

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB  
CAMPUS GAMA – FGA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

**ÉTICA E REGULAÇÃO NO USO DE PLATAFORMAS *ORGANS-ON-A-CHIP* PARA ESTUDOS DE FERIDAS  
DO TIPO PÉ DIABÉTICO: PERSPECTIVAS DA ENGENHARIA BIOMÉDICA E PESQUISA TRANSLACIONAL  
NO BRASIL**

**ANA KAROLINE ALMEIDA DA SILVA**

ORIENTADORA: DRA. SUÉLIA DE SIQUEIRA RODRIGUES FLEURY ROSA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

FACULDADE UNB GAMA – FGA



**ÉTICA E REGULAÇÃO NO USO DE PLATAFORMAS *ORGANS-ON-A-CHIP* PARA  
ESTUDOS DE FERIDAS DO TIPO PÉ DIABÉTICO: PERSPECTIVAS DA ENGENHARIA  
BIOMÉDICA E PESQUISA TRANSLACIONAL NO BRASIL**

**ANA KAROLINE ALMEIDA DA SILVA**

**ORIENTADORA: DRA. SUÉLIA DE SIQUEIRA RODRIGUES FLEURY ROSA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM  
ENGENHARIA BIOMÉDICA

PUBLICAÇÃO: 174A/2023  
BRASÍLIA/DF, AGOSTO DE 2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB

FACULDADE UNB GAMA - FGA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO

**ÉTICA E REGULAÇÃO NO USO DE PLATAFORMAS *ORGANS-ON-A-CHIP* PARA  
ESTUDOS DE FERIDAS DO TIPO PÉ DIABÉTICO: PERSPECTIVAS DA ENGENHARIA  
BIOMÉDICA E PESQUISA TRANSLACIONAL NO BRASIL**

ANA KAROLINE ALMEIDA DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

---

DRA. SUÉLIA DE SIQUEIRA RODRIGUES FLEURY ROSA  
(ORIENTADORA / PRESIDENTE)

---

DR. JOSÉ CARLOS TATMATSU-ROCHA  
(EXAMINADOR INTERNO)

---

DRA. CICÍLIA RAQUEL MAIA LEITE  
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 18 DE AGOSTO DE 202

## FICHA CATALOGRÁFICA

DD111? Da Silva, Ana Karoline Almeida  
Ética e regulação no uso de plataformas *Organs-on-a-chip* para estudos de feridas do tipo pé diabético: perspectivas da engenharia biomédica e pesquisa translacional no Brasil / Ana Karoline Almeida Da Silva; orientador Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa. -- Brasília, 2023.  
147 p.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) --  
Universidade de Brasília, 2023.

1. Organ-on-a-chip. 2. Úlcera do Pé Diabético. 3. Pesquisa Translacional em Saúde. 4. Legislação e Regulamentação de Equipamentos Médicos. 5. Pesquisa, Desenvolvimento & Inovação . I. Fleury Rosa, Suélia de Siqueira Rodrigues, orient. II. Título.

## REFERÊNCIA

Da Silva, Ana Karoline Almeida (2023). Ética e regulação no uso de plataformas *Organs-on-a-chip* para estudos de feridas do tipo pé diabético: perspectivas da engenharia biomédica e pesquisa translacional no Brasil. Dissertação de mestrado em Engenharia Biomédica, Publicação 174A/2023, Programa de Pós-Graduação, Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 147p.

## CESSÃO DE DIREITOS

Autor: Ana Karoline Almeida da Silva

Título: Ética e regulação no uso de plataformas *Organs-on-a-chip* para estudos de feridas do tipo pé diabético: perspectivas da engenharia biomédica e pesquisa translacional no Brasil

Grau: Mestre

Ano: 2023

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender essas cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

anakaroline.alms@gmail.com

Brasília, DF – Brasil

*Dedico este trabalho ao meu querido, Arthur Almeida (ou como você prefere ser chamado: “neném Arthur”). Esta dissertação é testemunho do amor incondicional que sinto por você e da incrível e desafiadora jornada que compartilhamos desde o início da gestação. Você esteve ao meu lado em cada passo da minha vida como cientista, desde as experiências primárias na pesquisa, até o ingresso na pós-graduação. Você sempre foi e será o propósito maior por trás de meus estudos. Sua presença me dá forças para seguir em frente diante de qualquer dificuldade, me incentiva a persistir mesmo no ápice do cansaço, e me motiva diariamente a tentar sempre evoluir. Você, meu querido Arthur, é a personificação do amor, da resiliência e da alegria que permeiam minha vida.*

*Que você cresça entendendo que a busca pelo conhecimento se tornará uma parte valiosa da sua identidade. Que se inspire em nossa jornada e se sinta encorajado a perseguir seus próprios objetivos, sempre lembrando que nada é impossível quando se tem determinação e amor em seu coração. Eu te dedico esse sucesso, meu filho, como uma prova de que nunca devemos limitar nossos sonhos e que temos o poder de superar qualquer obstáculo quando colocamos o coração naquilo que fazemos. Você me ensinou lições que nenhum livro ou artigo acadêmico poderia oferecer. Espero que, ao ler estas palavras um dia, você se sinta orgulhoso de ter sido minha maior motivação e compreenda o quão profundamente eu te amo.*

*Com todo o meu amor, “mamãe do Arthur”.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a **Deus** pela vida, pela saúde do meu filho Arthur, pela força e pela sabedoria concedidas ao longo desta jornada. Sua presença constante me deu a fé necessária para enfrentar os árduos desafios que apareceram durante a minha caminhada. Obrigada pelos anjos que colocou em meu caminho para que eu conseguisse chegar até aqui. À minha família, **Geralda** (mãe), **Manoel** (pai), **Aline**, **Pedro** e **Júnior** (irmãos) pelos ensinamentos e incentivo. Agradeço ao meu filho, **Arthur**, que acompanha essa jornada desde o começo.

Em especial, agradeço à minha querida orientadora, Professora Dra. **Suélia Rosa**. Sou imensamente grata por sua orientação, motivação e inspiração ao longo deste processo. É difícil escrever sobre o que a sua chegada representou não apenas na minha carreira, mas na minha vida. Você não apenas acreditou em mim, mas também me incentivou a dar o meu melhor. Guardo no coração a conversa que tivemos por telefone, quando a senhora me sugeriu tentar iniciar a pós-graduação e disse que estaria ao meu lado. A sua presença tem uma luz inexplicável, obrigada por tantas palavras de carinho e incentivo durante essa jornada. Sua força, humildade, sabedoria e amizade foram fundamentais para o meu crescimento como pesquisadora e como pessoa. Finalizamos esta etapa juntas, lado a lado, e iniciamos outra em breve. Obrigada por não hesitar em nenhum momento na crença de que eu conseguiria finalizar este trabalho. É uma honra fazer parte desta etapa valiosa de sua incrível carreira, marcada pelo desenvolvimento de equipamentos médicos e tecnologias de ponta para a população que mais precisa. Agradeço por me tratar como uma filha e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao professor Dr. **Mario Rosa**, agradeço por compartilhar seu vasto conhecimento acadêmico e por todos os ensinamentos profissionais valiosos que adquiri ao longo dessa jornada. Obrigada pela paciência durante os inúmeros trabalhos que desenvolvemos juntos até aqui. Ao meu “pai acadêmico”, professor Dr. **Tatmatsu**, agradeço por abrir as portas da ciência e do conhecimento para mim. Sua influência e orientação foram fundamentais para o meu despertar acadêmico e para a minha dedicação à pesquisa. Obrigada pela amizade, confiança e pelos inúmeros conselhos em momentos difíceis. Aos professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, em especial às professoras, Dra. **Marcella** e à Dra. **Glécia**, agradeço por todo o carinho, apoio e ensinamentos transmitidos ao longo deste percurso. Aos colegas e amigos que conheci no **BioEngLab** e no **Núcleo Organ.on.a.chip**,

obrigada pela colaboração, parceria e amizade. Vocês tornaram essa jornada mais leve e enriquecedora. Agradeço por compartilharmos conhecimentos e experiências, crescendo juntos como pesquisadores.

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento ao meu grande parceiro nesta jornada, o doutorando **Gustavo Nunes**. Sua presença e suporte foram fundamentais em cada etapa desse percurso. Agradeço por me ouvir, compreender e estar ao meu lado nos momentos difíceis que envolviam questões pessoais e os desafios acadêmicos. Sua dedicação em incentivar e compartilhar conhecimentos contribuiu significativamente para o meu crescimento como pesquisadora. Agradeço pelos inúmeros aprendizados desde o início dessa jornada e por dedicar várias tardes às nossas reuniões, que sempre resultavam em discussões sobre assuntos incríveis. Sua presença e apoio foram inestimáveis e fizeram uma diferença imensa. Muito obrigada, Gustavo, por todo o seu auxílio e por ser uma pessoa tão generosa, humilde e inspiradora.

**Rafael Pissinati, Mili, Rafael Mendes e Marcos**, obrigada por todo apoio, pelos conselhos, conversas e risadas. Todo o tempo ao lado de vocês, foi valioso. À **Carolina Ramos**, por estar presente e por ser uma amiga incrível durante essa jornada desafiadora. Fui sua primeira amiga na pós-graduação (morava em outro estado, mas isso foi apenas um detalhe), e não imaginava que se tornaria uma rede de apoio tão incrível mesmo à distância. Serei eternamente grata por compartilhar suas experiências comigo, sempre mostrando o lado bom da vida. Você me ajudou desde o primeiro momento que a conheci, inclusive revisando inúmeros documentos comigo na tentativa de entrar no mestrado. Estarei sempre na torcida pelo seu sucesso, e o da sua família. Agradeço também à **Isolda**, pelos conselhos, apoio, amizade e carinho. Que a sua jornada seja cheia de luz como você merece.

Aos amigos especiais **Vanessa, Tatiana, Vinícius, Maria Laura, Maria Paula, Pedro Rodrigo, Layana, Pedro Henrique, Jade e Dyane**, meu profundo agradecimento por não soltarem a minha mão durante toda a minha jornada. E mesmo com a minha falta de tempo, sempre estiveram ao meu lado quando precisei.

Agradeço à Universidade de Brasília (UnB) pelo acolhimento aos alunos. Ao **Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica (PPGEB)** pelo suporte e apoio sempre que solicitado. À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos subsidiada enquanto cursava outro programa de pós-graduação (Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas – PPGCM/UnB). À **Fundação de Apoio à**

**Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF)** pelo suporte financeiro ao Projeto e bolsa concedida, que me possibilitou a continuidade dos estudos. E não menos importante, agradeço à banca avaliadora pelo aceite, pelas contribuições e correções inestimáveis como avaliadores deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês. Seja mediante palavras de encorajamento, suporte emocional, compartilhamento de conhecimentos ou qualquer outra forma de ajuda, sua contribuição foi inestimável e valorizada. Que a vida lhes retribua com bênçãos e realizações, e que nosso caminho continue sendo iluminado pelo compartilhamento de conhecimento, amizade e sonhos realizados. Todos os momentos com vocês estarão guardados para sempre em meu coração.



“É justo que muito custe o que muito vale”

– Santa Teresa D'Ávila

## RESUMO

A investigação e avanço na tecnologia dos modelos de *Organ-on-a-chip* (OoC) estão ganhando cada vez mais atenção, devido ao seu potencial revolucionário nos campos da medicina e engenharia biomédica. Esses dispositivos em microescala foram criados para imitar tanto a estrutura quanto a função dos órgãos humanos, proporcionando maior precisão em ensaios pré-clínicos tradicionais. Eles oferecem a capacidade de realizar testes em alta escala, o que acelera a descoberta de novos medicamentos. Além disso, tem o potencial de diminuir a dependência de testes em animais para avaliações toxicológicas, contribuindo para melhorias na ética em Pesquisa.

Uma das aplicações promissoras para os OoCs é o estudo da *Diabetes Mellitus* (DM) e suas complicações, como a úlcera do pé diabético (UPD). A UPD é uma comorbidade grave associada a altas taxas de morbimortalidade e amputações, representando um grande desafio para os sistemas de saúde globais. A utilização desta tecnologia nesse contexto visa proporcionar *insights* importantes sobre a fisiopatologia, e permitir novas abordagens terapêuticas mais eficazes, incluindo a medicina personalizada.

Essa dissertação tem como objetivo analisar os aspectos éticos e regulatórios da implementação do OoC na Pesquisa Translacional em Saúde (PTS) no Brasil. Especial atenção é dada ao papel desempenhado pela Engenharia Biomédica no desenvolvimento dessa inovadora tecnologia. A dissertação está estruturada em sete capítulos que exploram diversas facetas relacionadas aos dispositivos em questão, bem como sua aplicação por meio de um estudo de caso centrado no contexto do pé diabético. Além disso, o trabalho engloba a produção de duas revisões sistemáticas pertinentes ao tema.

Além dos mencionados estudos, foram examinadas as leis e regulamentos tanto nacionais quanto internacionais que governam a utilização dos OoCs. Adicionalmente, foi concebido um plano de divulgação científica para promover maiores informações sobre essas plataformas, enfatizando sua significância na pesquisa e na inovação científica. Essa abrangente abordagem metodológica permitiu investigar várias facetas dos dispositivos OoCs, bem como, as dificuldades regulatórias enfrentadas no país para ampla adoção destes equipamentos nas fases da PTS.

Este estudo marca um avanço notável no campo da regulamentação de dispositivos no Brasil. Seu propósito é estabelecer uma base sólida que possa ser empregada inclusive na formulação de políticas públicas e diretrizes regulatórias no país. A interconexão vital entre a Engenharia Biomédica e o setor da saúde é ressaltada, propulsando o Brasil à vanguarda da pesquisa biomédica. Isto assegura que a utilização dos OoCs não só enriqueça o conhecimento científico, mas também proporcione benefícios à sociedade como um todo. Este trabalho compreende ações coordenadas, convidando as autoridades reguladoras, os pesquisadores e os profissionais de saúde a unirem esforços rumo a um ambiente regulatório eficiente e ágil. Visamos a adoção ética e segura dos dispositivos microfisiológicos, buscando abrir portas para uma nova era de descobertas e terapias inovadoras, com o potencial de impactar positivamente a saúde e a qualidade de vida de milhões de cidadãos brasileiros.

**Palavras-chave:** Pé Diabético. Dispositivos *Lab-On-A-Chip*. Microfluídica. Pesquisa Translacional Biomédica. Pesquisa em Sistemas de Saúde Pública.

## ABSTRACT

The research and development of *Organ-on-a-chip* (OoC) devices have been garnering increasing attention due to their revolutionary potential in the field of medicine and biomedical research. These miniature devices are designed to replicate the structure and function of human organs with greater precision than traditional cell cultures or animal models. They offer high-throughput screening, accelerating the discovery of new drugs and identifying potential side effects or interactions between different organs with greater accuracy. Additionally, they have the potential to reduce the need for animal models in toxicological testing.

One of the promising applications for OoCs is the study of Diabetes Mellitus (DM) and its complications, such as diabetic foot ulcers (DFU). DFU is a severe comorbidity associated with high rates of morbidity, mortality, and amputations, posing a major challenge to global healthcare systems. The use of this technology in this context aims to provide crucial insights into the pathophysiology and enable more effective therapeutic approaches, including personalized medicine.

This dissertation aims to analyze the ethical and regulatory aspects of implementing OoCs in Translational Health Research (THR) in Brazil, with a focus on the role of Biomedical Engineering in developing this technology. The work is divided into seven chapters, covering various elements related to the devices and their application in the context of diabetic foot ulcers, including two systematic reviews.

The first article focuses on the use of microphysiological systems in the DFU scenario, exploring their applicability in understanding functional changes in the body and the underlying disease mechanisms. The second study sought evidence on a potential healing biocompound, urucum, for the treatment of chronic wounds. Additionally, national and international legislations and regulations governing the use of OoCs were analyzed.

Furthermore, a scientific marketing plan was developed to disseminate knowledge about these platforms and their significance in scientific research and innovation. This comprehensive methodology allowed exploring different aspects of OoCs and their relevance to DFU studies, as well as promoting the advancement of this technology in national THR.

This dissertation represents a significant milestone in the field of legislation and regulation of devices in Brazil. It aims to provide a solid foundation that can be used in shaping public policies and regulatory guidelines in the country. The importance of interdisciplinarity between Biomedical Engineering and the healthcare sector is emphasized, propelling Brazil to the forefront of biomedical research and ensuring that the use of OoCs benefits not only science but society as a whole. This work serves as a call to action for regulatory authorities, researchers, and healthcare professionals to join forces in creating an agile and efficient regulatory environment that encourages the safe and ethical advancement of OoCs, paving the way for a new era of innovative discoveries and treatments with the potential to positively transform the health and quality of life of millions of Brazilians.

**Keywords:** Diabetic foot. Wound Healing. Lab-on-a-chip Devices. Microfluidics. Translational Research, Biomedical. Public Health Systems Research.

## SUMÁRIO

<b>Apresentação da Dissertação .....</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo I. Introdução, objetivos, justificativa e contribuições .....</b>	<b>24</b>
1.1 Da bancada à beira do leito: o papel da pesquisa translacional na inovação de produtos e fármacos para a saúde .....	27
1.2 <i>Organ-on-a-chip</i> : Uma Abordagem Revolucionária na Reprodução de Órgãos Humanos	31
1.3 Implicações legislativas sobre métodos alternativos ao uso de animais na pesquisa científica brasileira .....	35
1.4 Considerações regulatórias da FDA sobre modelos de cultura 3D .....	37
1.5 Regulamentação brasileira de <i>Organ-on-a-chip</i> .....	39
1.6 Estudo de caso: aplicações de <i>Organ-on-a-chip</i> no contexto do pé diabético .....	41
1.7 Tratamentos do pé diabético no sus e o avanço de equipamentos médicos com contribuição da engenharia biomédica .....	46
1.8 Objetivos .....	52
1.8.1 Objetivo geral .....	52
1.8.2 Objetivos específicos .....	52
1.9 Contribuições da Dissertação .....	53
<b>Capítulo II. Materiais e métodos .....</b>	<b>53</b>
2.1 Desenho de estudo .....	56
2.2 Busca bibliográfica nos órgãos regulamentadores brasileiros .....	56
2.3 Escrita de duas revisões sistemáticas .....	56
2.4 Produção de marketing científico – apresentação gráfica da plataforma <i>Organ-on-a-chip</i> .....	58
<b>Capítulo III. Artigo – <i>Organ-on-a-chip</i> for diabetic wound foot neovascularization: a systematic review of preclinical studies and future directions.....</b>	<b>60</b>
<b>Capítulo IV. Capítulo de livro – <i>bixa orellana</i> l. And its implications in human health: perspectives and new trends.....</b>	<b>61</b>
<b>Capítulo V. Marketing científico – ilustração de plataformas <i>Organs-on-a-chip</i>: funcionamento, aplicações e potencialidades.....</b>	<b>62</b>
5.1 Marketing científico: <i>Organ-on-a-chip</i> e suas aplicações .....	63
<b>Capítulo VI. Discussão.....</b>	<b>64</b>
6.1 Critérios de padronização, confiabilidade, <i>upscaling</i> e redução de custos para promoção da pesquisa translacional envolvendo <i>Organ-on-a-chip</i> .....	65
6.2 Legislação brasileira aplicada a dispositivos microfisiológicos em saúde .....	73
6.3 <i>Organs-on-a-chip</i> e sua relação com a quarta revolução industrial.....	75
<b>Capítulo VII. Considerações finais.....</b>	<b>76</b>
7.1 Conclusão .....	77
7.2 Trabalhos futuros .....	78
<b>VIII. Referências .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Quadro 1.1.** Descrição dos Princípios dos 3Rs. Esses Princípios dos 3Rs são fundamentais para garantir a ética e a responsabilidade na pesquisa científica, buscando minimizar o uso de animais, reduzir seu sofrimento e promover métodos substitutivos que possam fornecer resultados científicos robustos. As plataformas *Organs-on-a-chip* se alinham a esses princípios, oferecendo uma alternativa promissora para a pesquisa translacional, que visa avanços científicos e médicos, enquanto respeita a proteção e o bem-estar dos animais..... 36

**Quadro 6.1.** Perguntas inerentes ao desenvolvimento e aplicação de plataformas *Organs-on-a-chip* no mercado, com intenção de simplificar o processo e garantir a qualidade por meio de padrões e diretrizes. .... 71

**Quadro 6.2.** Legislações brasileiras que estão relacionadas a implementação de métodos alternativos ao uso de animais. .... 74

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Organização da dissertação: Classificação em capítulos, de acordo com a estruturação – contextualização e metodologia, pesquisas originais e resultados publicados, discussões e principais achados éticos e regulatórios.....20

**Figura 1.1.** Desafios e Custos no Desenvolvimento de Novos Medicamentos: Da Descoberta à Fase Clínica. Requer anos de pesquisa, alto investimento financeiro, equipe especializada e fases clínicas regulamentadas. Pode-se levar mais anos do que o previsto, dependendo de inúmeros fatores para que o fármaco seja comercializado. ....28

**Figura 1.2.** Principais etapas do processo de Pesquisa Translacional de um fármaco ou produto através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 1. Desenvolvimento e pesquisa: O primeiro passo é realizar pesquisas e estudos para desenvolver o equipamento médico ou fármaco. Isso inclui testes em laboratório, estudos pré-clínicos e ensaios clínicos em seres humanos, de acordo com os padrões de segurança e eficácia. 2. Solicitação de registro ou cadastro: Após concluir as etapas de pesquisa e desenvolvimento, o fabricante ou empresa responsável deve fazer a solicitação de registro ou cadastro do equipamento médico ou fármaco junto à ANVISA. Essa solicitação deve incluir dados e informações detalhadas sobre o produto, incluindo estudos de segurança, eficácia e qualidade. 3. Análise documental: A ANVISA realiza uma análise documental inicial para verificar se a solicitação está completa e se todos os requisitos legais foram atendidos. Caso a documentação esteja incompleta, a empresa é notificada para fazer as correções necessárias. 4. Avaliação técnica: Após a análise documental, a ANVISA realiza a avaliação técnica do equipamento médico ou fármaco. Isso envolve a revisão dos estudos e dados fornecidos pela empresa, verificação da conformidade com os requisitos regulatórios e avaliação da segurança, eficácia e qualidade do produto. 5. Inspeção: Em alguns casos, a ANVISA pode realizar inspeções nas instalações de fabricação do equipamento médico ou fármaco para garantir que estejam em conformidade com as boas práticas de fabricação e com os requisitos regulatórios. 6. Análise e deliberação: Com base na avaliação técnica e, se necessário, nas inspeções realizadas, a ANVISA delibera sobre a aprovação do registro do produto. Essa deliberação pode resultar em aprovação, solicitação de informações adicionais ou recusa. 7. Emissão do registro ou cadastro: Se aprovado, é emitido o registro ou cadastro. O registro é concedido para produtos de maior risco, enquanto o cadastro é destinado a produtos de menor risco, mas ainda sujeitos à regulamentação sanitária. 8. Monitoramento pós-comercialização: Após a aprovação e a comercialização do equipamento ou medicamento, a ANVISA monitora continuamente a segurança e eficácia por meio de relatórios de eventos adversos e outras formas de monitoramento pós-comercialização. A empresa também é responsável por relatar quaisquer eventos adversos à ANVISA .....30

**Figura 1.3.** A importância do ambiente 3D para a engenharia da função celular. A composição da MEC, incluindo colágeno, proteoglicanos e proteínas matricelulares, desempenha papéis essenciais no controle da adesão, migração e diferenciação celular. Além disso, a presença de proteínas morfogenéticas ligadas à matriz e a perfusão do meio

de cultura do tecido também têm influência na regulação dos processos celulares e gradientes bioquímicos locais) .....33

**Figura 1.4.** Métodos de Fabricação para Chips Microfluídicos. (a) Moldagem por réplica cria carimbos com formas complementares a padrões gravados em chips de silício por fotolitografia. Uma fina camada uniforme de material fotossensível (fotorresiste) é aplicada por centrifugação em um chip de silício, que é então sobreposto por uma máscara fotográfica (por exemplo, uma placa de vidro transparente com camadas opacas de cromo) com um padrão microscópico gerado por software de design assistido por computador. A máscara fotográfica protege algumas regiões do fotorresiste e expõe outras durante a exposição à luz ultravioleta (UV) de alta intensidade. O material exposto à luz UV se dissolve em uma solução de revelador, deixando o padrão microscópico gravado no fotorresiste. Carimbos elastoméricos com uma topografia superficial complementar à superfície gravada são criados por uma técnica de moldagem por réplica, na qual um pré-polímero líquido de Polidimetilsiloxano (PDMS) é moldado sobre o padrão de fotorresiste gravado, polimerizado e removido. O carimbo de PDMS pode ser usado para a impressão microcontato de moléculas da MEC em qualquer substrato, incluindo aqueles dentro de dispositivos microfluídicos (não mostrados). (b) Um dispositivo microfluídico de canal único é fabricado criando um carimbo de PDMS com duas entradas, um único canal principal e uma saída e selando-o conformalmente a um substrato plano de vidro. Uma fotografia de um dispositivo de cultura microfluídica de duas câmaras, com corantes vermelho e azul sendo perfundidos por canais superiores e inferiores, é mostrada à direita. Os canais laterais transparentes são usados para aplicar sucção cíclica para distorcer ritmicamente a membrana central flexível e as células aderentes .....34

**Figura 1-1.** Considerações regulatórias para o uso de modelos de cultura celular 3D. Ilustração esquemática de questões específicas sobre seleção de modelos 3D, incluindo aplicação geral, contexto específico de uso e validade do modelo, para auxiliar na discussão com a FDA.....38

**Figura 1-2** Gráfico de estimativas de diabetes (20-79 anos) - Pessoas com diabetes, em 1.000. O gráfico fornece uma representação visual das estimativas do número de pessoas afetadas pela doença em diferentes períodos. Em 2021, haviam em torno de 15.733,6 portadores de DM. Em 2030, estima-se um aumento exponencial de 19.224,1, enquanto em 2045 este número poderá chegar a 23.223,6 indivíduos acometidos.....42

**Figura 1.7.** Principais complicações tradicionais e complicações emergentes da *Diabetes Mellitus*. As complicações tradicionais incluem: 1) doença renal diabética, 2) retinopatia, 3) neuropatia periférica, 4) doença coronariana e insuficiência cardíaca, 5) acidente vascular cerebral e 6) doença vascular periférica. As complicações periféricas trata-se de: 7) câncer, 8) infecções, 9) doença hepática, 10) incapacidade funcional, 11) deficiência cognitiva e 8) transtornos afetivos. Esta não é uma lista exaustiva de complicações associadas à diabetes.....43

**Figura 1.3.** Exemplos característicos de lesões pré-ulcerativas (A), neuropáticas (B e C), neuroisquêmicas (D-F) e isquêmicas (H-I) do pé diabético. As lesões mais superficiais ou profundas, que não afetam o tecido dérmico, são consideradas pré-ulcerativas, porém apresentam um alto risco de progressão para uma úlcera do pé diabético .....44

**Figura 1.4.** Fisiopatologia de feridas diabéticas. Feridas diabéticas apresentam angiogênese desregulada, resposta inflamatória crônica, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e colonização bacteriana persistente, frequentemente evoluindo para um biofilme de difícil tratamento .....45

**Figura 1.5.** Equipamento Rapha® com lâmina de látex e tratamento padrão com o dispositivo. O kit Rapha® é composto por um dispositivo de LED que emite luz vermelha, lâminas de látex e itens para higienização da ferida. Após a limpeza, a lâmina é aplicada sobre a lesão e o aparelho de LED é colocado em seguida. O tratamento é realizado diariamente durante 35 minutos e tem apresentado resultados mais rápidos em comparação com o tratamento convencional. O procedimento padrão, que utiliza alginato de cálcio ou espuma de prata, leva seis meses. É importante realizar a limpeza da área antes de aplicar a membrana de látex microperfurada, que deve cobrir toda a superfície da lesão. O dispositivo de LED é fixado ao corpo do paciente e, após ligado, inicia-se a sessão de tratamento que dura 30 minutos, sendo indicado pelo sinal sonoro emitido ao final da sessão .....48

**Figura 1.6.** Maturidade Tecnológica - *Technology Readiness Levels* (TRL) do Equipamento RAPHA® (TRL 8). TRL 01: Patente Equipamento Rapha Aparelho emissor de luz led + Curativo de Látex. TRL 02: Desenvolvimento e Produção de *Mockups* para testes Pré-Clínicos. TRL 03: Realização de testes em animais. CEUA/UnB nº 64/2018. CEUA/UnB nº 77/2018. TRL 04: Ensaio Pré-Clínicos complementares. TRL 05: Ensaio Clínico Randomizado Comparativo Duplo Cego. TRL 06: Parlatório ANVISA - Deferimento desenho ensaio clínico para quesitos regulatórios. Notificação ANVISA final pesquisa clínica. Produto Classe II. TRL 07: Termo de Sigilo; Transferência e/ou Licenciamento Tecnológico voltado para Indústria na área da saúde. TRL 08: Adequação produtiva para o Equipamento Rapha atender quesitos regulatórios INMETRO e ANVISA. TRL 09: Adequação planta industrial para produção em escala do Equipamento Rapha e produção em escala industrial .....49

**Figura 1.7.** Contribuições diretas e indiretas da dissertação sobre os avanços científicos relacionados à tecnologia *Organ-on-a-chip* .....54

**Figura 2.** Fluxograma metodológico do desenvolvimento das revisões sistemáticas. As etapas principais envolveram: a) planejamento, b) seleção dos estudos, c) síntese dos dados e análise das evidências e d) publicação ou submissão do trabalho .....58

**Figura 6.** Fatores relacionados a ampla adoção de dispositivos *Organs-on-a-chip*. 1. Harmonização - A harmonização evita redundâncias e conflitos entre estratégias de teste padronizadas desenvolvidas independentemente por laboratórios de pesquisa e desenvolvimento. Ela é essencial para avaliação de produtos, desenvolvimento e aprovação, podendo reduzir a necessidade de estudos em animais e dados clínicos. 2. Segurança e desempenho - Métodos de teste padronizados permitem comparação direta de segurança e desempenho entre produtos similares ou limiars estabelecidos de segurança. São geralmente simples e não exigem equipamentos especializados e custosos. 3. Desenvolvimento de produtos em estágios iniciais - Os padrões auxiliam pesquisadores no estágio inicial do desenvolvimento de produtos, preparando-os para o ciclo de vida



completo do produto por meio de um caminho definido para comercialização. 4. Desenvolvimento de cadeias de suprimentos - Padrões para materiais, fabricação e testes promovem o estabelecimento de cadeias de suprimentos industriais, reduzindo os custos desde pesquisadores básicos até fabricantes do produto final. 5. Aceleração de novatos na área - Padrões permitem que usuários "não especialistas" utilizem componentes microfluídicos como ferramentas, sem a necessidade de compreender profundamente os mecanismos por trás do sistema. Isso facilita a entrada de novos atores no campo .....72

## LISTA DE NOMENCLATURAS E ABREVIações

<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional
<b>ADMTE</b>	Absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade
<b>AOS</b>	Apneia Obstrutiva do Sono
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>BixO</b>	<i>Bixa Orellana L.</i>
<b>BraCVAM</b>	Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos
<b>CASIS</b>	<i>Center for the Advancement of Science in Space</i>
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>CTEs</b>	Células-tronco Embrionárias
<b>CTNAs</b>	Células-tronco Neonatais ou Adultas
<b>CTPs</b>	Células-tronco Pluripotentes Induzidas
<b>DAP</b>	Doença Arterial Periférica
<b>DARPA</b>	Agência de Projetos de Pesquisa Avançada de Defesa
<b>DGA</b>	Ácido Diglicólico
<b>ECR</b>	Ensaio Clínico Randomizado
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>HSE</b>	Equivalente de Pele Humana
<b>IDF</b>	<i>International Diabetes Federation</i>
<b>LED</b>	Diodo Emissor de Luz
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular
<b>NIH</b>	<i>National Institutes of Health</i>
<b>NP</b>	Neuropatia Periférica
<b>Nrf2</b>	Fator Nuclear Eritroide 2
<b>OoC</b>	<i>Organ-on-a-chip</i>
<b>OoCs</b>	<i>Organs-on-a-chip</i>
<b>PD&amp;I</b>	Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação
<b>PDMS</b>	Dimetil polissiloxano
<b>PK</b>	Farmacocinética
<b>PTS</b>	Pesquisa Translacional em Saúde
<b>RENAMA</b>	Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso de Animais

<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>UPD</b>	Úlcera do Pé Diabético
<b>UV</b>	Ultravioleta

# APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação é o primeiro produto científico a nível de pós-graduação do Núcleo de Desenvolvimento de Pesquisas e Inovação em *Organ-on-a-chip* e Engenharia de Tecidos (*Organ-on-a-chip* /UnB). O referido grupo é cadastrado no diretório do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), coordenado pela orientadora desta dissertação, Profa. Dra. Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa. O projeto em desenvolvimento é subsidiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), sob processo nº: 00193.00002366/2022-81, Edital 12/2022 – Programa FAPDF Learning – Chamada 04/2022 *Bio Health Learning*. De maneira global, a pesquisa almeja o desenvolvimento, recriação da função, modelagem e análise do processo de vascularização utilizando *Organ-on-a-chip* (OoC) e mecanobiologia, para ampliar a terapia de fotobioestimulação associada a biomaterial aplicado em feridas crônicas de pele.

Através deste trabalho, iremos abordar os aspectos éticos e regulatórios de OoCs em nível nacional, trazendo a visão da pesquisa translacional e da engenharia biomédica para o desenvolvimento de cada etapa subsequente. A dissertação está em conformidade com o regimento do Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade de Brasília (PPGEB/UnB). É composta principalmente por dois estudos integrados, do tipo revisões sistemáticas, que foram realizados com o intuito de identificar, analisar e sintetizar as principais evidências científicas disponíveis sobre o tema. Portanto, foi estruturada nos seguintes capítulos indicados na **Figura 1**.



**Figura 1.** Organização da dissertação: Classificação em capítulos, de acordo com a estruturação – contextualização e metodologia, pesquisas originais e resultados publicados, discussões e principais achados éticos e regulatórios.

## **CAPÍTULO I. INTRODUÇÃO, PROBLEMÁTICA, JUSTIFICATIVA, OBJETIVOS E CONTRIBUIÇÕES**

No primeiro capítulo desta dissertação, apresentamos uma introdução ao tema da implementação de dispositivos *Organ-on-a-chip* (OoCs) na pesquisa científica, bem como sua relevância em diferentes fases da Pesquisa Translacional em Saúde (PTS). Nosso foco é o estudo das úlceras do tipo Pé Diabético (UPD), sua relação entre métodos *in vitro* tridimensionais (3D) e o avanço da Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I) na área da saúde. Inicialmente, fornecemos uma visão geral da patologia, destacando sua importância, os tratamentos disponíveis e a necessidade de avanços tecnológicos na área médica. Adicionalmente, definimos os objetivos do estudo e introduzimos considerações éticas e regulatórias relacionadas à implementação dessas plataformas tanto na pesquisa quanto na indústria. Por fim, apresentamos as justificativas e contribuições deste trabalho, enfatizando a lacuna de conhecimento existente e os potenciais benefícios da utilização de OoCs no contexto específico das UPDs.

## **CAPÍTULO II. MATERIAIS E MÉTODOS**

Na apresentação dos materiais e métodos, esperamos apresentar o estabelecimento de uma base sólida e transparente para a condução das revisões sistemáticas e o desenvolvimento de buscas acerca da legislação sobre OoCs no Brasil. Esperamos que estes processos metodológicos embasados contribuam para uma análise rigorosa das evidências disponíveis e forneça uma comunicação clara e impactante sobre o tema. Ainda, detalhamos os métodos empregados no desenvolvimento do desenho técnico para divulgação dos OoCs. Incluímos a definição dos objetivos do desenho, a seleção dos elementos visuais e o planejamento da organização das informações.

## **CAPÍTULO III. ARTIGO: ORGAN-ON-A-CHIP FOR DIABETIC WOUND FOOT NEOVASCULARIZATION: A SYSTEMATIC REVIEW OF PRECLINICAL STUDIES AND FUTURE DIRECTIONS**

No terceiro capítulo, apresento uma revisão sistemática submetida à revista *Translational Research*, da editora *Elsevier*, com fator de impacto 7.8, que aborda a utilização de plataformas OoCs no contexto do pé diabético. Nessa revisão, investigamos estudos pré-

clínicos que empregaram culturas de células 3D para reproduzir e analisar aspectos inerentes à fisiopatologia. Além disso, enfatizamos as futuras perspectivas de aplicação dessas tecnologias inovadoras no estudo e tratamento das UPDs. As evidências coletadas indicam que os OoCs têm o potencial de avançar significativamente a compreensão da patogênese das feridas, impulsionando novas estratégias terapêuticas e, conseqüentemente, melhorando os cuidados e a qualidade de vida dos pacientes afetados por essa condição debilitante. As perspectivas futuras são promissoras, com a expectativa de que a contínua evolução dos OoCs contribua para uma abordagem mais precisa e eficaz no tratamento dessas complicações diabéticas.

#### **CAPÍTULO IV. CAPÍTULO DE LIVRO – “*BIXA ORELLANA L. AND ITS IMPLICATIONS IN HUMAN HEALTH: PERSPECTIVES AND NEW TRENDS*”**

Esta revisão sistemática foi publicada em uma edição especial da editora *Elsevier*, no livro *Studies in Natural Products Chemistry*. Buscamos explorar o significado da planta *Bixa orellana L. (BixO)* no contexto da saúde humana [1]. Neste capítulo, são abordadas várias perspectivas e tendências emergentes relacionadas ao potencial impacto desta na cicatrização de feridas crônicas.

Com o crescente interesse em remédios naturais e medicamentos à base de ervas, este capítulo lança luz sobre as propriedades farmacológicas, compostos bioativos e possíveis benefícios para a saúde que a *BixO* oferece. Ele também explora as últimas pesquisas e avanços, fornecendo uma visão esclarecedora de como esta planta pode ser aproveitada no desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas, e contribuir para promover a saúde humana de maneiras inovadoras.

Além disso, o trabalho possibilita novas perspectivas quanto à extrapolação e comparação dos resultados para plataformas 3D, como as OoCs. Combinar os conhecimentos desta revisão com o uso dessas plataformas pode aprimorar a compreensão do potencial da *BixO* no tratamento de UPD's e, abrir novos caminhos para o desenvolvimento de terapias mais eficazes nessa área.

#### **CAPÍTULO V: DESENVOLVIMENTO DE UM DESENHO DE MARKETING CIENTÍFICO PARA DIVULGAÇÃO DE PLATAFORMAS *ORGANS-ON-A-CHIP*: FUNCIONAMENTO, APLICAÇÕES E POTENCIALIDADES**

Este capítulo descreve o desenvolvimento de um desenho de *marketing* científico abrangente para divulgação das plataformas OoCs. Através dessa estratégia, busca-se promover a compreensão e conscientização sobre essas inovações tecnológicas avançadas, destacando seu potencial para impulsionar a pesquisa biomédica, o desenvolvimento de medicamentos e o avanço da medicina personalizada.

## **CAPÍTULO VI: DISCUSSÃO DOS ASPECTOS ÉTICOS E REGULATÓRIOS DA IMPLEMENTAÇÃO DE PLATAFORMAS *ORGANS-ON-A-CHIP* NA PESQUISA TRANSLACIONAL NO BRASIL, CONSIDERANDO A VISÃO DA ENGENHARIA BIOMÉDICA NO PAÍS**

No sétimo capítulo, serão discutidas as questões éticas e regulatórias relacionadas à implementação de plataformas OoCs na pesquisa translacional no Brasil de maneira mais profunda. Serão abordados temas como o estabelecimento de diretrizes e regulamentos específicos para a utilização dessas tecnologias no Brasil, comparando com as evidências científicas de outros países. Será realizada uma análise das atuais políticas e normas regulamentadoras brasileiras, identificando desafios e possíveis soluções para a implementação ética e regulatória de OoCs na PTS.

## **CAPÍTULO VII: CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O último capítulo dispõe sobre considerações finais acerca das contribuições dos artigos publicados e discussão ética e regulatória desta tecnologia na PTS. Apresentam-se as possíveis direções futuras de pesquisa e recomendações para a aplicação prática das descobertas obtidas por meio de OoCs, no cenário das UPDs. Ao estudar o sistema de translação de sistemas microfisiológicos em nível nacional, é possível compreender melhor os aspectos éticos envolvidos. Além disso, a regulação adequada desses dispositivos é essencial para garantir sua qualidade, segurança e eficácia.

## **CAPÍTULO I**

Introdução, Objetivos, Justificativa e Contribuições



# 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos medicamentos no âmbito da pesquisa translacional em saúde (PTS) é um processo longo, por vezes ineficiente e com altos custos envolvidos, que vai desde a descoberta de candidatos em bibliotecas adequadas, até as fases pré-clínica e clínica. A taxa de sucesso de novos compostos é estimada em apenas 5%, resultando em uma perda significativa de recursos anualmente. Além disso, a busca por melhores formas de administrar medicamentos é essencial para avanços em farmacodinâmica [2]. Os testes pré-clínicos convencionais são baseados em cultura de células *in vitro* bidimensional (2D), e modelos animais (*in vivo*). Modelos de cultura 2D tradicionalmente contam com baixa previsibilidade, devido ao microambiente celular limitado. São realizados com o intuito de avaliar a eficácia do composto a ser testado e estabelecer a toxicidade inicial. Já os modelos animais são utilizados para avaliar a toxicidade sistêmica, determinar a dosagem adequada, analisar a biodisponibilidade e fornecer um melhor panorama dos efeitos farmacológicos. Por sua vez, estão associados à altos custos, envolvem questões éticas importantes e demonstram baixa precisão, devido à discrepância genética entre as espécies [3].

Neste sentido, os dispositivos *Organ-on-a-chip* (OoC) podem oferecer um suporte útil em ambas as direções. Permitem a reprodução de características intrínsecas e extrínsecas de um órgão ou tecido, seu microambiente, barreiras biológicas; e possibilitam testar a eficácia, a solubilidade, a permeabilidade, a entrega direcionada e a toxicidade de medicamentos, preservando questões éticas e com resultados potencialmente mais adequados [4]–[6]. Foram desenvolvidos com o intuito de combinar o melhor de ambos os modelos tradicionais de experimentos pré-clínicos, cultivando células humanas em um modelo tridimensional (3D); incorporando forças físicas, hidrodinâmicas, mecânicas e elétricas através da microfluídica. Comportam a criação de modelos *in vitro* de subsistemas do corpo humano, concentrando-se na funcionalidade específica do órgão, e subsequente maturação necessária da cultura celular na mensuração das variáveis fisiológicas [5].

O contexto histórico das primeiras tentativas de integração da cultura de células e microfluídica data de meados de 2003 [5]. Um marco importante na adaptação de sistemas microfisiológicos para o desenvolvimento de medicamentos e estudos toxicológicos ocorreu em 2004, quando o grupo de Shuler [7] criou um modelo microfluídico de cultura de células

que era análogo a um modelo matemático de farmacocinética (PK), representando os órgãos do corpo como compartimentos interconectados. O objetivo deste modelo era estudar a absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicidade (ADMET) de substâncias químicas completamente *in vitro*, ao invés de utilizar animais, como é comumente feito na indústria farmacêutica. Esse grupo posteriormente desenvolveu vários tipos de dispositivos em microescala, contendo múltiplas câmaras de cultura, cada uma com um tipo de célula representando um órgão diferente (como pulmão, fígado, tecido adiposo, tumor) e conectadas por canais microfluídicos, imitando o acoplamento fisiológico *in vivo* [7].

Desde 2012, o *National Institutes of Health* (NIH) tem liderado o desenvolvimento de tecnologias OoC por meio de uma série de iniciativas. Estas incluem o desenvolvimento inicial de chips de tecido (2012-2014), a integração de plataformas OoC (2014-2017) e a validação independente das plataformas OoC atuais (2016-2018). Também buscam por melhorias na taxa de sucesso de novas terapias em ensaios clínicos, motivados pela falha em torno de 85% na segurança e eficácia. A iniciativa para ensaios clínicos (ECR) no OoC, através do programa “Clinical Trials on a chip”, apoia o uso desta tecnologia para planejamento e execução, estratificação de riscos e análise de previsibilidade em desfechos confiáveis. Além disso, o NIH tem colaborado com o Center for the Advancement of Science in Space (CASIS) em duas iniciativas para levar chips de tecido ao espaço, visando estudos em ambientes de microgravidade [5], [8].

O aperfeiçoamento e a aplicação destes dispositivos ainda se encontra em estágios iniciais. Há desafios a serem superados, como a reprodução fiel das características complexas dos órgãos, a integração de múltiplos sistemas e a validação clínica dos resultados [6], [9], [10]. A expectativa é de que as colaborações contínuas entre governo, indústria, laboratórios de pesquisa acadêmica, entidades comerciais e agências reguladoras acelerem a adoção dos OoCs como parte dos fluxos de trabalho padrão da indústria. Essas parcerias são essenciais para impulsionar a inovação, a validação e a implementação dessa tecnologia promissora. A dissertação tem busca aprofundar a temática da incorporação de sistemas microfisiológicos na saúde e pesquisa translacional, tendo em vista os avanços internacionais nessa área. O foco será trazer para o âmbito nacional os principais pontos e aspectos relacionados à adoção dessas plataformas por órgãos regulamentadores brasileiros. Nos tópicos e capítulos a seguir, será analisado o contexto atual, identificando desafios e oportunidades, visando contribuir para o desenvolvimento e aprimoramento do uso desta inovação tecnológica no cenário brasileiro.

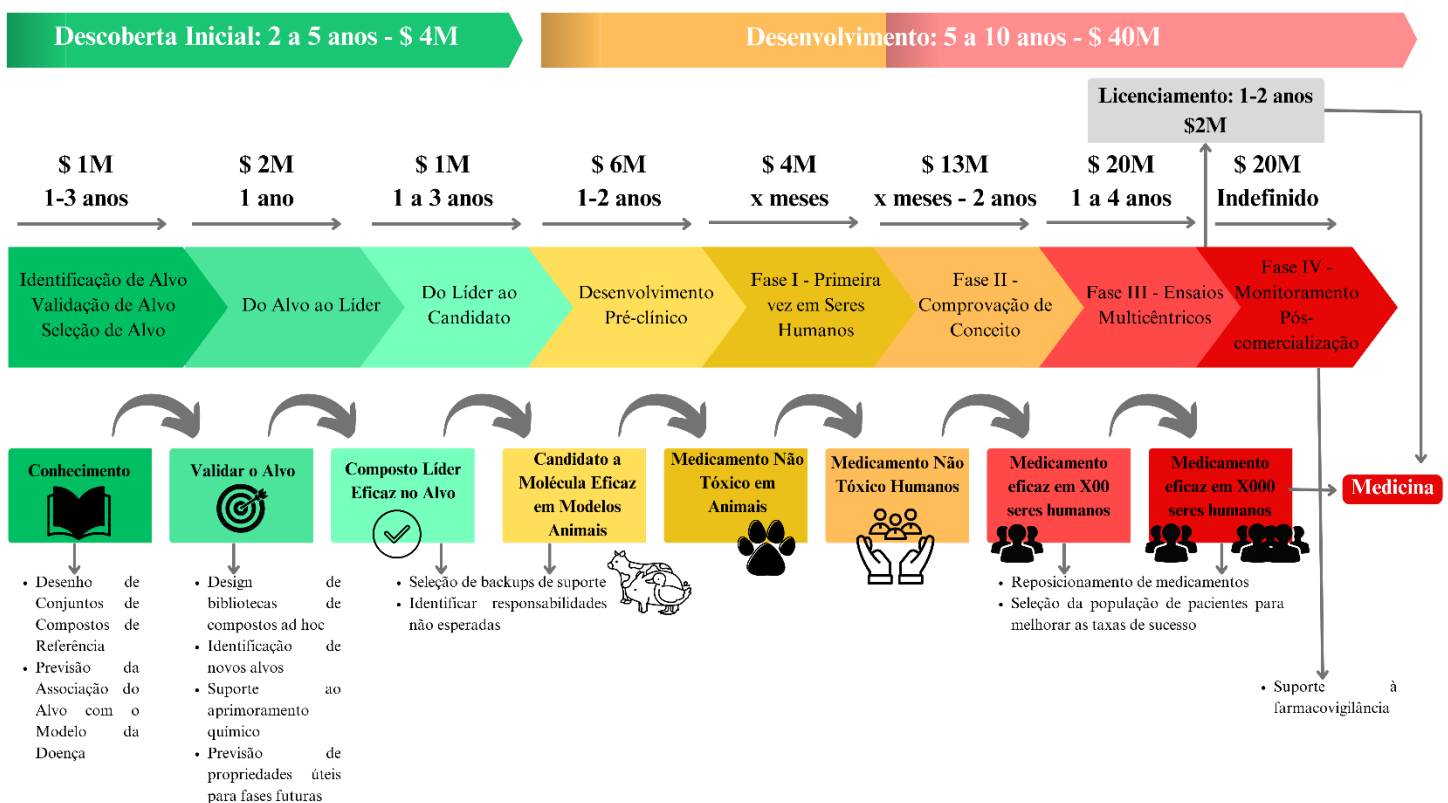
## 1.1 DA BANCADA À BEIRA DO LEITO: O PAPEL DA PESQUISA TRANSLACIONAL NA INOVAÇÃO DE PRODUTOS E FÁRMACOS PARA A SAÚDE

A PTS surgiu com o intuito de otimizar o tempo entre a Pesquisa Básica e aplicação clínica dos resultados obtidos, sendo bem conhecida pelo termo em inglês *bench to bedside* (da bancada para a beira do leito). Essa área da ciência envolve o desenvolvimento de produtos científicos, como medicamentos, dispositivos médicos e meios de diagnóstico, com o objetivo de disponibilizá-los ao mercado. Além disso, também abrange o acesso a esses produtos pela população, considerando variações nas abordagens e práticas de saúde, bem como os impactos socioeconômicos [15], [16]. O objetivo principal da PTS é promover uma integração interdisciplinar de conhecimentos diversos, combinando especialidades e técnicas para aprimorar a prevenção, o prognóstico e as terapias em saúde. O foco é melhorar a oferta geral de cuidados, buscando aprimorar a eficiência e eficácia no tratamento e gerenciamento das condições de saúde e na assistência médica [17].

As etapas que envolvem a translação em Pesquisa não são totalmente definidas no Brasil, com poucos estudos relacionados ao tema. Todavia, a literatura aponta que estas são sobrepostas e complementares, o que torna difícil analisar o tempo empregado em cada uma fase. São indispensáveis para assegurar a correta utilização de orientações técnicas dos órgãos regulamentadores ou princípios éticos [15]. Os desafios enfrentados no país são inúmeros, começando pela baixa reprodutibilidade e falhas nas etapas da translação de pesquisas biomédicas, culminando com a baixa confiabilidade de resultados pré-clínicos. Muitos estudos não fornecem descrições completas incluindo randomização e cegamento dos pesquisadores, fluxo de animais e amostra, estado de saúde do animal antes do experimento, e motivos de exclusão [18].

A disponibilização de um medicamento para o público em geral, é longa e cheia de percalços. É iniciada pelos ensaios Pré-clínicos, *in vitro* e *in vivo*, e ensaios clínicos, contando com inúmeros testes de segurança e eficácia. É seguido de um pedido de registro e aprovação por autoridade sanitária regulamentadora local [15]. De maneira global, estima-se que são necessários ao menos 14 anos para a inclusão de potenciais fármacos no âmbito da Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PD&I), com custos estimados entre US\$ 1,3 bilhões e 1,8 bilhões por medicamento. Ainda, apenas 12% dos fármacos que realizaram ensaios clínicos foram aprovados pela *Food And Drug Administration* (FDA) (**Figura 1.1**) [15].

O desenvolvimento de novos medicamentos é um processo complexo e desafiador. Infelizmente, muitos destes falham em testes clínicos de fase III ou demonstram efeitos colaterais graves após serem lançados no mercado. Esses fracassos e eventos adversos têm um impacto significativo na saúde dos pacientes e representam um enorme ônus financeiro para a indústria farmacêutica. Globalmente, estudos mostram que o custo médio de desenvolvimento de um novo medicamento ultrapassa a marca de US\$ 1 bilhão. Esses custos onerosos estão relacionados aos longos períodos de pesquisa e desenvolvimento, aos testes clínicos rigorosos, à regulação governamental, à necessidade de garantir a eficácia e a segurança do medicamento, bem como aos riscos associados à falha do produto no mercado [5].



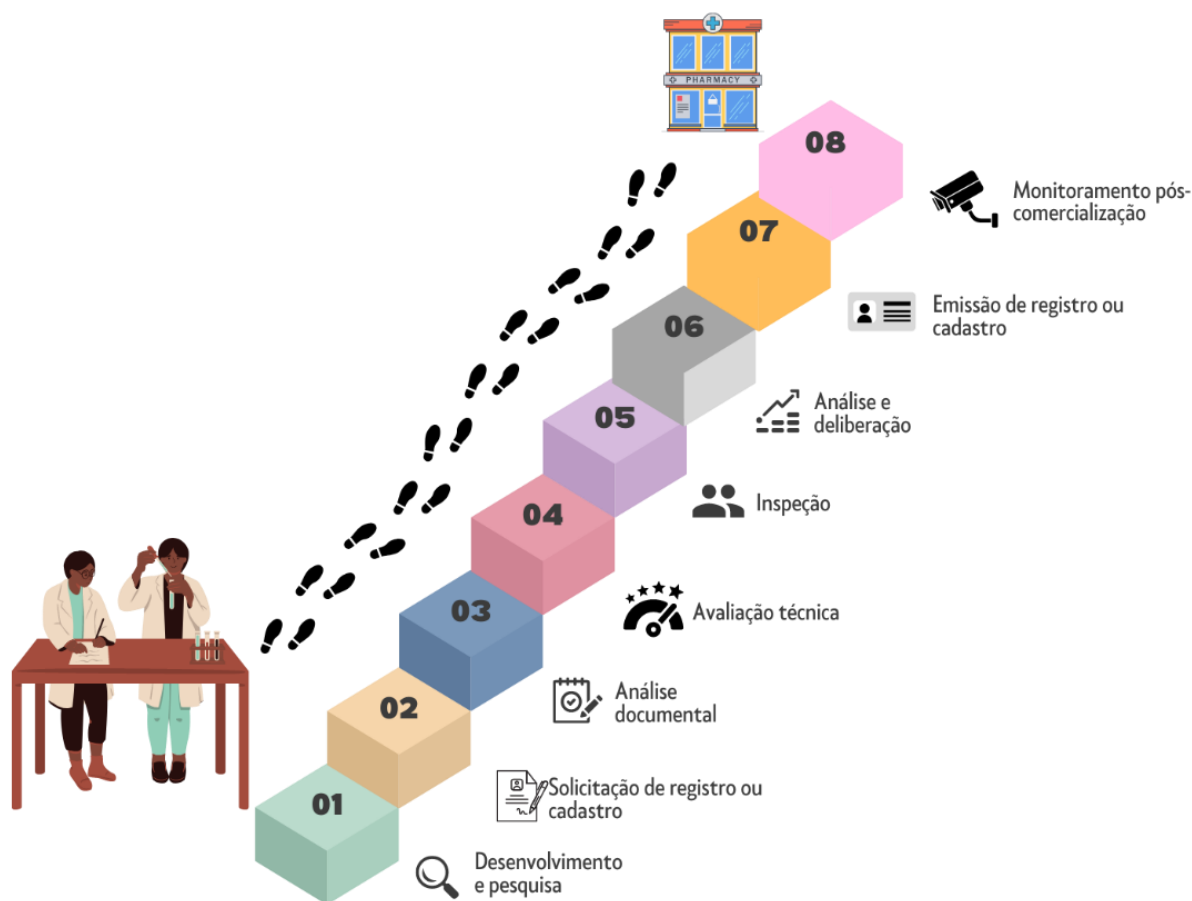
**Figura 1.1.** Desafios e Custos no Desenvolvimento de Novos Medicamentos: Da Descoberta à Fase Clínica. Requer anos de pesquisa, alto investimento financeiro, equipe especializada e fases clínicas regulamentadas. Pode-se levar mais anos do que o previsto, dependendo de inúmeros fatores para que o fármaco seja comercializado. Fonte: Adaptado de: [19].

No Sistema Único de Saúde (SUS), a pesquisa translacional desempenha um papel crucial não apenas na avaliação de custo-efetividade, mas também na elaboração de diretrizes para a prática clínica. Estas levam em consideração o interesse da saúde coletiva, garantindo a

continuidade das práticas e ações em saúde e considerando os indicadores epidemiológicos relevantes [22]. Dessa forma, a PTS no contexto do SUS busca como desfecho a promoção da eficiência dos recursos e a qualidade dos cuidados oferecidos à população. Ao aliar a ciência à prática clínica, essa abordagem contribui para a melhoria contínua dos serviços de saúde e para o enfrentamento de desafios complexos na área da saúde pública. [15].

No Brasil, o processo de validação de medicamentos é conduzido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que é responsável por garantir a segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos disponíveis no mercado brasileiro. A validação de fármacos ou equipamentos em saúde no país ocorre em etapas distintas, seguindo um conjunto de diretrizes e regulamentações estabelecidas pelo órgão, com base em evidências científicas e em conformidade com padrões internacionais. A primeira etapa consiste em experimentos pré-clínicos, no qual os medicamentos são submetidos a estudos *in vitro* e em animais para avaliar sua atividade farmacológica, toxicidade e perfil de segurança inicial. Esses dados pré-clínicos são submetidos à ANVISA como parte do processo de registro do medicamento [20].

O próximo passo consiste na realização de estudos clínicos, nos quais os medicamentos são testados em seres humanos para avaliar sua eficácia e segurança. Esses estudos são conduzidos em conformidade com protocolos pré-aprovados e envolvem a participação de voluntários saudáveis ou de pacientes com a condição médica-alvo. Os resultados dos estudos clínicos são submetidos na plataforma como parte do processo de registro do fármaco ou equipamento. Além dos estudos pré-clínicos e clínicos, também há a avaliação das informações relacionadas à fabricação e controle de qualidade. A agência realiza inspeções nas instalações de fabricação para verificar o cumprimento das diretrizes regulatórias [20]. Na **Figura 1.2**, é apresentado um esquema das principais fases do processo de aprovação de um fármaco junto à agência regulamentadora ANVISA.



**Figura 1.2.** Principais etapas do processo de Pesquisa Translacional de um fármaco ou produto através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 1. Desenvolvimento e pesquisa: O primeiro passo é realizar pesquisas e estudos para desenvolver o equipamento médico ou fármaco. Isso inclui testes em laboratório, estudos pré-clínicos e ensaios clínicos em seres humanos, de acordo com os padrões de segurança e eficácia. 2. Solicitação de registro ou cadastro: Após concluir as etapas de pesquisa e desenvolvimento, o fabricante ou empresa responsável deve fazer a solicitação de registro ou cadastro do equipamento médico ou fármaco junto à ANVISA. Essa solicitação deve incluir dados e informações detalhadas sobre o produto, incluindo estudos de segurança, eficácia e qualidade. 3. Análise documental: A ANVISA realiza uma análise documental inicial para verificar se a solicitação está completa e se todos os requisitos legais foram atendidos. Caso a documentação esteja incompleta, a empresa é notificada para fazer as correções necessárias. 4. Avaliação técnica: Após a análise documental, a ANVISA realiza a avaliação técnica do equipamento médico ou fármaco. Isso envolve a revisão dos estudos e dados fornecidos pela empresa, verificação da conformidade com os requisitos regulatórios e avaliação da segurança, eficácia e qualidade do produto. 5. Inspeção: Em alguns casos, a ANVISA pode realizar inspeções nas instalações de fabricação do equipamento médico ou fármaco para garantir que estejam em conformidade com as boas práticas de fabricação e com os requisitos regulatórios. 6. Análise e deliberação: Com base na avaliação técnica e, se necessário, nas inspeções realizadas, a ANVISA delibera sobre a aprovação do registro do produto. Essa deliberação pode resultar em aprovação, solicitação de informações adicionais ou recusa. 7. Emissão do registro ou cadastro: Se aprovado, é emitido o registro ou cadastro. O registro é concedido para produtos de maior risco, enquanto o cadastro é destinado a produtos de menor risco, mas ainda sujeitos à regulamentação sanitária. 8. Monitoramento pós-comercialização: Após a aprovação e a comercialização do equipamento ou medicamento, a ANVISA monitora continuamente a segurança e eficácia por meio de relatórios de eventos adversos e outras formas de monitoramento pós-comercialização. A empresa também é responsável por relatar quaisquer eventos adversos à ANVISA. Fonte: O autor, baseado em: [20] [21].

## 1.2 ORGAN-ON-A-CHIP: UMA ABORDAGEM REVOLUCIONÁRIA NA REPRODUÇÃO DE ÓRGÃOS HUMANOS

A cultura de células é amplamente utilizada na pesquisa e indústria, sendo indispensável na produção de potenciais fármacos e inúmeros testes de segurança biológica. O seu uso iniciou em meados do século XX, através dos experimentos de Harrison com sua investigação sobre o desenvolvimento de fibras nervosas de um sapo colocando-as sobre um prato e examinando-as. Na década de 1920, Carrel e Ebeling estabeleceram critérios de assepsia e métodos de subcultura, e em 1950 finalmente o cultivo celular em ambiente artificial foi realizado pelo Pesquisador Gey. Apesar de serem facilmente reproduzidas, a cultura de células 2D apresenta limitações como a falta de arquitetura celular próxima da realidade, e um contexto ambiental simplista e em monocamadas, impossibilita a análise de interações celulares e vários processos biológicos [9]. Além disso, fornecem baixa precisão na previsão de funções de tecidos vivos e ações medicamentosas [11].

O pesquisador precursor da utilização do termo OoC e aprimoramento da tecnologia para a medicina personalizada foi o Dr. Donald E. Ingber, do Instituto *Wyss*, da Universidade de *Harvard*, em 2011. Ingber propôs a ideia de que, assim como os componentes eletrônicos são integrados em um chip, as células e tecidos poderiam ser combinados em um dispositivo em miniatura para simular a função de um órgão. A abordagem tinha o potencial de revolucionar a forma como compreendemos e tratamos doenças, possibilitando o desenvolvimento de terapias preventivas e curativas para patologias subjacentes, o que poderia contribuir para avanços na medicina personalizada [12].

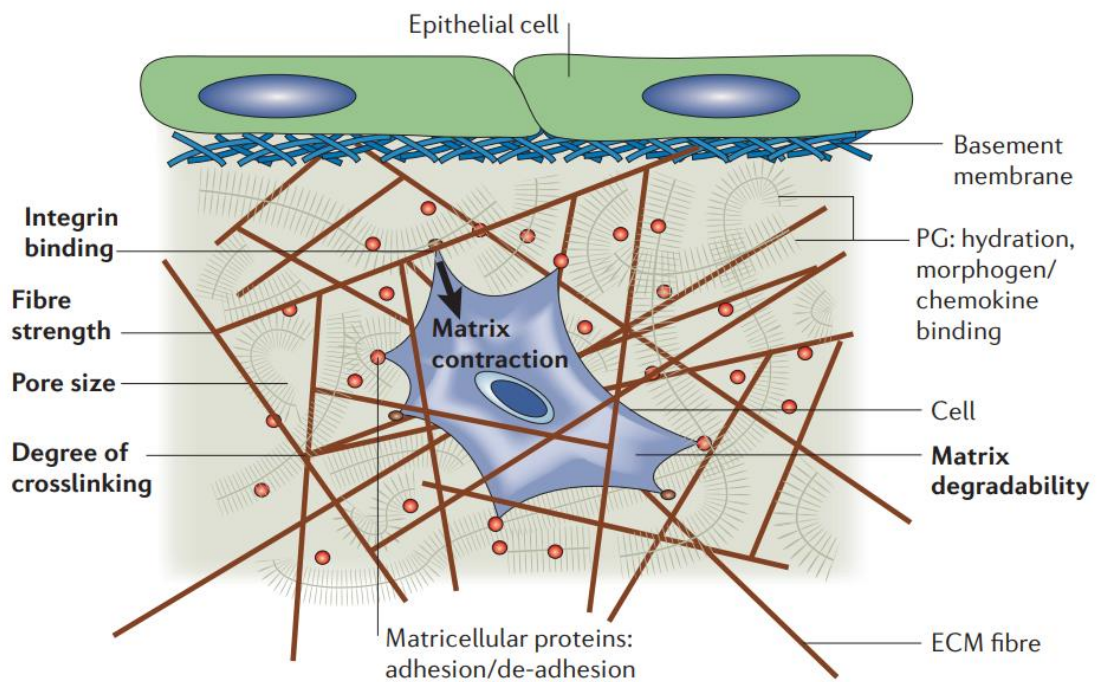
Devido às limitações e questões éticas que envolvem os modelos pré-clínicos tradicionais, a busca por modelos *in vitro* mais complexos foram sendo de maior interesse na Pesquisa. Assim, desenvolveram-se modelo de cultura de células 3D, com possibilidades de análises mais precisas relacionadas a complexidade espacial e química dos tecidos vivos. Em relação aos modelos 2D, os 3D podem capturar melhor as vias de sinalização e a capacidade de resposta farmacológica de substâncias [7]. Desenvolvida há mais de 50 anos, as culturas 3D geralmente dependem do uso de hidrogéis, que são obtidos por meio de compostos de moléculas naturais da matriz extracelular (ECM) ou polímeros sintéticos. Os hidrogéis, por sua vez, são responsáveis por induzir a polarização das células e interação com as células vizinhas.

Podem ter diferentes formatos, como células intercaladas aleatoriamente na ECM, ou agrupada em estruturas celulares como os Organoides [7], [13].

As culturas de células 3D são frequentemente realizadas em suspensão, ou seja, sem um suporte sólido, por várias razões como: i) mimetizar o ambiente tridimensional: Ao cultivar as células em suspensão, elas têm a liberdade de se organizar e interagir em um ambiente mais semelhante ao que encontrariam no corpo humano, onde as células estão suspensas em fluidos biológicos como sangue, linfa ou líquido intersticial. Isso permite que as células se comportem de maneira mais natural e formem estruturas tridimensionais sem a influência de uma matriz sólida; ii) formação de esferoides ou organoides; iii) maior interação celular, permitindo a comunicação e a troca de sinais, essenciais para o funcionamento normal dos tecidos e órgãos; iv) maior acesso a nutrientes e oxigênio, uma vez que podem estar expostas a meios de cultura ou fluidos que permitem uma melhor difusão desses elementos vitais; v) facilidade de manipulação em termos de cultivo, expansão e transferência [14]

A diferença fundamental entre as culturas de células 2D e 3D está na presença e organização da matriz extracelular (MEC). Nas culturas 2D, as células crescem e se proliferam em uma superfície plana, como placas de cultura ou lâminas de vidro revestidas com uma camada fina de proteína, como colágeno ou gelatina. Nesse ambiente, as células estão em contato direto com o substrato, mas a estrutura tridimensional da MEC é ausente ou limitada. Isso pode afetar a forma como as células se comportam e se diferenciam, resultando em respostas celulares diferentes das encontradas no corpo humano. Por outro lado, nas culturas 3D, as células são cultivadas em um ambiente que permite a formação de uma MEC tridimensional que se assemelha mais ao ambiente fisiológico dos tecidos humanos. Além disso, a MEC tridimensional pode influenciar a diferenciação celular, o metabolismo, a proliferação, a migração e a resposta a estímulos externos de maneira mais semelhante aos tecidos in vivo [12] (**Figura 1.3**).



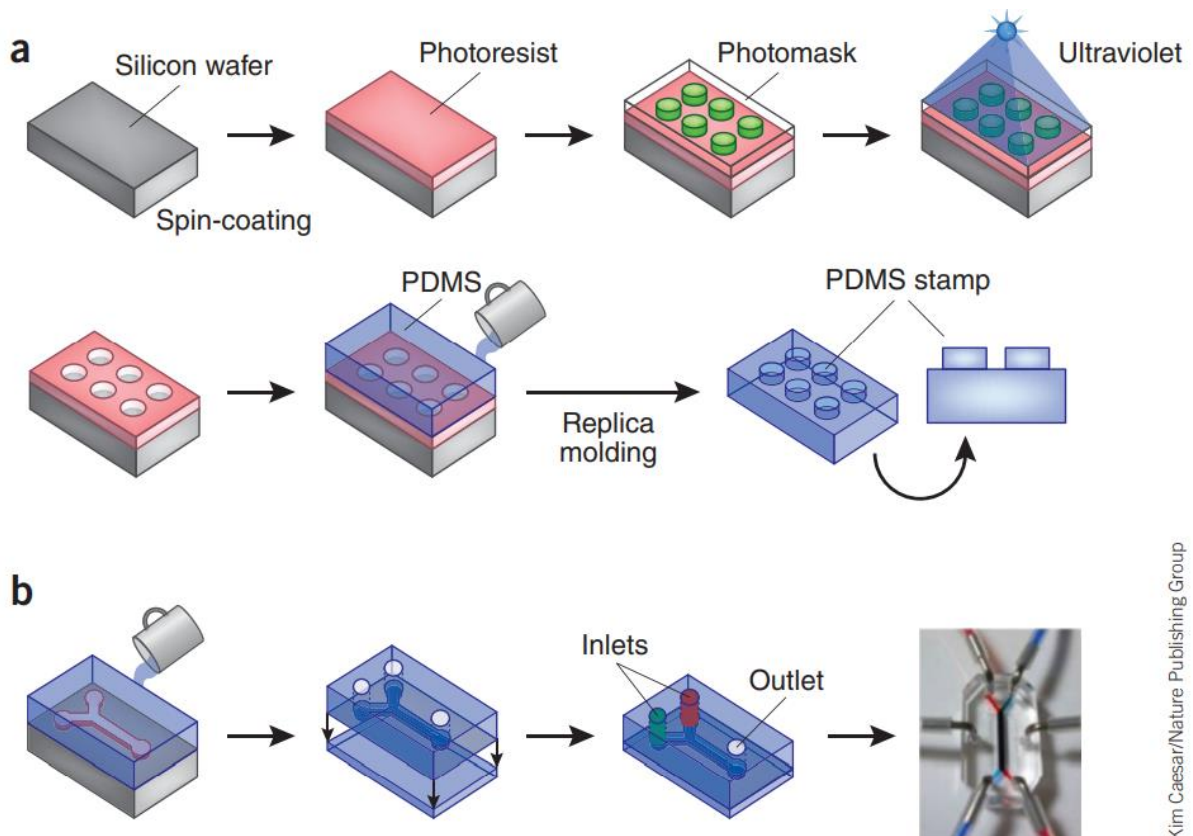


**Figura 1.3.** A importância do ambiente 3D para a engenharia da função celular. A composição da MEC, incluindo colágeno, proteoglicanos e proteínas matricelulares, desempenha papéis essenciais no controle da adesão, migração e diferenciação celular. Além disso, a presença de proteínas morfogenéticas ligadas à matriz e a perfusão do meio de cultura do tecido também têm influência na regulação dos processos celulares e gradientes bioquímicos locais). Fonte: [12], p.2.

Diversas linhagens celulares podem ser incorporadas na cultura de células OoCs, dependendo do tipo de tecido ou órgão que se deseja modelar. Podem ser derivados de células-tronco embrionárias (CTEs), células-tronco pluripotentes induzidas (CTPs), células-tronco neonatais ou adultas (CTNAs) [14]. Considerando a crescente importância e o potencial impacto dos estudos com a tecnologia, é essencial que os pesquisadores envolvidos nessa área busquem a aprovação e orientação do Comitê de Ética em Pesquisa. Ao fazer isso, eles demonstram comprometimento com a integridade da pesquisa, a proteção dos participantes e a garantia de resultados confiáveis e éticos.

Existem limitações relacionadas à microfabricação, que estão ligadas principalmente aos métodos utilizados, os quais frequentemente são demorados e requerem montagem manual. Essas trazem impacto direto na produção em larga escala e na validação do dispositivo. A necessidade de processos manuais aumenta o tempo e os custos envolvidos na fabricação, dificultando sua aplicação em estudos de alto rendimento e tornando desafiadora a obtenção de

resultados consistentes e replicáveis [10] (**Figura 1.4**). Portanto, é crucial desenvolver técnicas de microfabricação mais eficientes e automatizadas para superar essas limitações e permitir a produção em escala, tornando-os mais acessíveis e viáveis para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos e terapias.



Kim Caesar/Nature Publishing Group

**Figura 1.4.** Métodos de Fabricação para Chips Microfluídicos. (a) Moldagem por réplica cria carimbos com formas complementares a padrões gravados em chips de silício por fotolitografia. Uma fina camada uniforme de material fotossensível (fotorresiste) é aplicada por centrifugação em um chip de silício, que é então sobreposto por uma máscara fotográfica (por exemplo, uma placa de vidro transparente com camadas opacas de cromo) com um padrão microscópico gerado por software de design assistido por computador. A máscara fotográfica protege algumas regiões do fotorresiste e expõe outras durante a exposição à luz ultravioleta (UV) de alta intensidade. O material exposto à luz UV se dissolve em uma solução de revelador, deixando o padrão microscópico gravado no fotorresiste. Carimbos elastoméricos com uma topografia superficial complementar à superfície gravada são criados por uma técnica de moldagem por réplica, na qual um pré-polímero líquido de Polidimetilsiloxano (PDMS) é moldado sobre o padrão de fotorresiste gravado, polimerizado e removido. O carimbo de PDMS pode ser usado para a impressão microcontato de moléculas da MEC em qualquer substrato, incluindo aqueles dentro de dispositivos microfluídicos (não mostrados). (b) Um dispositivo microfluídico de canal único é fabricado criando um carimbo de PDMS com duas entradas, um único canal principal e uma saída e selando-o conformalmente a um substrato plano de vidro. Uma fotografia de um dispositivo de cultura microfluídica de duas câmaras, com corantes vermelho e azul sendo perfundidos por canais superiores e inferiores, é mostrada à direita. Os canais laterais transparentes são usados para aplicar sucção cíclica para distorcer ritmicamente a membrana central flexível e as células aderentes. Fonte: [7], p. 2.

### **1.3 IMPLICAÇÕES LEGISLATIVAS SOBRE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NA PESQUISA CIENTÍFICA BRASILEIRA**

Os métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa têm recebido crescente atenção e desenvolvimento nos últimos anos. Antes da promulgação da legislação brasileira sobre o uso de animais em laboratórios, o assunto era abordado nacionalmente apenas por meio da lei que trata das sanções penais e administrativas decorrentes de condutas prejudiciais ao meio ambiente (Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998) [22]. Ela estabelece que é punível com detenção e multa a execução de procedimentos dolorosos e cruéis, mesmo que com fins educacionais ou científicos, quando existirem recursos alternativos [23].

O Brasil tem progredido no desenvolvimento e validação de técnicas alternativas que visam substituir completamente o uso de animais em testes ou reduzir e aprimorar sua utilização. O CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) possui a Câmara Permanente de Métodos Alternativos ao Uso de Animais, juntamente com a RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos) e o BraCVAM (*Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods*). Essas entidades regulam e coordenam o desenvolvimento e validação de métodos alternativos em âmbito nacional [24]–[26].

A Lei Arouca (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) foi criada para regulamentar o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, e revogou a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979. Suas disposições tratam de limitações a estudos científicos utilizando animais, garantindo ética em seu manuseio. A fiscalização da sua aplicação nos ambientes de ensino institucionais é realizada pelo CONCEA, em parceria com os Comitês de Ética no Uso de Animais – CEUA's, que estão inseridos dentro das instituições de Pesquisa [27].

Apesar da lei Arouca ter se tornado uma ferramenta jurídica indispensável à proteção dos animais durante os experimentos científicos, ela não dispõe de princípios relacionados as diretrizes internacionais dos 3R's – Redução (*Replacement*), Substituição (*Reduction*) e Refinamento (*Refinement*) (Quadro 1.1). A primeira publicação que abordou estes princípios éticos foi o livro *The principles of humane experimental technique*. Publicado em 1959, o zoólogo William Russell e o microbiologista Rex Burch trouxeram ideais que buscavam melhorar o tratamento de animais na pesquisa, ao mesmo tempo em que sugeriam avanços nas metodologias e testes científicos [28]–[30].

**Quadro 1.1.** Descrição dos Princípios dos 3Rs. Esses Princípios dos 3Rs são fundamentais para garantir a ética e a responsabilidade na pesquisa científica, buscando minimizar o uso de animais, reduzir seu sofrimento e promover métodos substitutivos que possam fornecer resultados científicos robustos. As plataformas OoC se alinham a esses princípios, oferecendo uma alternativa promissora para a pesquisa translacional, que visa avanços científicos e médicos, enquanto respeita a proteção e o bem-estar dos animais.

Princípio	Descrição
Substituir ( <i>Replace</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Busca por métodos alternativos que evitem ou reduzam a necessidade de animais vivos em experimentos.</li> <li>• Desenvolvimento e a utilização de técnicas substitutivas, como modelos celulares, culturas de tecidos, modelos computacionais, estudos epidemiológicos, testes in vitro e métodos de pesquisa não animais sempre que possível</li> </ul>
Reduzir ( <i>Reduce</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Refere-se à minimização do número de animais utilizados em experimentos</li> <li>• Envolve a adoção de técnicas e estratégias que permitem obter resultados científicos robustos usando o menor número possível de animais.</li> <li>• Tamanho da amostra otimizado.</li> <li>• Há compartilhamento de dados e informações entre pesquisadores e a replicação de estudos podem contribuir para reduzir a necessidade de novos experimentos com animais</li> </ul>
Refine ( <i>Refinar</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O princípio se concentra na melhoria das técnicas experimentais para minimizar ou eliminar o sofrimento e o desconforto dos animais utilizados.</li> <li>• Implementação de procedimentos e práticas que reduzam a dor, o estresse e o impacto negativo na saúde e no bem-estar dos animais</li> </ul>

Fonte: Adaptado de [28], [29].

A Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – SBCAL/COBEA foi fundada em 1983, com a missão de proteger os animais de laboratório do uso inadequado. Auxilia na fiscalização da legislação vigente, além de ter papel fundamental no estímulo ao desenvolvimento científico e tecnológico no âmbito experimental [31]. Desde 2014, através da Resolução Normativa 17 – RN 17, passou a levar em os princípios éticos dos 3R's [28], [32].

Até o momento, o CONCEA publicou quatro Resoluções Normativas reconhecendo 41 métodos alternativos validados internacionalmente, com o objetivo de substituir parcial ou integralmente o uso de animais em pesquisa. As aplicações específicas desses métodos, bem como a determinação de substituição total, parcial ou redução do uso de animais, são descritas em cada método e devem ser seguidas de acordo com as diretrizes estabelecidas na Resolução Normativa ConceA nº 54. Após o reconhecimento pelo CONCEA, é estabelecido um prazo de até cinco anos para a substituição obrigatória do método original pelo método alternativo. Em 24 de fevereiro de 2023, o CONCEA deu um passo adiante ao publicar a Resolução Normativa

nº 58, que proíbe o uso de animais em pesquisa científica e no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que contenham ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas. Além disso, essa resolução torna obrigatório o uso de métodos alternativos reconhecidos em pesquisas científicas e no desenvolvimento e controle de qualidade de produtos que contenham ingredientes ou compostos cuja segurança ou eficácia não tenham sido comprovadas. Essa medida busca harmonizar a utilização de animais no desenvolvimento e controle de produtos cosméticos, alinhando-se aos padrões internacionais, uma vez que o uso de testes com animais para o desenvolvimento de cosméticos já é proibido em várias partes do mundo [24].

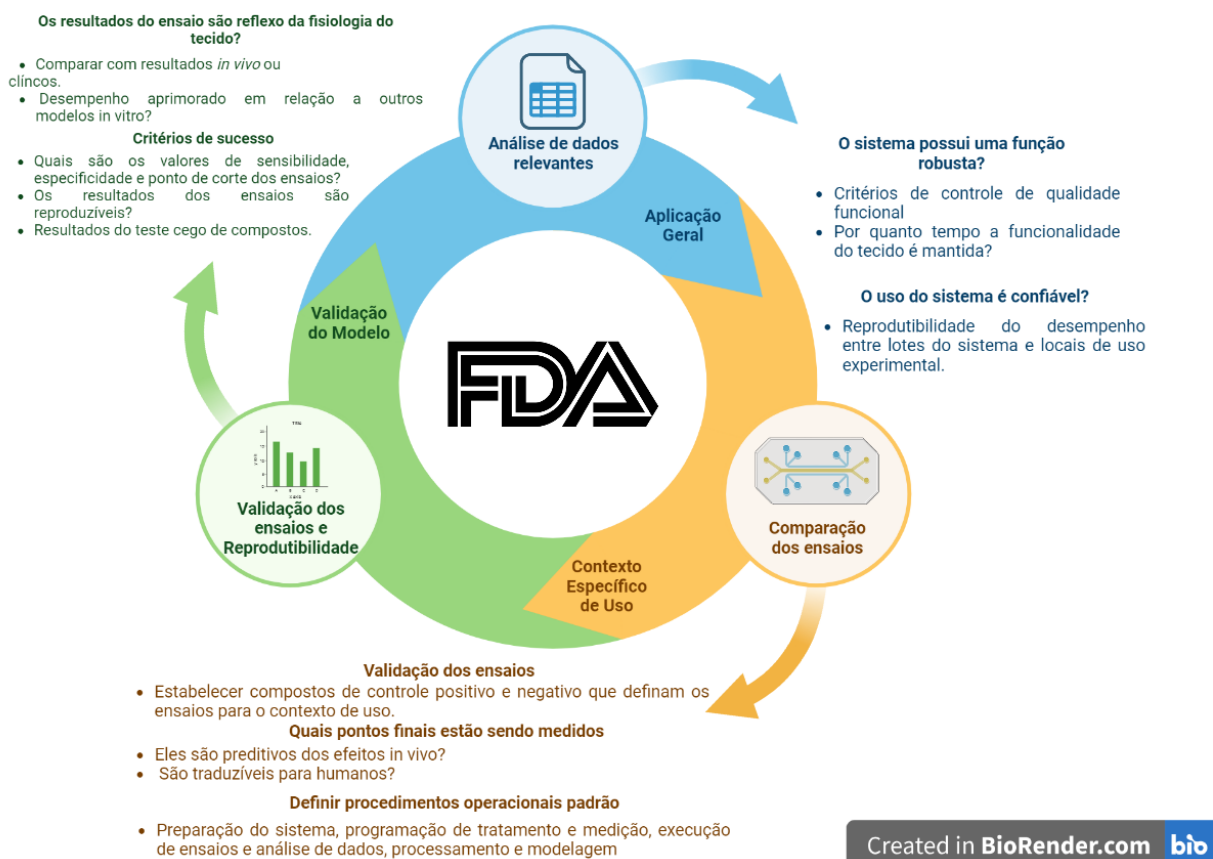
## **1.4 CONSIDERAÇÕES REGULATÓRIAS DA FDA SOBRE MODELOS DE CULTURA 3D**

A FDA (*Food and Drug Administration*) é uma referência mundial em regulamentação de dispositivos médicos e medicamentos [33]. Embora esta dissertação se concentre na legislação brasileira, é relevante fazer comparações e análises com as práticas e diretrizes da FDA para entender as tendências internacionais e possíveis lacunas regulatórias no contexto brasileiro, a sem discutidas no capítulo VI. A FDA tem um papel fundamental na avaliação de novas tecnologias, incluindo o OoC, e suas diretrizes e pesquisas em desenvolvimento podem fornecer *insights* valiosos para os pesquisadores e reguladores brasileiros. Além disso, a colaboração e harmonização regulatória entre diferentes agências nacionais e internacionais é um aspecto importante para promover o avanço e a aceitação de tecnologias como o OoC em escala global.

Desde 2010, a *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) tem se envolvido no desenvolvimento de modelos de cultura *in vitro* 3D. Isso inclui o apoio financeiro ao Instituto *Wyss* [34], além da colaboração com a Agência de Projetos de Pesquisa Avançada de Defesa (DARPA). Em 2017, a FDA lançou seu Plano de Toxicologia Preditiva, buscando reduzir o uso de testes em animais e promover o desenvolvimento de métodos alternativos [35]–[37]. A FDA continua seu envolvimento com a tecnologia de OoCs, implantando chips em seus laboratórios e buscando integrar dados de modelos de cultura em decisões regulatórias. O relatório discutiu estratégias para usar a ciência do século XXI para promover o desenvolvimento e a avaliação de métodos toxicológicos emergentes, bem como novas tecnologias, e incorporá-los à revisão

regulatória da FDA. O plano enfatizou que os usuários finais da nova tecnologia, ou seja, os reguladores, devem estar envolvidos desde o início para que essas tecnologias sejam eficazes. [35], [36].

Com esse objetivo, a FDA estabeleceu um Grupo de Trabalho de Métodos Alternativos, que está desenvolvendo uma estratégia direcionada para a transição para o uso de métodos alternativos nos testes regulatórios. Sistemas microfisiológicos de diversos fornecedores acadêmicos e comerciais foram implantados em laboratórios de pesquisa da FDA, e pesquisadores da FDA se reúnem mensalmente para discutir os avanços nesse espaço de tecnologia em rápida evolução. O objetivo está associado a eventualmente, ajudar os na formulação de critérios de desempenho regulatório. Essa experiência prática no desenvolvimento de tecnologia, como descrito acima em relação a um modelo de fígado em um chip para avaliação de toxicidade e farmacocinética, é um componente crítico da estratégia da FDA para entender como os dados de modelos de cultura podem eventualmente ser incorporados em decisões regulatórias[35]–[37]. Na **Figura 1.5** há um esquemático de considerações regulatórias importantes relacionadas ao FDA.



**Figura 1-1.** Considerações regulatórias para o uso de modelos de cultura celular 3D. Ilustração esquemática de questões específicas sobre seleção de modelos 3D, incluindo aplicação geral, contexto específico de uso e validade do modelo, para auxiliar na discussão com a FDA. Figura criada com o Biorender. Fonte: Adaptado de [35], p. 52.

A Lei de Modernização da FDA 2.0 é uma iniciativa legislativa focada em incorporar tecnologias não animais no quadro regulatório da FDA. Visa abordar a necessidade de métodos de testes alternativos que possam substituir ou reduzir o uso de animais na avaliação da segurança e eficácia de produtos. Ao trazer tecnologias não animais para a mesa regulatória, a lei busca modernizar a abordagem da FDA em relação aos testes e aprovação de produtos, promovendo o desenvolvimento e uso de métodos inovadores e relevantes para seres humanos. Essa mudança tem o potencial de melhorar a eficiência, precisão e padrões éticos do processo regulatório, ao mesmo tempo em que impulsiona os avanços científicos na pesquisa biomédica e desenvolvimento de produtos[38].

## **1.5 REGULAMENTAÇÃO BRASILEIRA DE *ORGAN-ON-A-CHIP***

A cultura de células 3D de órgãos é uma tecnologia em desenvolvimento que apresenta grandes possibilidades no campo da medicina regenerativa. No entanto, os formuladores de políticas em todo o mundo enfrentam desafios ao tomar decisões regulatórias nesse novo espaço. A falta de informações abrangentes dificulta a criação de diretrizes regulatórias consistentes. Embora diferentes países adotem abordagens distintas, muitos compartilham preocupações semelhantes relacionadas à segurança e eficácia. Para avançar nesse campo, os reguladores precisam obter mais informações sobre os riscos e benefícios envolvidos, a fim de determinar se as estruturas regulatórias existentes são adequadas para lidar com as preocupações de segurança e qualidade associadas a essa tecnologia inovadora.

Atualmente, no contexto regulatório brasileiro, há algumas iniciativas isoladas de startups e indústrias relacionadas à bioimpressão, porém, ainda não existe um programa unificado de pesquisa e desenvolvimento específico para essa área. É importante incentivar a criação de uma rede funcional e saudável no país, que envolva diferentes atores, como empresas, instituições de pesquisa, universidades e agências reguladoras. Uma abordagem colaborativa e coordenada entre essas partes é fundamental para promover avanços no campo da bioimpressão e estabelecer diretrizes regulatórias adequadas.

No entanto, as normas gerais da ANVISA aplicáveis ao desenvolvimento, fabricação e uso de dispositivos médicos podem ser consideradas para a regulamentação desse tipo de tecnologia podem incluir:

- RDC 185/2001: Estabelece requisitos para o registro, cadastro e notificação de dispositivos médicos no Brasil. Apesar de não mencionar especificamente os OoCs, essa norma define os procedimentos para a comercialização de dispositivos médicos em território nacional [39].
- RDC 16/2013: Dispõe sobre os requisitos de boas práticas de fabricação para dispositivos médicos. Embora não seja específica para OoC, essa norma estabelece os padrões para a fabricação de dispositivos médicos, garantindo a qualidade e segurança dos produtos [40].
- RDC 36/2015: Regulamenta o uso de materiais de uso em saúde, incluindo materiais biocompatíveis utilizados em dispositivos médicos. Essa norma pode ser relevante para a seleção e utilização de materiais adequados nos OoCs [41].

É importante destacar que a regulamentação de dispositivos médicos está em constante evolução, e pode envolver a colaboração e a coordenação entre diferentes órgãos reguladores, visando assegurar a segurança, eficácia e qualidade dessa tecnologia. A conformidade com as normas e regulamentações estabelecidas pelos órgãos competentes é essencial para a utilização e comercialização do OoC no país.

Promovendo a metrologia, a qualidade e a segurança de produtos e serviços no Brasil, o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro) é responsável por certificar produtos, avaliando sua conformidade com requisitos específicos. Essas avaliações englobam uma ampla gama de produtos, como eletrodomésticos, brinquedos, equipamentos de proteção individual e dispositivos médicos. No entanto, até o momento atual, não foram especificadas regulamentações para sistemas microfisiológicos [42].[42].

A emergente tecnologia OoC apresenta um grande potencial para revolucionar a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos, proporcionando uma alternativa promissora aos testes tradicionais em animais. Embora ainda não haja disposição de uma regulamentação específica para OoC no Brasil, é importante ressaltar que os dispositivos médicos, incluindo aqueles baseados em tecnologia de chips, estão sujeitos a regulamentações gerais de segurança

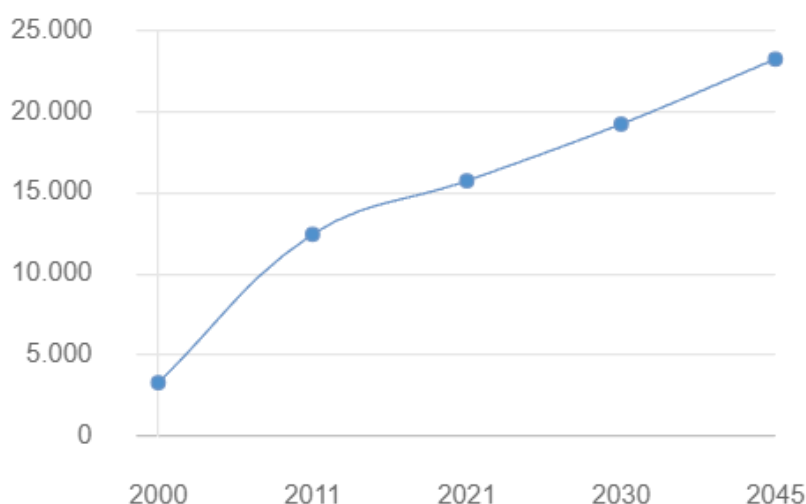


e qualidade. Isso inclui as conformidades com as normas técnicas e requisitos estabelecidos com entidades reguladoras como a Anvisa, Inmetro e CONCEA.

## **1.6 ESTUDO DE CASO: APLICAÇÕES DE *ORGAN-ON-A-CHIP* NO CONTEXTO DO PÉ DIABÉTICO**

A *Diabetes Mellitus* (DM) é considerada uma das doenças crônicas mais prevalentes nas últimas décadas, muitas vezes associada a quadro de obesidade. Sua etiologia é complexa e multifatorial. Caracteriza-se por níveis elevados de glicose no sangue devido a uma resistência do corpo à absorção da glicose ou à produção insuficiente da insulina. A insulina é um hormônio produzido pelo pâncreas e desempenha um papel fundamental na absorção da glicose sanguínea, utilizada como fonte de energia pelo organismo [43]–[45]. A prevalência global de DM em adultos de 20 a 79 anos de idade foi estimada em 425 milhões em 2017, sendo o DM tipo 2 a principal causa desse aumento. Projeções indicam que até o ano de 2045, esse número pode aumentar em 48%, chegando a 629 milhões de casos. Em regiões com condições socioeconômicas mais precárias, espera-se um aumento relativo tanto em casos diagnosticados quanto em casos não diagnosticados de diabetes (entre 37% e 77%) [46].

O ônus socioeconômico associado a patologia se agrava em diferenças regionais profundas. As desigualdades socioeconômicas impactam sobre o acesso à saúde com equidade. Levando em consideração que em países de baixa renda há uma maior concentração de taxas de morbimortalidade, este é um fator que afeta diretamente a qualidade de vida e prognóstico do paciente [47]. De acordo com a *International Diabetes Federation* (IDF), o panorama brasileiro de adultos diagnosticados em 2021 era de aproximadamente 149.916,8, e há expectativa para que em 2030, este número passe a ser em torno de 161.892,7 diabéticos. Ainda, o número de mortes atribuídas à DM no ano de 2021 foi de 214.175,0 [48]. Em 2018, Os custos totais de hipertensão, diabetes e obesidade no SUS alcançaram 3,45 bilhões de reais (R\$) (IC95%: 3,15 a 3,75) [49] (**Figura 1.6**).



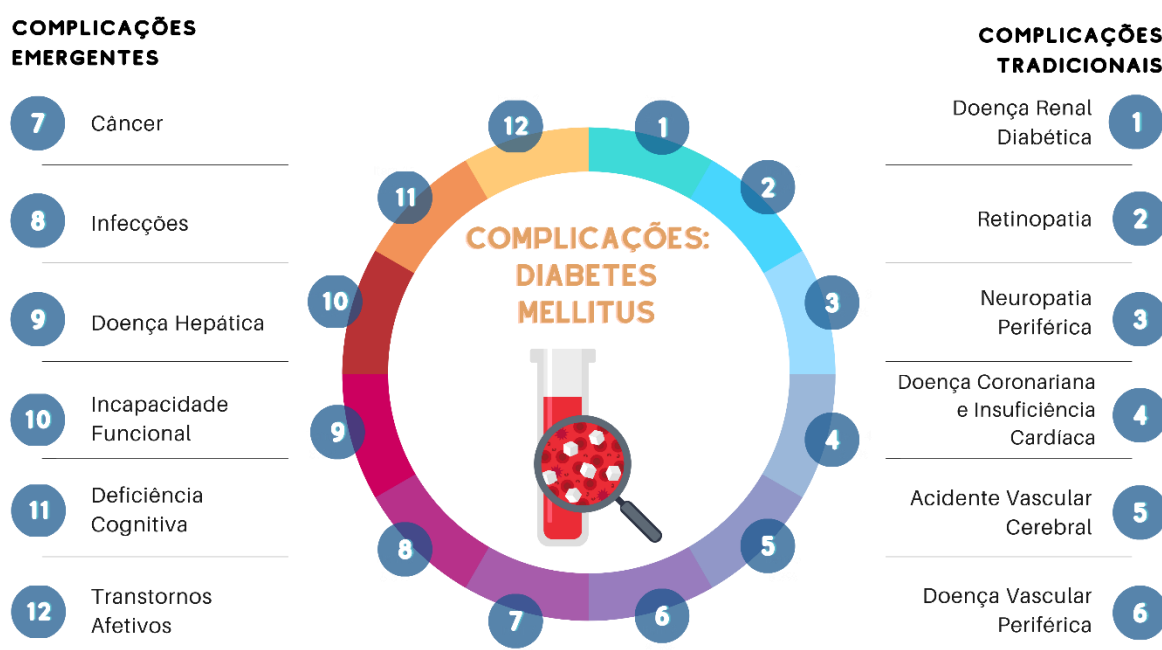
**Figura 1-2** Gráfico de estimativas de diabetes (20-79 anos) - Pessoas com diabetes, em 1.000. O gráfico fornece uma representação visual das estimativas do número de pessoas afetadas pela doença em diferentes períodos. Em 2021, haviam em torno de 15.733,6 portadores de DM. Em 2030, estima-se um aumento exponencial de 19.224,1, enquanto em 2045 este número poderá chegar a 23.223,6 indivíduos acometidos. Fonte: [48].

Uma das complicações mais comuns e mais graves da DM trata-se do Pé Diabético (UPD). É definida como uma ruptura na epiderme em uma pessoa com diabetes [50]. Existem poucas evidências disponíveis sobre o impacto econômico do Pé Diabético no Brasil. Em um estudo publicado em 2018, foi realizado um levantamento dos custos anuais relacionados ao tratamento dessa condição. Os pesquisadores concluíram que em 2014 (com uma taxa de câmbio de 1 Int\$ = R\$ 1,748), o Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro foi de \$ 3,307 trilhões, dos quais 8,3% (\$ 274,48 bilhões) foram destinados à saúde. Desse total, os gastos públicos com saúde representaram 42,5% (\$ 116,73 bilhões). De acordo com o estudo, estimamos que os custos médicos diretos anuais do Pé Diabético em 2014 foram de Int \$ 361 milhões, o que corresponde a 0,31% dos gastos públicos com saúde nesse período. Considerando apenas os gastos com internações pelo Sistema Único de Saúde (SUS), o governo federal desembolsou R\$ 7,414 bilhões em 2014. Portanto, as internações relacionadas ao Pé Diabético representaram 0,37% desse valor [51].

A amputação é uma complicação que ocorre em estágios avançados do diabetes mal gerenciado a longo prazo e, frequentemente, reflete a falta de acesso adequado, prestação e aceitação de cuidados relacionados ao diabetes. Os efeitos combinados da desvantagem

socioeconômica, outros determinantes sociais da saúde e o racismo estrutural são responsáveis por disparidades marcantes nas taxas de amputação entre diferentes raças, etnias e *status* socioeconômico [50].

Em estimativas mundiais, dados de 2015 revelam que 9,1 milhões a 26,1 milhões de pessoas com diabetes em todo o mundo irão desenvolver úlceras nos pés. A incidência de UPD em diabéticos ao longo da vida é de aproximadamente 19-34% [51]. Sua evolução culmina com disfunções microvasculares (como a neuropatia, nefropatia e retinopatia) e macrovasculares (como doença arterial coronariana, doença da artéria carotídea, e doença vascular periférica) [52], [53]. Estas complicações tradicionais causam impactos substanciais na qualidade de vida do portador, e para os sistemas de saúde mundiais. Não obstante, há novas evidências de um aumento de um conjunto de complicações distintas, que incluem câncer, deficiência cognitiva e funcional, apneia obstrutiva do sono (AOS), doença hepática gordurosa não alcoólica e depressão [43] (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7.** Principais complicações tradicionais e complicações emergentes da *Diabetes Mellitus*. As complicações tradicionais incluem: 1) doença renal diabética, 2) retinopatia, 3) neuropatia periférica, 4) doença coronariana e insuficiência cardíaca, 5) acidente vascular cerebral e 6) doença vascular periférica. As complicações periféricas trata-se de: 7) câncer, 8) infecções, 9) doença hepática, 10) incapacidade funcional, 11) deficiência cognitiva e 12) transtornos afetivos. Esta não é uma lista exaustiva de complicações associadas à diabetes. Fonte: O autor, adaptado de [43], p. 526

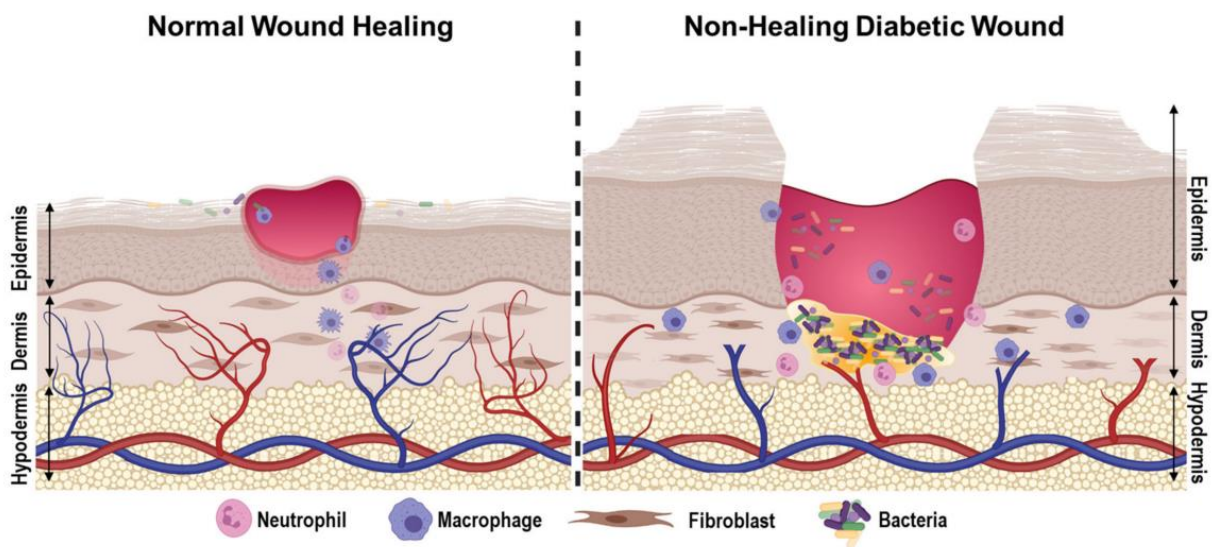
Uma das complicações mais frequentes e preocupantes da DM é a Úlcera do Pé Diabético (UPD). A etiologia subjacente da UPD é classificada em 3 tipos: i) neuropática (associada a NP), ii) neuroisquêmica (presença de NP e DAP) e iii) isquêmica (quando há presença de DAP) [50]. Na maioria dos casos, é resultante de pequenos traumas repetitivos, podendo ser ocasionada também por alterações na marcha relacionadas a neuropatia periférica, fricção e cisalhamento de calçados, lesão não reconhecida associada a quadro de alteração na sensibilidade plantar, e deformidades estruturais como a neuropatia de *Charcot*. ao menos parcial da derme [50]. Apesar da fisiopatologia ainda não ser completamente elucidada, as evidências apontam que está associada a aterosclerose, funcionamento comprometido de várias células da pele e neuropatia periférica. Além disso, também tem sido associada a complicações vasculares e disfunção das células endoteliais [54]–[56] (**Figura 1.8**).



**Figura 1.3.** Exemplos característicos de lesões pré-ulcerativas (A), neuropáticas (B e C), neuroisquêmicas (D-F) e isquêmicas (H-I) do pé diabético. As lesões mais superficiais ou profundas, que não afetam o tecido dérmico, são consideradas pré-ulcerativas, porém apresentam um alto risco de progressão para uma úlcera do pé diabético. Fonte: [50], p. 210.

A UPD é de difícil cicatrização, com tempo médio em torno de 3 a 12 meses, o que frequentemente pode ser estendido quando há presença de infecções ou outras gravidades. As taxas de recorrência após um ano são em média 25%, 3 anos chegam a 44%, e 05 anos de 50 a 65%. A Diabetes é o principal fator de risco para amputações de membros inferiores em adultos nos EUA, com algumas regiões do mundo aumentando em 50% o número de amputados. A DFU afeta desproporcionalmente os adultos mais jovens e os grupos negros e hispânicos, o que revela uma preocupante realidade de desigualdade social [50].

A hiperglicemia interrompe processos críticos para a cicatrização, ou seja, a síntese proteica, migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos. Em pacientes com UDP, a expressão de várias proteínas de queratinócitos relacionadas à reepitelização é interrompida, incluindo proteínas de queratina do citoesqueleto (K2, K6 e K10), que são importantes para a diferenciação dos queratinócitos, e uma proteína precursora da cadeia  $\alpha 3$  da laminina-5 (LM-3A32), que regula a ligação das células epiteliais à membrana basal. Posteriormente, a redução de LM-3A32 perturba a sobrevivência e diferenciação dos queratinócitos e, portanto, a cicatrização [54] (**Figura 1.9**).



**Figura 1.4.** Fisiopatologia de feridas diabéticas. Feridas diabéticas apresentam angiogênese desregulada, resposta inflamatória crônica, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e colonização bacteriana persistente, frequentemente evoluindo para um biofilme de difícil tratamento. Fonte: [54], p. 02.

A importância dos avanços científicos no manejo da úlcera do pé diabético é imensurável, especialmente quando consideramos as disparidades de acesso socioeconômico a tratamentos adequados. Essas disparidades têm um impacto significativo na saúde e no bem-estar das pessoas que sofrem dessa condição. Avanços científicos que promovem tratamentos acessíveis e eficazes para o pé diabético são cruciais para garantir que todos os indivíduos, independentemente de sua situação socioeconômica, possam receber o cuidado necessário. Ao reduzir as barreiras econômicas, podemos aumentar a igualdade de acesso a tratamentos avançados, o que resultará em melhores resultados de saúde, prevenção de complicações graves, como amputações, e uma melhor qualidade de vida para todas as pessoas afetadas pelo pé diabético. Somente dessa forma podemos alcançar uma sociedade onde a saúde seja um direito fundamental para todos, independentemente de sua condição socioeconômica.

Os estudos com OoC podem oferecer uma abordagem inovadora para simular a interação complexa entre células, tecidos e órgãos no contexto da doença. Ao reproduzir características fisiológicas e patológicas específicas do Pé Diabético, como a formação de úlceras, inflamação e disfunção vascular, os OoCs permitem uma análise detalhada dos mecanismos subjacentes à doença. Além disso, esses modelos podem ser utilizados para testar novas terapias e medicamentos, avaliar sua eficácia e segurança, e até mesmo personalizar o tratamento para cada paciente.

## **1.7 TRATAMENTOS DO PÉ DIABÉTICO NO SUS E O AVANÇO DE EQUIPAMENTOS MÉDICOS COM CONTRIBUIÇÃO DA ENGENHARIA BIOMÉDICA**

No Brasil, entre 2010 e 2020, houve um registro preocupante de mais de 240 mil internações relacionadas à amputação ou desarticulação de membros inferiores devido ao Diabetes Mellitus (DM), com uma maior prevalência nas regiões nordeste e sudeste do país. O tratamento convencional atual do pé diabético envolve a limpeza da lesão, remoção de tecidos necrosados, controle da circulação, aplicação de curativos tópicos e manejo de infecções. No entanto, em indivíduos com DM, o tratamento convencional muitas vezes não é suficiente para alcançar uma cicatrização satisfatória em tempo hábil, o que requer a utilização de terapias adjuvantes para acelerar o processo de reparo tecidual e prevenir amputações [57].

O setor da saúde pública no Brasil está intrinsecamente ligado ao desenvolvimento científico e tecnológico nacional, tendo em vista que a medicina sanitária e bacteriológica do início do século XX influenciou o rumo das pesquisas experimentais. A política de pesquisa em saúde no Sistema Único de Saúde (SUS) deve contemplar três aspectos essenciais: as transições saúde-doença, que abrangem a promoção, prevenção, cura e reabilitação, considerando os fatores determinantes individuais e coletivos; os sistemas e políticas de saúde; e a interseção entre saúde, sociedade e desenvolvimento. A pesquisa em saúde no âmbito do SUS deve englobar todos os seus componentes, incluindo a pesquisa biomédica, clínica, epidemiológica, bem como as ciências sociais relacionadas à política, planejamento e gestão em saúde [58].

O desenvolvimento de equipamentos médicos para o pé diabético desempenha um papel crucial na abordagem dessa problemática de saúde. A diabetes mellitus é uma doença crônica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e está associada a complicações graves, como a úlcera do pé diabético. Nesse contexto, os equipamentos médicos desempenham um papel fundamental, oferecendo soluções que auxiliam na prevenção, tratamento e cuidado adequado do pé diabético. O avanço nessa área é fundamental para melhorar a qualidade de vida dos pacientes diabéticos, reduzir a ocorrência de complicações e evitar sequelas graves, destacando a importância do contínuo desenvolvimento de equipamentos médicos específicos para o pé diabético.

Idealizado pela Profa. Dra. Suélia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa, foi desenvolvido um equipamento inovador chamado RAPHA® (que significa "curar" em hebraico) para tratar feridas nos membros inferiores de pacientes com diabetes. Essa tecnologia portátil combina o uso de uma biomembrana de látex natural, derivada da seringueira *Hevea brasiliense*, com a fototerapia por LED. Estudos clínicos demonstraram resultados promissores com o uso do RAPHA®, que permite que o tratamento seja realizado no conforto do lar, pelo próprio paciente e seus familiares [59]. O dispositivo Rapha® combina o uso de látex com a fototerapia de LED, um procedimento com propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes, para tratar lesões nos membros inferiores de pacientes com pé diabético [58] (**Figura 1.10**).





**Figura 1.5.** Equipamento Rapha® com lâmina de látex e tratamento padrão com o dispositivo. O kit Rapha® é composto por um dispositivo de LED que emite luz vermelha, lâminas de látex e itens para higienização da ferida. Após a limpeza, a lâmina é aplicada sobre a lesão e o aparelho de LED é colocado em seguida. O tratamento é realizado diariamente durante 35 minutos e tem apresentado resultados mais rápidos em comparação com o tratamento convencional. O procedimento padrão, que utiliza alginato de cálcio ou espuma de prata, leva seis meses. É importante realizar a limpeza da área antes de aplicar a membrana de látex microperfurada, que deve cobrir toda a superfície da lesão. O dispositivo de LED é fixado ao corpo do paciente e, após ligado, inicia-se a sessão de tratamento que dura 30 minutos, sendo indicado pelo sinal sonoro emitido ao final da sessão. Fonte: [58], p.15.

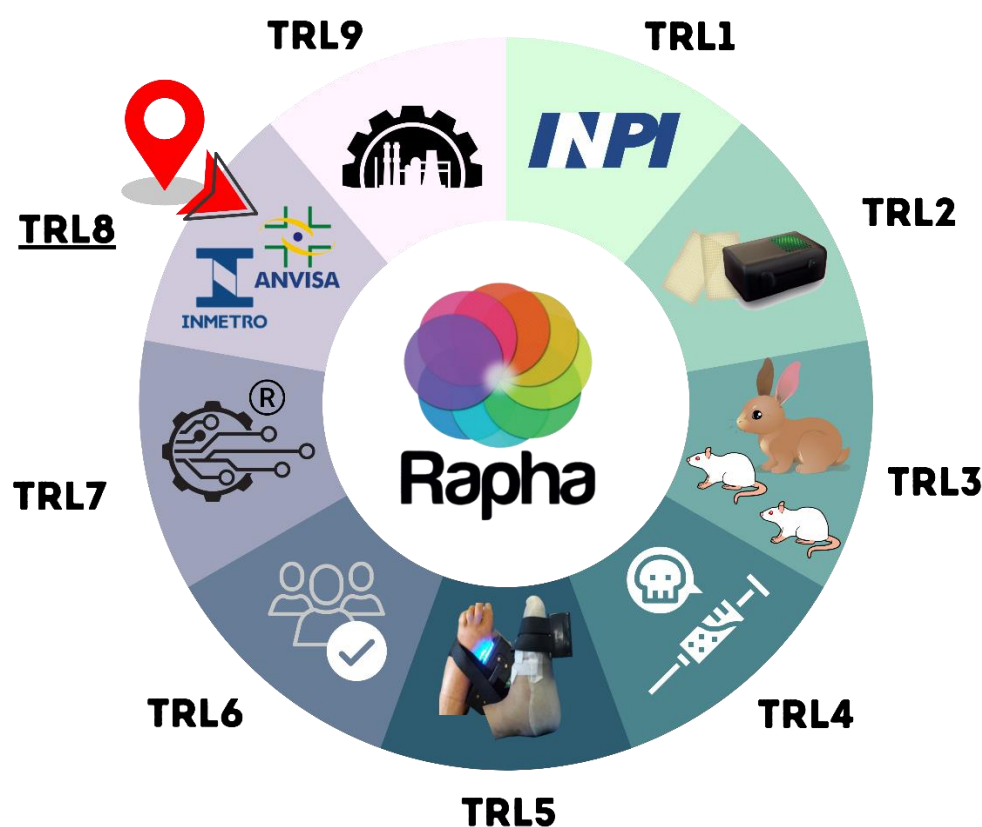
A engenharia biomédica desempenha um papel fundamental no contexto do desenvolvimento de equipamentos médicos assistenciais. Essa área de estudo e pesquisa combina princípios da engenharia com conhecimentos da área da saúde, visando a criação e aprimoramento de dispositivos e tecnologias que auxiliam no diagnóstico, tratamento e monitoramento de pacientes. A importância da engenharia biomédica pode ser percebida em diversos aspectos. Primeiramente, ela contribui para o desenvolvimento de equipamentos de última geração, capazes de oferecer diagnósticos mais precisos e tratamentos mais eficazes. Através da integração de conhecimentos técnicos, científicos e clínicos, os engenheiros biomédicos contribuem para melhorar o diagnóstico, tratamento e monitoramento de pacientes, promovendo maior eficácia, segurança e qualidade de vida na assistência médica [60], [61].

O processo de translação do equipamento Rapha, utilizado no tratamento de úlcera diabética, é um exemplo de sucesso na área da engenharia biomédica. Ao longo desse processo, foram realizados estudos clínicos para comprovar a segurança e eficácia do Rapha, obtendo resultados promissores no tratamento de úlceras diabéticas em pacientes [58] [59].

Com um *Technology Readiness Level* (TRL) de 8, o Rapha está em um estágio avançado de desenvolvimento, próximo à comercialização. Esse processo envolveu etapas desde a



concepção e projeto do dispositivo até a realização de testes clínicos e validação de sua eficácia. A partir da identificação da necessidade de tratamento eficiente e acessível para úlceras diabéticas, pesquisadores e engenheiros biomédicos trabalharam em conjunto para desenvolver uma solução inovadora. A translação bem-sucedida do Rapha demonstra o potencial da engenharia biomédica em fornecer soluções que impactam diretamente na saúde e qualidade de vida dos pacientes com úlcera diabética. Outros estudos para aprimoramento do equipamento utilizando outros biocompostos associados, como o Urucum (conforme as evidências do artigo descrito no capítulo V), está em fase de desenvolvimento por Pesquisadores da Universidade de Brasília.



**Figura 1.6.** Maturidade Tecnológica - *Technology Readiness Levels* (TRL) do Equipamento RAPHIA® (TRL 8). TRL 01: Patente Equipamento Rapha Aparelho emissor de luz led + Curativo de Látex. TRL 02: Desenvolvimento e Produção de *Mockups* para testes Pré-Clínicos. TRL 03: Realização de testes em animais. CEUA/UnB nº 64/2018. CEUA/UnB nº 77/2018. TRL 04: Ensaio Pré-Clínicos complementares. TRL 05: Ensaio Clínico Randomizado Comparativo Duplo Cego. TRL 06: Parlatório ANVISA - Deferimento desenho ensaio clínico para quesitos regulatórios. Notificação ANVISA final pesquisa clínica. Produto Classe II. TRL 07: Termo de Sigilo; Transferência e/ou Licenciamento Tecnológico voltado para Indústria na área da saúde. TRL 08: Adequação produtiva para o Equipamento Rapha atender quesitos regulatórios INMETRO e ANVISA. TRL 09: Adequação planta industrial para produção em escala do Equipamento Rapha e produção em escala industrial. Fonte: Acervo do Núcleo *Organ-on-a-chip*.

## 1.8 CENÁRIO

O pé diabético é uma complicação grave e comum que afeta pessoas com diabetes. É caracterizado por feridas crônicas nos pés que podem levar a infecções graves, amputações e até mesmo à morte em casos avançados. A problemática do pé diabético é significativa, não apenas em termos de impacto na qualidade de vida dos indivíduos afetados, mas também em termos de custos financeiros e de saúde pública.

Atualmente, existem diversas abordagens para o estudo e tratamento do pé diabético, mas muitas delas têm limitações. Os modelos animais são amplamente utilizados para a pesquisa nessa área, mas eles não conseguem reproduzir fielmente as características e complexidades do tecido humano. Além disso, ensaios clínicos envolvendo pacientes com pé diabético podem ser arriscados e eticamente desafiadores. Nesse contexto, a aplicação do OoC na pesquisa do pé diabético apresenta-se como uma alternativa promissora. Ele permite a simulação de tecidos e órgãos humanos em microdispositivos, fornecendo uma plataforma mais precisa e relevante para estudos de doenças e testes de drogas.

Em âmbito nacional, é de extrema importância realizar estudos com foco na translação. O Brasil enfrenta um grande desafio relacionado à diabetes, com uma população significativa de pessoas afetadas pela doença. A implementação do OoC em pesquisas nacionais pode proporcionar avanços significativos no entendimento da fisiopatologia do pé diabético, no desenvolvimento de terapias mais eficazes e na prevenção de complicações graves. Ao realizar estudos a nível nacional com foco no OoC para estudos do pé diabético, é possível obter dados mais relevantes para a população brasileira, considerando as particularidades genéticas e ambientais. Além disso, essa abordagem poderia contribuir para o desenvolvimento de tratamentos mais personalizados e adaptados à realidade do país.

A pesquisa translacional nessa área permitiria a colaboração entre engenheiros biomédicos, cientistas da saúde, médicos e profissionais da indústria farmacêutica, visando a adaptação do OoC para a realidade do pé diabético. Essa colaboração interdisciplinar é fundamental para superar os desafios técnicos e éticos envolvidos na aplicação dessa tecnologia em um contexto clínico. A problemática do pé diabético exige abordagens inovadoras e eficazes para sua prevenção e tratamento. A aplicação do *Organ-on-a-chip* na pesquisa translacional do pé diabético apresenta-se como uma solução promissora, permitindo estudos mais precisos e relevantes. A realização de estudos a nível nacional com foco nessa tecnologia pode

impulsionar avanços significativos no entendimento da doença e no desenvolvimento de terapias mais eficazes, contribuindo para a melhoria da saúde e qualidade de vida das pessoas afetadas pelo pé diabético no Brasil.

## **1.9 PROBLEMÁTICA E JUSTIFICATIVA**

A problemática do pé diabético é uma complicação grave e comum que afeta indivíduos com diabetes, resultando em feridas crônicas e potenciais complicações sérias. Atualmente, as abordagens de estudo e tratamento existentes possuem limitações, como a falta de modelos que reproduzam fielmente as características do tecido humano e os desafios éticos dos ensaios clínicos envolvendo pacientes com pé diabético. Nesse cenário, a aplicação do OoC surge como uma alternativa promissora. Através da microfisiologia, fornece uma plataforma mais precisa e relevante para pesquisas e testes de drogas. No contexto brasileiro, é crucial realizar estudos focados na translação do OoC para pesquisas sobre o pé diabético, dada a relevância da doença no país.

Esses estudos nacionais podem contribuir para avanços significativos no entendimento da fisiopatologia do pé diabético, desenvolvimento de terapias mais eficazes e prevenção de complicações graves. A colaboração interdisciplinar entre engenheiros biomédicos, cientistas da saúde, profissionais de saúde e profissionais da indústria farmacêutica é fundamental para adaptar o OoC à realidade clínica do pé diabético e superar os desafios técnicos e éticos envolvidos. A aplicação do OoC na pesquisa translacional do pé diabético pode fornecer soluções inovadoras e eficazes para a prevenção e tratamento dessa problemática, melhorando a saúde e a qualidade de vida dos pacientes no Brasil.

No entanto, a falta de diretrizes éticas e regulatórias específicas para a aplicação do OoC na PTS no Brasil representa um obstáculo para a sua adoção e utilização em estudos clínicos e na prática clínica. Portanto, é essencial realizar uma análise aprofundada dos aspectos éticos e regulatórios relacionados à implementação do OoC na PTS no Brasil, reconhecendo o papel crucial da Engenharia Biomédica nesse desenvolvimento tecnológico. Além disso, é fundamental identificar lacunas existentes na legislação atual e propor direções futuras para a legislação e a aplicação prática das descobertas obtidas por meio do OoC.

Essa dissertação busca contribuir para o avanço da pesquisa translacional em saúde, particularmente no contexto do pé diabético, fornecendo uma análise abrangente dos aspectos

éticos e regulatórios envolvidos na implementação do OoC. As descobertas e recomendações resultantes deste estudo podem orientar o desenvolvimento de diretrizes mais atualizadas e adequadas, promovendo a segurança e a eficácia dos estudos utilizando o OoC, além de impulsionar melhorias na saúde e qualidade de vida dos pacientes com pé diabético no Brasil.

## **1.8 OBJETIVOS**

### **1.8.1 OBJETIVO GERAL**

Esta dissertação tem como objetivo analisar os aspectos éticos e regulatórios da implementação do *Organ-on-a-chip* (OoC) na pesquisa translacional em Saúde (PTS) no Brasil, reconhecendo o papel da Engenharia Biomédica nesse desenvolvimento tecnológico; identificando lacunas e propondo direções futuras na legislação e aplicação prática das descobertas.

### **1.8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos para o desenvolvimento desta dissertação tratou-se de:

I) Analisar a utilização da integração da microfluídica e cultura celular 3D no cenário de Pesquisas sobre Úlcera do Pé diabético (UPD);

II) Revisar os modelos e *designs* de dispositivos OoCs existentes e suas aplicações no âmbito das tecnologias em saúde;

III) Realizar uma revisão sistemática sobre o uso de OoC no contexto do pé diabético, em busca de avanços no tratamento, prognóstico e identificação dos fatores relacionados ao problema;

IV) Realizar uma revisão sistemática sobre os modelos e designs de dispositivos OoC, abrangendo os avanços tecnológicos e a integração de tecidos e células humanas;

V) Discutir os aspectos éticos e regulatórios da implementação de plataformas OoC na pesquisa translacional no Brasil;

VI) Reconhecer o papel da Engenharia Biomédica no desenvolvimento tecnológico e apoio à pesquisas que incluam os dispositivos OoCs;

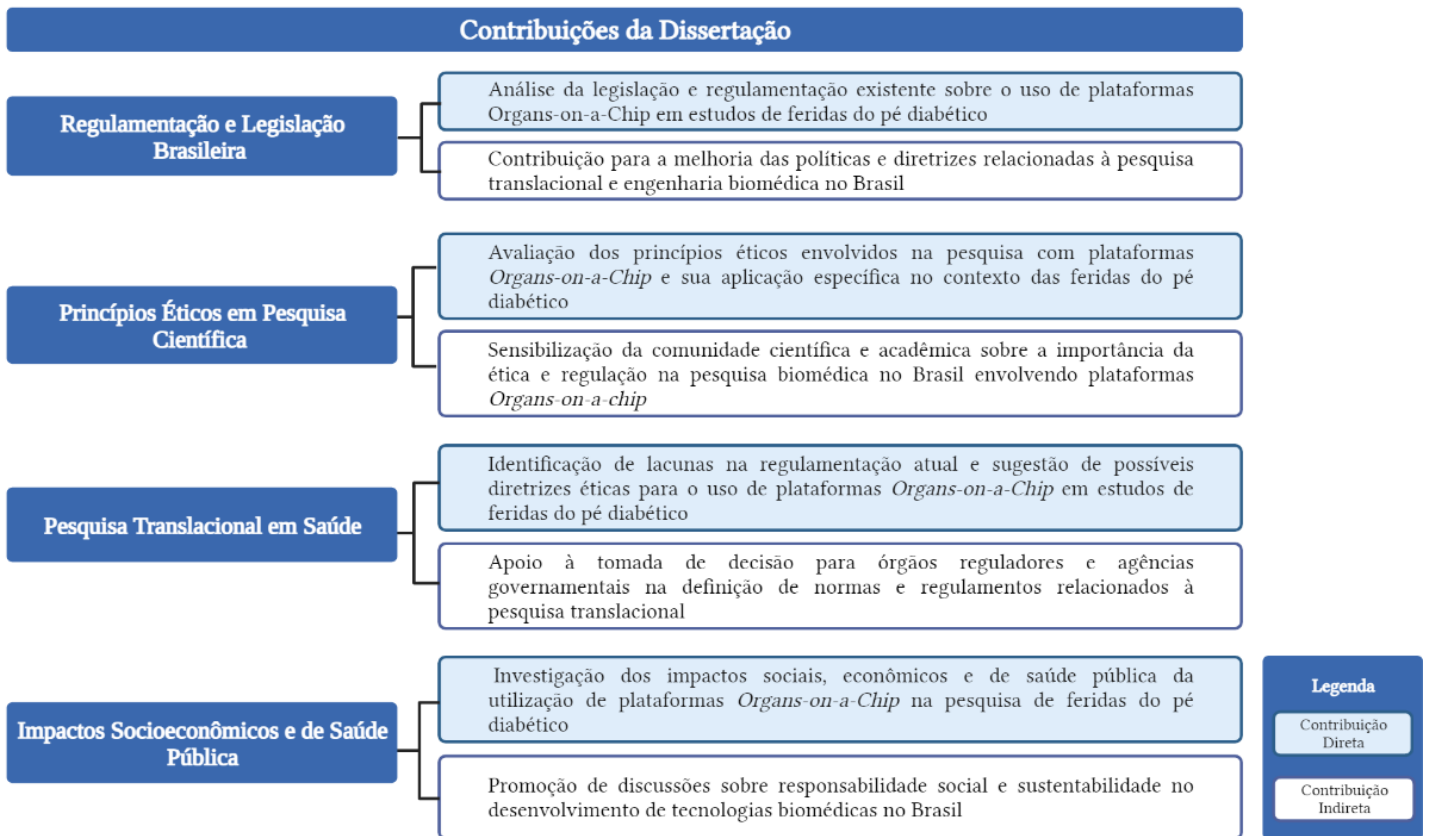
VII) Identificar lacunas e contribuir com a legislação que regulamenta a tecnologia OoC, promovendo avanços na Pesquisa Translacional em Saúde (PTS).

VII) Divulgação por meio de marketing científico das potencialidades da plataforma OoC;

IX) Propor direções futuras de pesquisa e recomendações para a aplicação prática das descobertas obtidas por meio de OoC, visando melhorias na saúde e qualidade de vida dos pacientes com pé diabético.

## **1.9 CONTRIBUIÇÕES DA DISSERTAÇÃO**

A tecnologia OoC tem o potencial de revolucionar a maneira como estudamos e tratamos o pé diabético, uma complicação séria que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, causando incapacidades substanciais. Ao simular de forma precisa o ambiente microvascular e celular da ferida, as plataformas 3D permitem testar terapias e medicamentos de maneira mais eficiente e ética, reduzindo a dependência de modelos animais e ensaios clínicos invasivos. Com a regulamentação adequada, essas plataformas podem acelerar as etapas da PTS, além de aprimorar a compreensão dos mecanismos subjacentes ao pé diabético, abrindo caminho para intervenções mais eficazes e melhorando a qualidade de vida dos pacientes. A importância desse trabalho não se limita apenas aos benefícios para a pesquisa e a medicina. A regulamentação a nível nacional também desempenha um papel fundamental na segurança do paciente. Ao estabelecer diretrizes claras e padrões de qualidade para essas tecnologias, é possível garantir que os resultados obtidos sejam confiáveis e replicáveis, minimizando riscos e viés metodológicos. Dessa forma, este trabalho não abrange apenas oportunidades de pesquisa promissoras, mas também um quadro regulatório sólido que fomenta a confiança e a segurança em benefício de todos os envolvidos, criando um ambiente propício para o PD&I de OoC no Brasil. A **Figura 1.12** mostra as contribuições diretas e indiretas que se pretende atingir com os objetivos deste trabalho.



**Figura 1.7.** Contribuições diretas e indiretas da dissertação sobre os avanços científicos relacionados à tecnologia *Organ-on-a-chip*.

## **CAPÍTULO II**

### Materiais e Métodos

## 2.1 DESENHO DE ESTUDO

Foi realizada uma pesquisa qualitativa, realizada em duas fases distintas: a primeira fase consistiu em uma busca bibliográfica nos órgãos regulamentadores brasileiros a respeito da legislação vigente relacionada a equipamentos médicos do tipo OoC. Já a segunda fase envolveu a escrita de duas revisões sistemáticas, abordando tópicos inerentes a sua utilização no cenário de UPD's. Essa abordagem permitiu uma compreensão aprofundada da legislação vigente e suas implicações para a indústria de equipamentos médicos no Brasil, fornecendo subsídios para o aprimoramento das políticas e regulamentações nessa área.

A pergunta de pesquisa que fundamentou o desenvolvimento desta dissertação, foi formulada através do acrônimo PICO (População, Intervenção, Comparação e Desfecho) [62]. Tratou-se: "Em estudos sobre feridas do tipo pé diabético (P), que utilizem plataformas *Organ-on-a-chip* (I), quais são os aspectos éticos e regulatórios (C) envolvidos para promoção da pesquisa translacional em saúde no Brasil? (O)"

## 2.2 BUSCA BIBLIOGRÁFICA NOS ÓRGÃOS REGULAMENTADORES BRASILEIROS

Foram identificados os principais órgãos brasileiros responsáveis pela regulamentação de equipamentos médicos, incluindo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Inmetro, BraVCAM, RENAMA e CONCEA. Em seguida, realizou-se buscas nas bases de dados dos órgãos regulamentadores para identificar leis, resoluções, portarias e normas técnicas relacionadas à legislação de equipamentos médicos. Os documentos obtidos foram analisados, identificando as principais informações sobre a legislação vigente. Foram buscados aspectos como classificação dos OoCs, requisitos de registro, certificação, controle de qualidade, entre outros.

## 2.3 ESCRITA DE DUAS REVISÕES SISTEMÁTICAS

Inicialmente, foram identificados dois tópicos de interesse relacionados à legislação de equipamentos médicos e ao projeto *Organ.on.a.chip*, de maneira global. Ainda, outro tópico foi buscado a respeito de biocompostos cicatrizantes que pudessem ser incorporados no tratamento de pé diabético, que se relacionou à 3ª revisão sistemática que compõe esta dissertação. Foram formuladas duas perguntas de pesquisa, respondidas através das duas revisões sistemáticas que foram desenvolvidas baseadas no método Prisma [63]. Na Figura 2.1,



é possível identificar as fases principais que envolveram a escrita dos estudos do tipo revisão sistemática.

**Pergunta de Pesquisa:** É o elemento fundamental, que irá definir o propósito e o escopo do estudo. uma pergunta de pesquisa bem formulada é essencial para direcionar o processo de pesquisa de maneira eficaz e garantir resultados relevantes. No contexto do acrônimo PICO, frequentemente utilizado na formulação de questões de pesquisa na área da saúde, cada letra representa um aspecto essencial: P para paciente/população, I para intervenção, C para comparação e O para desfecho. Essa estrutura ajuda a delimitar o tema da pesquisa, permitindo uma abordagem mais precisa e direcionada ao responder questões específicas.

**Estratégia de busca:** Definiu-se uma estratégia de busca sistemática nas bases de dados científicas, para identificar estudos primários que abordassem os tópicos selecionados.

**Registro de protocolo de revisão sistemática:** O registro de protocolo PROSPERO é uma iniciativa importante para promover a transparência e a qualidade das revisões sistemáticas na área da saúde. PROSPERO é um banco de dados internacional que permite o registro prospectivo de revisões sistemáticas em andamento, fornecendo informações sobre a metodologia, objetivos, critérios de inclusão e exclusão, além de permitir o acesso aos protocolos de revisão. Ambas as revisões tiveram protocolo registrado logo inicialmente, antes de realizar as buscas nas bases de dados.

**Seleção de estudos:** Os estudos foram selecionados com base em critérios de inclusão e exclusão estabelecidos previamente. Foram realizadas leituras de título, resumo e texto completo para determinar a relevância dos estudos. A seleção foi composta por duas fases, sendo a primeira a realização da leitura do título e resumo, e a segunda a leitura do texto na íntegra. Em ambas, as decisões foram tomadas em duplicata e de maneira independente pelos autores.

**Extração e análise de dados:** Os dados relevantes dos estudos incluídos foram extraídos e organizados, em duplicata e de maneira independente. Uma análise crítica dos estudos foi realizada, destacando as principais conclusões e contribuições para a compreensão da legislação aplicável a equipamentos médicos.

**Análise da qualidade metodológica dos estudos:** A análise da qualidade metodológica dos estudos em uma revisão sistemática é de extrema importância para avaliar a confiabilidade e validade dos resultados obtidos. Essa análise permite identificar a robustez dos estudos incluídos na revisão, levando em consideração aspectos como o desenho do estudo, a seleção adequada da amostra, a coleta e análise dos dados, o controle de vieses e a interpretação dos resultados. Nas revisões sobre *organ-on-a-chip*, por não existirem instrumentos validados a respeito da análise metodológica de estudos sobre plataformas 3D, adaptamos as perguntas conforme a necessidade do estudo.

**Redação das revisões sistemáticas:** Com base na análise dos estudos selecionados, foram escritas três revisões sistemáticas, seguindo as diretrizes metodológicas estabelecidas para esse tipo de estudo.



**Figura 2.** Fluxograma metodológico do desenvolvimento das revisões sistemáticas. As etapas principais envolveram: a) planejamento, b) seleção dos estudos, c) síntese dos dados e análise das evidências e d) publicação ou submissão do trabalho.

## **2.4 PRODUÇÃO DE MARKETING CIENTÍFICO – APRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PLATAFORMA ORGAN-ON-A-CHIP**

A produção de uma apresentação gráfica de *marketing* científico sobre a plataforma OoC é importante por diversos motivos. Em primeiro lugar, buscamos transmitir informações complexas de forma visualmente mais facilitada, melhorando a compreensão do público-alvo. Além disso, buscamos destacar os principais pontos de interesse do OoC, como suas aplicações, benefícios e avanços recentes, de forma clara e concisa.

Para sua consolidação, realizamos uma pesquisa detalhada sobre o tema, coletando informações atualizadas e relevantes sobre o OoC, suas aplicações e benefícios, incluindo informações retiradas das revisões sistemáticas conduzidas. Utilizamos a plataforma Prezi [64] para esta etapa, dividindo as informações de forma que ficassem expostas de maneira coerente.

### **CAPÍTULO III**

Artigo – *Organ-on-a-chip* for diabetic wound foot neovascularization: a sistematic review of preclinical studies and future directions

# *Organ-on-a-Chip* for diabetic wound foot neovascularization: a systematic review of preclinical studies and future directions

Ana Karoline Almeida da Silva<sup>a,\*</sup>, Suéilia de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa<sup>a,b</sup>, Gustavo Adolfo Marcelino de Almeida Nunes<sup>b</sup>, Rafael Mendes Faria<sup>b,c</sup>, Klériston Silva Santos<sup>b,c</sup>, Rafael Pissinati de Souza<sup>b,d</sup>, Lindemberg Barreto Mota da Costa<sup>e</sup>, Marcos Augusto Moutinho Fonseca<sup>b</sup>, Sheila Sousa Gomes Fortes<sup>f</sup>, Amanda Maciel Lima<sup>f</sup>, Ana Carolina Migliorini Figueira<sup>g</sup>, Harsson Silva Santana<sup>h</sup>, Marcella Lemos Brettas Carneiro<sup>i,j</sup>, Pedro Henrique Silva de Almeida<sup>k</sup>, Isolda de Sousa Monteiro<sup>l</sup>, Paulo Sérgio França<sup>m</sup>, Maria Alice Martins<sup>n</sup>, Ícaro Santos<sup>o</sup>, Glécia Virgolino da Silva Luz<sup>a</sup>, Graziella Anselmo Joanitti<sup>j</sup>, José Carlos Tatmatsu-Rocha<sup>k</sup>, Mário Fabrício Fleury Rosa<sup>a</sup>, Emanuel Carrilho<sup>f,p,1</sup>

<sup>a</sup>University of Brasilia, Faculty of Gama, Postgraduate Programme in Biomedical Engineering, Gama, Distrito Federal, 72444-240, Brazil.

<sup>b</sup>University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Postgraduate Programme in Mechatronic Systems, Mechanical Engineering Department, Brasilia, Distrito Federal, 70910-900, Brazil.

<sup>c</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology of Triângulo Mineiro, Paracatu, Minas Gerais, 38609-899, Brazil.

<sup>d</sup>Federal Institute of Education, Science and Technology of Rondônia, Porto Velho, Rondônia, 76820-441, Brazil.

<sup>e</sup>Christus University Centre, Physiotherapy Department, Fortaleza, Ceará, 60190-180, Brazil

<sup>f</sup>University of São Paulo - USP, Institute of Chemistry of São Carlos, Department of Chemistry and Molecular Physics, São Carlos - São Paulo, 13563-120, Brazil.

<sup>g</sup>Brazilian Center for Research in Energy and Materials - CNPEM, National Laboratory of Biosciences - LNBIO, Campinas, São Paulo, 13083-970, Brazil.

<sup>h</sup>State University of Campinas Unicamp, Faculty of Chemical Engineering, Campinas, São Paulo, 13083-852, Brazil.

<sup>i</sup>University of Brasilia, Campus Planaltina, Postgraduate Programs in Biomedical Engineering and Nanoscience and Nanotechnology, Planaltina, Distrito Federal, 73345-010, Brazil.

<sup>j</sup>University of Brasilia, Campus Ceilândia, Postgraduate Program in Nanoscience and Nanobiotechnology and Postgraduate Program in Health Sciences and Technologies, Ceilândia, Distrito Federal, 72220-275, Brazil.

<sup>k</sup>Federal University of Ceara – UFC, Medicine School, Postgraduate Programs in Biomedical Engineering and in Physiotherapy and Functionality, Fortaleza, Ceara, 60430450, Brazil.

<sup>l</sup>University of Brasilia, Campus Ceilândia, Postgraduate program in health sciences and technologies, Brasilia, Distrito Federal, 70.910-900, Brazil.

<sup>m</sup>University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Postgraduate Program in Medical Sciences, Brasília, Distrito Federal, 70.910-900, Brazil.

<sup>n</sup>Nanotechnology National Laboratory for Agriculture, Embrapa Instrumentation, São Carlos, São Paulo, 13560-970, Brazil.

<sup>o</sup>Department of Biomedical Engineering, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI, 53706-1572, United States of America.

<sup>p</sup>National Network of Alternative Methods - RENAMA. Ministry of Science, Technology, and Innovation. Brazil.

<sup>1</sup>National Institute of Science and Technology on Bioanalytics, State University of Campinas, Campinas - São Paulo, 13083-970, Brazil.

---

## Abstract

The healing process of diabetic foot ulcers (DFUs) presents a slow pattern, with an increased risk of infections, ischemia, and thrombosis, correlated with high levels of reactive oxygen species production. Vascular injury is one of the factors contributing to the difficulty in wound healing in diabetic patients. Although understanding the pathophysiology of DFUs has significantly increased in recent years, associated treatments still have a high level of failure, leading to high morbidity rates, mortality, and amputations. 3D cell culture platforms can offer a new approach to investigating and treating DFUs as they can reproduce one or more physiological systems in a relevant microenvironment. This systematic review describes the advancements, challenges, and future impacts of advanced 3D cell culture models in DFU vascularization, including the pathophysiological understanding and treatment and prognosis perspectives. We followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines. This work was registered under the protocol number PROSPERO [CRD42022336473]. The eligibility criteria addressed studies related to chronic DFUs that analyzed vascularization during the healing process. The selected study designs were related to 3D cell culture and *Organ-on-a-Chip* platforms using primary or secondary human cell lines for culture. Studies published over ten years ago or that used only animal cells in 2D culture environments were excluded. The search was conducted in PubMed, LILACS, EMBASE, MEDLINE, IEEE, BSV regional portal, ScienceDirect, Scopus, CINAHL EBSCO, and Web of Science. In total, 2413 relevant studies were found in the Scopus, PubMed, Embase, and IEEE databases, updated as of April 16, 2023. After applying filters, 1343 studies were gathered. Only two studies met the inclusion criteria for this systematic review. These studies showed a growing interest in the 3D culture of DFUs in the context of hydrogel scaffolds; however, they needed more primary studies on the topic. *Organ-on-a-Chip* platforms provide a controlled microenvironment for cell culture and mimic the structure and function of blood vessels and tissues, allowing investigation of the mechanisms involved in DFU healing. Although there are already combinations of hydrogels with microtechnologies like OoCs, the results associating both technologies for the chronic wound scenario were inconclusive. This review provides an overview of the current and future critical challenges regarding hydrogels for 3D culture and applications in OoC devices.

**Keywords:** Diabetes Mellitus, Diabetic Wound Foot, Tissue Healing, *Organ-on-a-chip*, Microfluidic Platforms, Angiogenesis.

## 1. Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a disorder of the endocrine system characterized by high blood glucose levels, which can lead to micro and macrovascular dysfunctions [Mathur et al. \(2019\)](#). Diabetic foot ulcer (DFU) is one of the most common and alarming complications of DM. The risk of individuals with DM developing a foot ulcer is as high as 34% throughout their lifetime. Failures in the healing process of these wounds often result in amputations, with an estimated half of all amputations in diabetic patients resulting from infected wounds [Yunir et al. \(2022\)](#). The mortality rate associated with lower limb amputation is high, with approximately one-third of deaths occurring within one year and 65% after four years [Yunir et al. \(2022\)](#). Furthermore, this complication significantly reduces the patient's quality of life and is frequently associated with psychological and familial problems [Burgess et al. \(2021\)](#). Globally, healthcare expenditures related to diabetes reached approximately \$700 billion in 2019 and are projected to reach \$825 billion by 2030. Among these costs, about one-third will be attributed to DFUs [Deng et al. \(2023\)](#).

The healing process of tissue injuries is a complex event that involves multiple physiological mechanisms, such as hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. There may be impairments due to pathophysiological factors, disrupting the mechanisms that regulate tissue repair [Chouhan et al. \(2019\)](#); [Burgess et al. \(2021\)](#). DFUs, for instance, exhibit a different pattern of healing, with some parts of the wound healing slower than others, increasing the risk of infections, ischemia, and thrombosis. Chronic hyperglycemia, a hallmark of diabetes, is directly associated with a deficiency in wound repair, atherosclerosis, and neuropathic dysfunction. Furthermore, chronic hyperglycemia causes endothelial cell dysfunction. Moreover, it is related to dysfunction of endothelial cells and decreased migration of keratinocytes and fibroblasts. The mechanisms underlying vascular damage related to prolonged hyperglycemia are not yet fully understood, but evidence suggests that high levels of glucose within cells may result in increased production of reactive oxygen species (ROS), which may alter cellular processes and impair blood vessels [Loots et al. \(1998, 2002\)](#); [Mathur et al. \(2019\)](#).

Endothelial dysfunction in DM involves reduced levels of endothelial progenitor cells, decreased proliferation of circulating endothelial cells, reduced vasculogenesis, and increased inflammation in vascular cells [Mathur et al. \(2019\)](#). Endothelial damage can also occur through non-hyperglycemic mechanisms, which can arise from obesity or hypertension, closely related to DM. It can be concluded that numerous risk factors for vascular changes can hinder prognosis and delay wound healing [Cole and Florez \(2020\)](#). The lack of dimensionality, crosstalks, and disease-specific cellular interactions is limited to traditional preclinical assays [Bersini and Moretti \(2015\)](#).

The limitations of scientific evidence can be mitigated by using new experimental methods in research. Studies have shown that *in vivo* assays are poorly reproducible due to significant physiological and genetic differences between species. Ethical concerns and questions about the reliability of data obtained from animal experiments to predict clinical outcomes have been a concern among scientists and the general population [Groff et al. \(2021\)](#). For this reason, several regulatory agencies, laboratories, and universities have encouraged and sought validation of alternative methods to the use of animals. Besides the European Union (EU), countries such as the United States and Japan have made considerable strides in regulating animal testing, with the use of animals being banned for cosmetic purposes in the EU since 2009 [Pimenta et al. \(2022\)](#), [Aziz et al. \(2017\)](#). In Brazil, the National Network of Alternative Methods (Renama) was created in 2010 and plays a fundamental role in promoting the use of alternative methods to animal experimentation. Its actions aim to raise awareness and encourage the adoption of these methods, with the goal of reducing the use of animals in testing and research [RENAMA \(2023\)](#).

Due to the uniqueness of each patient and the growing need for personalized vascular medicine that mimics the patient's tissue architecture, there is an increasing interest in 3D cell culture in the pharmaceutical and cosmetics industry. This approach aids in understanding complex crosstalk mechanisms, in addition to responses at the cellular, molecular, and biophysical levels, and allows for interaction between diseased and heterotypic cell populations, providing more accurate functional responses. This can reduce reliance on ineffective and harmful treatment strategies. In addition, biomimetic modeling platforms can be an alternative to address treatment gaps for individuals who do not respond to conventional therapeutics [Dupuy et al. \(2021\)](#). *Organ-on-a-chip* (OoC) platforms have been developed to create a controlled microenvironment for the long-term manipulation and differentiation of various cell types [Huh et al. \(2011\)](#), [Van Duinen et al. \(2015\)](#).

Particularly for diabetic foot ulcers, the OoC platforms can be used to investigate the impact of hyperglycemia on vascular and cellular functions, such as the effect on endothelial cells and their capacity for angiogenesis in chronic wounds [Wimmer et al. \(2019\)](#). Additionally, these platforms can be used to study the role of immune cells, such as macrophages, in chronic inflammation and impaired wound healing in diabetic patients. Providing a controlled microenvironment that mimics *in vivo* conditions can help elucidate the key signaling pathways involved in neovascularization and screen for drugs that may enhance angiogenesis in diabetic wounds, promoting faster tissue repairs without recurrences [Leung \(2022\)](#).

Hydrogel, a material composed primarily of water, exhibits physical and chemical characteristics that resemble biological tissue, making it an ideal choice for recreating specific microenvironments [Maione et al. \(2015\)](#); [Ozdogan et al. \(2020\)](#). The utilization of hydrogels in OoC platforms has been a promising approach to simulating the functionality of human organs in a controlled and exact environment. Recently, hydrogel substrates equipped with microfluidic channels have been developed to create three-dimensional cell culture envi-

\*Corresponding author at: University of Brasilia, Faculty of Gama, Post-graduate Programme in Biomedical Engineering, Gama, Distrito Federal, 72444-240, Brazil

Email address: [silva.karoline@aluno.umb.br](mailto:silva.karoline@aluno.umb.br) or [anakaroline.alms@gmail.com](mailto:anakaroline.alms@gmail.com) (Ana Karoline Almeida da Silva)

ronments. Natural and synthetic polymers such as alginate, collagen, agarose, and crosslinked PEG have been used to construct hydrogel-based microchannel networks. Various approaches have been tested to design these structures, including three-dimensional bio-printing, sacrificial model technology, and layer-by-layer assembly of hydrogel sheets [Nie et al. \(2018\)](#).

In general, the use of OoC platforms in the analysis of DFU holds great potential to advance our understanding of the disease's pathophysiology and improve the clinical predictability of current or developing drugs. This systematic review describes advanced microfluidic models' achievements, challenges, and future impacts on the pathophysiological understanding, treatment, and prognosis of diabetic foot wounds. With a deeper insight, one may foresee opportunities for innovation and entrepreneurial endeavors.

## 2. Methodology

### 2.1. Protocol and Registration

We registered this systematic review on the PROSPERO international prospective register of systematic reviews under registration number [CRD42022336473]. We followed the guidelines of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) for this review [Page et al. \(2022\)](#).

### 2.2. Eligibility Criteria

#### Inclusion Criteria

The inclusion criteria for this systematic review followed the PICOS approach (Population, Intervention, Comparison, Outcome, and Study Design) [Methley et al. \(2014\)](#). The selected studies involved diabetic foot wounds (P). They examined impaired vascularization during the healing process (I), using human primary and secondary lineage cell cultures (C) in a 3D cell culture setting (O) through in vitro studies using an Organ-on-a-chip platform or 3D culture (S)..

**Exclusion Criteria** We excluded from the review the studies that did not meet the inclusion criteria based on the PICOS approach. Specifically, studies that did not involve diabetic foot-type wounds, did not analyze impaired vascularization during the healing process, did not use human primary and secondary lineage cell cultures, did not involve a 3D cell culture setting, or did not use an OoC platform were excluded. We also excluded studies that utilized pluripotent or primary cells from animals. The exclusion criteria were prioritized in the given order:

1. Studies that did not provide information on vascularization or wound healing;
2. Donor cells not from living humans or cadavers;
3. Reports, letters, personal opinions, book chapters, conference summaries, and patents;
4. Studies using donated animal cells;
5. Not *in vitro* studies and randomized clinical trials on humans; and
6. Studies published over ten years ago.

### 2.3. Search Strategy and Information Sources

Review Question: What is the application of OoC in vascularizing chronic wounds in people with diabetes? Search strategies have been developed and adapted according to the needs of each of the databases used for research: PubMed, LILACS, EMBASE, MEDLINE, IEEE, regional portal BSV, ScienceDirect, Scopus, CINAHL EBSCO, and Web of Science. The team searched databases published in the last ten years, from September 1, 2022, to April 16, 2023, with no language restrictions. Duplicate references were removed using *Rayyan*® software [Elmagarmid et al. \(2014\)](#). The results are presented in **Supplementary Material**.

### 2.4. Study Selection and Data Extraction

In the first phase, the authors screened the titles and abstracts of all references identified in the electronic databases and selected the articles that met the inclusion criteria. The selections of the first phase were made by peers, using the *Rayyan*® software [Elmagarmid et al. \(2014\)](#), applying the pre-defined inclusion and exclusion criteria. In the second phase, the authors independently analyzed the full texts in pairs and picked the papers using a standardized data extraction form. A third author was consulted to decide if there were any disagreements. This process was implemented to minimize discrepancies and bias between reviewers.

The extraction of relevant data from each study was organized in a predefined table that described the main points related to the characteristics of the intervention of interest, including the type of cell donors, cell lineage, data on microfluidic simulation, angiogenesis rate, and its relationship with chronic wound healing in diabetic patients.

### 2.5. Risks of bias and Quality in Individual Studies

Due to the heterogeneity of the evaluated interventions, it was not possible to perform a meta-analysis of all the data related to the findings. Therefore, we analyzed the methodological quality of the studies using the Cochrane Robvis Collaboration Tool (Rob 2), adapted by the authors. We performed evaluations in duplicate and individually. A third author mediated in cases of disagreement [Eldridge et al. \(2016\)](#); [Moher et al. \(2010\)](#).

Bias risk analysis using the RoB 2 platform is a fundamental step in critically evaluating the methodological quality of primary studies. It can assist in the interpretation of results from systematic reviews and meta-analyses. However, there is currently a need for a specific tool for evaluating the methodological quality of *in vitro* 3D trials. [McGuinness and Higgins \(2021\)](#).

We adapted an available version of the RoB 2 tool to create 15 domains to assess the methodological quality of Organ-on-a-chip assays. These domains cover various aspects, including the selection of tissues and cells, presence of experimental and control groups, identification and authenticity of the cell line, basic morphological description, allocation of tissues or cells, steps of cell layer formation procedures, pre-established criteria for inclusion or exclusion of experimental units, blinding of



215 evaluators, loss of follow-up, standardized data collection, detailed description of Chip Design platform development, submission to the research ethics committee, control of confounding factors, and declaration of conflicts of interest. These domains can be used to assess the risk of bias in OoC studies and to determine the overall quality of the study. By carefully evaluating each part, one can decide if the risk of bias is low or high in each study.

220 "LOW" responses indicate that there is sufficient evidence or appropriate measures to reduce bias in a study. This suggests that the risk of bias is low and the results are reliable. "NO INFORMATION" was used when there was insufficient information available to assess the risk of bias in a specific study. This indicates that more data is needed for a proper evaluation. "CRITICAL" was associated with a high risk of bias in a study, which could affect the validity of the results. This indicates that the study limitations are significant and may compromise the reliability of the findings. Studies labeled as "HIGH" indicate that the risk of bias in a study was high, which could impact the interpretation of the results. This suggests that the study limitations are substantial and should be considered when analyzing the findings. "UNCLEAR" was used when the available information was insufficient or ambiguous to determine the risk of bias in a study. This indicates that the assessment of bias cannot be made with certainty due to a lack of clear information.

230 The outcomes that the reviewers raised were measured and used to classify the studies based on the percentage of "YES" responses to the criteria. Studies with  $\geq 70\%$  "YES" answers were considered high quality, studies with 50-69% "YES" responses were regarded as moderate quality, and studies with  $\leq 49\%$  "YES" responses were considered low quality.

### 3. Results

245 In a bibliometric study conducted on January 24, 2023, using VOSviewer software version 1.6.17, we searched IEEE, PubMed, Scopus, and Embase databases using MeSH search terms "Lab-On-A-Chip Devices," "Microfluidics," "Angiogenesis," and "Diabetic Foot." There were 1343 articles found, excluding duplicates. Figure 1 shows the most frequent keywords found in the articles, divided into four different groups: microfluidics (red), biomedical monitoring (blue), diabetes (green), and temperature measurement (yellow) (Figure 1).

255 The lines connecting the terms represent the co-occurrence relationships between them across the analyzed papers. It is evident the lack of studies focusing on 3D cell culture in the context of chronic wounds such as Diabetic Foot. Some of the most frequently occurring terms in this field include diabetes, Diabetic Foot, temperature measurement, skin, wounds, biomedical monitoring, mathematical modeling, microfluidics, and others. The co-occurrence threshold for these terms was set to at least 20 occurrences.

#### 3.1. Synthesis of the Results

265 Our systematic review aimed to investigate the advances related to 3D cell culture and OoC platforms in the context of

diabetic foot diseases. As shown in the PRISMA flow diagram, a more notable contribution from scientific papers was found in electronic databases: Scopus ( $n = 4$ ), PubMed ( $n = 1$ ), Embase ( $n = 12$ ), and IEEE ( $n = 2396$ ), totaling 2413 articles (Figure 2). After applying filters and removing duplicates, 1343 articles passed through the first filter of the review, which involved analyzing the titles and abstracts of the works. After selecting the studies, approximately 32 papers were chosen for full-text reading. Despite a comprehensive search and recent advances in the microfabrication of microfluidic devices, only two studies met the inclusion criteria and were selected to compose this review (Ozdogan et al. (2020) Maione et al. (2015)).

275 Despite being the target of this review, the found studies needed to present a DFU model on an OoC platform. However, the cultures were performed on other three-dimensional structures using two distinct and complementary approaches, which may indicate paths for application in OoCs. These studies were recently developed and focused on the immune response of the skin, topical drug testing (Maione et al. (2015)), and the analysis of gene expression and the response of diabetic skin to different stimuli (Ozdogan et al. (2020)).

285 Both studies performed cellular cultivation using a 3D gel-based setting (Table 1). Hydrogels which are polymers with substantial water content, were employed. When it comes to 3D cellular cultivation purposes, it is vital to primarily contemplate the mechanical resilience and porosity of the gels owing to their varied physical, biological, and chemical attributes (Maione et al. (2015); Ozdogan et al. (2020)). The mechanical durability of the device plays a significant function in fostering improved tissue organization and attachment to the framework.

295 (Ozdogan et al. (2020) developed a 3D diabetic skin model by isolating human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), dermal fibroblasts, and keratinocytes from type II diabetic patients diagnosed for at least four years. The cells were cultured on a 3D GelMA cell culture platform crosslinked at 8%, with a compression modulus of  $4.53 \pm 0.67$  kPa. For the construction of *in vitro* skin models, hydrogels like GelMA are the most prevalent due to their high-water content, high permeability to small molecules, mechanically biocompatible, and adjustable physicochemical properties alike those of the skin.

305 In the methodological development, the researchers used primary skin cells from diabetic patients but faced difficulty obtaining enough material for all assays. Therefore, cell culture studies in the hydrogel were performed with normoglycemic human dermal fibroblasts for optimization. Then the *in vitro* 3D diabetic skin model was constructed using keratinocytes, dermal fibroblasts, and HUVECs derived from type II diabetic donors. The *in vitro* 3D diabetic skin model was then characterized and compared with *in vivo* diabetic skin, showing significant similarities (Ozdogan et al. (2020)).

315 According to (Ozdogan et al. (2020)), the skin model featured a dermal layer and a continuous basal epidermal layer, which exhibited a structure akin to a blood capillary, measuring 12 mm in diameter and 1.86 mm in height. The cells were



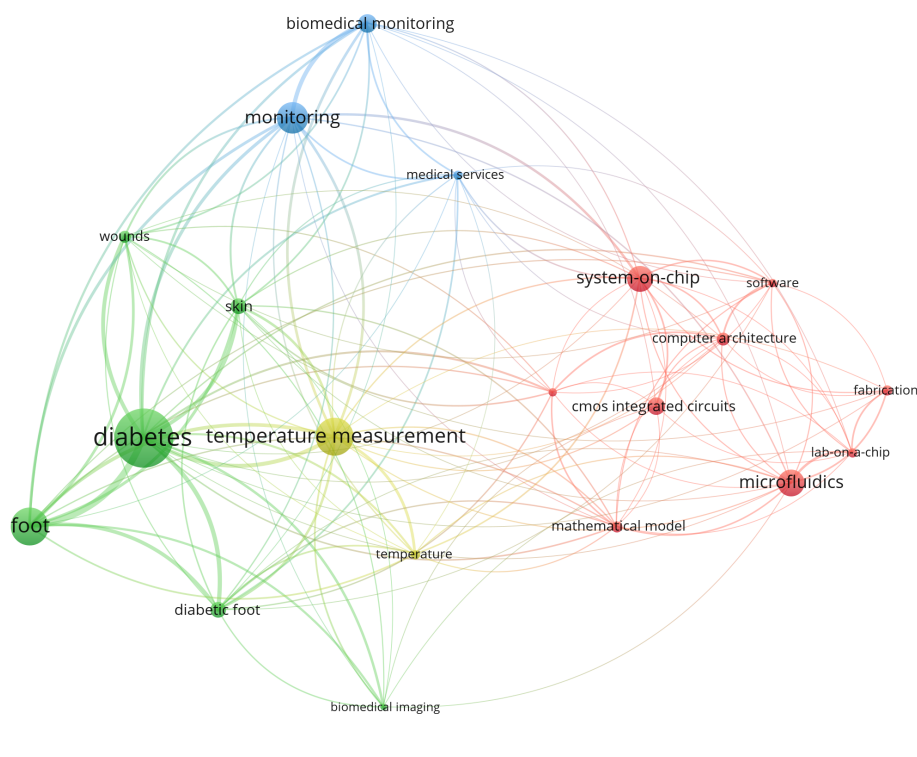


Figure 1: Bibliometric Analysis: Word Map - Bibliometric analysis was conducted using the VOSviewer program version 1.6.17 Van Eck and Waltman (2011) on 1,343 works published with the search string ("Lab.-On-A-Chip Devices" OR "Body on a chip" OR "Microfluidics" AND "Angiogenesis Inducing Agents" OR "Angiogenesis Modulating Agents" OR "Neovascularization Physiologic" AND "Wound Healing" OR "Cicatrix" AND "Diabetes Mellitus" OR "Diabetic Foot") in the title, abstract, or keywords on January 24, 2023. The analysis used a minimum co-occurrence of terms of 30 times and binary counting.

cultivated in a supplemented medium containing human blood plasma to replicate the natural cellular environment. To simulate the blood composition of individuals with diabetes, the glucose concentration in the medium was elevated around 25 mM. The medium was renewed three times per week. For wound healing analysis, a biopsy was conducted, creating a 4 mm synthetic wound at the center of the diabetic skin model, with a sample size of  $n = 3$ . The solution consisted of atelocollagen at 6.67 mg/ml, L-ascorbic acid at 6.67 mg/ml, and sodium alginate at 1.67 mg/ml. Subsequently, the samples underwent incubation, cellular fixation, and subsequent analysis.

To cultivate the dermis, HUVECs were isolated via enzymatic digestion. The presence of endothelial cells was confirmed by the expression of the CD31 marker, indicating their presence. Epithelial cells, specifically keratinocytes, were immunolabeled using cytokeratin 5 to ensure a pure culture. Under microscopic analysis, structures resembling capillaries were observed beneath the epidermal layer, although the vascularization of the tissue could not be assessed. The authors hypothesize that this limitation is attributable to the lack of perfusion in the culture, which resulted from the substantial thickness of the hydrogel used for cultivation. This, in turn, may have prompted cell migration toward the outer regions and hindered the appropriate interaction between fibroblasts and endothelial cells. Such findings demonstrated that the 3D diabetic skin prototype

could identify inflammation in diabetic skin samples in a laboratory setting, mirroring the in vivo conditions. This implies that the prototype holds the potential for investigating inflammation in diabetes, a significant factor in the development of the disease. Moreover, the in vitro 3D diabetic skin model was employed to assess the effectiveness of topical therapies for diabetes. The GelMA hydrogel was crosslinked at a concentration of 8%. Compared with previous studies, the authors noted that this concentration adequately facilitated the dispersion and normal functioning of dermal fibroblasts in three-dimensional cultures Ozdogan et al. (2020).

After nine days of cultivation, the curative substance exhibited the migration of keratinocytes from the periphery to the core of the injury, albeit failing to encompass the area entirely. Using qualitative assessment involving the observation of typical cellular morphology and quantitative evaluation encompassing cell migration and cell enumeration, the therapeutic hydrogel unveiled beneficial outcomes that hold potential for improvement in diverse frameworks aimed at addressing the recuperation of persistent wounds Ozdogan et al. (2020).

Maione et al. (2015) concluded that 3D models as a platform for the growth and analysis of DFUs from a biological perspective are the way to map the critical aspects related to highlighted mechanisms for cell-cell and cell-matrix interactions. The authors selected fibroblasts derived from DFU patients and control

Table 1: Summary of descriptive characteristics of the included studies and outcomes data

Study	In vitro Assays	Intervention		Fabrication		Data Analysis	Outcomes
Reference	Sample	Objective	Methodology	Formation of a cell layer	Cell culture methodology	Types of Analysis	Results
<a href="#">Ozdogan et al. (2020)</a>	HUVECs from diabetic patients, diagnosed for at least 04 years	Develop an in vitro three-dimensional model of diabetic human skin to study the pathophysiology of DM in wound healing	The HUVECs were cultured on the 3D Matrigen™ platform. The effect of the wound healing compound GK-2 on wound healing was evaluated	Initially, the cells were expanded in culture plates and then transferred to the 3D platform. Then, the cells were incubated at 37°C in an atmosphere with 5% carbon dioxide and controlled humidity.	The culture wells were made of transparent plastic, with a diameter of 24 mm and a depth of 15 mm	<i>DHSM</i> = Cell viability and proliferation, immunofluorescence and histological analyses. <i>GK-2</i> = Cell viability and proliferation, gene expression analysis, and biochemical analyses (histological staining, hydroxyproline assay, levels of wound healing proteins such as fibronectin, and presence of ECM-degrading enzymes such as MMP.	DHMS exhibited similar characteristics to those of diabetic skin <i>in vivo</i> , such as the expression of proteins related to wound healing. The mean front of collective migration of fibroblasts was determined as $1.22 \pm 0.13$ mm. The compound GK-2 showed promising results in tissue repair of DFUs in vitro.
<a href="#">Maione et al. (2015)</a>	FBs originating from DFUs.	Develop a three-dimensional human tissue model that mimics characteristics of chronic wounds in people with diabetes	They performed isolation of fibroblasts from diabetic foot ulcers, growth of fibroblasts in hydrogel matrices, histological and molecular characterization of tissue models	The cell culture was derived from human fibroblasts obtained from biopsies of individuals with DFUs. The fibroblasts were cultivated in a solution containing collagen and fibrin hydrogel	Not specified by the authors of the study	Histological analysis, immunofluorescence, gene expression analysis, and cell viability assessment, matrix contraction evaluation	They accurately recapitulated aspects related to the connection of these cells with the development and maintenance of chronic wounds, including: i. ↓ stimulation of angiogenesis, ii. ↑ keratinocytes, and iii. ↓ healing rate and compromised ECM

Legend: DM = Diabetes Mellitus. HUVECs = Human Umbilical Vascular Endothelial Cells. DHSM = Type 2 Diabetic Human Skin Model. ECM = Extracellular Matrix. MMP = Matrix Metalloproteinase. FBs = Fibroblasts. DFU = Diabetic Foot Ulcer.

Source: Authors.

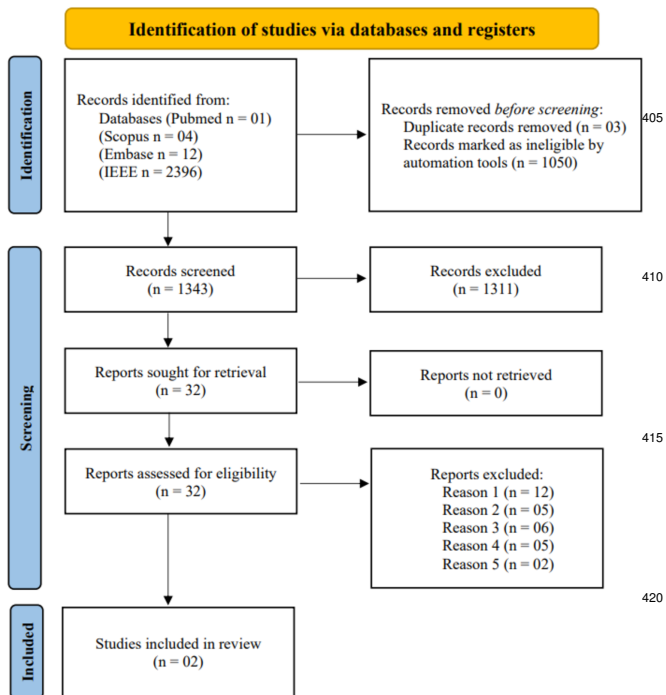


Figure 2: Flow diagram of literature search and selection criteria adapted from PRISMA. Page et al. (2021)

Source: Authors

patients with compatible regulation and DFU formation in their investigation. The selection of the 3D structure is superior to 2D culture models as the last fail to provide the necessary complexity to investigate the process of angiogenesis and interactions between fibroblasts and keratinocytes in the formation of the extracellular matrix (ECM). The studied model could accurately reproduce the main stages, including reduced angiogenesis stimulus, increased proliferation of keratinocytes, decreased re-epithelialization, and impaired deposition of the ECM.

In this study, the researchers stimulated ECM production by introducing ascorbic acid into the 3D culture for five weeks. As a result, a granulation tissue similar to ECM was observed, with the experimental group producing a thinner structure compared to the control group. These findings suggest that the phenotype of pressure ulcers for ECM production may contribute to the chronic nature of the wound Maione et al. (2015).

To characterize the healing potential of isolated fibroblasts, the authors conducted *in vivo* experiments on male mice 16 weeks old, where two layers of skin measuring 6 mm were obtained from the dorsal area of each animal. The fibroblasts encapsulated in the hydrogel were tested for their healing potential. This allowed studying how the encapsulated cells behave and interact with the wound healing environment, providing valuable information about the therapeutic potential of the hydrogel in tissue regeneration using animal models. The groups cultivated from DFU-derived cells showed reduced cell motility during the wound repair process Maione et al. (2015).

The hydrogel used alginate with a high content of G blocks, with mannuronic-guluronic acid (MVG) ratio of M:G = 40:60,

with a molecular weight of approximately 250 kDa. The gels contained a concentration of 2% alginate, with a high molecular weight to low molecular weight ratio of 25:75. These gels were ionically crosslinked with a 1.22 M calcium sulfate solution as the cell culture environment. To analyze the crosstalk between fibroblasts and keratinocytes in the 3D environment, human skin equivalents (HSEs) were constructed in triplicate wells at a final concentration of  $3 \times 10^5$  cells/mL. They were submerged for one week in an epidermal collagen growth medium containing 3.8 g/L glucose and 0.3% serum Maione et al. (2015).

To evaluate the hyperproliferative characteristic of keratinocytes in DFUs in the 3D model, tissues from diabetic wounds and non-ulcerated skin were included in collagen matrices of the dermal compartment of the HSE. A biopsy was performed in the center of the tissue to create a wound. The base of the injured tissue was the same for the experimental and control groups, constructed from fibroblasts and keratinocytes derived from a healthy foreskin. In the structures tested with DFU-derived fibroblasts, basal keratinocytes in the HSE showed 44-47% higher proliferation rates, consistent with findings in the literature. Regarding wound closure, gels filled with DFU-derived cells achieved an average re-epithelialization rate of 36% Maione et al. (2015).

Regarding angiogenesis, cells derived from DFUs showed reduced endothelial cell sprouting compared to the control group, with lower secretion of IL-6, IL-8, and SDF-1. The authors suggest that the model they developed, incorporating endothelial cells in gels, can be used to study the crosstalk relationship between endothelium and fibroblasts. This results in more precise studies on the influence of angiogenesis disorders Maione et al. (2015).

Analysis of ECM disorders in 3D models is vital for understanding wound healing. The production of ECM fibroblasts plays an essential role, serving as a support for keratinocyte migration. The hydrogel used in this study comprises hydrophilic polymers that provide a three-dimensional environment for cell proliferation and interaction. The outcomes presented in both studies for this review demonstrated the potential application of hydrogels for structuring the tissue layers of chronic wounds Maione et al. (2015); Ozdogan et al. (2020). In the following section, we will discuss the evidence of these applications in microfluidics studies, bringing future perspectives for application in the context of DFUs.

### 3.2. Quality and Risk of Bias in Individual Studies

When analyzed using adapted questions from the ROB Generic tool, the 3D cell culture trials had some limitations. Although the selection criteria for the tissues used in the assays were well described ( $n = 2$ ), crucial methodological information such as group randomization ( $n = 2$ ), blinding of outcome assessors ( $n = 2$ ), information about the loss to follow-up between groups ( $n = 2$ ), standardized data collection ( $n = 2$ ), and control of confounding factors ( $n = 2$ ) were not described in the studies. Only one study (Ozdogan et al. (2020)) presented criteria for a low risk of bias in an overall analysis. However, we should consider that the characteristics analyzed in the bias

risk do not compromise the obtained results, and the collected information can be used to contribute to this review (Fig. 3).

## 4. Discussion

### 4.1. Advances in Organ-on-a-chip Vascularization

Our systematic review aimed to investigate advances related to 3D cell culture in the context of DFUs, focusing on the advancements and prospects of OoC platforms. Only two studies met the inclusion criteria and were selected for the review. However, these studies did not present fully elucidated models for DFUs in OoCs. Still, they utilized 3D cell culture platforms with approaches involving hydrogels for structuring the epithelial tissue and dermis. Although the 3D *in vitro* model has characteristics like the *in vivo* skin, it is still limited regarding cellular and molecular interactions in the natural skin environment. Future perspectives for applying these findings in microfluidics will be discussed further based on current evidence in other pathological scenarios.

Understanding the underlying mechanisms of the onset and healing difficulties of DFUs is of utmost importance. According to the most recent scientific evidence, contributing factors to the severity of DFUs are associated with neuropathy, ischemia, infection, increased plantar pressure, prolonged cellular hyperglycemia, inflammation, and alterations in the extra-cellular matrix (Deng et al. (2023)). Vascular damage associated with DFUs affects approximately 50% of patients, and its onset is linked to peripheral arterial disease (PAD). In these cases, the most common form of PAD is atherosclerosis, which leads to vascular endothelial damage associated with arterial endothelial injury, vascular smooth muscle dysfunction, increased blood coagulation, platelet alterations, and inflammation (Deng et al. (2023)).

The current advancements and constraints of 3D cell culture techniques in the context of DFUs are revealed by the findings of this review. While not employing OoC methodologies explicitly, the employed platforms facilitated the development of intricate structures like the dermis and epidermis. The portrayal of DFUs in preclinical investigations remains considerably restricted, primarily because of the complex and dynamic nature of human skin (Maione et al. (2015); Ozdogan et al. (2020)).

### 4.2. Organs-on-a-chip

The realm of biomedical research has undergone a groundbreaking revolution with the emergence of OoC technology. This innovative approach provides a potent instrument for exploring human physiology and diseases with unparalleled precision and efficacy, transcending the constraints of traditional *in vitro* models and animal experimentation (Leung (2022)). The origins of the OoC concept can be traced back to the early 2000s when visionary scientists embarked on its development. The term “organ-on-a-chip” was officially coined in 2010 by the pioneering group at the Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, Harvard University. However, the seeds of this remarkable innovation were planted even earlier, during the late 1990s and early 2000s, through seminal works that paved the

path for the creation of the initial OoC devices. Since then, this unique technology has continuously evolved, gaining escalating prominence in the domain of biomedical research (Huh et al. (2013); Bhise et al. (2014); Huh (2015)).

Microfluidic models can contribute to understanding how microvascular networks respond to biochemical and mechanical stimuli. The endothelium is one of the most critical components in macro and micro scales that reproduce the physiology of the vascular system. It selectively acts as a permeable barrier between circulating blood and adjacent tissues. It plays a role in thrombogenic barrier function and vessel stabilization and formation (Haase and Kamm (2017)). *In vitro* analysis using microfluidic platforms of vascular behavior in diseases such as DM can provide a better understanding of signaling and response mechanisms (Kato et al. (2015)).

The 3D skin model can address heterotypic communication between keratinocytes and fibroblasts, as well as study the functions of fibroblasts in extracellular matrix deposition, assembly, and remodeling. There are two main types of 3D skin models: scaffold-free self-assembled skin (SASS) and scaffold-based human skin equivalent (HSE). SASS models are developed through fibroblast self-organization in synthesizing their extracellular matrix, followed by the culture of keratinocytes on the reconstructed dermal layer. HSE models are constructed with a dermal matrix, which can be composed of various materials such as collagen, fibrin, and synthetic materials, with dermal fibroblasts and keratinocytes cultured on the surface. Both SASS and HSE models have been used in drug screening studies and models of skin pathologies. Additionally, commercial 3D skin models have gained popularity for cosmetic and therapeutic testing. The knowledge and techniques acquired in developing these three-dimensional models can potentially be applied in the context of diabetic foot ulcers (Shou Jin Phang (2021)).

Microfluidic assays are focused on examining basic angiogenic steps, such as basement membrane degradation with vascular sprout formation, endothelial cell migration, and maturation. These processes are studied through growing monolayers of native endothelial cells (ECs) coated with extracellular matrix proteins and, recently, cultured between polydimethylsiloxane (PDMS) channels (Haase and Kamm (2017)). However, they have limited precision because they depend on cellular sources that are not always primary or able to represent pathological changes. These approaches commonly use exogenous factors to stimulate and create a diseased environment without considering phenotypic differences (Mathur et al. (2019)). Another challenge associated with using these devices is system handling. The chip requires external pumps for cell culture media feeding, which requires researchers with know-how to properly configure and install pumps, control units, or other necessary connections (Kato et al. (2015)).

In the field of translational research, there is still a path to be followed for these devices to become more accessible in research laboratories, companies, and the pharmaceutical industry (Ko et al. (2022); Caplin et al. (2015); Wu et al. (2020)). Once the OoC is validated in terms of its physiological aspects, its validation should include microfabrication and 3D printing



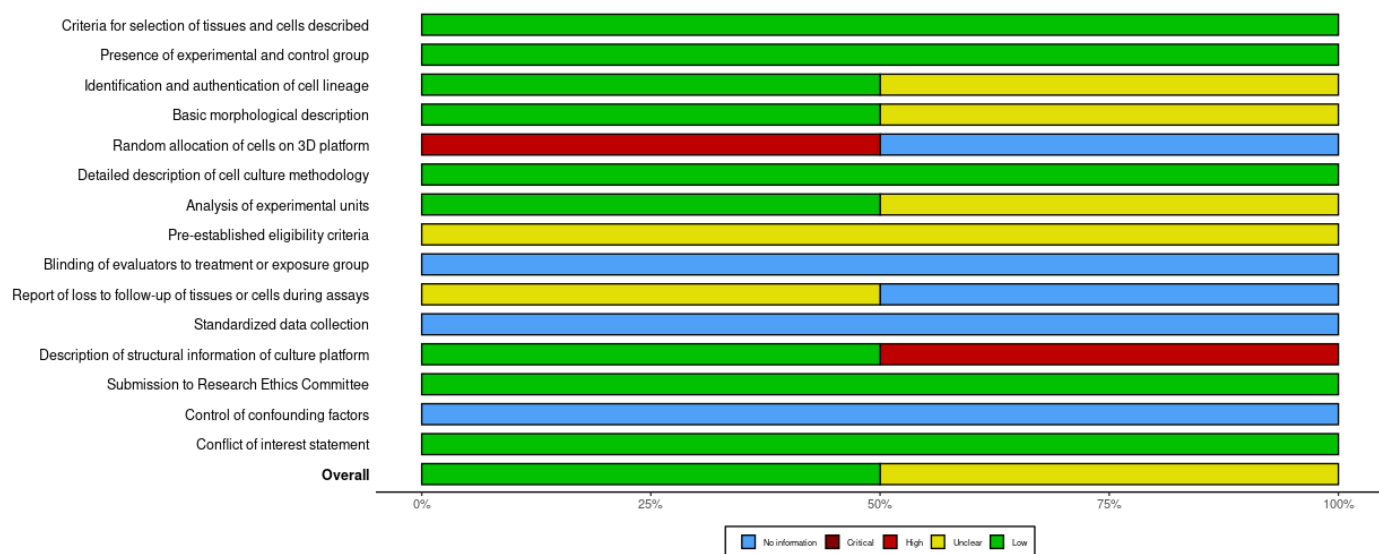


Figure 3: Overall quality of the selected studies. "LOW" - Low risk of bias. "NO INFORMATION" - Insufficient information to assess the risk of bias. "CRITICAL" - High risk of bias, with significant limitations. "HIGH" - High risk of bias, with substantial limitations. "UNCLEAR" - Insufficient available information. A detailed description of the evaluated parameters is found in Supplementary material.

Source: Authors

techniques for precise and controlled structure; cells and biomaterials that allow organ or tissue reproduction; expansion of specific metabolic function analyses - including more quantitative data; simulations of disease conditions within the OoC scenario; as well as comparison with existing traditional models - to assess the relevance and accuracy of the device compared to conventional methods Ko et al. (2022); Khalid et al. (2017); Ma et al. (2021). In Figure 4, it is possible to perceive the main limitations related to the organ-on-a-chip platform and its incorporation in translational health research.

#### 4.3. Specificities of 3D cell culture in Diabetic Foot Ulcers

The current emphasis has been on constructing a three-dimensional rendition of DFUs. Researchers have successfully fabricated a three-dimensional model of a diabetic wound, employing fibroblasts and keratinocytes obtained from individuals diagnosed with type 2 diabetes. Through culturing the model in a medium supplemented with glucose, it faithfully reproduces the hyperglycemic microenvironment specific to DFUs. However, the lack of a normoglycemic model hampers the evaluation of treatment efficacy through comparison. While the process of dermal vascularization remained unobservable, employing a denser hydrogel with enhanced medium perfusion could potentially improve visual clarity Ozdogan et al. (2020).

The heterogeneity of fibroblasts and the microenvironmental niche within the dermis also play crucial roles in wound healing. Fibroblasts derived from the papillary dermis show better healing capacity than those derived from the reticular dermis, while fibroblasts from palmoplantar regions show reduced capacity. Additionally, the cell origin and local microenvironment influence the response to wound healing Maione et al. (2015).

Primary cells retain a "metabolic memory" of the DFU microenvironment even after expansion in culture, high-

lighting the importance of incorporating cells derived from DFUs in three-dimensional models of hyperglycemic wounds. Researchers have successfully developed biomimetic three-dimensional models of DFUs using fibroblasts derived from DFU patients and normal human keratinocytes Maione et al. (2015). However, the use of collagen from animal extracellular matrix introduces variability. To address this issue, Smith et al. (2021) established a self-organized skin substitute HSE model that supports the production of the human extracellular matrix. By incorporating fibroblasts derived from DFUs, human keratinocytes, and monocytes, the SASS model offers greater consistency and scalability for screening. Incorporating monocytes derived from diabetic patients resulted in a pro-inflammatory condition, mimicking the M1 macrophage phenotype observed in DFUs. These advances provide a better resemblance to DFUs and offer potential endpoints for therapy development. The limited availability of biopsy samples and the potentially little growth of DFU cells pose a challenge to overcome Maione et al. (2015); Smith et al. (2021).

Regarding the commercialization of in vitro 3D skin models, products like EpiSkin<sup>TM</sup>, T-Skin<sup>TM</sup> (L'Oréal, Paris, France), Epiderm<sup>TM</sup>, and EpiDermFT<sup>TM</sup> (MatTek, Ashland, MA, USA) have been used as full-thickness or epidermal models for drug administration analysis, sensitization, and wound healing. However, they still fall short of faithfully reproducing the physiological characteristics of human skin. One of the main shortcomings of these skin models is that they do not recapitulate the active transport of molecules such as nutrients, growth factors, and specific cell interactions Maione et al. (2015); Shou Jin Phang (2021).

Numerous methodologies exist for fabricating three-dimensional (3D) skin models in a laboratory setting, encompassing hydrogels as supportive structures for the dermis while

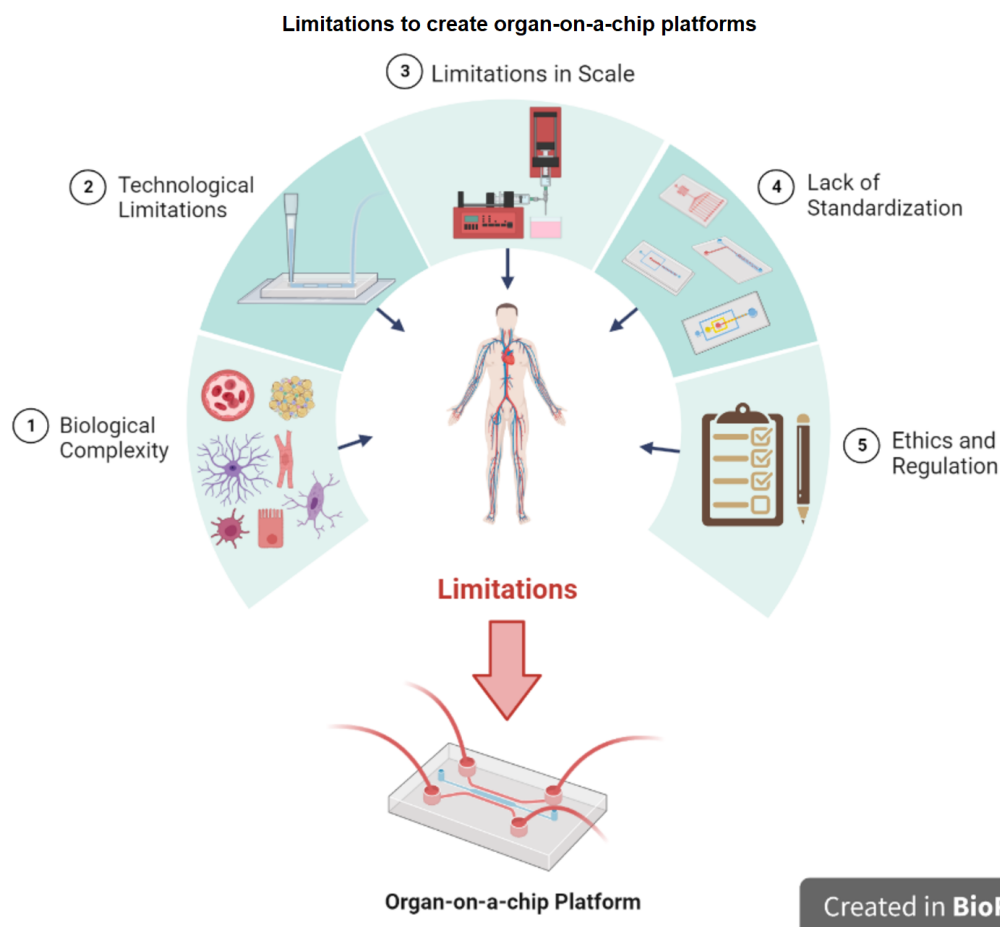


Figure 4: Limitations to create organ-on-a-chip platforms: (1) Biological complexity: Difficulty in reproducing cellular interactions due to the complexity that encompasses the microenvironment, metabolic activity, presence of blood vessels, and interaction with the immune system. (2) Technological limitations: The technologies used to create organ-on-a-chip platforms are still under development and have some limitations, such as the lack of miniaturization and standardization of some components, the difficulty in creating ideal culture conditions for all cells and tissues involved, and the limited detection of molecules at low concentrations. (3) Scale limitations: Mass production of *organ-on-a-chip* platforms is still complex, making these platforms expensive and limited to small-scale studies. Their use for large-scale drug testing still needs to be improved. (4) Lack of standardization: The lack of standardization in fabricating and using *organ-on-a-chip* platforms hinders the comparison and replication of results among different studies and institutions. (5) Ethics and regulation: Ethical and regulatory issues are involved in the use of these platforms, such as the use of human and animal tissues, the lack of specific regulation for this type of technology, and the need to ensure the safety and efficacy of drugs tested on humans.

Source: Authors. Based on: [National Centre for the Replacement and of Animals in Research \(NC3Rs\)](#).

culturing keratinocytes atop them. Nevertheless, these models cannot faithfully replicate the intricate molecular transport and migration of cells observed *in vivo*, primarily due to the lack of a functional capillary network system [Shou Jin Phang \(2021\)](#). Additionally, these models predominantly employ normoglycemic cells, and there is a scarcity of available models utilizing primary cells derived from patients with type 2 diabetes. Hydrogels, particularly gelatin-based ones, have gained extensive usage owing to their modifiable characteristics, permeability, and biocompatibility. However, despite significant progress, there remain inherent constraints when constructing *in vitro* 3D skin models that truly recapitulate the physiology of human skin. Another impediment pertains to the inability to fabricate *in vitro* 3D skin models with a thickness exceeding 100-2000  $\mu\text{m}$  [Maione et al. \(2015\)](#); [Ozdogan et al. \(2020\)](#).

#### 4.4. Diabetic Foot Ulcers with Hydrogel-Based Microfluidics

Hydrogels can be designed to mimic the extracellular matrix, providing structural support for cultured cells and allowing for the diffusion of essential nutrients and molecular signals. Furthermore, its ability to alter its stiffness and mechanical properties enables the replication of different tissues, such as muscles, bones, and blood vessels. Incorporating human cells into hydrogel provides a realistic three-dimensional environment, allowing cell interaction and observation of physiological responses closer to real ones [Maione et al. \(2015\)](#); [Ozdogan et al. \(2020\)](#).

Hydrogel is highly hydrated and can provide a three-dimensional matrix that resembles the physical properties of the skin's natural extracellular matrix (ECM), which can be essential for cell proliferation and differentiation. Additionally, hydrogels can be designed to be biodegradable, allowing for a controlled release of therapeutic compounds or growth fac-

tors, which can help treat dermatological conditions, including diabetic skin. Hydrogels can absorb over 90% of water into their 3D network. The water absorption capacity influences the mechanical properties of a hydrogel, such as compressibility and elasticity, its degradation rate, and its cellular behavior on it. The degree of swelling of hydrogels varies with the type of polymer, degree of methacrylation, and proportion of components. The low swelling rate of the hydrogel contributes to the preservation of structural integrity. The porosity of a hydrogel is essential in terms of its interaction with surrounding cells. It can also affect the diffusion of oxygen and nutrients, cell migration, and proliferation [Ozdogan et al. \(2020\)](#); [Maione et al. \(2015\)](#); [Carvalho et al. \(2021\)](#).

In the study by [Nie et al. \(2018\)](#), researchers developed a blood vessel system on a chip using hydrogels as scaffolds for forming channels representing blood vessels. These channels were lined with endothelial cells to mimic the inner layer of blood vessels. Microfluidics was included to control the flow of liquids and nutrients within the channels, creating a dynamic environment that simulates blood flow. Furthermore, the hydrogel-based microfluidic system allowed for the analysis of endothelial cell behavior, including their barrier function, response to inflammatory stimuli, and interaction with blood cells.

This microfluidic-based hydrogel approach has the potential to be a valuable tool for biomedical research and regenerative medicine. The ability to study blood vessels in a controlled and realistic environment provides essential insights into vascular diseases and enables the development of more effective and personalized therapies. In addition to demonstrating good interconnection between the channels, a uniform endothelialized channel with the lumen and histological architecture of a blood vessel was observed in microscopic images. Cell culture maintained a high survival rate and good spreading morphology, which brings some solutions to applying structured endothelialized channels in OoC devices [Nie et al. \(2018\)](#).

Although it appeared in the previous bibliometric review ([Figure 1](#)) and was not explored in the articles included in this review, temperature is an extremely important variable for cell culture. Precise temperature control is essential to reproduce the optimal conditions for cell cultivation and to maintain the viability and functionality of tissues in an in vitro environment [Bäcker et al. \(2012\)](#). The study conducted by [Bäcker et al. \(2012\)](#) aimed to demonstrate the fabrication and characterization of a microfluidic microchip, highlighting its capabilities in fluid flow control. They presented a design that incorporated microvalves controlled by thin hydrogel films, sensitive to temperature and pH changes, enabling dynamic control of fluid flow patterns. The integration of hydrogel-sensitive microvalves can provide increased functionality and versatility in microfluidic devices, opening new possibilities for advanced fluid manipulation and analysis.

## 5. Conclusion

Biomedical and translational research in health is progressing towards discoveries in preclinical and clinical experimental

through potential new approaches such as OoC devices. Recapturing in a more accurate, ethical, and clinically predictable manner are inherent aspects of the development of microfluidic studies.

DM is a pathology with a high rate of morbidity and mortality that is increasingly prevalent in the population, making it necessary to ensure the long-term quality of life and expectations in global healthcare systems. There are few studies involving DFUs or scientific evidence regarding prognosis based on the application of wound healing and tissue repair treatments. Through 3D cell culture, possibilities for experimentation in micro-controlled environments expand, with specificity allowing for physiological behavior like that in humans.

This systematic review addressed current techniques for replicating models of diabetic wounds involving hydrogel for the structuring of the epidermis and dermis, with cultures derived from samples of diabetic individuals and biopsied tissues from ulcers. It was possible to conclude that both studies reproduced the expected physiology of the diabetic wound, showing a decrease in the healing rate and alterations in the underlying cellular mechanisms due to prolonged exposure to a hyperglycemic environment.

The main challenges to be overcome, from the perspective of a more efficient model, would be:

1. **Acquire more samples/tissues:** obtain tissue from ulcer biopsies or surgical procedures such as debridement. Although they do not offer the possibility of tracking the patient and analyzing follow-up data in the future, they can reduce the limitations related to the number of cells for culture procedures;
2. **Chip and channel design:** need to allow the integration of other tools or technologies that will enable structuring of the dermis and epidermis physiologically, taking advantage of microfluidics to enhance the scenario;
3. **Biomaterials:** we have seen that hydrogel channels allow better integration of vascular tissue. Therefore, more studies are needed on 3D printing for more accurate prints, with microchannels that are permeable to the exchange of substances without absorption or adsorption of molecules, which can impact the final results; and
4. **Association with other techniques for analysis of results:** the results are currently very focused on quantitative analysis and classical cellular assays. Clearly there is room for the advancement of omics sciences such as metabolomics and proteomics for assessment of the effects under study. In addition, the omics are expensive, and the equipment requires qualified researchers.

Analyzing the process of angiogenesis still needs to be improved by all the factors mentioned above. Therefore, this systematic review did not obtain evidence of structured vascular models for the DFU scenario. More studies need to be carried out to allow the observation of the histoarchitecture of vascularized tissue and the physiological behavior similar to the pathology, which can be leveraged for numerous pharmacological and prognostic studies.

### 5.1. Future Perspectives

Angiogenesis was identified through biomarkers, but the structure where the 3D cell culture was performed did not allow for the visualization of a blood vessel structure. Therefore, as future perspectives, the integration of multiple 3D mediums, the improvement of bio-printing techniques, and the discovery of new materials involving interdisciplinary approaches between tissue engineering and biotechnology. These advancements can provide histoarchitecture and physiological behavior as in DFUs, contributing to future pharmacological assays and personalized medicine prognosis.

## 6. Limitations

The primary limitations encountered in this study are as follows:

1. Variability in the nomenclature of 3D cell culture, which initially made it difficult to differentiate between structures that were devices with microfluidics or provided three-dimensional culture structures;
2. Limited availability of studies related explicitly to diabetic foot ulcers (DFUs) due to the challenges in obtaining tissue samples from these patients;
3. Low number of studies on the topic, which impacted qualitative and quantitative analyses of the review;
4. Presentation of results focused on qualitative data, where some findings may be influenced by the evaluator involved in the study; and
5. Non-utilization of other biomaterials or structures associated with microfluidic devices could have enhanced the results obtained.

## Credit authorship contribution statement

**Suélia Rosa:** Conceptualization, Methodology, Data Curation, Writing - Review & Editing, Supervision and Project administration **Ana Silva:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data Curation, and Writing - Original Draft. **Gustavo Nunes:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data Curation, and Writing - Original Draft. **Rafael Faria:** Methodology, Data Curation, and Writing - Review & Editing. **Lindemberg Costa:** Methodology, Data Curation, and Writing - Review & Editing. **Klérison Santos:** Methodology and Data Curation. **Rafael Souza:** Methodology, Data Curation, and Writing - Review & Editing. **Marcos Fonseca:** Methodology, Data Curation, and Writing - Review & Editing. **Sheila Fortes:** Writing - Review & Editing. **Amanda Lima:** Writing - Review & Editing. **Isolda Monteiro:** Writing - Review & Editing. **Pedro Almeida:** Methodology and Writing - Review & Editing. **Ana Figueira:** Writing - Review & Editing. **Harrison Santana:** Writing - Review & Editing. **Marcella Carneiro:** Writing - Review & Editing. **Glécia Luz:** Writing - Review & Editing. **Graziella Joanitti:** Writing - Review & Editing. **José Rocha:** Writing - Review & Editing. **Mário Rosa:** Methodology and Writing - Review & Editing. **Paulo França:** Writing -

Review & Editing. **Ícaro Santos:** Writing - Review & Editing. **Emanuel Carrilho:** Writing - Review & Editing. **Maria Alice Martins:** Writing - Review & Editing.

All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding statement

The study was financially supported by Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF).

Supported The University of Brasília (UnB) under the Biomedical Engineering, Mechatronic Systems, Nanoscience and Nanobiotechnology, Health Sciences and Technology, and Medical Sciences Postgraduate Programs; Federal Institute of Education, Science and Technology of Triângulo Mineiro; Federal Institute of Education, Science and Technology of Rondônia, University of São Paulo; National Center for Research in Energy and Materials; State University of Campinas; Federal University of Ceara and in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel in Brazil (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and the Foundation for Research Support of the Federal District (FAP-DF).

The funder and supporters did not influence the study design, data collection and analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

## Declaration of competing interest

The authors declare that the research was conducted without any commercial or financial relationships that could be construed as potential conflicts of interest.

## Data availability

The datasets used and/or analyzed in the current study are available in the **Supplementary Material** or upon request from the corresponding author. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the support from the Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) through the Public Call No. 04/2022 - Bio Health Learning of the FAPDF Learning Program (12/2022), Brasília, Distrito Federal, Brazil. We also thank Erika Kokay - Federal Deputy for the Distrito Federal - Brazil.

## References

- Aziz, A.U.R., Geng, C., Fu, M., Yu, X., Qin, K., Liu, B., 2017. The role of microfluidics for organ on chip simulations. *Bioengineering* 4, 39.
- Bäcker, M., Raue, M., Schusser, S., Jeitner, C., Breuer, L., Wagner, P., Poghosian, A., Förster, A., Mang, T., Schöning, M.J., 2012. Microfluidic chip with integrated microvalves based on temperature- and ph-responsive hydrogel thin films. *physica status solidi (a)* 209, 839–845.
- Bersini, S., Moretti, M., 2015. 3d functional and perfusable microvascular networks for organotypic microfluidic models. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 26, 1–11.



- 875 Bhise, N.S., Ribas, J., Manoharan, V. nad Zhang, Y.S., Polini, A., Massa, S., Dokmeci, M.R., Khademhosseini, A., 2014. Organ-on-a-chip platforms for studying drug delivery systems. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 190, 82–93.
- Burgess, J.L., Wyant, W.A., Abdo Abujamra, B., Kirsner, R.S., Jozic, I., 2021.<sup>950</sup> Diabetic wound-healing science. *Medicina* 57, 1072.
- 880 Caplin, J.D., Granados, N.G., James, M.R., Montazami, R., Hashemi, N., 2015. Microfluidic organ-on-a-chip technology for advancement of drug development and toxicology. *Advanced Healthcare Materials* 4, 1426–1450.
- Carvalho, V., Gonçalves, I., Lage, T., Rodrigues, R.O., Minas, G., Teixeira,<sup>955</sup> S.F.C.F., Moita, A.S., Hori, T., Kaji, H., Lima, R.A., 2021. 3d printing techniques and their applications to organ-on-a-chip platforms: A systematic review. *Sensors* 21.
- Chouhan, D., Dey, N., Bhardwaj, N., Mandal, B.B., 2019. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status<sup>960</sup> and advances. *Biomaterials* 216, 119267.
- 890 Cole, J.B., Florez, J.C., 2020. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. *Nature reviews nephrology* 16, 377–390.
- Deng, H., Li, B., Shen, Q., Zhang, C., Kuang, L., Chen, R., Wang, S., Ma, Z., Li, G., 2023. Mechanisms of diabetic foot ulceration: A review. *Journal of*<sup>965</sup> *Diabetes* .
- 895 Dupuy, A., Hagimola, L., Mgaith, N.S., Houlahan, C.B., Preketes-Tardiani, R.E., Coleman, P.R., Passam, F.H., 2021. Thromboinflammation model-on-a-chip by whole blood microfluidics on fixed human endothelium. *Diagnostics* 11, 203.
- 900 Eldridge, S., Campbell, M., Campbell, M., Drahota-Towns, A., Giraudeau, B., Higgins, J., Reeves, B., Siegfried, N., 2016. Revised cochrane risk of bias tool for randomized trials (rob 2.0): additional considerations for cluster-randomized trials .
- Elmagarmid, A., Fedorowicz, Z., Hammady, H., Ilyas, I., Khabsa, M., Ouz-<sup>975</sup> zani, M., 2014. Rayyan: a systematic reviews web app for exploring and filtering searches for eligible studies for cochrane reviews, in: *Evidence-Informed Public Health: Opportunities and Challenges. Abstracts of the 22nd Cochrane Colloquium*, John Wiley & Sons Hyderabad, India, India. pp. 21–26.
- 980 Groff, K., Evans, S.J., Doak, S.H., Pfuhrer, S., Corvi, R., Saunders, S., Stoddart, G., 2021. In vitro and integrated in vivo strategies to reduce animal use in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 36, 389–400.
- Haase, K., Kamm, R.D., 2017. Advances in on-chip vascularization. *Regenerative medicine* 12, 285–302.
- 985 Huh, D., Hamilton, G.A., Ingber, D.E., 2011. From 3d cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology* 21, 745–754.
- Huh, D., Kim, H., Fraser, J.e.a., 2013. Microfabrication of human organs-on-chips. *nature protocols* 8, 2135–2157.
- Huh, D.D., 2015. A human breathing lung-on-a-chip. *Annals of the American*<sup>990</sup> *Thoracic Society* 12, S42–S44.
- 920 Kato, Y., Hirai, Y., Kamei, K., Tsuchiya, T., Tabata, O., 2015. Microfluidic device to interconnect multiple organs via fluidic circulation: towards body-on-a-chip, in: *2015 Transducers-2015 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)*,<sup>995</sup> IEEE. pp. 1549–1552.
- 925 Khalid, N., Kobayashi, I., Nakajima, M., 2017. Recent lab-on-chip developments for novel drug discovery. *Wiley Interdisciplinary Reviews* 9.
- Ko, J., Park, D., Lee, S., Gumuscu, B., Jeon, N.L., 2022. Engineering organ-on-a-chip to accelerate translational research. *Micromachines* 13.
- 1000 Leung, C.M.e.a., 2022. A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers* 2.
- Loots, M.A., Kenter, S.B., Au, F.L., Van Galen, W., Middelkoop, E., Bos, J.D., Mekkes, J.R., 2002. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with egf, igf-i, bfgf and pdgf-ab compared<sup>005</sup> to controls. *European journal of cell biology* 81, 153–160.
- 935 Loots, M.A., Lamme, E.N., Zeegelaa, J., Mekkes, J.R., Bos, J.D., Middelkoop, E., 1998. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *Journal of Investigative Dermatology* 111, 850–857.
- 940 Ma, C., Peng, Y., Li, H., Chen, W., 2021. Organ-on-a-chip: A new paradigm for drug development. *Trends in pharmacological sciences* 42, 119–133.
- Maione, A.G., Brudno, Y., Stojadinovic, O., Park, L.K., Smith, A., Tellechea, A., Leal, E.C., Kearney, C.J., Veves, A., Tomic-Canic, M., et al., 2015. Three-dimensional human tissue models that incorporate diabetic foot ulcer-derived fibroblasts mimic in vivo features of chronic wounds. *Tissue Engi-*  
*neering Part C: Methods* 21, 499–508.
- Mathur, T., Singh, K.A., Pandian, N.K., Tsai, S.H., Hein, T.W., Gaharwar, A.K., Flanagan, J.M., Jain, A., 2019. Organ-on-chips made of blood: endothelial progenitor cells from blood reconstitute vascular thromboinflammation in vessel-chips. *Lab on a Chip* 19, 2500–2511.
- McGuinness, L.A., Higgins, J.P., 2021. Risk-of-bias visualization (robvis): an r package and shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments. *Research synthesis methods* 12, 55–61.
- Methley, A.M., Campbell, S., Chew-Graham, C., McNally, R., Cheraghi-Sohi, S., 2014. Pico, picos and spider: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews. *BMC health services research* 14, 1–10.
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D.G., Group, P., et al., 2010. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the prisma statement. *International journal of surgery* 8, 336–341.
- Nie, J., Gao, Q., Wang, Y., Zeng, J., Zhao, H., Sun, Y., Shen, J., Ramezani, H., Fu, Z., Liu, Z., Xiang, M., Fu, J., Zhao, P., Chen, W., He, Y., 2018. Vessel-on-a-chip with hydrogel-based microfluidics. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 14.
- Ozdogan, C.Y., Kenar, H., Davun, K.E., Yucel, D., Doger, E., Alagoz, S., 2020. An in vitro 3d diabetic human skin model from diabetic primary cells. *Biomedical Materials* 16, 015027.
- Page, M., McKenzie, J., Bossuyt, P., Boutron, I., Hoffmann, T., Mulrow, C., 2021. & moher, d.(2021). the prisma 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *systematic reviews*, 10 (1), 1-11.
- Page, M.J., Moher, D., McKenzie, J.E., 2022. Introduction to prisma 2020 and implications for research synthesis methodologists. *Research synthesis methods* 13, 156–163.
- Pimenta, J., Ribeiro, R., Almeida, R., Costa, P.F., da Silva, M.A., Pereira, B., 2022. Organ-on-chip approaches for intestinal 3d in vitro modeling. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 13, 351–367.
- RENAMA, 2023. National network of alternative methods. URL: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html>.
- National Centre for the Replacement, R., of Animals in Research (NC3Rs), R., 2021. Nc3rs organ on a chip report and recommendations. URL: <https://www.nc3rs.org.uk/sites/default/files/2021-10/NC3Rs%20organ%20on%20a%20chip%20report%20and%20recommendations.pdf>.
- Shou Jin Phang, Bavani Arumugam, U.R.K.M.B.F.M.L.L., 2021. A review of diabetic wound models—novel insights into diabetic foot ulcer. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 15, 1051–1068.
- Smith, A., Watkins, T., Theocharidis, G., Lang, I., Leschinsky, M., Maione, A., Kashpur, O., Raimondo, T., Rahmani, S., Baskin, J., Mooney, D., Veves, A., Garlick, J., 2021. A novel three-dimensional skin disease model to assess macrophage function in diabetes. *Tissue engineering. Part C, Methods* 27, 49–58.
- Van Duinen, V., Trietsch, S.J., Joore, J., Vulto, P., Hankemeier, T., 2015. Microfluidic 3d cell culture: from tools to tissue models. *Current opinion in biotechnology* 35, 118–126.
- Van Eck, N.J., Waltman, L., 2011. Vosviewer manual. Manual for VOSviewer version 1.
- Wimmer, R.A., Leopoldi, A., Aichinger, M., Wick, N., Hantusch, B., Novatchkova, M., Taubenschmid, J., Hämmerle, M., Esk, C., Bagley, J.A., et al., 2019. Human blood vessel organoids as a model of diabetic vasculopathy. *Nature* 565, 505–510.
- Wu, Q., Liu, J., Wang, X., Feng, L., Wu, J., Zhu, X., Wen, W., Gong, X., 2020. Organ-on-a-chip: recent breakthroughs and future prospects. *Biomedical engineering online* 19, 9.
- Yunir, E., Tarigan, T.J.E., Iswati, E., Sarumpaet, A., Christabel, E.V., Widiyanti, D., Wisnu, W., Purnamasari, D., Kurniawan, F., Rosana, M., et al., 2022. Characteristics of diabetic foot ulcer patients pre-and during covid-19 pandemic: lessons learnt from a national referral hospital in indonesia. *Journal of Primary Care & Community Health* 13, 21501319221089767.

## Additional File 1 – String

("Analytical Device\*" AND "Microchip") OR ("Analytical Device\*" AND "Nanochip") OR ("Device\*" AND "Lab-On-A-Chip") OR ("Device\*" AND "Microchip Analytical") OR ("Device\*" AND "Microfluidic") OR ("Device\*" AND "Nanochip Analytical") OR ("Lab On A Chip Devices") OR ("Lab-On-A-Chip Device") OR ("Lab-On-A-Chip\*" AND "Microfluidic") OR ("Microchip Analytical Device\*") OR ("Microchip\*" AND "Microfluidic") OR ("Microfluidic Device\*") OR ("Microfluidic Lab On A Chip") OR ("Microfluidic Lab-On-A-Chip\*") OR ("Microfluidic Microchip\*") OR ("Nanochip Analytical Device\*") OR ("Analytical Device\*" AND "Microchip") OR ("Microchip Analytical Device") OR ("Analytical Device\*" AND "Nanochip") OR ("In-Check system") OR ("microfluidic chip") OR ("body on a chip") OR Microfluidics OR ("microfluidics") AND ("Agents" AND "Angiogenesis Inducing") OR ("Agents" AND "Angiogenesis Stimulating") OR ("Angiogenesis Effect\*") OR ("Angioge\* Factor") OR ("Angiogenesis Inducers") OR ("Angiogenesis Stimulating Agents") OR ("Angiogenesis Stimulators") OR ("Angiogenic Factor" AND "Tumor") OR ("Effect\*" AND "Angiogenesis") OR ("Factor" AND "Angiogen\*") OR ("Factor" AND "Tumor Angiogenic") OR ("Inducers" AND "Angiogenesis") OR ("Inducing Agents" AND "Angiogenesis") OR ("Stimulating Agents" AND "Angiogenesis") OR ("Stimulators" AND "Angiogenesis") OR ("Tumor Angiogenic Factor") OR ("angiogenesis inducing agent\*") OR ("placental angiogenesis fator") OR ("Angiogenesis Modulators") OR ("Modulators" AND "Angiogenesis") OR ("angiogenesis modulating agent\*") OR ("Angiogenesis" AND "Physiologic\*") OR ("Neovascularization" AND "Physiological") OR ("Physiologic\* Angiogenesis") OR ("Physiologic\* Neovascularization") AND ("Healing\*" AND "Wound") OR ("Wound Healing\*") OR ("granulation" AND "wound") OR ("healing" AND "wound") OR ("repair" AND "wound") OR ("wound granulation") OR ("wound regeneration") OR ("wound repair") OR Cicatrization OR (Scar\*) OR Scarring OR cicatrices OR cicatrix OR ("radiation scar") AND ("Diabetes Mellitus") OR ("Complications of Diabetes Mellitus") OR ("Diabetes Complication") OR ("Diabetes Mellitus Complication\*") OR ("Diabetes Related Complications") OR ("Diabetes-Related Complication\*") OR ("Diabetic Complication\*") OR ("Diabetes Insipidus") OR ("Diet" AND "Diabetic") OR ("Prediabetic State") OR ("Scleredema Adultorum") OR ("Glycation End Products" AND "Advanced") OR ("Glucose Intolerance") OR Gastroparesis OR diabetes OR diabetic OR ("Diabetic Feet") OR ("Feet" AND "Diabetic") OR ("Foot Ulcer" AND "Diabetic") OR ("Foot" AND "Diabetic") OR ("Diabetic foot") OR ("Foot" AND "Diabetic") OR ("Diabetic Feet") OR ("Feet" AND "Diabetic") OR ("diabetic feet") OR ("diabetic foot syndrome") OR ("diabetic foot ulcer") OR ("foot ulcer" AND "diabetic")

## Additional File 2 – Database search and results

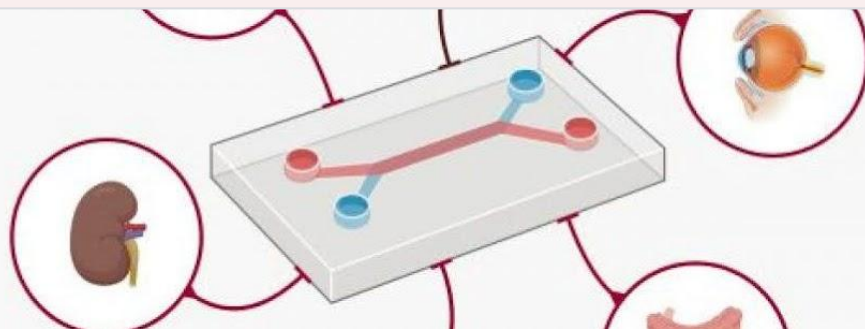
Database	Search	Quantity of Publications
<b>Scopus</b> January 24, 2023 Update: Abril 16, 2023	<pre>(( TITLE-ABS-KEY ( ("Analytical Device*" AND "Microchip") OR ("Analytical Device*" AND "Nanochip") OR ("Device*" AND "Lab-On-A-Chip") OR ("Device*" AND "Microchip Analytical") OR ("Device*" AND "Microfluidic") OR ("Device*" AND "Nanochip Analytical") OR ("Lab On A Chip Devices") OR ("Lab-On-A-Chip Device") OR ("Lab-On-A-Chip*" AND "Microfluidic") OR ("Microchip Analytical Device*") OR ("Microchip*" AND "Microfluidic") OR ("Microfluidic Device*") OR ("Microfluidic Lab On A Chip") OR ("Microfluidic Lab-On-A-Chip*") OR ("Microfluidic Microchip*") OR ("Nanochip Analytical Device*") OR ("Analytical Device*" AND "Microchip") OR ("Microchip Analytical Device") OR ("Analytical Device*" AND "Nanochip") OR ("In-Check system") OR ("microfluidic chip"))) OR ( TITLE-ABS-KEY ( ("body on a chip"))) OR ( TITLE-ABS-KEY ( microfluidics OR ("micro-fluidics")))) AND (( TITLE-ABS-KEY ( ("Agents" AND "Angiogenesis Inducing") OR ("Agents" AND "Angiogenesis Stimulating") OR ("Angiogenesis Effect*") OR ("Angioge* Factor") OR ("Angiogenesis Inducers") OR ("Angiogenesis Stimulating Agents") OR ("Angiogenesis Stimulators") OR ("Angiogenic Factor" AND "Tumor") OR ("Effect*" AND "Angiogenesis") OR ("Factor" AND "Angiogen*") OR ("Factor" AND "Tumor Angiogenic") OR ("Inducers" AND "Angiogenesis") OR ("Inducing Agents" AND "Angiogenesis") OR ("Stimulating Agents" AND "Angiogenesis") OR ("Stimulators" AND "Angiogenesis") OR ("Tumor Angiogenic Factor") OR ("angiogenesis inducing agent*") OR ("placental angiogenesis fator"))) OR ( TITLE-ABS-KEY ( ("Angiogenesis Modulators") OR ("Modulators" AND "Angiogenesis") OR ("angiogenesis modulating agent*"))) OR ( TITLE-ABS-KEY ( ("Angiogenesis" AND "Physiologic*") OR ("Neovascularization" AND "Physiological") OR ("Physiologic* Angiogenesis") OR ("Physiologic* Neovascularization")))) AND (( TITLE-ABS-KEY ( ("Healing*" AND "Wound") OR ("Wound Healing*" OR ("granulation" AND "wound") OR ("healing" AND "wound") OR ("repair" AND "wound") OR ("wound granulation") OR ("wound regeneration") OR ("wound repair")))) OR ( TITLE-ABS-KEY ( cicatrization OR (scar*) OR scarring OR cicatrices OR cicatrix OR ("radiation scar")))) AND (( TITLE-ABS-KEY ( ("Diabetes Mellitus") OR ("Complications of Diabetes Mellitus") OR ("Diabetes Complication") OR ("Diabetes Mellitus Complication*") OR ("diabetes AND related AND complications ") OR ("diabetes-related AND complication*") OR ("Diabetic Complication*") OR ("Diabetes Insipidus") OR ("Diet" AND "Diabetic") OR ("Prediabetic State") OR ("Scleredema Adultorum") OR ("Glycation End Products" AND "Advanced") OR ("Glucose Intolerance") OR gastroparesis OR diabetes OR diabetic)) OR ( TITLE-ABS-KEY ( ("Diabetic Feet") OR ("Feet" AND "Diabetic") OR ("Foot Ulcer" AND "Diabetic") OR ("Foot" AND "Diabetic") OR ("Diabetic foot") OR ("Foot" AND "Diabetic") OR ("Diabetic Feet") OR ("Feet" AND "Diabetic") OR ("diabetic feet") OR ("diabetic foot syndrome") OR ("diabetic foot ulcer") OR ("foot ulcer" AND "diabetic"))))</pre>	<b>Total: 04</b>  <b>Total after applying the filter: 04</b>
<b>Pubmed</b> January 24, 2023 Update: Abril 16, 2023	<pre>("Lab-On-A-Chip Devices"[MeSH Terms] OR "Microfluidics"[MeSH Terms]) AND ("Angiogenesis Inducing Agents"[MeSH Terms] OR "Angiogenesis Modulating Agents"[MeSH Terms] OR "neovascularization, physiologic"[MeSH Terms]) AND ("Wound Healing"[MeSH Terms] OR "Cicatrix"[MeSH Terms]) AND ("Diabetes Mellitus"[MeSH Terms] OR "Diabetic Foot"[MeSH Terms])</pre>	<b>Total: 01</b>  <b>Total after applying the filter: 01</b>
<b>Embase</b> January 24, 2023 Update: Abril 16, 2023	<pre>('lab on a chip'/exp OR 'body on a chip'/exp OR 'microfluidics'/exp OR 'microfluidics') AND ('angiogenic factor'/exp OR 'angiogenesis modulator'/exp OR 'angiogenesis'/exp OR 'angiogenesis') AND ('wound healing'/exp OR 'scar'/exp) AND ('diabetes mellitus'/exp OR 'diabetic foot'/exp)</pre>	<b>Total: 12</b>  <b>Total after applying the filter: 11</b>

<b>Web of Science</b>	AB=(("Diabetic Feet") OR ("Feet" AND "Diabetic") OR ("Foot Ulcer" AND "Diabetic") OR ("Foot" AND "Diabetic") OR ("Diabetic foot") OR ("Foot" AND "Diabetic") OR ("Diabetic Feet") OR ("Feet" AND "Diabetic") OR ("diabetic feet") OR ("diabetic foot syndrome") OR ("diabetic foot ulcer") OR ("foot ulcer" AND "diabetic") )	<b>Total: 01</b>
January 24, 2023		<b>Total after applying the filter: 01</b>
Update: April 16, 2023		

<b>IEEE Xplore</b>	("Abstract":Lab.-On-A-Chip Devices ) OR ("Abstract":Body on a chip ) OR ("Abstract":Microfluidics) AND ("Abstract":Angiogenesis Inducing Agents ) OR ("Abstract":Angiogenesis Modulating Agents ) OR ("Abstract":Neovascularization Physiologic ) AND ("Abstract":Wound Healing ) OR ("Abstract":Cicatrix ) AND ("Abstract":Diabetes Mellitus ) OR ("Abstract":Diabetic Foot)	<b>Total: 2396</b>
January 24, 2023		<b>Total after applying the filter: 1330</b>
Update: April 16, 2023		

<b>CINAHL/EBSCO</b>	((((AB ("Diabetic Feet") OR ("Feet" AND "Diabetic") OR ("Foot Ulcer" AND "Diabetic") OR ("Foot" AND "Diabetic") OR ("Diabetic foot") OR ("Foot" AND "Diabetic") OR ("Diabetic Feet") OR ("Feet" AND "Diabetic") OR ("diabetic feet") OR ("diabetic foot syndrome") OR ("diabetic foot ulcer") OR ("foot ulcer" AND "diabetic")) AND (S1 OR S2)) AND (S3 OR S4 OR S5)) AND (S6 OR S7)) AND (S8 OR S9)) AND (S10 AND S11 AND S12 AND S13 AND S14)	<b>Total: 0</b>
January 24, 2023		<b>Total after applying the filter: 0</b>
Update: April 16, 2023		

<b>Total number of articles found in the databases:</b>	<b>2413</b>
<b>Total number of articles found after applying the filters and removing duplicates:</b>	<b>1343</b>
<b>Filters used: research from the last ten years (2013-2023) and types of articles</b>	



## Phase 2 - Full-text reading: Eligibility criteria

PROSPERO Protocol Link: [https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display\\_record.php?RecordID=336473](https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?RecordID=336473)

Note: Please re-read the PROSPERO protocol and ensure you are confident about the eligibility criteria before starting the article evaluation. If you have any doubts, consult with the first author.

anakaroline.alms@gmail.com [Alternar conta](#)

 Não compartilhado



\* Indica uma pergunta obrigatória

Reviewer: \*

- Suélia Rosa
- Ana Karoline Almeida
- Gustavo Nunes
- Lindemberg Barreto

Article title \*

Sua resposta



Authors of the work \*

Sua resposta

Year of publication \*

Sua resposta

Published journal \*

Sua resposta

Próxima

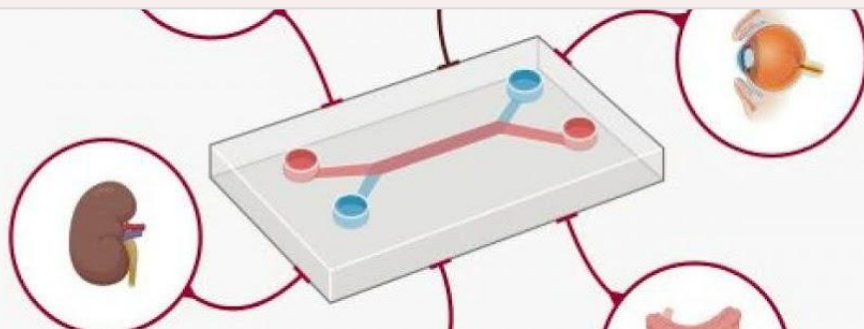
Limpar formulário

Nunca envie senhas pelo Formulários Google.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google. [Denunciar abuso](#) - [Termos de Serviço](#) - [Política de Privacidade](#)

Google Formulários





## Phase 2 - Full-text reading: Eligibility criteria

anakaroline.alms@gmail.com [Alternar conta](#)

 Não compartilhado



\* Indica uma pergunta obrigatória

Information about the article read in full:

Study design \*

- In vitro
- In vivo
- Randomized controlled trial
- In silico
- Review
- Other

Does the study use 3D platforms for in vitro studies? \*

- Yes
- No



If the previous answer was yes, what type of platform is used?

- Organoids
- Organ-on-a-chip
- Human-on-a-chip
- Lab-on-a-chip
- Other

Which tissue was used for cell culture? \*

Sua resposta \_\_\_\_\_

Does the study address systemic circulation, microcirculation, angiogenesis, or vasculogenesis? \*

- Yes
- No

Does the study address the scenario of Diabetes Mellitus? \*

- Yes
- No
- Outro: \_\_\_\_\_





Does the study address diabetic foot wounds? \*

Sim

Não

Voltar

Próxima

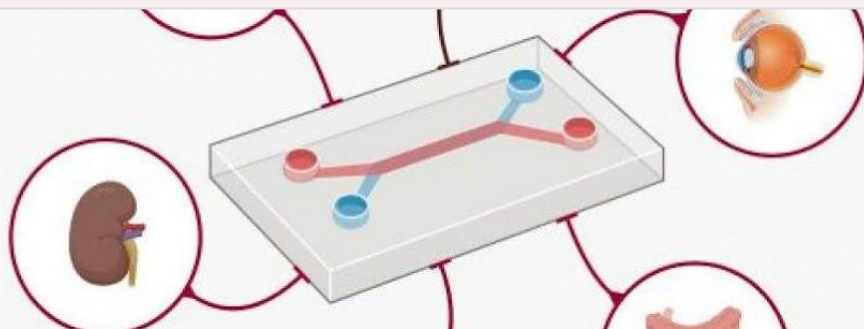
Limpar formulário

Nunca envie senhas pelo Formulários Google.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google. [Denunciar abuso](#) - [Termos de Serviço](#) - [Política de Privacidade](#)

Google Formulários





## Phase 2 - Full-text reading: Eligibility criteria

anakaroline.alms@gmail.com [Alternar conta](#)

 Não compartilhado



\* Indica uma pergunta obrigatória

### Decision on inclusion or exclusion of the study

Based on the eligibility criteria previously described in the PROSPERO protocol, do <sup>\*</sup> you decide to include or exclude this study from this systematic review?

- Include
- Exclude

If you have chosen to exclude, please provide a brief description of the reason in one sentence:

Sua resposta

[Voltar](#)

[Enviar](#)

[Limpar formulário](#)

Nunca envie senhas pelo Formulários Google.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google. [Denunciar abuso](#) - [Termos de Serviço](#) - [Política de Privacidade](#)



#### **Additional Files 4 - Excluded articles and Reasons for exclusion**

<b>Reasons for exclusion</b>	<b>Total</b>
<b>Reason 01.</b> The study does not address tissue angiogenesis focused on 3D platforms or organs-on-a-chip	12
<b>Reason 02.</b> The study is not relevant or applicable to research focused on Organs-on-a-chip devices	5
<b>Reason 03.</b> The work is related to electronic devices in general that are not connected to in vivo 3D platforms	6
<b>Reason 04.</b> The article is not linked to studies on chronic wounds or diabetic foot	5
<b>Reason 05.</b> It is a literature review	2
<b>Articles excluded after full-text reading:</b>	<b>30</b>

## **Additional Files 5 - Risk of bias of selected individual studies**

---

- D1.** Were the criteria used to select tissues and cells in the Organ-on-a-chip or 3D cell culture platform described?
- D2.** Was there an experimental group and a control group in the manufacturing process?
- D3.** Was identification and authentication of the cell line performed?
- D4.** Did the study provide a basic morphological description containing cell status and differentiation information?
- D5.** Was there any non-random allocation of tissues or cells in the Organ-on-a-chip or 3D cell culture platform?
- D6.** Are the cell layer formation procedure steps clearly described and detailed enough to allow replication?
- D7.** Did cell fixation and growth have a clearly indicated number of experimental units in each group? And is it the same number (n) that was evaluated in statistical analyses?
- D8.** Are the pre-established criteria for including or excluding experimental units described during the experiments or analyses?
- D9.** Were the evaluators of the Organ-on-a-chip assay or 3D cell culture results blinded to the treatment or exposure group?
- D10.** Was there any loss to follow-up of tissues or cells during the 3D cell culture assay? Was this loss disproportionate between treatment or exposure groups?
- D11.** Was data collection on the Organ-on-a-chip assay results standardized between treatment or exposure groups?
- D12.** Is there a detailed description of the Chip Design platform development, including construction and dimensions?
- D13.** Was submission to the Research Ethics Committee, respective to the type of cell culture, performed?
- D14.** Are there any confounding factors that could affect the relationship between exposure and the results of the 3D cell culture? If so, were they properly controlled or adjusted in the analysis of the results?
- D15.** Is there a statement about the presence or absence of conflicts of interest in the study?

## Additional Files 06 – Risk of Bias Table

Study	Criteria for selection of tissues and cells described	Presence of experimental and control group	Identification and authentication of cell lineage	Basic morphological description	Random allocation of cells on 3D platform	Detailed description of cell culture methodology	Analysis of experimental units	Pre-established eligibility criteria	Blinding of evaluators to treatment or exposure group	Report of loss to follow-up of tissues or cells during assays	Standardized data collection	Description of structural information of culture platform	Submission to Research Ethics Committee	Control of confounding factors	Conflict of interest statement	Overall
Ozdogan et al., 2020	Low	Low	Low	Low	No information	Low	Low	Unclear	No information	Unclear	No information	Low	Low	No information	Low	Low
Maione et al., 2015	Low	Low	Unclear	Unclear	High	Low	Unclear	Unclear	No information	No information	No information	High	Low	No information	Low	Unclear

**Legend:** Responses of "YES" indicated a low risk of bias, "NO" indicated a high risk of bias, "UNCLEAR" means that this information in question is not clearly available in the text, and "NO INFORMATION" indicated that bias could not be attributed.

## **CAPÍTULO IV**

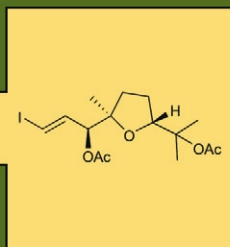
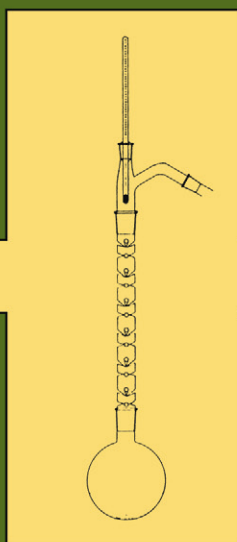
Capítulo de livro – *Bixa Orellana L.* and its implications in human health: perspectives and new trends

# Studies in Natural Products Chemistry

Atta-ur-Rahman, FRS

Editor

---



---

Volume 77

Bioactive Natural Products



ELSEVIER

# Studies in Natural Products Chemistry

Bioactive Natural Products

---

Volume 77



# Studies in Natural Products Chemistry

Edited by Atta-ur-Rahman

- Vol. 1 Stereoselective Synthesis (Part A)
- Vol. 2 Structure Elucidation (Part A)
- Vol. 3 Stereoselective Synthesis (Part B)
- Vol. 4 Stereoselective Synthesis (Part C)
- Vol. 5 Structure Elucidation (Part B)
- Vol. 6 Stereoselective Synthesis (Part D)
- Vol. 7 Structure and Chemistry (Part A)
- Vol. 8 Stereoselective Synthesis (Part E)
- Vol. 9 Structure and Chemistry (Part B)
- Vol. 10 Stereoselective Synthesis (Part F)
- Vol. 11 Stereoselective Synthesis (Part G)
- Vol. 12 Stereoselective Synthesis (Part H)
- Vol. 13 Bioactive Natural Products (Part A)
- Vol. 14 Stereoselective Synthesis (Part I)
- Vol. 15 Structure and Chemistry (Part C)
- Vol. 16 Stereoselective Synthesis (Part J)
- Vol. 17 Structure and Chemistry (Part D)
- Vol. 18 Stereoselective Synthesis (Part K)
- Vol. 19 Structure and Chemistry (Part E)
- Vol. 20 Structure and Chemistry (Part F)
- Vol. 21 Bioactive Natural Products (Part B)
- Vol. 22 Bioactive Natural Products (Part C)
- Vol. 23 Bioactive Natural Products (Part D)
- Vol. 24 Bioactive Natural Products (Part E)
- Vol. 25 Bioactive Natural Products (Part F)
- Vol. 26 Bioactive Natural Products (Part G)
- Vol. 27 Bioactive Natural Products (Part H)
- Vol. 28 Bioactive Natural Products (Part I)
- Vol. 29 Bioactive Natural Products (Part J)
- Vol. 30 Bioactive Natural Products (Part K)
- Vol. 31 Studies in Natural Products  
Chemistry: Cumulative Indices  
Vol. 1-30
- Vol. 32 Bioactive Natural Products (Part L)
- Vol. 33 Bioactive Natural Products (Part M)
- Vol. 34 Bioactive Natural Products (Part N)
- Vol. 35 Bioactive Natural Products (Part O)
- Vol. 36 Bioactive Natural Products
- Vol. 37 Bioactive Natural Products
- Vol. 38 Bioactive Natural Products
- Vol. 39 Bioactive Natural Products
- Vol. 40 Bioactive Natural Products
- Vol. 41 Bioactive Natural Products
- Vol. 42 Bioactive Natural Products
- Vol. 43 Bioactive Natural Products
- Vol. 44 Bioactive Natural Products
- Vol. 45 Bioactive Natural Products
- Vol. 46 Bioactive Natural Products
- Vol. 47 Bioactive Natural Products
- Vol. 48 Bioactive Natural Products
- Vol. 49 Bioactive Natural Products
- Vol. 50 Bioactive Natural Products
- Vol. 51 Bioactive Natural Products
- Vol. 52 Bioactive Natural Products
- Vol. 53 Bioactive Natural Products
- Vol. 54 Bioactive Natural Products
- Vol. 55 Bioactive Natural Products
- Vol. 56 Bioactive Natural Products
- Vol. 57 Bioactive Natural Products
- Vol. 58 Bioactive Natural Products
- Vol. 59 Bioactive Natural Products
- Vol. 60 Bioactive Natural Products
- Vol. 61 Bioactive Natural Products
- Vol. 62 Bioactive Natural Products
- Vol. 63 Bioactive Natural Products
- Vol. 64 Bioactive Natural Products
- Vol. 65 Bioactive Natural Products
- Vol. 66 Bioactive Natural Products
- Vol. 67 Bioactive Natural Products
- Vol. 68 Bioactive Natural Products
- Vol. 69 Bioactive Natural Products
- Vol. 70 Bioactive Natural Products
- Vol. 71 Bioactive Natural Products
- Vol. 72 Bioactive Natural Products
- Vol. 73 Bioactive Natural Products
- Vol. 74 Bioactive Natural Products
- Vol. 75 Bioactive Natural Products
- Vol. 76 Bioactive Natural Products

## Chapter 1

# *Bixa orellana* L. and its implications in human health: Perspectives and new trends

A.K.A. da Silva,<sup>1</sup> C.R. dos Santos,<sup>2</sup> M.L.B. Carneiro,<sup>2,3</sup> G.A. Joanitti,<sup>2,3,4</sup> G.V.S. Luz,<sup>2</sup> S.S.R.F. Rosa,<sup>2,5</sup> W.M. Pinheiro,<sup>3</sup> M.F.F. Rosa,<sup>2</sup> P.R.A. Abreu,<sup>1</sup> F.M.G. Fukuoka<sup>2</sup> and J.C. Tatmatsu-Rocha<sup>2,6,\*</sup>

<sup>1</sup>University Federal of Ceará, Center for Research and Technological Innovations in Human Rehabilitation – INOVAFISIO, Fortaleza, Ceará, Brazil; <sup>2</sup>University of Brasília – Faculty of Gama, Post-Graduate Program in Biomedical Engineering, Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>3</sup>University of Brasília, Post-Graduate Program in Nanoscience and Nanotechnology, Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>4</sup>University of Brasília, Post-Graduate Program in Health Sciences and Technologies, Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>5</sup>University of Brasília, Post-Graduate Program Graduation in Electronics Engineering, Brasília, Distrito Federal, Brazil; <sup>6</sup>University Federal of Ceará, Medicine School, Post-Graduate Program in Physiotherapy and Functionality, Fortaleza, Ceará, Brazil

\*Corresponding author: E-mail: [tatmatsu@gmail.com](mailto:tatmatsu@gmail.com).

## Introduction

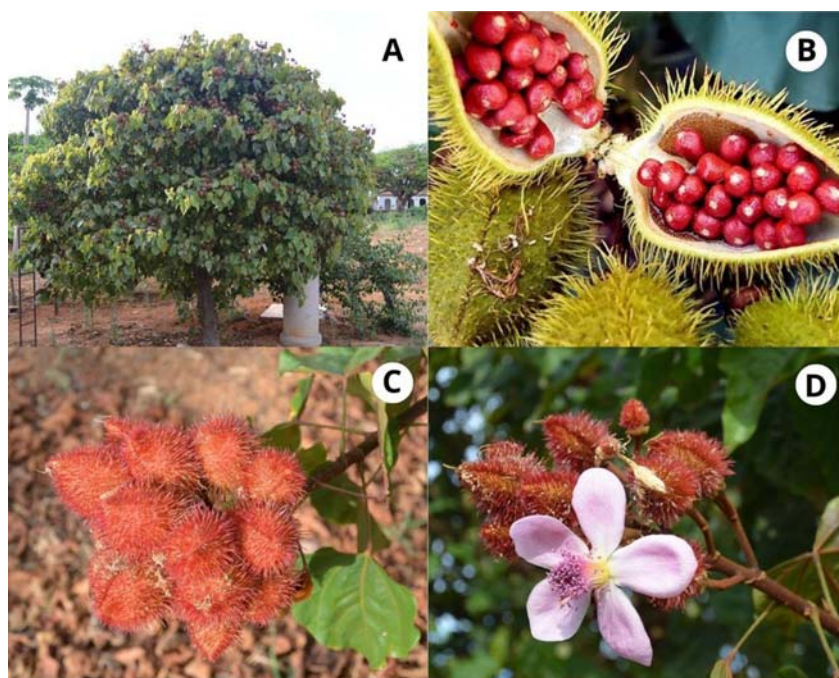
The use of compounds of animal, vegetable, or mineral origin began at the dawn of civilization. Their use in the preparation of food, cosmetics, and medicines is already mentioned in the ancient writings of the Chinese and Egyptians. With technological advances, it has been possible to expand, modulate, and specify the use of plants in some diseases [1]. Since 1978, the World Health Organization (WHO) has recognized the benefits of herbal medicines, calling them the best and most important source of medicine for humanity. There are more than 21,000 plant species used for medicinal purposes [2].

A reddish-yellow dye is obtained from the seeds by rubbing, scraping, solvent, or stimulating enzymatic processes in the seed. Its low production cost favors its use in various industries, especially in the food and pharmaceutical industries [3]. The acceptable daily intake (ADI) for pure pigment, according

to the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives estimated the ADI for annatto as 0–2.5 mg/kg body weight day<sup>-1</sup> expressed as the pure pigment. It is used not only as a substitute for various synthetic dyes in food but also in folk medicine for the treatment of diabetes, burns, fever, diarrhea, and skin infections [4].

*Bixa* is a plant native to the tropical areas of the Americas, rich in derivatives of carotenoids, terpenoids, tocotrienols, and flavonoids [5]. Native people used tea from the leaves of this plant as a remedy for headaches, heartburn, indigestion, dysentery, fever, microbial diseases, jaundice, diabetes, and hypertension [6]. The name “annatto” comes from the Tupi word “ru-ku”, which means red. It is the second-most economically important dye after saffron. The world market price ranges from US\$ 5.445 to US\$ 11.605 per kg of seed, the world market for carotenoids is estimated at US\$ 1.5 billion, and the world production of annatto is 10 million tons [7]. Latin America provides almost 60% of the world’s production of achiote, with Brazil, Mexico, and Peru being the main producing countries [8].

The *Bixa* plant has simple, glabrous foliage when mature, with an average length of 8 cm and a width of 4 cm. It is a small-growing species, reaching about 2–5 m in height, as shown in Fig. 1.1. In addition, this species has long



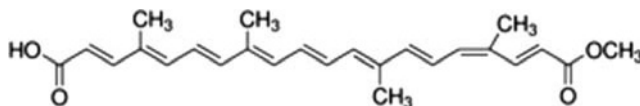
**FIGURE 1.1** Photographic record authored by *Bixa* and extract from internet: (A) urucuzeiro plant and bush, (B) annatto, (C) urucuzeiro cachopas, (D) flowering urucuzeiro. Source: *E. Multimídia, Banco de Imagens, 2013. Available from: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-midia/1062002/pe-de-urucum>. (Accessed 30 November 2021) [9].*

leaf stalks alternating with branches, hermaphrodite flowers of various colors, and fruits that are shaped like an ovoid, dehiscent capsule. It can have up to three carpels, and when young, it has flexible spines that range from three to five inches and are covered with a red, waxy ovary. The number of clusters varies. It is estimated that about 17 units of clusters can produce 40–50 seeds. The amount of seeds also varies, depending on the variety of the plant [5,10–12].

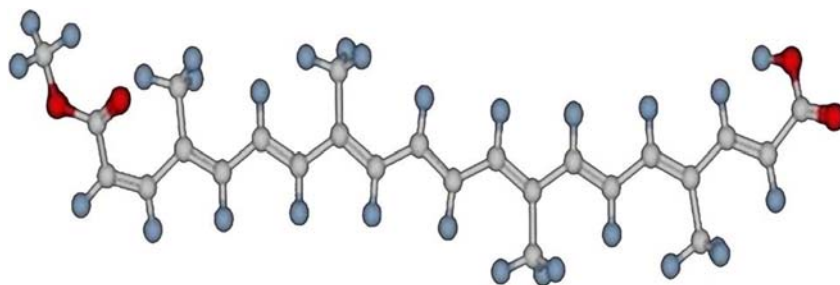
The annatto seed contains a mixture of eight dyes from the carotenoid group giving it its characteristic red color. Among these, *BixO* is considered its main pigment. However, more than 24 substances have already been isolated from the seeds of *BixO*, and more than 100 volatile compounds from the aqueous extracts of the plant. Among the substances isolated in annatto seeds, the presence of compounds such as norbixin (*NorBix*), the oily component geranylgeraniol, alpha- and beta-carotene, orelin, flavonoids, lutein, salicylic acid, phenylalanine, and tryptophan stands out. This richness of substances gives the plant a high pharmacological potential, and its therapeutic efficacy is diverse. One of the ways to determine the chemical composition of *BixO* is through spectrophotometric methods [13–15].

Carotenoids are tetraterpenoids with 40 carbon atoms linked by opposing units in the molecular center [7]. Carotenoids are classified according to the composition of carbon and hydrogen; oxycarotenoids, or xanthophylls, contain carbon, hydrogen, and oxygen (Fig. 1.2). Carotenoids are subject to chemical reactions such as cyclization, hydrogenation, dehydrogenation, migration of double bonds, and shortening or lengthening of the chain. The variety of structures of carotenoids is related to rearrangements, isomerization, the introduction of oxygen, or a combination of these processes. When carotenoids are composed of only carbon and hydrogen, they are called carotenes, and when oxidized, they are called xanthophylls. They have substitution groups with oxygen, such as hydroxyl, keto, and epoxy groups [17,18].

Bixin (*Bix*) is conventionally extracted from the annatto seeds of *BixO* using alkaline solutions or organic solvents. The traditional methods for extraction of *Bix* are sequential extraction in a fixed bed in three stages, using supercritical CO<sub>2</sub>, hydroalcoholic solutions and/or associated alkaline solutions whose solvent is organic. The main pigments of annatto are *Bix* and *NorBix*, which are mainly distributed in the outer coating of the seed itself. *Bix* is a compound whose molecular formula is (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>). *Bix* (Fig. 1.3) is fat-soluble, and *NorBix* is water-soluble, with molecular formula (C<sub>24</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>) [14]. Annatto seeds are coated with a resinous material of red color containing the



**FIGURE 1.2** Schematic representation of the bixin structure. Source: Molviewsoft University of California. molview.org\_software. Available from: <https://molview.org/> [16].



**FIGURE 1.3** Chemical structure of bixin. Source: Molviewsoft University of California. molview.org\_software. Available from: <https://molview.org/>.

carotenoid *Bix* as the main pigment and at least six other chemically similar pigments. It is also the predominant pigment in the fat-soluble preparations, followed by *NorBix* [13–15].

Currently, three methods are used to extract *Bix* from annatto: 1. alkaline extraction, 2. oil extraction, which results in the removal of *Bix* and other carotenoids, and 3. organic solvent extraction, which allows for an isomer of *Bix* whose reaction yield is more expressive [19]. Vegetable oil extraction produces more concentrated suspensions of pigments, but these may contain degradation products because the extraction is carried out at temperatures above 100°C. Other extraction methods can also be used, such as extraction with supercritical CO<sub>2</sub> [15].

According to Ref. [17], different extractions were performed to determine the percent yield at different concentrations using a high chemical affinity solvent based on ethanol. The results are shown in Table 1.1.

Several studies have demonstrated the medicinal properties of *BixO* thanks to its antiinflammatory [6,20,21], antibacterial, antifungal [22–24], antimalarial [25], antioxidant [26,27], anticancer [28,29], antidiabetic, and beneficial effects related to tissue repair [30,31]. However, there are few studies on the toxicological effects associated with the use of the plant. The medicinal properties of *BixO* are associated with the presence of carotenoids, tocotrienols, and tocopherols, bioactive molecules found in abundance in the seeds and leaves of the fruit [18,32–34]. The antiinflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities that promote tissue repair are attributed to the bioactive compounds. The toxicological effects of its use are limited, showing no genotoxicity or carcinogenesis at high concentrations, such as 1000 µg/mL [35,36]. After synthetic dyes were banned in food and cosmetics, annatto became one of the few accepted by the WHO. Natural compounds such as *Bix* are considered safe food additives and are approved by the FDA (Food and Drug Administration), a regulatory agency in the United States [37].

The healing process consists of the replacement of damaged tissue with new, repaired connective tissue [5,38]. In this sense, the physiological healing process has three distinct phases: Inflammation, proliferation, and remodeling.

**TABLE 1.1** Results of sequential extractions.

Exp.	Solvent	P (bar)	M <sub>raw</sub> material (g)	M <sub>extract</sub> (g)	M <sub>bixin</sub> (g)	% bixin	M <sub>bixin</sub> /M <sub>raw</sub> material
S1	ScCO <sub>2</sub>	400	14.9153	0.2525	0.0121	4.79	0.0062
	Ethanol			0.5002	0.0607	12.14	
	Ethanol-H <sub>2</sub> O			0.4506	0.0196	4.35	
S2	ScCO <sub>2</sub>	400	15.1358	0.2591	0.0085	3.28	0.0068
	Ethanol			0.4979	0.0714	14.34	
	Ethanol-H <sub>2</sub> O			0.4314	0.0234	5.42	
S3	ScCO <sub>2</sub>	400	15.066	0.2691	0.0113	4.20	0.0067
	Ethanol			0.4947	0.0663	13.40	
	Ethanol-H <sub>2</sub> O			0.4339	0.0242	5.58	

Source: T. Taham, F.A. Cabral, M.A.S. Barrozo, Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies, J. Supercrit. Fluids 100 (May 2015) 175–183. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844615000674> with modifications.

Initially, it consists of an inflammatory response to injury or invading pathogens. Locally, chemotactic factors are released that recruit neutrophils, monocytes, and other cells of the immune system to attack the lesion. The macrophage becomes one of the most important markers for the transition from the inflammatory phase to the proliferative phase during this particular phase. Parallel to all these steps, neovascularization occurs, i.e., the formation of new vessels that supply the newly formed tissue with blood and thus with nutrients [5,21,39].

Disturbances in neovascularization can cause wounds to become chronic, which is usually the case with diabetic foot wounds. Remodeling is referred to as the final phase of healing, where wound closure and local collagen deposition occur, which can take months to a few years. However, this collagen matrix is different from uninjured skin and consists of densely packed fibers. Fibroblasts play a critical role in collagen synthesis. Therefore, they form immature scar tissue that is later replaced by definitive tissue [30,39].

Activation of the antioxidant transcription factor (nuclear erythroid factor 2 related to factor 2) called NrF2 is directly related to the antiinflammatory effects of annatto and acts on important cellular defense mechanisms [3]. Phase II detoxification, inflammatory signaling, cellular DNA repair, an antioxidant response, and autophagic activation are coordinated by Nrf2,



suggesting an essential role in tissue repair. Its action is also demonstrated in protecting gene expression from ultraviolet (UV)-induced skin damage, representing a potential new approach to photoprotection and photochemoprevention, radiation dermatitis, and capillary aging. In the test with HaCat cells, treatment with 20  $\mu\text{M}$  *Bix* of *BixO* for 24 h promoted the protection of cells from oxidative stress. Based on this test, *Bix* activated the positive expression of the Nrf2 gene, which is one of the regulatory genes of oxidative defense in human keratinocytes [3,37,38,40].

Another therapeutic property of *BixO* is its antimicrobial activity. Through tocopherols extracted from the seeds, this plant has shown inhibitory properties on (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)-infected individuals, i.e., the methicillin-resistant bacterium *S. aureus*, significantly reducing the bacterial load of wounds in mice [41]. Not only the seeds but also other parts of the plant, such as the leaves and the skin of the seedless fruit, showed an inhibitory effect, showed growth inhibition to varying degrees for the organisms *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and *S. aureus*, by the disk test [42].

When methanol extracts from the seeds and leaves of *BixO* were compared, the leaves showed superior inhibitory activity in tests with *Staphylococcus mutans* and *Staphylococcus sanguinis* [43]. The inhibitory effect of the seed extract of *BixO* may be attributed to the presence of flavonoids, which can form extracellular complexes with soluble proteins and with the bacterial cell wall. However, polysaccharides from samples of leaves and twigs of *BixO* showed antioxidant activities in the in vitro tests. In addition to seeds, extracts of mucilaginous polysaccharides from leaves and twigs of *BixO* effectively eliminated radicals such as molybdenum, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), iron, nitrogen, and superoxide [34]. *Bix*, the most abundant carotenoid in this plant, also showed antioxidant properties and prevented the increase of superoxide anions when it was packaged in nanocapsules and tested in animal models [44]. In an in vivo test in diabetic rats, annatto extract and  $\beta$ -carotene modulated the production of reactive oxygen/nitric oxide species in neutrophil cells in animal models [45].

Overall, these studies support the validity of the therapeutic potential of *BixO* for tissue healing in terms of antioxidant, antiinflammatory, and antimicrobial effects on tissue regeneration. This research design included a systematic review that compiled relevant translational studies.

## Materials and methods

### Protocol and registration

The preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses (PRISMA) were used [46]. The protocol for this systematic review was

published in the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) [47] under registration number: CRD42021285602.

## Eligibility criteria

### *Inclusion criteria*

The inclusion criteria of this systematic review were based on the PICOS (Population, Intervention, Comparison, Outcome, and Study Design) approach [48]. The studies in which *BixO* (I) was used for tissue repair, antimicrobial, and/or antiinflammatory and/or antioxidant activities (O) types, effects extracts, and crude extract of *BixO* were compared (C), both in an in vivo model and in vitro (S).

### *Exclusion criteria*

The group studied was excluded for the following reasons: (1) lack of in vivo or in vitro studies; (2) did not evaluate the antioxidant and/or antimicrobial and/or antiinflammatory effects of *BixO*; (3) unable to provide information on wound healing; (4) abstracts, reviews, letters, personal opinions, book chapters, and conferences; (5) no copy available; (6) published more than 10 years ago (2011–21).

## Information sources and search strategy

Review Question: Does the *BixO* act as a modulator of the tissue repair process in rats? Individual search strategies were developed for the following bibliographic databases: Cochrane Library, Prospero, LILACS/BVS, Embase, MEDLINE/Pubmed, ScienceDirect, Scopus, CINAHL/EBSCO, and Web of Science. Searches were conducted in databases published in the last decade, from September 15–18 to October 2021, with no language restrictions. Duplicate references were removed using the Reference Manager software (Mendeley). Results are presented in Table S1 (in the supplementary material).

## Study selection

The selection of articles was made in two phases: Screening of titles and abstracts (phase 1) and reading of the full text (phase 2). In phase 1, two authors (Silva, A.K.A.; Santos, C.R.) reviewed the titles and abstracts that appeared to meet the inclusion criteria. In phase 2, three pairs of authors (Silva, A.K.A.; Santos, C.R.; Abreu, P.R.A.; Pinheiro, W.M.; Fukuoka, F.M.G.; and Tatmatsu-Rocha, J.C.) were trained to independently analyze the full text of articles selected in phase 1 and exclude studies that did not meet the inclusion criteria in Table S2 (in the supplementary material), and a third author (Tatmatsu-Rocha, J.C.) was consulted in case of disagreement. The extraction of relevant data from each study was organized in a predefined table



describing the main points related to the characteristics of the intervention of interest: Characteristics of the herbal medicine (crude extract or separate pigment), dose, time, treatment regimen, route of administration, and sample.

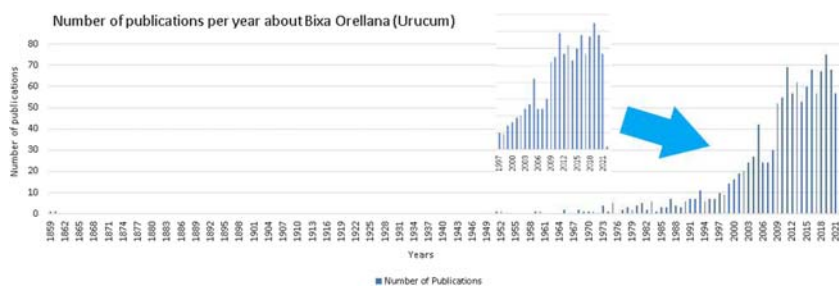
## Risks of bias and quality in individual studies

Due to the heterogeneity of the interventions evaluated, it was not possible to perform a meta-analysis of all data in relation to the results found. Therefore, we use them through narrative description, associated information, classification of the quality of studies, and minimization of bias through the Cochrane Collaboration Tool for Bias Risk Assessment using a Rob 2.0 platform. The Rob 2.0 tool has 05 domains, namely: (1) bias due to the randomization process; (2) bias due to deviation from planned interventions; (3) bias due to missing outcome data; (4) bias in outcome measurement; and (5) bias in the selection of reported studies [49–52].

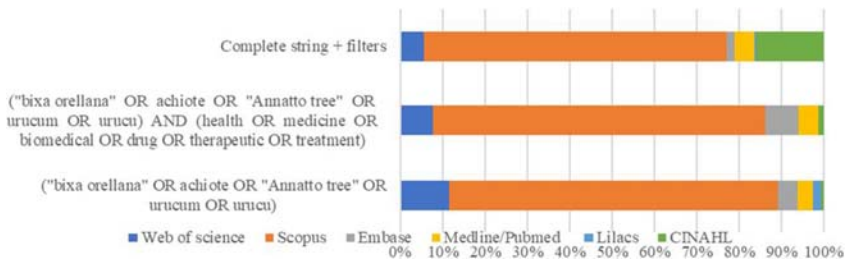
## Results

In a bibliometric study conducted on October 26, 2021, in the Web of Science, Scopus, Embase, and MEDLINE/Pubmed databases using the search terms (“*Bixa*” OR “achiote” OR “annatto tree” OR “annatto”), 1180 publications were found, duplicates excluded. Fig. 1.4 shows the publications registered since 1859. It is noteworthy that research with this biomaterial has increased dramatically since the 1970s. Since 2009, there have been at least 50 publications per year. To date, publications written about “*Bixa*” from 2018 through 2022 have accounted for 23% of all publications in these databases.

For these studies, a bibliometric analysis was performed using VOSviewer version 1.6.17 [54] with the configuration “binary count” with at least 10 simultaneous occurrences of terms. The result is shown in Fig. 1.4, which



**FIGURE 1.4** The number of publications per year, searched in databases (Web of Science, Scopus, Embase and MEDLINE/Pubmed). *Source: Developed using A.D. Pinzón-García, P. Cassini-Vieira, C.C. Ribeiro, C.E. de Matos Jensen, L.S. Barcelos, M.E. Cortes, et al., Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded PCL nanofibers in diabetic mice, J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 105 (7) (October 2017) 1938–1949. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.33724>.*



**FIGURE 1.5** Bibliometric analysis, with the VOSviewer Program version 1.6.17 [54], of the 732 works published with the search string (“Bixa orellana” OR “achiote” OR “annatto tree” OR “annatto”), in title/abstract/words-keys, on October 26, 2021, with a minimum cooccurrence of terms of 10 times and “binary counting”. Source: Developed using Leiden University - Center for Science and Technology Studies, VOSviewer—Visualizing Scientific Landscapes. CWTS—Meaningful Metrics. Available from: <https://www.vosviewer.com/>.

shows the most frequent terms in the works. In Fig. 1.5, we can consider the data according to five different clusters (groups). Each cluster is represented by main terms linked to the following terms: Seed (red), extract (blue), Brazil (green), project (yellow), and acid (purple).

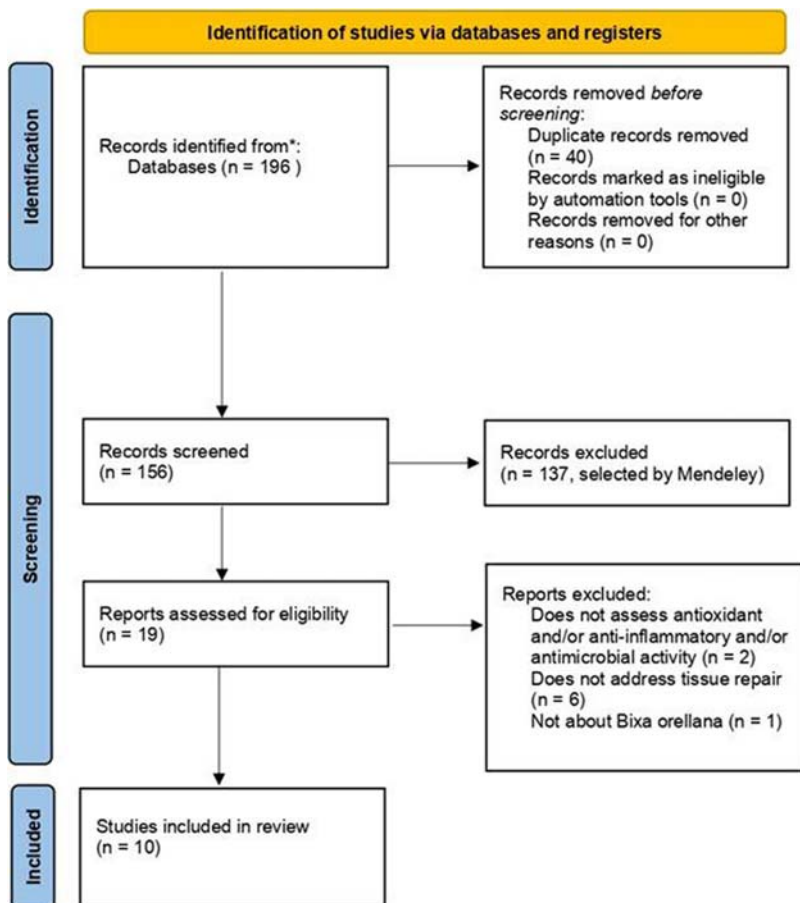
The lines between the terms indicate the relationships between them in the different papers analyzed. It appears that many of these studies are related to studies on the use of *BixO* in medicine. Some of the most common terms in this field are drug, disease, diabetes mellitus, cancer, malaria, antimicrobial activity, antibacterial activity, oxidative stress, antioxidant properties, etc. Nevertheless, 732 papers were found when searching the database, especially the Web of Science. Some of the regions that contributed the most were Brazil (53%), India (10%), the United States (10%), Mexico (6%), and Malaysia (4%).

### Characteristics of the included studies

When performing a bibliometric analysis using the terms associated with this study, an outstanding contribution to the number of works in scientific databases is observed (see Fig. 1.5): Scopus, Web of Science, CINAHL, and Medline/Pubmed, respectively. By applying the full search string plus filters, 196 publications were found. As shown in the PRISMA flow diagram (Fig. 1.6), 10 papers were considered for qualitative data analysis (Fig. 1.7).

### Characteristics of the included studies

All included studies were research articles that investigated the antioxidant, antiinflammatory, antimicrobial, and/or tissue repair effects of *BixO* bio-molecules/extracts in the in vitro and/or in vivo models. The main characteristics of the studies are summarized in Table 1.2.



**FIGURE 1.6** Flow diagram of literature search and selection criteria. Adapted from PRISMA, D. Moher, L. Shamseer, M. Clarke, D. Gherzi, A. Liberati, M. Petticrew, et al., Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement, *Syst. Rev.* 4 (1) (December 1, 2015) 1. Available from: <https://systematicreviewsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-4053-4-1>; B. Hutton, G. Salanti, D.M. Caldwell, A. Chaimani, C.H. Schmid, C. Cameron, et al., The PRISMA extension statement for reporting of systematic reviews incorporating network meta-analyses of health care interventions: checklist and explanations, *Ann. Intern. Med.* 162 (11) (June 2, 2015) 777–784. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M14-2385>.

The included studies were conducted in Brazil (n = 6), the United States (n = 3), and Italy (n = 1). It is worth noting that only three countries in the entire world have studied this research topic and that Brazil leads in the number of studies. All studies were published between 2013 and 2020; 80% were in English and 20% in Portuguese [3,30].



TABLE 1.2 Summary of descriptive characteristics of the included studies.

Study	Population		Intervention	Outcomes
Author, year/ country	In vitro/in vivo model (n)	Biocompound/species	Model/treatment regimen (dose, time and route)	Biological activities
<b>Capella et al., 2016, Brazil [30]</b>	In vivo: - Male Wistar rats ( <i>Rattus norvegicus</i> ), - 60 days - (n = not informed)	<i>Oil extract/BixO(UO)</i>	In vivo: Model: dorsal lesion by punch (0.8 cm) Dose/time: UO with vaseline (vehicle) over the lesion: 0.1% or 0.01% (0.1 mL). Daily for 21 days.	<b># Tissue repair and anti-inflammatory activities</b> <b>1) In vivo:</b> Exudate presence (day 4): 50% (all treatments); progress reduction till day 21; <b>2) Crust presence (day 7):</b> 100% (all treatments); <b>3) Epithelization (day 7):</b> 92% (U 0.1%); 75% (U 0.01%); 16% (vaseline); 0% (saline); $P < .05$ ; <b>4) Lesion area (day 4):</b> ↓ U 0.1% and U 0.01% (37.2 and 34.1 mm <sup>2</sup> ); vaseline and saline (55 and 52.6 mm <sup>2</sup> ); $P < .05$ ; <b>5) Lesion area (day 7):</b> U 0.1% and U 0.01% (36.4 and 39.2 mm <sup>2</sup> ); ↓ vaseline and saline (32.7 and 24.5 mm <sup>2</sup> ); $P < .05$ ; <b>6) Tensiometric analysis (day 21):</b> ↓ 47% (U 0.1% and U 0.01%); $P < .05$ ; <b>7) Cicatricial evolution:</b> - Day 4: inflammatory phase (all treatments) - Day 7: ↑ proliferation phase (vaseline and saline); $P < .05$ - Day 14: transition from inflammatory to maturation phase (all treatments); - Day 21: maturation phase (all treatments). <b>8) Fibrin pattern:</b> - Day 7: ↑ fibrin deposition (U 0.1% and U 0.01%); $P < .05$ ; - Day 14: fibrin still present (U 0.1% and U 0.01%); $P < .05$ ; - Day 21: no fibrin (all treatments).

<p><b>Rojo de la Vega et al., 2018, United States</b> [37]</p>	<p>In vitro: HEMnLP cell line (melanocytes) In vivo: Mice, 8–12 weeks of age a) Acute photodamage: SKH1 (Nrf2<sup>+/+</sup> and Nrf2<sup>-/-</sup>); n = 6 b) PUVA-induced hair graying: C57BL/6J (Nrf2<sup>+/+</sup> and Nrf2<sup>-/-</sup>); n = 6</p>	<p>Cis-bixin (purity—98%) dispersed in PEG 400/BixO</p>	<p>In vitro: a) Assay: Nrf2 protein expression (immunoblotting) Dose/time: cells treated with bixin (Bix, 20 and 40 μM) for 4 h; b) Assay: cell viability (assay not informed). Dose/time: cells treated with bixin (Bix, 20 μM); hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μM); and Bix + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> every other day for 6 wks. In vivo: a) <i>Model: acute photodamage (UV)</i>: Dose/time: topical bixin (Bix): 1% bixin in PEG400 (vehicle) on the dorsal skin; twice (every 24 h) → with or without UV exposure (4.4 J/cm<sup>2</sup> UVA + 240 mJ/cm<sup>2</sup> UVB). b) <i>Model: PUVA-induced hair graying</i>: Dose/time: b.1) topical bixin (Bix): 1% bixin in PEG400 (vehicle) on</p>	<p># <b>Antioxidant activity</b> In vitro: 1) Nrf2 protein expression: ↑ Nrf2 activation and its downstream genes; dose-dependent. 2) <i>Cell viability</i>: control (100%); Bix (200%); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (&lt;20%); Bix + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (~125%); <i>P</i> &lt; .05. In vivo: a) <i>Acute photodamage</i>: 1) Bix 1% (no UV): ↑ Nrf2 (6.8-fold) and its downstream proteins in Nrf2<sup>+/+</sup> mice; <i>P</i> &lt; .05; - Attenuated effect in Nrf2<sup>-/-</sup> mice; <i>P</i> &lt; .05; 2) Epidermal thickening after UV exposure: ↓ in Nrf2<sup>+/+</sup> mice (1.4-fold), but not in Nrf2<sup>-/-</sup> mice (3.8-fold) both pretreated with Bix; <i>P</i> &lt; .05; 3) Oxidative DNA lesion after UV exposure: ↓ in Nrf2<sup>+/+</sup> mice (1.2-fold), but not in Nrf2<sup>-/-</sup> mice (1.9-fold) both pretreated with Bix; <i>P</i> &lt; .05; b) <i>PUVA-induced hair graying</i>: 1) PUVA: ↑ Nrf2 (&gt;4-fold) and its downstream proteins in Nrf2<sup>+/+</sup> mice; <i>P</i> &lt; .05; - PUVA + Bix (1%): ↓ Nrf2 (2-fold) and its downstream proteins in Nrf2<sup>+/+</sup> mice; <i>P</i> &lt; .05; 2) Hair graying after PUVA: ↓ in Nrf2<sup>+/+</sup> mice (0.7-fold), but not in Nrf2<sup>-/-</sup> mice (1.6-fold) both and two-fold in C57BL/6J Nrf2<sup>+/+</sup>.</p>
--	--	---	--	--

Continued

TABLE 1.2 Summary of descriptive characteristics of the included studies.—cont'd

Study	Population		Intervention	Outcomes
Author, year/ country	In vitro/in vivo model (n)	Biocompound/species	Model/treatment regimen (douse, time and route)	Biological activities
			<p>the dorsal skin; no UVA; twice (every 24 h);</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Topical bixin + PUVA: 1% bixin in PEG400 on the dorsal skin, twice (every 24 h) → topical 8-MOP (0.5 mg/mL) for 30 min → UVA exposure (1.32 J/cm<sup>2</sup> UVA).</li> <li>b.2) topical bixin + PUVA: 1% bixin in PEG400 on the dorsal skin, twice (every 24 h) → topical 8-MOP (0.5 mg/mL) for 30 min → UVA exposure (1.32 J/cm<sup>2</sup> UVA) → after hair regrowth, one more cycle of depilation → hair regrowth till day 50.</li> </ul>	

<p><b>Nascimento et al., 2019, Brazil</b> [55]</p>	<p>In vivo: - Male Wistar rats (<i>Rattus norvegicus</i>), 10 weeks of age - (n = 5)</p>	<p>Norbixin-based PHB membrane (PHB-Nor)/<i>BixO</i></p>	<p>In vivo: - Tendon sectioned transversally in the middle region (surgical procedure) → NorBix-based PHB membrane glued joining the two portions of the tendon (group M) or no intervention (control group) → skin was closed with a suture. - Histological analysis after 7-, 14-, and 21-days postinjury procedure.</p>	<p><b># Tissue repair and anti-inflammatory activities</b>  <b>1) Histopathological features PHB-Nor:</b>          - Day 7: newly formed blood vessels, young fibroblasts near the preserved residual tendon;          - Day 14: thin fibroblasts arranged in compact bundles;          - Day 21: mature fibroblasts arranged in bundles parallel to the preexisting tendon; granulomas  <b>2) Presence of collagen I (mature):</b>          - Day 7: PHB-Nor (25%) &gt; control (2%); <math>P &lt; .05</math>          - Day 14: PHB-Nor (51%) &gt; control (20%); <math>P &lt; .05</math>  <b>3) Presence of collagen III (immature):</b>          - Day 7: PHB-Nor (70%) &lt; control (95%); <math>P &lt; .05</math>          - Day 14: PHB-Nor (49%) &lt; control (79%); <math>P &lt; .05</math>  <b>4) Inflammatory cell counts: PHB-Nor (~85 cells) &lt; control (~160 cells) (7–21 Days); <math>P &lt; .0001</math></b>  <b>5) Fibroblast counts: PHB-Nor (~99 cells) &gt; control (~72 cells) (7–21 Days); <math>P &lt; .0001</math></b></p>
<p><b>Nascimento et al., 2020, Brazil</b> [56]</p>	<p>In vivo: - Male Wistar rats (<i>Rattus norvegicus</i>), 10 weeks of age - (n = 5)</p>	<p>NorBix-based PHB membrane (PHB-Nor)/<i>BixO</i></p>	<p>In vivo: - Tendon sectioned transversally in the middle region (surgical procedure) → NorBix-based PHB membrane glued joining the two portions of the tendon or no</p>	<p><b># Tissue repair and anti-inflammatory activities</b>  <b>1) Inflammatory cell counts (mean): PHB-Nor + LED (~78 cells) &lt; control + LED (~90 cells) (7–21 Days); <math>P &lt; .0001</math></b>  <b>2) Fibroblast counts (mean):</b>          - Day 7: PHB-Nor + LED (82 cells) &gt; control + LED (121 cells); <math>P &lt; .0001</math>          - Day 14: PHB-Nor + LED (101 cells) similar to control + LED (105 cells);</p>

Continued



TABLE 1.2 Summary of descriptive characteristics of the included studies.—cont'd

Study	Population		Intervention	Outcomes
Author, year/ country	In vitro/in vivo model (n)	Biocompound/species	Model/treatment regimen (dose, time and route)	Biological activities
			<p>intervention (control group) → skin was closed with a suture.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Photobiomodulation (LED-660 nm, 14 mW, during 4 min): 1 h postinjury; repeated once a day for 21 days.</li> <li>- Histological analysis after 7, 14, and 21 days postinjury procedure.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Day 21: PHB-Nor + LED (99 cells) &lt; control + LED (150 cells); <math>P &lt; .0001</math></li> <li>3) Presence of collagen I (mature): PHB-Nor + LED (37.99%) &gt; control + LED (9.47%) (day 7); <math>P &lt; .05</math></li> <li>- Days 14 and 21: no significant difference among groups.</li> <li>4) Presence of collagen III (immature): PHB-Nor + LED (62.01%) &lt; control + LED (90.53%) (day 7); <math>P &lt; .05</math></li> <li>- Days 14 and 21: no significant difference among groups</li> </ul>
<b>Pinzón-García et al., 2017, Brazil</b> [53]	<p>In vitro: 3T3-L1 cell line (mouse preadipocyte fibroblasts)</p> <p>In vivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Male C57BL/6 mice (<i>Mus musculus</i>), 8 weeks of age (n = 10)</li> <li>- Diabetic (induced by</li> </ul>	<p>Bix-loaded PCL electrospun nanofibers (Bix-PCL)/<i>BixO</i></p>	<p><i>Nanofibers:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bixin-PCL1: 2.5% (w/w) Bix;</li> <li>- Bix-PCL2: 12.5% (w/w) Bix</li> </ul> <p>In vitro</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cells were split over the sterile nanofibers for 3, 5, and 7 days.</li> <li>- Cell adhesion/growth: MTT assay</li> </ul> <p>In vivo</p>	<p><b># Tissue repair</b></p> <p>In vitro</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cell adhesion/growth: no treatment &gt; PCL &gt; Bix-PCL1 &gt; Bix-PCL2 (3–7 Days); <math>P &lt; .05</math></li> </ul> <p>In vivo</p> <p><b>a) Wound closure</b></p> <p>* <i>diabetic mice:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Days 3 and 5: Bix-PCL1 &gt; PCL and Bix-PCL2; <math>P &lt; .05</math></li> <li>- Day 7: Bix-PCL1 = Bix-PCL2 &gt; PCL; <math>P &lt; .05</math></li> </ul> <p>* <i>non-diabetic mice:</i></p>

	streptozotocin treatment)		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Four 0.5 cm circular excisional wounds (dorsum) with punch.</li> <li>- Topical treatment (diabetic and nondiabetic mice) once: 0.5 cm<sup>2</sup> PCL; 0.5 cm<sup>2</sup> Bix-PCL1; 0.5 cm<sup>2</sup> Bix-PCL2.</li> <li>- Analysis: wound area; histopathology; scar tissue area; histomorphometry (day 14)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Days 5 and 7: Bix-PCL1 &gt; PCL; <math>P &lt; .05</math></li> <li><b>b) Total collagen (14 day)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>* <i>diabetic mice</i>:           <ul style="list-style-type: none"> <li>- PCL &gt; Bix-PCL1 &gt; Bix-PCL2; <math>P &lt; .05</math></li> </ul> </li> </ul> </li> <li><b>c) Scar tissue area (14 day)</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>* <i>diabetic mice</i>:           <ul style="list-style-type: none"> <li>- PCL &gt; Bix-PCL1 &gt; Bix-PCL2; <math>P &lt; .05</math></li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<b>Pierpaoli et al., 2017, Italy [41]</b>	<p>In vivo: <i>Balb/c mice (Mus musculus)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 6-month-age</li> <li>- (n = 6)</li> </ul>	<p>Tocotrienol-rich extract (87.1% <math>\delta</math>-T3s and 12.9% <math>\gamma</math>-T3s) from seeds of <i>BixO</i>.</p>	<p>In vivo: Model: superficial surgical wounds infected with methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA).</p> <p>Dose/time: 50 or 100 mg/kg of T3s (oral), daily until at end experiment, starting from 8 days before MRSA-challenge.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 days after surgical wounds infected with MRSA: some mice received additional treatment with the DAP 7 mg/kg, daily, via IP, for more 7 days.</li> </ul>	<p><b>#Tissue repair, anti-inflammatory, and antimicrobial activities</b></p> <p><b>1) Viable MRSA cells present on tissues:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 mg/kg of T3s → no significant reduction in MRSA counts.</li> <li>- 100 mg/kg of T3s → no significant reduction in MRSA counts.</li> <li>- DAP alone → ↓ 3-log10 in MRSA counts; <math>P &lt; .05</math></li> <li>- DAP + 50 mg/kg of T3s → no significant reduction in MRSA counts.</li> <li>- DAP + 100 mg/kg of T3s → ↓ 4-log10 in MRSA counts; <math>P &lt; .05</math></li> </ul> <p><b>2) Immune modulation:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ↑ CD49b<sup>+</sup> NK cells over the levels observed in all infected groups; <math>P &lt; .05</math></li> <li>- ↑ levels of NK activity (mean ± SD; 20% lytic units (LU<sub>20</sub>) per 10<sup>7</sup> cells):           <ul style="list-style-type: none"> <li>* control → 6.9 ± 0.1</li> <li>* 100 mg/kg of T3s → 7.9 ± 0.1; <math>P &lt; .05</math></li> </ul> </li> </ul>

Continued

TABLE 1.2 Summary of descriptive characteristics of the included studies.—cont'd

Study	Population		Intervention	Outcomes
Author, year/ country	In vitro/in vivo model (n)	Biocompound/species	Model/treatment regimen (dose, time and route)	Biological activities
			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analysis: quantification of viable bacterium, mRNA expression, lymphocytes analysis, and NK cytotoxic/activity assay</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* DAP alone <math>\rightarrow 10.6 \pm 1.9</math>; <math>P &lt; .05</math></li> <li>* DAP + 100 mg/kg of T3s <math>\rightarrow 12.7 \pm 2.2</math>; <math>P &lt; .05</math></li> <li>- <math>\uparrow</math> monocytes/macrophages (CD11b+) and granulocytes (Gr-1+) in T3s and DAP alone; <math>P &lt; .05</math></li> <li>- <math>\uparrow</math> CD4+ and CD8+ cells in T3s and DAP + T3s treated mice <math>\rightarrow</math> CD4+ in T3s &gt; DAP + T3s; <math>P &lt; .05</math></li> <li>3) Tissue repair: <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>fibronectin</i> mRNA levels: <math>\uparrow</math> 2.8- and 1.6-fold in T3s alone and DAP + T3s, respectively; <math>\downarrow</math> 2.1-fold in DAP alone; <math>P &lt; .05</math></li> <li>- <i>IL-24</i> mRNA levels: <math>\uparrow</math> 2 and 2.4-fold in T3s alone and DAP + T3s, respectively; <math>P &lt; .05</math></li> </ul> </li> </ul>
<b>Piva et al., 2013, Brazil [57]</b>	In vivo: Male Wistar rats, - 45–50 days-age - n = 8	Bix (diluted in DMSO)	In vivo: Model: surgical lesion of the 0.5 cm, in the middle of the dorsum of the tongue. Dose/time: daily <i>topical</i> application of 50 $\mu$ L of the Bix (3 mg/mL), applied for 1 min in all	<b># Tissue repair and anti-inflammatory activities</b> In vivo: 1) Histological analysis: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Day 2: there was discrete inflammatory infiltrate.</li> <li>- Day 7: reepithelialization; <math>\downarrow</math> lesion area; discrete inflammatory infiltrate; <math>\uparrow</math> fibroblasts with a greater deposition of collagen fibers.</li> </ul>

			injured areas. Once a day for 21 days.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Day 14: ↓ lesion area; better organization of collagen.</li> <li>- Day 21: complete reepithelialization; presence of blood vessels, intense collagen matrix, collagen fibers of varied and organized thickness, and ↓ lesion area.</li> </ul> <ol style="list-style-type: none"> <li>2) ↓ number of neutrophils (more pronounced at days 2 and 7); <math>P &lt; .05</math></li> <li>3) Average number of blood vessels; macrophages; lymphocytes; and plasma cells → similar to control group.</li> <li>4) ↑ collagen area (~2.6-fold; day 2); <math>P &lt; .05</math></li> <li>5) Collagen type:             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Immature collagen: similar to control group</li> <li>- Mature collagen: ↑ at day 14 (~3.3-fold); <math>P &lt; .05</math></li> </ul> </li> </ol>
<b>Santos et al., 2014, Brazil [3]</b>	In vivo: males Wistar rats, adults (n = 4)	NorBix (aqueous extract—2.5% NorBix)/ <i>BixO</i> .	<p>Model: cutaneous wounds (2 cm) on the animals' backs</p> <p>Dose/time: topical application of the 2.5% norbixin over the wound for 3 days.</p> <p>Analysis: histomorphometry (day 3,7, 14, and 21)</p>	<p><b># Tissue repair and anti-inflammatory activities</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) ↑ inflammatory infiltrate: predominance of neutrophils and eosinophils (day 3) and macrophages and lymphocytes (day 14); <math>P &lt; .05</math></li> <li>2) ↑ ~2-fold vascular density (7–21 days); <math>P &lt; .05</math></li> <li>3) ↓ 50%–60% fibroblast counts (3–14 days); ↑ ~2-fold fibroblast counts (day 21); <math>P &lt; .05</math></li> <li>4) No variation in collagen deposition.</li> <li>5) No delay in reepithelization and fibroplasia process.</li> </ol>

Continued

TABLE 1.2 Summary of descriptive characteristics of the included studies.—cont'd

Study	Population		Intervention	Outcomes
Author, year/ country	In vitro/in vivo model (n)	Biocompound/species	Model/treatment regimen (dose, time and route)	Biological activities
<b>Schmidlin et al., 2020, United States [58]</b>	In vitro: skin keratinocytes (HaCaT) cells, transfected or not with siRNA <i>Nrf2</i> In vivo: SKH1 <i>Nrf2</i> <sup>+/+</sup> and <i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup> mice; 8–12 weeks of age (n = not informed)	Bix (dispersed in PEG 400)/ <i>Bixa orellana</i> .	In vitro: <b>a)</b> Assay: cell viability (MTT assay) Dose/time: Bix 40 $\mu$ M, 24 h prior ionizing irradiation exposure (4 Gy) $\rightarrow$ MTT assay 10 days postradiation. <b>b)</b> Assay: DNA fragmentation (comet assay) Dose/time: Bix 40 $\mu$ M, 24 h prior ionizing irradiation exposure (4 Gy) $\rightarrow$ comet assay 1 h postradiation. <b>c)</b> Assay: protein expression, (immunoblotting) Dose/time: Bix 40 $\mu$ M, 24 h prior ionizing irradiation exposure (4 Gy) $\rightarrow$ protein expression 1 h postradiation.	<b># Antioxidant activities</b> <b>1)</b> Maintained cell viability 10 days postradiation; $P < .05$ . <b>2)</b> $\downarrow$ foci/cell 1–2 h postradiation; $P < .05$ <b>3)</b> $\downarrow$ DNA damage marker (p-p53) and DNA fragmentation 1–2 h postradiation ( <i>Nrf2</i> - dependent); $P < .05$ . <b>4)</b> $\downarrow$ ROS 1 h postradiation ( <i>Nrf2</i> -dependent); $P < .05$ . <b>5)</b> $\uparrow$ 1.5-fold glutathione levels 24 h postradiation ( <i>Nrf2</i> -dependent); $P < .05$ . <b>1)</b> $\downarrow$ 3-fold severity of erythema mice; $P < .05$ . <b>2)</b> $\downarrow$ epidermal thickening (21 day); $P < .05$ . <b>3)</b> $\downarrow$ ROS 1 h postradiation ( <i>Nrf2</i> -dependent); $P < .05$ . <b>4)</b> $\uparrow$ regulation of <i>Nrf2</i> target gene expression 1 h postradiation; $P < .05$ . <b>5)</b> $\downarrow$ DNA damage 1 h postradiation; $P < .05$ .

**d)** Assay:  $\gamma$ -H2AX foci formation  
 Dose/time: Bix 40  $\mu$ M, 24 h prior ionizing irradiation exposure (4 Gy)  $\rightarrow$  foci formation 1 h postradiation.

**e)** Assay: (ROS) detection (EPR)  
 Dose/time:

In vitro: Bix 40  $\mu$ M, 24 h prior ionizing irradiation exposure (4 Gy)  $\rightarrow$  ROS 1 h postradiation.

**e)** Assay: glutathione levels detection (kit)  
 Dose/time: Bix 40  $\mu$ M, 24 h prior ionizing irradiation exposure (4 Gy)  $\rightarrow$  glutathione levels 24 h postradiation.

In vivo:

Model: ionizing irradiation (30 Gy) Dose/time: pretreatment with 1% bixin (topical) 24 and 48 h prior to 30 Gy radiation exposure in the back skin  $\rightarrow$  mice were monitored and imaged for 21 days postradiation.

Continued

TABLE 1.2 Summary of descriptive characteristics of the included studies.—cont'd

Study	Population		Intervention	Outcomes
Author, year/ country	In vitro/in vivo model (n)	Biocompound/species	Model/treatment regimen (dose, time and route)	Biological activities
Tao et al., 2015, United States [59]	In vitro: Human skin keratinocytes (HaCaT) cells and primary human epidermal keratinocytes (HEKA). In vivo: SKH1 Nrf2 <sup>+/+</sup> and Nrf2 <sup>-/-</sup> mice; 8 weeks of age (n = 6)	Bix (dispersed in corn oil)/ BixO.	In vitro: a) Assay: cell viability. MTT assay Dose/time: Bix 0–160 μM, 48 h b) Assay: annexinV/PI Dose/time: Bix 20 μM, 24 h c) Assay: glutathione assay (luminescent GSH-Glo) Dose/time: 0–40 μM, 24 h d) Assay: intracellular oxidative stress (DCFH-DA) Dose/time: cells pretreated with bixin (20 μM; 1 or 24 h) → exposed to singlet oxygen generated by dye-sensitization → incubated with DCFH-DA and analyzed after 1 h.	<b># Antioxidant and anti-inflammatory activities</b> In vitro: 1) ↑ regulation of NRF2 signaling (gene expression of target genes and protein levels) in HEKA and HaCaT cells (Bix 20 μM, 24 h); <i>P</i> < .05 2) ↑ regulation of NRF2 signaling without affecting <i>Nrf2</i> or <i>Keap1</i> mRNA levels; <i>P</i> < .05 3) No impairment of cell viability (HaCat) after Bix exposure (0–160 μM, 48 h); <i>P</i> < .05 4) ↑ total cellular glutathione (HaCat) after Bix exposure (0–40 μM, 24 h); <i>P</i> < .05 5) ↓ induced oxidative stress with Bix pretreatment (20 μM, 24 h); <i>P</i> < .05 6) ↑ regulation of NRF2 signaling in HaCaT cells (20 μM, 24 h) even in cells preincubated with different antioxidants; <i>P</i> < .05 7) ↑ NRF2 half-life (Bix 40 μM, 4 h); <i>P</i> < .05 8) ↓ NRF2-ubiquitination (Bix 40 μM, 4 h); <i>P</i> < .05 9) Bix → canonical NRF2 inducer acting through the critical Cys-151 sensor residue in KEAP1. In vivo:

**e)** Assay: oxidative stress PCR expression array analysis.  
Dose/time: 20  $\mu$ M; 1 or 24 h

**f)** Assay: transfection with KEAP1 wild type (KEAP1-WT) or KEAP1 mutated  
Dose/time: 24 h  
posttransfection, cells were treated with bixin (40  $\mu$ M) for 16 h  $\rightarrow$  analysis of the reporter gene activity

**g)** Assay: Nrf2 protein expression, ubiquitylation, and half-life (immunoblotting/immunoprecipitation)  
Dose/time:  
- Cells were treated with Bix (40  $\mu$ M) for 4 h for Nrf2 half-life and ubiquitylation

In vivo:  
*Model:*  
photodamage (sunburn model-UV);  
Dose/time:

- 1) Bix plasma concentration peak (Nrf2<sup>+/+</sup> and Nrf2<sup>-/-</sup>): 2 h after i.p. injection; basal levels after 48 h.
- 2)  $\uparrow$  protein levels of Nrf2 and its targets (GCLM and AKR1C1) (Nrf2<sup>+/+</sup>)  $\rightarrow$  Bix 200 mg/kg (i.p.) after 72 h
- 3)  $\uparrow$  cutaneous Nrf2 pathway in Nrf2<sup>+/+</sup> but not in Nrf2<sup>-/-</sup> mice, detectable at the protein [Nrf2, GCLM, AKR1C1] and mRNA levels [*Gclm*, *Akr1c1*] (Bix + UV);  $P < .05$ .
- 4)  $\downarrow$  UV-induced epidermal thickening and apoptosis in Nrf2<sup>+/+</sup> (Bix + UV);  $P < .05$
- 5)  $\downarrow$  oxidative DNA damage in Nrf2<sup>+/+</sup> (Bix + UV);  $P < .05$
- 6)  $\downarrow$  keratinocyte hyperproliferation in Nrf2<sup>+/+</sup> (Bix + UV);  $P < .05$
- 7)  $\downarrow$  UV-induced epidermal expression of the inflammatory NF- $\kappa$ B target gene MMP9 in Nrf2<sup>+/+</sup> (Bix + UV);  $P < .05$
- 8)  $\downarrow$  UV-induced cutaneous inflammatory gene expression (*IL6*, *TNF $\alpha$* , *MMP9*) in Nrf2<sup>+/+</sup> (Bix + UV);  $P < .05$

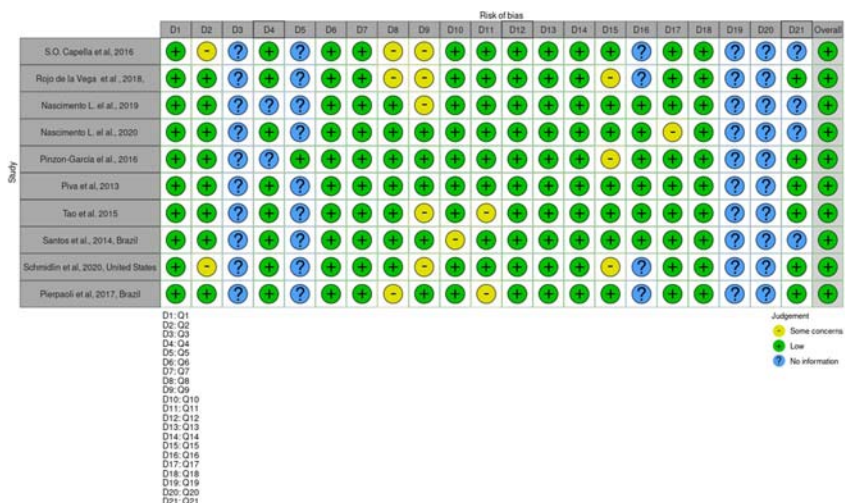
Continued



TABLE 1.2 Summary of descriptive characteristics of the included studies.—cont'd

Study	Population		Intervention	Outcomes
Author, year/ country	In vitro/in vivo model (n)	Biocompound/species	Model/treatment regimen (dose, time and route)	Biological activities
			intraperitoneal (i.p.) injection of Bix: 200 mg/kg in corn oil (vehicle); 48 h before UV exposure → with or without UV exposure (4.4 J/cm <sup>2</sup> UVA + 240 mJ/cm <sup>2</sup> UVB) → skin tissue collection 24 h after UV exposure. - Plasma collection: 0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, and 72 h after injection → Bix detection by HPLC.	

8-MOP, 8-methoxypsoralen; C57BL/6, black fur mouse; CFU, colony formation unit; CFU/mL, colony forming units per mL; DAP, daptomycin; DCFH-DA, 2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; ECM, extracellular matrix; EPR, electron paramagnetic resonance; FP, fibrin pattern; gamma-GCS, gamma-glutamylcysteine synthetase; GSH, glutathione; HaCat, keratinocytes and primary epidermal; IP, intraperitoneal route; LED, light emitting diode; ML, PHB membrane with LED; MMP9, matrix metalloproteinase 9; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; ND, not determined; NK, natural killer cells; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PCL, polycaprolactone; PEG400, polyethylene glycol 400; PHB, poly(hydroxybutyrate); PHB, poly-beta-hydroxybutyrate; PI, propidium iodide; PUVA, photosensitizer and UVA; ROS, reactive oxygen species (free radical levels); SF, group physiological; SKH1 Nrf2<sup>+/+</sup> and KH1 Nrf2<sup>-/-</sup>, knockout mice for a phenotypic indicator of postirradiation skin; T3s,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ , and  $\delta$ -tocopherols or tocotrienols; U, oil extract of annatto; U 0.1%, group oil extract of annatto 0.1% of concentration; U 0.01%, group oil extract of annatto 0.01% of concentration; UV, ultraviolet radiation; UVA, solar ultraviolet ray A; UVB, solar ultraviolet ray B; V, group vaseline; VERO cells, African green monkey kidney; WKS, weeks.



**FIGURE 1.8** Quality and risk of bias assessment based on ARRIVE and SYRCLEs’RoB. LOW answers indicated low risk of bias, NO INFORMATION indicated did not clearly describe, and SOME CONCERNS indicated it was incomplete information. Detailed description of the evaluated parameters is found in Table S3 (in supplementary material).

and inflammatory marker gene expression (n = 1). For antimicrobial analysis, the studies assessed the number of MRSA CFU (n = 1).

### Quality and risk of bias individual studies

The assessment of quality and risk of bias for all included studies based on ARRIVE and SYRCLE’s RoB guidelines is summarized in Table S3 (in the supplemental material) and shown in Fig. 1.8. Criteria were classified as “somewhat concerning” if they were not reported or contained incomplete information. The study design was well executed in most studies, and some articles mentioned the timing of treatment (n = 10), the route of administration (n = 10), the dose of *Bixa* biomolecules/extracts (n = 8), and the presence of control groups (n = 10). Animal models were considered appropriate, and ethics committee approval was indicated in all studies. Most studies did not include clear descriptions of allocation/randomization (n = 4) and blinding (n = 9), which are required for risk of bias and quality assessment. In addition, all studies (n = 10) had a low risk of selection bias in reported outcomes.

### Synthesis of results

Included studies included in vivo experiments (n = 10) or both in vitro and in vivo analyzes (n = 4); in vivo studies were performed with rats (n = 5) and mice (n = 5), three of which used knockout animals (NrF2<sup>-/-</sup>) animals

[37,58,59]. The cell lines used in in vitro studies were HEMnLP (human melanocytes) [37], 3T3-L1 (murine fibroblasts) [53], HaCat, and HEKA (human keratinocytes) [58,59].

For in vivo tissue repair and antiinflammatory investigations, it was noted that most of the studies induced surgical wounds in the dorsal animal region ( $n = 3$ ), with diameter areas varying from 0.5 to 2 cm [3,30,53]. One study induced a 0.5 cm wound in the dorsum of the tongue [57], and the other two studies evaluated tissue repair after tendon surgical section procedures [55,56].

Interestingly, one of these studies evaluated wound closure in diabetic mice [53], and another study compared the association of photobiomodulation and *NorBix* treatment in tendon tissue repair [56]. Regarding the route of administration of the treatments, most of the studies ( $n = 6$ ) described the topical application of *BixO* biomolecules/extracts over the wound [3,30,53,55–57]. The doses of *BixO* biomolecules/extracts ranged from (a) 2.5% for *NorBix* in the aqueous extract [3]; (b) 0.01%–0.1% for oil extract [30]; and (c) 3 mg/ $\mu$  for free *Bix* [57] or 2.5%–12.5% for *Bix* associated with nanofibers [53]. Treatment application frequency varied from one single application [53,55,56] to daily applications for 3 [3] or 21 days [30,57]. Only one study performed the treatment by daily oral administration of 50 or 100 mg/kg of *BixO* tocotrienol-rich extract. Interestingly, the wounds evaluated in this study were infected with MRSA.

The treatment started 8 days before the MRSA challenge until the end of the experiment (9 days postinfection). Additional treatment with the antibiotic daptomycin was also evaluated [41].

For in vivo antioxidant and antiinflammatory activity investigations, UV (sunburn model) ( $n = 2$ ) [37,59] or ionizing radiation ( $n = 1$ ) [58] exposure to the dorsal skin of wild-type or knockout ( $\text{NrF2}^{-/-}$ ) mice was used. In addition, one of these studies also used a PUVA ( )-induced hair greying model [59]. It is worth noting that the only *BixO* biomolecule evaluated in these studies was the *Bix*. Regarding the dose and route of administration of the treatments, most of the studies performed topical applications (1% *Bix*;  $n = 2$ ) [58] and one of them used intraperitoneal application (200 mg/kg *Bix*;  $n = 1$ ) [59]. Interestingly, in all antioxidant studies, *Bix* was administered as a pretreatment 24 and/or 48 h before UV or ionizing radiation exposure.

In vitro experiments were used in four studies to complement in vivo analysis and to investigate the mechanisms of action involved in tissue repair ( $n = 1$ ) [53] and antioxidant activity ( $n = 3$ ) [37,58,59] of *Bix*. The dose and time of treatment were 2.5%–12.5% (3–7 days) for *Bix* associated with nanofibers [53] and 20–40  $\mu\text{M}$  of *Bix* incubated for 4–48 h [37,58,59].

## Discussion

The bioactive molecules *cis-Bix*, *Bix*, and *NorBix* from *BixO* have structural features that have important therapeutic potential. Carotenoids, phenolic

compounds, and tocopherols make it a plant of medicinal interest, as these compounds have inhibitory potential for oxidation reactions and stimulate tissue regeneration [36]. In view of this, in the literature of the last decade, we have systematically investigated the potential effects of this plant on tissue healing and/or protection, using antioxidant, antiinflammatory, and antimicrobial effects in in vivo and in vitro models as guiding elements.

Given the hydrophobic nature of the *Bix* molecule, some studies have opted for its dispersion in various vehicles to allow the study of its biological effects in in vitro and in vivo models. For example, in a study [57,60], *Bix* was dispersed in DMSO (dimethyl sulfoxide) solution.

This choice was since the dye has polar (C=O) and nonpolar (C-H) regions in its structure. Such properties extend the solubility possibilities of this substance. In contrast to this study [37,58], dispersed *Bix* in the nonionic surfactant (PEG 400). Other suggestions for dissolving *Bix* included dispersing it in corn oil [37,59] or petrolatum [30]. Nanofibers were also used to bind with *Bix* (PCL), a biodegradable polyester [53].

The most reported methods for the extraction of *Bix* and *Norbix* are consist of ethanol extractions based on the seeds of *Bixa orellana* [61]. The acidity parameters of urucum, the peroxide levels, and the amount of carotenoids are used as the main parameters that reflect the quality of the oil. These changes in parameters may be caused not only by the extraction methods but also by the high content of fatty acids, terpenes, and long-chain molecules in urucum, which, according to Ref. [62], give less stability to the extracts and vegetable oils.

The dark coloration of two carotenoid-rich seed extracts may be associated with the fatty acid degradation of taxa. For the Association of the Official Analytical Chemists—AOAC (2022) [63], lipid degradation may occur through processes of hydrolysis, oxidation, and polymerization. Thus, the degradation of two carotenoids can occur through oxidation processes and enzymes such as lipoxygenase, which catalyzes the oxidation of two carotenoids and promotes the release of fatty acids to form geometric and optical isomers [64].

Since this study analyzed the antioxidant, antiinflammatory, and antimicrobial effects of *BixO* in vitro and in vivo, we believe it is critical to understand the factors involved in tissue repair. Some of the authors listed in this review have proposed to evaluate the healing and local inflammatory processes in surgical wounds in the dorsal region of the animals studied [3,30,37,53], using as experimental intervention the topical application of *BixO* preparations to these wounds. In addition, other studies have analyzed tissue repair on the dorsum of the tongue [57] and, after surgical resection of tendons [53,55,56], studied healing in rats suffering from diabetes.

However, the healing process is unique and varies from tissue to tissue. Tendons, for example, are composed of many types of collagen fibers, and their healing process generally involves a series of growth factors that differ

from other superficial tissues. Its phases include the initial inflammatory phase, collagen synthesis, angiogenesis, and fibrosis [55,65] evaluated the efficacy of *NorBix*-based PHB membranes in rats whose tendons were sectioned at seven, 14, and 21 days for further histological analysis.

This study supports the results of [3,30], which obtained a high production of fibroblasts after the 14th day, an improvement in the intervention groups in reducing the inflammatory process, and a better disposition of fibers from type I collagen, probably due to the high production of fibroblasts after the 14th day.

Other studies selected in this review have associated *BixO* with bio-compounds, as in the study by Ref. [53], in which *Bix* was associated with PCL. The results showed that this compound effectively accelerated wound closure. In addition [56], used the association of a *NorBix*-based membrane with (light emitting diode (LED)) type light emitters. In this study, the injuries on the heels of rats were examined for 7, 14, and 21 days. The control group received treatment with LED, while the intervention group LED was associated with biomembranes. In this study, the use of isolated LED proved to be more effective in terms of healing results than membrane-associated LED [66], with a reduction in inflammatory infiltrates and an increase in the number of fibroblasts, which consequently stimulated a remarkable maturation of collagen fibers.

**Photobiomodulation:** A systematic review and meta-analysis of the most used parameters in the resolution of diabetic foot ulcers. In the discussion of this work, it was suggested that the membrane may have affected the proliferative phase cycle and the possibility of oxidative degradation of *NorBix* after interaction with electromagnetic irradiation by LED. However, there is evidence of beneficial effects of this type of light emitter on tissue repair [67], it must be emphasized that this was the only study using photobiomodulation (LED), whose wavelength was  $660 \pm 20$  nm by the authors. Further studies are needed to assess whether this association of light with *NorBix* could occur at other wavelengths of light.

These associations of *BixO* with biocompounds may be significant in diabetic models, where there is a significant vascular deficit in tissue perfusion. In this sense, healing in diabetic patients relies on reducing the angiogenesis process and capillary density, which impairs the supply of nutrients required for tissue repair [68]. In addition to the impairment of the vascular maturation process, alterations in macrophage-regulated proinflammatory activities can also be observed, delaying the progression of the healing process and thus contributing to a chronic wound [69]. The hyperglycemic state causes mitochondrial dysfunction and consequently an increase in oxidative processes [70]. Wounds and various pathological conditions can contribute to free radicals, i.e., reactive oxygen and nitrogen species. Free radicals are associated with initiating inflammation, and antioxidant substances delay, prevent, or interrupt the oxidative damage caused by free radicals [25]. The articles

included in this study pointed out the important antioxidant activities of *Bix*, so its oxidative protection can be highlighted even directly in DNA.

Moreover, antioxidant agents have the function of protecting cells from tissue damage and promoting the activation of defense mechanisms, especially in the activation of NrF2<sup>+/+</sup> gene expression. NrF2 is involved in crucial cellular defense mechanisms such as detoxification in phase II, inflammation signaling, DNA repair, antioxidant response, and autophagic activation [37]. To confirm these data, in vitro and/or in vivo experiments were performed on rats to evaluate the efficacy of *Bix* as an activator of NrF2<sup>+/+</sup> gene expression [37,58,59].

This work showed that *Bix* has an antioxidant protective effect that stimulates melanocyte production and minimizes harmful oxidative damage.

The *Bix* administration was systemic by intraperitoneal via, and the results showed a notable antioxidant effect. *Bix* increased the protein concentration by NrF2 and prevented the degradation of these proteins allowing a longer activation time of the antioxidant effect [59]. Similarly, in in vitro tests with UV and PUVA irradiation, observed that the amount of free *Bix* doubled after exposure of melanocyte cells compared to the control group and accelerated the production of melanocyte cells. Antioxidant protection was observed when the authors added hydrogen peroxide to the cells. It was observed that the viability of the cells decreased to almost 20% without *Bix*, while the viability was 100% in the presence of *Bix* [37]. In an in vivo study with rats aged 8–12 weeks, an increase in the expression of NrF2<sup>+/+</sup> and proteins correlated with this pathway was observed. Similar effects were observed with ionizing radiation. In the study in vivo, a decrease in the formation of reactive oxygen species, an activation of the NrF2 protein, and a 1.5-fold increase in glutathione levels as protection against DNA damage were observed upon treatment with *Bix* [58].

The antimicrobial effect of *BixO* was studied in surgical wounds infected with MRSA. Long-term supplementation with 100 mg/kg T3 was unable to alter the immune phenotype of splenocytes. They concluded that T3 plays an important role in potentiating antibiotic therapy for deep infections caused by virulent MRSA strains. The use of low-cost natural products with low toxicity could evolve into new antibiotic therapy strategies that potentiate the effect of drugs or act in isolation [41]. For this, studies are needed to analyze the antimicrobial activity of *BixO*.

The antioxidant, antiinflammatory, and antimicrobial effects of *BixO* in vivo and in vitro models presented in this systematic review point the way for further work, using the reports of the papers selected in this review as a starting point. The methodological quality and risk of bias in these studies were highlighted to facilitate the development of new strategies in these new studies. The dilutions, dosages, methodologies, and likely mechanisms of action of the selected articles were discussed and compared. The antioxidant, antiinflammatory, and antimicrobial effects of *BixO* were presented in this

systematic review. The methodological quality and risk of bias analysis could be a starting point for further studies.

## Limitations

In preparing this systematic review, several limitations were noted. First, there was heterogeneity in carotenoids, extraction characteristics, animal models, administration periods, and intervention concentrations, which made the meta-analysis infeasible. Most studies did not clearly specify allocation/randomization and blinding, which are required for risk of bias and quality assessment.

## Conclusion

The low production cost of *BixO* associated with its easy obtention favors its use in the healing wound industry. In addition, the use of *BixO* can boost the bioeconomy. The antioxidant, antimicrobial, and antiinflammatory properties of *BixO* are extensively related in the literature and this review can be used as referential to further studies as a starting point. Indeed, this review point to the new perspectives on studies translational favoring future clinical applicability of *BixO*.

## Supplementary material

Supplementary data related to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91294-5.00016-6>

## Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the support of the Cearense Foundation for Scientific and Technological Development (FUNCAP-CE). Research Program for Sistema Único de Saúde/PPSUS, Public Notice 02/2020, Ceará, Brazil. National Council for Scientific and Technological Development—CNPq.

### Author's contributions

The authors developed the idea and prepared, edited, and finalized the manuscript. The selection of articles was done in two phases: Review of titles and abstracts (Phase 1) and reading of the full text (Phase 2). In phase 1, two authors (Silva, A.K.A. and Santos, C.R.) reviewed the titles and abstracts of all references found in the electronic databases and selected the articles that appeared to meet the inclusion criteria. In phase 2, three pairs of authors (Silva, A.K.A.; Santos, C.R.; Abreu, P.R.A.; Pinheiro, W.M.; Fukuoka, F.M.G.; and Tatmatsu-Rocha, J.C.) independently analyzed the full text of the articles selected in phase 1 and excluded studies that did not meet the inclusion criteria. Brettas, M.C.; Joanitt, G.A.; Luz, G.V.S.; Rosa, M.F.F.; Rosa, S.S.R.F.; and revised the manuscript and prepared the graphical abstract. All authors contributed to the chapter and approved the submitted version.

### Funding

This study was supported by the Faculty of Medicine of the Federal University of Ceará, the University of Brasília under the Biomedical Engineering and Electrical Engineering Graduate Programs, and in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel in Brazil, the National Council for Scientific and Technological Development, and the Cearense Foundation for Scientific and Technological Development funded by Public Decree February 2020, SESA-Decit/SCTIE/MS-CNPq, process P20-0171-00117.01.01/20. The funders did not influence the study design, data collection, and analysis, decision to publish, or manuscript preparation.

### Availability of data and materials

The data sets used and/or analyzed in the current study are available upon request from the corresponding author. The original papers presented in the study are included in the chapter/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

### Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted without any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

## References

- [1] J.A. Ribeiro Neto, B.R. Pimenta Tarôco, H. Batista dos Santos, R.G. Thomé, E. Wolfram, R.I. Maciel de A Ribeiro, Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: from traditional use to scientific approach, *J. Ethnopharmacol.* 260 (October 2020) 112547. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037887411834306X>.
- [2] B. Kar, B. Chandar, S.S. Rachana, H. Bhattacharya, D. Bhattacharya, Antibacterial and genotoxic activity of *Bixa orellana*, a folk medicine and food supplement against multidrug resistant clinical isolates, *J. Herb. Med.* 32 (March 2022) 100502. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2210803321000828>.
- [3] J.A.A. Santos, M.F.A.M. Sousa, E.L.V. Silva, F.C. Aguiar Júnior, Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, *Rev. Bras. Plantas Med.* 16 (3 Suppl. 1) (2014) 637–643. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722014000700001&lng=pt.&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000700001&lng=pt.&tlng=pt).
- [4] R. Rivera-Madrid, M. Aguilar-Espinosa, Y. Cárdenas-Conejo, L.E. Garza-Caligaris, Carotenoid Derivates in achiote (*Bixa orellana*) seeds: synthesis and health promoting properties, *Front. Plant Sci.* (September 21, 2016) 7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.01406/abstract>.
- [5] Shahid-ul-Islam, L.J. Rather, F. Mohammad, Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications—a review, *J. Adv. Res.* 7 (3) (May 2016) 499–514. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123215001101>.
- [6] S.D.G. Pacheco, A.T. Gasparin, C.H.A. Jesus, B.B. Sotomaior, A.C.S.S.B. Ventura, D.D.B. Redivo, et al., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of bixin, a carotenoid extracted from the seeds of *Bixa orellana*, *Planta Med.* 85 (16) (November 23, 2019) 1216–1224. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1008-1238>.



- [7] J.A. Teixeira da Silva, J. Dobránszki, R. Rivera-Madrid, The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L. (achiote), *Planta* 248 (2) (August 10, 2018) 267–277. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-018-2909-7>.
- [8] D.R. Gómez-Linton, A. Navarro-Ocaña, A. Román-Guerrero, S. Alavez, L. Pinzón-López, J.A. Mendoza-Espinoza, et al., Environmentally friendly achiote seed extracts with higher  $\delta$ -tocotrienol content have higher in vitro and in vivo antioxidant activity than the conventional extract, *J. Food Sci. Technol.* 58 (7) (July 2, 2021) 2579–2588. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s13197-020-04764-0>.
- [9] Embrapa, Multimídia: Banco de Imagens, 2013. Available from: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1062002/pe-de-urucum>. (Accessed 30 November 2021).
- [10] G. Dequigiovani, S.L.F. Ramos, A. Alves-Pereira, E.G. Fabri, P.R.N. Carvalho, M.G. da Silva, et al., Genetic diversity and structure in a major Brazilian annatto (*Bixa orellana*) germplasm bank revealed by microsatellites and phytochemical compounds, *Genet. Resour. Crop Evol.* 64 (7) (October 20, 2017) 1775–1788. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10722-017-0535-z>.
- [11] M.G. Pires, Enriquecimento de norbixina por processos físico-químicos a partir de bixina de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) e avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana in vitro, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-13032019-173209/>.
- [12] S. Oliveira-Silva, J. de Carvalho, E. Pereira, L. da Cunha Lima-Melo, R. dos Santos-Araújo, Atividade antimicrobiana e caracterização físico-química de urucum (*Bixa orellana* L.) em diferentes estádios de maturação, *Rev. Bras. Prod. Agroind.* 20 (2018) 49–57.
- [13] D.D.A. Vilar, M.S.D.A. Vilar, T.F.A.D.L. Moura, F.N. Raffin, M.R.D. Oliveira, C.F.D.O. Franco, et al., Traditional uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa orellana* L.: a review, *Sci. World J.* 2014 (2014) 1–11. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/857292/>.
- [14] L.R.P. Lima, T.T.D. Oliveira, T.J. Nagem, A.D.S. Pinto, P.C. Stringheta, A.L.A. Tinoco, et al., Bixina, norbixina e quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos, *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38 (4) (2001) 196–200. Available from: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/issue/view/5890>.
- [15] G.G. Mckeown, E. Mark, The composition of oil-soluble annatto food colors, *J. AOAC Int.* 45 (3) (August 1, 1962) 761–766. Available from: <https://academic.oup.com/jaoac/article/45/3/761-766/5730898>.
- [16] Molviewsoft University of California. molview.org\_software®. Available from: <https://molview.org/>.
- [17] T. Taham, F.A. Cabral, M.A.S. Barrozo, Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies, *J. Supercrit. Fluids* 100 (May 2015) 175–183. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844615000674>.
- [18] F. Delgado-Vargas, A.R. Jiménez, O. Paredes-López, Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40 (3) (May 2000) 173–289. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690091189257>.
- [19] C. Prentice-Hernandez, O. Rusig, Extrato de urucum (*Bixa orellana* L.) obtido utilizando álcool etílico como solvente, *Arq. Biol. Tecnol.* 35 (1) (1992) 65–74.
- [20] D. Gatsou Djibersou, B. Rosnay Tietcheu Galani, P. Dieudonne Djamen Chuisseu, N. Yanou Njintang, Anti-oxidant and anti-inflammatory potential of aqueous extracts of leaves, barks and roots of *Bixa orellana* L. (Bixaceae) on acetaminophen-induced liver damage in mice,

- Avicenna J. *Phytomed.* 10 (4) (2020) 428–439. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32850299>.
- [21] Y. Yong, M. Somchit, Z. Ahmad, Anti-inflammatory properties of *Bixa orellana* leaves extract are associated with suppression of bradykinin-induced endothelial hyperpermeability, *Pharmacogn. Mag.* 14 (57) (July 1, 2018) 352–357. Available from: <http://www.phcog.com/article.asp?issn=0973-1296>.
- [22] V.K. Nathan, M.E. Rani, G. Rathinasamy, K. Narayanan Dhiraviam, Antioxidant and antimicrobial potential of natural colouring pigment derived from *Bixa orellana* L. seed aril, *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* 89 (1) (2019) 137–143.
- [23] S.M.B. Ul Islam, M.K. Hossain, I. Gomes, D.J. Gomes, S.R. Rahman, M.S. Rahman, et al., Antimicrobial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Bixa orellana* Linn, *Lat. Am. J. Pharm.* 30 (6) (2011) 1126–1134.
- [24] S.J. Stohs, Safety and efficacy of *Bixa orellana* (achiote, annatto) leaf extracts, *Phyther. Res.* 28 (7) (July 2014) 956–960. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.5088>.
- [25] A.C. Omonhinmin, I.P. Dike, S.O. Rotimi, Phytochemical, cytotoxicity and antioxidant activities of five anti-malaria plants, *Res. J. Med. Plant* 9 (2) (2015) 81–89.
- [26] J.A.C. Osorio, J.L.P. Daniel, J.F. Cabral, K.V. Almeida, K.L. Guimarães, M.R. Sippert, et al., Annatto seeds as antioxidants source with linseed oil for dairy cows, *Animals* 11 (5) (May 20, 2021) 1465. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/5/1465>.
- [27] L.F. Souza, N.D.S. Medeiros, P.C.P. dos Santos, C.H. Pagno, C.D. Nora, E.V. de Jong, et al., Antioxidants from annatto seeds as possible inhibitory agents of the hepatotoxicity induced by the antitumor agent cisplatin, *Nat. Prod. Commun.* (9) (September 1, 2016) 11, 1934578X1601100. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1934578X1601100909>.
- [28] C. Sepúlveda Rincón, G. Ciro Gómez, J. Zapata Montoya, Extracción de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote), *Rev. Cuba. Plantas Med.* 21 (2) (2016) 133–144.
- [29] D. Ajaghaku, N. Okorie, M. Okwor, C. Mbah, Evaluation of cancer chemopreventive potentials of *Bixa orellana* L. leaf extract, *Trop. J. Nat. Prod. Res.* 4 (9) (October 3, 2020) 636–642.
- [30] S.O. Capella, M.T. Tillmann, A.O.C. Félix, E.G. Fontoura, C.G. Fernandes, R.A. Freitag, et al., Potential cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 68 (1) (February 2016) 104–112. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352016000100104&lng=pt.&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352016000100104&lng=pt.&tlng=pt).
- [31] J. Li, Y. Yang, S. Wei, L. Chen, L. Xue, H. Tian, et al., Bixin protects against kidney interstitial fibrosis through promoting STAT6 degradation, *Front. Cell Dev. Biol.* (November 17, 2020) 8. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.576988/full>.
- [32] R.P. Louro, L.J.M. Santiago, Development of carotenoid storage cells in *Bixa orellana* L. seed arils, *Protoplasma* 253 (1) (January 19, 2016) 77–86. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00709-015-0789-2>.
- [33] S.M.M. Freire, Qualidade do Urucum (*Bixa orellana* L.) Produzido Pelos Agrocultores Familiares do Agreste Paraibano, 2017. Available from: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/15689/1/SMMF13092019.pdf>.
- [34] S.S. Kumar, B.G. Girish Patil, P. Giridhar, Mucilaginous polysaccharides from vegetative parts of *Bixa orellana* L.: their characterization and antioxidant potential, *J. Food Biochem.*

- 43 (3) (March 2019) e12747. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.12747>.
- [35] J. Quintero Quiroz, V. Velazquez, L.L. Corrales-Garcia, J.D. Torres, E. Delgado, G. Ciro, et al., Use of plant proteins as microencapsulating agents of bioactive compounds extracted from annatto seeds (*Bixa orellana* L.), Antioxidants 9 (4) (April 13, 2020) 310. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3921/9/4/310>.
- [36] R.C. Chisté, A.Z. Mercadante, A. Gomes, E. Fernandes, J.L.F. da Costa Lima, N. Bragagnolo, In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species, Food Chem. 127 (2) (July 2011) 419–426. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611000483>.
- [37] M. Rojo de la Vega, D.D. Zhang, G.T. Wondrak, Topical bixin confers NRF2-dependent protection against photodamage and hair graying in mouse skin, Front. Pharmacol. (March 27, 2018) 9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00287/full>.
- [38] M.R. de la Vega, G. Wondrak, D. Zhang, The apocarotenoid bixin protects mouse skin against UV-induced damage in an NRF2-dependent manner, Free Radic. Biol. Med. 112 (November 2017) 194. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584917310900>.
- [39] H. Sorg, D.J. Tilkorn, S. Hager, J. Hauser, U. Mirastschijski, Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts, Eur. Surg. Res. 58 (1–2) (2017) 81–94. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/454919>.
- [40] J.-Q. Ma, Y.-J. Zhang, Z.-K. Tian, C.-M. Liu, Bixin attenuates carbon tetrachloride induced oxidative stress, inflammation and fibrosis in kidney by regulating the Nrf2/TLR4/MyD88 and PPAR- $\gamma$ /TGF- $\beta$ 1/Smad3 pathway, Int. Immunopharmacol. 90 (January 2021) 107117. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576920335840>.
- [41] E. Pierpaoli, F. Orlando, O. Cirioni, O. Simonetti, A. Giacometti, M. Provinciali, Supplementation with tocotrienols from *Bixa orellana* improves the in vivo efficacy of daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a mouse model of infected wound, Phytomedicine 36 (December 2017) 50–53. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711317301290>.
- [42] A. Venugopalan, P. Giridhar, Bacterial growth inhibition potential of annatto plant parts, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2 (3) (January 2012) S1879–S1882. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169112605139>.
- [43] D. Medina-Flores, G. Ulloa-Urizar, R. Camere-Colarossi, S. Caballero-García, F. Mayta-Tovalino, J. del Valle-Mendoza, Antibacterial activity of *Bixa orellana* L. (achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 6 (5) (May 2016) 400–403. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115309485>.
- [44] A.T. Figueiredo-Junior, F.D.F. dos Anjos, F.D.C.D.M. Brito, V.G.F. Viana, S.S. Valença, M. Lanzetti, et al., Bixin loaded on polymeric nanoparticles: synthesis, characterization, and antioxidant applications in a biological system, Appl. Nanosci. 11 (1) (January 12, 2021) 63–78. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s13204-020-01555-z>.
- [45] J.V. Rossoni-Júnior, G.R. Araújo, B.D.C. Pádua, M.M. Chaves, M.L. Pedrosa, M.E. Silva, et al., Annatto extract and  $\beta$ -carotene modulate the production of reactive oxygen species/nitric oxide in neutrophils from diabetic rats, J. Clin. Biochem. Nutr. 50 (3) (2012) 177–183. Available from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcbtn/50/3/50\\_11-49/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcbtn/50/3/50_11-49/_article).
- [46] M.D.F. McInnes, D. Moher, B.D. Thombs, T.A. McGrath, P.M. Bossuyt, T. Clifford, et al., Preferred reporting items for a systematic review and meta-analysis of diagnostic test

- accuracy studies, *JAMA* 319 (4) (January 23, 2018) 388. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2670259>.
- [47] National Institute for Health Research, PROSPERO—International Prospective Register of Systematic Reviews, 2020. Available from: <https://www.crd.york.ac.uk/prospERO>. (Accessed 10 January 2021).
- [48] A.M. Methley, S. Campbell, C. Chew-Graham, R. McNally, S. Cheraghi-Sohi, PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews, *BMC Health Serv. Res.* 14 (1) (December 21, 2014) 579. Available from: <https://bmchealthservres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12913-014-0579-0>.
- [49] J. Chandler, J. McKenzie, I. Boutron, V. Welch (Eds.), *Cochrane Methods* 2016, October 2016. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD201601>.
- [50] J.A.C. Sterne, J. Savović, M.J. Page, R.G. Elbers, N.S. Blencowe, I. Boutron, et al., RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials, *BMJ* (August 28, 2019) 14898. Available from: <https://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.l4898>.
- [51] D. Moher, L. Shamseer, M. Clarke, D. Ghersi, A. Liberati, M. Petticrew, et al., Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement, *Syst. Rev.* 4 (1) (December 1, 2015) 1. Available from: <https://systematicreviewsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-4053-4-1>.
- [52] B. Hutton, G. Salanti, D.M. Caldwell, A. Chaimani, C.H. Schmid, C. Cameron, et al., The PRISMA extension statement for reporting of systematic reviews incorporating network meta-analyses of health care interventions: checklist and explanations, *Ann. Intern. Med.* 162 (11) (June 2, 2015), 777–784. Available from: <https://www.acpjournals.org/doi/10.7326/M14-2385>.
- [53] A.D. Pinzón-García, P. Cassini-Vieira, C.C. Ribeiro, C.E. de Matos Jensen, L.S. Barcelos, M.E. Cortes, et al., Efficient cutaneous wound healing using bixin-loaded PCL nanofibers in diabetic mice, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 105 (7) (October 2017), 1938–1949. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.b.33724>.
- [54] Leiden University - Center for Science and Technology Studies, VOSviewer—Visualizing Scientific Landscapes. CWTS—Meaningful Metrics (2021). Available from: <https://www.vosviewer.com/>.
- [55] L.D.S. Nascimento, R.A. Nicolau, A.L.M. Maia Filho, J.Z.L.V. Santos, K.M. Fonseca, D.C.L. Ferreira, et al., Effect of norbixin-based poly(hydroxybutyrate) membranes on the tendon repair process after tenotomy in rats, *Acta Cirúrgica Bras.* 34 (11) (November 2019). Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502019001100215&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502019001100215&tlng=en).
- [56] L.D.S. Nascimento, R.A. Nicolau, A.L.M. Maia Filho, K.F.S. Nascimento, J.Z.L.V. Santos, R.C. de Sousa, et al., Effect of low intensity photobiomodulation associated with norbixin-based poly (hydroxybutyrate) membrane on post-tenotomy tendon repair. In vivo study, *Acta Cirúrgica Bras.* 35 (3) (2020). Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502020000300204&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502020000300204&tlng=en).
- [57] R. Machado Piva, A. Cristina Batista Rodrigues Johann, C. Kocler Costa, O. Gomez Miguel, E. Ribeiro Rosa, L. Reis de Azevedo-Alanis, et al., Bixin action in the healing process of rats mouth wounds, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14 (9) (2013) 785–791. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpb/2013/00000014/00000009/art00001>.
- [58] C.J. Schmidlin, M. Rojo de la Vega, J. Perer, D.D. Zhang, G.T. Wondrak, Activation of NRF2 by topical apocarotenoid treatment mitigates radiation-induced dermatitis, *Redox*

- Biol. 37 (October 2020) 101714. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231720309198>.
- [59] S. Tao, S.L. Park, M.R. de la Vega, D.D. Zhang, G.T. Wondrak, Systemic administration of the apocarotenoid bixin protects skin against solar UV-induced damage through activation of NRF2, *Free Radic. Biol. Med.* 89 (December 2015) 690–700. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584915006061>.
- [60] A.P.R. Bitencourt, J.L. Duarte, A.E.M.F.M. Oliveira, R.A.S. Cruz, J.C.T. Carvalho, A.T.A. Gomes, et al., Preparation of aqueous nanodispersions with annatto (*Bixa orellana* L.) extract using an organic solvent-free and low energy method, *Food Chem.* 257 (August 2018) 196–205. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618303030>.
- [61] O.A. Conrad, I.P. Dike, U. Agbara, In vivo antioxidant assessment of two antimalarial plants—*Allamanda cathartica* and *Bixa orellana*, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3 (5) (May 2013) 388–394. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169113600829>.
- [62] C.C. Garcia, P.I.B.M. Franco, T.O. Zuppa, N.R. Antoniosi Filho, M.I.G. Leles, Thermal stability studies of some cerrado plant oils, *J. Therm. Anal. Calorim.* 87 (3) (March 7, 2007) 645–648. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-006-7769-x>.
- [63] Association of the Official Analytical Chemists (AOAC), *Official Methods of Analysis of the Association of the Official Analytical Chemists, 2022*. Available from: <https://www.aoac.org/>.
- [64] D.B. Rodriguez-Amaya, M. Kimura, J. Amaya-Farfan, *Fontes brasileiras de carotenoides. Tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos* Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2008.
- [65] A.L. Titan, D.S. Foster, J. Chang, M.T. Longaker, Flexor tendon, *Plast. Reconstr. Surg.* 144 (4) (October 2019) 639e–647e. Available from: <http://journals.lww.com/00006534-201910000-00028>.
- [66] S.S.R.F. Rosa, M.F.F. Rosa, M.P. Marques, G.A. Guimarães, B.C. Motta, Y.C.L. Macedo, et al., Regeneration of diabetic foot ulcers based on therapy with red LED light and a natural latex biomembrane, *Ann. Biomed. Eng.* 47 (4) (April 1, 2019) 1153–1164. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10439-019-02220-5>.
- [67] L. dos Santos Mendes-Costa, V.G. de Lima, M.P.R. Barbosa, L.E. dos Santos, S. de Siqueira Rodrigues Fleury Rosa, J.C. Tatmatsu-Rocha, Photobiomodulation: systematic review and meta-analysis of the most used parameters in the resolution diabetic foot ulcers, *Lasers Med. Sci.* 36 (6) (August 15, 2021) 1129–1138. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10103-020-03192-y>.
- [68] L. Zhao, T. Johnson, D. Liu, Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases, *Stem Cell Res. Ther.* 8 (1) (December 5, 2017) 125. Available from: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0578-2>.
- [69] R. Mirza, T.J. Koh, Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice, *Cytokine* 56 (2) (November 2011) 256–264. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466611002080>.
- [70] J.C. Tatmatsu-Rocha, C.A. de Castro, M. Sene-Fiorese, N.A. Parizotto, Light-emitting diode modulates carbohydrate metabolism by pancreatic duct regeneration, *Lasers Med. Sci.* 32 (8) (November 3, 2017) 1747–1755. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10103-017-2245-3>.

## **CAPÍTULO V**

Marketing científico – Ilustração de plataformas *Organs-on-a-chip*: funcionamento, aplicações e potencialidades.

## 5.1 MARKETING CIENTÍFICO: *ORGAN-ON-A-CHIP* E SUAS APLICAÇÕES

O *design* de *marketing* científico que criamos tem como objetivo disseminar informações essenciais sobre as potencialidades, aplicações e funcionamento da plataforma. Através deste material, buscamos apresentar essa inovadora tecnologia que replica órgãos humanos em miniatura para fins de pesquisa e testes, permitindo avanços significativos na área da biomedicina.

Com esse material, esperamos alcançar um amplo público interessado em ciência, pesquisadores, profissionais da área médica e estudantes, oferecendo a eles a oportunidade de compreender melhor o potencial e as possibilidades oferecidas pela tecnologia. É fundamental que o conhecimento seja divulgado e acessível a todos, pois isso pode acelerar pesquisas científicas e o desenvolvimento de novos tratamentos e medicamentos. A disponibilidade gratuita do material visa promover a democratização da informação, permitindo que pesquisadores e profissionais de saúde de diversas áreas tenham acesso a conhecimentos que podem beneficiar suas atividades e contribuir para o avanço da medicina.

Para acessar gratuitamente o material sobre o OoC, acesse: <https://prezi.com/view/AI1QZnDIJrtn96UCFDya/>

## **CAPÍTULO VI**

Discussão:

- Aspectos éticos e regulatórios
- Pesquisa translacional no Brasil
- Visão da engenharia biomédica



## **6.1 CRITÉRIOS DE PADRONIZAÇÃO, CONFIABILIDADE, *UPSCALING* E REDUÇÃO DE CUSTOS PARA PROMOÇÃO DA PESQUISA TRANSLACIONAL ENVOLVENDO *ORGAN-ON-A-CHIP***

Muitos medicamentos podem não apresentar efeitos adversos em animais durante a fase pré-clínica, mas podem demonstrar danos hepáticos, cardíacos ou renais imprevisíveis em pacientes durante os ensaios clínicos. Portanto, a avaliação da toxicidade e eficácia é vital durante a fase tardia do desenvolvimento pré-clínico e nos ensaios clínicos. Nesse sentido, os *Organ-on-a-Chip* humanos podem servir como uma ferramenta útil para a avaliação eficiente e precisa da toxicidade de medicamentos antes da aprovação para uso em ensaios clínicos [6]. Conforme as evidências dispostas nas revisões sistemáticas, apesar de serem uma abordagem promissora, ainda faltam processos relacionados à fabricação, testes e legislações mundiais para que estes dispositivos possam ser incorporados na PTS.

A parceria entre universidades, órgãos reguladores e indústria privada desempenha um papel fundamental na validação dos dispositivos. Essa colaboração é essencial para garantir a confiabilidade, segurança e eficácia desses dispositivos, bem como para impulsionar a sua adoção e aplicação clínica. As universidades trazem o conhecimento científico e a experiência em pesquisa e desenvolvimento, enquanto os órgãos reguladores fornecem o conhecimento das normas e regulamentos necessários para garantir a conformidade regulatória. Por sua vez, a indústria privada contribui com a experiência em produção em escala, fabricação e comercialização dos dispositivos.

A parceria permite a realização de ensaios e estudos robustos, que são essenciais para validar a eficácia e segurança dos dispositivos OoC. Além disso, a colaboração entre essas entidades promove a troca de conhecimentos, estimula a inovação e acelera o processo de desenvolvimento e aprovação dos dispositivos. Essa sinergia entre universidades, órgãos reguladores e indústria privada é fundamental para impulsionar avanços na área de *Organ-on-a-Chip*, permitindo o desenvolvimento de soluções médicas mais precisas, personalizadas e eficazes para o benefício da saúde e bem-estar das pessoas.

A ampla adoção de modelos OoC é prejudicada pela falta de informações sobre sua confiabilidade e relevância. É essencial caracterizar e qualificar esses dispositivos para fornecer confiança aos usuários finais e reguladores. Isso envolve selecionar modelos

relevantes com base em resultados específicos, realizar estudos com compostos de referência, garantir a qualidade das culturas de células, demonstrar eficácia em comparação com os perfis *in vivo* e garantir a reprodutibilidade dos resultados. Propõe-se que estudos de qualificação sejam conduzidos por terceiros, e iniciativas e infraestruturas regionais estão sendo desenvolvidas, com bancos de dados públicos para armazenar dados de qualificação e promover a adoção dos modelos OoC. A coordenação internacional também é importante para compartilhar conhecimento e recursos [65].

Em um ensaio promissor comparativo, fruto de uma parceria entre a FDA e a empresa *Emulate*, OoCs de fígado humano (*Human Liver Organ-Chip*), foram avaliados para analisar a segurança de OoCs em um cenário regulatório. O objetivo era determinar a utilidade desses sistemas em comparação com os modelos tradicionais *in vivo* e *in vitro*. Para isso, foi utilizado o ácido diglicólico (DGA), uma hepatotóxina conhecida, em hepatócitos humanos primários criopreservados. O DGA foi testado em concentrações de 1 a 20 mM tanto no *Liver-Chip* quanto em placas multi-poços tradicionais. Os resultados mostraram que concentrações de 10 mM e 20 mM de DGA foram severamente citotóxicas em ambas as plataformas, enquanto 5 mM foi levemente citotóxico apenas no *Liver-Chip*.

Além disso, algumas funções dos hepatócitos foram reduzidas com 5 mM de DGA no *Liver-Chip* e 1 mM nas placas multi-poços. Observou-se que os efeitos dos poços individuais foram mais pronunciados ou ocorreram mais cedo do que nos chips de fígado. A análise do desempenho do *Liver-Chip* revelou baixa variabilidade para parâmetros bioquímicos, mas maior variabilidade para parâmetros de imagem. A sensibilidade e especificidade do *Liver-Chip* foram altas, sendo necessário apenas 3-4 *Liver-Chips* para detectar um efeito.

A plataforma mostrou resultados mais fisiologicamente relevantes, possivelmente devido à remoção de produtos residuais e à adição de sinais de sobrevivência de células endoteliais hepáticas. No entanto, algumas diferenças foram observadas entre as plataformas, indicando que algumas observações podem ser específicas para cenários *in vivo* ou requerer a presença de outros tipos de células. Estudos adicionais são necessários para entender melhor essas diferenças, incluindo estudos mecanísticos, duração mais longa dos experimentos e uso de outros tipos de células hepáticas [37].

Conforme apresentado, a validação destes dispositivos está caminhando, todavia, existem diversos aspectos a serem considerados além de ensaios e parcerias entre órgãos

regulamentadores, indústrias e universidades. A padronização e o *upscaling* de dispositivos OoC são aspectos fundamentais para promover o avanço e a aplicação dessas tecnologias na pesquisa e na indústria. A padronização refere-se à definição de diretrizes, normas e protocolos que permitem a replicação e a comparação de resultados entre diferentes laboratórios e estudos. Isso é essencial para garantir a confiabilidade e a validade dos dados gerados pelos dispositivos OoC.

O *upscaling* envolve a transição dos dispositivos OoC de um ambiente de laboratório para uma produção em larga escala. Isso implica na adaptação dos processos de fabricação, no aumento da capacidade de produção e na garantia da qualidade e consistência dos dispositivos em grande escala. Além disso, também pode envolver a otimização dos materiais utilizados, a melhoria dos métodos de fabricação e a implementação de estratégias de automação para aumentar a eficiência e reduzir os custos de produção.

A construção desses chips requer consideração abrangente e sistemática de vários fatores biológicos e técnicos, como a escala e integração dos órgãos, mas a multidimensionalidade do corpo humano apresenta desafios. Além disso, a resposta dos pacientes aos medicamentos é frequentemente variável devido a heterogeneidades genéticas e microambientais, o que torna necessária uma avaliação precisa da eficácia terapêutica e otimização para cada paciente. O uso de OoC com células primárias de doadores saudáveis e pacientes demonstra a viabilidade da avaliação das respostas específicas de cada paciente em um ambiente organotípico [6], [66], [67].

Para promover a transição dos OoCs e sua adoção generalizada, é fundamental simplificar, padronizar e reduzir os custos associados a esses modelos. A simplificação envolve a otimização dos processos de fabricação, reduzindo a complexidade e a variabilidade entre os diferentes dispositivos. A padronização é essencial para estabelecer diretrizes e protocolos comuns, garantindo a consistência e comparabilidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios. Além disso, a redução dos custos é um fator crítico para permitir que os OoCs sejam mais acessíveis e amplamente utilizados.

O uso de bombas para alimentação de OoC é uma aplicação comum nessa área de pesquisa e desenvolvimento. Os OoCs são dispositivos microfluídicos que reproduzem as funções de órgãos humanos em escala reduzida, permitindo estudos mais precisos e eficientes em áreas como farmacologia, toxicologia e pesquisa médica. As bombas são essenciais nos

OoCs para controlar o fluxo de fluidos que simula a circulação sanguínea ou outros processos biológicos. Essas bombas fornecem pressão e fluxo controlados, permitindo que os fluidos se movam através dos canais microfluídicos, onde ocorrem as interações celulares e análises. Todavia, existem dispositivos que funcionam sem bomba externa, dependendo da gravidade e dos microcanais para exercer este papel [4].

Ao eliminar as bombas externas, essas plataformas oferecem vantagens, como maior simplicidade, menor custo e maior facilidade de uso, ao mesmo tempo em que mantêm a funcionalidade e a relevância biológica. A operabilidade de uso simplificada e a esterilidade são mantidas com maior facilidade, além de um acesso mais fácil para manuseio de líquidos [3]. Além disso, a utilização da gravidade como força motriz permite a melhor acomodação dos dispositivos, ofertando maior espaço, uma vez que inúmeros OoCs podem ser acomodados lado a lado.

A adoção de OoCs autônomos possui grande potencial para aplicação de sistemas de alto rendimento, como necessário para a indústria farmacêutica. Outro benefício está relacionado a redução na adsorção indesejada de drogas nas superfícies, visto que a proposta reduz significativamente a área de superfície exposta. Ainda, a solução está associada a um melhor desempenho da cultura de células, uma vez que impedem a formação de bolhas por conta da flutuabilidade, este problema notório que aflige a maioria dos chips, e muitas vezes leva ao fracasso do experimento [3], [4].

Todavia, durante a construção de dispositivos autônomos, uma relação de suma importância a ser considerada na definição do sistema, é a relação fluxo e ângulo de inclinação. O fluxo é movimentado por meio de plataformas de reservatórios de acesso aberto e gravidade, como citado anteriormente. Ao projetar as dimensões do canal e o ângulo de inclinação, é possível controlar a taxa de fluxo dos líquidos no sistema. pode atingir uma ampla gama de taxas de fluxo adequadas para sistemas OoC, variando de submicrolitros a mililitros por minuto. Isso é alcançado modificando o ângulo de inclinação dos canais. Portanto, o ângulo de inclinação desempenha um papel fundamental na determinação da taxa de fluxo alcançada. É importante destacar que uma vez que os chips são fabricados e os componentes fluídicos estão integrados, as proporções das taxas de fluxo entre os órgãos são fixas. No entanto, ainda é possível ajustar as taxas de fluxo gerais modificando o ângulo de inclinação [3], [4].

Um sistema *HSE-on-a-chip* (Equivalente de Pele Humana) foi projetado para permitir a manutenção de longo prazo de HSEs de forma livre de bombas, com baixo custo. As dimensões dos microcanais foram determinadas com base em tempos de residência fisiologicamente relevantes, utilizando taxas de perfusão sanguínea e volumes de órgãos previamente relatados para a pele humana adulta. Essa abordagem de dimensionamento baseado no tempo de residência foi utilizada para alcançar o transporte fisiológico de moléculas e facilitar a integração do *HSE-on-a-chip* com outros modelos de órgãos em chip, como fígado ou trato gastrointestinal.

O fluxo do meio de cultura, impulsionado pela gravidade, foi criado e redirecionado através de uma plataforma oscilante. A frequência de oscilação de 2 ciclos por minuto foi escolhida para garantir uma taxa de fluxo estável e tempo de residência adequado, evitando variações não uniformes na distribuição de moléculas. O *HSE-on-a-chip* operou com um requisito mínimo de meio de 125 µl por dia, que é quase 36 vezes menor do que a quantidade de meio necessária em culturas convencionais em *transwell*, facilitando a medição de substâncias que atravessam a barreira da pele [4].

O estudo também demonstrou a capacidade de manutenção a longo prazo do HSE-on-a-chip em comparação com amostras de controle em placas de *transwell*. A integridade das camadas dérmicas e epidérmicas, bem como a atividade proliferativa dos queratinócitos basais, foram avaliadas ao longo de quatro semanas. Os resultados mostraram a formação adequada das camadas dérmicas e epidérmicas, bem como a preservação da atividade proliferativa dos queratinócitos basais nas amostras tratadas e não tratadas. Além disso, a função de barreira da pele foi avaliada ao longo de três semanas, e os resultados indicaram que a permeabilidade de oligonucleotídeos através do *HSE-on-a-chip* se manteve estável ao longo do tempo. Além disso, o efeito tóxico do fármaco doxorrubicina nas células da pele também foi avaliado, demonstrando sua capacidade de causar efeitos adversos na proliferação e diferenciação dos queratinócitos [4].

Para que haja uma adoção efetiva pelo setor farmacêutico, os dispositivos OoC precisam ter uma boa relação de custo-benefício, com resultados confiáveis e fáceis de operar. Portanto, pesquisas na linha de dispositivos 3D estão cada vez mais incorporando a ideia de adesão à sistemas autônomos e de baixo custo, com coleta de dados de respostas funcionais e fisiológicas. É considerado autônomo quando o sistema não precisar de bombas ou circuitos

externos, sendo substituídos por padrões não-invasivos e não destrutivos, como registros elétricos *in situ* ou interrogatório óptico [3].

Embora haja avanços promissores nas tecnologias microfluídicas no campo biomédico, ainda falta a criação de métodos de teste padrão para validar aspectos fundamentais como fabricação, desempenho e segurança dos dispositivos. A padronização é crucial para o desenvolvimento e adoção generalizada da microfluídica. Um desafio comum enfrentado pelos sistemas microfluídicos é o vazamento não intencional, que pode prejudicar o funcionamento adequado e apresentar riscos de segurança [68].

Sem métodos de teste padronizados, pequenas empresas podem ter dificuldades em desenvolver e validar seus próprios métodos, além de enfrentar desafios regulatórios. Órgãos reguladores, como a FDA, podem precisar trabalhar individualmente com as empresas para criar planos de teste específicos. Essas abordagens alternativas são ineficientes em termos de custo, recursos e interpretação dos resultados. Com o aumento da comercialização de dispositivos microfluídicos, torna-se evidente a necessidade de abordagens consistentes e simplificadas para avaliar dispositivos semelhantes. A padronização nesse campo emergente impulsionará a comercialização e tornará o processo de envio mais consistente para órgãos reguladores [69].

A diversidade dos materiais e processos de fabricação é um obstáculo significativo para o crescimento da microfluídica. Essa diversidade depende se o produto está sendo fabricado em um ambiente de pesquisa acadêmica ou em uma instalação de produção em massa para fins comerciais. Os acadêmicos geralmente são motivados pela compreensão científica e pela obtenção de bolsas de pesquisa, enquanto muitos professores e pesquisadores associados têm a esperança de que suas melhores ideias e invenções sejam comercializadas no futuro, seja através de uma empresa derivada ou por meio do licenciamento de patentes [69] (**Figura 6**).

No entanto, muitos experimentos de prova de conceito realizados no ambiente acadêmico utilizam materiais que são adequados apenas para a produção de dispositivos em pequena escala. Isso dificulta a transição desses conceitos inovadores para a produção em larga escala, onde são necessários materiais e processos de fabricação diferentes. Portanto, a falta de materiais e processos padronizados e escaláveis é um desafio para o crescimento da microfluídica [69]. As seguintes perguntas gerais devem sempre serem consideradas antes de iniciar o desenvolvimento deste tipo de produto (**Quadro 6.1**):

**Quadro 6.1.** Perguntas inerentes ao desenvolvimento e aplicação de plataformas *Organs-on-a-chip* no mercado, com intenção de simplificar o processo e garantir a qualidade por meio de padrões e diretrizes.

---

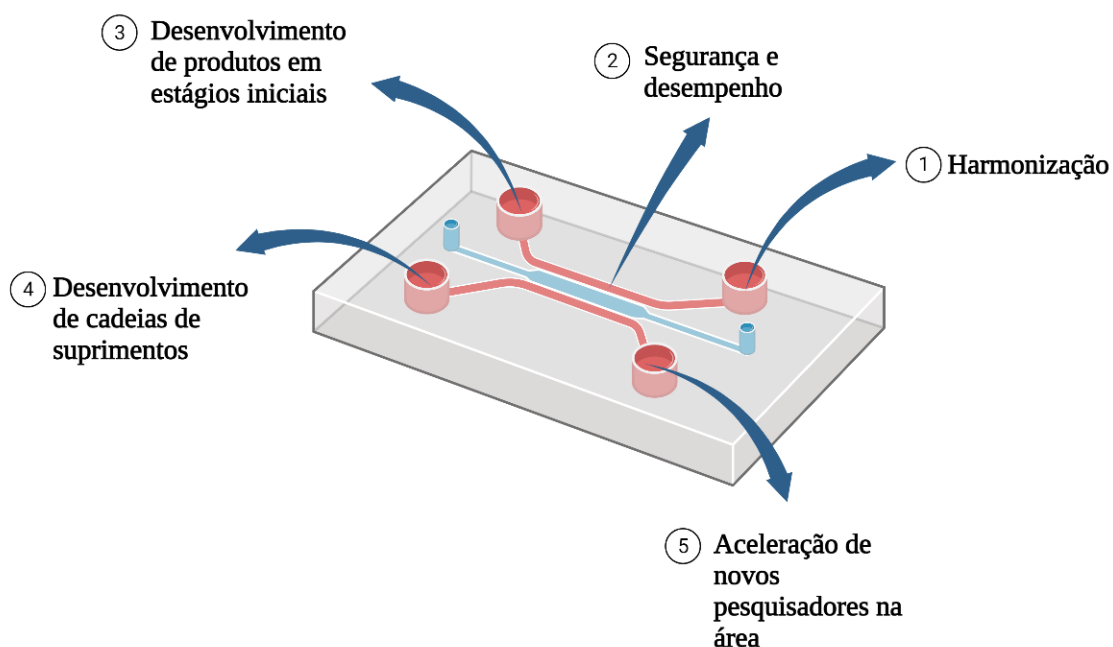
1. **Qual é o potencial de mercado do *Organ-on-a-chip*?**
  2. **O *Organ-on-a-chip* permite medições de ponto único ou ensaios multiplexados?**
  3. **Qual é a necessidade de saúde pública que o *Organ-on-a-chip* aborda e qual problema ele ajuda a resolver?**
  4. **Quais são os resultados desejados e necessários pelos clientes do *Organ-on-a-chip*?**
  5. **O *Organ-on-a-chip* é uma alternativa a soluções existentes no mercado?**
  6. **Qual é o benefício para o cliente ao adotar o *Organ-on-a-chip* ou por que eles mudariam para esse novo produto?**
  7. **Quais são os volumes de amostra e consumíveis necessários para o uso do *Organ-on-a-chip*, e quais são os custos recorrentes, o preço de venda e as margens de lucro de longo prazo?**
- 

Fonte: Adaptado de [69].

Em dispositivos terapêuticos, vazamentos inesperados podem apresentar riscos de biocompatibilidade, toxicidade e segurança para o paciente. Em sistemas de administração de medicamentos, vazamentos podem impedir a entrega adequada da dose pretendida. Avaliar o risco de segurança, identificar e quantificar vazamentos, além de tomar medidas corretivas, é necessário nessas situações. No entanto, em alguns sistemas microfluídicos, um certo nível de vazamento pode ser tolerável, dependendo da aplicação. Se o vazamento não representar ameaça à segurança do usuário ou ao ambiente, especificações baseadas em normas de exposição máxima podem ser suficientes, juntamente com informações detalhadas nas instruções de uso sobre as implicações de vazamentos observados [68].

Uma pesquisa realizada pela *The Microfluidics Association* [70], indica que muitos desenvolvedores de dispositivos têm utilizado seus próprios protocolos internos para testar e detectar vazamentos há décadas, principalmente porque ainda não existem protocolos padronizados para atender essa necessidade na escala micro. No entanto, a harmonização desses esforços é de extrema importância agora que o número de submissões de dispositivos

médicos baseados em microfluídica para agências regulatórias, como a Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, está aumentando constantemente. Um levantamento anterior com mais de 100 organizações na área de microfluídica constatou que "vazamento" foi identificado como um dos modos de falha mais comuns durante a operação dos dispositivos. A comunidade reconhece que métodos de teste padronizados para avaliar vazamentos em microfluídica são imprescindíveis ao longo de todo o ciclo de vida do produto, desde a prototipagem até a comercialização.



Created in **BioRender.com** 

**Figura 6.** Fatores relacionados a ampla adoção de dispositivos *Organs-on-a-chip*. 1. Harmonização - A harmonização evita redundâncias e conflitos entre estratégias de teste padronizadas desenvolvidas independentemente por laboratórios de pesquisa e desenvolvimento. Ela é essencial para avaliação de produtos, desenvolvimento e aprovação, podendo reduzir a necessidade de estudos em animais e dados clínicos. 2. Segurança e desempenho - Métodos de teste padronizados permitem comparação direta de segurança e desempenho entre produtos similares ou limiares estabelecidos de segurança. São geralmente simples e não exigem equipamentos especializados e caros. 3. Desenvolvimento de produtos em estágios iniciais - Os padrões auxiliam pesquisadores no estágio inicial do desenvolvimento de produtos, preparando-os para o ciclo de vida completo do produto por meio de um caminho definido para comercialização. 4. Desenvolvimento de cadeias de suprimentos - Padrões para materiais, fabricação e testes promovem o estabelecimento de cadeias de suprimentos industriais, reduzindo os custos desde pesquisadores básicos até fabricantes do produto final. 5. Aceleração de novos na área - Padrões permitem que usuários "não especialistas" utilizem componentes microfluídicos como ferramentas, sem a necessidade de compreender profundamente os mecanismos por trás do sistema. Isso facilita a entrada de novos atores no campo. Fonte: Adaptado de [69].



A ISO 22916:2022 é uma norma internacional que estabelece requisitos de interoperabilidade para dimensões, conexões e classificação inicial de dispositivos microfluídicos. Essa norma tem como objetivo fornecer diretrizes para padronizar aspectos técnicos e de *design* de dispositivos microfluídicos, permitindo a compatibilidade e a interoperabilidade entre diferentes dispositivos fabricados por diversos fabricantes. A padronização desses requisitos facilita a integração e o intercâmbio de dispositivos microfluídicos, promovendo avanços no desenvolvimento e na aplicação dessas tecnologias [71].

## **6.2 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA APLICADA A DISPOSITIVOS MICRO FISIOLÓGICOS EM SAÚDE**

O princípio dos 3Rs (*replacement, reduction, and refinement*) foi estabelecido como um marco para a pesquisa animal, com o objetivo de desenvolver abordagens alternativas que evitem o uso de animais [72]. No Brasil, ainda não existem leis específicas voltadas exclusivamente para a regulamentação do uso de *organ-on-a-chip* (OoC) ou modelos alternativos. No entanto, o país tem avançado no reconhecimento e validação de métodos alternativos por meio de iniciativas como a Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama) e o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM). Através de resoluções normativas e deliberações da Anvisa, métodos alternativos validados pela OCDE têm sido reconhecidos e estabelecidos prazos para sua adoção obrigatória.

Embora a legislação específica ainda esteja em desenvolvimento, o Brasil tem mostrado um compromisso com a promoção de métodos alternativos, incluindo modelos OoC, visando à redução do uso de animais em experimentos científicos.[73]. No Quadro 6.2 abaixo, dispomos as principais legislações relacionadas a métodos alternativos, incluindo um panorama estadual conforme um artigo publicado pelo Grupo Kosmoscience Ciência e Tecnologia Cosmética Ltda [20], [73] (**Quadro 6.2**).

**Quadro 6.2.** Legislações brasileiras que estão relacionadas a implementação de métodos alternativos ao uso de animais.

<b>Legislação e portarias sobre a proibição do uso de animais em pesquisa de produtos cosméticos e artigos de higiene no Brasil</b>	
<b>Legislação</b>	<b>Descrição</b>
Lei Nº 6.638/1979 (Lei Arouca Original)	A primeira legislação brasileira específica para a proteção dos animais utilizados em atividades de ensino e pesquisa científica. Estabelece princípios éticos e critérios para a experimentação animal e incentiva o desenvolvimento e adoção de métodos alternativos
Lei Nº 9.605/1998 (Lei de Crimes Ambientais)	Estabelece as sanções penais e administrativas para condutas lesivas ao meio ambiente, incluindo o uso indevido de animais em pesquisas. A lei promove a proteção dos animais e incentiva a utilização de métodos alternativos sempre que possível.
Lei Nº 11.794/2008 (Lei Arouca)	Regulamenta o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, estabelecendo princípios éticos e critérios para a realização de experimentação animal. A lei incentiva a adoção de métodos alternativos sempre que possível.
Portaria Interministerial Nº 141/2016	Institui o Grupo de Trabalho (GT) para o Desenvolvimento e Implementação de Métodos Alternativos no Brasil. O GT tem como objetivo promover a pesquisa, o desenvolvimento e a implementação de métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa.
Lei Nº 13.872/2019	Descrição: Altera a Lei Arouca e proíbe o uso de animais vivos em atividades de ensino, experimentação e pesquisa de cosméticos, produtos de higiene pessoal, perfumes e seus componentes. Estimula o desenvolvimento e a adoção de métodos alternativos para testes nessa área.
<b>Legislações estaduais brasileiras sobre a proibição do uso de animais em pesquisa de produtos cosméticos e artigos de higiene</b>	
<b>Estado</b>	<b>Legislação</b>
São Paulo	Lei Estadual n.º 15.316, de 23 de janeiro de 2014
Mato Grosso do Sul	Lei Estadual n.º 4.538, de 3 de junho de 2014
Paraná	Lei Estadual n.º 18.668, de 22 de dezembro de 2015
Pará	Lei Estadual n.º 8.361, de 11 de maio de 2016
Rio de Janeiro	Lei Estadual n.º 7.814, de 15 de dezembro de 2017
Minas Gerais	Lei Estadual n.º 23.050, de 25 de julho de 2018
Amazonas	Lei Estadual n.º 289, de 3 de dezembro de 2015

Fonte: Adaptado de [66] p.3 e [15].

### **6.3 ORGANS-ON-A-CHIP E SUA RELAÇÃO COM A QUARTA REVOLUÇÃO INDUSTRIAL**

A Quarta Revolução Industrial, também conhecida como Indústria 4.0, é um estágio avançado da produção industrial que envolve a digitalização em larga escala e a integração de novas tecnologias, como Inteligência Artificial, Sistemas Ciberfísicos, Internet das Coisas, *Big Data* e Manufatura Aditiva. Essa revolução está transformando os modelos de negócios existentes, alterando as estruturas de mercado e redistribuindo a participação global. A transformação digital abrange processos, produtos e modelos de negócios, proporcionando maior eficiência, flexibilidade e redução de prazos. A Indústria 4.0 também apresenta desafios regulatórios, levando os países a desenvolver ações regulatórias ágeis que apoiem a inovação, protejam a sociedade e fortaleçam a economia. O papel da regulação precisa ser modernizado para estimular a inovação, proteger os cidadãos e promover uma economia mais eficiente, com órgãos governamentais atuando como reguladores [74].

A relação entre a Indústria 4.0 e os *Organs-on-a-Chip* é baseada na convergência de tecnologias avançadas e na transformação digital que está ocorrendo em várias indústrias, incluindo a área da saúde e da biotecnologia. Tanto a Indústria 4.0 quanto os OoCs são impulsionados por inovações tecnológicas que visam melhorar a eficiência, a precisão e a personalização dos processos. É perceptível a convergência entre a Indústria 4.0 e os OoCs está ocorrendo em várias áreas. Ambas compartilham a visão de aplicar tecnologias avançadas para melhorar a eficiência e a qualidade dos processos. A aplicação das tecnologias da Indústria 4.0 nos OoCs impulsiona a pesquisa biomédica, a descoberta de medicamentos e o avanço da medicina personalizada, abrindo caminho para tratamentos mais eficazes e seguros.

## **CAPÍTULO VII**

### Considerações Finais

## 7.1 CONCLUSÃO

Em conclusão, por meio das revisões sistemáticas conduzidas neste trabalho, foi possível identificar as principais lacunas na literatura relacionadas aos dispositivos *organ-on-a-chip* (OoC) e o potencial de biomaterial encontrados no bioma brasileiro que poderiam ser incorporados em terapias.

Uma das limitações identificadas foi a escassez de estudos que abordassem especificamente a análise de feridas diabéticas em OoC, o que representa uma lacuna significativa na pesquisa nacional e internacional. Essa falta de investigações específicas sobre o assunto impacta negativamente a compreensão e o desenvolvimento de terapias direcionadas a esse importante problema de saúde pública.

Através deste trabalho, procuramos mostrar direcionamentos futuros em relação da aplicabilidade dos OoCs em um importante problema de saúde mundial, diminuir gastos públicos em saúde e promover terapias mais eficazes. Embora ainda não haja uma regulamentação específica para os dispositivos OoC, existem normas que podem ser incorporadas durante as pesquisas, garantindo a segurança e a ética nas investigações científicas.

Promover a pesquisa translacional com OoCs é de suma importância, pois isso pode resultar em estudos com maior previsibilidade, reduzindo o tempo entre a bancada de pesquisa e a implementação do equipamento na indústria. Essa abordagem também estimula a inovação científica no Brasil, permitindo que os achados dessa pesquisa tenham um impacto direto na saúde da população e no desenvolvimento de novas terapias e produtos.

Portanto, é essencial que sejam realizados esforços contínuos para preencher as lacunas na literatura, especialmente no que diz respeito ao estudo de feridas diabéticas em OoCs. É fundamental que as entidades reguladoras acompanhem os avanços tecnológicos e promovam a criação de regulamentações adequadas para garantir a segurança e a eficácia desses dispositivos.

## 7.2 TRABALHOS FUTUROS

De maneira geral, o núcleo *Organ.on.a.chip* objetiva o desenvolvimento de um dispositivo *organ-on-a-chip* personalizado, voltado para a avaliação de feridas diabéticas, com o intuito de aprimorar o conhecimento sobre os tratamentos já investigados pelo grupo. Buscamos desenvolver uma plataforma de fácil usabilidade, que possa ser adotada tanto em laboratórios de pesquisa quanto em ambiente industrial.

Além disso, almejamos que essa iniciativa estimule o desenvolvimento da indústria nacional, possibilitando a produção e comercialização do dispositivo em larga escala, com potencial de impacto positivo na saúde e qualidade de vida dos pacientes com diabetes. A produção e comercialização desses dispositivos podem impulsionar a economia, criar oportunidades de emprego e fortalecer a capacidade tecnológica do país.

Com uma indústria local desenvolvendo e fornecendo OoCs, há uma maior autonomia e independência na obtenção dessas tecnologias, reduzindo a dependência de importações e favorecendo a infraestrutura científica e tecnológica nacional. Ao unir pesquisa translacional, desenvolvimento de OoCs de origem brasileira e a colaboração entre academia, indústria e profissionais da saúde, é possível promover avanços significativos no campo da medicina regenerativa, terapia personalizada e descoberta de medicamentos. Isso resulta em benefícios diretos para os pacientes, com tratamentos mais eficazes, redução de custos e melhoria da qualidade de vida. Portanto, o impacto da pesquisa translacional ao incorporar OoCs de origem brasileira é promissor e necessário.

## VIII REFERÊNCIAS

- [1] A. K. A. da Silva *et al.*, “Bixa orellana L. and its implications in human health: Perspectives and new trends,” 2023, pp. 1–36.
- [2] A. G. Monteduro, S. Rizzato, G. Caragnano, A. Trapani, G. Giannelli, and G. Maruccio, “Organs-on-chips technologies – A guide from disease models to opportunities for drug development,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 231, p. 115271, Jul. 2023, doi: 10.1016/j.bios.2023.115271.
- [3] Y. I. Wang *et al.*, “Self-contained, low-cost Body-on-a-Chip systems for drug development,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 242, no. 17, pp. 1701–1713, Nov. 2017, doi: 10.1177/1535370217694101.
- [4] H. E. Abaci, K. Gledhill, Z. Guo, A. M. Christiano, and M. L. Shuler, “Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 3, pp. 882–888, 2015, doi: 10.1039/C4LC00999A.
- [5] K. Ronaldson-Bouchard and G. Vunjak-Novakovic, “Organs-on-a-Chip: A Fast Track for Engineered Human Tissues in Drug Development,” *Cell Stem Cell*, vol. 22, no. 3, pp. 310–324, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.stem.2018.02.011.
- [6] C. Ma, Y. Peng, H. Li, and W. Chen, “Organ-on-a-Chip: A New Paradigm for Drug Development,” *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 42, no. 2, pp. 119–133, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.tips.2020.11.009.
- [7] S. N. Bhatia and D. E. Ingber, “Microfluidic organs-on-chips,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 32, no. 8, pp. 760–772, Aug. 2014, doi: 10.1038/nbt.2989.
- [8] “Tissue Chip Initiatives & Projects,” *National Center for Advancing Translational Sciences (NIH)*, 2023. <https://ncats.nih.gov/tissuechip/projects#modeling> (accessed Jul. 16, 2023).
- [9] C.-M. Moysidou, C. Barberio, and R. M. Owens, “Advances in Engineering Human Tissue Models,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, Jan. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2020.620962.
- [10] N. Gaio *et al.*, “A multiwell plate Organ-on-Chip (OOC) device for in-vitro cell culture stimulation and monitoring,” in *2018 IEEE Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, Jan. 2018, pp. 314–317, doi: 10.1109/MEMSYS.2018.8346549.
- [11] D. E. Ingber, “Developmentally inspired human ‘organs on chips,’” *Development*, vol. 145, no. 16, Aug. 2018, doi: 10.1242/dev.156125.
- [12] L. G. Griffith and M. A. Swartz, “Capturing complex 3D tissue physiology in vitro,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 7, no. 3, pp. 211–224, Mar. 2006, doi: 10.1038/nrm1858.
- [13] D. Huh, G. A. Hamilton, and D. E. Ingber, “From 3D cell culture to organs-on-chips,” *Trends Cell Biol.*, vol. 21, no. 12, pp. 745–754, Dec. 2011, doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.005.
- [14] C. Corró, L. Novellademunt, and V. S. W. Li, “A brief history of organoids,” *Am. J. Physiol. Physiol.*, vol. 319, no. 1, pp. C151–C165, Jul. 2020, doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020.
- [15] E. de O. Lupatini, J. O. M. Barreto, I. R. Zimmermann, and E. N. da Silva, “Medicamentos e pesquisa translacional: etapas, atores e políticas de saúde no contexto brasileiro,” *Saúde em Debate*, vol. 43, no. spe2, pp. 181–199, Nov. 2019, doi: 10.1590/0103-11042019s214.
- [16] M. S. S. Felipe, K. S. Rezende, M. F. F. Rosa, and C. A. G. Gadelha, “Um olhar sobre

- o Complexo Econômico Industrial da Saúde e a Pesquisa Translacional,” *Saúde em Debate*, vol. 43, no. 123, pp. 1181–1193, Oct. 2019, doi: 10.1590/0103-1104201912316.
- [17] C. V. de S. R. Correia, K. S. Rezende, S. de S. R. F. Rosa, J. O. M. Barreto, and M. S. S. Felipe, “Pesquisa translacional no Brasil: temas de pesquisa e sua aderência à Agenda do SUS,” *Saúde em Debate*, vol. 43, no. spe2, pp. 75–86, Nov. 2019, doi: 10.1590/0103-11042019s206.
- [18] B. S. Kousholt *et al.*, “Reporting quality in preclinical animal experimental research in 2009 and 2018: A nationwide systematic investigation,” *PLoS One*, vol. 17, no. 11, p. e0275962, Nov. 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0275962.
- [19] “Summary: Predictive analytics support along the drug discovery process,” *Machine Learning Applied to Drug Discovery*. <https://doctortarget.com/machine-learning-applied-drug-discovery/> (accessed Jul. 17, 2023).
- [20] “Registro de Medicamentos,” *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)*. <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos> (accessed Jul. 10, 2023).
- [21] Brasil, *Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976*. 1976.
- [22] “LEI Nº 9.605, DE 12 DE FEVEREIRO DE 1998,” *BRASIL*, 1998. [https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19605.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm) (accessed Jul. 16, 2023).
- [23] D. A. Pedro, “MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS EM ENSINO E PESQUISA: EVOLUÇÃO E PANORAMA ATUAL DO BRASIL,” *Encicl. Biosf.*, vol. 18, no. 37, pp. 334–348, 2021, [Online]. Available: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2021C/metodos.pdf>.
- [24] “Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica,” *Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação*, 2023. [https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoes-do-concea/guia\\_concea\\_led\\_animais-\\_ensino\\_ou\\_pesquisa\\_2023.pdf](https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/publicacoes-do-concea/guia_concea_led_animais-_ensino_ou_pesquisa_2023.pdf) (accessed Jul. 16, 2023).
- [25] “Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA),” *MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES*, 2023. <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html> (accessed Jul. 16, 2023).
- [26] “Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM),” *Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)*. <http://www.bracvam.fiocruz.br/> (accessed Jul. 16, 2023).
- [27] “LEI No 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008.,” *MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES E CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL*, 2008. [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/111794.htm) (accessed Jun. 13, 2023).
- [28] R. G. W. Kirk, “Recovering The Principles of Humane Experimental Technique,” *Sci. Technol. Hum. Values*, vol. 43, no. 4, pp. 622–648, Jul. 2018, doi: 10.1177/0162243917726579.
- [29] W. M. S. Russell and L. B. Rex, *The principles of humane experimental technique*. 1959.
- [30] J. Tannenbaum and B. T. Bennett, “Russell and Burch’s 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose,” *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, vol. 54, no. 2, pp. 120–132, 2015.
- [31] “Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório,” *SBCAL*, 2008.



- <https://www.sbcal.org.br> (accessed Jun. 13, 2023).
- [32] “Resolução, regulamentação e orientações técnicas,” *Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas*, 2021. <https://ww3.icb.usp.br/pes/legislacao-regulamentacao-e-orientacoes-tecnicas/> (accessed Jun. 13, 2023).
- [33] “Food and Drug Administration,” *FDA*. <https://www.fda.gov/> (accessed Jul. 23, 2023).
- [34] “Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering,” *Harvard*. <https://wyss.harvard.edu/> (accessed Jul. 15, 2023).
- [35] H. Wang *et al.*, “3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration,” *Clin. Transl. Sci.*, vol. 14, no. 5, pp. 1659–1680, Sep. 2021, doi: 10.1111/cts.13066.
- [36] “Advancing new alternative methodologies at FDA,” *U.S. Food & Drug Administration*. pp. 1–30, 2021, doi: 10.1109/GMEPE-PAHCE.2017.7972078.
- [37] K. Eckstrum *et al.*, “Utilization of a model hepatotoxic compound, diglycolic acid, to evaluate liver Organ-Chip performance and in vitro to in vivo concordance,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 146, p. 111850, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.fct.2020.111850.
- [38] A. Stewart, D. Denoyer, X. Gao, and Y.-C. Toh, “The FDA modernisation act 2.0: Bringing non-animal technologies to the regulatory table,” *Drug Discov. Today*, vol. 28, no. 4, p. 103496, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.drudis.2023.103496.
- [39] “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 185, DE 22 DE OUTUBRO DE 2001,” *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)*, 2001. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/rdc0185\\_22\\_10\\_2001.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/rdc0185_22_10_2001.pdf) (accessed Jul. 20, 2023).
- [40] “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº16, DE 28 DE MARÇO DE 2013,” *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)*. [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0016\\_28\\_03\\_2013.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0016_28_03_2013.pdf) (accessed Jul. 03, 2023).
- [41] “RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 36, DE 26 DE AGOSTO DE 2015,” *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)*. [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2979365/%288%29RDC\\_36\\_2015\\_CO MP.pdf/1ef4765f-ee2a-4ea6-b4b2-d2c68ba0ff7f](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2979365/%288%29RDC_36_2015_CO MP.pdf/1ef4765f-ee2a-4ea6-b4b2-d2c68ba0ff7f) (accessed Jul. 04, 2023).
- [42] “INMETRO,” *Brasil*. <https://www.gov.br/inmetro/pt-br> (accessed Jul. 17, 2023).
- [43] D. Tomic, J. E. Shaw, and D. J. Magliano, “The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 18, no. 9, pp. 525–539, Sep. 2022, doi: 10.1038/s41574-022-00690-7.
- [44] G. Rojas, P. Solís Pazmiño, R. Gaona, F. Mollocana, I. Espín, and A. Nunes, “Calidad De Vida En Un Grupo De Pacientes Con Diabetes Mellitus Tipo 2: Un Estudio Transversal,” *Rev. Medica Vozandes*, vol. 32, no. 1, pp. 13–22, 2021, doi: 10.48018/rmv.v32.i1.7.
- [45] “Sociedade Brasileira de Diabetes,” *SBD*, 2023. <https://diabetes.org.br/> (accessed Jul. 12, 2023).
- [46] J. Harreiter and M. Roden, “Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2019),” *Wien. Klin. Wochenschr.*, vol. 131, no. S1, pp. 6–15, May 2019, doi: 10.1007/s00508-019-1450-4.
- [47] D. C. Malta *et al.*, “Diabetes autorreferido e fatores associados na população adulta brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde, 2019,” *Cien. Saude Colet.*, vol. 27, no. 7, pp. 2643–2653, 2022, doi: 10.1590/1413-8123202277.02572022.
- [48] “Brasil: Relatório de diabetes 2000 - 2045,” *International Diabetes Federation*, 2021. <https://diabetesatlas.org/data/en/country/27/br.html> (accessed Jul. 12, 2023).

- [49] E. A. F. Nilson, R. da C. S. Andrade, D. A. de Brito, and O. Michele Lessa de, “Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018,” *Rev. Panam. Salud Pública*, vol. 44, p. 1, Apr. 2020, doi: 10.26633/RPSP.2020.32.
- [50] K. McDermott, M. Fang, A. J. M. Boulton, E. Selvin, and C. W. Hicks, “Etiology, Epidemiology, and Disparities in the Burden of Diabetic Foot Ulcers,” *Diabetes Care*, vol. 46, no. 1, pp. 209–221, Jan. 2023, doi: 10.2337/dci22-0043.
- [51] C. Toscano, T. Sugita, M. Rosa, H. Pedrosa, R. Rosa, and L. Bahia, “Annual Direct Medical Costs of Diabetic Foot Disease in Brazil: A Cost of Illness Study,” *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, no. 1, p. 89, Jan. 2018, doi: 10.3390/ijerph15010089.
- [52] D. Glovaci, W. Fan, and N. D. Wong, “Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease,” *Curr. Cardiol. Rep.*, vol. 21, no. 4, p. 21, Apr. 2019, doi: 10.1007/s11886-019-1107-y.
- [53] C. J. Magri, D. Mintoff, L. Camilleri, R. G. Xuereb, J. Galea, and S. Fava, “Relationship of Hyperglycaemia, Hypoglycaemia, and Glucose Variability to Atherosclerotic Disease in Type 2 Diabetes,” *J. Diabetes Res.*, vol. 2018, pp. 1–9, Jul. 2018, doi: 10.1155/2018/7464320.
- [54] J. L. Burgess, W. A. Wyant, B. Abdo Abujamra, R. S. Kirsner, and I. Jozic, “Diabetic Wound-Healing Science,” *Medicina (B. Aires)*, vol. 57, no. 10, p. 1072, Oct. 2021, doi: 10.3390/medicina57101072.
- [55] P. Poredoš *et al.*, “Inflammatory and Prothrombotic Biomarkers, DNA Polymorphisms, MicroRNAs and Personalized Medicine for Patients with Peripheral Arterial Disease,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 23, no. 19, p. 12054, Oct. 2022, doi: 10.3390/ijms231912054.
- [56] K. Stoberock *et al.*, “The interrelationship between diabetes mellitus and peripheral arterial disease,” *Vasa*, vol. 50, no. 5, pp. 323–330, Sep. 2021, doi: 10.1024/0301-1526/a000925.
- [57] A. D. Cabral, A. A. Said, A. K. F. dos Santos, R. S. Lima, and M. G. S. A. BRANDÃO, “TERAPIAS INOVADORAS PARA REPARO TECIDUAL EM PESSOAS COM PÉ DIABÉTICO,” *Rev. Enferm. Atual Derme*, vol. 96, no. 39, Jul. 2022, doi: 10.31011/reaid-2022-v.96-n.39-art.1365.
- [58] A. C. da Silva, “Equipamento rapha® para a cura do pé diabético : uma abordagem translacional em saúde,” 2021.
- [59] L. F. dos Anjos, “O processo do autocuidado no protocolo de tratamento das doenças dos pés no diabetes : o caso do equipamento Rapha ®,” 2023.
- [60] “Uma estratégia de desenvolvimento para o sistema nacional de inovação de produtos médicos,” *Rev. Bras. Eng. Biomédica*, 2012, doi: 10.4322/rbeb.2012.020.
- [61] “Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica,” *SBEB*. <https://sbeb.org.br/> (accessed Jul. 17, 2023).
- [62] A. M. Methley, S. Campbell, C. Chew-Graham, R. McNally, and S. Cheraghi-Sohi, “PICO, PICOS and SPIDER: a comparison study of specificity and sensitivity in three search tools for qualitative systematic reviews,” *BMC Health Serv. Res.*, vol. 14, no. 1, p. 579, Dec. 2014, doi: 10.1186/s12913-014-0579-0.
- [63] M. J. Page *et al.*, “The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews,” *Int. J. Surg.*, vol. 88, p. 105906, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.ijssu.2021.105906.
- [64] “Prezi.” <https://prezi.com/> (accessed Jul. 17, 2023).

- [65] M. Mastrangeli and J. van den Eijnden-van Raaij, “Organs-on-chip: The way forward,” *Stem Cell Reports*, vol. 16, no. 9, pp. 2037–2043, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.stemcr.2021.06.015.
- [66] K. H. Benam *et al.*, “Small airway-on-a-chip enables analysis of human lung inflammation and drug responses in vitro,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 2, pp. 151–157, Feb. 2016, doi: 10.1038/nmeth.3697.
- [67] Y. Koo, B. T. Hawkins, and Y. Yun, “Three-dimensional (3D) tetra-culture brain on chip platform for organophosphate toxicity screening,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 2841, Feb. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20876-2.
- [68] V. Silverio *et al.*, “Overcoming technological barriers in microfluidics: Leakage testing,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 10, Sep. 2022, doi: 10.3389/fbioe.2022.958582.
- [69] D. R. Reyes *et al.*, “Accelerating innovation and commercialization through standardization of microfluidic-based medical devices,” *Lab Chip*, vol. 21, no. 1, pp. 9–21, 2021, doi: 10.1039/D0LC00963F.
- [70] “Microfluidics Association.” <https://microfluidics-association.org/> (accessed Jul. 12, 2023).
- [71] “ISO 22916:2022 - Microfluidic devices — Interoperability requirements for dimensions, connections and initial device classification.” <https://www.iso.org/standard/74157.html> (accessed Jul. 02, 2023).
- [72] D. A. PEDRO, “MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS EM ENSINO E PESQUISA: EVOLUÇÃO EPANORAMA ATUAL DO BRASIL,” *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer, 2021. <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2021C/metodos.pdf> (accessed Jul. 17, 2023).
- [73] Bs. S Eberlin, PhD; MS da Silva, PhD; G Facchini, PhD; GH da Silva, BSc; ALTA Pinheiro, MD; A da Silva Pinheiro, “Métodos Alternativos para Avaliação de Segurança de Produtos no Brasil,” *Grupo Kosmoscience Ciência e Tecnologia Cosmética Ltda*, 2019. <https://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/class/artigos/uploads/9f52d-CT316---18-28.pdf>.
- [74] “ESTUDO SOBRE A INFLUÊNCIA DA INDÚSTRIA 4.0 NO MODELO REGULATÓRIO DO INMETRO,” *INMETRO*. <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/assuntos/regulamentacao/modelo-regulatorio-do-inmetro/05-relatorio-industria-40-v2.pdf> (accessed Jul. 17, 2023).
- [75] J. D. SOARES, “IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA GERIR E AVALIAR A MATURIDADE DE PROJETOS DE PD&I,” 2022. <https://app.uff.br/riuff/handle/1/25228>.
- [76] M. F. F. Rosa, “Pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) do respirador vesta : Universidade de Brasília (UnB) como vetor da pesquisa translacional em saúde,” 2022.
- [77] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, Jul. 2006, doi: 10.1038/nature05058.