaping Tissues by Balancing Active Forces and Geometric Constraints. *J. Phys. D. Appl. Phys.*, **2016**, *49* (5). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/5/053001>.
- [220] Edmondson, R.; Broglie, J. J.; Adcock, A. F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.*, **2014**, *12* (4). <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.
- [221] Wong, C.-W.; LeGrand, C. F.; Kinnear, B. F.; Sobota, R. M.; Ramalingam, R.; Dye, D. E.; Raghunath, M.; Lane, E. B.; Coombe, D. R. In Vitro Expansion of Keratinocytes on Human Dermal Fibroblast-Derived Matrix Retains Their Stem-Like Characteristics. *Sci. Rep.*, **2019**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54793-9>.
- [222] Purkis, P. E.; Steel, J. B.; Mackenzie, I. C.; Nathrath, W. B. J.; Leigh, I. M.; Lane, E. B. Antibody Markers of Basal Cells in Complex Epithelia. *J. Cell Sci.*, **1990**, *97* (1), 39–50.
- [223] Mahmood, T.; Yang, P. C. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N. Am. J. Med. Sci.*, **2012**, *4* (9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>.
- [224] Cau, L.; Pendaries, V.; Lhuillier, E.; Thompson, P. R.; Serre, G.; Takahara, H.; Méchin, M. C.; Simon, M. Lowering Relative Humidity Level Increases Epidermal Protein Deimination and Drives Human Filaggrin Breakdown. *J. Dermatol. Sci.*, **2017**, *86* (2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.02.280>.
- [225] Mi, B.; Liu, J.; Liu, Y.; Hu, L.; Liu, Y.; Panayi, A. C.; Zhou, W.; Liu, G. The Designer Antimicrobial Peptide A-HBD-2 Facilitates Skin Wound Healing by Stimulating Keratinocyte Migration and Proliferation. *Cell. Physiol. Biochem.*, **2018**. <https://doi.org/10.1159/000495320>.
- [226] Pendaries, V.; Malaisse, J.; Pellerin, L.; Le Lamer, M.; Nachat, R.; Kezic, S.; Schmitt, A. M.; Paul, C.; Poumay, Y.; Serre, G.; et al. Knockdown of Filaggrin in a Three-Dimensional Reconstructed Human Epidermis Impairs Keratinocyte Differentiation. *J. Invest. Dermatol.*, **2014**, *134* (12), 2938–2946. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.259>.
- [227] Serafino, A.; Nicotera, G.; Andreola, F.; Giovannini, D.; Zonfrillo, M.; Sferrazza, G.; Calcaterra, A.; De Angelis, C.; Camponeschi, C.; Pierimarchi, P. Synergistic Antiproliferative and Differentiating Effect of 2,4-Monofurfurylidene-Tetra-O-Methylsorbitol and 4,6-Dimethyl-2-(3,4,5-Trimethoxyphenylamino)Pyrimidine on Primary and Immortalized Keratinocytes. *Biomed. Pharmacother.*, **2018**. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.174>.
- [228] Karvinen, S.; Pasonen-Seppänen, S.; Hyttinen, J. M. T.; Pienimäki, J. P.; Törrönen, K.; Jokela, T. A.; Tammi, M. I.; Tammi, R. Keratinocyte Growth Factor Stimulates

- Migration and Hyaluronan Synthesis in the Epidermis by Activation of Keratinocyte Hyaluronan Synthases 2 and 3. *J. Biol. Chem.*, **2003**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310445200>.
- [229] Hoffmann, H. J.; Tabaksblat, L. M.; Enghild, J. J.; Dahl, R. Human Skin Keratins Are the Major Proteins in Exhaled Breath Condensate. *Eur. Respir. J.*, **2008**. <https://doi.org/10.1183/09031936.00059707>.
- [230] Nithya, S.; Radhika, T.; Jeddy, N. Loricrin - An Overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2015. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.157204>.
- [231] Ishida-Yamamoto, A. Loricrin and Human Skin Diseases: Molecular Basis of Loricrin Keratodermas. *Histol. Histopathol.*, **1998**, *13* (3), 819–826. <https://doi.org/10.14670/HH-13.819>.
- [232] Eckert, R. L.; Crish, J. F.; Robinson, N. A. The Epidermal Keratinocyte as a Model for the Study of Gene Regulation and Cell Differentiation. *Physiol. Rev.*, **1997**, *77* (2), 397–424. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.2.397>.
- [233] Robinson, N. A.; LaCelle, P. T.; Eckert, R. L. Involucrin Is a Covalently Crosslinked Constituent of Highly Purified Epidermal Corneocytes: Evidence for a Common Pattern of Involucrin Crosslinking in Vivo and in Vitro. *J. Invest. Dermatol.*, **1996**. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12298323>.
- [234] Alépée, N.; Grandidier, M. H.; Cotovio, J. Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. Vit.*, **2014**. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.10.016>.
- [235] Mateeva, V.; Angelova-Fischer, I. Irritant Contact Dermatitis. In *Applied Dermatotoxicology*; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420130-9.00002-5>.

CV resumido

Denisse Esther Mallaupoma Camarena

Personal Information

Full Name Denisse Esther Mallaupoma Camarena
 Mobile Phone (+55) 11 943317929
 Email denisse23uni@usp.br
 Nationality Peruvian
 Passport C341872
 Membership Brazilian Society of Chemistry

Education

2016 – Present **Ph.D. in Chemistry (expected August 2021)**,
 Laboratory of Polymeric Biomaterials, Institute of Chemistry,
 University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

2016 **Master in Chemistry**, Faculty of Philosophy, Sciences and
 Letters of Ribeirão Preto of University of São Paulo (FFCLRP
 USP), Ribeirão Preto, Brazil.

2003 – 2009 **Graduation in Chemistry**, Science Department
 National University of Engineering, Lima, Peru.

Complementary Education

2021 **TÉCNICAS MICROSCÓPICAS DE CARACTERIZACIÓN**
 Coursera - Universitat de Barcelona, Spain.

2021 **METROLOGIA BÁSICA APLICADA À NANOTECNOLOGÍA**
 Course, National Institute of Metrology, Quality and
 Technology (INMETRO), Rio de Janeiro, Brazil.

2019 **CURSO DE CULTIVO CELULAR EM 3D**
 Course, Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ), Rio de Janeiro,
 Brazil

Technical Skills

2020 **Contact angle – Drop shape analysis**

- Laboratory of Polymeric Biomaterials
Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 2020 **Spin coating technique**
Training. Laboratory of Polymeric Biomaterials
Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 2019 **Western Blotting Technique**
Training. Skin Biology Laboratory, Clinical Chemistry & Toxicology Department. School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 2018 **Histology and Immunohistochemistry Technique**
Training. Skin Biology Laboratory, Clinical Chemistry & Toxicology Department. School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
- 2017 **Kruss K100 tensiometer - Washburn method**
Training. Institute of Chemistry,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 2017 **Density KIT (Mettler Toledo)**
Laboratory of Polymeric Biomaterials
Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 2016 - 2018 **Cell Culture – Production of Human Skin Model**
Training. Skin Biology Laboratory, Clinical Chemistry & Toxicology Department. School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 2016 **Scanning Electron Microscope (SEM),**
Training. Institute of Chemistry,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 2016 **Electrospinning**
Training. Laboratory of Polymeric Biomaterials
Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
- 2015 **Kjeldahl System for Protein Determination**
Training. Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto of University of São Paulo (FFCLRP - USP), *Ribeirão Preto*, Brazil.

2015 **Software STATISTICA 12** for *planning, analysis, and* Optimization experimental. Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto of University of São Paulo (FFCLRP - USP), *Ribeirão Preto*, Brazil

Experience

Teaching

- 1st Semester 2017 **Teaching Assistant**, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
Teaching Assistant for the undergraduate course General Chemistry.
- Feb. 2012 - Dec 2013 **Chemistry teacher at high school and Monograph Development Coordinator of International Baccalaureate Studies**, *Congregación de los Sagrados Corazones Colegio SS. CC. Recoleta*, Lima, Peru
- 2nd Semester 2012 **Teaching Assistant**, Science Department National University of Engineering, Lima, Peru
Teaching Assistant for the undergraduate course General Chemistry
- 1st Semester 2012 **Teaching Assistant**, Science Department National University of Engineering, Lima, Peru
Teaching Assistant for the undergraduate course Inorganic Chemistry
- 2nd Semester 2011 **Teaching Assistant**, Science Department National University of Engineering, Lima, Peru.
Teaching Assistant for the undergraduate course General Chemistry.
- 1st Semester 2008 **Teaching Assistant**, Science Department National University of Engineering, Lima, Peru.
Teaching Assistant for the undergraduate course Inorganic Chemistry I.
- 2nd Semester 2007 **Teaching Assistant**, Science Department National University of Engineering, Lima, Peru.
Teaching Assistant for the undergraduate course Inorganic Chemistry IV.

Working

- Dec 2009 **Graduate research experience**, *Instituto de Minería y Medio Ambiente*. National University of Engineering, Lima, Peru.
- Dec 2010 Area of instrumental analytical determination.
- 2007 **Undergraduate research experience**, *Laboratorio de Agua, Suelo y Medio Ambiente del Departamento de Recursos de Agua y Tierra de la Universidad Nacional Agraria "LA MOLINA"*, Lima, Peru.
Area of instrumental analytical determination.

Research Interests

Chemistry, Biopolymers, Bioremediation, Antioxidants, Polymeric Biomaterials, Tissue Engineering, Skin-like, Biochemical.

Publications

Thesis

- 2016 **Production and Characterization of starch and flour from Andean Tubers: mashua (*Tropaeolum tuberosum*) and Olluco (*Ullucus tuberosus*)**. In Portuguese, Master in Chemistry, Supervisor: Delia Rita Tapia Blácido, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto of University of São Paulo (FFCLRP - USP), *Ribeirão Preto*, Brazil.

Papers

- 2020 **Development of Epidermal Equivalent from Electrospun Synthetic Polymers for In Vitro Irritation/Corrosion Testing** Camarena, Denisse Esther Mallaupoma; Matsuyama, Larissa Satiko Alcântara Sekimoto; Maria-Engler, Silvy Stuchi; Catalani, Luiz Henrique. *Nanomaterials*^{SCR}, v. 10, p. 2528, 2020.
- 2011 **Estudio de Biosorción de Pb(II) y Cd (II) Utilizando Cápsulas de Quitosano – Alginato**. *Revista de la Facultad de Ciencias de la UNI – REVCUNI* 14, (2) (2011) 17 -25.

Presentations in Conferences

- 2017 **IUPAC 49th General Assembly** – Poster presentation “Synthetic Scaffolds from Electrospun Polymers in the Production of Epidermis Equivalent”. São Paulo, Brazil.

- 2015 **Symposium - Simpósio de Alimentos e Nutrição (SIAN)**
 IISIAN SIMPÓSIO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
 Oral presentation
 "Produção e caracterização de farinha e amido de tubérculos andinos: mashua (*Tropaeolum tuberosum*) e olluco (*Ullucus tuberosus*)". Rio de Janeiro, Brazil.
- 2012 **XXVI Peruvian Chemistry Congress** – Oral presentation
 "Estudio de biosorción de Pb(II) y Cd(II) utilizando cápsulas de Quitosano-Alginato". Arequipa, Peru.

Meetings Organization

- 2015 **1° Encontro Nacional de Química Biotecnológica Agroindustrial – ENQBIOTEC**
 Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto of University of São Paulo (FFCLRP - USP), Ribeirão Preto, Brazil.
- Jan. 2013 **Encuentro Científico Internacional ECI 2013 i**
 Centro de Preparación para la Ciencia y Tecnología CEPRECYT, Lima, Peru.
- Aug. 2009 **Encuentro Científico Internacional ECI 2009i**
 Centro de Preparación para la Ciencia y Tecnología CEPRECYT, Lima, Peru.
- Jan. 2009 **Seminary – Seminario Científico Internacional de Verano- SCI 2009v.**
 Centro de Preparación para la Ciencia y Tecnología CEPRECYT, Lima, Peru.
- Jan. 2009 **Encuentro Científico Internacional ECI 2009 v**
 Centro de Preparación para la Ciencia y Tecnología CEPRECYT, Lima, Peru.
- Aug. 2008 **XIV Encuentro Científico Internacional de Invierno ECI 2008 i**
 Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), Lima, Peru.
- Jan. 2008 **XIV Encuentro Científico Internacional de Verano ECI 2008 v**
 Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación

Tecnológica (CONCYTEC), Lima, Peru.

Languages

Spanish Native Speaker

English Comprehends Reasonably, Speaks Little, Reads Reasonably,
Writes Reasonably

Portuguese Comprehends Well, Speaks Well, Reads Well, Writes Well

Fellowships

Feb. 2014 - Feb. 2016 Scholarship: *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).*

May. 2016 - July 2020 Scholarship: *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).*