



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Beatriz Medeiros Afonso

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanofibres and nanohydrogels for tissue engineering” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, do Dr. Amadeu Carvalho, da Dra. Olga Simões e da Professora Doutora Eliana B. Souto apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Beatriz Medeiros Afonso

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanofibres and nanohydrogels for tissue engineering” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, do Dr. Amadeu Carvalho, da Dra. Olga Simões e da Professora Doutora Eliana B. Souto apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021

Declaração de Autoria

Eu, Ana Beatriz Medeiros Afonso, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015240039, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanofibres and nanohydrogels for tissue engineering” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 21 de setembro de 2021.

Ana Beatriz Medeiros Afonso

(Ana Beatriz Medeiros Afonso)

Agradecimentos

À Professora Doutora Eliana B. Souto, minha orientadora de monografia, pela proposta de trabalho e por sempre se mostrar disponível.

Ao Dr. Amadeu Carvalho e a toda a equipa que me acompanhou e apoiou durante a minha presença na Farmácia Vilaça.

À Dra. Olga Simões e à minha colega de estágio pela boa disposição e por tornarem melhor a minha passagem pela Plural – Cooperativa Farmacêutica, CRL..

A todos os docentes, pelos ensinamentos transmitidos e pela inspiração que me causaram.

Aos meus pais e irmão e a toda a restante família, por acreditarem em mim e me ajudarem a alcançar os meus objetivos, por serem o meu pilar.

Às amigas que criei e às amigas que sempre estiveram presentes, pelos momentos bons e experiências partilhadas, por tornarem o meu percurso académico mais bonito.

A todos aqueles que de alguma forma fizeram parte deste percurso, por deixarem uma marca positiva no meu caminho.

Muito Obrigada!

Índice

Resumo.....	7
Abstract	8

Parte I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária: Farmácia Vilaça

Lista de abreviaturas e acrónimos	10
1. Introdução	11
2. A Farmácia Vilaça	12
3. Análise SWOT.....	13
4. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>).....	13
4.1. Instalações e equipamentos	13
4.2. Equipa técnica.....	14
4.3. Medidas de Higiene e segurança	14
4.4. Serviços farmacêuticos.....	14
4.5. Diversidade de dermocosmética	15
4.6. Incentivo à autonomia.....	15
5. Pontos Fracos (<i>Weakenesses</i>).....	16
5.1. Gestão de <i>stocks</i>	16
5.2. Preparação de manipulados	16
5.3. Formações internas.....	16
5.4. Pandemia COVID-19	16
6. Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	17
6.1. Atividades desenvolvidas	17
6.2. Diferentes horários e estações	18
6.3. Atendimento e aconselhamento farmacêutico	18
7. Ameaças (<i>Threats</i>)	19
7.1. Medicamentos em falta ou esgotados	19
7.2. Elevado número de produtos para o mesmo efeito	19
7.3. Competitividade com outros estabelecimentos de MNSRM	20
8. Considerações Finais	21
REFERÊNCIAS	22
ANEXOS	23
Casos Práticos	23

Parte II - Relatório de Estágio em Distribuição Farmacêutica: Plural - Cooperativa Farmacêutica, CRL.

Lista de abreviaturas e acrónimos	26
1. Introdução	27
2. A Plural – Cooperativa Farmacêutica, CRL.....	28
3. Análise SWOT.....	29
4. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>).....	29
4.1. Sistema de garantia da qualidade.....	29
4.2. Logística	30
4.3. As pessoas.....	30
4.4. Higiene e segurança no trabalho	30
4.5. Serviços multipharma.....	31
5. Pontos Fracos (<i>Weakenesses</i>).....	31
5.1. Conhecimento científico.....	31
5.2. Controlo de <i>stocks</i> e validades	31
6. Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	32
6.1. Estágio no setor da distribuição farmacêutica	32

6.2. Complemento ao estágio em Farmácia Comunitária	32
6.3. Aplicação de conhecimentos	32
7. Ameaças (<i>Threats</i>)	33
7.1. Farmacêuticos na distribuição farmacêutica	33
8. Considerações Finais	34
REFERÊNCIAS	35

Parte III - Monografia "Nanofibres and nanohydrogels for tissue engineering"

List of Abbreviations and Acronyms	37
Figure Index.....	39
Annex Index.....	39
1. Introdução	40
2. Nanosponges for tissue engineering.....	42
2.1. Production and physicochemical characterization of nanosponges.....	42
2.2. Applications of nanosponges (in vitro and in vivo)	44
2.2.1. miRNA sponges.....	44
2.2.2. Silk Fibroin Sponge	45
2.2.3. Chitosan sponge	46
3. Nanofibres for tissue engineering.....	47
3.1. Production and physicochemical characterization of nanofibres.....	47
3.1.1. Electrospinning	47
3.1.2. Carboxymethylcellulose Fibres.....	49
3.1.3. Bioactive Glass Fibres	49
3.2. Applications of nanofibres (in vitro and in vivo)	50
3.2.1. Bone regeneration.....	50
3.2.2. Skin regeneration	51
3.2.3. Bladder regeneration.....	52
3.2.4. Drug delivery system	53
4. Nanohydrogels for tissue engineering	54
4.1. Production and physicochemical characterization of nanohydrogels	54
4.1.1. Polymer and peptide hydrogels	55
4.1.2. Nanoparticle–hydrogel	56
4.2. Applications of nanohydrogels (in vitro and in vivo).....	57
4.2.1. Bone regeneration.....	57
4.2.2. Wound Dressings.....	59
4.2.3. Drug delivery systems.....	60
4.2.4. Nanoparticles encapsulated in hydrogels.....	61
4.2.5. Plant viruses in bioactive Hydrogels	62
5. Conclusions.....	63
REFERENCES	64
APPENDIX	71

Resumo

Este documento encontra-se dividido em três partes, as partes I e II são compostas pelos relatórios de estágio curricular em farmácia comunitária e em distribuição farmacêutica, respectivamente. Os relatórios são apresentados através de uma análise SWOT que tem como intuito evidenciar os pontos fortes, os pontos fracos, as oportunidades e as ameaças encontradas ao longo da minha experiência. A Parte III consiste numa revisão sistemática da literatura, onde desenvolvo o tema “Nanofibres and Nanohydrogels for Tissue Engineering”. A engenharia de tecidos e medicina regenerativa (TERM, do inglês “Tissue Engineering Regenerative Medicine”) tem manifestado grandes progressos nos últimos anos, com o crescente desenvolvimento tecnológico e também com o desenvolvimento de biomateriais funcionais que permitem gerar um bom microambiente para o desenvolvimento celular e de regeneração tecidual. Estes biomateriais podem estar na forma de nanoesponjas, nanofibras e nanohidrogeles que podem exercer funções de suporte, transporte e funcionar como sistemas de entrega controlada de fármacos. O método de produção dos biomateriais vai depender do tipo de tecido em que este vai exercer a sua ação. A forma mais eficaz de produzir nanofibras para a engenharia de tecidos é a eletrofiação, que permite proporcionar as melhores características às fibras. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido realizados para a aplicação das nanofibras na regeneração de tecidos, sendo alguns deles abordados neste trabalho. Também os hidrogeles apresentam-se como bons suportes para a engenharia de tecidos, como por exemplo para a regeneração de tecido ósseo e como curativos para feridas, permitem encapsular fármacos, assim como responder a estímulos.

Palavras-chave: Estágio curricular, Análise SWOT, Engenharia de tecidos, Nanohidrogeles, Nanofibras, Nanoesponjas

Abstract

This document is divided into three parts, parts I and II are composed of the curricular internship reports in community pharmacy and pharmaceutical distribution, respectively. The reports are presented through a SWOT analysis that aims to highlight the strengths, weaknesses, opportunities and threats found throughout my experience. Part III consists of a systematic literature review, where I develop the theme “Nanofibres and Nanohydrogels for Tissue Engineering”. Tissue engineering and regenerative medicine (TERM) has shown great progress in recent years, with increasing technological development and also with the development of functional biomaterials that allow the generation of a good microenvironment for cell development and tissue regeneration. These biomaterials can be in the form of nanosponges, nanofibres and nanohydrogels that can perform support, transport and function as controlled drug delivery systems. The method of production of biomaterials will depend on the type of tissue in which they will exert its action. The most effective way to produce nanofibres for tissue engineering is electrospinning, which allows providing the best characteristics to the fibres. Several in vitro and in vivo tests have been carried out for the application of nanofibres in tissue regeneration, some of which are addressed in this work. Hydrogels also present themselves as good supports for tissue engineering, such as for bone tissue regeneration and as wounds dressings, allowing drugs encapsulation, as well as responding to stimuli.

Keywords: Curricular Internship, SWOT analysis, Tissue engineering, Nanohydrogels, Nanofibres, Nanosponges

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Vilaça

Lista de abreviaturas e acrónimos

ANF – Associação Nacional de Farmácias

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento não sujeito a receita médica

MSRM – Medicamento sujeito a receita médica

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

TRAg – testes rápidos de antigénio

I. Introdução

O estágio curricular em farmácia comunitária faz parte do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia de Universidade de Coimbra. Esta unidade curricular difere-se de todas as outras pela sua forma prática e desafiante de ser apresentada. Coloca o estudante no local onde o farmacêutico mais tem contacto com o utente e onde este tem a oportunidade de pôr em prática muitos dos conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares ao longo do curso. Ao mesmo tempo que exige bons conhecimentos científicos, também requer uma boa capacidade de comunicação por parte do estudante.

A área da farmácia comunitária é uma área das ciências farmacêuticas que faz uso de elevados conhecimentos técnico-científicos e que exige uma constante formação e empenho do farmacêutico, quer pelo desenvolvimento constante no ramo de medicamentos e produtos de saúde, quer pela exigência cada vez maior do utente no serviço que lhe é prestado. Além disso, o farmacêutico comunitário é muitas vezes o primeiro a quem as pessoas recorrem com vista a solucionar os seus problemas com a saúde e bem-estar e de quem esperam o maior profissionalismo.

Este relatório tem como objetivo apresentar a minha experiência como estagiária numa farmácia comunitária, a farmácia Vilaça, sob orientação do Diretor Técnico, o Dr. Amadeu Carvalho. O meu estágio realizou-se do dia 11 de janeiro de 2021 a 01 de maio de 2021 e posteriormente, durante a última quinzena de agosto, de forma a cumprir o número total de horas exigidas pelo plano de estágio.

O relatório é apresentado sob forma de uma análise SWOT (do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), onde estão descritos os pontos fortes e pontos fracos encontrados, bem como as oportunidades e ameaças encaradas.

2. A Farmácia Vilaça

A farmácia Vilaça situa-se na Rua Ferreira Borges, na baixa de Coimbra. Uma rua, próxima do rio Mondego e rodeada de espaços de comércio. É bastante conhecida pelo seu grande fluxo de pessoas e pelo seu turismo. O horário de funcionamento da farmácia é das 9h às 20h de segunda a sábado. Juntamente com um conjunto de farmácias de Coimbra é feita uma rotação em que a farmácia fica de serviço 24h.

No período em que realizei o estágio, a equipa da farmácia era constituída pelo Diretor Técnico, Dr. Amadeu Carvalho e pelos farmacêuticos Dr. João Pais e Dra. Marisa Ferreira.

Organização do espaço da farmácia

A farmácia Vilaça dispõe de dois pisos. No espaço exterior, possui um painel e um letreiro identificativos de farmácia, bem como a bandeira *travel tax-free*. Possui duas portas de entrada e duas grandes janelas com montras para a rua. No espaço interior alberga um amplo espaço de circulação e de exposição de produtos, com lugares onde os utentes se podem sentar.

Na farmácia existe uma grande variedade de produtos de saúde dispostos em gôndulas e lineares acessíveis ao público, particularmente, uma grande componente de dermocosmética. Possui ainda produtos de higiene oral, perfumaria, produtos de higiene íntima, ortopedia, puericultura, material de penso e outros produtos diversos. A zona de atendimento é composta por cinco balcões de atendimento ao público equipados com computadores possuindo o sistema informático *Sifarma 2000®*. Nas prateleiras situadas atrás dos balcões estão expostos os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), suplementos alimentares, medicamentos homeopáticos, produtos de dietética e medicamentos e produtos de uso veterinário e, armazenados em gavetas, encontram-se outros produtos de saúde. Num local não visível ao público encontra-se o frigorífico que armazena os medicamentos que requerem condições especiais de conservação (2 a 8°C) e uma pequena sala onde se guardam temporariamente os medicamentos pedidos por reserva. Ainda no espaço acessível ao público, existe uma balança e um medidor de pressão arterial.

No piso inferior é feita a receção de encomendas, é também aí que se encontra o *robot* que armazena os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e os entrega ao andar de cima, um grande espaço com armários de arrumação de *stocks*, um laboratório onde se preparam os medicamentos manipulados e onde se armazenam as matérias-primas e produtos químicos, o gabinete da direção técnica, uma casa de banho e uma sala de atendimento particular. Para facilitar o acesso por parte dos doentes, a farmácia é dotada de um elevador.

3. Análise SWOT

Na Tabela que se segue está descrita de forma resumida a análise SWOT, categorizando internamente os pontos fortes e os pontos fracos e, externamente, as oportunidades e ameaças encontradas durante o meu estágio.

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none">• Instalações e equipamentos• Equipa técnica• Medidas de higiene e segurança• Serviços Farmacêuticos• Diversidade de dermocosmética• Incentivo à autonomia	<ul style="list-style-type: none">• Gestão de <i>stocks</i>• Preparação de manipulados• Formações internas• Pandemia COVID-19
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none">• Atividades desenvolvidas• Diferentes horários e estações• Atendimento e aconselhamento farmacêutico	<ul style="list-style-type: none">• Medicamentos em falta ou esgotados• Elevado número de produtos para o mesmo efeito• Competitividade com outros estabelecimentos de MNSRM

4. Pontos Fortes (*Strengths*)

4.1. Instalações e equipamentos

Destaco positivamente a existência do sistema robotizado que se encontra instalado na farmácia. A existência do *robot* permite uma melhor gestão do espaço físico da farmácia, diminui o tempo despendido na arrumação dos medicamentos e facilita o atendimento.

No momento do atendimento, através do programa *Sifarma 2000*® é possível chamar os medicamentos de uma forma simples e estes vêm parar ao andar de cima num curto espaço de tempo. A maior vantagem encontra-se quando os medicamentos a serem dispensados são muitos e existe uma grande afluência à farmácia. O tempo poupado no processo de ir buscar os medicamentos permite ao farmacêutico aproveitar esse tempo para exercer as suas funções de aconselhamento e dedicar-se mais ao contacto com o utente.

Outro aspeto positivo é a existência de uma máquina de troco automática. A sua existência diminui erros e também diminui o tempo utilizado neste processo.

4.2. Equipa técnica

Um dos fatores que considero mais importante no local de trabalho é o bom ambiente entre os colegas. Onde se possam desenvolver boas relações e onde reine um espírito de equipa.

A equipa técnica da farmácia onde estagiei mostrou-se desde o início amigável, atenciosa e compreensiva, e sempre que necessitei de algum auxílio ou tinha alguma dúvida, me ajudou e incentivou. Havia um bom ambiente entre os colegas e um ambiente de entreajuda, fazendo-me sentir parte integrante da equipa.

4.3. Medidas de Higiene e segurança

A farmácia reunia as medidas de segurança gerais estabelecidas para diminuir a transmissão do vírus SARS-CoV-2 [1]. As portas de entrada e saída da farmácia possuíam setas indicadoras de circulação e era mantido o número máximo de utentes a poder frequentar o espaço interior, bem como o distanciamento social. Havia um desinfetante ao lado da porta de entrada e em cada balcão de atendimento, nos balcões também existia um separador transparente entre a zona de atendimento e o utente. Para a limpeza dos balcões entre cada atendimento existia uma solução desinfetante utilizada pelos profissionais. Toda a equipa, assim como qualquer pessoa que entrasse na farmácia fazia uso da máscara de forma correta e eram alertadas caso se verificasse alguma anomalia.

4.4. Serviços farmacêuticos

A farmácia Vilaça faz parte da associação nacional de farmácias (ANF) e através do site das farmácias portuguesas é possível averiguar os serviços por ela prestados. São estes, serviço de entrega ao domicílio, medição de parâmetros bioquímicos, tais como colesterol total, triglicéridos e glicémia, e físicos, tais como peso, altura e IMC e medição da pressão arterial e frequência cardíaca, testes de gravidez e administração de vacinas e de injetáveis.

Como já referido, a farmácia Vilaça possui o serviço de entrega ao domicílio, o que para muitas pessoas com dificuldades de deslocação ou mesmo por comodidade, constitui um serviço de grande utilidade, ao mesmo tempo que é um fator competitivo no mercado atual.

Com as novas necessidades, surgiram novas funcionalidades, e a farmácia onde estagiei também passou a realizar testes rápidos de anticorpos e, posteriormente, testes rápidos de antígeno (TRAg) ao SARS-CoV-2. Os testes rápidos de anticorpos foram os primeiros a ser

praticados, utilizava-se uma amostra de sangue total e detetava-se qualitativamente a presença de anticorpos IgG e IgM que seriam produzidos em resposta à infeção pelo SARS-CoV-2, caso a pessoa tivesse sido exposta ao vírus. A farmácia também passou a realizar TRAg com emissão de certificado. Estes testes de zaragatoa permitem detetar se a pessoa se encontra infetada no momento da colheita.

Todos estes serviços são úteis no controlo do estado de saúde do utente e/ou da efetividade terapêutica, dão valor à farmácia, ao papel do farmacêutico como profissional de saúde, e principalmente, constituem um bem para a sociedade em geral.

4.5. Diversidade de dermocosmética

A farmácia Vilaça possui uma elevada e diversificada componente de dermocosmética, possuindo lineares das marcas *La Roche Posay®*, *Eucerin®*, *Vichy®*, *Bioderma®*, *Avène®*, *ISDIN®*, *Jowae®*, *CeraVe®*, *Lierac®*, *SkinCeuticals®*, *Filorga®* e *PAPILLON®*. Esta particularidade distingue a de outras farmácias e permite satisfazer diferentes pessoas que possuem diferentes tipos de pele ou problemas de pele, procuram resultados distintos ou diferentes texturas nos produtos, além de diferentes investimentos que se permitem fazer neste campo.

Inicialmente, quando era abordada pelas pessoas, maioritariamente mulheres, e estas me perguntavam qual a melhor marca para determinado efeito desejado, bem como, quando me perguntavam qual a diferença entre uma marca e outra, eu ficava com alguma dificuldade em obter uma resposta. Ao longo da minha experiência fui conhecendo mais as particularidades de cada uma delas e já me era mais fácil optar por determinada marca no aconselhamento de produtos cosméticos, ouvindo o que as pessoas me tinham a dizer e fazendo perguntas estratégicas que excluíssem ou levassem à escolha de determinada marca.

4.6. Incentivo à autonomia

Desde o início do meu estágio fui incentivada à autonomia e ao contacto com os utentes, apesar de não exercer o atendimento nos primeiros dias. O facto de ter realizado estágio de verão numa outra farmácia também foi um aspeto positivo que me deu bases para exercer a autonomia com mais confiança, pois já estava familiarizada com o funcionamento de uma farmácia e as funções exercidas pelo farmacêutico no *back-office*. Ao mesmo tempo que me era permitida esta autonomia, também era supervisionada e auxiliada sempre que necessário, com o intuito de realizar o melhor atendimento.

5. Pontos Fracos (*Weakenesses*)

5.1. Gestão de stocks

A quantidade de produtos em *stock* vai depender da avaliação feita do histórico de vendas dos produtos, assim como da previsão de vendas desses mesmos produtos. Pela farmácia se situar numa zona turística, torna-se mais complicado prever as necessidades dos utentes, que são muito variadas e por vezes imprevisíveis. Com a pandemia, o fluxo de utentes diminuiu e com isso diminuíram as vendas, o que teve um impacto negativo na gestão de *stocks* da farmácia, bem como em produtos fora de prazo.

Também pude constatar, ao realizar o inventário da farmácia, e comparando as quantidades reais com as quantidades no sistema informático, a presença de erros de *stocks* em alguns produtos.

5.2. Preparação de manipulados

A farmácia dispõe do serviço preparação de manipulados. Pude presenciar a existência de tais pedidos, no entanto, como o número de farmacêuticos na farmácia era reduzido e a zona de atendimento tinha de ter sempre alguém disponível, não me foi possível a preparação ou observação da preparação de manipulados, facto este que considero como um ponto negativo no decorrer do meu estágio.

5.3. Formações internas

Durante o meu estágio gostaria de ter tido a oportunidade de assistir a formações internas. Tive a oportunidade de poder conversar e ouvir explicações de delegados de marcas, quando estes vinham à farmácia dar a conhecer os seus produtos e fazer negociações. No entanto, acho importante que numa farmácia, que tem constantemente novos produtos farmacêuticos e medicamentos, e onde as necessidades das pessoas estão constantemente a evoluir, que se realizem este tipo de formações para que os farmacêuticos e técnicos de farmácia possam dar o melhor aconselhamento e que pratiquem uma aprendizagem e desenvolvimento contínuo. Considero ainda que estas formações estimulam os profissionais na melhoria do seu desempenho.

5.4. Pandemia COVID-19

Um dos resultados da pandemia causada pelo vírus Sars-cov-2 foi a implementação de medidas de confinamento. Como consequência, o número de utentes a frequentar a farmácia diminuiu drasticamente e sendo esta uma farmácia muito sustentada pelo turismo, ainda sentiu mais este impacto negativo.

Com o confinamento, a farmácia viu diminuir a sua faturação. Muitas das pessoas, em estado de confinamento passam a recorrer a meios eletrónicos para verem as suas necessidades satisfeitas, sem terem de sair de casa. Com a existência da venda de MNSRM de forma *online*, muitas pessoas optam por essa opção.

De modo particular, esta falta de movimentação na farmácia durante os estados de confinamento fez com que não me fosse permitido desenvolver tanto o meu atendimento, tendo passado mais tempo a desenvolver outras atividades, e ao mesmo tempo, não me permitiu realizar mais horas de estágio, tendo este que ser prolongado para uma outra altura.

6. Oportunidades (*Opportunities*)

6.1. Atividades desenvolvidas

As primeiras atividades realizadas durante o estágio foram atividades de *back-office*. Fiz a criação, receção e conferência de encomendas, seguida da arrumação dos produtos e medicamentos nos locais e da forma adequados, como a reposição de medicamentos no *robot*, tendo em atenção as validades. Realizei a gestão de devoluções, como a criação de notas de devolução e entrega da devolução aos fornecedores, e ao longo do tempo fui-me familiarizando com o *Sifarma 2000*®. Também realizei o controlo de *stocks* e prazos de validade, participei na organização do espaço da farmácia e das montras e realizei a medição da pressão arterial. Uma semana depois do começo do meu estágio, já tinha iniciado o meu atendimento, de forma gradual e com a supervisão dos farmacêuticos. Ao longo do estágio fui exercendo estas diferentes atividades e aprimorando o meu atendimento e desenvolvendo novos conhecimentos.

Valormed: Outra atividade na qual estive envolvida foi na utilização do Valormed como ponto de recolha de medicamentos. Muitos dos utentes habituais da farmácia participavam ativamente nesta ação.

Conselheira de dermocosmética: No dia 29 de março, estive presente na farmácia uma conselheira de dermocosmética da marca *Skinceuticals*®, esta proporcionou aos clientes habituais da marca uma análise do tipo de pele, um cuidado da pele e a recomendação dos produtos mais adequados ao seu tipo de pele.

Delegados de marcas: Também visitaram a farmácia delegados de marcas que apresentaram os seus produtos ao mesmo tempo que indicavam informações úteis a fazer no aconselhamento farmacêutico e comparavam as características de uns com os outros.

Deteção precoce do cancro colorretal: A farmácia onde estagiei foi aderente da campanha nacional de sensibilização para a deteção precoce do cancro colorretal, tendo disponibilizado aos utentes os *kits* para fazerem a colheita de amostras de fezes onde, posteriormente entregariam na farmácia, e onde poderiam esclarecer as suas dúvidas.

6.2. Diferentes horários e estações

Pelo meu horário de estágio abranger as horas das 9h às 20h, dependendo dos dias, tive a oportunidade de observar a diferença existente entre os utentes que frequentam a farmácia da parte da manhã, com os que a frequentam ao fim da tarde.

Na parte da manhã, a maioria dos utentes eram utentes fidelizados da farmácia. Na sua maioria utentes mais idosos, que vinham com receitas médicas para virem levantar os seus medicamentos. Nestas condições, a minha função como farmacêutica permitiu-me ficar mais familiarizada com os nomes comerciais e os diversos laboratórios de MSRM, bem como com o aviamento das receitas, questões de toma da medicação e interações medicamentosas. Na parte da tarde, muitos dos utentes eram pessoas que andavam em passeio ou que vinham à farmácia com uma necessidade específica. Correspondendo a questões mais variadas e que muitas vezes eram resolvidas com MNSRM, e também, uma grande parte das pessoas procurava aconselhamento na área da dermocosmética.

Devido à pandemia do COVID-19 e às medidas de confinamento que foram mais restritas nos primeiros meses do ano, a farmácia passou a ter muito poucos utentes, não me permitindo praticar mais horas por dia, pois no facto de não existirem utentes resulta da não atividade do farmacêutico na farmácia comunitária. Desta maneira, tive a oportunidade de terminar o meu estágio no mês de agosto e puder presenciar as diferentes necessidades dos utentes de acordo com a sazonalidade (inverno, primavera e verão). Durante a estação de inverno, muitos dos problemas estavam relacionados com afeções no foro nasal e garganta, já durante o verão a grande maioria dos utentes procurava por proteções solares e medidas de tratamento pós queimadura solar, bem como picadas de insetos e material podológico.

6.3. Atendimento e aconselhamento farmacêutico

Durante o meu estágio, tive a oportunidade de desenvolver o meu atendimento farmacêutico. O farmacêutico comunitário encontra-se em contacto direto com os utentes, e desempenhar esta atividade, permitiu-me desenvolver as minhas habilidades relacionais, criar um ambiente cativante e agradável a todas as pessoas que entravam na farmácia, permitindo que elas expressassem as suas necessidades com uma maior facilidade. Também tive a

oportunidade de contactar com utentes de várias nacionalidades o que me permitiu comunicar em inglês e aperfeiçoá-lo, algo que pessoalmente valorizei.

O que mais valorizei no estágio foi precisamente ter a oportunidade de atender e fazer o aconselhamento farmacêutico. Tive a oportunidade de presenciar uma grande diversidade de situações clínicas, que, constantemente colocavam os meus conhecimentos à prova. Sempre que necessitei, recorri ao auxílio dos farmacêuticos, para me darem uma segunda opinião, ou mesmo para me substituírem em casos de atendimentos em que tinha uma maior dificuldade.

7. Ameaças (*Threats*)

7.1. Medicamentos em falta ou esgotados

No momento do atendimento, acontecia que, por vezes, existiam medicamentos em falta ou esgotados na farmácia. O facto de que no momento da venda de medicamentos, estes não existam no *stock* da farmácia, por terem pouca rotatividade, por haver erros na gestão de stocks ou mesmo pela característica particular dos utentes que frequentem a farmácia, que são muito distintos entre si e entre as suas necessidades e preferências, faz com que fiquem insatisfeitos com o atendimento.

Nas situações em que a farmácia não tinha o medicamento, por exemplo, no caso de um genérico, perguntava-se se a pessoa admitia exclusivamente aquele laboratório, ou noutras casos, telefonava-se diretamente para os fornecedores para saber se estava disponível e encomendar para a seguinte remessa. Por vezes os utentes não queriam esperar pelo produto ou medicamento, ou desistiam de aviar a sua receita por não a conseguirem aviar na totalidade. Como consequência destas situações, a farmácia perde oportunidades de venda e, como já referi, deixa os utentes insatisfeitos.

7.2. Elevado número de produtos para o mesmo efeito

Uma ameaça com que me deparei ao longo do meu estágio foi o elevado número de medicamentos e produtos de saúde para o mesmo efeito, apenas mudava a marca do produto. Isto resultou numa maior dificuldade no momento do aconselhamento.

O facto de existirem muitos MNSRM e produtos de saúde para o mesmo fim revelou-se uma ameaça para mim, na medida em que não estava familiarizada com todos os nomes comerciais, e só por pesquisa percebia do que se tratava. Por vezes, tinha um produto semelhante na farmácia que poderia aconselhar para o mesmo fim, e noutras vezes, as pessoas tinham preferência por uma marca específica.

Como já referi anteriormente, também no caso dos produtos de dermocosmética se verificou esta particularidade, cada marca possuía várias gamas de produtos para o mesmo fim e explicar a diferença entre uns e outros gerou alguma dificuldade.

7.3. Competitividade com outros estabelecimentos de MNSRM

Uma grande ameaça que considero relevante para as farmácias é a competitividade que existe com os outros estabelecimentos de venda de MNSRM. A competitividade encontra-se principalmente na facilidade em obter os MNSRM e nos preços praticados por estes estabelecimentos. Presenciei casos de pessoas que compararam preços da farmácia com os preços de outros estabelecimentos. A farmácia, no entanto, possui os farmacêuticos que aconselham e garantem um atendimento diferencial e voltado para a saúde do utente. Uma das estratégias que considero para contrabalançar esta desvantagem passa por aconselhar medicamentos que apenas são vendidos nas farmácias. No entanto, a publicidade de certos medicamentos e produtos de saúde também pode causar um entrave à descoberta de novas opções.

8. Considerações Finais

Trabalhar como farmacêutico numa farmácia comunitária vai muito mais além da cedência de medicamentos. O farmacêutico tem um papel extremamente importante na garantia da saúde e bem-estar dos utentes, através do aconselhamento e acompanhamento farmacoterapêutico e na realização de ações de promoção da saúde.

Com o meu estágio em farmácia comunitária pude constatar a importância que o farmacêutico tem na promoção da saúde dos utentes. Através de um bom atendimento é possível conscientizar as pessoas de certos hábitos menos saudáveis ou escolhas menos corretas pela sua falta de conhecimento na área. Cabendo ao farmacêutico essa função, que através de uma boa comunicação e dos seus conhecimentos científicos pode encontrar a melhor solução para o problema em questão.

Deste modo, considero que o estágio em farmácia comunitária foi de grande importância na consolidação e aquisição de novos conhecimentos e no desenvolvimento da minha comunicação enquanto profissional de saúde. Considero ainda que a atividade de um farmacêutico comunitário é muito gratificante pelo impacto positivo que gera no bem-estar da população.

REFERÊNCIAS

[1] Cedime - **Plano de Contingência - Covid-19: Farmácia**. Versão 10, 2021. [Acedido 10 de setembro de 2021]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/covid_19/planos/PlanoFC.pdf

[2] INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento - Flabien 500mg de comprimidos revestidos por película**. [Acedido 28 de agosto de 2021]. Disponível da Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

ANEXOS

Casos Práticos

Caso 1

Um homem, com cerca de 38 anos dirigiu-se à farmácia e pediu algo para tratar os sintomas de congestão nasal, que lhe era difícil assoar. Referindo que seria uma “gripe ou constipação que apanhou”. Perguntei se apresentava algum outro sintoma, como dor de garganta, febre ou espirros, afirmando negativamente.

Depois de avaliar a situação e ser indicativo de uma constipação, indiquei-lhe a toma de um descongestionante nasal sob a forma de *spray* nasal, o *Vibrocil® Actilong* 1mg/ml de cloridrato de xilometazolina, e ao mesmo tempo, recomendei-lhe uma solução de limpeza nasal, o *Rhinomer Spray Nasal Força 3*, referi que a força correspondia apenas à força do jato e que poderia fazer diariamente sempre que sentisse necessidade. Depois referi como tomar o *Vibrocil® Actilong*, disse que poderia fazer 1 a 2 pulverizações em cada narina 1 a 2 vezes por dia e caso fosse necessário, para não exceder as 3 doses diárias. Referi ainda para não exceder a toma por mais de 10 dias seguidos.

Caso 2

Uma mulher com os seus 55 anos, chega à farmácia a queixar-se de uma queimadura solar nas costas que apanhou por ter estado demasiado exposta ao sol. Prontamente me mostrou as costas, com isto observei que estas se apresentavam vermelhas, com ausência de bolhas ou pele a descamar e que a mulher apresentava a pele clara, o que a tornava mais suscetível a queimaduras solares. Logo perguntei se tinha algum sintoma, pelo que me respondeu que sentia um ardor e ligeira dor. Perguntei se já tinha tomado alguma medida para solucionar o problema, e disse-me que não. Verificando que se tratava de uma situação pouco grave, decidi indicar-lhe o *Lamicreme*, um creme com componentes hidratantes e que acelera a cicatrização da pele. Disse que poderia aplicar uma boa camada na zona afetada 2 ou 3 vezes por dia, durante 4/5 dias. Como medidas não farmacológicas, aconselhei a toma de bastante água para se manter hidratada, a toma de banho tépidos para diminuir o desconforto na zona afetada e a evitar a exposição ao sol até a sua pele ficar recuperada. Aconselhei também o uso de protetor solar sempre que se fosse expor ao sol.

Caso 3

Um homem com cerca de 70 anos dirige-se à farmácia e começa por dizer que já tomou *Daflon*® para a circulação das pernas, que se tinha sentido bem, mas que tinha deixado de tomar durante um tempo. Ao mesmo tempo, mostrou-se aberto a conhecer outros medicamentos que fizessem o mesmo efeito.

Depois de ter conversado um bocadinho com ele sobre as suas queixas e medicação, decidi indicar-lhe o *Flabien*® contendo 500mg de diosmina, uma substância que reduz a distensibilidade venosa e diminui a estase venosa, reduz a permeabilidade capilar e reforça a resistência capilar [2]. Expliquei-lhe o porquê de aquele ser um bom medicamento para as pernas pesadas e cansadas, referi como deveria ser feita a toma, poderia tomar 2 comprimidos de uma só vez ou tomar 2 comprimidos em tomas separadas, com um copo de água. Referi ainda que só passado 1 mês é que começaria a verificar os efeitos benéficos. No final da venda senti que o cliente ficou satisfeito por lhe ter apresentado e indicado um novo medicamento.

Parte II

Relatório de Estágio em Distribuição Farmacêutica

Plural – Cooperativa Farmacêutica, CRL.

Lista de abreviaturas e acrónimos

BPD – Boas Práticas da Distribuição

CDM – Código de dispositivo médico

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SAP – System Analysis Program

SGQ – Sistema de garantia de qualidade

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

O setor da distribuição por grosso deve cumprir a regras apresentadas no regulamento relativo às boas práticas de distribuição (BPD) de medicamentos para uso humano, apresentadas na Deliberação n.º 47/CD/2015 pelo INFARMED.

Na distribuição por grosso é obrigatória a existência de um diretor técnico responsável pelas BPD que tem de ser um farmacêutico inscrito na Ordem dos farmacêuticos. Este tem de cumprir com as responsabilidades a si aplicadas. As BPD aplicam-se não só ao pessoal, como também às instalações e equipamento, à documentação, às operações, às reclamações, devoluções, suspeitas de medicamentos falsificados e retiradas de medicamentos, às atividades subcontratadas, às autoinspeções, ao transporte, assim como aos intermediários [1].

Este relatório tem como principal objetivo apresentar a minha experiência e aprendizagem durante o estágio em distribuição farmacêutica, na plural+udifar, através de uma análise SWOT fundamentada onde menciono os pontos fortes e fracos, as oportunidades e ameaças que percebi do meu estágio no setor da distribuição farmacêutica.

Optei por realizar este estágio pelo meu interesse e curiosidade em conhecer o funcionamento do setor da distribuição farmacêutica, nomeadamente a sua logística, de saber todos os processos que estão envolvidos na gestão e no fornecimento dos medicamentos e produtos de saúde, bem como, de como é feito o armazenamento no armazém e de como é feita a sua distribuição de forma tão rápida e eficaz para as farmácias.

2. A Plural – Cooperativa Farmacêutica, CRL.

A Plural – Cooperativa Farmacêutica, C.R.L. foi fundada em 1974, possuindo desde fevereiro de 2021 uma nova identidade corporativa, plural+udifar. Tem a sua sede em Eiras, Coimbra, possuindo ao todo 6 plataformas logísticas em Portugal (Maia, Covilhã, Coimbra, Caldas da rainha, Lisboa e Faro), estas cooperam entre si para garantir que as necessidades são da melhor forma satisfeitas [2].

Sendo uma empresa de distribuição por grosso, tem como função a compra, armazenamento, venda e distribuição de medicamentos e produtos de saúde, atuando como o elo de ligação entre a indústria farmacêutica e as farmácias. Possui também serviços multipharma como o apoio ao cliente, serviços de recolha, triagem e incineração de resíduos de medicamentos e produtos químicos e hospitalares, ações de formação para as farmácias, entre outros serviços e projetos [3].

O meu estágio teve início no dia 3 de maio de 2021 e terminou no dia 30 de junho de 2021. Começou com a apresentação da empresa e explicação da organização dos vários departamentos, bem como a apresentação da minha orientadora de estágio, a Dra. Olga Simões que é a diretora técnica do armazém e gere o sistema de garantia de qualidade (SGQ), e apresentação das funções e projetos que desempenhava no momento.

No primeiro mês, o meu estágio foi passado no armazém, local onde tive a oportunidade de conhecer e exercer diversas atividades, nomeadamente, o aviamento, também chamado de *picking*, e o *picking* de medicamentos que requerem condições especiais de temperatura, aviamento no carrossel (SCS – *Schaefer Caroussel System*), reposição e armazenamento de mercadorias, verificação de validades e inventário, receção e conferência de mercadoria e devoluções.

No meu estágio tive também a oportunidade de visitar o cais e perceber como são organizadas as carrinhas de distribuição e as condições especiais de transporte que estas requerem, conhecer de como funciona o processo de logística inversa, que um mês antes do meu estágio, foi transferido para o Cacém e de perceber como são feitos o atendimento e as reclamações.

Também me foi proposto pela orientadora de estágio um trabalho que tinha como objetivo de registar dispositivos médicos no Sistema de Informação para Dispositivos Médicos (SIDM) e posteriormente no SAP (*System Analysis Program*) da empresa, para que pudessem ser distribuídos, trabalho esse, que ocupou uma boa parte do estágio.

3. Análise SWOT

Na Tabela que se segue está descrita de forma resumida a análise SWOT, categorizando internamente os pontos fortes e os pontos fracos e, externamente, as oportunidades e ameaças encontradas durante o meu estágio.

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none">• Sistema de garantia de qualidade• Logística• As pessoas• Higiene e segurança no trabalho• Serviços multipharma	<ul style="list-style-type: none">• Conhecimento científico• Controlo de <i>stocks</i> e validades
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none">• Estágio no setor da distribuição farmacêutica• Complemento ao estágio em farmácia comunitária• Aplicação de conhecimentos	<ul style="list-style-type: none">• Farmacêuticos na distribuição farmacêutica

4. Pontos Fortes (*Strengths*)

4.1. Sistema de garantia da qualidade

A plural+udifar possui o seu próprio Manual da Qualidade, onde é descrito o SGQ implementado na plural+udifar, no que diz respeito ao «Comércio por Grosso de produtos farmacêuticos». Nesse manual é descrita toda a função do diretor técnico como sendo “responsável do SGQ na implementação, manutenção e dinamização de ações de melhoria” [4].

A plural+udifar também realiza auditorias internas de forma a avaliar a eficácia do SGQ, elaborar ações corretivas e garantir a melhoria contínua [4].

Relativamente ao armazenamento dos medicamentos, os medicamentos sujeitos a monitorização especial encontram-se armazenados em armários fechados e são sujeitos a uma contagem regular. Os produtos que requerem condições especiais de armazenamento, como a temperatura, são armazenados num local apropriado com a temperatura adequada. Também

durante o transporte, são mantidas as condições exigidas. As carrinhas são termatizadas e possuem um revestimento que mantém a temperatura adequada ao transporte dos medicamentos.

4.2. Logística

No armazém da plural+udifar os medicamentos e produtos de saúde são arrumados de uma forma caótica em prateleiras, com número de fila e coluna, que são divididas por ruas. Isto permite que, no momento do *picking*, medicamentos parecidos não sejam confundidos, diminuindo os erros e facilitando o seu encontro através dos aparelhos de radiofrequência. Existem máquinas automáticas e semiautomáticas que permitem otimizar o tempo, aumentar a produtividade e diminuir erros.

No momento do *picking*, todos os operadores se organizam adequadamente para garantir a fluidez do processo e ajustar o tempo para que os baques cheguem ao cais o mais rápido possível para ser feita a sua distribuição. Chegando ao cais, os baques são separados por rotas, e todos eles vêm identificados com a farmácia e localidade.

No que diz respeito ao processo de distribuição, os quilómetros praticados pelos motoristas são contados e é possível ter acesso ao percurso de cada motorista, o que permite criar as melhores rotas, diminuindo os custos e aumentando a eficiência do processo de distribuição.

4.3. As pessoas

Nos dois meses de estágio pude conviver diariamente com os operadores de armazém, que se mostraram sempre simpáticos e prestáveis. Havia um bom ambiente de trabalho entre os colegas. Nas últimas três semanas, fiquei empenhada num dos processos que permitem a comercialização de dispositivos médicos pela plural+udifar na sala do SGQ, o que me permitiu ter contacto com os trabalhadores dessa sala, nomeadamente com a minha orientadora de estágio, sendo o ambiente igualmente amigável.

Um bom ambiente de trabalho é algo que valorizo muito em qualquer local onde eu me queira inserir, por esta razão, o bom ambiente sentido por todas as pessoas foi um ponto forte do meu estágio.

4.4. Higiene e segurança no trabalho

Dentro de todo o espaço das instalações da plural+udifar se verificam as condições de higiene e segurança. Com a pandemia causada pelo COVID-19, novas regras de higiene foram implementadas nos espaços do ambiente de trabalho. Os espaços possuem álcool em gel para

a desinfecção das mãos, tanto no refeitório como em espaços partilhados existem indicações que promovem o distanciamento social, assim como as cadeiras mantêm a distância mínima exigida entre si. Relativamente à segurança no trabalho, os operadores de armazém possuem farda própria e calçado adequado para estarem seguros na sua função.

4.5. Serviços multipharma

A plural+udifar, para além de exercer as suas funções como armazenista e distribuidora farmacêutica, também exerce um conjunto de serviços multipharma que permitem dar resposta às necessidades das farmácias. São estes, os serviços de apoio ao cliente e de pedidos/encomendas que mantêm um contacto próximo entre farmácia e fornecedor, serviço de recolha, triagem e incineração de resíduos de medicamentos, produtos químicos e hospitalares dos grupos III e IV, um serviço amigo do ambiente, serviços de formação, entre outros serviços [3].

5. Pontos Fracos (Weaknesses)

5.1. Conhecimento científico

No armazém exerci funções que não correspondem ao trabalho do farmacêutico como diretor técnico na distribuição farmacêutica. Inicialmente foi importante para perceber os processos por que passa o medicamento desde a sua chegada pela indústria até à sua entrega às farmácias, no entanto, passado algum tempo, tornou-se um trabalho mais mecânico, importante, mas que não me acrescentou conhecimentos.

5.2. Controlo de stocks e validades

Através da minha observação e atividade desenvolvida no armazém de distribuição, pude detetar algumas melhorias que poderiam ser praticadas, com o objetivo de gerir melhor os recursos disponíveis e evitar reclamações por parte das farmácias.

No caso da gestão de *stocks* de medicamentos, foi-me possível presenciar um caso de excesso de *stock*, que como consequência afeta o espaço disponível no armazém, assim como pode afetar a qualidade das embalagens, que por ficarem demasiado empilhadas, se podem danificar.

Outro caso observado foi o de validades demasiado próximas do prazo de expirar. Os medicamentos são arrumados por pessoas, o que pode levar a um maior erro. Estes devem ser sempre arrumados segundo o princípio do «primeiro a expirar, primeiro a sair». Um erro que pode acontecer é o de se deixarem medicamentos com prazos de validades menores atrás

dos que têm maior prazo. Isto leva ao desperdício de medicamentos, que deixam de ser viáveis para a comercialização.

6. Oportunidades (*Opportunities*)

6.1. Estágio no setor da distribuição farmacêutica

Sempre tive curiosidade de perceber e acompanhar de perto o setor da distribuição farmacêutica e a função do farmacêutico como profissional nesta área. Além disso, ter a oportunidade de estagiar num outro setor que não a farmácia comunitária, por si só, foi para mim um ponto positivo.

Este estágio permitiu-me alargar a minha visão de como funciona o percurso do medicamento e de todas as etapas que existem desde a chegada do medicamento ao armazém, até à sua entrega pelos distribuidores às farmácias.

6.2. Complemento ao estágio em Farmácia Comunitária

A atividade no armazém permitiu-me ter o acesso a uma enorme diversidade de medicamentos e produtos de saúde, ficar mais familiarizada com embalagens e observar onde e como podem ocorrer erros detetados nas farmácias.

Pude assistir e conhecer o funcionamento do atendimento ao cliente e reclamações por parte das farmácias, mas agora estando do outro lado do telefone. De perceber processos de faturação, como a faturação de vendas diretas. Também tratei dos medicamentos devolvidos pelas farmácias, quer por prazos de validade curtos ou expirados, quer medicamentos danificados, quer medicamentos pedidos por engano.

Todos estes processos, garantem que as farmácias têm as suas necessidades satisfeitas e facilitam a gestão de *stocks* por parte das farmácias, assim como, permitem que estas poupem tempo e recursos.

6.3. Aplicação de conhecimentos

O Regulamento (UE) 2017/745, de 5 de abril, relativo aos dispositivos médicos, apresenta no capítulo II, artigo 14º as obrigações gerais dos distribuidores. O distribuidor deve notificar à autoridade competente a lista de dispositivos médicos colocados no mercado que por ele são distribuídos [5].

A meio do meu estágio, foi-me colocada a atividade de registar dispositivos médicos no SIDM. Todos os dispositivos médicos possuem um código de dispositivo médico (CDM) a eles associado, no entanto, quando colocados no stock da plural+udifar e no SAP, é gerado

um código aleatório que não tem correspondência. Desta forma, através da informação constada no INFARMED, nomeadamente no infoDM, é possível encontrar a informação necessária para o seu correto registo.

7. Ameaças (*Threats*)

7.1. Farmacêuticos na distribuição farmacêutica

Antes de realizar o estágio na plural+udifar tinha a ideia errada da quantidade de farmacêuticos que trabalhariam no setor da distribuição. O número de farmacêuticos a trabalhar neste setor é reduzido. Na sede da plural+udifar, existem atualmente 3 farmacêuticos a desempenhar cargos. O diretor geral, o diretor de compras e a diretora técnica do armazém. Além de serem poucos os farmacêuticos nesta área, os cargos desempenhados, com exceção da direção técnica, são cargos ligados a outras áreas e que podem ser desempenhados por outros profissionais.

Apesar de poucos os farmacêuticos neste setor, estes desempenham papéis muito importantes e imprescindíveis para a garantia das boas práticas de distribuição, pois possuem um grande conhecimento acerca dos medicamentos. Na comunicação com as farmácias e a indústria é importante que haja este conhecimento, que também permite uma melhor comunicação entre as partes envolvidas, sendo que o farmacêutico possui mais apetências para criar um bom contacto com as farmácias.

8. Considerações Finais

Os principais aspetos que retive deste estágio foram que a gestão da qualidade é essencial para garantir a segurança dos medicamentos. Que, o farmacêutico, pela sua formação, é efetivamente o profissional indicado para garantir o cumprimento das BPD na distribuição de medicamentos, além disso, um farmacêutico possui uma melhor capacidade de relação com as farmácias e consegue perceber melhor as suas necessidades. Outro aspeto importante que retive ao longo deste estágio foi de que, no caso dos dispositivos médicos, estes, assim como os medicamentos seguem normas de garantia de qualidade e existem vários processos burocráticos que têm de ser cumpridos para que estes possam ser vendidos e distribuídos.

Considero que o meu estágio foi um bom complemento ao estágio curricular em farmácia comunitária. Permitiu-me entender todos os processos que antecedem o fornecimento dos medicamentos às farmácias, de como é feito todo o percurso do medicamento e de como é feita a sua logística. Permitiu-me também alargar a minha visão relativamente ao mundo do trabalho e as suas possibilidades, de desenvolver novas habilidades, relacionais e de logística que me fizeram evoluir tanto a nível pessoal como a nível profissional.

REFERÊNCIAS

[1] INFARMED - **Deliberação n.º 77-A/CD/2021**. Lisboa: Infarmed. [Acedido a 01 de setembro de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/11048532.PDF/4bde6495-b33d-4311-8302-784be4a65971>

[2] **plural+udifar: Conheça a história da plural+udifar**. [Acedido a 01 de setembro de 2021]. Disponível na Internet: https://www.plural.pt/quem-somos/historia_16

[3] **plural+udifar: Serviços Multipharma**. [Acedido a 06 de setembro de 2021]. Disponível na Internet: https://www.plural.pt/servicos/servicos-multipharma_34

[4] PORTUGAL. Conselho de Administração - **Manual da Qualidade**. Coimbra: PLURAL – Cooperativa Farmacêutica, CRL., 2020.

[5] Jornal Oficial da União Europeia - **Regulamento (UE) 2017/745 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de abril de 2017, relativo aos dispositivos médicos, que altera a Diretiva 2001/83/CE, o Regulamento (CE) n.º178/2002 e o Regulamento (CE) n.º1223/2009 e que revoga as Diretivas 90/385/CEE e 93/42/CEE do Conselho**. 2017 [Acedido a 01 de setembro de 2021]. Disponível na Internet: <https://eurlex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32017R0745#d1e2457-1-1>

Parte III

Monografia

“Nanofibres and Nanohydrogels for Tissue Engineering”

List of Abbreviations and Acronyms

Ag NPs – Silver nanoparticles

BCI – Blood clotting index

BMIMAc – 1-butyl-3-methyl imidazolium acetate

BMP-2 – Bone morphogenetic protein-2

BSA – Bovine serum albumin

CDDs – controlled DDSs

circRNA – Circular RNA

CMC – Carboxymethylcellulose

CNT – Carbon nanotubes

CS – Chitosan

CVD – Cardiovascular disease

DDSs – Drug delivery systems

ECM – Extracellular matrix

FGF2 – Fibroblast growth factor 2

GAGs – Glycosaminoglycans

GelMA – Methacrylated gelatine

HA – Hyaluronic acid

HBC – Hydroxybutyl chitosan

HUVEC – Human umbilical vein endothelial cell

ILs – Ionic liquids

miRNA – Micro RNA

MSCs – Mesenchymal stem cells

nBG – Nano-bioactive glass

NGF – Nerve growth factor

NPs – Nanoparticles

PCL – Poly (ϵ -caprolactone)

PDGF-BB – Platelet-derived growth factor-BB

PDO – Poly (dioxanone)

PEG – Polyethylene glycol

PEO – Poly (ethylene oxide)

PGA – Poly (glycolic acid)

PHB – Poly (hydroxybutyrate)

PLA – Poly (lactic acid)

PLCL – Poly (lactide-co-caprolactone)

PNIPAM – Poly (N-isopropylacrylamide)

PPS – Polyphosphazene

PU – Polyurethane

PVA – Poly-vinyl alcohol

RNAi – RNA interference

SBF – Simulated body fluid

SEM – Scanning electron microscopy

SF – Silk fibroin

siRNAs – Small interfering RNAs

TEM – Transmission electron microscopy

TERM – Tissue engineering and regenerative medicine

TGF- β – Transforming growth factor β

TMC – Quaternary ammonium chitosan

TMC NPs – Nanoparticles of Quaternary Ammonium Chitosan

TPP – Tripolyphosphate

VNPs – Virus nanoparticles

Figure Index

Figure 1 – SEM images of the interior porous structure of the CS, HC-1, HC-2, HC-3 and HBC.....	43
Figure 2 – Influence of the electric field strength.....	47
Figure 3 – SEM observation of experimental membranes of nanofibrous morphology of the nBG embedded within a collagen matrix and histologically stained tissues after 3 weeks of in vivo implantation in rat calvarium defects.....	50
Figure 4 – Classification of hydrogels based on the different properties.....	54

Annex Index

Annex I – Comparison of synthetic polymers, biopolymers and ECM-derived materials for tissue engineering templates.....	70
Annex II – Electrospinning parameter's influence on nanofibre morphology.....	71

I. Introdução

By understanding how cells respond to signals, interact with their environment and organize themselves to form tissues, it is possible to manipulate these processes to repair damaged tissues and even create new ones [1]. With advances in knowledge in this scientific area and advances in technology, tissue engineering emerged.

Tissue engineering aims to develop biological substitutes that restore, maintain or improve tissue or organ function. Regenerative medicine is a broader field that includes tissue engineering [1] [2] where the body, with or without the help of biomaterials, uses its own systems to rebuild tissues and organs [1]. This is an area where there is a lot of research and also a great interest in the potential for medicine [3].

Traditionally, tissue and organ transplantation has been the basis for replacing damaged and diseased body parts, which is dependent on the existence of an available transplant [4]. Therefore, tissue engineering came to overcome the challenges faced by organ and tissue transplants, bringing a faster recovery and also a better prognosis [2]. An aspect that requires attention in tissue engineering therapies is the safety that must exist in obtaining cells and tissues. Another challenge faced is how clinical performance and in vivo biological responses can be assessed, as well as follow-up studies with patients in order to monitor the viability, performance and safety of the tissue engineered product [3].

The three main elements for regenerative medicine and tissue engineering (TERM) are cells, scaffolds, and cell-matrix interactions to promote proper tissue growth [5]. Scaffold is a 3D structure of natural or artificial materials where the tissue is cultivated to mimic a biological process outside the body or to replace a damaged tissue within the body [1], it provides structural support and chemical and mechanical signals for the cells [5].

With the new discoveries in the last few years at TERM, the field of application of biomaterials has grown a lot. Biomaterials can be natural or synthesized in the laboratory, using metallic components, polymers, ceramics, or composite materials [6]. Annex I shows the comparison of synthetic polymers, biopolymers and extracellular matrix (ECM)-derived materials for tissue engineering models.

Currently, biomaterials have been used in medical practice as medical implants, methods to promote healing of human tissues, regenerated human tissues, molecular probes and nanoparticles, biosensors and drug delivery systems [6].

When it is intended to select a biomaterial for tissue engineering, it is important that it has certain characteristics. Its biocompatibility and bioactivity are decisive aspects when choosing a biomaterial for the production of scaffolds [7]. Scaffolds require adequate physical (e.g. geometry, porosity, surface characteristics), chemical (e.g. degradability) and mechanical properties suitable for allowing cell adhesion, proliferation and remodelling [2] [8], they must be non-immunogenic and non-toxic [9], as well as their degradation products [2]. The kinetics and degradation profile must be adequate. Biodegradation of scaffold material must proceed at a rate that matches the speed of its replacement with the native ECM and the growth of new tissue [5]. The pore size of the structure must be adjusted to allow for vascularization, without interfering with the formation of a continuous luminal epithelial layer [9].

Nanotechnology is the science that designs and produces materials at the nanoscale. Research in this area has developed extensively in recent decades. Nanomaterials resulting from nanotechnology have unique physicochemical properties due to their small size [10].

Fibres are an excellent resource for several biomedical applications, in addition to their application in tissue engineering, due to their small size and large surface area, as well as their good mechanical performance. Moreover, they have the great advantage of mimicking the fibres present in the extracellular matrix of the body's tissues, such as collagen fibres [11]. The challenges encountered are the creation of new manufacturing techniques that allow production on an industrial scale and the challenge of achieving the ideal properties of nanofibres [12].

Hydrogels are attractive materials because of their tissue-like properties and because of their biodegradability [4]. They generally exhibit good biocompatibility and high permeability for oxygen, nutrients, and other water-soluble metabolites due to their highly hydrated hydrophilic polymer networks that contain pores between polymer chains [13]. A disadvantage of hydrogels is their limitations in mechanical strength, therefore hydrogels are often mixed with inorganic ingredients to increase their mechanical strength [7].

This review addresses the production processes, the physicochemical characterization and the applicability of nanosponges, nanofibres and nanohydrogels in tissue regeneration as they are promising materials and with a large research and development in the area of TERM.

2. Nanosponges for tissue engineering

2.1. Production and physicochemical characterization of nanosponges

Sponges are defined as a solid matrix dispersed with gas, usually air [14]. These can be manufactured using the freeze-drying technique [5]. It consists of removing water by freeze-drying the subject material.

Sponges are materials that can be developed from plant-based hydrogels, namely those based on cellulose (nanocelluloses), by exploiting their strong interactions with water. The main advantages of cellulose in the field of tissue engineering are its biological compatibility and its cell adhesion properties and its inherent high mechanical strength [15].

In the production of sponges from cellulose, the main phenomena that require special attention are solubility, hydration, wetting, capillarity and diffusion [15].

In order to assess the biocompatibility of the materials used, hemolysis tests, plasma protein absorption and cytotoxicity tests are commonly performed. A great result is to obtain a relative cell growth rate above 75% and a hemolysis index below 5% [14].

Sponge characteristics and physicochemical properties are characterized by methods such as scanning electron microscopy (SEM), asymmetric wettability measurement, water vapor transmission rate, in vitro degradation, mechanical testing, porosity measurement, swelling capacity and moisture retention, antibacterial activity and in vitro cytotoxicity assays [16] [17].

Natural polymers such as agar, chitin, chitosan, alginate and glycosaminoglycans are also sourced from marine resources such as crustaceans and algae. Due to their intrinsic characteristics, environmental and economic advantages, they can be used as matrices for the construction of nanomaterials, scaffolds, etc. [18].

Many studies have demonstrated the potential of ionic liquids (ILs) as platforms for the production of 2D and 3D-based marine polymers, namely sponges, among others. ILs are known as poorly coordinated salts, liquids at room temperature [19], and allow to dissolve a variety of polysaccharides by breaking the hydrogen bonds [18].

As a practical example of its use in the production of sponges, the work done by SILVA, S.S. *et al.* [19] where IL, 1-butyl-3-methyl imidazolium acetate (BMIMAc) was used to dissolve chitin and SF from *Antheraea pernyi* and used for the production of sponges from blend.

Sponges produced by co-dissolution/freeze-drying showed good values of porosity, interconnectivity and pore size, considerable swelling and adequate viscoelastic properties [18][19].

Alginate is a linear polymer present in the brown algae skin wall, it is soluble in water and known for its gelling capacity. Exhibit biocompatibility, low toxicity and low cost [18].

Other functional resources can be added to spongy matrices, such as drugs, growth factors, antibacterial activity, among others, which allow them to increase their performance [5].

Chitosan (CS) is a biopolymer widely explored in tissue engineering due to its characteristics of biocompatibility, biodegradability and adjustable biological properties [16]. For this reason, sponges can be produced from these biocomposites. Sponges based on polysaccharides, such as CS, have low toxicity [14], great mechanical strength, high porosity, high permeability, large surface area and high water retention capacity and bacteriostatic activity, due to the presence of amino groups in its nature [16].

However, as under physiological circumstances CS is insoluble in water it can be esterified to obtain soluble CS derivatives such as hydroxybutyl CS (HBC). HBC has excellent biodegradability due to the presence of the structural β -glycosidic bond in the structure, which can be hydrolyzed by various enzymes (chitinases, chitosanases, lipase and lysozyme). It presents a satisfactory solubility in water and has a thermo-responsive behaviour [14].

The composite sponge was produced by physically mixing HBC with CS to form a porous sponge material through vacuum freeze-drying. This sponge showed better water holding capacity and a large specific surface area and permeability. Among other results, it was observed that the swelling property decreases with increasing proportion by weight of HBC [17]. It was also observed that increasing the degree of substitution of hydroxybutyl groups improves the solubility [14] and decreases the antibacterial activity of HBC due to the reduction of amino substitution groups [16].

In figure 1 it is possible to observe the internal porous structure of the sponges. The CS:HBC mixture contained a weight ratio of 1:3, 1:2 and 1:1 designated HC-1, HC-2, HC-3 respectively.

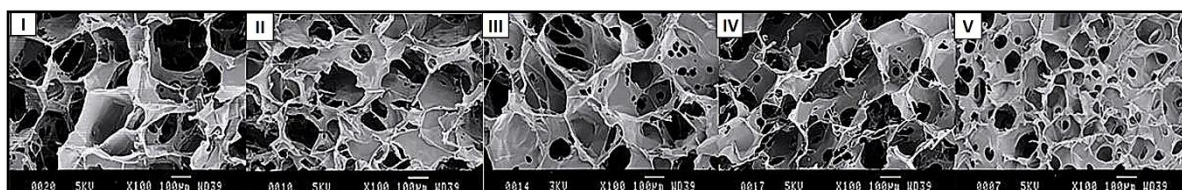


Figure 1 - I-V were the SEM images of the interior porous structure of the CS, HC-1, HC-2, HC-3 and HBC respectively. Adapted from [17]

Another highly valued feature of these sponges in tissue engineering is that they have asymmetric surface wettability, which allows them to have a hydrophobic outer surface and a hydrophilic inner surface. The hydrophobic surface has the function of waterproofing and anti-invasion of pollutants and the hydrophilic surface preserves a moist environment that promotes wound healing, as well as it has an antibacterial activity function [16].

An example of a sponge prepared to have asymmetric wettability is the case of a sponge composed of Nanoparticles of Quaternary Ammonium Chitosan/CS (TMC NPs/CS) prepared by freeze-drying. Quaternary ammonium chitosan (TMC) nanoparticles (NPs) were prepared by ionic crosslinking using negatively charged tripolyphosphate (TPP) as crosslinker. NPs were considered spherical, smooth and non-aggregated [16].

2.2. Applications of nanosponges (in vitro and in vivo)

2.2.1. miRNA sponges

Circular RNAs (circRNAs) are involved in cell differentiation and proliferation, in regulation of transcription and translation. For these reasons they have great potential in several applications, in the development of biomarkers, tools for translating circRNAs and therapeutic potential to regulate cell proliferation. Most studies on circRNAs have focused on their ability to act as micro RNA (miRNA) sponges, whereby they inhibit miRNA-mRNA binding [20].

CircRNA play an important role in cardiovascular disease (CVD), in the proliferation, differentiation, survival and cardiac reprogramming of cardiomyocytes. Namely, heart-related circRNA (HRCR) and CDRIas act as miRNA sponges [20].

Several in vitro and in vivo studies have revealed the role of circRNA, circHIPK3 is a circRNA where its overexpression has shown to induce endothelial proliferation of the

coronary artery, increase cardiomyocyte proliferation, promote angiogenesis, through the effects of miRNA-133a sponge, and decrease fibrosis in the area around the zone surrounding the area of myocardial infarction in adult mice [20].

CircrRNAs can also function as miRNA sponges to regulate proliferation, migration and cell cycle in gastric cancer. Overexpression of miR-21 was identified in bowel cancer samples and based on this information a synthetic circRNA with five repeat miR-21 binding sites was constructed, and inhibition of gastric carcinoma cell proliferation was verified [21].

2.2.2. Silk Fibroin Sponge

An ideal wound dressing should be non-toxic, non-adherent, non-allergenic, maintain a moist environment at the wound interface and be easily removed without trauma. In recent years several types of wound dressings have been formulated, including nanofibres, hydrogels and sponges [22].

Silk fibroin (SF) is a naturally occurring protein-based biomaterial. It has good biocompatibility and causes minimal inflammatory responses in vitro and in vivo. It can be used alone or in combination with other materials in different forms of scaffolds, such as nanofibres, hydrogels and sponges in tissue engineering applications [5].

SF sponges and SF blends have been used to observe the healing of infected wounds in vitro and in vivo. As SF has no inherent antibacterial activity, to these sponges are incorporated agents with antibacterial activity, such as colloidal Ag and ciprofloxacin or gentamicin sulfate [5].

As an example, an in vitro study showed that a citrus pectin/SF sponge, manufactured by freeze-drying, had high porosity (83%), a high water absorption capacity and cyto-biocompatibility for fibroblast cells. Several in vivo studies have demonstrated that SF and SF blend sponges have good cyto-biocompatibility for fibroblasts, smoothness and flexibility, and accelerated wound healing. However, sponges with more than one material showed better results. Another aspect observed was that higher concentrations of SF and smaller pore sizes resulted in decreased in vivo degradation [5].

In order to develop therapies to treat diabetic foot ulcers, a SF sponge was prepared containing gelatine microspheres that had the function of transporting neurotensin, which is a neuropeptide that acts as an inflammatory modulator in wound healing, as well as helping to

improve angiogenesis during wound healing processes. It was observed an acceleration in wound regeneration and re-epithelialization [23].

2.2.3. Chitosan sponge

Due to the properties mentioned in the previous point of CS sponges, they have attracted great attention as wounds dressings [16].

A CS sponge containing platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) was prepared as an osteoinductive material to induce or stimulate bone formation. CS sponge showed effective PDGF-BB loading, controlled release, and potential of cellular migration and growth, which was beneficial to promote the regeneration of periodontal bone [14].

Sponges composed of HBC/CS showed high porosity, water absorption, antibacterial rates (>99.99%) and low blood clotting index (BCI), apart from the ability to promote the growth of fibroblasts, used as dressings for wounds in in vivo tests with rats [14]. They have great potential to promote the formation of skin glands and the creeping growth of epithelial cells, thus being able to promote rapid healing of the skin wound [14] [17].

HBC sponges have high porosity, better hemocompatibility and low BCI, greater cell proliferation and viability, used as wound dressings in in vitro and in vivo tests [14].

Another in vitro study, reported in YANG, J. *et al.* [7] showed that a 3D sponge scaffold having CS, collagen type I and fibronectin to simulate a periodontal tissue, promoted the proliferation of osteoblasts [7].

As mentioned above, the composite sponge TMC NPs/CS has an asymmetric surface wettability that gives it characteristics of a good material for wound healing. Thus, The TMC NPs/CS composite sponge could effectively prevent wound infection, accelerate re-epithelialization, and angiogenesis in vivo chronic wound healing model, thus promoting wound healing [14].

3. Nanofibres for tissue engineering

3.1. Production and physicochemical characterization of nanofibres

Nanofibres can be produced from natural polymers, such as collagen, alginate, fibroin, chitosan, gelatine, etc., and synthetic polymers, such as poly (glycolic acid) (PGA), poly (lactic acid) (PLA) [9], polyethylene glycol (PEG), poly(hydroxybutyrate) (PHB), etc, from ceramic materials. Nanofibres can also be prepared with mixtures of polymers and/or other components [24].

Synthetic polymers give nanofibres excellent mechanical properties, thermal stability and an adequate degradation profile. Natural polymers, on the other hand, have the advantage of being recognized by cell surface receptors, as they have sequences of peptides on their surface [25].

The diameter of nanofibres can be adapted by adjusting the parameters of their synthesis and electrospinning, this one is in the nanometric scale. They have a high porosity and specific surface area. Its porosity is generally well interconnected but the pore size ranges from several to tens of micrometres [26]. Nanofibres allow to obtain 3D architectures [25].

Nanofibre production techniques can be classified into physical, chemical and biological techniques according to the actions applied in their production. Physical methods apply high energy radiation, abrasion, evaporation or condensation to the material. Chemical methods involve chemical reactions between two or more species of reagents to form nanofibres. Finally, biological methods involve biological reactions between nanofibre raw materials and bioactive species, in the presence or absence of external forces [12].

3.1.1. Electrospinning

The best way of producing fibres in nano size scale is electrospinning, this technique allows to produce stable nanofibres [22] with diameters ranging from few nanometres to several micrometres [12]. It is a technique that applies to most polymers [8], as opposed to the phase separation and self-assembly techniques which, besides to being applied to specific polymers, generate short nanofibre strands [26]. Is easy to handle, and cost-effective [8]. This technique uses electricity and uses electrostatic forces to form a thin filament that comes from a polymer solution [2] [27].

In more detail, the electrospinning process makes use of a high voltage power supply, a die, which is connected to a syringe that has a polymer solution, and a collector [2] [27].

The polymer solution with appropriate viscoelastic properties is extruded through a syringe needle [26]. When a high voltage is applied (1 to 30 kV), the pendant drop of polymer solution at the die tip becomes highly electrified with positive or negative charges evenly distributed across the surface. Under the action of these electrostatic interactions (electrostatic repulsion and coulombic forces), the liquid drop will be distorted into the Taylor cone, this because the intensity of the electric field exceeded a limit causing the electrostatic force to overcome the surface tension of the polymer solution and thus force the ejection of a jet of liquid from the nozzle (Figure 2). Then, a thin filament is formed, which is attracted by the collector due to the potential difference. The formed fibres are randomly deposited and the solvent evaporates into the environment [21] [22] [26]. The surface structure and morphology of the electrospun nanofibres can be identified by SEM and transmission electron microscopy (TEM) [28].

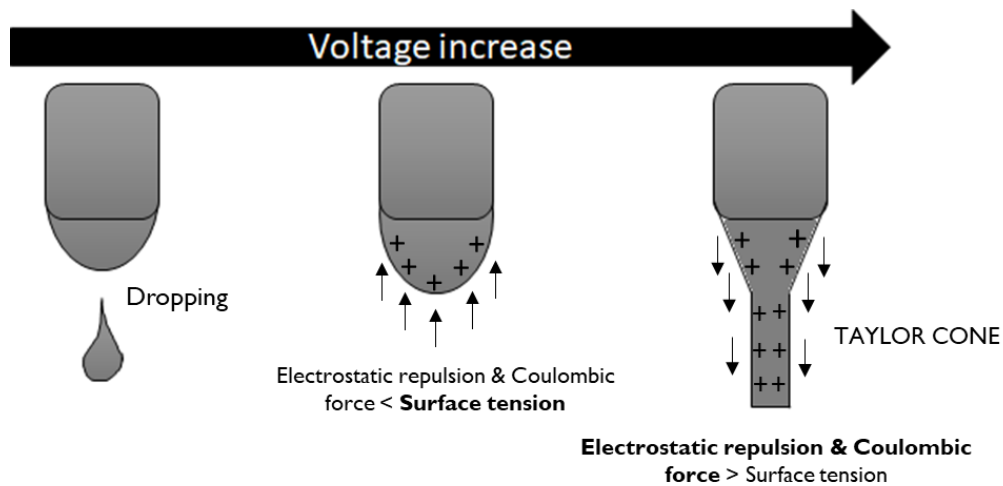


Figure 2 – Influence of the electric field strength. Adapted from [26].

In the electrospinning process there are several parameters that affect the final characteristics of the obtained nanofibres (Annex II). These are the flow rate, applied voltage, needle diameter and distance between needle and collector, solvent used, polymer concentration, polymer solution conductivity and viscosity, humidity and temperature [22] [24] [25] [29].

Besides uniaxial electrospinning, there is also coaxial electrospinning that makes use of two concentric capillaries, which can simultaneously feed two independently monitored solutions [22] and multiaxial electrospinning, which allows processing three or more fluids [29].

The analysis of the applicability of nanofibres makes use of several scientific areas and computational methods. Force-field-based computational methods can be used to describe

the polymeric surfaces of the nanosized scaffold patches and their ability to bind to cell membrane proteins [9].

3.1.2. Carboxymethylcellulose Fibres

Carboxymethylcellulose (CMC) is a biopolymer derived from cellulose [30] and abundant in nature, it is soluble in water and non-toxic [31]. In biomedicine it is used for wound dressings because it is flexible, is able to absorb exudate and promote angiogenesis and autolytic debridement. CMC fibres have high absorbency, are non-adherent, can be cut and used according to the size of wounds in the wound beds, and have low rates of infection [31].

By surface modification electrospinning, CMC nanofibres can be incorporated with silver nanoparticles (Ag NPs) that are immobilized on the surface [31]. SHI, D. *et al.* [30] fabricated CMC/poly (ethylene oxide) (PEO) mixture nanofibres by electrospinning of CMC/PEO aqueous solution, then they were immersed in a solution of Ag NPs, and CMC nanofibres containing Ag NPs were obtained by irradiating the as-prepared nanocomposite. Finally, the PEO was removed. Ag NPs confer antimicrobial properties to composite fibres, namely for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. This activity is conferred by the release of Ag⁺ ions [30].

3.1.3. Bioactive Glass Fibres

Bioactive glasses are osteoconductive and osteoinductive. Due to their inherent fragility, they are added to polymers to increase their bioactivity, mechanical strength and allow the construction of 3D scaffolding [32].

The addition of an agent that promotes the creation of pores inside and on the fibre surface allows to improve its bioactivity, by increasing the amount of bioactive glass available on the surface of the fibres, by increasing the surface area. Greater porosity (100-500 µm) favours the angiogenesis of materials and an increased absorption of proteins, by increasing the specific surface area [26].

Bioactive glasses make it possible to produce a layer of hydroxyapatite on its surface through the process of dissolution-precipitation [32], which is necessary for the connection with bone tissue to occur [26] [32].

After the electrospinning phase, calcination can be carried out to expose the entire ceramic content to the biological environment, allowing the elimination of the polymer and resulting in a pure inorganic fibre [26]. This step can also lead to fibre diameter reduction,

weight reduction, and glass crystallization [32]. Combining inorganic fibres with polymeric matrices, improves degradability, biocompatibility, and mechanical properties [26].

3.2. Applications of nanofibres (in vitro and in vivo)

Nanofibres have diverse applications in the field of TERM, in the regeneration of cartilage, bone, muscle, skin, heart valve and neural tissue, as well as drug delivery systems [25].

3.2.1. Bone regeneration

The porosity between the fibres can help provide nutrients to bone cells. As a result of the increased surface area, biomineralization, cell proliferation and osteogenic differentiation were favoured [26].

MG-63 cells are cells similar to human osteoblasts, which show a rapid and infinite proliferation, and which maintain the undifferentiated phenotype under culture conditions. Therefore, they have been used as a standard model for in vitro tests that assess bone-implant interactions and biocompatibility [26].

Bone scaffolds are generally porous, biodegradable and mechanically strong to support the repair of damaged bone. Type I collagen is the main component of bone, which makes collagen-based scaffolds popular in TERM bone studies [21]. Nanocollagen is used to repair blood vessels [22].

The natural healing process of the bone structure may be insufficient when the bone defect is very large, so the development of synthetic materials for bone repair is a promising challenge. Nanofibres prepared by electrospinning process can reproduce the fibrillar structure of the bone ECM [26].

Bioactive glass fibres are advantageous as bone regeneration materials, cell proliferation platforms, in wound healing and as drug delivery matrices [32] and carriers for antibiotics or biologically active proteins such as growth factors, cytokines or antibodies [26].

Several in vitro studies have demonstrated the bioactivity of electrospun bioactive glass fibres (hollow, solid and porous) by comparing the composition and morphology of the fibres with the reported initiation of HA deposition after immersion in simulated body fluid (SBF). Fibre bioactivity has been shown to be affected by their different morphology, chemical structure, and fibre:SBF ratio [32].

Figure 3 represents an *in vivo* study where experimental membranes incorporated in collagen matrix, collagen/nano-bioactive glass (nBG) hybrid and its combination with 50 µg/ml fibroblast growth factor (FGF2) (ideal concentration determined *in vitro*) were implanted in rat calvaria. The results demonstrated that incorporation of the nBG component significantly increased bone formation within three weeks. Incorporation with FGF2 enhanced the defect closure and bone regeneration [33].

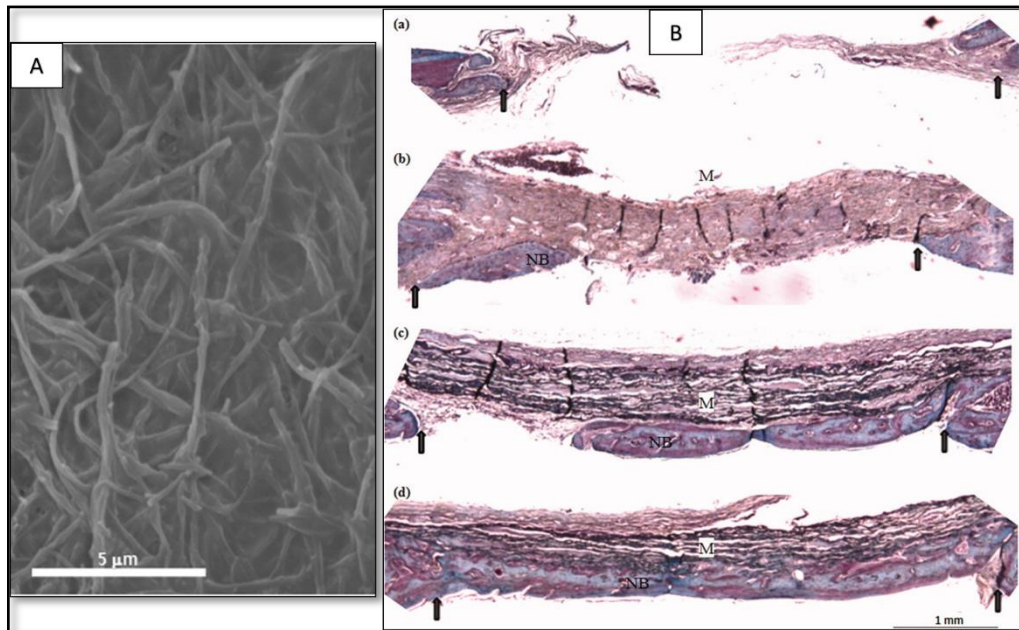


Figure 3 - SEM observation of experimental membranes of (A) nanofibrous morphology of the nBG embedded within a collagen matrix. (B) histologically stained tissues after 3 weeks of *in vivo* implantation in rat calvarium defects. (a) blank control and (b–d) membranes were used: (b) collagen, (c) collagen-BG, and (d) collagen-BG-FGF. «M» stands for membrane and «NB» for new bone. Adapted from [33].

3.2.2. Skin regeneration

Fibres are important materials for wound care. Its high surface-volume properties promote cell attachment and its interconnected pores are compatible with gas exchange, nutrient delivery and fluid loss control [25]. The wound healing process involves four phases, hemostasis, inflammation, proliferation, and maturation/remodelling [22].

Electrotrophied nanofibre membranes derived from polysaccharides are similar to the skin ECM, have high surface area, porosity and the ability to act as drug delivery systems. These polysaccharides can be of plant origin (e.g., starch, cellulose and pectins), animal (e.g., chitosan and hyaluronic acid), algae (e.g., alginates), fungal (e.g., pullulan and schizophyll) and bacterial (e.g., dextran and xanthan gum). As an example, an *in vitro* study carried out with mouse fibroblasts (L929) demonstrated excellent biocompatibility of Schizophyllan/PVA

nanofibres, as well as high efficiency in improving cell adhesion and proliferation, demonstrating its non-cytotoxicity [22].

In the case of diabetes mellitus, peripheral neuropathy, impaired vascular function, impaired angiogenesis and chronic inflammation can lead to diabetic ulcers. Polyurethane (PU)-based nanofibres and different amounts of CMC containing *Malva sylvestris* extract were prepared to assess their effect on diabetic wound healing. The healing process was evaluated in vivo and it was observed that the addition of the extract had a positive effect on granulation tissue formation and tissue repair. It was also observed that the increase in the diameter of the nanofibres and the decrease in the concentration of CMC resulted in an increase in the release time of the extract in up to 85h [34]. Another study showed that after 15 days of treatment, animals treated with PU electrospun membranes had well-organized dermis and granulation tissue [25].

3.2.3. Bladder regeneration

The bladder wall is made up of a specialized epithelial lining, urothelium, and a smooth muscle layer covering about 60 to 70% of its thickness [35].

Various scaffolds and biomaterials have been studied for bladder tissue engineering. Collagen-derived scaffolds, due to their biocompatibility, were among the first choice [7] [35]. On the other hand, synthetic scaffolds offer more versatile and adaptable properties to meet the needs of target tissues [35].

The study by BRACCINI, S. *et al.* [9] analyzed the adhesion and proliferation of fibroblast cells from mouse embryos of clone A31 Balb/3T3 on different polymeric surfaces prepared from poly(dioxanone) (PDO), PGA, PHB, and PLA, and their 1:1 mixtures. Experimental results have shown that PGA-based polymer films promote better adhesion of mouse embryo fibroblast Balb/3T3 cells compared to glass and other polymeric films. Whereas, in the experience of cell proliferation in relation to plain glass it was found that the best results were observed for films based on PLA1, PLA2, PHB/PLA1 and PHB/PGA [9].

With the results of the in vitro study it was concluded that these polymeric biomaterials can be used as scaffolds for tissue engineering and regenerative urology. However, most synthetic polymers induce inflammation in vivo and may not provide the adequate characteristics needed for long-term proper functioning of the urethra. These limitations require consideration of new biomaterials for urological tissue engineering [9].

In *in vivo* studies it was observed that the mechanical characteristics of scaffolds, in the particular case of Poly(lactide-co-caprolactone) (PLCL), are as important in tissue regeneration as their biocompatibility. Another study revealed that hyaluronic acid (HA) coating increased smooth muscle cell proliferation and migration in the PLCL/HA scaffold [35].

3.2.4. Drug delivery system

Peptides and proteins are the most multifunctional biomolecules in the body, participating in various physiological processes. For instance, transforming growth factor β (TGF- β) is a cytokine that is involved in wound healing, inflammation, adult stem cell differentiation, and embryonic development [29].

However, traditional methods of administration protein drugs have many limitations, such as structural changes that lead to loss of bioactivity [29]. Nanofibres produced by the co/multi-axial electrospinning technique can encapsulate proteins and other therapeutic agents and serve as drug delivery systems (DDSs) [22][29], with applicability in tissue regeneration [29].

For example, an aligned nanofibrous scaffold composed of nerve growth factor (NGF)-encapsulating poly(ϵ -caprolactone) (PCL) nanofibres was developed. The co-encapsulation of NGF and BSA allowed the sustained release of growth factor over 28 days and the protein-loaded scaffolds successfully promoted the adhesion, proliferation and neurite extension of PC12 cells [29]. Another study used nanofibres made from a mixture of CS, PEO and encapsulated insulin [36]. Insulin bioactivity was assessed *in vitro* by quantifying Akt phosphorylation in preadipocytes [29][36]. Its stability was also evaluated, and the *in vitro* study revealed that its stability was dependent on the PEO ratio, as well as its morphology and mechanical properties [36].

4. Nanohydrogels for tissue engineering

4.1. Production and physicochemical characterization of nanohydrogels

Hydrogels consist of a colloiddally dispersed solid with long, branched parts and a liquid that acts as a dispersant, which is mostly water [13]. The solid component is made of a three-dimensional polymeric network of hydrophilic nature, where the polymers are physically or chemically linked by crosslinking [37], these bonds give the hydrogels resistance to dissolution [13]. They have a high water content, because, due to their characteristics (presence of hydrophilic groups) they can bind several-fold more water as compared to their dry weight [37] [38]. This feature makes them expandable materials. They are semi-transparent materials and semi-permeable to gases and fluids [38], are considered mechanically stable and easily deformable systems [13].

Hydrogels are presented in the form of an amorphous gel, elastic solid sheet or film [38]. Hydrogels can be formed in vitro or in situ, and can be implantable or injectable [39]. The in situ formation allows efficient and homogeneous encapsulation of drugs or cells [40]. Natural hydrogels have a large amount of water, softness, flexibility and biocompatibility. Synthetic hydrogels, on the other hand, allow for a more stable formulation and easy shape control and have a low production cost [37]. Hydrogels can also be designed to respond to stimuli such as a change in pH or temperature, exposure to a specific wavelength of light, or exposure to electrical or magnetic fields [41].

Hydrogel-based scaffolds have the advantages of biocompatibility and high porosity, which makes them able to facilitate cell growth, differentiation and neovascularization [42], in addition to their ability to mimic the ECM, and thus, reproduce a good environment for cell development [39].

Figure 4 represents the classification of hydrogels according to their different properties.

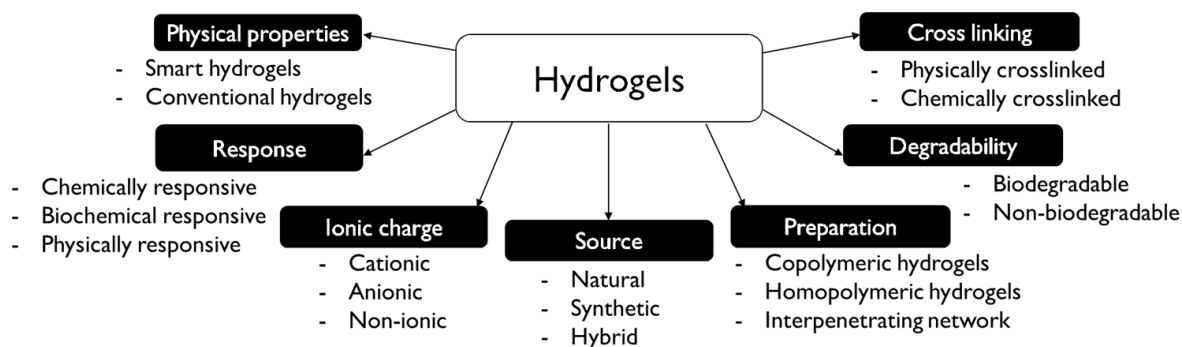


Figure 4 – Classification of hydrogels based on the different properties. Adapted from [43].

4.1.1. Polymer and peptide hydrogels

Hydrogels can be produced from natural polymers like collagen, matrigel and chitosan or from synthetic polymers like PEG [39]. The polymers used in the construction of hydrogels for tissue regeneration are greatly influenced by the tissue in which they will be applied. For example, in the case of manufacturing heart valves for tissue engineering, the most used biomaterials are collagen type I and fibrin, as they are the main components of ECM in native heart valves. Regarding synthetic polymers, polyurethane is one of the most successful materials for the development of cardiovascular devices, as it has a structure with both the hard and soft segments beneficial to modulate polymer stiffness [8].

Polymer hydrogels can be produced in different ways. They can be classified into three categories: crosslinking polymer hydrogel, conductive polymer hydrogel and natural polymer hydrogel [44].

Crosslinking polymer hydrogel:

Chemical hydrogels – are produced by covalent crosslinking of polymer chains. The most common crosslinkers are epichlorohydrin, glutaraldehyde and polyaldehydes. They have multiple porosity [44], as well as multiple mechanical strength that is affected by their rheological behaviour. This strength will somehow define its use [15].

Physical hydrogels – are formed by non-covalent supramolecular interactions (hydrogen bonds, tangled chains, hydrophobic interaction, crystalline interaction, etc.). Due to their weak interactions, they are reversible hydrogels and have weak mechanical properties, a viscoelastic behaviour and multiple porosity. They are

produced from solutions at high temperature or by sonication, followed by cooling to room temperature where the gel form is obtained [44].

Double network hydrogel – are produced by chemical and physical crosslinking, presenting a high mechanical strength and tenacity [44].

Conducting polymer hydrogels:

Conducting polymer hydrogels are gels, which contain a conducting polymer (e.g. polyaniline, polypyrrole, polythiophene) along with a supporting multifunctional dopant (e.g. nanomaterials, such as nanocarbons and metallic nanoparticles.) as well as a gelator [44].

Natural polymer hydrogel:

Natural polymers are known for their sustainability, biocompatibility, biodegradability and low cytotoxicity. The most common polymers and polysaccharides are cellulose, chitosan and hyaluronic acid and are used to prepare hydrogels. Using cellulose hydrogels as an example, these can be easily prepared [15] from cellulose-based matrices or by nanocellulose incorporating into composites [44].

4.1.2. Nanoparticle–hydrogel

Nanoparticle-hydrogel superstructures can be formed by physical and covalent crosslinking. For tissue engineering, these structures have the advantages of having adjustable mechanical properties, allowing controlled and localized drug delivery and greater availability of bioactive agents [42].

Polyphosphazene (PPS) is a biopolymer that has been used to produce hydrogels used for drug delivery. Amphiphilic graft PPS in aqueous solution, has the ability to self-assemble into core–shell polymer micelles. Its degradation rate can be adjusted, have structural design flexibility, and non-toxic degradation products [40].

The poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM) hydrogel allows to encapsulate drugs easily and gives a temperature-dependent drug release in a slow and linear profile. As in its pure state its capacity is limited, the formation of a copolymer is an effective strategy to adjust its properties. These hydrogels have been incorporated with organic and inorganic NPs [41].

4.2. Applications of nanohydrogels (in vitro and in vivo)

In recent years, hydrogels have been widely used in the field of biomedical applications, as reservoirs for controlled drug release [40], cell encapsulation and delivery [42], as supports for tissue engineering, materials for wound healing, etc. [37].

4.2.1. Bone regeneration

Scaffolds made of silica nanomaterials have high porosity, high mechanical strength, low cytotoxicity and biocompatibility. They have the ability to stimulate bone cell growth and to load and release signalling molecules [45].

Medicines and growth factors can be used simultaneously on hydrogel scaffolds. Its simultaneous administration has shown the best results in bone tissue engineering. A scaffold of mesoporous silica nanomaterials with controlled release capacity of dexamethasone and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) was developed. Silica nanomaterials were animated with amine groups that interacted with BMP-2, while mesopores were loaded with dexamethasone [45]. In vitro studies evaluated its cellular viability and the results showed that this scaffold promoted osteogenic differentiation. In the subsequent in vivo study, its intramuscular implantation in rats for 3 weeks revealed that this system effectively induced bone differentiation and regeneration [46].

Chondroitin sulphate

Chondroitin sulphate is a natural macromolecule, belonging to the class of glycosaminoglycans (GAGs) and used in the preparation of hydrogels. It is one of the main components of ECM. It proved to be a biocompatible material, with excellent stability, controlled degradation and non-toxic. Furthermore, it has many bioactivities, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-coagulation, antitumor, immune-enhancing activity [7].

Due to these characteristics, chondroitin sulphate was usually applied to prepare a composite biomaterial in cartilage tissue engineering, in the form of an injectable hydrogel, in order to simulate the ECM cartilage. As the extracellular matrix of bone has 65-70% mineral component, chondroitin sulphate combined with mineral component was applied to fabricate biomimetic scaffold for substitution of bone [7].

Hydrogels encapsulating spheroids

Multi-cellular spheroids are formed as a 3D structure with dense cell-cell/cell-extracellular matrix interactions. They have been widely used in TERM as building blocks to engineer 3D complex tissues. Due to their spherical 3D structure that allows for many interactions, spheroids allow to regulate cell functionality, such as its response to stimuli. Furthermore, spheroids that are smaller in size, less than 100 μm , allow for longer viability [39].

Mesenchymal stem cells (MSCs) have the advantage of being able to be isolated from various tissues of a mature organism and with a potential for multi-differentiation to different cell lines [47]. In addition, hydrogels encapsulating spheroids within their ECM-like mesh structure were used as 3D carriers to control spheroid fusion and vascularization [39], with vascularization being an important criterion in bone tissue regeneration [47].

Thus, the study performed by DEO, D.N. *et al.* [47] demonstrated that MSC/human umbilical vein endothelial cell (MSC/HUVEC) spheroids encapsulated in collagen/fibrin hydrogels complexed with prevascularized bone tissue exhibited the formation of a prevascular network, enhanced cell viability and proliferation, as well as improved osteogenic differentiation and increased bone mineral deposition. This *in vitro* study suggests that MSC/HUVEC spheroid-encapsulated composite hydrogels are a good strategy for vascularized bone tissue regeneration [47].

Peptide Hydrogels

Peptide hydrogels are easy to create, have excellent biocompatibility, biodegradability, morphological flexibility, strong mechanical stability and a porous structure, in addition to a high specific surface area, which makes them materials with unique characteristics that allow them to be useful in engineering as well as for target drug and gene delivery [48].

Hydroxyapatite is a biomimetic material that has been widely used in bone tissue engineering due to its composition and structure similar to the natural bone mineral apatite. Hence, was manufactured a multicomponent peptide-based hydrogel that incorporated hydroxyapatite in its composition. This hydrogel-hydroxyapatite scaffold improved mechanical properties and the presence of calcium bone particles along with improved cell adhesion and viability [48].

Peptides can also be combined with proteins, chitosan or other biomolecules to form hydrogels for bone tissue engineering application. Furthermore, they can be manufactured in 3D hydrogels that improve their mechanical properties, greater porosity and larger specific surface areas [48].

4.2.2. Wound Dressings

Due to their hydrophilic nature and insolubility, hydrogels have a great potential to absorb wound exudates and at the same time allow oxygen diffusion that accelerates healing [37] [38]. They are widely used in the engineering of soft tissue in the skin, blood vessels, muscle and fat. Due to their characteristics of mimicking the properties of human skin, they have wide application as wound dressings and can be presented in various forms, such as film, sprayable, and injectable gels [37].

Methacrylated gelatine, methacrylated kappa-carrageenan and CS are three natural polymers with hydrophilic properties and particular characteristics that allow them to be good polymers for forming hydrogels for wound dressing [37].

As said before, currently, there are hydrogel dressings with integrated sensors with the ability to detect specific biological, chemical or physical processes such as temperature, oxygenation amount, inflammation level, bacterial density, and pH. These biosensors make it possible to provide information about the condition of the wound [37].

Cellulose derived hydrogels:

Cellulose derivatives are an alternative to pure cellulose because they have a better dissolution capacity both in water and in organic solvents, in addition to their biocompatibility, biodegradability and low cost. The most important natural polymers derived from cellulose are cellulose acetate, cellulose sulfate, cellulose nitrate, CMC, ethyl cellulose and methyl cellulose [49].

Biomimetic CMC/dopamine tissue adhesive hydrogels have been developed. The materials presented a six-fold improved wet tissue adhesion force over a commercial suture agent due to the interfacial reactions between the catechol moieties of the hydrogel and the biomolecules on the wet tissue surface [49].

Methyl cellulose has the ability to form thermo-sensitive hydrogels, having been obtained silver oxide nanoparticles from a precursor salt, during the hydrogelation process.

These materials showed good results in the healing of burns and showed great potential as injectable hydrogels for skin regeneration [49].

4.2.3. Drug delivery systems

DDSs are of special interest because they can significantly release biological agents in the right place and/or at a rate adjusted to disease progression. These combine polymers, natural or synthetic, with biocompatible drugs and can be administered in the form of injectable hydrogels [50].

Several studies have reported the use of three-dimensional hydrogels (multilayer nano structure) and polymer micelles in controlled DDSs (CDDs) [21]. The advantages of these vehicles containing nanomaterials is that they can improve the therapeutic activity of the drug by extending the half-life, increasing the hydrophobicity of the drugs, reduce potential immunogenicity and still release drugs in a controllable and limited manner [50].

Polymer blends have demonstrated a good response to external stimuli which can be regarded as a novel class of carriers or coating materials for sustained drug release and for CDDs [50].

The work performed by RASOOL, A *et al.* [51] prepared CS/PVP based pH sensitive hydrogels for the controlled release of wound healing drug (silver sulfadiazine). Biodegradation of hydrogels and drug loading and release were evaluated in vitro. The results showed that the hydrogels gradually degraded over time [51]. Regarding the release of silver sulfadiazine, the results showed a controlled release of 91.2% in 80 minutes. These results suggest that these hydrogels are good candidates as CDDs for dressings and wound healing [50] [51].

Another work prepared HA/poly- γ -glutamic acid hydrogels to act as protein carriers, in this case, bovine serum albumin (BSA) was used as the protein drug model. The in vitro drug release study demonstrated that the release of BSA from HA/poly- γ -glutamic acid hydrogels with various compositions showed sustained release behaviour (>30 h). In this study it was also observed that the crosslink density of the hydrogel affects drug release [52].

CDDs hydrogels have also been explored in the treatment of neurodegenerative diseases. An example of this use was the creation of a hydrogel for the development of stem cells containing amyloid nanofibrils, composed of Fmoc-protected peptides derived from β -sheet prone C-terminal A β 42. The hydrogel allowed the proliferation and fixation of cells and supported the differentiation of mesenchymal stem cells. Many other studies have shown that

encapsulation of neural stem cells in different types of hydrogels improved stem cell survival and cognitive capacities in mouse models [53].

4.2.4. Nanoparticles encapsulated in hydrogels

Nanoparticles allow for the controlled release of bioactive agents. In tissue engineering, they have been incorporated into hydrogels as a way to improve therapeutic outcomes [42].

It has been shown that cardiomyocytes and related progenitor cell populations grow exponentially and migrate well by electrophysiological stimulation, thus conducting hydrogels have been studied for applications in cardiac tissue engineering. Carbon nanotubes (CNT) have electrical properties [54].

An in vitro study incorporated CNT into (methacrylated gelatine) nanotubes GelMA hydrogels for cardiac scaffolds. The results show that CNT made the hydrogels more conductive, which promoted cell adhesion and improved electrical coupling between cells. [38] Another similar study demonstrated that the conducting hydrogel enhanced the cardiac differentiation of mouse embryoid bodies when compared to a GelMA only and a random CNT-GelMA hydrogel [54].

Hydrogels also allow the encapsulation of RNA interference (RNAi) molecules into specific bone defect sites and achieving a sustained release to surrounding cells. To date, hydrogels have transported nucleic acids in the form of RNAi conjugates or within nanoparticles. The activity of osteoblasts and osteoclasts is regulated by several signalling pathways, and RNAi molecules including small interfering RNAs (siRNAs) and miRNAs can be used as a mechanism in modulating bone remodelling [55].

In vitro experiments demonstrated that the sustained delivery of siNoggin and siNoggin/miRNA-20a increased osteogenic differentiation in hydrogel 3D cultivation. Another in vivo study demonstrated that sustained release enhanced miRNA-26a expression at both the defect and the surrounding tissue, which promoted vascularization and bone formation [55].

Also, for wound healing, in vitro and in vivo studies have been carried out with hydrogels having nanoparticles. Namely, hydrogels containing silver nanoparticles demonstrated their sustained release and ability to inhibit bacterial growth, in an in vitro test. Other in vitro tests were carried out on hydrogels containing ciprofloxacin, and their controlled and sustained release was demonstrated [42].

4.2.5. Plant viruses in bioactive Hydrogels

Plant viruses are suitable supports for the development of innovative nanomaterials. They have the advantages of being hydrophilic and self-assembling. They can be modified by genetic engineering, bioconjugation or encapsulation to form virus nanoparticles (VNPs) [56].

VNPs have many advantages in biomedicine, such as their uniformity and versatility, in addition to being safe and have an inexpensive production. They are biocompatible and biodegradable. Plant virus-derived VNPs remain stable when exposed to high temperatures, extreme pH, and many solvents [56].

Plant VNPs have been used to develop inorganic hybrid materials and modified to carry drugs, contrast and imaging reagents, immunomodulators, enzymes, and biosensors. Bioactive scaffolds can be developed by incorporating plant VNPs into hydrogels, allowing the exhibition of peptides that promote cell proliferation, adhesion, migration or differentiation [56].

5. Conclusions

TERM combines the principles of biomaterials and cell transplantation to develop new tissues and to promote endogenous regeneration [57]. Biomaterials, more precisely, nanomaterials, have been widely used for *in vitro* and *in vivo* studies, for application in TERM, with different functions, according to their intrinsic properties.

The main objectives of *in vitro* studies are to demonstrate that the materials are biologically active, assess their viability, predict their *in vivo* behaviour and adjust the parameters to produce the biomaterial with the best physicochemical characteristics for a particular use. Then, *in vivo* studies assess the efficiency and safety of biomaterials.

In this work, were exposed some of the *in vitro* and *in vivo* studies on the use of biomaterials, such as nanofibres and nanohydrogels, as well as nanosponges, which have been carried out more recently for use in tissue engineering. These nanoscale biomaterials allow for superior biocompatibility. Its physicochemical characteristics were addressed, in general, the physicochemical characteristics considered most important are its composition, structure, size, surface properties, porosity, charge and stability [58]. Its main forms of production and polymers used were also addressed.

From a therapeutic point of view, nanomedicine still needs to overcome obstacles before its commercialization. It needs to create nanostructures with the appropriate physicochemical properties and biological behaviours, as well as to optimize reproducible manufacturing processes. In addition, products must have a favourable pharmacological and toxicity profile and demonstrate safety and efficiency in clinical trials [58].

REFERENCES

- [1] National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, obtained in may 16, 2021, from <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine>
- [2] LI, Z.; XIE, M.; LI, Y.; MA, Y.; LI, J.; DAI, F. - **Recent Progress in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Journal of Biomaterials and Tissue Engineering. ISSN: 2157-9083. 6, 10 (2016) 755-766.
- [3] Regenerative medicine and human tissue engineering, (2015) obtained in may 16, 2021, from <https://www.certh.gr/dat/66AB249E/file.pdf>
- [4] DZOBO, K.; THOMFORD, N.E.; SENTHEBANE, D.A.; SHIPANGA, H.; ROWE, A.; DANDARA, C.; PILLAY, M.; MOTAUNG, K.S.C.M. - **Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine**. Stem Cells International. ISSN: 16879678. 2018 (2018). doi:10.1155/2018/2495848.
- [5] GHOLIPOURMALEKABADI, M.; SAPRU, S.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A.; REIS, R.L.; KAPLAN, D.L.; KUNDU, S.C. - **Silk fibroin for skin injury repair: Where do things stand?** Adv Drug Deliv Rev. ISSN 18728294. 153 (2020) 28-53. doi:10.1016/j.addr.2019.09.003.
- [6] National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering. Biomaterials, obtained in may 16, 2021, from <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/biomaterials>
- [7] YANG, J.; SHEN, M.; WEN, H.; LUO, Y.; HUANG, R.; RONG, L.; XIE, J. - **Recent advance in delivery system and tissue engineering applications of chondroitin sulfate**. Carbohydrate Polymers. ISSN: 01448617. 230 (2020) 115650. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115650.
- [8] HASAN, A.; SALIBA, J.; PEZESHGI M.H.; BAKHATY, A.; NASAJPOUR, A.; MOFRAD, M.R.K.; SANATI-NEZHAD, A. - **Micro and nanotechnologies in heart valve tissue engineering**. Biomaterials. 103 (2016) 278-292. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.07.001.
- [9] BRACCINI, S.; PECORINI, G.; CHIELLINI, F.; BAKOS, D.; MIERTUS, S.; FRECER, V. - **Adhesion of fibroblast cells on thin films representing surfaces of polymeric scaffolds of human urethra rationalized by molecular models of integrin binding: cell adhesion on polymeric scaffolds for regenerative medicine**. J Biotechnol. ISSN: 18734863. 324, October (2020) 233–238. doi:10.1016/j.jbiotec.2020.11.001.

- [10] EFTEKHARI, A.; DIZAJ, S.M.; SHARIFI, S.; SALATIN, S.; SAADAT, Y.R.; VAHED, S.Z.; SAMIEI, M.; ARDALAN, M.; RAMESHRAD, M.; AHMADIAN, E.; CUCCHIARINI, M. - **The Use of Nanomaterials in Tissue Engineering for Cartilage Regeneration; Current Approaches and Future Perspectives.** International Journal of Molecular Sciences. 21, 536 (2020). doi:10.3390/ijms21020536.
- [11] QASIM, M.; CHAE, D.S.; LEE, N. - **Advancements and frontiers in nano-based 3d and 4d scaffolds for bone and cartilage tissue engineering.** International Journal of Nanomedicine. . ISSN: 11782013. 14 (2019) 4333-4351. doi:10.2147/IJN.S209431.
- [12] RASOULI, R.; BARHOUM, A.; BECHELANY, M.; DUFRESNE, A. - **Nanofibers for Biomedical and Healthcare Applications.** Macromolecular Bioscience. ISSN: 1800256. 19, 2 (2018). doi:10.1002/mabi.201800256.
- [13] TEBMAR, J.; BRANDL, F.; GOPFERICH, A. – **Hydrogels For Tissue Engineering.** In: MEYER, U.; MEYER, T.; HANDSCHEL, J.; WIESMANN, H.P. Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 2009. ISBN: 978-3-540-77754-0, 495-513.
- [14] SUN, M.; WANG, T.; PANG, J.; CHEN, X.; LIU, Y. - **Hydroxybutyl Chitosan Centered Biocomposites for Potential Curative Applications: A Critical Review.** Biomacromolecules. ISSN: 15264602. 21, 4 (2020) 1351–1367. doi:10.1021/acs.biomac.0c00071.
- [15] AJDARY, R.; TARDY, B.L.; MATTOS, B.D.; BAI, L.; ROJAS, O.J. - **Plant Nanomaterials and Inspiration from Nature: Water Interactions and Hierarchically Structured Hydrogels.** Adv Mater. ISSN 15214095. May (2020). doi:10.1002/adma.202001085.
- [16] XIA, G.; ZHAI, D.; SUN, Y.; HOU, L.; GUO, X.; WANG, L.; LI, Z.; WIANG, F. - **Preparation of a novel asymmetric wetttable chitosan-based sponge and its role in promoting chronic wound healing.** Carbohydrate Polymers. ISSN: 01448617. 227, 7166 (2020) 115296. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115296.
- [17] HU, S.; BI, S.; YAN, D.; ZHOU, Z.; SUN, G.; CHENG, X.; CHEN, X. - **Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing.** Carbohydrate Polymers. ISSN: 01448617. 184, June 2017 (2018) 154–163. doi:10.1016/j.carbpol.2017.12.033.

- [18] SILVA, S.S.; GOMES, J.M.; RODRIGUES, L.C.; REIS, R.L. **Marine-Derived Polymers in Ionic Liquids: Architectures Development and Biomedical Applications**. Mar Drugs. ISSN: 16603397. 18, 7 (2020). doi:10.3390/md18070346.
- [19] SILVA, S.S.; GOMES, J.M.; VALE, A.C.; LU, S.; REIS, R.L.; KUNDU, S.C. - **Green Pathway for Processing Non-mulberry Antheraea pernyi Silk Fibroin/Chitin-Based Sponges: Biophysical and Biochemical Characterization**. Frontiers in Materials. ISSN: 22968016. 7, May (2020). doi:10.3389/fmats.2020.00135.
- [20] MESTER-TONCZAR, J.; HASIMBEGOVIC, E.; SPANNBAUER, A.; TRAXLER, D.; KASTNER, N.; ZLABINGER, K.; EINZINGER, P.; PAVO, N.; GOLIASCH, G.; GYONGYOSI, M. - **Circular RNAs in Cardiac Regeneration: Cardiac Cell Proliferation, Differentiation, Survival, and Reprogramming**. Front Physiol. ISSN: 1664042X. 11, September (2020) doi:10.3389/fphys.2020.580465.
- [21] WU, W.; ZHEN, T.; YU, J.; YANG, Q. - **Circular RNAs as New Regulators in Gastric Cancer: Diagnosis and Cancer Therapy**. Front Oncol. ISSN: 2234943X. 10, September (2020) 1-10. doi:10.3389/fonc.2020.01526.
- [22] IACOB, A.T.; DRAGAN, M.; IONESCU, O.M.; PROFIRE, L.; FICAI, A.; ANDRONESCU, E.; CONFEDERAT, L.G.; LUPASCU, D. - **An Overview of Biopolymeric Electrospun Nanofibers Based on Polysaccharides for Wound Healing Management**. Pharmaceutics. ISSN 19994923. 12, 10 (2020) 1–49. doi:10.3390/pharmaceutics12100983.
- [23] LIU, J.; YAN, L.; YANG, W.; LAN, Y.; ZHU, Q.; XU, H.; ZHENG, C.; GUO, R. - **Controlled-release neurotensin-loaded silk fibroin dressings improve wound healing in diabetic rat model**. Bioactive Materials. ISSN: 2452199X. 4, March 2019 (2019) 151–159. doi:10.1016/j.bioactmat.2019.03.001.
- [24] BHATTARAI, D.P.; AGILAR, L.E.; PARK, C.H.; KIM, C.S. - **A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering**. Membranes. ISSN: 20770375. 8, 3 (2018). doi:10.3390/membranes8030062.
- [25] MIGUEL, S.P.; FIGUEIRA, D.R.; SIMÕES, D.; RIBEIRO, M.P.; COUTINHO, P.; FERREIRA, P.; CORREIRA, I.J. - **Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: A review**. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. ISSN: 18734367. 169 (2018) 60–71. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.05.011.
- [26] DEJOB, L.; TOURY, B.; TADIER, S.; GREMILLARD, L.; GAILLARD, C.; SALLES, V. - **Electrospinning of in situ synthesized silica-based and calcium phosphate**

bioceramics for applications in bone tissue engineering: a review. Acta Biomater. ISSN: 18787568. 123 (2021) 123–153. doi:10.1016/j.actbio.2020.12.032.

[27] LIPOLO, L. S. and RAHMAN, Md. M. **Electrospinning and Electrospun Nanofibers.** World Journal of Nano Science and Engineering. 6, 2 (2016) 45-50. doi:10.4236/wjnse.2016.62005

[28] WANG, F.; SHI, D.; LAN, T.; ZHANG Y.; SHAO, Z. - **One-step preparation of carboxymethyl cellulose/polyoxyethylene nanofiber mats containing silver nanoparticles.** Integrated Ferroelectrics. ISSN. 16078489. 169, 1 (2016) 50–57. doi:10.1080/10584587.2016.1162613.

[29] MOREIRA, A.; LAWSON, D.; ONYEKURU, L.; DZIEMIDOWICZ, K.; ANGKAWINITWONG, U.; COSTA, P.F.; RADACSI, N.; WILLIAMS, G.R. - **Protein encapsulation by electrospinning and electrospraying.** J Control Release. ISSN 18734995. 329, October (2021) 1172–1197. doi:10.1016/j.jconrel.2020.10.046.

[30] SHI, D.; WANG, F.; LAN, T.; ZHANG, Y.; SHAO, Z. - **Convenient fabrication of carboxymethyl cellulose electrospun nanofibers functionalized with silver nanoparticles.** Cellulose. ISSN: 1572882X. 23, 3 (2016) 1899–1909. doi: 10.1007/s10570-016-0918-x.

[31] KANIKIREDDY, V.; VARAPRASAD, K.; JAYARAMUDU, T.; KARTHIKEYAN, C.; SADIKU, R. - **Carboxymethyl cellulose-based materials for infection control and wound healing: A review.** Int J Biol Macromol. ISSN: 18790003. 164 (2020) 963–975. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.160.

[32] NAGRATH, M.; ALHALAWANI, A.; YAZDI, A.R.; TOWLER, M.R. - **Bioactive glass fiber fabrication via a combination of sol-gel process with electro-spinning technique.** Materials Science and Engineering C. ISSN: 18730191. 101, March (2019) 521–538. doi:10.1016/j.msec.2019.04.003.

[33] HONG, K.S.; KIM, E.; BANG, S.; CHUNG, C.; LEE, Y.I.; HYUN, J.K.; LEE, H.; JANG, J.; KIM, T.; KIM, H. - **Bone regeneration by bioactive hybrid membrane containing FGF2 within rat calvarium.** Wiley InterScience. 94A, 4 (2010) 1187-1194. doi:10.1002/jbm.a.32799

[34] ALMASIAN, A.; NAJAFI, F.; EFTEKHARI, M.; ARDEKANI, M.R.S.; SHARIFZADEH, M.; KHANAVALI, M. - **Polyurethane/carboxymethylcellulose nanofibers containing Malva sylvestris extract for healing diabetic wounds: Preparation, characterization, in in**

vitro and in vivo studies. Materials Science and Engineering C. ISSN: 18730191. 114, April (2020). doi:10.1016/j.msec.2020.111039.

[35] ZAMANI, M; SHAKHASSALIM, N.; RAMAKRISHNA, S.; NAJI, M. - **Electrospinning: Application and Prospects for Urologic Tissue Engineering.** Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. ISSN: 22964185. 8, October (2020). doi:10.3389/fbioe.2020.579925.

[36] LANCINA, M.G.; III, SHANKAR, R.K.; YANG, H. - **Chitosan nanofibers for transbuccal insulin delivery.** Society For Biomaterials. 105, 5 (2017) 1252-1259. doi:10.1002/jbm.a.35984.

[37] TAVAKOLI, S.; KLAR, A.S. **Advanced Hydrogels as Wound Dressings.** Biomolecules. ISSN: 2218273X. 10, 8 (2020) 1–20. doi:10.3390/biom10081169.

[38] STOICA, A.E.; CHIRCOV, C.; GRUMEZESCU, A.M. - **Nanomaterials for Wound Dressings: Na Up-to-Date Overview.** Molecules. 25 (2020) 2699. doi:10.3390/molecules25112699.

[39] KIM, S.J.; KIM, E.M.; YAMAMOTO, M.; PARK, H.; SHIN, H. - **Engineering Multi-Cellular Spheroids for Tissue Engineering and Regenerative Medicine.** Adv Healthc Mater. ISSN: 21922659. 9, 23 (2020) 1–18. doi:10.1002/adhm.202000608.

[40] NI, Z.; YU, H.; WANG, L.; SHEN, D.; ELSHAARANI, T.; FAHAD, S.; KHAN, A.; HAQ, F.; TENG, L. - **Recent research progress on polyphosphazene-based drug delivery systems.** J Mater Chem B . ISSN: 20507518. 8,8 (2020) 1555–1575. doi:10.1039/c9tb02517k.

[41] XU, X.; LIU, Y.; FU, W.; YAO, M.; DING, Z.; XUAN, J.; LI, D.; WANG, S.; XIA, Y.; Cao, M. - **Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Thermoresponsive Composite Hydrogels for Biomedical Applications.** Polymers (Basel). 12 (2020) doi:10.3390/polym12030580.

[42] JIANG, Y.; KRISHNAN, N.; HEO, J.; FANG, R.H.; ZHANG, L. - **Nanoparticle-hydrogel superstructures for biomedical applications.** J Control Release. ISSN: 18734995. 324, May (2020) 505–521. doi:10.1016/j.jconrel.2020.05.041.

[43] ULLAH, F.; OTHMAN, M.B.H.; JAVED, F.; AHMAD, Z.; AKIL, H.M. - **Classification, processing and application of hydrogels: A review.** Materials Science and Engineering C. ISSN: 18730191. 57 (2015) 414–433. doi:10.1016/j.msec.2015.07.053.

[44] MONDAL, Sanjoy; DAS, Sujoy; NANDI, Arun K. - **A review on recent advances in polymer and peptide hydrogels.** Soft Matter. ISSN: 17446848. 16, 6 (2020) 1404–1454. doi:10.1039/c9sm02127b.

- [45] EIVAZZADEH-KEIHAN, R.; CHENAB, K.K.; TAHERI-LEDARI, R.; MOSAFER, J.; HASHEMI, S.M.; MOKHTARZADEH, A.; MALEKI, A.; HAMBLIN, M.R. - **Recent advances in the application of mesoporous silica-based nanomaterials for bone tissue engineering.** Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. ISSN: 18730191. 107 (2020) 110-267. doi:10.1016/j.msec.2019.110267.
- [46] ZHOU, W.; FENG, W.; QIU, K.; CHEN, L.; WANG, W.; NIE, W.; MO, X.; HE, C. - **BMP-2 Derived Peptide and Dexamethasone Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Osteogenic Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells.** ACS Appl. Mater. Interfaces. 7, 29 (2015) 15777-15789. doi:10.1021/acsami.5b02636.
- [47] DEO, D.N.; HOSPODIUK, M.; OZBOLAT, I.T. - **Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering.** Acta Biomaterialia. ISSN: 18787568. 95 (2019) 348356. doi:10.1016/j.actbio.2019.02.046.
- [48] WANG, Y.; ZHANG, W.; GONG, C.; LIU, B.; LI, Y.; WANG, L.; SU, Z.; WEI, G. - **Recent advances in the fabrication, functionalization, and bioapplications of peptide hydrogels.** Soft Matter. ISSN: 17446848. 16, 44 (2020) 10029–10045. doi:10.1039/d0sm00966k.
- [49] OPREA, M.; VOICU, S.I. - **Recent advances in composites based on cellulose derivatives for biomedical applications.** Carbohydr Polym. ISSN: 01448617. 247, June (2020) 116683. doi:10.1016/j.carbpol.2020.116683.
- [50] MAGHSOUDI, S.; TAGHAVI SHAHRAKI, B.; RABIEE, N.; FATAHI, Y.; DINARVAND, R.; TAVAKOLIZADEH, M.; AHMADI, S.; RABIEE, M.; BAGHERZADEH, M.; POURJAVADI, A., *et al.* - **Burgeoning Polymer Nano Blends for Improved Controlled Drug Release: A Review.** Int J Nanomedicine. ISSN: 11782013. 15, (2020) 4363–4392. doi:10.2147/IJN.S252237.
- [51] RASOOL, A.; ATA, S.; ISLAM, A. - **Stimuli responsive biopolymer (chitosan) based blend hydrogels for wound healing application.** Carbohydrate Polymers. ISSN: 01448617. 203, September 2018 (2019) 423–429. doi:10.1016/j.carbpol.2018.09.083.
- [52] MA, X.; XU, T.; CHEN, W.; GIN, H.; CHI, B.; YE, Z. - **Injectable hydrogels based on the hyaluronic acid and poly (γ -glutamic acid) for controlled protein delivery.** Carbohydrate Polymers. ISSN: 01448617. 179, 30 (2018) 100–109. doi:10.1016/j.carbpol.2017.09.071.

- [53] BORDONI, M.; SCARIAN, E.; REY, F.; GAGLIARDI, S.; CARELLI, S.; PANSARASA, O.; CEREDA, C. - **Biomaterials in Neurodegenerative Disorders: A Promising Therapeutic Approach**. *Int J Mol Sci*. ISSN: 14220067. 21, 9 (2020) 1–21. doi:10.3390/ijms21093243.
- [54] MIN, J.H.; PATEL, M.; KOH, W, G. - **Incorporation of conductive materials into hydrogels for tissue engineering applications**. *Polymers*. ISSN: 20734360. 10, 10 (2018) 1–36. doi:10.3390/polym10101078.
- [55] YU, T.; WANG, H.; ZHANG, Y.; WANG, X.; HAN, B. - **The Delivery of RNA-Interference Therapies Based on Engineered Hydrogels for Bone Tissue Regeneration**. *Front Bioeng Biotechnol*. ISSN: 22964185. 8, May (2020) 1–9. doi:10.3389/fbioe.2020.00445.
- [56] DICKMEIS, C.; KAUTH, L.; - **Commandeur, U. From infection to healing: The use of plant viruses in bioactive hydrogels**. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. ISSN: 19390041. 13, 1 (2021) 1–32. doi:10.1002/wnan.1662.
- [57] PINA, S.; RIBEIRO, V.P.; PAIVA, O.C.; CORRELO, V.M.; OLIVEIRA, J.M.; REIS, R.L. - **9 - Tissue engineering scaffolds: future perspectives**. *Woodhead Publishing Series in Biomaterials*. (2019) 165-185. doi:10.1016/B978-0-08-102563-5.00009-5.
- [58] WU, L.; WANG, D.; LI, Z. - **Grand challenges in nanomedicine**. *Materials Science & Engineering C*. 106 (2020) 110302. doi:10.1016/j.msec.2019.110302.
- [59] WILLIAMS, D.F. - **Challenges With the Development of Biomaterials for Sustainable Tissue Engineering**. *Front Bioeng Biotechnol*. 7, 127 (2019). doi:10.3389/fbioe.2019.00127.
- [60] PASHIROVA, T.N.; AFONSO, A.B.; TEREKHOVA, N.V.; KAMALOV, M.I.; MASSON, P.; SOUTO, E.B. - **Nanogels for drug delivery: physicochemical properties, biological behavior and *in vivo* applications, in: “Nanotechnology and Regenerative Medicine: History, Techniques, Frontiers and Applications”, M. H. A. Santana, E. B. Souto (editors), Amsterdam, The Netherlands, Elsevier (2021) Chapter 7, accepted.**

APPENDIX

Annex I: Comparison of synthetic polymers, biopolymers and ECM-derived materials for tissue engineering templates. Adapted from [59].

	Synthetic polymers	Biopolymers	ECM-derived materials
Material characteristics	Good control of essential material chemical characteristics, giving acceptable quality control and regulatory processes	Dependent on source and processing conditions	Considerable variability in essential material characteristics, making quality control difficult
Mechanical properties	Usually tunable and cover wide range	Some can be quite good, others poor	Some can be quite good, others poor
Compatibility	Materials are inherently incompatible with support of key cell functions; may be capable of functionalization for some limited improvement	Careful choice of formulation can give good compatibility with cell function	Structure most closely replicates normal cell microenvironment, with support of cell function
Degradation Characteristics	Can be tunable and cover wide range	Can be tuned, especially by control of blends	Degradation properties not easily tuned
Toxicological and immunological risks	Most materials should be free from toxicological and immunological risks	Most materials should be free from toxicological and immunological risks	Possibility of immunological responses
Cost-effectiveness	Usually very cost effective	Can be very expensive, especially if recombinant techniques are required	Cost effectiveness will vary with source and processing conditions
Bioprinting	Only a few are compatible with 3D bioprinting	Several materials with excellent characteristics for bioprinting	Not ideal for bioprinting

Annex II: Electrospinning parameter's influence on nanofibre morphology. Adapted from [24].

Parameters	Effect on Fibre Morphology
Polymer property	Increased molecular mass of polymer might reduce the number of beads. Fibre diameter increases with higher molecular mass of polymer.
Solvent property	Solvent used in electrospinning affect on solution spinnability.
Solution property	Increase in concentration of solution increases the fibre diameter.
<ul style="list-style-type: none"> - Concentration - Conductivity - Viscosity/Surface tension 	<p>Low concentration of solution led to beaded fibres, Intermediate concentration led to good fibre and high concentration led to bimodal fibres.</p> <p>Increase in conductivity of solution decreases the fibre diameter.</p> <p>Formation of an unstable jet as a resultant effect of surface tension and viscosity led to the bead formation.</p>
Processing parameter	<p>Increase in voltage decreases the fibre diameter and it is strongly correlated to bead formation.</p> <p>Distance effects on complete evaporation of fibre.</p> <p>Too short and too large distances may generate beads.</p> <p>Greater distance to be covered by the fibre and longer flight time favor the formation of thinner fibre.</p> <p>Decrease in flow rate decreases the fibre diameter.</p> <p>High flow rate might generate beads.</p>
Ambient parameter	<p>High humidity might affect solvent evaporation.</p> <p>Increase in temperature decreases the fibre diameter.</p>
Supplementary addition	Addition of salt might help in reduction of beads.