



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Luís Miguel Amado de Andrade

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanocelulose: avanços e perspetivas futuras em tecnologia farmacêutica” referentes à Unidade Estágio Curricular, sob a orientação da Dra. Maria Manuela Rocha Helena, da Dra. Ana Sofia Francisco da Silva e da Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino 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

Luís Miguel Amado de Andrade

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanocelulose: avanços e perspectivas futuras em tecnologia farmacêutica” referentes à Unidade Estágio Curricular, sob a orientação da Dra. Maria Manuela Rocha Helena, da Dra. Ana Sofia Francisco da Silva e da Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino 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

Eu, Luís Miguel Amado de Andrade, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016224135, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanocelulose: avanços e perspectivas futuras em tecnologia farmacêutica” 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, 1 de setembro de 2021.

Luís Miguel Amado de Andrade

(Luís Miguel Amado de Andrade)

Agradecimentos

Tendo chegado ao culminar de mais uma etapa, marcada pela evolução e crescimento pessoal e profissional, resta-me agradecer a todos os que fizeram parte deste percurso, tornando-o mais enriquecedor e memorável.

À minha família, em especial aos meus pais e aos meus avós, pelo apoio incondicional e dedicação com que sempre encararam todos os meus desafios. A motivação e a força que sempre senti diariamente foram fulcrais para aqui chegar.

Aos meus colegas e amigos, por todos os momentos partilhados e pelas memórias criadas ao longo de 5 anos e que me acompanharão nas próximas etapas.

A toda a equipa da Farmácia Rocha, pelos conhecimentos e competências transmitidos, que contribuíram para a minha formação, pela amabilidade, pela paciência e pela dedicação sempre demonstradas para comigo.

A toda a equipa do Departamento de *Compliance* da Bluepharma, pela oportunidade de estágio, pelo profissionalismo, pelo espírito de equipa e pela transmissão de conhecimentos que me proporcionaram um contacto mais profícuo com a Indústria Farmacêutica.

À Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino, pela disponibilidade, por todo o acompanhamento, orientação e rigor e pela confiança depositada em mim. Só assim foi possível elaborar a monografia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e respetivos docentes e não docentes, por terem sido parte ativa na minha formação e desenvolvimento de competências.

A todos, por isto e por muito mais, o meu mais sincero
“Obrigado”.

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	8
1. Introdução	9
2. Análise SWOT	10
2.1 Pontos Fortes	10
2.1.1 Plano de estágio	10
2.1.2 Equipa técnica.....	12
2.1.3 Aconselhamento farmacêutico.....	12
2.1.4 Serviços disponibilizados pela Farmácia Rocha.....	12
2.2 Pontos Fracos	13
2.2.1 Timidez e falta de confiança	13
2.2.2 Dificuldade na associação entre nomes comerciais e denominação comum internacional (DCI).....	13
2.2.3 Receitas manuais.....	14
2.3 Oportunidades	14
2.3.1 Medicamentos manipulados	14
2.3.2 Formações.....	15
2.4 Ameaças	15
2.4.1 Medicamento esgotados e descontinuados	15
2.4.2 Conhecimentos adquiridos pela <i>Internet</i> e familiares	16
2.4.3 Locais de venda de MNSRM.....	16
3. Conclusão	17
4. Referências Bibliográficas	18
Anexos	20

Parte II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	26
1. Introdução	27
2. Bluepharma[®]	27
3. Compliance	28
3.1 Departamento de Compliance	29
4. Análise SWOT	29
4.1 Pontos Fortes	29

4.1.1	Receção, acolhimento e integração	29
4.1.2	Equipa	30
4.1.3	Metodologia <i>Kaizen</i>	30
4.1.4	Formações internas.....	31
4.1.5	Plano de estágio	32
4.1.6	Autonomia nas tarefas desempenhadas e confiança nos estagiários.....	33
4.2	Pontos Fracos	34
4.2.1	Duração do estágio	34
4.3	Oportunidades	34
4.3.1	Experiência em Indústria Farmacêutica	34
4.3.2	Desenvolvimento de <i>soft skills</i> e domínio do <i>software Microsoft Teams</i>	35
4.4	Ameaças	35
4.4.1	Pandemia atual.....	35
4.4.2	Crescente exigência e requisitos de qualidade/ <i>compliance</i>	36
5.	Conclusão	37
6.	Referências Bibliográficas	38
Anexos	39

Parte III – Monografia: “Nanocelulose: avanços e perspectivas futuras em tecnologia farmacêutica”

Lista de Abreviaturas	43
Resumo	45
Abstract	45
I. Introdução	46
1.1 Celulose	46
1.2 Nanocelulose	46
1.3 Aspetos citotóxicos, imunogénicos e genotóxicos da NC	47
2. Tipos de NC e respetivas características	49
2.1 Nanocelulose bacteriana	49
2.2 Celulose nanocristalina	50
2.3 Celulose nanofibrilada	50
2.4 Dimensões dos três tipos de NC	51
3. Aplicações biomédicas e em tecnologia farmacêutica	52
3.1 Aplicação na engenharia de tecidos	52
3.1.1 Obtenção de hidrogéis de BNC para implantes de cartilagem	53

3.1.2 Síntese de <i>scaffolds</i> à base de BNC para implantes de substituição da cartilagem auricular.....	54
3.1.3 Síntese de <i>scaffolds</i> de CNCs e acetato de polivinilo.....	54
3.1.4 Produção de <i>scaffolds</i> de CNFs com alginato de sódio.....	55
3.1.5 Produção de <i>scaffolds</i> através de nanocompósitos de CNFs.....	56
3.2 Aplicação na cicatrização de feridas.....	58
3.2.1 Atividade antimicrobiana da bromelaína em membrana de BNC.....	58
3.2.2 Apósito de CNCs com mel e polivinil pirrolidona.....	59
3.2.3 Apósito de BNC com polihexanida e sericina.....	59
3.2.4 <i>Scaffold</i> à base de CNFs com fibroína de seda.....	60
3.2.5 Compostos híbridos de BNC com nanopartículas de prata.....	61
3.3 Aplicação em sistemas de libertação de fármacos.....	62
3.3.1 Hidrogel de CNCs com paclitaxel para a terapia contra o cancro.....	62
3.3.2 CNCs modificados para administração de vitamina C.....	63
3.3.3 Filmes de NFC com fármacos pouco solúveis em água para uma libertação controlada.....	64
3.3.4 Nanocompósitos de poli-(N-metacrilóil glicina) e BNC para a libertação controlada de diclofenac.....	66
3.4 Aplicação como biossensores.....	67
3.4.1 Desenvolvimento de um biossensor para a deteção da glucose.....	67
3.4.2 Formação de um conjugado peptídico-celulósico para a deteção da elastase neutrofílica humana.....	69
3.4.3 Desenvolvimento de um biossensor para a deteção do colesterol.....	71
4. Patentes e análise de mercado.....	72
5. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	75
6. Referências Bibliográficas.....	76
Anexos.....	91

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Farmácia Rocha

Estágio orientado pela
Dra. Maria Manuela Rocha Helena

Lista de Abreviaturas

DCI – Denominação Comum Internacional

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FOS – Fruto-oligossacáridos

IMC – Índice de Massa Corporal

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PVA – Preço de Venda ao Armazenista

PVP – Preço de Venda ao Público

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

No âmbito do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), surge, no final do 5.º Ano, o Estágio Curricular em Farmácia Comunitária, como a “ponte” estabelecida entre os conhecimentos adquiridos ao longo de 5 anos de estudo académico com a profissão farmacêutica, isto é, com a aplicação diária numa farmácia, em contexto real, de todas as valências e competências que foram sendo ganhas ao longo da formação.

Tal como se encontra referido no *website* da autoridade nacional do medicamento e produtos de saúde (INFARMED), «[n]o exercício da sua profissão o farmacêutico como agente da saúde desenvolve atividades que contribuem para a salvaguarda da Saúde Pública da comunidade no âmbito da promoção da saúde, informação e uso racional do medicamento»,¹ o que denota, desde logo, a importância, o cuidado e a pertinência desta profissão no contributo para uma sociedade mais saudável. Muitas vezes, o papel do farmacêutico pode prevenir e evitar idas desnecessárias a centros de saúde e hospitais, quando são situações perfeitamente ao alcance de serem resolvidas, colocando em prática os conhecimentos que a nossa formação nos proporciona, o que pode ser bastante benéfico, principalmente para os doentes mais idosos e com dificuldades e atendendo ao atual contexto de pandemia. Foi com este enorme sentido de responsabilidade que, do dia 11 de janeiro de 2021 ao dia 30 de abril de 2021, realizei o meu estágio curricular na Farmácia Rocha, em Condeixa-a-Nova, sob a orientação da Dra. Maria Manuela Rocha Helena, com a duração de 670 h.

Iniciei este estágio com a ânsia de aprender mais, consolidar conhecimentos já adquiridos, aplicando-os em contexto de casos reais, tentando compreender toda a dinâmica e espírito de ajuda que uma equipa numa farmácia tem de ter para que, diariamente, desempenhe as suas funções com a maior plenitude, ética profissional, satisfação e rigor, indo ao encontro das necessidades dos utentes.

A Farmácia Rocha está localizada na Praça da República n.º16, 3150-127 Condeixa-a-Nova, sendo esta uma zona estratégica, pois é bastante movimentada, apresentando um horário flexível. Optei por realizar o estágio nesta farmácia, pois, para além de ser próxima da minha área de residência, já aí tinha realizado dois estágios de verão, que, no meu ponto de vista, foram bastante enriquecedores. Além disso, esta farmácia, sendo histórica, familiar e bastante acolhedora, é conhecida por todos os habitantes da região, permitindo que exista um núcleo de utentes fiéis que a frequentam desde criança, tornando a profissão farmacêutica na Farmácia Rocha mais acolhedora, dinâmica e familiar. Atualmente, a equipa é constituída por quatro farmacêuticas – a Dra. Manuela, a Dra. Isabel, a Dra. Rita e a Dra. Cristina, todas caracterizadas pela simpatia, competência e profissionalismo, que me transmitiram muitos

conhecimentos e formas de detetar e resolver problemas, contribuindo para o meu crescimento enquanto futuro farmacêutico e para uma aprendizagem mais rica e profícua.

Na verdade, para além de proporcionar serviços de aconselhamento, preparação de medicamentos manipulados e administração de vacinas e injetáveis, esta farmácia aproxima-se mais de toda a comunidade, com a medição de parâmetros como o colesterol, a glicémia, os triglicéridos, o índice de massa corporal (IMC), a pressão arterial e o peso dos utentes, com consultas de podologia e com rastreios (principalmente auditivos). Para além disso, colabora no projeto VALORMED e aderiu, face à pandemia atual, à operação *Luz Verde*. Atualmente, toda a equipa desempenha o seu papel ao nível do auxílio ao utente no atendimento e no aconselhamento, utilizando o Sifarma 2000®.

Este relatório de estágio apresenta-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*). Com este método de planeamento estruturado, pretendo abordar, de forma crítica e global, o estágio realizado, mencionando, a nível interno, os pontos fortes e os pontos fracos e, a nível externo, as oportunidades e as ameaças com que me deparei e a forma como cresci enquanto profissional, mas também como pessoa, ao longo destes quase 4 meses (Anexo 1). Terminarei com uma breve conclusão acerca do estágio na Farmácia Rocha e com a abordagem de três casos clínicos que me surgiram e a forma como os resolvi (Anexo 2).

2. Análise SWOT

2.1 Pontos Fortes

2.1.1 Plano de estágio

Primeiramente, a minha orientadora de estágio, a Dra. Maria Manuela Rocha Helena, voltou a mostrar-me os “cantos” da farmácia, isto é, os vários locais onde se encontram todos os produtos, como, por exemplo, medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) a medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e até medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF), familiarizando-me, assim, com a sua localização, facilitando-me tanto o trabalho de *back-office* como, mais tarde, o atendimento ao público. Durante o primeiro mês de estágio, as competências desenvolvidas foram, maioritariamente, ao nível do *back-office*. Comecei por aprender a dar entrada de encomendas de medicamentos e produtos de saúde, utilizando, para esse fim, o Sifarma 2000®. Ao nível das encomendas, aprendi a introduzir o preço de venda ao armazenista (PVA) no sistema informático e, quando necessário, a proceder à alteração do preço de venda ao público (PVP). Além disso, à medida que dava entrada dos medicamentos, passei a conhecer as mais variadíssimas marcas, permitindo-me realizar uma associação entre os princípios ativos

aprendidos em 5 anos de estudo e as marcas, algo que é fulcral para a prática farmacêutica, bem como fazer uma gestão de *stock* dos produtos e dos prazos de validade dos mesmos (alterando a validade do produto no sistema informático, sempre que necessário). Tive, ainda, o cuidado de organizar os produtos, tendo por base a regra do *first in first out*, isto é, o produto ou medicamento cuja validade termina primeiro tem de ser o primeiro a ser vendido, para além de fazer notas de devolução de produtos que tivessem vindo, dos fornecedores e armazéns, por engano, que estivessem fora de validade ou cujas embalagens estivessem danificadas. Sempre que tinha oportunidade, ia para o atendimento, como observador, para me familiarizar com o programa informático, tomando nota de passos essenciais que tinha que saber e dos aconselhamentos prestados aos utentes.

Numa segunda fase do meu estágio, comecei a tratar das receitas para a Casa de Saúde, um lar em Condeixa, em que cada farmácia, uma vez por semana, avia as receitas dos seus utentes, o que me permitiu adquirir destreza ao nível do atendimento, ao tratar e dispensar receitas, para que, depois, aplicasse esta prática adquirida no contexto real com um utente.

Numa terceira fase, passei para o atendimento, onde, inicialmente, tinha um farmacêutico a supervisionar-me tendo, mais tarde, desempenhado esta função de forma autónoma. Desta forma, não só dispensei receitas (eletrónicas e manuais), como também coloquei em prática, ao nível do aconselhamento, conceitos teóricos que aprendi em 5 anos de curso e todas as notas que tirei, enquanto assistia ao atendimento. Para além disso, tive também oportunidade de preparar manipulados (pomadas de aplicação tópica) e de fazer medições de glicémia, pressão arterial, colesterol e triglicérideos. Assisti, não só à realização do controlo de temperatura e humidade da farmácia, garantindo a estabilidade dos vários produtos, como também a algumas formações que serviram para conhecer produtos e adquirir competências para os aconselhar, quando necessário. Durante estas três fases, contactei com medicação hospitalar através da operação *Luz Verde*, que consiste na dispensa de medicamentos hospitalares dos doentes nas farmácias, em articulação com as equipas hospitalares e contactei com o projeto VALORMED, que consiste na gestão dos resíduos dos medicamentos, fora de validade ou não, desde embalagens a materiais usados no acondicionamento com o intuito de serem eliminados de forma correta, não prejudicando o ambiente, tendo procedido à recolha e à devolução dos mesmos para os armazenistas. Concluo, assim, que este plano foi fundamental para o meu sucesso a nível de aprendizagens.

2.1.2 Equipa técnica

Indiscutivelmente, tenho que destacar a equipa técnica da Farmácia Rocha como um dos pontos fortes do meu estágio. De facto, desde o primeiro dia em que entrei nesta farmácia, o apoio e os ensinamentos que me transmitiram foram fundamentais para a minha formação. Diariamente, sempre com boa disposição, esclareciam-me todas as dúvidas e perguntas que fazia, ajudavam-me nas tarefas que me eram propostas, fazendo-me sentir incluído na equipa, motivando-me a ser cada vez melhor no meu dia a dia. Para além disto, acho fundamental referir a forma como a equipa tratava os vários utentes – a paciência, a compreensão, a dedicação, a simpatia e o profissionalismo demonstrados foi excepcional, proporcionando um grau de satisfação ímpar. A meu ver é, de facto, notória a minha evolução ao longo do estágio e a autonomia adquirida no ato farmacêutico, muito graças ao espírito de entreatajuda e de rigorosa qualificação da equipa na Farmácia Rocha.

2.1.3 Aconselhamento farmacêutico

Inicialmente, reconheço que tinha imensas dificuldades ao nível do aconselhamento farmacêutico, quer a nível de dermocosmética, quer a nível de preparações de uso veterinário ou até de suplementos ou dispositivos médicos, não só pela novidade como também pela dificuldade em associar conceitos teóricos com práticos, o que, a meu ver, é normal, dado a pouca experiência a este nível que um estagiário possui. Na minha opinião, não considero isto um ponto fraco, mas sim um ponto forte, pois, com a ajuda de todos os farmacêuticos, ia tirando notas acerca de aconselhamentos e pesquisando em fontes fidedignas determinados produtos que não conhecia tão bem. À medida que ia passando o estágio, as dificuldades iniciais foram desaparecendo e ganhei confiança nas minhas qualidades na resolução de situações do quotidiano na farmácia. Na verdade, aprendi a detetar sintomas e causas para determinadas queixas apresentadas pelos utentes e como resolvê-las, tendo sempre como prioridade o bem-estar de quem tentava ajudar. A meu ver, esta foi, sem sombra de dúvidas, a área onde mais cresci, onde mais consolidei conhecimentos, onde mais aprendi e, acima de tudo, onde assimilei e adquiri ensinamentos para o meu futuro enquanto farmacêutico.

2.1.4 Serviços disponibilizados pela Farmácia Rocha

Na minha opinião, este é um ponto forte de elevada importância, pois a farmácia Rocha disponibiliza alguns serviços, como as medições de parâmetros biológicos (colesterol, triglicéridos, glicémia e IMC), de parâmetros fisiológicos (pressão arterial) e ainda do peso da pessoa. Também facultava, temporariamente, serviços de podologia e rastreios auditivos. De facto, um serviço prestado com qualidade pode fidelizar os utentes à farmácia (ter como foco

a monitorização do doente e estar disposto a esclarecê-lo e aconselhá-lo são motivos para aumentar o grau de satisfação do utente).

Durante o estágio, procedi à medição de alguns parâmetros. Tal facto ajudou-me não só a inteirar-me da situação clínica do doente, como também a perceber qual a medicação que fazia (se a tomava de forma correta e se adotava um estilo de vida saudável), avaliar se os parâmetros estavam controlados, sensibilizar para o seu controlo regular por parte do utente e alertar para incorreções que um farmacêutico tem competência para detetar. Isto tudo pode ser essencial para uma terapêutica eficaz, já que, sempre que fazia as medições, aplicava os meus conhecimentos teóricos com vista a uma aplicação prática para o bem-estar do utente.

2.2 Pontos Fracos

2.2.1 Timidez e falta de confiança

Decidi enfatizar, com alguma importância, a timidez e a falta de confiança com que encarei o estágio. De facto, inicialmente, o medo de errar era notório, fosse qual fosse a tarefa que me propunham. Não foi fácil lidar com o cuidado em manter o bom nome da farmácia e nunca colocar em causa a saúde do utente, não cometendo erros. Agradeço novamente a paciência de toda a equipa da Farmácia Rocha, pois disponibilizaram-se sempre a esclarecer todas e quaisquer dúvidas que me surgissem, aumentando a minha segurança nas tarefas que desempenhava diariamente. Contudo, tal facto acabou por afetar o meu estágio, pois, se tivesse mais segurança nas minhas capacidades, poderia ter evitado a interrupção de tarefas importantes realizadas pelos farmacêuticos da farmácia.

2.2.2 Dificuldade na associação entre nomes comerciais e denominação comum internacional (DCI)

Um dos maiores obstáculos que me surgiu no estágio foi, de facto, associar, muitas vezes, os nomes comerciais aos princípios ativos. Com o desenrolar do estágio e com o trabalho *de back-office*, essa dificuldade foi sendo ultrapassada. Contudo, no atendimento, tive situações em que os utentes mencionavam uma determinada marca e pediam aconselhamento sobre ela e, como tinha dificuldades em lhe associar o princípio ativo correspondente, tive que recorrer constantemente ao auxílio do Sifarma 2000[®] para esclarecer o utente. De facto, muitas vezes, os utentes não têm a certeza da medicação que fazem, distinguindo-a só pela cor da caixa ou pela patologia associada, dificultando a dispensa de receitas, quando não se tem um conhecimento generalizado dos nomes comerciais dos vários medicamentos, sejam eles genéricos ou não. O auxílio da ficha do utente fidelizado, e acedendo à última prescrição, ajudou não só ao acompanhamento do utente, como também a associar os nomes comerciais

aos princípios ativos descritos na receita. Por outro lado, com a experiência, conhecimento do utente e aprendizagem diária, as lacunas nesta temática acabaram por se dissipar.

2.2.3 Receitas manuais

Durante o estágio, deparei-me com algumas receitas manuais que dificultaram o atendimento. A sua prescrição é uma prática cada vez menos usual, tendo sido substituída pela prescrição de receitas eletrónicas. Apenas é autorizada a sua prescrição quando há falência informática, inadaptação fundamentada do prescriptor, previamente confirmada e validada anualmente pela respetiva Ordem Profissional, e em casos de prescrição ao domicílio.² Quanto a mim, estas receitas são mais complicadas de dispensar, dada a dificuldade que se prende com a interpretação do que está escrito e a suscetibilidade para o aparecimento de erros na dispensa de medicamentos. Algumas delas não cumprem as especificidades das receitas manuais, prejudicando o utente, que fica sem participação. Contudo, com o passar do tempo, habituei-me às receitas manuais, embora o atendimento fosse mais moroso.

2.3 Oportunidades

2.3.1 Medicamentos manipulados

Segundo a Portaria nº594/2004 de 2 de junho do INFARMED, um medicamento manipulado «[...] é qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico».³

Ao longo do estágio, tive a oportunidade de preparar alguns medicamentos manipulados, preencher a ficha de preparação e calcular o preço do manipulado. Dos que preparei, destaco a pomada de ácido salicílico a 5% e ureia a 10% com vaselina q.b.p 100 g. O ácido salicílico nesta concentração apresenta propriedades queratolíticas, isto é, promove a dissolução de formações queratínicas. As preparações com ácido salicílico são usadas no tratamento tópico em situações hiperqueratose e descamação da pele. Por outro lado, a ureia atua como hidratante apresentando uma capacidade de retenção de humidade ao nível da camada córnea e atua também como queratolítico ligeiro e antipruriginoso. Pode ser usado em peles secas e com prurido. Assim sendo, a pomada de ácido salicílico a 5% e ureia a 10% está indicada para o tratamento de hiperqueratoses e psoríase. Pode ainda ser utilizada na prevenção das gretas dos pés, que surgem devido a um espessamento do estrato córneo e a uma deficiente hidratação cutânea.⁴

Por fim, queria apenas acrescentar que, no meu entender, a preparação de medicamentos manipulados nas farmácias deveria ser uma prática mais recorrente, visto que

adquirimos muitas valências na faculdade em algumas disciplinas que nos tornam aptos para a sua preparação sempre que as condições da farmácia assim o permitam.

2.3.2 Formações

No meu ponto de vista, as formações são uma oportunidade para conhecer novos produtos ou para enriquecer e melhorar a abordagem ao utente. Durante o estágio tive a possibilidade de assistir a algumas formações via *zoom*, devido à pandemia que atravessamos, e aumentar o meu conhecimento sobre suplementos, dispositivos médicos, produtos de dermocosmética, entre outros. Nestas ações de formação, os delegados de propaganda médica apresentavam os produtos, referindo não só os seus benefícios do ponto de vista clínico, como também nos elucidavam em relação às suas contraindicações e interações, proporcionando momentos de partilha de conhecimento. Uma formação que me suscitou muito interesse foi a proporcionada pela Pharma Nord, onde nos foi apresentado o suplemento Bioactivo® Biloba Forte, contendo extrato de *Ginkgo Biloba*. Foi-nos explicado que este suplemento é indicado para a memória (um comprimido por dia) e para as frieiras, mantendo uma boa circulação sanguínea, não se devendo proceder à sua toma quando o utente faz uma medicação à base de anticoagulante nem o dar a pessoas com demência.

No caso das frieiras, recomenda-se a toma de dois comprimidos, quando se trate de uma situação grave, e, com melhoria, reduzir para um comprimido para manutenção. Sempre que o utente se submeter a uma cirurgia, terá de descontinuar a toma deste 2 semanas antes.

Na minha opinião, estas formações são essenciais para que se obtenha um conhecimento detalhado de produtos que podemos recomendar e aconselhar aos utentes e, deste modo, desenvolver técnicas de *cross-selling*, com o objetivo de ir ao encontro das necessidades dos utentes, contribuindo para um aconselhamento farmacêutico eficaz e focado no seu bem-estar. Com a pandemia atual, muitas ações de formação acabaram por ser canceladas, o que acaba por prejudicar bastante as competências dos farmacêuticos. Deve-se apostar mais nesta ferramenta, pois ela é essencial para a plenitude em saúde do utente.

2.4 Ameaças

2.4.1 Medicamentos esgotados e descontinuados

Atualmente, existem cada vez mais medicamentos esgotados quer seja por rutura de *stock*, quer por medicamentos que foram descontinuados, não sendo a responsabilidade da farmácia. No estágio foram inúmeras as vezes em que um utente se dirigiu à farmácia Rocha e pediu um medicamento que não tínhamos em *stock*. Tentava sempre encomendar aos armazéns, mas, muitas vezes sem sucesso. Torna-se sempre difícil explicar às pessoas que os

medicamentos estão esgotados. Nestes casos, aconselhei um medicamento pertencente ao mesmo grupo homogêneo. Contudo, a pessoa vê-se muitas vezes obrigada a suspender a terapêutica por falta do medicamento, sendo fundamental encaminhá-la para o médico. Muitos utentes têm uma elevada aversão a levar um medicamento diferente, o que implica uma falha ao nível do seu plano terapêutico, podendo prejudicar a sua saúde. Esta situação pode ser uma ameaça, pois um utente que se desloque à farmácia pretende sempre que esta tenha todos os medicamentos que deseja. Caso contrário, o utente pode sentir-se desagradado, o que poderá contribuir para a desconfiança, fazendo com que deixe de ter determinada farmácia como a sua referência, diminuindo a sua fidelização.

2.4.2 Conhecimento adquirido pela *Internet* e por familiares

Considero este conhecimento como uma ameaça, pois, ao longo do estágio, deparei-me com situações no atendimento em que vários utentes pediam determinado medicamento (muitas vezes MNSRM) sem receita médica, ou porque tinham visto na *Internet* ou porque um familiar lhe tinha dito que era muito eficaz. Em qualquer dos casos, tentava explicar que nem todos os medicamentos ou produtos são aconselhados para todos os tipos de utentes, sendo necessário um aconselhamento mais personalizado. Contudo, muitas vezes, o utente considera que tem razão e mais conhecimento de causa em relação ao medicamento em si do que o próprio farmacêutico, prejudicando a dinâmica do aconselhamento focado na sua saúde.

2.4.3 Locais de vendas de MNSRM

De acordo com o Decreto-Lei n.º 134/2005, de 16 de agosto, do Ministério da Saúde, «[o]s medicamentos não sujeitos a receita médica para uso humano, adiante designados por MNSRM, podem ser vendidos ao público fora das farmácias [...]».⁵ Este Decreto-Lei teve como objetivo facilitar a acessibilidade por parte do utente e garantir uma redução do preço dos mesmos, dado que, nestes estabelecimentos, se conseguem preços mais baixos, devido a campanhas e a descontos, aliciando assim os utentes e impedindo que estes comprem os medicamentos nas farmácias. No artigo 2 deste Decreto-Lei, faz-se referência à necessidade de existir pessoal qualificado (farmacêutico ou técnico de farmácia) para a dispensa de MNSRM, algo que, nem sempre se verifica. Na minha opinião, ao tentar facilitar-se o acesso aos medicamentos, contribuimos para um aumento de casos de automedicação e de desinformação em saúde. Muitas vezes, as pessoas adquirem medicamentos nestes espaços sem saber se é seguro efetuarem a sua toma, devido às suas patologias ou medicação.

Só através de um aconselhamento farmacêutico de excelência e cientificamente correto para com os utentes, com o objetivo de um uso racional e cuidadoso do medicamento,

poderemos incentivar as pessoas a adquirir todos os medicamentos que procuram nas farmácias. Durante este estágio, tive o cuidado de consciencializar os utentes para a importância do medicamento para o bem-estar individual de cada um, evitando situações graves que pudessem comprometer a sua saúde, sensibilizando-os para a importância em adquirir os medicamentos numa farmácia.

3. Conclusão

Findo o estágio, posso afirmar com segurança que o balanço do mesmo foi extremamente positivo, na medida em que obtive conhecimentos fundamentais para a minha formação. Estou certo que, num futuro próximo, irei aplicar, diariamente, como farmacêutico, todas as competências que adquiri, contribuindo para o meu sucesso profissional.

De facto, o estágio curricular assume uma importância surpreendente na consolidação de conhecimentos teóricos já aprendidos ao longo de 5 anos e a sua aplicação em contexto prático. Considero fundamental para os estudantes compreender não só toda a dinâmica de uma farmácia, como também a responsabilidade com que é necessário desempenhar todas as funções, desde o trabalho de *back-office* até ao aconselhamento no atendimento.

Na Farmácia Rocha existe uma sensibilidade elevada com os utentes para que, em todas as situações, as suas necessidades e preocupações sejam satisfeitas, através de um aconselhamento personalizado e focado no utente, o que contribui para um bem-estar individual e um cuidado exemplar da sua saúde. Assim, evoluí e ganhei competências a nível pessoal e profissional e na forma como lidar com os utentes, respeitando-os sempre.

Durante estes quase 4 meses, compreendi o papel imprescindível de um farmacêutico na comunidade, sendo este essencial para a saúde pública, tendo um valor preponderante para o bem-estar da população e contribuindo para uma harmonia em saúde. Na verdade, a aprendizagem enquanto farmacêutico é contínua, já que todos os dias há novos produtos para conhecer e novos aconselhamentos para proporcionar. Para isso, é necessário procurar saber sempre mais e melhor, para prestarmos um melhor auxílio ao utente.

Em suma, resta-me agradecer a toda a equipa da Farmácia Rocha. Desde cedo que me senti incluído na mesma e com à vontade para esclarecer todas as minhas dúvidas. O ambiente familiar e de amizade da Farmácia Rocha foi, sem dúvida alguma, um dos fatores mais fundamentais para o sucesso do meu estágio e para a minha aprendizagem. Por tudo isto, o meu mais sincero “Obrigado”.

4. Referências Bibliográficas

1. INFARMED, I.P. – **Farmacêuticos | Introdução**. (2016). [Acedido a 03/03/2021]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/licenciamentos/farmaceuticos>
2. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Portaria n.º 390/2019 de 29 de outubro**. Diário da República n.º 208/2019, Série I de (2019), p. 6-7.
3. INFARMED, I.P. – **Boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados**. Portaria n.º 594/2004, de 2 de junho.
4. FORMULÁRIO GALÉNICO PORTUGUÊS – **Pomada de Ácido Salicílico a 5% e Ureia a 10% (FGP A.I.28.)** Lisboa: Centro Tecnológico do Medicamento da Associação Nacional das Farmácias (2001), p. 5-7.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de agosto**. Diário da República, Série I-A. n.º 156/2005 (2005), p. 4763-4765.
6. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento**. Betadine® 40 mg/mL espuma cutânea. (2018). [Acedido a 03/03/2021]. Disponível na Internet: <https://documentcloud.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:fa4649a7-06f8-4370-9211-1cf01dbfb163>
7. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento**. Hadazin® 10 mg/g creme. (2018). [Acedido a 07/03/2021]. Disponível na Internet: <https://documentcloud.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:1dd2d0ac-531c-4160-959a-78351aec0e60>
8. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento**. Amoxicilina + Ácido Clavulânico Mylan® 875 mg/125 mg, Comprimidos revestidos por película. (2012). [Acedido a 14/03/2021]. Disponível na Internet: <https://documentcloud.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:5288fe8b-e52f-4aa5-811e-18c5887961c1>
9. SILFARMA PLUS – **CISTISIL®**. (2021). [Acedido a 14/03/2021]. Disponível na Internet: <https://silfarmaplus.pt/produto/cistisil/>
10. INFARMED, I.P. – **Resumo das Características do Medicamento**. Gino-Canesten® 10 mg/g creme vaginal. (2014). [Acedido a 14/03/2021]. Disponível na Internet: <https://documentcloud.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:3b83a588-a256-4ddc-a3f4-bc3d9956477f>
11. LACTACYD – **LACTACYD® ÍNTIMO Gel para Higiene Íntima Diária 200 mL**. (2021). [Acedido a 14/03/2021]. Disponível na Internet: https://www.lactacyd.pt/lactacyd/portfolio/lactacydintimo/?gclid=CjwKCAjwr_uCBhAFEiwAX8YJgQL7vxH

U6_SaiR5ra4I7QiCIh6WO7ryGuOfPBprnB2ajtVgG42khoCi0UQAvD_BwE&gclid=a
w.ds

12. INFARMED – **Resumo das Características do Medicamento**. Imodium® Rapid 2 mg comprimido orodispersível. (2019). [Acedido a 21/03/2021]. Disponível na Internet: <https://documentcloud.adobe.com/link/review?uri=urn%3Aaaid%3Ascds%3AUS%3A978f18e1-1c3f-438e-8792-41c92a452cea#pageNum=11>
13. A FARMÁCIA ONLINE – **Atyflor® 10 saquetas**. (2021). [Acedido a 21/03/2021]. Disponível na Internet: <https://www.afarmaciaonline.pt/atyflor-10-saquetas.html>
14. PHARMA SCALABIS – **Dioralyte® 20 Saquetas Sabor Groselha**. (2021). [Acedido a 21/03/2021]. Disponível na Internet: <https://www.pharmascalabis.com.pt/store/dioralyte-20-saquetas-sabor-groselha/>

ANEXO I

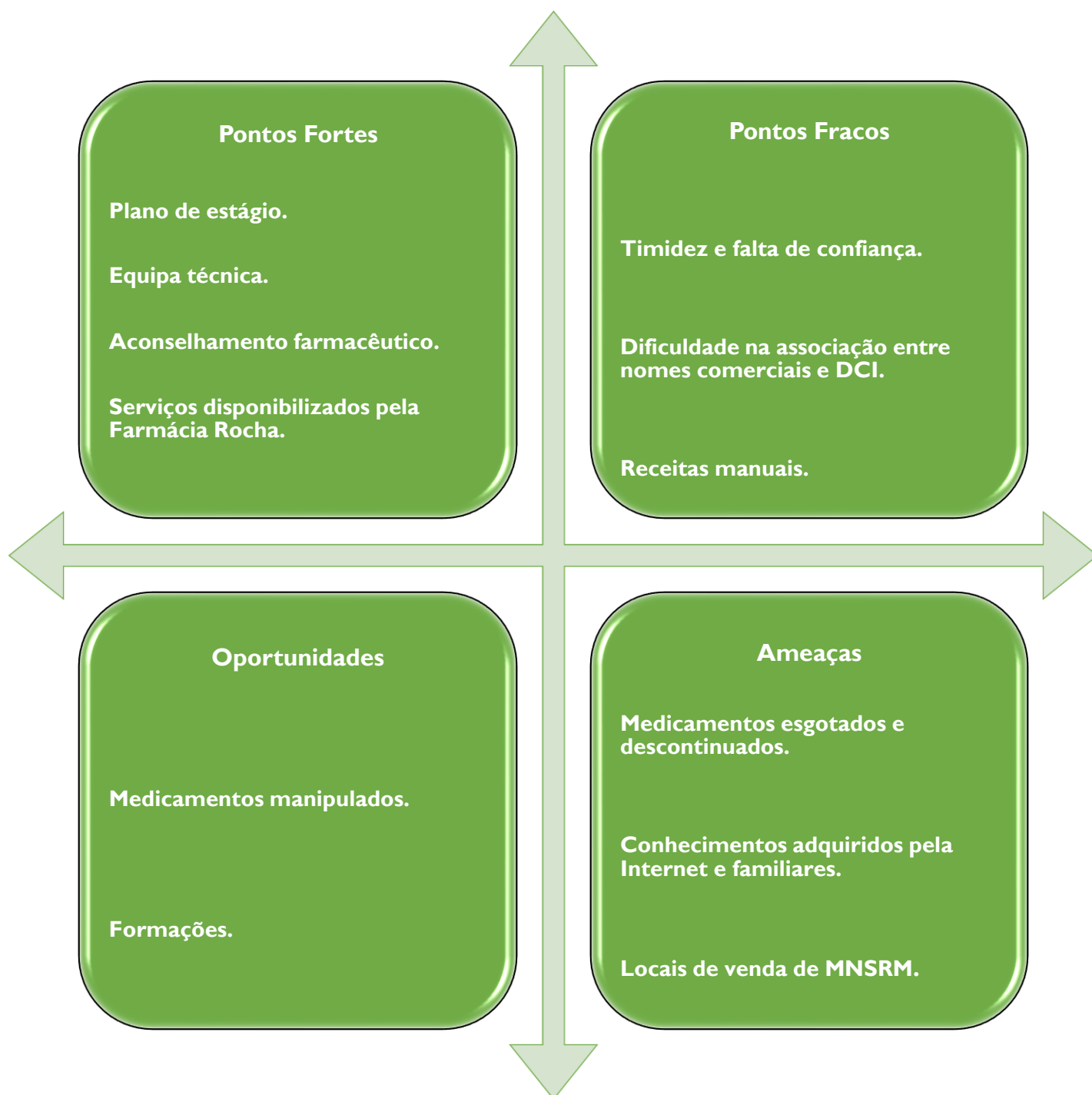


Figura I-I-A. Representação esquemática da análise SWOT do estágio realizado em Farmácia Comunitária, na Farmácia Rocha.

ANEXO 2

Caso Clínico I

Homem de 55 anos dirige-se à farmácia, mostrando uma fotografia da sua virilha e queixando-se de comichão na zona que se encontra, nitidamente, bastante vermelha e irritada, pedindo aconselhamento para esta situação, que o incomoda.

Aconselhamento

Perante a sintomatologia mencionada pelo utente, presumo que se possa tratar de uma micose, isto é, uma infeção causada por um fungo que atinge a pele. Por conseguinte, achei por bem recomendar o Betadine[®] 40 mg/mL espuma cutânea, cujo princípio ativo é a iodopovidona (complexo composto por polivinil pirrolidona e por iodo), na dosagem de 4 g, sendo um antisséptico que atua ao nível da desinfeção e higiene da pele e das mucosas, considerado como um adjuvante no tratamento ou profilaxia de micoses.⁶ Após aplicação cutânea, há uma libertação ao longo do tempo de iodo, o que permitirá a morte de microorganismos, graças às suas propriedades microbidas.⁶ Aconselhei a lavagem com Betadine[®] 40 mg/mL espuma cutânea na zona lesada e passar muito bem com água.⁶ Para o tratamento da micose propriamente dita, aconselhei o Hadazin[®] 10 mg/g creme, em que 1 g de creme contém 10 mg de clotrimazol, sendo este o princípio ativo.⁷ Hadazin[®] é recomendado no tratamento tópico de infeções provocadas por fungos suscetíveis ao clotrimazol.⁷ Esta substância ativa é um antifúngico utilizado em afeções cutâneas, sendo um derivado imidazólico com um largo espectro de ação antimicótica.⁷ Por conseguinte, o clotrimazol inibe a síntese de ergosterol, induzindo danos estruturais e funcionais ao nível da membrana citoplasmática.⁷

Por fim, referi que o utente deveria aplicar o creme entre duas a três vezes por dia, efetuando o tratamento durante 1 semana, aplicando uma camada fina na pele afetada. Antes de cada aplicação era essencial lavar com Betadine[®] 40 mg/mL espuma cutânea com o objetivo de limpar a pele, evitando consequências mais graves. Posto isto, o utente decidiu levar os dois produtos. Passadas 2 semanas, regressa à farmácia, agradecendo o aconselhamento prestado, pois tinha, de facto, melhorado bastante a sua condição.

Caso Clínico 2

Senhora de 33 anos dirige-se à farmácia com receita de antibiótico (Amoxicilina + Ácido Clavulânico 875 mg/125 mg, comprimidos revestidos por película) para o tratamento de uma infecção urinária, queixando-se da recorrência com que tem tido este tipo de infecção e pedindo ajuda para tentar evitar ou minimizar o problema.

Aconselhamento

Inicialmente, questionei a utente quanto à preferência por algum laboratório em específico, sendo que o medicamento pretendido foi Amoxicilina + Ácido Clavulânico Mylan[®] 875 mg/125 mg, comprimidos revestidos por película. Este antibiótico é recomendado para infecções urinárias de origem bacteriana, do grupo dos medicamentos antibacterianos pertencendo à associação de penicilinas com inibidores das beta-lactamases.⁸ A amoxicilina pertence à família das penicilinas, que inibe enzimas na via de síntese do peptidoglicano bacteriano, sendo este um constituinte da parede celular.⁸ Sem este peptídeo, ocorre lise celular e posterior morte da bactéria.⁸ Por outro lado, o ácido clavulânico inibe enzimas beta-lactamases prevenindo a degradação da amoxicilina, não possuindo um efeito antibiótico útil do ponto de vista clínico.⁸ Reforcei junto da utente que teria de efetuar uma toma duas vezes ao dia até ao fim da embalagem com uma administração no início das refeições, para que houvesse uma diminuição do potencial de intolerância gastrointestinal bem como uma otimização da absorção da Amoxicilina + Ácido Clavulânico.⁸

Para além disto, recomendei o suplemento CISTISIL[®], contendo arando vermelho (*Vaccinium macrocarpon*), cavalinha (*Equisetum arvense*), uva ursina (*Arctostaphylos uva-ursi*) e fruto-oligossacáridos (FOS), sendo destinado ao conforto urinário bem como para o bom funcionamento da bexiga e do trato urinário.⁹

Tanto a uva ursina como o arando americano são antissépticos urinários muito usados em pessoas com infeções urinárias recorrentes (como a utente). O arando americano previne infeções no trato urinário, tendo como constituintes ativos principais as protoantocianidinas, que irão evitar a formação de biofilmes bacterianos, inibindo a aderência de bactérias ao urotélio e favorecendo a ação do antibiótico no combate da infeção. Por outro lado, a uva ursina tem como principal composto o arbutósido, tendo um papel coadjuvante com propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas. A cavalinha é um diurético vegetal, contendo um elevado teor em iões potássio, favorecendo, assim, a eliminação de água e levando a um aumento da taxa de filtração glomerular. Neste suplemento, a cavalinha irá ter um papel na terapêutica de lavagem, permitindo a remoção das bactérias. Por fim, os FOS (prébióticos)

complementam a ação dos constituintes anteriormente abordados. Posto isto, recomendei à utente a toma de um comprimido de 12 em 12 h.

Posteriormente, recomendei também o Gino-Canesten® 10 mg/g creme vaginal indicado para a candidíase vaginal recorrente bem como para a inflamação dos lábios vaginais e zonas circundantes.¹⁰ A substância ativa presente neste creme é o clotrimazol, sendo este um antifúngico derivado imidazólico com uma extensiva ação antimicótica, inibindo a síntese de ergosterol, o que induz danos ao nível da membrana citoplasmática.¹⁰ Visto que a utente tinha feito recorrentemente antibiótico, esta poderá estar mais suscetível a uma candidíase, daí considerar pertinente este aconselhamento. Também lhe expliquei como utilizar o aplicador vaginal de forma correta e que o tratamento com Gino-Canesten® 10 mg/g creme vaginal deveria durar 6 dias consecutivos com uma aplicação diária à noite, ao deitar.¹⁰

Em suma, relembrei à utente alguns cuidados que se devem ter como a ingestão abundante de água (aumento da diurese), o consumo de alimentos ricos em vitamina C (meio ácido fundamental para impedir a proliferação bacteriana), não retardar o ato de urinar e ter também cuidados redobrados com a higiene íntima, usando, por exemplo, o LACTACYD® ÍNTIMO Gel para Higiene Íntima Diária 200 mL, contendo ácido láctico, que contribui para a regularização do pH, promovendo a segurança da zona íntima da utente, diminuindo possíveis problemas futuros, desempenhando, assim, uma ação preventiva.¹¹

A utente mostrou-se muito agradada com o aconselhamento prestado e decidiu levar todos os produtos por mim aconselhados, proporcionando um combate mais eficaz para esta situação recorrente.

Caso Clínico 3

Senhora de 40 anos dirige-se à farmácia, queixando-se que está com diarreia e que precisa de algo para resolver a situação, pois tem uma reunião à qual não pode faltar.

Aconselhamento

Inicialmente, questiono a senhora sobre o facto de ter febre (em caso afirmativo, indicar logo para o médico), há quanto tempo estava assim, se já tomara alguma coisa ou se fizera algum tipo de medicação diariamente. A utente esclarece que não tem febre e que os sintomas tinham surgido há pouco tempo e que estava constantemente a ir à casa de banho com dejeções líquidas, não apresentando mais sintomas. Além disto, afirma também que não faz qualquer tipo de medicação diária nem tinha tomado nada para a situação.

Como medidas farmacológicas, aconselhei o Imodium® Rapid 2 mg comprimido orodispersível, tratando-se este de um obstipante contendo loperamida.¹² Este princípio ativo

liga-se aos recetores opiáceos da parede intestinal, inibindo a libertação de acetilcolina e de prostaglandinas,¹² reduzindo, assim, o peristaltismo, o que se traduz num aumento do tempo de trânsito intestinal.¹² O objetivo deste aconselhamento foi parar as dejeções frequentes, por uma questão de alívio, dado que a utente tinha uma reunião fora de casa. Expliquei-lhe que inicialmente deveria colocar dois comprimidos na língua sem água e depois, sempre que fosse à casa de banho com diarreia, colocar mais um na língua, tendo o cuidado de nunca ultrapassar os 6 diários.¹² Para além disto, aconselhei-lhe também um simbiótico, o Atyflor® 10 saquetas, que contém sete estirpes de probióticos e FOS.¹³ O objetivo deste aconselhamento foi normalizar a flora intestinal sem provocar obstipação, já que, numa situação de diarreia, as dejeções frequentes desregulam-na, logo, o simbiótico iria repor a flora intestinal. A utente deveria tomar uma saqueta por dia.¹³

Por fim, decidi também aconselhar o Dioralyte® 20 Saquetas Sabor Groselha, que é um pó para solução oral constituído por glucose (3,56 g), cloreto de sódio (0,47 g), cloreto de potássio (0,30 g) e citrato dissódico (0,53 g), isto é, eletrólitos que permitem uma manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico, minimizando o risco de desidratação dado as dejeções frequentes apresentadas pela utente.¹⁴ Devia tomar uma saqueta diária, dissolvendo o pó em 200 mL de água,¹⁴ tendo-lhe também explicado que era essencial adotar medidas não farmacológicas como cuidados alimentares, evitar medicação indutora de diarreia e a diminuição da ingestão de álcool.

Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica
Unidade Qualidade, *Compliance* e Regulamentar
Departamento de *Compliance*



Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.

Estágio orientado pela
Dra. Ana Sofia Francisco da Silva

Lista de Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

API – *Active Pharmaceutical Ingredient*

AR – Assuntos Regulamentares

FDA – *Food and Drug Administration*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

GMP – *Good Manufacturing Practice*

HPAPIs – *Highly Potent Active Pharmaceutical Ingredients*

MAD – *Marketing Authorization Dossier*

MBR – *Manufacturing Batch Record*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MSDS – *Material Safety Data Sheet*

PA – Produto Acabado

PBR – *Packaging Batch Record*

PSA – Produto Semi-acabado

PVC/PVDC – Policloreto de Vinilo/Policloreto de Vinilideno

QP&C – Qualidade do Produto e *Compliance*

SOP – *Standard Operating Procedure*

SPEC – *Specification*

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

I. Introdução

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), através de um plano de estudos abrangente e completo, proporciona aos estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) a realização de um Estágio Curricular no final do 5.º Ano, noutras áreas do medicamento. No meu ponto de vista, este segundo estágio é, sem dúvida, uma mais-valia para os estudantes, pois permite-lhes que tenham uma melhor perceção acerca das possíveis saídas profissionais após a conclusão do curso e que assimilem uma versatilidade de competências, para se tornarem melhores profissionais de saúde.

Neste sentido, com o objetivo de complementar a minha formação académica e adquirir uma maior diversidade de conhecimentos, decidi realizar um estágio curricular em Indústria Farmacêutica, pois esta surge como uma área que me suscita um elevado interesse e curiosidade para o futuro. Após um processo de candidatura e posterior entrevista, fui selecionado para, de 3 de maio a 30 de julho, estagiar na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A., especificamente no Departamento de *Compliance*, integrado na Unidade de Qualidade, *Compliance* e Regulamentar, em regime misto (presencial e teletrabalho), sob a orientação da Dra. Ana Sofia Francisco da Silva e da tutela do Dr. Henrique Miguel Bentes. Na verdade, encarei esta nova etapa da minha formação com um enorme sentido de responsabilidade e com um elevado nível de motivação, dada a oportunidade que me foi proporcionada.

O presente relatório de estágio incide, inicialmente, numa contextualização acerca da Bluepharma®, do conceito de *compliance* e do departamento onde estagiei, apresentando-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), em que pretendo, de forma estruturada, abordar, através de um ponto de vista crítico e global, o estágio realizado, mencionando, a nível interno, os pontos fortes e os pontos fracos e, a nível externo, as oportunidades e as ameaças com que me deparei durante estes 3 meses de aprendizagem (Anexo I). Por fim, através de uma breve conclusão, focar-me-ei no balanço global deste estágio, quer a nível pessoal, quer a nível profissional.

2. Bluepharma®

A Bluepharma® é uma empresa Farmacêutica portuguesa, com sede em São Martinho do Bispo, em Coimbra. Iniciou a sua atividade em fevereiro de 2001, após a aquisição de uma unidade industrial pertencente à multinacional Bayer.¹ Atualmente, o grupo Bluepharma® inclui vinte empresas, onde tive oportunidade de estagiar, como referi anteriormente, na Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.² A atividade da Bluepharma® percorre toda a cadeia de valor do medicamento, desenvolvendo-se em três áreas: a produção de medicamentos próprios e para terceiros (essencialmente formas farmacêuticas sólidas, como cápsulas e

comprimidos); a investigação, o desenvolvimento e o registo de medicamentos; e a comercialização de medicamentos genéricos.³

Ao longo de 20 anos de história, é possível constatar muitos marcos fundamentais no seu crescimento. A Tabela 2-I-A ilustra algumas das muitas conquistas desta empresa.

Tendo em consideração que a missão desta empresa consiste na «[...] investigação e desenvolvimento de medicamentos de elevado valor acrescentado e a contínua aposta na qualidade e inovação dos seus processos de fabrico e comercialização»,⁴ torna-se importante realçar o projeto “Bluepharma Acelera 2030”. De facto, com este projeto, pretende-se criar um novo estabelecimento em Eiras, em que o enfoque será a produção de medicamentos que incorporam *highly potent active pharmaceutical ingredients* (HPAPIs).⁵

Neste sentido, a Bluepharma[®], ao desenvolver e comercializar novos produtos mais complexos, sofisticados e com maior grau de inovação, utilizando para isso tecnologias de última geração, permitirá alcançar uma maior atratividade para o mercado internacional, bem como diversificar o seu negócio, o que, na verdade, reforçará não só o seu exponencial crescimento, mas também a sua posição como uma referência global, transversal e de excelência ao nível da Indústria Farmacêutica.⁵

3. Compliance

Com origem no verbo inglês “*to comply*” (que significa cumprir), *compliance* pode definir-se como *agir de acordo com ou em conformidade com* a legislação em vigor ou as normas, isto é, conciliar as ações, condutas e procedimentos com as exigências legais, éticas e regulamentares de forma transparente. Assim sendo, torna-se perceptível que a aplicação deste conceito a nível empresarial permite minimizar problemas que possam surgir ou detetar, eliminar e evitar inconformidades no dia a dia.^{6; 7; 8}

Posto isto, torna-se essencial compreender a aplicação de *compliance*, numa perspetiva farmacêutica. Sendo assim, e tendo em consideração as informações providenciadas pela *european medicines agency* (EMA), quer seja no desenvolvimento, no fabrico, no *marketing* ou na distribuição de medicamentos, tem de haver conformidade com as normas e com as *guidelines* das autoridades, o que evidencia a aplicabilidade deste conceito em todas as fases do ciclo de vida do medicamento, garantindo que estas decorrem sem riscos, pois só assim será possível garantir a segurança, a qualidade e a eficácia dos medicamentos quando comercializados, minimizando os riscos para os doentes.⁹

De facto, a atividade desenvolvida neste departamento é uma mais-valia para contribuir e assegurar que os medicamentos comercializados estão em conformidade com os requisitos de qualidade.

3.1 Departamento de Compliance

Durante 3 meses, estagiei no departamento de *Compliance* (um novo departamento que surgiu em 2020, após uma reestruturação da empresa), fazendo parte da Unidade de Qualidade, *Compliance* e Regulamentar da Bluepharma Indústria. De referir que a equipa de *Compliance* foi formada por colaboradores do departamento de assuntos regulamentares (AR) e pelo antigo departamento da qualidade do produto e *compliance* (QP&C).

Neste departamento é gerido o ciclo de vida de um medicamento após este ter obtido uma autorização de introdução no mercado (AIM). Aqui, verifica-se o impacto regulamentar que a documentação de Fabrico e Analítica pode ter no lançamento de um medicamento para o mercado ou na manutenção de um dossier de AIM, que pode culminar numa alteração regulamentar aos termos de AIM.

Como é possível verificar na Figura 1 do Anexo 3, o departamento encontra-se organizado em três equipas fundamentais: a do Produto (*Product Compliance*), a da Documentação (*Documentation*) e a dos Materiais (*Materials*), tendo eu sido integrado na equipa da Documentação, mais concretamente na documentação de Fabrico. As funções desta equipa são:

- Preparação, revisão e gestão da documentação de Fabrico em rotina, isto é, *manufacturing batch record* (MBR), *packaging batch record* (PBR) e FORMs (documento para registo de atividades/tarefas);
- Verificação e controlo da conformidade da documentação de Fabrico com o dossier de AIM;
- Verificação de receitas de Fabrico e embalagem.

Deste modo, podemos perceber a importância e obrigatoriedade em ter os procedimentos e instruções de Fabrico (desde a formulação, matérias primas e equipamentos usados, até aos processos e parâmetros críticos), em conformidade com o *dossier* de AIM.

4. Análise SWOT

4.1 Pontos Fortes

4.1.1 Receção, acolhimento e integração

Estes 3 meses de estágio começaram no dia 3 maio com uma receção na sede da Bluepharma®, em S. Martinho do Bispo, por parte do departamento dos Recursos Humanos. Foi-me proporcionado, tal como aos restantes estagiários, uma sessão de apresentação da organização da empresa e das funções desempenhadas, de forma geral, por cada departamento. Infelizmente, dadas as contingências atuais, devido à pandemia que atravessamos, não foi possível a realização da habitual visita às instalações da empresa. No final

da receção, foi atribuído a cada estagiário um tutor com a função de o acompanhar na sua fase inicial e de o ajudar em questões do dia a dia que pudessem surgir. Neste meu primeiro dia, o meu tutor explicou-me e apresentou-me alguns locais-chave na empresa, para facilitar a minha integração. Para além disso, tive oportunidade de assistir a uma sessão de acolhimento ministrada pelo presidente da Bluepharma®, Dr. Paulo Barradas Rebelo, tendo-me sido apresentados a missão, a história, os valores e as perspetivas futuras da empresa.

De facto, estes fatores, previamente mencionados, aliados a uma breve autoapresentação via *Microsoft Teams*, realizada por mim e por toda a equipa de *Compliance*, em que foi possível conhecer os seus elementos e as funções que desempenhavam, permitiram-me, desde o primeiro dia, sentir-me à vontade e perder o nervosismo inicial, motivando-me ainda mais para este desafio.

4.1.2 Equipa

Atualmente, a equipa do departamento de *Compliance* é composta por vários colaboradores integrados nas equipas suprarreferidas. No geral, a equipa é bastante jovem, muito competente, qualificada, profissional e com um elevado espírito de companheirismo entre os seus vários elementos. Estas qualidades, aliadas à disponibilidade e preocupação que sempre prestaram para o esclarecimento das minhas dúvidas, quer presencialmente, quer em teletrabalho, facilitaram, naturalmente, as funções que desempenhei durante o meu estágio.

O bom ambiente e a amizade, que desde cedo senti, foram, sem dúvida, ímpares, contribuindo, assim, para a minha integração na equipa e na realidade profissional vivida numa Indústria Farmacêutica.

4.1.3 Metodologia Kaizen

Na Bluepharma®, é adotada a metodologia *Kaizen*, uma filosofia Nipónica que significa melhoria contínua.¹⁰ No caso concreto da Indústria Farmacêutica, alguns desafios prendem-se com o aumento da produtividade, da qualidade, da eficiência, da otimização de processos e da eliminação de ações que não possuem um valor acrescentado. Este conceito é, atualmente, transversal a todas as áreas e departamentos da Bluepharma®.

No caso em específico do departamento de *Compliance*, é adotada esta metodologia, já que, diariamente, se realizam reuniões de *Kaizen*. Estas reuniões, devido à pandemia que atravessamos, realizam-se via *Microsoft Teams* e, têm, na generalidade, uma duração curta, apresentando como finalidade não só incentivar o envolvimento de todos os colaboradores, como também controlar e melhorar os resultados e indicadores da equipa, pois só assim se consegue uma melhoria de processos e a concretização dos objetivos pretendidos.

De facto, neste departamento, estas reuniões encontram-se profissionalmente estruturadas, pois centram-se em vários aspetos. Em primeiro lugar, abordam-se as comunicações que cada colaborador pode expor, que interfiram com o trabalho da equipa, para que haja um acompanhamento coletivo atualizado da situação diária e semanal do departamento. De seguida, há o preenchimento do plano de trabalho, bem como de parâmetros relacionados com problemas detetados e lições aprendidas, que são fulcrais para que toda a equipa fique a par do trabalho desenvolvido por todos os colaboradores. Em certos dias da semana, são abordados determinados temas que, uma vez mais, contribuem para o trabalho desenvolvido pelo departamento e são essenciais para o seu bom funcionamento.

Nestes 3 meses de estágio, tive oportunidade de assistir às reuniões de *Kaizen*, e, a meu ver, assimilei muitos conhecimentos e formas de otimizar o meu trabalho, pois a partilha de temas e de informações fez-me não só conseguir relacionar conceitos como também ter uma compreensão mais realista do trabalho e do espírito de *entreajuda*, que é necessário para o bom funcionamento e sucesso de uma equipa na Indústria Farmacêutica.

4.1.4 Formações internas

A Bluepharma® é uma empresa que aposta desde cedo na formação dos seus colaboradores, de forma a que estes adquiram competências e valências fundamentais para desempenharem corretamente as funções que lhes são atribuídas, contribuindo para o sucesso da empresa. Além disso, estas formações têm também como objetivo contextualizar o novo colaborador para os diferentes departamentos existentes e respetivas atividades, para as medidas de segurança e orientação e as práticas e para o funcionamento e as políticas da empresa.

Nos primeiros dias, assisti às sessões formativas disponibilizadas nos *success factors*, das quais destaco: “SGI: Qualidade e GMP”, “VEEVA Vault”, “Ambiente, Segurança e Saúde no trabalho”, “Melhoria contínua”, “Assuntos Regulamentares” e “Farmacovigilância”, que me permitiram não só consolidar conhecimentos que já possuía como também me auxiliaram e facilitaram as atividades que desenvolvi durante o meu estágio.

Para além disso, na primeira semana, foram-me ministradas pelos vários elementos da equipa de *Compliance*, via *Microsoft Teams*, algumas formações que serviram para me contextualizar acerca das funções, dos princípios e objetivos do departamento e, também, para compreender melhor a dinâmica da equipa. Destas, considero importante destacar a formação proporcionada pela Dra. Carolina Almeida sobre codificação e a formação acerca MBRs e PBRs, ministrada pela Dra. Inês Valada, que, a meu ver, foram essenciais para conseguir desempenhar as tarefas propostas.

Neste sentido, no início do meu estágio, foi também necessária a leitura de *standard operating procedures* (SOPs), adequadas às funções que iria desempenhar, das quais destaco a de codificação de materiais, a de sistemas de documentação e as de preparação e revisão de MBRs e PBRs.

Como se pode verificar com o que suprarreferi, há, sem dúvida alguma, uma preocupação ímpar da Bluepharma® na formação contínua de colaboradores competentes com as variadíssimas formações que se encontram ao seu dispor. De facto, na minha ótica, sinto que o meu processo de integração e aprendizagem foi, em muito, beneficiado pelo investimento da empresa nesta área.

4.1.5 Plano de estágio

Após completar a formação inicial, realizei duas tarefas fundamentais ao nível da documentação de Fabrico, tendo sido ambas à base da análise em detalhe dos PBRs e da consulta dos MBRs. Estes dois documentos são elaborados pelo departamento de *Compliance* e têm de estar de acordo com o *marketing authorization dossier* (MAD). Em primeiro lugar, os MBRs são documentos que compilam as fórmulas e as instruções de fabrico para cada produto, lote e tamanho. Por outro lado, os PBRs compilam a informação acerca das instruções de embalagem para cada produto, lote e tamanho. Uma vez que o enfoque do meu estágio foram os PBRs, queria apenas acrescentar que estes, para produto acabado (PA) para comercialização, têm de estar de acordo com o dossier do produto, com as *good manufacturing practices* (GMPs), com a legislação aplicável e com as exigências locais requeridas pelo cliente para o qual se destinam. Os PBRs incluem um certificado, os componentes do PA, o modo de procedimentos e cuidados a ter ao nível do acondicionamento primário, secundário e final, o controlo durante o processo, a avaliação do processo de desblisteragem, o rendimento e os anexos para marcação dos dados variáveis nas caixas e etiqueta da caixa final.

Ao nível do trabalho desenvolvido durante o meu estágio, procedi à recolha, num Excel, dos códigos de produto semiacabado (PSA), presentes em cada PBR, fazendo correspondência com as respetivas fontes de *active pharmaceutical ingredient* (API) dos vários fabricantes/fornecedores indicados nos MBRs. Após isso, através da consulta de um documento presente no SharePoint® (sistema interno de partilha e armazenamento de dados), tinha que verificar quais eram as fontes de API aprovadas para cada cliente da Bluepharma® e perceber se, nos PBRs, existiam determinados códigos de PSA correspondentes a fontes de API que já não estavam aprovadas para esses clientes ou se esses clientes já tinham aprovadas outras fontes de API novas, que correspondiam a códigos de PSA que ainda não constavam

no PBR. Independentemente da situação em si, os PBRs, a nível de codificação de PSA, teriam que ser atualizados, pelo que notifiquei essas possíveis atualizações no documento efetuado.

Numa segunda fase do meu estágio, procedi à revisão e à atualização dos PBRs para o novo *layout* (motivado pela recente mudança no sistema de gestão documental) e referência para as SOPs. Para o processo de revisão, utilizei o Excel que tinha criado, para atualizar os códigos de PSA. Para além disso, através da consulta de vários documentos no SharePoint®, foi-me possível confirmar os vários constituintes do PA, como, por exemplo, o policloreto de vinilo/policloreto de vinilideno (PVC/PVDC) e o alumínio (ambos constituintes dos blisters), a caixa, a literatura e os selos. Além disso, através da consulta do dossier de AIM de cada produto para cada cliente, através da secção 3.2.P.8 – *Stability*, foi-me possível confirmar o prazo de validade aprovado para o produto. Ao nível dos cuidados a ter, verifiquei a serialização dos produtos, se aplicável, e consultei a *material safety data sheet* (MSDS) para cada API, com o objetivo de atualizar os PBRs. No que diz respeito ao controlo durante o processo, consultei a *specification* (SPEC) de PSA de cada cliente com o intuito de verificar e atualizar a sua aparência. Realizei também a atualização do rendimento e introduzi o peso unitário teórico através da consulta dos MBRs. Por fim, procedi à atualização e/ou introdução dos anexos suprarreferidos.

Concluo, assim, que a multiplicidade de tarefas que desempenhei contribuíram para compreender melhor não só a forma como os vários departamentos se encontram interligados como também a constante necessidade de se possuir uma documentação atualizada, para se estar sempre em *compliance* com o exigido pelas autoridades competentes.

4.1.6 Autonomia nas tarefas desempenhadas e confiança nos estagiários

Durante o meu estágio, desempenhei algumas funções que me iam sendo atribuídas, estando as mesmas previamente mencionadas neste documento.

Desde cedo, senti uma total confiança dos restantes colegas do departamento de *Compliance* nas minhas capacidades e no meu empenho e dedicação na realização das mesmas, estando sempre disponíveis para me esclarecer em dúvidas que me iam surgindo.

No meu ponto de vista, esta confiança que foi depositada em mim foi fulcral para que, dia após dia, sentisse mais segurança nas minhas capacidades e colocasse em prática os conhecimentos adquiridos na faculdade e os transmitidos pela equipa. Só assim foi possível ter desenvolvido competências de trabalho e de resolução de problemas de forma crítica e autónoma, cumprindo, com sucesso, as tarefas desenvolvidas.

4.2 Pontos Fracos

4.2.1 Duração do estágio

Apesar de considerar a oportunidade de estagiar em Indústria Farmacêutica uma experiência única e enriquecedora, considero que 3 meses de estágio acabam por servir apenas como uma breve consciencialização acerca das várias atividades que são aqui desempenhadas e perceber, de forma geral, como estas se encontram interligadas nos vários departamentos.

Na minha opinião, a duração deste estágio acaba por ser insuficiente para que tenhamos uma perceção mais detalhada, concreta e fundamentada da forma como as valências de um farmacêutico podem ser aplicadas nesta área profissional, algo que considero fulcral para quem tenha interesse em seguir este ramo.

No caso do departamento de *Compliance*, como referi anteriormente, este é essencial para o bom desempenho de uma empresa. Logo, não só são executadas imensas tarefas como também existe um elevado número de procedimentos e conceitos a si inerentes, que, infelizmente, não são possíveis de dominar em apenas 3 meses.

4.3 Oportunidades

4.3.1 Experiência em Indústria Farmacêutica

Durante o meu percurso na FFUC, houve vários momentos em que alguns docentes abordavam a Indústria Farmacêutica, estando esta em exponencial crescimento, como uma saída profissional possível para os estudantes de MICE. Naturalmente, fiquei durante estes anos com uma ideia pré-concebida daquilo que poderia ser a aplicação dos meus conhecimentos neste ramo. Com esta oportunidade de estágio, apreendi, ainda que genericamente, algumas das valências que um farmacêutico pode aplicar na indústria e, assim, passar a possuir uma ideia mais de acordo com a realidade do trabalho em indústria, pois a que tinha anteriormente em pouco se assemelhava à que tive agora a hipótese de presenciar.

Na verdade, algumas unidades curriculares, como Gestão e Garantia de Qualidade, Tecnologia Farmacêutica (I, II e III) e Assuntos Regulamentares do Medicamento são, a meu ver, as essenciais, para adquirirmos conhecimentos que possamos aplicar em indústria, tendo, no meu caso específico, consciência de que me foram úteis.

Uma vez que o estágio surge como uma oportunidade de aprendizagem complementar e de consolidação de conceitos, considero que me poderei tornar num farmacêutico mais competente, polivalente, versátil, diferenciado e proativo para a adaptação ao mundo do trabalho que se me avizinha.

4.3.2 Desenvolvimento de soft skills e domínio do software Microsoft Teams

Nas atividades realizadas durante o meu estágio, previamente mencionadas neste relatório, utilizei algumas ferramentas com as quais já estava familiarizado, como é o caso do *Microsoft Word* e do *Microsoft Excel*.

Na verdade, para essas mesmas funções desempenhadas, tive que, muitas vezes, consultar vários Excel presentes no Sharepoint® da Bluepharma®, o que me permitiu consolidar competências na sua utilização, bem como interpretar a informação aí organizada e sistematizada. Este facto tornou-me mais apto para a realização do Excel referido em 4.1.5, com o objetivo de o tornar o mais completo e perceptível possível para ser utilizado pelos colaboradores da empresa. Além disso, editei a *checklist* existente para a atualização e revisão dos PBRs, de modo a torná-la mais completa e, nos casos em que os revi, foi sempre necessário utilizar o *Microsoft Word*, logo, na minha opinião, não só apliquei como também desenvolvi competências para a sua correta elaboração.

Por outro lado, com o aparecimento da pandemia e a implementação do teletrabalho, surgiu o *software Microsoft Teams*, como uma ferramenta fundamental para a continuação do trabalho realizado pela Bluepharma®, já que este *software* permite o estabelecimento de reuniões e chamadas entre os vários colaboradores da empresa, facilitando, desta forma, a comunicação entre todos e a resolução de problemas. Este *software*, através do *Microsoft Planner*, permite a anotação das tarefas que cada colaborador tem para realizar, estabelecendo datas para as mesmas, o que contribui para uma maior organização do trabalho da equipa.

De facto, o meu conhecimento em relação ao *Microsoft Teams* era bastante limitado, mas considero que, com o estágio, tive a oportunidade de conhecer esta ferramenta e conseguir dominá-la para desempenhar as minhas funções no dia a dia.

4.4 Ameaças

4.4.1 Pandemia atual

Infelizmente, sinto que o meu estágio foi, de certo modo, condicionado pela pandemia atual, que atravessamos há já quase 2 anos.

Apesar de ainda vivermos tempos de alguma incerteza, foi possível tê-lo realizado em regime misto, dado a equipa ter adotado um regime de rotatividade semanal, cumprindo, deste modo, as normas implementadas pela Bluepharma® para a prevenção de contactos no local de trabalho de colaboradores em modo presencial. Todas as semanas ia pelo menos 2 dias à Bluepharma®, estando os restantes 3 dias em teletrabalho. Na verdade, ter a possibilidade de estagiar em regime misto foi uma grande vantagem e um privilégio que, desde já, agradeço.

Contudo, considero que inicialmente houve alguma dificuldade da minha parte em me adaptar ao teletrabalho. Muitas vezes, sentia que não atingia o rendimento de trabalho que pretendia e acabava por possuir um ritmo pouco coordenado e organizado. Felizmente, habituei-me a esta realidade e melhorei em muito as minhas capacidades nesta vertente.

Contudo, apesar do breve convívio pessoal e profissional, com troca de conhecimentos que tive com alguns colegas nos dias em que estagiava em modo presencial, não tive oportunidade de conhecer, na globalidade, o ambiente e a rotina de trabalho presencial que existe entre todos os colaboradores no departamento de *Compliance*. No meu ponto de vista, teria sido bastante enriquecedor ter assistido a uma reunião de *Kaizen* realizada presencialmente, para ter uma perceção mais “palpável” da dinâmica da equipa.

Finalmente, queria apenas acrescentar que o facto de não ter sido possível visitar nem conhecer todas as instalações da Bluepharma® nem os vários departamentos desta empresa e respetivos profissionais existentes nos mesmos, devido à pandemia, como já referi, impediu que obtivesse uma melhor perceção acerca da produção e atividades desempenhadas por outros departamentos, não me permitindo uma melhor contextualização da interdependência de todos os colaboradores e da sua importância na Indústria Farmacêutica.

4.4.2 Crescente exigência e requisitos de qualidade/compliance

Durante este tempo, apercebi-me, dia após dia, da crescente exigência e requisitos de qualidade/*compliance*, que têm de ser cumpridos para um bom funcionamento da empresa.

Nos dias de hoje, é notório que os parâmetros de qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos são cada vez mais pormenorizadamente controlados e regulados para se garantir um menor risco possível para os doentes. Uma vez que a Bluepharma® tem um elevado volume de exportações para muitos e variados territórios, é normal que seja auditada com bastante frequência por entidades auditoras, que realizam inspeções e auditorias de forma a averiguar se os seus procedimentos e documentação cumprem com o exigido, pois, caso contrário, podem surgir não conformidades indesejáveis. De facto, para que haja uma harmonia na conformidade do produto final obtido, é necessária uma comunicação clara e ativa não só entre os vários departamentos como também entre a empresa e os respetivos clientes para os quais o produto final se destina.

No caso em concreto da documentação de Fabrico do Departamento de *Compliance*, são necessárias, constantemente, alterações nos documentos, que podem surgir por parte dos clientes ou por mudanças nos setores da produção e da embalagem. As alterações ao nível da produção e da embalagem, que implicam modificações na documentação, têm de ser averiguadas com o cliente, pois podem implicar mudanças regulamentares nos termos de AIM.

Tudo tem de estar, assim, conforme o exigido pelas autoridades, o que leva a uma sobrecarga nas atividades desenvolvidas e a um aumento do volume de trabalho dos colaboradores.

Apesar destes fatores, nunca nos podemos esquecer que temos de ter sempre presente que as melhorias efetuadas servem para garantir que os três pilares fundamentais do medicamento são cumpridos.

5. Conclusão

Neste último ponto do meu relatório, são várias as considerações que tenho de abordar e analisar.

Em primeiro lugar, realçar, uma vez mais, a oportunidade que nos é proporcionada pela FFUC em realizar um estágio em Indústria Farmacêutica, que é fundamental para quem tenciona enveredar por esta área profissional ou obter mais conhecimento sobre a mesma.

Por outro lado, com este estágio, foi possível alargar os meus horizontes no que diz respeito às possíveis saídas profissionais, que eu, futuro farmacêutico, posso ter ao meu alcance, nomeadamente ao nível da Indústria Farmacêutica, e perceber, ainda que de uma forma pouca aprofundada, de que forma o papel de um farmacêutico pode ser fundamental neste ramo, dado que apliquei, no meu dia a dia, conhecimentos adquiridos em unidades curriculares de MICE.

Para além do constatado, é com bastante satisfação e orgulho que tenho consciência do meu trabalho desenvolvido ao longo destes 3 meses. Alcancei os meus objetivos pessoais, adaptei-me ao trabalho, desafiei-me a ser melhor e a aprender mais e considero que cumpro com todas as tarefas que me foram sendo solicitadas.

Em relação à equipa de *Compliance*, senti, desde o primeiro dia, o verdadeiro significado de trabalho em equipa e de espírito de equipa. Dado o meu trabalho desenvolvido neste departamento, a extraordinária competência e profissionalismo de todos os colaboradores da equipa e o ambiente presenciado, desenvolvi um elevado gosto por esta área, que, até então, pouco conhecia. Tenho, sem dúvida alguma, de agradecer a toda a esta equipa, pois não só me integraram e ajudaram, como também me fizeram crescer enquanto pessoa e profissional, graças aos ensinamentos que me foram transmitidos. Levá-los-ei comigo para, eventualmente, me poder vir a tornar num farmacêutico competente.

Em suma, considero que a Bluepharma® foi a escolha ideal para um primeiro contacto com a Indústria Farmacêutica, dado o seu rigor, os seus valores e a sua missão, que a tornam numa empresa de excelência. A todos com quem tive oportunidade de privar e aprender, o meu mais sincero “Obrigado”.

6. Referências Bibliográficas

1. BLUEPHARMA – **História.** (2020). [Acedido a 4 de julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-history.php>
2. BLUEPHARMA – **Grupo Bluepharma.** (2020). [Acedido a 4 de julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>
3. BLUEPHARMA – **Quem somos.** (2020). [Acedido a 4 de julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>
4. BLUEPHARMA – **Missão, Visão e Valores.** (2020). [Acedido a 7 de julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-mvv.php>
5. BLUEPHARMA – **Bluepharma Acelera 2030 | Projeto 42.611.** (2020). [Acedido a 7 de julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/P2020-Acelera2030.php>
6. TECHEDGE GROUP – **O QUE É COMPLIANCE? ENTENDA A SUA IMPORTÂNCIA E COMO IMPLEMENTAR** (2020). [Acedido a 6 julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.techedgegroup.com/pt/blog/o-que-é-compliance-entenda-a-sua-importância-e-como-implementar>
7. OCP Portugal – **Apresentação | Compliance.** (2021). [Acedido a 6 julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ocp.pt/pt/apresentacao/compliance>
8. IGNATTI, Adriano – **Tudo que você precisa saber sobre compliance.** (2020). [Acedido a 6 julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://blog.cedrotech.com/tudo-sobre-compliance>
9. EUROPEAN MEDICINES AGENCY – **Compliance: Overview | European Medicines Agency.** (2021). [Acedido a 6 de julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/compliance-overview#compliance-in-the-product-lifecycle-section>
10. KAIZEN INSTITUTE – **What is Kaizen?** (2021). [Acedido a 12 de julho de 2021]. Disponível na Internet: <https://www.kaizen.com/what-is-kaizen.html>

ANEXO I

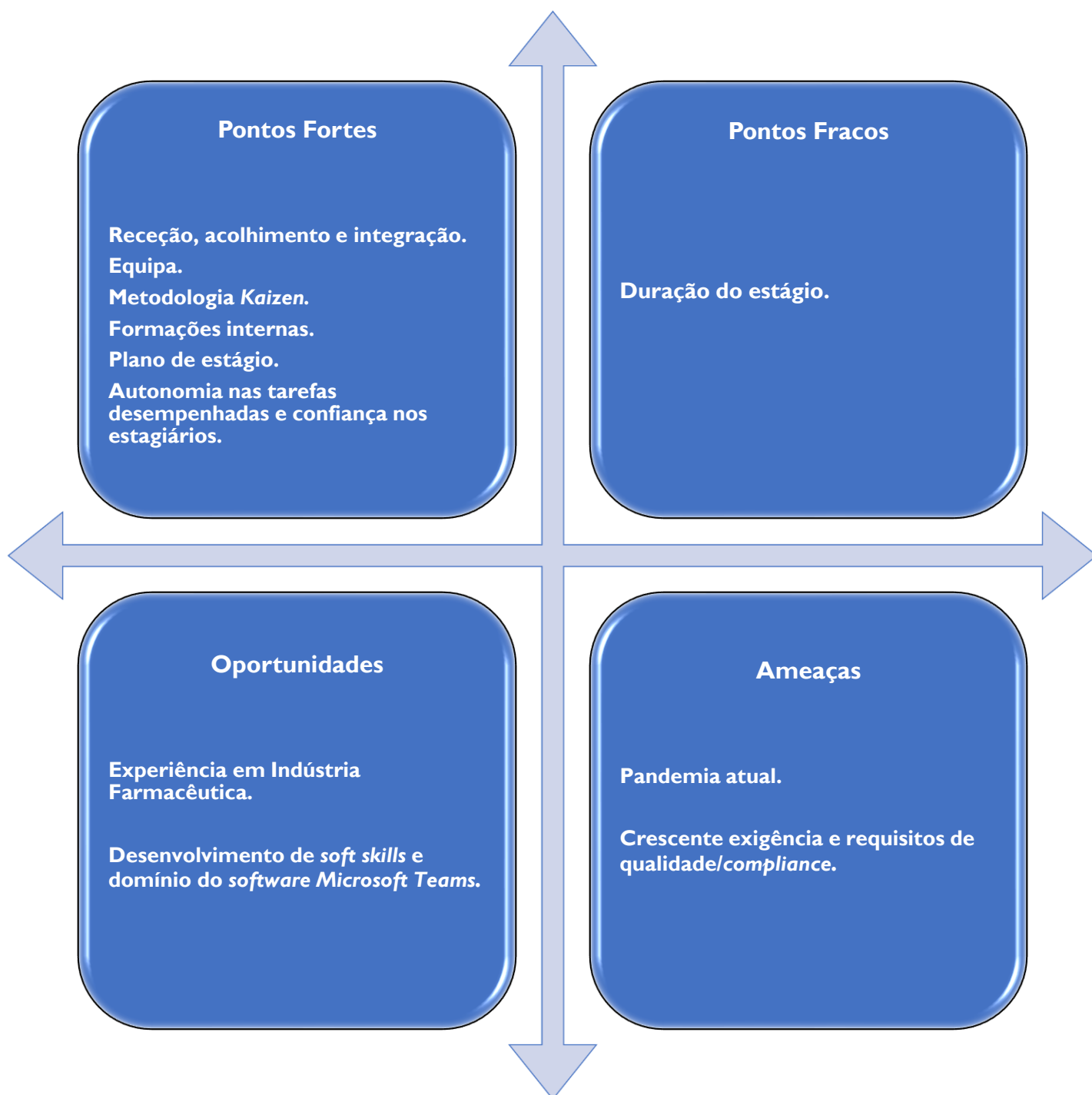


Figura I-I-A. Representação esquemática da análise SWOT do estágio realizado no departamento de *Compliance* na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.

ANEXO 2

Tabela 2-I-A. Enumeração de alguns marcos históricos alcançados pela Bluepharma®, constantes no website da empresa.¹

Ano	Marco histórico alcançado
2002	Constituição da Bluepharma Genéricos.
2003	Obtenção de certificações em qualidade (ISO 9001/2000), ambiente (ISO 14001/1999) e segurança e saúde ocupacional (OHSAS 18000).
2008	Lançamento do primeiro medicamento desenvolvido <i>in-house</i> .
2009	Obtenção da certificação da <i>food and drug administration</i> (FDA) para o desenvolvimento e produção de formas sólidas.
2016	Obtenção da certificação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) do Brasil.
2019	Dupla distinção nos Prêmios Boas Práticas INFARMED 25+, nas categorias de "Exportação" e "Exportação de Genéricos".
2020	Início das obras de expansão em São Martinho e do projeto ONConcept® (Eiras).

ANEXO 3

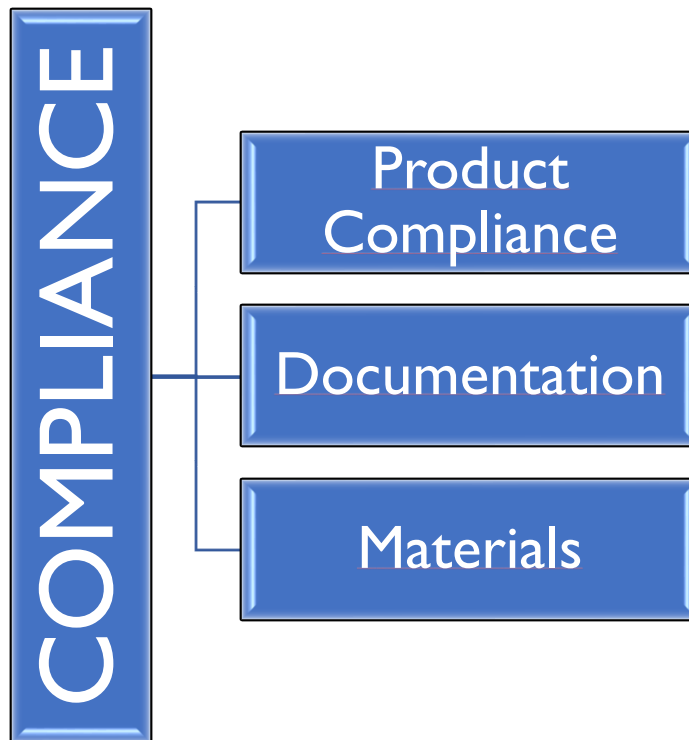


Figura 3-1-A. Representação esquemática da estrutura do departamento de *Compliance*.

Parte III

Monografia

“Nanocelulose: avanços e perspectivas futuras em tecnologia farmacêutica”

Orientada pela

Professora Doutora Carla Sofia Pinheiro Vitorino

Lista de Abreviaturas

3D – Tridimensional

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AgNO₃ – Nitrato de prata

AgNPs – Nanopartículas de prata

AGU – Unidades anidro-D-glucopiranoose

BNC – Nanocelulose bacteriana

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

CFU – Unidades formadoras de colónias

ChOx – Colesterol oxidase

CMI – Concentração mínima inibitória

CNCs – Nanocristais de celulose

CNFs – Nanofibras de celulose

CNWs – *Nanowhiskers* de celulose

CS_{Os} – Oligossacarídeo de quitosano

CV – Voltametria cíclica

DCF – Diclofenac

DES – *Deep eutectic solvent*; solvente eutético profundo

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

DSC – Calorimetria diferencial de varrimento

ECM – Matriz extracelular natural

GLU – Glutaraldeído

GOx – Glucose oxidase

GRAS – *Generally recognized as safe*

H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio

HAp – Hidroxiapatite

HDA – Hexadecilamina

HEC – Fibroblastos para ligamentos humanos

HLC – Células endoteliais vasculares humanas

HNE – Elastase neutrofílica humana

IL-8 – Interleucina 8

LI – Líquido iônico

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

MCC – Microcristais de celulose

MFC – Celulose microfibrilada

MRI – Imagiologia por ressonância magnética

mRNA – RNA mensageiro

NaOH – Hidróxido de sódio

NC – Nanocelulose

NCC – Celulose nanocristalina

NFC – Celulose nanofibrilada

PANi – Polianilina

PBS – Tampão fosfato salino

PHMB – Polihexanida

PMGly – Poli-(N-metacrilóil glicina)

PPY – Polipirrol

PTX – Paclitaxel

PVA – Acetato de polivinilo

PVP – Polivinil pirrolidona

R&D – Investigação e desenvolvimento

RSD – Desvio padrão relativo

SA – Alginato de sódio

SA% – Atividade sequestrante

SBF – Fluido corporal simulado

SPE – Elétrodo serigrafado de carbono

TCP – Placa de cultura de tecidos

TEMPO – Radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TPP – Tripolifosfato

VC – Vitamina C

XRD – Difração de raios X

Resumo

A procura de novos excipientes com propriedades versáteis, que sejam sustentáveis, renováveis e baratos é uma necessidade premente da tecnologia farmacêutica. A nanocelulose (NC) surgiu como uma nova solução face aos desafios emergentes do mundo da investigação e do desenvolvimento. Uma vez que é dotada de facetas e características excepcionais, torna-se essencial a sua abordagem numa perspetiva biomédica e tecnológica. Nesta revisão, são enumerados os tipos de NC e as suas excelentes características, bem como algumas das suas propriedades a nível de toxicidade para o organismo humano. Para além disso, esta monografia tem como enfoque a exposição e discussão das suas diversas aplicações, em que a NC tem conduzido à obtenção de resultados promissores e surpreendentes no panorama científico. Neste trabalho, de modo a realçar a evolução deste excipiente, foram abordadas as patentes, o mercado e as perspetivas futuras. Na verdade, o objetivo primordial foi elucidar as potencialidades e o crescimento exponencial da NC para fazer face aos novos desafios e revolucionar o mundo tecnológico.

Palavras-chave: Nanocelulose, Toxicidade, Engenharia de Tecidos, Cicatrização de Feridas, Sistemas de Libertação de Fármacos, Biossensores, Patentes, Perspetivas Futuras.

Abstract

The search for new excipients with versatile properties that are sustainable, renewable and cheap is a pressing need for pharmaceutical technology. Nanocellulose (NC) arisen as a new solution to the emerging challenges of the world of research and development. Since it has exceptional facets and characteristics, it is essential to look at it from a biomedical and technological perspective. In this review, the types of NC and their outstanding characteristics are listed, as well as some of their properties related to their toxicity to the human body. Furthermore, this monograph focuses on the presentation and discussion of the diverse applications in which NC has led to promising and surprising results in the scientific panorama. In order to shed light on the development of this excipient, patents, the market and future perspectives are addressed. The main objective was to highlight the potential and exponential growth of NC to face new challenges and revolutionize the technological world.

Keywords: Nanocellulose, Toxicity, Tissue Engineering, Wound Dressings, Drug Delivery Systems, Biosensing, Patents, Future Perspectives.

I. Introdução

I.1 Celulose

A celulose de fórmula química $(C_6H_{10}O_5)_n$, em que n é o grau de polimerização, é um excipiente bastante conhecido e pode até ser considerado como o biopolímero mais abundante no nosso planeta. Este excipiente pode ser encontrado na parede de células de determinadas plantas, em alguns animais marinhos podendo, inclusivamente, ser produzido por determinadas bactérias.¹ No que diz respeito às suas características, a celulose é um carboidrato constituído por unidades anidro-D-glucopiranosose de longa cadeia (AGU), que estão ligadas covalentemente entre o grupo equatorial do átomo de carbono 1 e o átomo de carbono 4 (ligação glicosídica $\beta - 1,4$). Para além disso, é importante referir que há três grupos hidroxilo por cada AGU na estrutura química da celulose (com exceção das unidades terminais). Estes grupos hidroxilo interagem uns com os outros através do complexo de ligações de hidrogénio intermoleculares e intramoleculares, formando-se, assim, uma estrutura supramolecular com regiões cristalinas ordenadas. As regiões cristalinas intercalam-se com regiões amorfas organizadas de forma aleatória, contribuindo para que as primeiras se mantenham unidas. A celulose pode ser convertida num elevado número de derivados por funcionalização, conferindo, deste modo, novas aplicações.^{2; 3; 4; 5; 6; 7} Na Figura I, é apresentada a estrutura molecular da celulose.

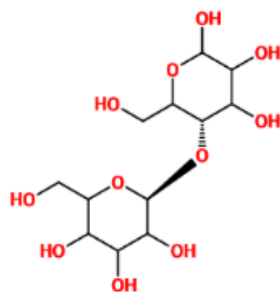


Figura I. Estrutura molecular da celulose.

A celulose é um biopolímero excepcional com características únicas, que tem vindo a ser utilizado a nível da indústria farmacêutica como excipiente em inúmeras aplicações. Neste sentido, a celulose tem sido modificada e otimizada com vista à obtenção de *performances* mais sustentáveis e derivados que cumpram com maior rigor as funções exigidas.^{1; 2; 8; 9; 10; 11}

I.2 Nanocelulose

Com o objetivo de tentar resolver alguns desafios tecnológicos, como por exemplo, a crescente exigência na obtenção e utilização de materiais com propriedades versáteis, baratos, sustentáveis e renováveis, surgiu a nanocelulose (NC) como sendo uma celulose inovadora,¹² sustentável, biodegradável e biocompatível, embora não seja degradada no corpo humano.¹³ Foi descrita pela primeira vez em 1951 por *Bengt Rånby* como «*bundles of cellulose molecules*

forming micelles in aqueous colloidal solutions».^{9; 14} Estes nanomateriais de celulose⁹ apresentam uma das suas dimensões na ordem da escala nano, isto é, no intervalo entre 1 a 100 nm. A NC pode ser utilizada em diferentes aplicações. Tal facto depende não só do processo de obtenção como também da relação entre a estrutura e as propriedades, as quais estão relacionadas com a fonte de onde são obtidas.¹² A NC está disponível em abundância na natureza, podendo ser extraída de plantas (ex. madeira) e animais, por tratamento (químico, mecânico ou enzimático), com vista a removerem-se os resíduos de lenhina e hemicelulose e desconstruir a estrutura hierárquica da celulose. Na verdade, a NC é obtida maioritariamente através de tratamento químico de vários polímeros renováveis.¹² Algumas características únicas deste excipiente são a elevada porosidade, flexibilidade,¹⁵ resistência, rigidez e área de superfície,¹⁶ possuindo uma estrutura cristalina rígida, uma boa absorção e retenção de água.¹³ Evidencia, também, propriedades reológicas e térmicas, com vista à utilização em sistemas de libertação de fármacos ou como hidrogéis. A forma em bastonete, a química de superfície modificável, a estabilidade mecânica extraordinária¹² e a interação favorável com células vivas¹⁷ apresentam-se como outras particularidades. Todas estas características têm cativado a atenção da comunidade científica.^{1; 2; 8; 9; 10; 11; 12; 18; 19; 20}

1.3 Aspetos citotóxicos, imunogénicos e genotóxicos da NC

Em termos globais, consideramos que as aplicações comerciais da NC são seguras e biocompatíveis. A biocompatibilidade da NC depende de vários fatores, como as propriedades estruturais da NC, a concentração aplicada, os modelos de estudo, os tipos de células, o tempo de exposição, a forma, a área de superfície, a carga, a pureza, a fonte do material, o modo de preparação da NC, o grau de aglomeração no meio de cultura, o comprimento das fibras e a contaminação com endotoxinas e glucanos.^{21; 22; 23; 24; 25} Para avaliar o potencial citotóxico, imunogénico e genotóxico são necessários estudos para perceber se existem riscos para a saúde humana após uma exposição prolongada e repetida a materiais à base da NC e perigos derivados da sua relação estrutura-atividade.^{10; 25}

De facto, alguns estudos evidenciaram que existia um potencial tóxico limitado em termos de citotoxicidade da NC.^{26; 27} Nos estudos de ENDES *et al.*^{28; 29} concluiu-se, através da utilização de um tecido epitelial humano, que a NC obtida de algodão e de tunicata não apresentava citotoxicidade quando depositada nas células. Por outro lado, um estudo de MAHMOUD *et al.*³⁰ evidenciou a citotoxicidade da NC em células renais embrionárias humanas. Num estudo mais recente de DELOID *et al.*³¹ avaliaram-se os efeitos toxicológicos da NC ingerida tanto *in vitro* como *in vivo*. Este excipiente ainda não recebeu o estatuto de GRAS, isto é, “*generally recognized as safe*”, o que denota, uma vez mais, a importância destes

estudos para avaliar a sua influência no organismo humano, quando, por exemplo, são utilizados com fármacos em sistemas de libertação. A toxicidade celular *in vitro* foi avaliada através da utilização de um simulador do trato gastrointestinal para digerir os materiais. Posteriormente, utilizou-se um modelo de cultura tripla do epitélio do intestino delgado para avaliar os efeitos da incubação com os materiais digeridos num dia ao nível da integridade da membrana celular, citotoxicidade e stress oxidativo, não se tendo verificado alterações significativas.³¹ Por outro lado, a toxicidade *in vivo* foi avaliada em ratos aos quais foi administrada uma suspensão de NC, duas vezes por semana durante 5 semanas. Foram recolhidas para posterior análise amostras de sangue, de soro, do pulmão, do fígado e do intestino delgado. Não se verificaram diferenças significativas a nível hematológico nem nos marcadores séricos. Em termos histológicos, não se detetaram diferenças entre o controlo e os ratos que receberam NC.³¹ Em suma, estes resultados vão ao encontro de alguns já analisados, em que se pode concluir que a NC é não tóxica ou é minimamente tóxica,³¹ principalmente numa administração única ou em baixas doses de NC.¹⁰

No seguimento desta análise, é também essencial avaliar o potencial de uma resposta pró-inflamatória do sistema celular em estudo quando em contacto com as nanopartículas. Alguns estudos evidenciaram, na sua maioria, não existir uma indução de mediadores de resposta inflamatória como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 8 (IL-8).²⁹ Contudo, outros estudos evidenciaram que a NC pode provocar reações inflamatórias após exposição pulmonar.²⁵ De facto, apesar de já existirem evidências, são necessários mais estudos para averiguar corretamente o risco, mediado por uma resposta imunológica, destes materiais para a saúde humana.¹⁰ Não obstante, é fundamental compreender o potencial genotóxico da NC, isto é, a sua capacidade em danificar ou alterar a informação genética de uma célula. Infelizmente, são ainda poucos os estudos que avaliam o seu potencial genotóxico. Estes são, efetivamente, essenciais quando se procede a modificações ao nível da superfície da NC (funcionalização), pois podem surgir riscos para as células.¹⁰ Num estudo, KOVACS *et al.*³² demonstraram que uma exposição até 2 mg/mL não causou alterações no ácido desoxirribonucleico (ADN) das células. Por outro lado, LIMA *et al.*³³ evidenciaram que a NC mostrou a capacidade de induzir alterações estruturais no ADN e na mitose. Podemos, assim, verificar que alguns estudos revelaram um baixo risco da NC, embora noutros tenham sido obtidos resultados opostos. De facto, podemos reforçar que isto se deve aos diferentes sistemas celulares utilizados, à origem do material, ao tratamento e caracterização, às doses de exposição celular, entre outros fatores. No entanto, os resultados globais permitem inferir que a NC apresenta um risco limitado. Nos estudos em que foram evidenciados riscos associados, verificou-se que uma diminuição nas dimensões da NC minimizaria o risco de

efeitos adversos biológicos. Os dados da exposição aguda relatados sobre a relação estrutura-atividade da NC indicam que estes não representam um risco maior para o ser humano.^{10; 34}

Em suma, são necessárias investigações adicionais, não só para que estas incidam nestes aspetos da NC, para entender melhor os seus efeitos no organismo humano, como também para corroborar evidências já conhecidas e permitir um maior grau de proximidade de resultados em termos de exposição humana, já que estes fatores são a chave para que a utilização deste excipiente seja uma mais valia para uma variedade de aplicações.^{10; 25; 31; 34}

2. Tipos de NC e respetivas características

Atualmente, existem três tipos de NC: a nanocelulose bacteriana (BNC), as nanofibras de celulose (CNFs) ou celulose nanofibrilada (NFC) e os nanocristais de celulose (CNCs) ou celulose nanocristalina (NCC) ou *nanowhiskers* de celulose (CNWs), podendo ser extraídos de bactérias, plantas (por exemplo, madeira) ou de animais (por exemplo, tunicatas), por vários métodos,¹² apresentando dimensões dependentes da fonte de celulose de onde são extraídos (Anexo I).³⁵

2.1 Nanocelulose bacteriana

A BNC é um nanoproduto renovável e em crescimento, devido às suas excelentes características, sendo sintetizada através de fermentação por algumas bactérias, maioritariamente pela *Gluconacetobacter xylinus*, como um polímero, a partir de fontes de carbono de baixo peso molecular, não tendo origem nem animal nem humana.³⁶ A BNC é segregada pelas bactérias como um produto extracelular da fermentação, sendo submetida a posterior lavagem com hidróxido de sódio (NaOH) para a sua obtenção. Este tipo de NC consiste numa rede emaranhada e interconectada de fibras de celulose pura (sem lenhina nem hemicelulose) semelhantes em tamanho às fibras de colagénio, sendo dotada de uma elevada deformabilidade, elasticidade e suavidade, podendo ser alterada consoante a aplicação pretendida.^{13; 37; 38} A sua estrutura tridimensional (3D) nanofibrilada e nanoporosa tem excelentes características como a capacidade de incorporar elevadas quantidades de princípios ativos, facilitando o seu transporte, resultando num elevado rácio área de superfície/volume,³⁶ e um significativo módulo elástico, o que revela uma elevada rigidez. A BNC é mais pura, hidrofílica e flexível, relativamente à celulose proveniente de origem vegetal.¹² Apresenta, também, um efeito barreira eficaz à entrada de microrganismos,^{39; 40; 41} boa estabilidade térmica, elevado teor em humidade (90%) e um elevado grau de polimerização.¹² Para além disso, forma hidrogéis estáveis podendo conter até 99% de água, permitindo a manutenção de um ambiente húmido uma vez aplicada em feridas, possui um efeito refrescante e uma capacidade de absorção de exsudatos durante a fase inflamatória, apresentando também uma boa retenção

e elevada capacidade de ligação e absorção de água.^{39; 40; 41} Neste sentido, possui ainda uma boa hemocompatibilidade,⁴² uma elevada cristalinidade e ótimas propriedades para a preparação de *scaffolds*.^{11; 43} Além disso, este tipo de NC apresenta-se como o mais vantajoso para aplicação em biossensores.¹⁸ Apresenta como contrapartidas um elevado tempo de extração e a necessidade de existência de ambientes altamente esterilizados para o cultivo e colheita das bactérias.^{1; 2; 8; 9; 10; 11; 44; 45}

2.2 Celulose nanocristalina

Relativamente à NCC, esta apresenta uma estrutura nanocristalina com partículas em formato “rod-like”,¹ com regiões predominantemente cristalinas. Segundo alguns estudos, como o de THOMAS *et al.*⁸, a NCC também pode ser descrita como microcristais de celulose (MCC) do tipo “rod-like”. A NCC pode apresentar-se como pequenos segmentos cristalinos que se encontram na NFC, ou seja, a NCC pode obter-se a partir da NFC, removendo apenas as partes amorfas que conectam estes segmentos cristalinos na sua estrutura. Contudo, este método não é o mais utilizado pela comunidade científica para a sua obtenção. Deste modo, a NCC proveniente desta fonte apresenta um tamanho inferior em relação à NFC.^{46; 47} Por outro lado, a NCC também se pode obter através de plantas e animais, sendo considerada barata, proveniente de recursos sustentáveis, muito abundante na natureza e ambientalmente vantajosa.⁴⁸ O método mais comum para a obtenção de NCC a partir da celulose é a hidrólise com ácido forte (ácido clorídrico, sulfúrico ou fosfórico), que permite a dissolução das partes amorfas intrínsecas, mantendo apenas os domínios cristalinos. A NCC, para além de possuir uma estrutura cristalina intrinsecamente forte,⁴⁸ apresenta também propriedades como biocompatibilidade e biodegradabilidade,¹⁸ ótimas para, por exemplo, proporcionar um ambiente ideal para o crescimento celular e desenvolvimento de tecidos.⁴⁹ Apresenta também uma boa hidrofiliabilidade⁵⁰ e porosidade, baixa densidade,^{51; 52} vasta área de superfície,¹⁸ elevada estabilidade, resistência mecânica e rigidez⁴⁸ e excelentes propriedades óticas.⁸ Curiosamente, é capaz de mimetizar a estrutura das fibras de colagénio do osso.⁵² Contém um elevado número de grupos hidroxilo que podem ser modificados para inúmeras funcionalidades⁵³ e apresenta-se carregada negativamente, o que a torna ótima para uma ligação de elevadas quantidades de fármacos à sua superfície.⁴⁸ Contudo, possui uma flexibilidade limitada, porque não tem as regiões amorfas.^{1; 2; 8; 9; 10; 11}

2.3 Celulose nanofibrilada

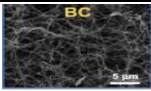
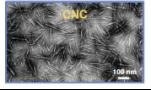
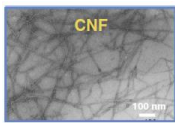
No que diz respeito à NFC, esta caracteriza-se por fibras individuais e nanofibras acumuladas⁵⁴ com regiões amorfas e cristalinas uniformes, provenientes de plantas e algas, podendo ser extraídas por tratamento químico, mecânico ou enzimático. A única diferença

entre a celulose microfibrilada (MFC) e a NFC é em relação ao diâmetro, uma vez que na primeira este se apresenta na escala micro e na NFC na escala nano.¹² A extração obtida a partir da madeira é realizada por oxidação mediada por hipoclorito de sódio com quantidades catalíticas de bromato de sódio e do radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO), sendo este um dos pré-tratamentos mais utilizados.⁵⁵ Este pré-tratamento ocorre numa região específica, oxidando o C6 da molécula de glucose em grupos carboxilo. Esta oxidação facilita a obtenção de nanofibras estruturalmente homogêneas e individualizadas.⁵⁵ Como características, apresentam um elevado número de grupos hidroxilo à superfície,⁵⁶ possuem um baixo peso, são biocompatíveis e biodegradáveis. Apresentam, ainda, uma boa porosidade e sustentabilidade,⁵⁷ um bom rendimento, favorável efeito barreira⁵⁸ e adequadas propriedades físico-químicas e reológicas.⁵⁸ A NFC caracteriza-se igualmente por uma rede emaranhada de fibras flexíveis e longas com elevada capacidade para captação de água,⁵⁸ o que lhes confere características semelhantes a géis, quando em água (hidrogéis), apresentando uma elevada área de superfície específica e natureza hidrofílica,^{55; 59} o que possibilita a interação com fármacos pouco solúveis.^{47; 58} Para além disso, podem atuar como estabilizadores de emulsões.⁴⁷ Através da modificação das propriedades físico-químicas e da via de síntese, podemos obter várias formas de NFC, como filmes, aerogéis, hidrogéis e suspensões de gel.⁶⁰ Os filmes de NFC são translúcidos, apresentam uma baixa porosidade^{61; 62} e são resistentes, permitindo uma boa absorção de líquidos e monitorização de exsudatos.^{1; 2; 8; 9; 10; 11; 55; 59; 63}

2.4 Dimensões dos três tipos de NC

Dado não existir um consenso na comunidade científica quanto aos intervalos de tamanho dos vários tipos de NC, a Tabela I, adaptada de THOMAS *et al.*⁸, mostra um padrão de intervalos de dimensões deste excipiente. Além disso, nesta tabela, é ilustrada uma morfologia convencional para os três tipos de NC através de imagens obtidas por microscopia eletrónica, adaptada de ABITBOL *et al.*⁶⁴

Tabela I. Padrão de intervalos de tamanho e morfologia convencional da NC, juntamente com outras particularidades.^{8; 64}

Tipo de nanocelulose	Fontes mais comuns	Processo de Obtenção	Tamanho médio	Morfologia convencional
BNC	Álcoois e açúcares de baixo peso molecular	Síntese bacteriana	Comprimento: alguns µm; Diâmetro: 20-100 nm	
NCC	Algodão, madeira, linho, arroz, tunicina, trigo, Avicel [®] , e algas	Hidrólise ácida	Comprimento: alguns µm; Diâmetro: 5-60 nm	
NFC	Madeira, batata, linho, cânhamo e beterraba	Tratamento químico, mecânico e enzimático	Comprimento: 100-250 nm (obtidos das plantas) e 100 nm a alguns µm para as restantes fontes; Diâmetro: 5-70 nm	

3. Aplicações biomédicas e em tecnologia farmacêutica

Nos últimos anos, os vários tipos de NC têm vindo a ser utilizados em inúmeras aplicações (Anexo 2), destacando-se, neste trabalho, as aplicações biomédicas e na tecnologia farmacêutica (Anexo 3). Para além das características já apresentadas anteriormente, os três tipos de NC podem ser modificados química e estruturalmente para as aplicações pretendidas, o que, uma vez mais, realça o seu interesse e curiosidade.^{1; 2; 8; 9; 10; 11; 12; 18; 35; 65} Posto isto, este trabalho prossegue com a exploração das aplicações em que este excipiente foi estudado, tais como sistemas de libertação de fármacos, *scaffolds* para a engenharia de tecidos, implantes médicos, agentes antimicrobianos, biossensores, enxertos vasculares, apósitos para queimaduras e cicatrização de feridas, entre muitos outros.^{12; 39} Estas aplicações, juntamente com alguns exemplos, serão abordadas ao longo das próximas secções.

3.1 Aplicação na engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos surge como uma técnica eficiente ao nível da reparação, melhoria ou substituição de tecidos e órgãos danificados. Consiste no isolamento e inoculação de células específicas em *scaffolds*, construindo substitutos funcionais.^{11; 18; 66; 67; 68; 69; 70; 71; 72} O objetivo principal de um *scaffold* é fornecer uma base 3D para direcionar a fixação, proliferação e diferenciação celulares, com promoção da formação de tecidos.^{73; 74} Para isso, estes têm que se apresentar como biocompatíveis, com porosidade controlável, versatilidade 3D, capacidade de aderência às superfícies e capacidade em mimetizar a matriz extracelular natural (ECM), um componente essencial do tecido nativo, o que permite obter transportadores temporários para a diferenciação, proliferação e crescimento celular.^{11; 66; 67; 68; 69; 70; 71} A arquitetura dos *scaffolds* é uma das componentes principais da resposta biológica que determina o sucesso da reconstrução do tecido.⁴⁹ Alguns exemplos são a pele, vasos sanguíneos, músculos, discos intervertebrais, ossos e ligamentos.

Assim, tendo em consideração as características da NC previamente abordadas, mais concretamente a elevada área de superfície (permite a fixação de células), modificações na superfície (favorece a aderência celular) e a elevada porosidade (que permite a infiltração de células e difusão de nutrientes), este excipiente assume uma importância redobrada na obtenção de *scaffolds*.⁷³ A Tabela 4-1-A apresenta uma lista de aplicações deste excipiente na engenharia de tecidos. Nesta secção do trabalho, serão abordados os estudos de AHREM et al.⁷⁵, NIMESKERN et al.¹³, LAM et al.⁴⁹, ABOUZEID et al.⁵⁷ e MATHEW et al.⁷⁶, para uma melhor compreensão das vantagens deste material na engenharia de tecidos.

3.1.1 Obtenção de hidrogéis de BNC para implantes de cartilagem

Num estudo de AHREM *et al.*⁷⁵ foram exploradas as favoráveis propriedades da BNC para a sua utilização como um possível implante de cartilagem. Para tal, foram produzidas BNC em meio enriquecido com glucose em condições aeróbias, partindo da *Gluconabacter xyliuns* para a sua síntese. A bactéria sintetizou um hidrogel de superfície plana muito cristalino, composto por uma rede nanofibrilada 3D. As nanofibras da BNC mostraram ser comparáveis às das matrizes de colagénio. Estes fatores favorecem a aderência e previnem a re-diferenciação de células do tecido conjuntivo, como é o caso dos condrócitos.^{75; 77} Contudo, estes hidrogéis apresentaram poros com tamanhos diferentes, com a superfície superior a exibir poros de tamanho inferior aos da superfície inferior. Ora, esta heterogeneidade dos poros limita o crescimento das células e a sua utilização como implantes para a engenharia de tecidos.^{75; 78; 79} De modo a tentar ultrapassar esta limitação, procedeu-se a uma perfuração a laser unidirecional e a uma perfuração a laser 3D nos hidrogéis, após a sua produção. Posto isto, efetuaram-se testes com o intuito de observar as vantagens destas duas modificações em relação à BNC sem modificações. Assim, a modificação com perfuração a laser unidirecional levou à obtenção de canais redondos com diâmetro aproximado de 220 µm (ótimo para cultura de células e proliferação). As superfícies externas apresentaram uma rede com fibras agregadas e uma nova estrutura porosa.⁷⁵

A cultura de condrócitos articulares bovinos durante 24 h em BNC com esta modificação originou uma colonização de células com morfologia redonda na superfície da BNC e nas novas paredes, formadas pelos canais gerados por laser, o que demonstra uma boa biocompatibilidade. De seguida, procedeu-se à cultura de condrócitos articulares humanos nesta BNC, entre 7 a 21 dias, tendo-se detetado células viáveis na superfície dos canais que foram gerados por laser. No último dia do estudo, os condrócitos formaram uma multicamada densa na superfície da BNC e geraram uma matriz extracelular com proteoglicanos. Além disso, evidenciaram uma re-diferenciação com o tempo, o que indica uma indução ou preservação do fenótipo, ideal para uma aplicação *in vivo* como substituto da cartilagem. Contudo, era necessário estabilizar a interconectividade entre os canais na BNC para permitir o crescimento interno 3D e o movimento das células em toda a BNC. Para isso, realizou-se uma perfusão 3D com obtenção de uma orientação ortogonal das amostras. Com esta modificação, obtiveram-se resultados semelhantes aos já referidos com a modificação anterior e nenhuma influenciou negativamente o módulo elástico da BNC.⁷⁵

Em suma, podemos perceber que existiu uma melhoria em termos de aplicabilidade da BNC ao nível da engenharia de tecidos. O crescimento de condrócitos e a sua movimentação pela matriz assegurados pelas modificações a laser permitiram que os hidrogéis

proporcionassem uma menor distância de difusão de nutrientes e componentes segregados na matriz extracelular e uma reparação da cartilagem *in vivo* por transplante de condrócitos associados à matriz, qualificando assim a BNC para a obtenção de *scaffolds*, que permitam o crescimento celular e remodelação da cartilagem articular.⁷⁵

3.1.2 Síntese de *scaffolds* à base de BNC para implantes de substituição da cartilagem auricular

Em NIMESKERN *et al.*¹³, foram avaliadas as propriedades da BNC com o intuito de desenvolver *scaffolds* à base deste excipiente para a engenharia de tecidos. Após a realização de alguns estudos, percebeu-se que o *scaffold* evidenciou um comportamento viscoelástico semelhante ao da cartilagem humana, para além das propriedades mecânicas a nível da compressão terem mostrado ser ajustáveis e correlacionadas com o conteúdo em celulose. Para além disso, de modo a permitir a penetração e proliferação dos condrócitos em todo o material, bem como aumentar a formação de ECM, pôde-se aumentar o número de poros nos *scaffolds* de BNC.¹³

Por outro lado, é também essencial existir um controlo da forma externa para obter resultados satisfatórios do ponto de vista estético. Para isso, realizou-se um biofabrico, onde se utilizou um molde para orientar a bactéria para reproduzir as características do tecido de interesse em larga escala. Através de dados de imagiologia por ressonância magnética (MRI) de doentes específicos, obteve-se um protótipo que mimetizou a forma da cartilagem auricular pretendida ao invés da orelha toda. De facto, a BNC assume-se como um excelente candidato para implantes de cartilagem auricular.¹³

3.1.3 Síntese de *scaffolds* de CNCs e acetato de polivinilo

Num estudo de LAM *et al.*⁴⁹, obtiveram-se CNCs a partir de bagaço da cana-de-açúcar, tendo sido incorporados com acetato de polivinilo (PVA) com o objetivo de produzir *scaffolds* para a engenharia de tecidos, com avaliação da resposta de células cutâneas humanas a este *scaffold in vitro*. Para isso, prepararam-se nanocompósitos com matriz de PVA, incorporados com concentrações crescentes de CNCs. De seguida, efetuaram-se estudos para avaliar a morfologia dos *scaffolds* obtidos. Com a introdução de CNCs na matriz de PVA, obteve-se uma estrutura muito porosa com um aumento do tamanho dos poros, principalmente quando se prepararam nanocompósitos com concentrações mais elevadas em CNCs.⁴⁹

Noutro sentido, determinaram-se as alterações nas características da estrutura cristalina do PVA com a incorporação de CNCs. A análise de padrões de difração de raios X (XRD) permitiu observar uma notória diminuição da cristalinidade em comparação com o PVA puro. Para concentrações mais elevadas, a agregação dos CNCs pode ter sido um fator

que desencadeou a perda de cristalinidade. Para além disso, o estabelecimento de interações, entre CNCs, água e PVA levou à destruição da rede polimérica. Procedeu-se, ainda, à avaliação do comportamento térmico, em que os termogramas dos nanocompósitos apresentaram o mesmo padrão dos do PVA puro. No que diz respeito à capacidade de intumescimento, avaliou-se este parâmetro a 37°C em tampão fosfato salino (PBS) a pH de 7,4. Tanto o PVA como os CNCs são polímeros hidrofílicos que estabelecem rapidamente ligações de hidrogénio com a água, o que leva à absorção de mais moléculas de água. O grau de intumescimento foi superior com o aumento do conteúdo em CNCs no nanocompósito, devido a um elevado número de grupos hidroxilo.⁴⁹

Não obstante, avaliaram-se as propriedades mecânicas. Com o aumento do conteúdo em CNCs, obteve-se uma maior resistência à compressão. O módulo elástico também aumentou à medida que se elevava a concentração em CNCs. De facto, a combinação com CNCs leva a um aumento da resistência e da rigidez dos *scaffolds*. O comportamento mecânico dos nanocompósitos de PVA/CNCs mostrou a capacidade que estes possuem em se deformar para difundir e resistir ao crescimento dos tecidos. Após isto, avaliou-se a viabilidade celular nos nanocompósitos com concentração mais elevada em CNCs, através de uma linha celular de fibroblastos L929, após incubação durante 24 h. A viabilidade celular foi superior a 70%, não se tendo verificado um potencial citotóxico dos materiais. Por fim, averiguou-se a biocompatibilidade com fibroblastos da pele humana (CRL-2522). Deste modo, os nanocompósitos foram colocados em contacto direto com CRL-2522. Após 7 dias, verificou-se que o crescimento e a morfologia das células se mantiveram constantes, multiplicaram-se, espalharam-se e preencheram toda a superfície do material, tendo-se verificado uma boa aderência e penetração entre as células e o *scaffold*. Além disso, o nanocompósito com concentração mais elevada em CNCs demonstrou uma morfologia uniforme e porosa e uma capacidade em suportar, em termos estruturais, o crescimento celular. Obteve-se, assim, um nanocompósito sem toxicidade e totalmente biocompatível para a regeneração de fibroblastos de células cutâneas humanas.⁴⁹

3.1.4 Produção de *scaffolds* de CNFs com alginato de sódio

Noutro estudo, o de ABOUZEID *et al.*⁵⁷, desenvolveram-se *scaffolds* porosos por impressão 3D para a substituição do tecido duro danificado e reparação de defeitos ósseos, através de um hidrogel obtido pela reticulação parcial com iões cálcio de CNFs com alginato de sódio (SA). O hidrogel de CNFs/SA foi preparado através da reticulação parcial com cloreto de cálcio (CaCl₂) para facilitar a impressão 3D de modo a manter a forma do *scaffold*. Após a sua impressão, realizou-se a reticulação completa com CaCl₂ para assegurar a rigidez do

hidrogel. Por outro lado, estudou-se a mineralização biomimética de hidroxiapatite (HAp) numa solução com fluido corporal simulado (SBF), como o efeito obtido através da combinação de CNFs e SA, pois as CNFs contêm grupos carboxilo que desempenham um papel importante na nucleação da HAp. Assim, prepararam-se cinco formulações de pasta para impressão com CNFs e SA puros ou com concentrações variáveis de ambos.

Ao longo deste estudo realizaram-se vários ensaios com o objetivo de analisar o composto formado. A nível da sua morfologia, os hidrogéis de CNFs/SA exibiram uma boa compatibilidade e interação sem separação de fases. De seguida, avaliaram-se as propriedades tixotrópicas do hidrogel e o tempo de recuperação após a aplicação de uma velocidade de corte constante (*steady shear rate*). O objetivo pretendido era a obtenção de hidrogéis altamente tixotrópicos, isto é, com uma viscosidade que diminuísse após a aplicação de uma tensão de corte, mas que recuperasse o mais rapidamente possível após remoção da tensão, obtendo assim hidrogéis com maior reprodutibilidade do objeto digital e com melhor capacidade de impressão. O hidrogel com 50%CNFs/50%SA apresentou os melhores valores.⁵⁷

Posteriormente, avaliaram-se as propriedades reológicas do hidrogel como, por exemplo, a viscosidade. Os valores desta propriedade mantiveram-se constantes por longos períodos em que se aplicou uma velocidade de corte constante. Para além disso, analisaram-se as propriedades mecânicas dos *scaffolds* impressos, como a resistência à compressão. Para este parâmetro, os *scaffolds* de CNFs/SA apresentaram uma boa resistência mecânica. Em relação ao módulo elástico (reflete a rigidez do *scaffold*), foram obtidos valores mais favoráveis para um maior conteúdo em SA, tornando assim os *scaffolds* mais rígidos. Além disto, após sofrer uma deformação, os *scaffolds* evidenciaram uma boa rigidez. De seguida, avaliou-se a mineralização biomimética da HAp por imersão em SBF durante 14 dias e a materialização da HAp foi confirmada através de várias técnicas de caracterização. A quantidade aproximada de HAp nos *scaffolds* mineralizados foi estimada em 20,1%. No geral, pode-se concluir que os *scaffolds* de CNFs/SA mineralizados com impressão 3D são um material promissor para a aplicação ao nível da engenharia de tecidos ósseos.⁵⁷

3.1.5 Produção de *scaffolds* através de nanocompósitos de CNFs

No estudo de MATHEW *et al.*⁷⁶, utilizaram-se CNFs para a obtenção de nanocompósitos fibrosos por dissolução parcial a 90 minutos (NF90) e a 120 minutos (NF120) com o objetivo de desenvolver ligamentos e tendões artificiais com propriedades mecânicas semelhantes ou até melhores em relação às apresentadas pelos tendões e ligamentos naturais.

Posteriormente, avaliou-se a captação de água com o objetivo de compreender o comportamento de absorção em condições húmidas e a mudança das dimensões dos

nanocompósitos no corpo, pois estas características são fundamentais para os implantes. De facto, a captação de água foi instantânea e elevada durante os primeiros minutos e o tamanho das amostras apenas variou entre 5% a 10% após a exposição em meio com água. Pode-se concluir que entre os dois nanocompósitos, o NF90 permitiu a melhor estabilidade dimensional em condições húmidas.⁷⁶

Por outro lado, para avaliar as propriedades mecânicas dos materiais para poderem ser utilizados como substitutos de tendões e ligamentos, efetuaram-se estudos antes e depois da esterilização em condições secas e húmidas. As amostras esterilizadas evidenciaram valores de resistência e deformação incluídas no intervalo de valores necessário para a aplicação pretendida. Em termos gerais, a avaliação das propriedades mecânicas indicou que o nanocompósito NF90 apresentou uma melhor *performance*, tendo prosseguido para os estudos em células para evidenciar a sua aplicabilidade para a finalidade pretendida.⁷⁶

Em relação à citocompatibilidade, avaliou-se em primeiro lugar a citotoxicidade, com a utilização de células de fibroblastos balb3T3. Quando em contacto com o nanocompósito NF90 não se verificou citotoxicidade, tendo-se obtido uma monocamada de células, o que comprova a viabilidade celular do material. De seguida, utilizaram-se fibroblastos para ligamentos humanos (HLC) e células endoteliais vasculares humanas (HEC) neste mesmo nanocompósito, com a obtenção de uma aderência e proliferação celular desejadas. Por fim, avaliou-se a expressão de RNA mensageiro (mRNA) extraído de HLC e HEC ao 1.º e 3.º dias. Para HLC, ocorreu a expressão de mRNA de colagénio tipo I, no colagénio sintetizado. Para além disso, também ocorreu a expressão de recetores da membrana citoplasmática. A expressão destes genes confirma os resultados obtidos para a aderência de HLC no nanocompósito NF90. Em relação a HEC, foi expresso o CD31 mRNA, que é um marcador de superfície típico de células endoteliais vasculares. Tal indicou que este nanocompósito permite a aderência e o crescimento endotelial, mas também a angiogénese, promovendo a difusão de nutrientes para a expressão do fenótipo de HLC, especialmente para a síntese de colagénio.⁷⁶

Concluindo, os nanocompósitos fibrosos obtidos por dissolução parcial demonstraram ser úteis para aplicações biomédicas, em face das propriedades avaliadas anteriormente. De facto, estes materiais evidenciaram ser promissores para a reparação de ligamentos através da angiogénese e síntese de colagénio.⁷⁶

3.2 Aplicação na cicatrização de feridas

Um material para a cicatrização de uma ferida tem de reunir algumas características fundamentais, das quais se destacam as propriedades antimicrobianas, a capacidade em manter a superfície da pele húmida e absorver exsudatos e toxinas, a facilidade de uma rápida cicatrização e o facto de não lesar a pele curada após remoção, bem como a possibilidade de não ser nem tóxico nem alergénico nem promover a inflamação.^{18; 80} Para uma visão alargada, são apresentados na Tabela 4-2-A, alguns exemplos, nos quais se estudaram os vários tipos de NC para esta aplicação. Neste capítulo, serão abordados de forma detalhada os estudos de ATAIDE *et al.*³⁹, TAHER *et al.*⁸¹, NAPAVICHAYANUN *et al.*⁴⁰, SHEFA *et al.*⁸² e BERNDT *et al.*⁴¹

3.2.1 Atividade antimicrobiana da bromelaína em membranas de BNC

Neste trabalho, estudou-se o possível desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de bromelaína, uma enzima proteolítica com propriedades anti-inflamatórias que facilita a renovação dos tecidos e acelera o processo de cicatrização da pele ulcerada, incorporada nas membranas da BNC para a cicatrização de feridas. Para avaliar a atividade antimicrobiana da bromelaína, estudou-se a concentração proteica, a atividade enzimática e a especificidade de três soluções (i- solução inicial de bromelaína; ii- solução residual de bromelaína; e iii- solução de bromelaína, após esta ser libertada da BNC), quando se atingiu a concentração mínima inibitória (CMI). Nestas, foi notório que a solução ii apresentou um decréscimo nos três parâmetros, quando comparada com a solução i, indicando que a membrana da BNC foi capaz de absorver 7,94 mg/mL de proteínas, o que representa 31% da concentração total de proteínas na solução inicial. A especificidade da bromelaína foi três vezes maior na solução iii, em relação à solução i, o que se deveu ao facto da membrana de BNC absorver seletivamente componentes de baixo peso molecular da bromelaína com uma maior atividade enzimática. Com os resultados obtidos em relação à CMI para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, podemos concluir que a atividade antimicrobiana da bromelaína tem uma relação com a atividade enzimática e que para se atingir a CMI na solução iii foi necessária uma menor concentração proteica com uma maior atividade enzimática, devido à sua elevada especificidade. Além disso, as membranas de BNC com bromelaína apresentaram atividade antimicrobiana para as três espécies em agar, ao contrário das membranas de BNC sem bromelaína. Finalmente, estudou-se também a mucoadesividade, propriedade que diminuiu com a associação entre a bromelaína e as membranas da BNC, pois esta estabelece-se através de ligações de H entre os grupos hidroxilo da BNC e os grupos amina da bromelaína. Com a diminuição de grupos hidroxilo livres, obteve-se uma diminuição

das interações entre a BNC e a mucina, tendo sido possível verificar que a atividade antimicrobiana da bromelaína se intensificou com esta associação.³⁹

Estes resultados permitem concluir que este sistema pode ser utilizado para a libertação controlada e prolongada da bromelaína, o que diminui a formação de biofilmes, minimiza o tempo de cicatrização, diminui o risco de infecção e promove o conforto e alívio da dor.³⁹

3.2.2 Apósito de CNCs com mel e polivinil pirrolidona

Num estudo realizado por TAHER *et al.*⁸¹, avaliou-se a possibilidade de se utilizar a NC como sistema de libertação de mel (usado no tratamento de feridas) para a formação de um apósito. Para isso, procedeu-se à síntese de CNCs a partir de algodão com posterior desenvolvimento de um filme de NC revestido com mel, utilizando polivinil pirrolidona (PVP) como agente ligante. Tanto o mel como o PVP tornaram o filme maleável e flexível, características ideais para um uso prolongado e eficaz. O filme obtido era uniforme, um pouco opaco e amarelado, tendo sido avaliado quanto à cinética de libertação do mel e eficácia antimicrobiana.

Os estudos cinéticos realizaram-se durante 72 h e tiveram como objetivo avaliar a cinética de libertação do mel a partir do filme. Inicialmente, verificou-se um aumento na libertação de mel até às 12 h, com tendência a atingir-se um *plateau* em 48 h, com uma posterior libertação constante de mel durante as restantes 24 h. Este estado estacionário implicou uma mudança de apósito, pois já não existiria mais libertação de mel como princípio ativo após as 48 h. Para além disso, avaliou-se a atividade antimicrobiana do filme contra bactérias Gram⁺ e Gram⁻, normalmente associadas a infeções no local das feridas, tendo sido utilizado o filme de NC sem mel como controlo negativo, que, por si só, não inibiu nenhum dos seis microorganismos testados. Por outro lado, o filme revestido com mel inibiu três dos seis microorganismos, o que permitiu concluir que, neste caso, o mel foi libertado para o meio envolvente, inibindo o crescimento microbiano. Deste modo, a cinética de libertação e as propriedades antimicrobianas parecem sugerir que este filme poderá ser uma alternativa para o desenvolvimento de apósitos em oposição à toxicidade e sensação alérgica dos sintéticos.⁸¹

3.2.3 Apósito de BNC com polihexanida e sericina

Num outro estudo, realizado por NAPAVICHAYANUN *et al.*⁴⁰ avaliou-se a eficácia, a segurança e a aplicabilidade de um apósito de BNC para feridas com polihexanida (PHMB) como agente antimicrobiano, juntamente com sericina como componente de aceleração da cicatrização. A PHMB apresenta um largo espectro de ação contra bactérias Gram⁺ e Gram⁻, tendo baixa toxicidade. A sericina é um antioxidante que favorece a bioadesão, ativação da

proliferação de células e promove a epitelização e produção de colagénio. Neste apósito, incorporou-se a sericina em primeiro lugar, de modo a evitar impactos negativos.⁴⁰

No que respeita a estudos *in vitro*, cultivaram-se fibroblastos L929 em diluições da solução extraída do meio do apósito em estudo (A), em comparação com um apósito já disponível no mercado (B) e com dois controlos. O número de células viáveis, quando cultivadas na solução extraída do apósito A, foi comparável em todas as diluições com o apósito B, indicando que o apósito testado não foi tóxico para as células. Quanto à migração celular, através de uma lesão na pele, pode-se perceber que, para o apósito A, a percentagem de células na solução que migrou foi a esperada, o que foi atribuído à ação da sericina.⁴⁰

Ao nível dos estudos *in vivo*, inseriu-se o apósito por implantação subcutânea nos ratos para avaliar a segurança e a eficácia na cicatrização. No apósito A verificou-se uma resposta inflamatória baixa, isto é, uma baixa percentagem de desgranulação dos mastócitos. Seguidamente, as amostras dos ratos foram incubadas após tratamento com anticorpo monoclonal anti FOXP3⁺ de rato para avaliação de reações alérgicas. Concluiu-se que houve menos reações alérgicas no apósito em estudo, devido à PHMB, o que diminui o risco de infeção (menor número de bactérias na ferida) e a reação inflamatória durante a implantação do apósito. Além disso, avaliou-se a eficácia de cicatrização. Após 21 dias de aplicação com o apósito A, a ferida cicatrizou, o que não se verificou no apósito B. A síntese de colagénio após 14 dias foi muito mais elevada para o apósito A relativamente ao apósito B, o que indicou uma elevada eficácia da sericina nesta formulação. Nos ensaios clínicos, os valores de eritema e melanina foram os esperados e não se verificaram edemas, pápulas, vesículas ou bolhas na pele, mostrando ser seguro e não irritante.⁴⁰

Assim, foi possível concluir que este apósito se apresenta como um material seguro e eficaz para uma aplicação clínica na cicatrização de feridas.⁴⁰

3.2.4 Scaffold à base de CNFs com fibroína de seda

Em SHEFA *et al.*⁸², prepararam-se *scaffolds* à base de CNFs obtidas por TEMPO com fibroína de seda (uma proteína), através de liofilização para aplicação como apósitos para feridas.

Em primeiro lugar, avaliou-se a capacidade dos *scaffolds* em absorver exsudatos. Para isso, monitorizou-se a capacidade de intumescimento dos *scaffolds* com PBS. Após 48 h, estes intumesceram e com a adição da proteína em concentrações de 2% e 5%, esta propriedade intensificou-se. Isto aliado ao facto de que a 5% de fibroína de seda os poros apresentavam um menor diâmetro (favorável para a aplicação pretendida), permitiu concluir que os *scaffolds*

preparados com estas duas concentrações eram os mais apropriados para apósitos, dado terem obtido a máxima captação de PBS.⁸²

Posteriormente, avaliou-se a citotoxicidade através de células L929, tendo-se utilizado como controlo uma placa de cultura de tecidos (TCP). Em todos os *scaffolds*, verificou-se um aumento tempo-dependente do número de células L929. Contudo, a viabilidade e a proliferação celular foram superiores em *scaffolds* com uma concentração mais elevada em fibroína de seda.⁸²

Além disso, realizaram-se também estudos *in vivo* em ratos para analisar o processo de cicatrização, tendo-se avaliado três proteínas: o colagénio, a fibronectina e a CD31. A ação da fibroína de seda levou a um aumento da expressão da fibronectina até ao 7.º dia, com posterior diminuição (fim da fase inflamatória) e de colagénio (a sua deposição evidencia a cicatrização de uma ferida) até ao 14.º dia, o que comprova que a proteína acelera o processo de cicatrização. A avaliação da CD31 ao 7.º e 14.º dias serviu para averiguar o fornecimento de sangue como fator de cicatrização. Os valores da proteína foram mais elevados para o composto a 2%, ou seja, uma menor concentração em fibroína de seda levou a uma melhor angiogénese. Deste modo, os *scaffolds* de CNFs preparados com 2% em proteína mostraram ser o melhor material para a utilização como apósito de feridas, evidenciando uma absorção de exsudatos, uma cicatrização tempo-dependente e uma biocompatibilidade favoráveis.⁸²

3.2.5 Compostos híbridos de BNC com nanopartículas de prata

Noutro estudo, BERNDT *et al.*⁴¹, prepararam híbridos por modificação química, que consistiam em BNC, juntamente com nanopartículas de prata (AgNPs), para exercer um efeito antimicrobiano. Os híbridos apresentaram uma coloração cinzenta com a existência de nanopartículas firmemente imobilizadas nas superfícies superior e inferior com agregações. Foi possível ajustar o conteúdo de AgNPs através da variação da concentração de nitrato de prata (AgNO₃) ou do tempo de reação da BNC na solução de AgNO₃. Os híbridos formados com concentrações mais baixas em AgNO₃ apresentaram aglomerados finos e distribuídos de forma homogénea em comparação com os híbridos preparados com concentrações mais elevadas. Além disso, o carácter de hidrogel da BNC pôde levar a um aumento do crescimento das AgNPs.

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos híbridos, cultivou-se *Escherichia coli* em placas de agar, tendo-se avaliado o número de unidades formadoras de colónias (CFU). Utilizaram-se os híbridos preparados a uma concentração de 5,0x10⁻³ mol/L, tendo a BNC pura sido usada como referência. Nos híbridos, não houve formação de CFU, nem na superfície superior nem na inferior, o que indicou ter ocorrido uma inativação de todas as bactérias,

tendo-se obtido uma elevada atividade antimicrobiana com uma baixa concentração de AgNO₃. A inibição foi semelhante em ambas as superfícies, o que corrobora a uniformização na distribuição das AgNPs nas amostras. Os resultados na difusão em agar permitiram concluir que as AgNPs apenas atuam como agente antimicrobiano, quando em contacto direto com as bactérias, sem libertação de iões de prata na ferida, o que é uma vantagem, pois esta libertação poderia originar resistência. Por fim, a combinação das propriedades únicas da BNC para o tratamento de feridas e as propriedades antimicrobianas das AgNPs levou à formação de um híbrido com bastante interesse para apósitos de feridas.⁴¹

3.3 Aplicação em sistemas de libertação de fármacos

A forma de administração de fármacos desempenha um papel crucial no seu fornecimento constante no local terapêutico desejado. Um sistema de libertação de fármacos tem de ser estável por determinados períodos de tempo, não se deixar afetar pelas alterações de pH, força iónica e temperatura, para permitir que os agentes terapêuticos atinjam os seus alvos terapêuticos, sejam estes órgãos, tecidos ou a própria pele. Vários estudos têm sido conduzidos para avaliar o papel da NC na qualidade de sistema de administração com o objetivo de melhorar a farmacocinética e otimizar a biodistribuição do fármaco, tendo revelado ser um transportador de excelência para a administração de fármacos pela via oral, transdérmica e local.^{9; 18; 83}

Por estes motivos, a Tabela 4-3-A reúne alguns exemplos de estudos que comprovaram a eficácia dos vários tipos de NC para esta aplicação. Nesta secção serão abordados alguns desses, com destaque para os estudos de NING *et al.*⁵⁰, AKHLAGHI *et al.*⁵³, KOLAKOVIC *et al.*⁵⁶ e SAIDI *et al.*⁸⁴

3.3.1 Hidrogel de CNCs com paclitaxel para a terapia contra o cancro

No estudo de NING *et al.*⁵⁰ é referido o desenvolvimento de um hidrogel de CNCs sensível ao pH com o objetivo de ultrapassar a baixa solubilidade em água do paclitaxel (PTX) e proporcionar uma libertação controlada e direcionada do mesmo na terapia contra o cancro. Para isto, formou-se uma rede com uma grande área solvofóbica, construída com NCC oxidada e hexadecilamina (HDA) capaz de reter o fármaco.

Posteriormente, procederam-se a várias análises do composto formado, como a capacidade de intumescimento (13,7%) e a eficiência de encapsulação (58,7%) do fármaco. Através da calorimetria diferencial de varrimento (DSC) foi notório que ocorreu uma mudança na morfologia do PTX quando incorporado no hidrogel.⁵⁰

No que diz respeito à libertação *in vitro* do PTX, a sua concentração a pH 5,5 aumentou durante as primeiras 10 h, tendo apresentado um incremento mais lento nas horas seguintes.

Já a pH 7,4, não se verificou uma libertação de PTX devido à estabilidade do hidrogel no ambiente fisiológico humano. Por fim, a pH 6,8, a libertação foi intermédia em relação aos restantes pH. Estes resultados sugerem que a estrutura do hidrogel foi destruída a pH ácido, levando à libertação do fármaco, isto é, a estabilidade do hidrogel diminui com a diminuição do pH. De facto, em relação ao PTX livre o hidrogel contendo o PTX apresentou um melhor perfil de libertação devido à encapsulação do PTX nas redes de NC. Em primeiro lugar, verificou-se uma redução da compactação das fibras e só depois a libertação do fármaco, obtendo-se um perfil de libertação controlada.⁵⁰

Foram também realizados estudos de citotoxicidade *in vitro*. A eficácia do hidrogel para inibir as células tumorais foi avaliada pela citotoxicidade em HepG2 e para A549. Em ambos os casos, foi notório que a viabilidade celular foi mais baixa com o hidrogel contendo o PTX em relação a NG (hidrogel sem PTX) para uma concentração celular até 50 µg/mL, o que evidencia uma favorável inibição providenciada pelos hidrogéis de NC como veículo para um sistema de libertação controlada e direcionada para este tipo de células, aumentando o efeito anti tumoral.⁵⁰

Por fim, avaliou-se a internalização celular, isto é, a entrega do PTX no citoplasma ou núcleo das células A549 e HepG2. Para isso, incubou-se o hidrogel contendo o PTX nas células, tendo-se obtido resultados no citoplasma após 3 h e no núcleo de ambas as células após 12 h, o que significa que o composto formado tinha potencial para ultrapassar a resistência celular aos fármacos. Ao nível da morte celular, avaliou-se este parâmetro com as células A549, tendo-se verificado apoptose significativa e crescente, após 3 h de incubação, atingindo valores de 90% após 12 h.⁵⁰

Concluindo, este hidrogel de NC modificado demonstrou um enorme potencial como um novo sistema de libertação, mais estável e com uma maior eficiência na entrega de fármacos no local terapêutico desejado.⁵⁰

3.3.2 CNCs modificados para administração de vitamina C

No estudo de AKHLAGHI *et al.*⁵³, utilizaram-se CNCs implantados com oligossacarídeo de quitosano (CS_{OS}) com formação dos complexos CNC-CS_{OS}. Posteriormente, formaram-se complexos de CNCS/VC por gelificação ionotrópica, entre a vitamina C (VC), os grupos amina carregados positivamente em CS_{OS} e tripolifosfato (TPP) como agente de reticulação. O objetivo deste estudo foi aumentar a estabilidade da VC através dos complexos de CNCS/VC com vantagens para administração tópica, pois os CNC-CS_{OS} funcionam como um transportador da VC e aumentam a sua estabilidade, e as partículas de CNCs atuam como uma barreira ao contacto com o O₂, diminuindo assim a oxidação da VC.

Os complexos CNC-CS_{OS} apresentaram elevada atividade antioxidante, tendo conduzido a uma atividade dupla do complexo de CNCS/VC. Após a libertação da VC do sistema, o transportador CNC-CS_{OS}, também com atividade antioxidante, promoveu um efeito sinérgico.

Após a obtenção dos complexos, realizaram-se vários estudos, em que se verificou que a eficiência de encapsulação e incorporação do fármaco foram superiores para pH 5 em relação a pH 3, dado que o primeiro pKa da VC é 4,2, logo a pH 3 os grupos hidroxilo estão protonados, o que dificulta o processo de encapsulação. A confirmação da inserção da VC no complexo CNC-CS_{OS} foi realizada por espectroscopia UV, tendo-se verificado um pico a 265 nm no espectro do complexo CNCS/VC, o que indicou a presença da VC.⁵³

Para além disso, estudaram-se os perfis de libertação *in vitro* da VC a pH 3 e pH 5, com utilização da VC como controlo. A pH 5, detetou-se um perfil de libertação mais controlado e uma maior percentagem de libertação da VC, devido à sua maior capacidade de incorporação. Posteriormente, tanto o controlo da VC como o complexo com VC formado a pH 3, contendo ambos a mesma quantidade em VC, foram colocados em tubos de diálise e imersos em PBS. A VC do controlo difundiu-se mais rapidamente para o meio e foi degradada ao longo do tempo, enquanto a VC no complexo foi libertada de forma gradual e controlada por 20 dias, apresentando-se mais estável.⁵³

Posteriormente, avaliou-se a atividade antioxidante a partir da atividade sequestrante (SA%) dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH). Para a determinação deste parâmetro, avaliou-se a SA% de 0,1% (m/m) CNCS/VC e a SA% de 0,1% (m/m) de VC durante 4 dias consecutivos. A SA% da VC decresceu ao longo do tempo, devido à sua instabilidade. Por outro lado, a SA% do complexo aumentou ao longo do tempo durante o qual a VC foi libertada do complexo. Por último, realizaram-se estudos cinéticos antioxidantes, tendo-se verificado uma maior atividade antioxidante no complexo, devido à presença de grupos funcionais na superfície dos CNCs, o que revela um efeito sinérgico no aumento da SA%.⁵³

Concluindo, formou-se um novo e dinâmico sistema antioxidante através do complexo formado. O pH, a elevada incorporação e a estabilidade da VC nos complexos CNCS/VC torna-os num excelente candidato para aplicações em cosmecêuticos tópicos.⁵³

3.3.3 Filmes de NFC com fármacos pouco solúveis em água para uma libertação controlada

KOLAKOVIC *et al.*⁵⁶, desenvolveram filmes incorporados com fármacos pouco solúveis em água (indometacina, beclometasona e itraconazol) a partir de uma suspensão de NFC. Os filmes apresentaram-se como sistemas matriciais capazes de controlar a libertação dos fármacos por longos períodos de tempo. A rede de fibra apertada, que se formou à volta

das partículas dos fármacos, devido ao processo de hornificação, protegeu-as do meio líquido, controlando a dissolução das moléculas do fármaco e criando uma barreira para a sua difusão. A nível da morfologia e estrutura dos filmes, as fibras de NFC orientaram-se e organizaram-se em fases lamelares durante o processo de filtração, formando múltiplas camadas finas à volta das partículas de fármaco aprisionadas. O seu tamanho foi diferente para os três fármacos, tendo estes mantido a sua forma cristalina após a incorporação nos filmes de NFC.

Relativamente ao comportamento de libertação, no caso da indometacina a libertação foi do tipo controlada até aos 15-30 dias, o que comprova uma libertação prolongada do fármaco. Os resultados indicaram que a difusão aparente foi mais rápida nas amostras com maior concentração de indometacina, devido ao facto do filme ter uma maior porosidade. No que diz respeito aos outros dois fármacos, verificaram-se perfis de libertação diferentes em relação à indometacina, tendo ocorrido uma libertação mais lenta, com uma libertação controlada até 3 meses, não se aplicando o modelo de *Higuchi*. Algumas razões para estas diferenças são o facto das partículas de itraconazol serem mais pequenas do que as de indometacina, o que leva a um aumento da tortuosidade das matrizes com itraconazol. Além disso, as partículas de maior dimensão da indometacina podem causar uma disrupção maior na estrutura lamelar dos filmes de NFC, tornando-os menos organizados. Por outro lado, o pH utilizado no meio de dissolução influencia o comportamento da NFC. Esta é carregada negativamente em meios neutros e torna-se praticamente neutra em meio ácido, sendo a carga proveniente da hemicelulose presente em NFC, o que gera uma carga de superfície ligeiramente aniónica. Neste sentido, o pH 5 do meio de dissolução utilizado para os filmes de indometacina levou a que uma maior porção dos grupos carboxilo da hemicelulose (cujo pK_a é 3,7) estivesse na forma ionizada, o que causou repulsão entre as fibras vizinhas da NFC, tendo conduzido a uma maior libertação do fármaco, enquanto que, para o meio com itraconazol, o pH utilizado foi de 1,2. Outro fator que se pode considerar para as diferenças observadas nos perfis, foi a possível ligação do fármaco às fibras numa forma molecular após dissolução das partículas de fármaco.⁵⁶

Concluindo, os filmes, para além de apresentarem boas propriedades mecânicas e de incorporação de fármaco, proporcionaram perfis de libertação controlada até 3 meses, dependendo do fármaco utilizado. A NFC mostrou ser um material muito interessante para esta aplicação, apesar de proporcionar um perfil de libertação lenta e uma libertação de pequenas quantidades de fármaco em 24 h, o que inviabiliza a sua utilização em formulações orais, mas apelativa para administração parenteral, tópica ou até ocular.⁵⁶

3.3.4 Nanocompósitos de poli-(N-metacrilóil glicina) e BNC para a libertação controlada de diclofenac

Neste estudo de SAIDI *et al.*⁸⁴ formularam-se nanocompósitos de poli-(N-metacrilóil glicina) (PMGly) e BNC sensíveis ao pH para modular a libertação controlada de diclofenac (DCF). Para isto, foram preparadas membranas de PMGly/BNC, nas quais se variou o conteúdo em monómeros.

Em primeiro lugar, após a preparação dos nanocompósitos de PMGly/BNC, verificou-se que estes eram homogéneos, o que indica uma boa dispersão do PMGly dentro da rede de BNC. De seguida, foram avaliadas algumas características fundamentais destes nanocompósitos, como a captação de água, a cristalinidade da BNC nos nanocompósitos, o comportamento térmico e as propriedades viscoelásticas, tendo todas estas características evidenciado uma ótima aplicabilidade destes materiais para a administração tópica ou transdérmica de fármacos, onde fatores como a aderência às superfícies irregulares da pele e a flexibilidade são essenciais. Além disso, avaliou-se a citotoxicidade *in vitro* em queratinócitos humanos (HaCaT), tendo-se obtido uma viabilidade de 100%, isto é, os nanocompósitos não foram tóxicos para as células.⁸⁴

O comportamento de libertação de diclofenac (DCF) a partir de uma membrana de PMGly/BNC foi posteriormente avaliado considerando diferentes meios que mimetizassem os fluidos corporais, isto é, a pH 7,4 para o fluido intestinal e a pH 2,1 para o fluido gástrico e também a pH 7,4 para a pele, com o objetivo de avaliar estes nanocompósitos como sistemas de libertação por via oral e transdérmica. Na verdade, o perfil de libertação do fármaco foi dependente dos valores de pH. Em meio ácido, a libertação do DCF foi muito lenta com apenas 9% libertado para o meio em 20 h de estudo. Tal deveu-se ao facto do DCF ser menos solúvel em meio ácido e também porque os nanocompósitos são sensíveis ao pH. Por outro lado, para um valor de pH de 7,4, o perfil de libertação do DCF apresentou, numa primeira instância, uma rápida libertação do fármaco (70%) após 1 h, tendo-se atingido um *plateau* a 85% da libertação do fármaco após 4 h. Estes resultados foram compatíveis com uma libertação prolongada, comprovando a utilidade dos nanocompósitos em controlar a libertação do DCF para este valor de pH em sistemas orais e transdérmicos. Para além disso, foi evidenciado o comportamento sensível ao pH dos nanocompósitos de PMGly/BNC pois, quando administrados oralmente, só uma pequena quantidade do fármaco foi libertada para o estômago (pH 2,1), o que evita efeitos gástricos adversos, permitindo a libertação da maior parte do DCF no intestino (pH 7,4).⁸⁴

Em suma, estes nanocompósitos proporcionaram uma libertação do fármaco de uma forma eficiente e controlada graças às suas propriedades, podendo assim ser aplicados em sistemas de libertação de fármacos por via oral e transdérmica.⁸⁴

3.4 Aplicação como biossensores

Por último, podem-se utilizar os vários tipos de NC no *biosensing*, isto é, na deteção de biomoléculas com a utilização de biossensores, que são dispositivos analíticos capazes de fornecer informação biológica quantitativa através da identificação biológica de um elemento.¹⁸ Esta aplicação surge como uma tecnologia emergente, com eficiência em termos de custos e tempo. A utilização de nanomateriais no *biosensing* permite um aumento da área de superfície disponível e da porosidade, o que leva a uma rápida penetração das moléculas no substrato, melhorando as propriedades físicas e químicas do composto, com obtenção de uma maior especificidade, sensibilidade e um tempo de resposta dos biossensores mais rápido.⁸⁵ Deste modo, a NC apresenta-se como um material apropriado para a imobilização de biomoléculas, contribuindo para a construção de biossensores com ótimas propriedades para serem utilizados em diagnósticos clínicos.^{12; 86} Os biossensores baseados em NC têm adequada flexibilidade, estabilidade mecânica e térmica e são estáveis em água.¹⁸

Contudo, apesar da NC evidenciar propriedades únicas e vantajosas, esta apresenta uma baixa condutividade elétrica. Assim, a NC não demonstra uma sensibilidade aceitável para esta aplicação e é muito hidrofílica, sendo necessário efetuarem-se modificações na sua superfície para se atingirem propriedades e funções mais adequadas para o *biosensing*.^{15; 85} Estes materiais foram já utilizados para a deteção de biomarcadores, como fármacos, proteínas e ADN.⁸⁶ A Tabela 4-4-A apresenta alguns estudos, nos quais se abordou a utilização da NC no *biosensing*. Nesta secção serão descritos em detalhe os estudos de ESMAEILI *et al.*⁸⁵, LING *et al.*¹⁶ e ABDI *et al.*⁵¹

3.4.1 Desenvolvimento de um biossensor para a deteção da glucose

No trabalho de ESMAEILI *et al.*⁸⁵ investigou-se a possibilidade de modificar quimicamente a NC com um polímero condutor, o polipirrol (PPY), com a obtenção de uma superfície eletricamente condutora para melhorar as suas propriedades a nível do *biosensing*. Com isto, exploraram-se as vantagens da aplicação de nanocompósitos de PPY/CNCs na adsorção da glucose oxidase (GOx) e transferência de eletrões como uma nova área de deteção de glucose.

Uma análise ao composto formado permitiu inferir uma polimerização homogénea na superfície dos CNCs, com formação de uma nanoestrutura porosa e fibrosa, de tamanho uniforme. Os agregados, que se observaram na membrana de PPy/CNCs na superfície do eletrodo serigrafado de carbono (SPE) modificado, apresentaram-se distribuídos de forma regular. A estrutura porosa dos nanocompósitos levou a uma elevada área de superfície com a GOx aprisionada nos poros, permitindo a rápida difusão da enzima para a membrana de PPy/CNCs.⁸⁵ A Figura 2, adaptada de ESMAEILI *et al.*⁸⁵, ilustra o biossensor desenvolvido.

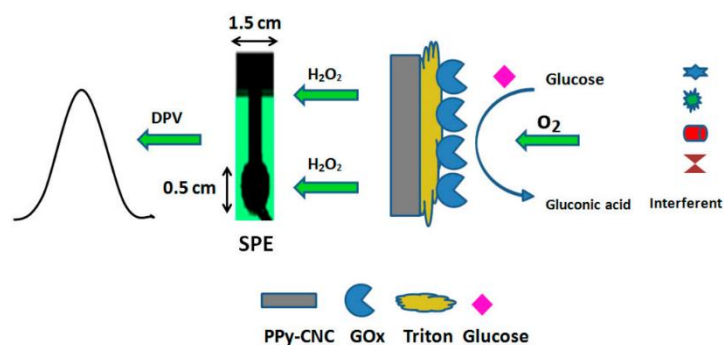


Figura 2. Ilustração esquemática do biossensor eletroquímico de glucose, com PPy/CNCs como membrana.⁸⁵

De seguida, efetuou-se uma caracterização eletroquímica de alguns parâmetros. Nos estudos voltamétricos, verificaram-se picos *redox* estáveis e bem definidos nos SPE modificados com PPy/CNCs. Na presença de CNCs, a interação através de ligações de hidrogénio entre os grupos hidroxilo da celulose e a ligação de hidrogénio ao azoto de PPy, conduziu à formação de uma cadeia de PPy na superfície dos CNCs. Os CNCs melhoraram a transferência de eletrões e a área de superfície ativa do nanocompósito. Contudo, concentrações muito elevadas de CNCs levaram ao efeito oposto, devido à aglomeração dos CNCs.⁸⁵

Posteriormente, variou-se a concentração da GOx de 0,05 até 0,5 mg/elétrodo. Verificou-se uma maior oxidação catalítica da glucose, com o aumento da concentração de 0,05 até 0,1 mg de GOx/elétrodo, o que indicou que a concentração de 0,1 mg/elétrodo foi suficiente para cobrir a superfície dos materiais de PPy/CNCs para consumir O₂ e produzir peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Em concentrações mais elevadas da enzima, a capacidade tampão do biossensor controlou o seu desempenho, o que resultou numa diminuição local do pH, reduzindo a atividade da enzima. Para além disso, esta diminuição na atividade pode ser justificada pelo rápido consumo da glucose na superfície externa do biossensor, devido a uma elevada concentração de GOx.⁸⁵

Avaliou-se, ainda, o efeito de *Triton* no SPE modificado. Este evidenciou uma melhor resposta, o que indica que impediu que a GOx sofresse lixiviação da superfície do eletrodo. O nanocompósito de PPy/CNCs é muito hidrofílico e é fortemente adsorvido à superfície do SPE, permitindo uma maior área de superfície e uma estrutura porosa ideal para a ligação da

enzima GOx, levando a uma maior transferência de elétrons durante a reação enzimática. Além disso, otimizou-se o eletrodo com uma solução de PBS e com uma gama de valores de pH para aumentar a atividade electrocatalítica do biossensor para a glucose. A resposta máxima foi obtida a pH 7, pois o ponto isoelétrico da GOx é 4,2, logo, apresenta uma carga negativa a pH 7. As interações eletrostáticas entre a enzima carregada negativamente e a matriz de PPy carregada positivamente a um pH 7, permitiram um aumento da adsorção e incorporação da enzima na nanoestrutura, o que levou a uma maior sensibilidade. A resposta do sensor dependeu fortemente da concentração de PBS na solução. Verificou-se que a intensidade da corrente aumentou 20 vezes, quando a concentração de PBS aumentou de 1,0 mM para 50 mM. Tal foi atribuído ao papel da solução de PBS como transportador de prótons entre o GOx e a membrana PPy/CNCs.⁸⁵

Por outro lado, avaliou-se a resposta dinâmica do biossensor a diferentes concentrações de glucose, tendo este apresentado linearidade na detecção de glucose na faixa de concentrações de 1 até 20 mM. Neste estudo, um aumento da concentração de glucose na gama considerada fez com que a reação enzimática fosse mais rápida, resultando em concentrações mais elevadas de H₂O₂. A partir de 20 mM, a reação começou a diminuir, pois a glucose na presença da GOx com O₂ leva à formação de ácido glicónico e H₂O₂. O ácido glicónico leva à diminuição do pH, o que se traduz numa inibição da ação da enzima. Outra razão apontada foi o facto da sensibilidade do biossensor poder ser afetada pela concentração de O₂ dissolvido.⁸⁵

Em suma, o biossensor apresentou uma reprodutibilidade e uma estabilidade apropriadas. A boa estabilidade deveu-se à biocompatibilidade da nanoestrutura PPy/CNCs, que proporcionou um microambiente adequado para que a enzima GOx mantivesse a sua bioatividade. A nível de possíveis interferências, numa solução com glucose, colesterol, ácido úrico e ácido ascórbico, verificou-se ausência de aumento na resposta do biossensor, o que evidenciou a sua especificidade. Face aos aspetos positivos detetados neste biossensor, poderá ser possível a sua aplicação em diversas áreas, com destaque para a bioquímica, a engenharia biomédica e a engenharia química.⁸⁵

3.4.2 Formação de um conjugado peptídico-celulósico para a detecção da elastase neutrofílica humana

No estudo de LING *et al.*¹⁶, foram preparados CNCs, mediados por um solvente eutéctico profundo (*deep eutectic solvent*, DES) para a formação de um conjugado peptídico-celulósico como biossensor de elevada sensibilidade para a detecção da elastase neutrofílica humana (HNE). Este conjugado foi comparado com um derivado de CNFs. O conjugado foi

formado inicialmente pela produção de CNCs, através de tratamento com ChCl/OA (DES) e de CNFs oxidadas por TEMPO. Os dois compostos foram decorados com um peptídeo sensível à deteção de HNE. Este tetrapeptídeo (Suc-AAPVpNA) foi ligado covalentemente aos CNCs e CNFs que tinham sido previamente esterificados com glicina. Através da análise das imagens de CNCs e CNFs em suspensão, foi visível que ambos se apresentavam sob a forma de uma suspensão homogénea e que ambos continham grupos carboxilo em C6, com a obtenção de um maior número destes nas CNFs em relação aos CNCs. Esta análise permitiu também observar que ocorreu uma fixação fácil da glicina na posição C6 das amostras.¹⁶

No que respeita à avaliação de algumas propriedades estruturais, foi observado que os valores médios da área de superfície específica foram superiores para as CNFs. Já o diâmetro dos poros foi relativamente semelhante para ambas as amostras, tendo apresentado valores na escala nano. No entanto, os poros das CNFs foram um pouco maiores, isto é, foram considerados como mesoporos o que conduziu a uma maior eficiência ao nível da adsorção do peptídeo. Deste modo, é possível que estes resultados permitam que as CNFs melhorem a imobilização do peptídeo com formação do conjugado.¹⁶

Em relação aos dois conjugados (CNCs-pep e CNFs-pep), verificou-se uma maior densidade de “manchas brancas” na superfície, referentes ao conjugado CNCs-pep. Tal permitiu concluir que a conjugação do tetrapeptídeo em CNCs-pep foi superior do que em CNFs-pep. O facto das CNFs apresentarem um maior número de grupos carboxilo, levou a uma elevada carga negativa na superfície, o que impediu a conjugação do peptídeo de cadeia mais longa com o grupo C6 esterificado com glicina. Além disso, os CNCs-pep apresentaram uma maior cristalinidade e um maior tamanho dos cristais. Deste modo, os CNCs ao exibirem cristais de maiores dimensões, permitiram que a ligação do peptídeo fosse mais rápida. Com a conjugação com o peptídeo, verificou-se um aumento do tamanho dos cristais de CNCs-pep em relação aos CNCs, não se tendo verificado o mesmo efeito para os CNFs-pep. Considera-se, por isso, que a maior agregação de peptídeos na superfície de CNCs-pep do que em CNFs-pep perturba o arranjo dos cristais, aumentando assim o seu tamanho.¹⁶

Por fim, avaliou-se a sensibilidade para a HNE através da deteção colorimétrica. Obteve-se uma coloração compatível com o intervalo de concentrações de HNE encontrado em doenças inflamatórias humanas, como feridas crónicas e doenças pulmonares. Dado o seu maior grau de substituição, os CNCs-pep apresentaram melhor bioatividade de acordo com a deteção colorimétrica. Tanto os CNCs como os CNFs provaram ser materiais apropriados para biossensores desta protease, evidenciando o seu potencial para incorporação em apósitos, bem como para a avaliação *in situ* de HNE no diagnóstico de doenças inflamatórias.¹⁶

3.4.3 Desenvolvimento de um biossensor para a detecção do colesterol

No estudo de ABDI *et al.*⁵¹ pretendeu-se desenvolver um biossensor enzimático sensível ao colesterol baseado num nanocompósito de polianilina (PANi), que é um polímero condutor, com NCC, revestido com um líquido iónico (LI) para aumentar a condutividade e transferência eletrónica do SPE. O efeito sinérgico da NCC e do PANi nas propriedades electrocatalíticas do nanocompósito, juntamente com a elevada porosidade do nanocompósito, tornaram-no num bom candidato para imobilizar enzimas e biomoléculas.

Em primeiro lugar, preparou-se o nanocompósito de PANi/NCC com introdução do LI e a sua posterior deposição no eléctrodo, tendo sido adicionado glutaraldeído (GLU) e, em último lugar, imobilizou-se a enzima colesterol oxidase (ChOx) que se ligou ao GLU.⁵¹

De seguida, avaliaram-se as propriedades electroquímicas dos eléctrodos modificados, através de voltametria cíclica (CV). A associação do nanocompósito no SPE levou a um aumento dos picos anódicos, devido à sua elevada área de superfície e porosidade, o que facilitou a transferência de eletrões e melhorou as propriedades electroquímicas. O revestimento com LI com elevada condutividade aprimorou a transferência eletrónica. O eléctrodo modificado com PANi/NCC/IL/GLU/ChOx evidenciou um aumento drástico nos picos *redox*, devido à reação química entre a enzima e o colesterol com produção de H₂O₂. Posteriormente, analisou-se a morfologia de superfície do nanocompósito PANi/NCC, tendo-se observado uma estrutura fibrosa com elevada porosidade graças à NCC, sem separação de fases, o que revelou a polimerização homogénea do monómero (PANi) na superfície da NCC.⁵¹

Para avaliação da *performance* analítica do biossensor PANi/NCC/IL/GLU/ChOx preparado, procedeu-se à determinação da sua sensibilidade, estabilidade, repetibilidade, linearidade e seletividade. O biossensor exibiu uma resposta rápida e sensível no intervalo de concentrações de colesterol de 1 µM até 12,0 mM, com um limite de deteção (LOD) e um limite de quantificação (LOQ) de 0,48 µM e 0,6 µM, respetivamente. Estes resultados permitiram concluir que este biossensor apresentou uma maior sensibilidade electroquímica em comparação com outros biossensores para o colesterol. Para se avaliar a reprodutibilidade do eléctrodo modificado, avaliaram-se cinco replicados de uma solução tampão com 1,0 mM de colesterol, com obtenção de um desvio padrão relativo (RSD) de 3,74%. Por outro lado, avaliou-se também a repetibilidade, mas, desta vez, através da realização de cinco medições de uma solução de 1,0 mM de colesterol, com obtenção de um RSD de 3,31%. Ora, estes valores baixos de RSD evidenciaram uma boa precisão do eléctrodo modificado.⁵¹

Por fim, para se avaliar a influência de interferências na seletividade dos biossensores, utilizou-se uma mistura com uma concentração de glucose, ácido ascórbico e ácido úrico igual

à de colesterol (1,0 mM), não se tendo verificado alterações na deteção. Com uma posterior adição de uma solução de 1,0 mM de colesterol à anterior, verificou-se um aumento na resposta do biossensor, o que comprova, uma vez mais, a sua elevada sensibilidade e seletividade. Os testes de estabilidade realizaram-se a 4°C durante 20 dias. No 19.º dia, a atividade do biossensor para uma amostra de colesterol de 1,0 mM reteve 84% da atividade inicial, o que evidenciou uma boa estabilidade do biossensor. Segundo os autores, de acordo com as análises efetuadas, o biossensor preparado mostrou resultados promissores para uma deteção de colesterol em diagnósticos clínicos.⁵¹

4. Patentes e análise de mercado

Numa análise retrospectiva deste tópico, é perceptível que a NC tem um elevado número de aplicações. Muitos investigadores analisam as patentes de uma determinada área tecnológica para procederem a investimentos e inovações mais direcionados. Além disso, nos estudos abordados anteriormente, são utilizados processos para obtenção e modificação da NC já patenteada, o que torna interessante a abordagem desta temática para uma melhor compreensão da sua universalidade e aplicabilidade. Assim sendo, com o objetivo de perceber melhor a sua evolução e inovação ao longo dos anos, neste capítulo são abordadas patentes relativas aos três tipos de NC, com destaque dos trabalhos de investigação realizados por CHARREAU *et al.*¹ e DURAN *et al.*⁸⁷

No trabalho de CHARREAU *et al.*¹ pesquisaram-se cerca de 4500 patentes referentes a nanomateriais de celulose, publicadas no período decorrente entre 2010 e 2017, abordando os três tipos de NC, tendo-se obtido um aumento notável no número anual de documentos publicados durante aquele período, em especial de 2015 a 2017. Para uma informação mais detalhada, consultar as Tabelas 1, 2 e 3 do presente estudo. Para além disso, a maioria das patentes ainda era detida por instituições académicas e de inovação, o que evidencia que a NC é cada vez mais utilizada, modificada e testada para aplicações pretendidas dadas as suas características. O segundo aspeto realçado foi a notoriedade atribuída à China, aos Estados Unidos da América e ao Japão, como sendo os mercados mais interessados na proteção e exploração comercial de inovações relacionadas com a NC.

Ainda neste contexto, no estudo de DURAN *et al.*⁸⁷ analisou-se, de uma forma geral, as patentes relacionadas com a NC. Nesta análise, concluiu-se que algumas das técnicas mais comuns para a preparação de NC são os procedimentos ácidos e enzimáticos e os processos de oxidação. Além disso, foi estudado o impacto de materiais à base deste excipiente em várias áreas, como as aplicações biomédicas já aqui destacadas. Com o objetivo de compreender melhor esta premissa, considera-se a consulta da tabela 8 deste estudo. Deste modo, torna-

se essencial abordar algumas patentes publicadas na literatura. Através de uma pesquisa nos websites ESPACENET⁸⁸ e WIPO⁸⁹, foi possível analisar algumas patentes. Na Tabela 2, mostram-se alguns dos exemplos encontrados.

Tabela 2. Exemplos de patentes publicadas relacionadas com a NC.

Número da publicação	Título	Inventores	Data da publicação
WO/2020/223778 ⁹⁰	<i>Matriz 3D de nanocelulose para cultura de células humanas e animais in vitro</i>	KOEPP, Janice; BERTI, Fernanda Vieira; COLLA, Guilherme; DOS REIS, Emily Marques; RAMBO, Carlos Renato; PORTO, Luismar Marques	12/11/2020
WO/2021/105538 ⁹¹	<i>Shredding method and device for obtaining nanocellulose</i>	BARAHONA GONZALEZ, Rafael	03/06/2021
CN111920762A ⁹²	<i>Preparation of high-efficiency hydrophobic drug-loaded nanocellulose-based hydrogel material</i>	HUO Ying; LIU Hongbin; LIU Yingying	13/11/2020
CN109646703A ⁹³	<i>Nanometer cellulose composite antibacterial material and preparation method and application thereof</i>	DU Yumin; GAO Huimin; PANG Zhiyi; QIDIAO Liangren; ZHANG Lina	19/04/2019
CN111363096 ⁹⁴	<i>Allicin-loaded nanocellulose hydrogel drug-loading system and preparation method and application thereof</i>	CHEN Haixia; GAO Xudong	03/07/2020

A primeira patente (WO/2020/223778) aborda a obtenção de uma matriz 3D de NC para a cultura de células humanas e animais *in vitro*, isto é, relata um método para o seu fabrico com obtenção de uma distribuição específica de nanofibras nas superfícies da matriz com possibilidade de imobilização de moléculas químicas. Além disso, aborda também a utilização das matrizes para a reconstrução de pele artificial como uma plataforma para testes de eficácia e segurança de cosméticos e fármacos *in vitro*.⁹⁰ Por outro lado, a WO/2021/105538 aborda um método e um dispositivo de obtenção de NC. O método envolve três passos, nos quais se submete a celulose diluída em água a uma pressão numa câmara com posterior trituração dupla com descompressão e, finalmente, a solução colide com as paredes da câmara, ocorrendo uma terceira trituração.⁹¹ Na CN111920762A divulgou-se a preparação de um hidrogel de NC de elevada eficiência para a incorporação de fármacos hidrofóbicos através de um método simples com capacidade de resolver as adversidades na incorporação deste tipo de fármacos.⁹² Para além destas patentes, a CN109646703A apresentou um material antibacteriano à base de NC com o respetivo método de preparação e aplicação. Este material apresentou excelentes propriedades em concordância com aquelas que tornam a NC ótima para a cicatrização de feridas, como a inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.⁹³ Em último lugar, a CN111363096 descreve um sistema de libertação de fármacos baseado em hidrogéis de NC carregados com alicina, como um método de

preparação e aplicação. O hidrogel apresentou ótimas características: uma boa resistência mecânica e uma elevada capacidade de incorporação do fármaco com uma boa estabilidade aplicabilidade em fármacos.⁹⁴

Em suma, resta apenas abordar o futuro da NC numa perspectiva de análise de mercado, com recurso, para isso, aos estudos realizados *Mordor Intelligence* e pela *Global Market Insights*. Com os dados obtidos, o valor de mercado da NC está previsto registar, entre 2021 e 2026, uma taxa de crescimento de 22% em relação a 2020, ano no qual este foi afetado pela pandemia que atravessamos.^{95; 96} Ambos os estudos concluíram que a NFC domina o mercado,^{95; 96; 97} com uma quota superior a 50%,^{95; 96} sendo expectável que isto se mantenha. Além disso, a longo prazo, os principais fatores que impulsionam o crescimento do mercado estudado são as excelentes propriedades da NC em diversas aplicações (Anexo 5).^{95; 96; 97} O facto desta ser um biopolímero, faz com que seja bastante atrativa para vários mercados e exista uma elevada procura em economias desenvolvidas. O mercado norte-americano é dominante, com uma quota de 40%, devido a um elevado consumo e conseqüente procura da NC. Os Estados Unidos da América têm o maior mercado biofarmacêutico, sendo o país líder em investigação e desenvolvimento (R&D) biofarmacêutico, onde a produção e comercialização de produtos farmacêuticos estão previstas aumentar no período decorrente entre 2021 e 2026. De facto, a Universidade de *Maine*, nos Estados Unidos da América, tem a capacidade de fornecer NFC a entidades com interesse em desenvolver novas aplicações à base deste excipiente. Com estas evidências, é expectável que o mercado da NC norte-americano cresça rapidamente.^{95;}⁹⁶ Ainda neste sentido, a Índia é considerada como uma economia desenvolvida, que apresenta um setor farmacêutico e cosmético em exponencial crescimento,^{95; 96} onde a NC poderá assumir um papel fundamental. Na verdade, com este estudo, foi perceptível que, do mercado total da NC, uma boa parte deve-se à sua aplicação nos setores referidos anteriormente.^{95; 96}

Finalmente, o mercado testemunhou um aumento do número de patentes entre 2015 e 2019.⁹⁷ Contudo, o seu crescimento poderá ser limitado por barreiras económicas.^{95; 96} Todos estes dados sugerem uma exponencial inovação da NC nos próximos anos, para um maior desenvolvimento de materiais à base deste excipiente, contribuindo assim para uma área emergente da nanotecnologia. Apresentam, contudo, alguns desafios ainda por superar para uma aplicação industrial mais vasta da NC.^{1; 87}

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Ao longo deste trabalho, foram abordados os três tipos de NC e respetivas características bem como a sua aplicabilidade crescente na tecnologia farmacêutica, mais concretamente em aplicações biomédicas e em biossensores. Para além disso, numa perspetiva de propriedade intelectual, foi possível abordar algumas patentes, bem como analisar o seu potencial de mercado e, uma vez mais, verificar a sua importância em diferentes contextos. Tudo isto, aliado a uma facilidade na modificação da superfície deste excipiente, permite, com segurança, afirmar que a NC possui uma elevada versatilidade. Reflexo desta característica é a sua utilização em inúmeras aplicações, como sejam sistemas de libertação de fármacos, *scaffolds* para a engenharia de tecidos, cicatrização de feridas ou, até, biossensores. Um exemplo de um produto já comercializado encontra-se no Anexo 6, em que um *scaffold* à base de BNC pode ser utilizado em reatores para a cultura de células animais.

Contudo, a NC não é degradável no organismo humano, sendo esta uma limitação que afeta, atualmente, a sua aplicação a nível da produção de, por exemplo, *scaffolds* para a engenharia de tecidos. Deste modo, é essencial que haja um maior conhecimento fundamentado e um maior número de estudos, como por exemplo, ensaios pré-clínicos em animais para se concluir acerca da toxicidade deste excipiente e das consequências que a sua utilização pode ter na saúde humana, com o objetivo de se concretizar uma maior comercialização destes materiais para diversas aplicações, como para a cicatrização de feridas. Para além disso, ainda não foi explorada a interação entre os nanocompósitos sintetizados com os microrganismos presentes no local de aplicação, o que requer estudos para avaliar esta condicionante. Por outro lado, a maioria dos estudos aborda a utilização da NC com biopolímeros ao invés de focar a utilização da NC com biopolímeros condutores. Assim, no futuro, são necessários mais estudos para que se possa beneficiar das propriedades eletroquímicas dos biopolímeros condutores para a obtenção de dispositivos eletrónicos para tratar patologias. Como exemplo, pode-se referir a obtenção de dispositivos SPE que sirvam como imunossensores ou que possam ser combinados em terapias de entrega de fármacos.

Além disso, também se torna fundamental aumentar a exploração e investigação de modificações na superfície deste excipiente para a obtenção de materiais com propriedades desejáveis e específicas para um campo tão desafiante e promissor como a nanomedicina.

A NC apresenta-se assim como um excipiente excepcional com inúmeras facetas e modificações ainda por descobrir. Possui, inquestionavelmente, um elevado potencial para, a longo prazo, revolucionar uma nova geração de materiais para diversas aplicações e uma elevada capacidade para a resolução dos desafios atuais e futuros.

6. Referências Bibliográficas

1. CHARREAU, Hernán; CAVALLO, Ema; FORESTI, María Laura - **Patents involving nanocellulose: Analysis of their evolution since 2010**. Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 237:February (2020) 116039. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116039.
2. SUN, Bo *et al.* - **Applications of Cellulose-based Materials in Sustained Drug Delivery Systems**. Current Medicinal Chemistry. ISSN 09298673. 26:14 (2018) 2485–2501. doi: 10.2174/0929867324666170705143308.
3. KONO, Hiroyuki; ERATA, Tomoki; TAKAI, Mitsuo - **CP/MAS 13C NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 2. Complete assignment of the 13C resonance for the ring carbons of cellulose triacetate polymorphs**. Journal of the American Chemical Society. ISSN 00027863. 124:25 (2002) 7512–7518. doi: 10.1021/ja010705g.
4. VUOTI, Sauli *et al.* - **Chemical modification of cellulosic fibers for better convertibility in packaging applications**. Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 96:2 (2013) 549–559. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.07.053.
5. KULASINSKI, Karol *et al.* - **A comparative molecular dynamics study of crystalline, paracrystalline and amorphous states of cellulose**. Cellulose. ISSN 09690239. 21:3 (2014) 1103–1116. doi: 10.1007/s10570-014-0213-7.
6. KENNEDY, J. F. *et al.* - **Cellulose and its derivatives: chemistry, biochemistry and applications**. ISSN 00086215. 219:2 (1985). doi: 10.1016/s0008-6215(00)90446-4.
7. HEBEISH, Ali; GUTHRIE, James Thomas - **The Chemistry and Technology of Cellulosic Copolymers**. [S.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 1981
8. THOMAS, Paul *et al.* - **Comprehensive review on nanocellulose: Recent developments, challenges and future prospects**. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. ISSN 18780180. 110:April (2020) 103884. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103884.
9. CURVELLO, Rodrigo; RAGHUWANSHI, Vikram Singh; GARNIER, Gil - **Engineering nanocellulose hydrogels for biomedical applications**. Advances in Colloid and Interface Science. ISSN 00018686. 267:2019) 47–61. doi: 10.1016/j.cis.2019.03.002.
10. ENDES, C. *et al.* - **A critical review of the current knowledge regarding the biological impact of nanocellulose**. Journal of Nanobiotechnology. ISSN 14773155. 14:1 (2016) 1–14. doi: 10.1186/s12951-016-0230-9.
11. LUO, Huize *et al.* - **Advances in tissue engineering of nanocellulose-based scaffolds: A review**. Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 224:July (2019)

115144. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115144.
12. NEHRA, Poonam; CHAUHAN, R. P. - **Eco-friendly nanocellulose and its biomedical applications: current status and future prospect.** Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. ISSN 15685624. 32:1 (2021) 112–149. doi: 10.1080/09205063.2020.1817706.
 13. NIMESKERN, Luc *et al.* - **Mechanical evaluation of bacterial nanocellulose as an implant material for ear cartilage replacement.** Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. ISSN 17516161. 22:2013) 12–21. doi: 10.1016/j.jmbbm.2013.03.005.
 14. RÅNBY, Bengt G. - **III. Fibrous macromolecular systems. Cellulose and muscle. The colloidal properties of cellulose micelles.** Discussions of the Faraday Society. ISSN 03669033. 11:111 (1951) 158–164. doi: 10.1039/DF9511100158.
 15. SORIANO, M. Laura; DUEÑAS-MAS, M. Jesús - **Promising Sensing Platforms Based on Nanocellulose.** 2018) 273–301. doi: 10.1007/5346_2018_26.
 16. LING, Zhe *et al.* - **Nanocellulose as a colorimetric biosensor for effective and facile detection of human neutrophil elastase.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 216:December 2018 (2019) 360–368. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.04.027.
 17. LUO, Huize; LI, Juanjuan; ZHOU, Fengshan - **Advances in Hard Tissue Engineering Materials—Nanocellulose-based Composites.** Paper and Biomaterials. 3:4 (2018) 62–76.
 18. SUBHEDAR, Aditya *et al.* - **Nanocellulose in biomedical and biosensing applications: A review.** International Journal of Biological Macromolecules. ISSN 18790003. 166:2021) 587–600. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.217.
 19. ATHUKORALALAGE, Sandya S. *et al.* - **3D bioprinted nanocellulose-based hydrogels for tissue engineering applications: A brief review.** Polymers. ISSN 20734360. 11:5 (2019) 1–13. doi: 10.3390/polym11050898.
 20. TORTORELLA, Silvia *et al.* - **Surface-modified nanocellulose for application in biomedical engineering and nanomedicine: A review.** International Journal of Nanomedicine. ISSN 11782013. 15:2020) 9909–9937. doi: 10.2147/IJN.S266103.
 21. KALIA, Susheel *et al.* - **Nanofibrillated cellulose: Surface modification and potential applications.** Colloid and Polymer Science. ISSN 14351536. 292:1 (2014) 5–31. doi: 10.1007/s00396-013-3112-9.
 22. DUGAN, James M.; GOUGH, Julie E.; EICHHORN, Stephen J. - **Bacterial cellulose scaffolds and cellulose nanowhiskers for tissue engineering.** Nanomedicine. ISSN 17486963. 8:2 (2013) 287–298. doi: 10.2217/nnm.12.211.

23. LIN, Ning; DUFRESNE, Alain - **Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect.** European Polymer Journal. ISSN 00143057. 59:July (2014) 302–325. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025.
24. HABIBI, Youssef - **Key advances in the chemical modification of nanocelluloses.** Chemical Society Reviews. ISSN 14604744. 43:5 (2014) 1519–1542. doi: 10.1039/c3cs60204d.
25. ČOLIĆ, Miodrag; TOMIĆ, Sergej; BEKIĆ, Marina - **Immunological aspects of nanocellulose.** Immunology Letters. ISSN 18790542. 222:March (2020) 80–89. doi: 10.1016/j.imlet.2020.04.004.
26. DONG, SHUPING *et al.* - **Cytotoxicity and Cellular Uptake of Cellulose Nanocrystals.** Nano LIFE. ISSN 1793-9844. 02:03 (2012) 1241006. doi: 10.1142/s1793984412410061.
27. MALE, Keith B. *et al.* - **Probing inhibitory effects of nanocrystalline cellulose: Inhibition versus surface charge.** Nanoscale. ISSN 20403364. 4:4 (2012) 1373–1379. doi: 10.1039/c2nr11886f.
28. ENDES, Carola *et al.* - **Fate of Cellulose Nanocrystal Aerosols Deposited on the Lung Cell Surface In Vitro.** Biomacromolecules. ISSN 15264602. 16:4 (2015) 1267–1275. doi: 10.1021/acs.biomac.5b00055.
29. ENDES, Carola *et al.* - **An in vitro testing strategy towards mimicking the inhalation of high aspect ratio nanoparticles.** Particle and Fibre Toxicology. ISSN 17438977. 11:1 (2014) 1–12. doi: 10.1186/s12989-014-0040-x.
30. MAHMOUD, Khaled A. *et al.* - **Effect of surface charge on the cellular uptake and cytotoxicity of fluorescent labeled cellulose nanocrystals.** ACS Applied Materials and Interfaces. ISSN 19448244. 2:10 (2010) 2924–2932. doi: 10.1021/am1006222.
31. DELOID, Glen M. *et al.* - **Toxicological effects of ingested nanocellulose in: In vitro intestinal epithelium and in vivo rat models.** Environmental Science: Nano. ISSN 20518161. 6:7 (2019) 2105–2115. doi: 10.1039/c9en00184k.
32. KOVACS, Tibor *et al.* - **An ecotoxicological characterization of nanocrystalline cellulose (NCC).** Nanotoxicology. ISSN 17435390. 4:3 (2010) 255–270. doi: 10.3109/17435391003628713.
33. LIMA, Renata DE *et al.* - **Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers.** International Journal of Nanomedicine. ISSN 11769114. 7:2012) 3555–3565. doi: 10.2147/IJN.S30596.
34. BACAKOVA, Lucie *et al.* - **Versatile application of nanocellulose: From**

- industry to skin tissue engineering and wound healing.** *Nanomaterials*. ISSN 20794991. 9:2 (2019). doi: 10.3390/nano9020164.
35. SACUI, Iulia A. *et al.* - **Comparison of the properties of cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils isolated from bacteria, tunicate, and wood processed using acid, enzymatic, mechanical, and oxidative methods.** *ACS Applied Materials and Interfaces*. ISSN 19448252. 6:9 (2014) 6127–6138. doi: 10.1021/am500359f.
36. PÖTZINGER, Yvette; KRALISCH, Dana; FISCHER, Dagmar - **Bacterial nanocellulose: The future of controlled drug delivery?** *Therapeutic Delivery*. ISSN 20416008. 8:9 (2017) 753–761. doi: 10.4155/tde-2017-0059.
37. GELIN, Kristina *et al.* - **Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy.** *Polymer*. ISSN 00323861. 48:26 (2007) 7623–7631. doi: 10.1016/j.polymer.2007.10.039.
38. GATENHOLM, Paul; KLEMM, Dieter - **Bacterial nanocellulose as a renewable material for biomedical applications.** *MRS Bulletin*. ISSN 08837694. 35:3 (2010) 208–213. doi: 10.1557/mrs2010.653.
39. ATAIDE, Janaína Artem *et al.* - **Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties.** *Scientific Reports*. ISSN 20452322. 7:1 (2017) 2–10. doi: 10.1038/s41598-017-18271-4.
40. NAPAICHAYANUN, Supamas; YAMDECH, Rungnapha; ARAMWIT, Pornanong - **The safety and efficacy of bacterial nanocellulose wound dressing incorporating sericin and polyhexamethylene biguanide: in vitro, in vivo and clinical studies.** *Archives of Dermatological Research*. ISSN 1432069X. 308:2 (2016) 123–132. doi: 10.1007/s00403-016-1621-3.
41. BERNDT, Sabrina *et al.* - **Antimicrobial porous hybrids consisting of bacterial nanocellulose and silver nanoparticles.** *Cellulose*. ISSN 09690239. 20:2 (2013) 771–783. doi: 10.1007/s10570-013-9870-1.
42. BAO, Luhan *et al.* - **Physicochemical Properties and In Vitro Biocompatibility of Three Bacterial Nanocellulose Conduits for Blood Vessel Applications.** *Carbohydrate Polymers*. ISSN 01448617. 239:March (2020) 116246. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116246.
43. DOUGLASS, Eugene F. *et al.* - **A Review of Cellulose and Cellulose Blends for Preparation of Bio-derived and Conventional Membranes, Nanostructured Thin Films, and Composites.** *Polymer Reviews*. ISSN 15583716. 58:1 (2018) 102–

163. doi: 10.1080/15583724.2016.1269124.
44. LEVY, Jacqueline L. *et al.* - **The effect of bacteria on the sensitivity of microalgae to copper in laboratory bioassays.** *Chemosphere*. ISSN 00456535. 74:9 (2009) 1266–1274. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.10.049.
45. HONG, Feng; WEI, Bin; CHEN, Lin - **Preliminary study on biosynthesis of bacterial nanocellulose tubes in a novel double-silicone-tube bioreactor for potential vascular prosthesis.** *BioMed Research International*. ISSN 23146141. 2015:2015). doi: 10.1155/2015/560365.
46. HABIBI, Youssef; LUCIA, Lucian A.; ROJAS, Orlando J. - **CNC - Johnsy - habibi2010 [2].pdf.** *Chemical Reviews*. 110:2010) 3479–3500.
47. LÖBMANN, Korbinian; SVAGAN, Anna J. - **Cellulose nanofibers as excipient for the delivery of poorly soluble drugs.** *International Journal of Pharmaceutics*. ISSN 18733476. 533:1 (2017) 285–297. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.064.
48. JACKSON, John K. *et al.* - **The use of nanocrystalline cellulose for the binding and controlled release of drugs.** *International journal of nanomedicine*. ISSN 11782013. 6:2011) 321–330. doi: 10.2147/ijn.s16749.
49. LAM, Nga Tien *et al.* - **Utilizing cellulose from sugarcane bagasse mixed with poly(vinyl alcohol) for tissue engineering scaffold fabrication.** *Industrial Crops and Products*. ISSN 09266690. 100:2017) 183–197. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.02.031.
50. NING, Like *et al.* - **Synthesis and biological evaluation of surface-modified nanocellulose hydrogel loaded with paclitaxel.** *Life Sciences*. ISSN 18790631. 241:2020) 117137. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117137.
51. ABDI, Mahnaz M. *et al.* - **Optimized fabrication of newly cholesterol biosensor based on nanocellulose.** *International Journal of Biological Macromolecules*. ISSN 18790003. 126:2019) 1213–1222. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.01.001.
52. CHEN, Qiang *et al.* - **Cellulose Nanocrystals-Bioactive Glass Hybrid Coating as Bone Substitutes by Electrophoretic Co-deposition: In Situ Control of Mineralization of Bioactive Glass and Enhancement of Osteoblastic Performance.** *ACS Applied Materials and Interfaces*. ISSN 19448252. 7:44 (2015) 24715–24725. doi: 10.1021/acsami.5b07294.
53. AKHLAGHI, Seyedeh Parinaz; BERRY, Richard M.; TAM, Kam Chiu - **Modified Cellulose Nanocrystal for Vitamin C Delivery.** *AAPS PharmSciTech*. ISSN 15309932. 16:2 (2015) 306–314. doi: 10.1208/s12249-014-0218-4.
54. LIU, Jun *et al.* - **Nanofibrillated cellulose originated from birch sawdust after sequential extractions: A promising polymeric material from waste to films.**

- Cellulose. ISSN 09690239. 21:4 (2014) 2587–2598. doi: 10.1007/s10570-014-0321-4.
55. SUN, Fengzhen *et al.* - **Mechanical characteristics of nanocellulose-PEG bionanocomposite wound dressings in wet conditions.** Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. ISSN 18780180. 69:January (2017) 377–384. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.01.049.
 56. KOLAKOVIC, Ruzica *et al.* - **Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery.** European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. ISSN 09396411. 82:2 (2012) 308–315. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.06.011.
 57. ABOUZEID, Ragab E. *et al.* - **Biomimetic Mineralization of Three-Dimensional Printed Alginate/TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibril Scaffolds for Bone Tissue Engineering.** Biomacromolecules. ISSN 15264602. 19:11 (2018) 4442–4452. doi: 10.1021/acs.biomac.8b01325.
 58. HUJAYA, Sry D. *et al.* - **Polyion complex hydrogels from chemically modified cellulose nanofibrils: Structure-function relationship and potential for controlled and pH-responsive release of doxorubicin.** Acta Biomaterialia. ISSN 18787568. 75:2018) 346–357. doi: 10.1016/j.actbio.2018.06.013.
 59. HAKKARAINEN, T. *et al.* - **Nanofibrillar cellulose wound dressing in skin graft donor site treatment.** Journal of Controlled Release. ISSN 18734995. 244:2016) 292–301. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.07.053.
 60. BASU, Alex *et al.* - **In Vitro and in Vivo Evaluation of the Wound Healing Properties of Nanofibrillated Cellulose Hydrogels.** ACS Applied Bio Materials. ISSN 25766422. 1:6 (2018) 1853–1863. doi: 10.1021/acsabm.8b00370.
 61. SALAS, Carlos *et al.* - **Nanocellulose properties and applications in colloids and interfaces.** Current Opinion in Colloid and Interface Science. ISSN 18790399. 19:5 (2014) 383–396. doi: 10.1016/j.cocis.2014.10.003.
 62. ORELMA, Hannes *et al.* - **Surface functionalized nanofibrillar cellulose (NFC) film as a platform for immunoassays and diagnostics.** Biointerphases. ISSN 15594106. 7:1–4 (2012) 1–12. doi: 10.1007/s13758-012-0061-7.
 63. POWELL, Lydia C. *et al.* - **An investigation of Pseudomonas aeruginosa biofilm growth on novel nanocellulose fibre dressings.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 137:2016) 191–197. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.024.
 64. ABITBOL, Tiffany *et al.* - **Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications.** Current Opinion in Biotechnology. ISSN 18790429. 39:1 (2016) 76–88. doi: 10.1016/j.copbio.2016.01.002.
 65. YU, Sujie *et al.* - **Nanocellulose from various biomass wastes: Its preparation**

- and potential usages towards the high value-added products.** Environmental Science and Ecotechnology. ISSN 26664984. 5:2021) 100077. doi: 10.1016/j.ese.2020.100077.
66. TANG, James D.; MURA, Cameron; LAMPE, Kyle J. - **Stimuli-Responsive, Pentapeptide, Nanofiber Hydrogel for Tissue Engineering.** Journal of the American Chemical Society. ISSN 15205126. 141:12 (2019) 4886–4899. doi: 10.1021/jacs.8b13363.
 67. GOINS, Allison; WEBB, Antonio R.; ALLEN, Josephine B. - **Multi-layer approaches to scaffold-based small diameter vessel engineering: A review.** Materials Science and Engineering C. ISSN 18730191. 97:November 2018 (2019) 896–912. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.067.
 68. VUKAJLOVIC, Djurdja *et al.* - **Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications.** Materials Science and Engineering C. ISSN 18730191. 96:2019) 955–967. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.026.
 69. DHASMANA, Archana *et al.* - **Silk fibroin protein modified acellular dermal matrix for tissue repairing and regeneration.** Materials Science and Engineering C. ISSN 18730191. 97:2019) 313–324. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.038.
 70. DOBOS, Andrew *et al.* - **Parallel fabrication of macroporous scaffolds.** Biotechnology and Bioengineering. ISSN 10970290. 115:7 (2018) 1729–1742. doi: 10.1002/bit.26593.
 71. RUSK, Rogers D. - **Science.** Educational Forum. ISSN 19388098. 15:1 (1950) 119–120. doi: 10.1080/00131725009342110.
 72. HUSSEY, George S.; DZIKI, Jenna L.; BADYLAK, Stephen F. - **Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine.** Nature Reviews Materials. ISSN 20588437. 3:7 (2018) 159–173. doi: 10.1038/s41578-018-0023-x.
 73. ZANDER, Nicole E. *et al.* - **Metal cation cross-linked nanocellulose hydrogels as tissue engineering substrates.** ACS Applied Materials and Interfaces. ISSN 19448252. 6:21 (2014) 18502–18510. doi: 10.1021/am506007z.
 74. POOYAN, Parisa *et al.* - **Design of a cellulose-based nanocomposite as a potential polymeric scaffold in tissue engineering.** Polymer. ISSN 00323861. 54:8 (2013) 2105–2114. doi: 10.1016/j.polymer.2013.01.030.
 75. AHREM, Hannes *et al.* - **Laser-structured bacterial nanocellulose hydrogels support ingrowth and differentiation of chondrocytes and show potential as cartilage implants.** Acta Biomaterialia. ISSN 17427061. 10:3 (2014) 1341–1353. doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.004.

76. MATHEW, Aji P. *et al.* - **Fibrous cellulose nanocomposite scaffolds prepared by partial dissolution for potential use as ligament or tendon substitutes.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 87:3 (2012) 2291–2298. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.10.063.
77. ANDERSSON, Jessica *et al.* - **Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds.** Journal of Biomedical Materials Research - Part A. ISSN 15493296. 94:4 (2010) 1124–1132. doi: 10.1002/jbm.a.32784.
78. HELENIUS, Gisela *et al.* - **In vivo biocompatibility of bacterial cellulose.** Journal of Biomedical Materials Research - Part A. ISSN 00219304. 76:2 (2006) 431–438. doi: 10.1002/jbm.a.30570.
79. GAO, Chuan *et al.* - **Preparation and characterization of bacterial cellulose sponge with hierarchical pore structure as tissue engineering scaffold.** Journal of Porous Materials. ISSN 13802224. 18:2 (2011) 139–145. doi: 10.1007/s10934-010-9364-6.
80. DU, Haishun *et al.* - **Cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical applications.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 209:November 2018 (2019) 130–144. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.01.020.
81. TAHER, Md Abu *et al.* - **Nanocellulose as drug delivery system for honey as antimicrobial wound dressing.** Materials Today: Proceedings. ISSN 22147853. 31:xxxx (2020) 14–17. doi: 10.1016/j.matpr.2020.01.076.
82. SHEFA, Anha Afrin *et al.* - **In vitro and in vivo evaluation of effectiveness of a novel TEMPO-oxidized cellulose nanofiber-silk fibroin scaffold in wound healing.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 177:2017) 284–296. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.130.
83. HOARE, Todd R.; KOHANE, Daniel S. - **Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges.** Polymer. ISSN 00323861. 49:8 (2008) 1993–2007. doi: 10.1016/j.polymer.2008.01.027.
84. SAÏDI, Louise *et al.* - **Poly(N-methacryloyl glycine)/nanocellulose composites as pH-sensitive systems for controlled release of diclofenac.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 169:2017) 357–365. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.030.
85. ESMAEILI, Chakavak *et al.* - **Synergy effect of nanocrystalline cellulose for the biosensing detection of glucose.** Sensors (Switzerland). ISSN 14248220. 15:10 (2015) 24681–24697. doi: 10.3390/s151024681.
86. GOLMOHAMMADI, Hamed *et al.* - **Nanocellulose in Sensing and Biosensing.** Chemistry of Materials. ISSN 15205002. 29:13 (2017) 5426–5446. doi:

- 10.1021/acs.chemmater.7b01170.
87. DURAN, Nelson; PAULA LEMES, Ana; B. SEABRA, Amedea - **Review of Cellulose Nanocrystals Patents: Preparation, Composites and General Applications**. Recent Patents on Nanotechnology. ISSN 18722105. 6:1 (2011) 16–28. doi: 10.2174/187221012798109255.
 88. **Espacenet – patent search** (2021). [Acedido a 6 junho de 2021]. Disponível na internet: <https://worldwide.espacenet.com/>
 89. **WIPO - Search International and National Patent Collections** (2021). [Acedido a 6 junho de 2021]. Disponível na internet: <https://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf>
 90. **WO2020223778 MATRIZ 3D DE NANOCELULOSE PARA CULTURA DE CÉLULAS HUMANAS E ANIMAIS IN VITRO** (2021). [Acedido a 6 junho de 2021]. Disponível na internet: <https://patentscope.wipo.int/search/pt/detail.jsf?docId=WO2020223778&tab=PCTBIBLIO>
 91. **WO2021105538 SHREDDING METHOD AND DEVICE FOR OBTAINING NANOCELLULOSE** (2021). [Acedido a 6 junho de 2021]. Disponível na internet: https://patentscope.wipo.int/search/pt/detail.jsf?docId=WO2021105538&tab=PCTBIBLIO&_cid=P12-KPK49F-25980-1
 92. **Espacenet – search results** (2021). [Acedido a 6 junho de 2021]. Disponível na internet: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/073304571/publication/CN111920762A?q=pn%3DCN111920762A>
 93. **Espacenet – search results** (2021). [Acedido a 6 junho de 2021]. Disponível na internet: <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/066116204/publication/CN109646703A?q=pn%3DCN109646703A>
 94. **CN11363096 Allicin-loaded nanocellulose hydrogel drug-loading system and preparation method and application thereof** (2021). [Acedido a 6 junho de 2021]. Disponível na internet: https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=CN299137946&_cid=P12KPKE4T-67180-1
 95. YEAR, Materials Base; PERIOD, Study; PERIOD, **Forecast - Global nanocellulose market (2021-2026)**. 2021) 2016–2026.
 96. **Nanocellulose Market Size, Trends | COVID-19 Impact Analysis 2021 to 2026 - Mordor Intelligence** (2021). [Acedido a 12 junho de 2021]. Disponível na internet: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/nanocellulose-market>
 97. **Nanocellulose Market Size and Share | Industry Statistics – 2026** (2021). [Acedido a 12 junho de 2021]. Disponível na internet: <https://www.gminsights.com>

98. RAGHAV, N.; SHARMA, Manishita R.; KENNEDY, John F. - **Nanocellulose: A mini-review on types and use in drug delivery systems.** Carbohydrate Polymer Technologies and Applications. ISSN 26668939. 2:December 2020 (2021) 100031. doi: 10.1016/j.carpta.2020.100031.
99. WANG, J.; WAN, Y.; HUANG, Y. - **Immobilisation of heparin on bacterial cellulose-chitosan nano-fibres surfaces via the cross-linking technique.** IET Nanobiotechnology. ISSN 17518741. 6:2 (2012) 52–57. doi: 10.1049/iet-nbt.2011.0038.
100. MARTÍNEZ ÁVILA, Héctor *et al.* - **3D bioprinting of human chondrocyte-laden nanocellulose hydrogels for patient-specific auricular cartilage regeneration.** Bioprinting. ISSN 24058866. 1–2:2016) 22–35. doi: 10.1016/j.bprint.2016.08.003.
101. PEDROTTY, Dawn M. *et al.* - **Three-Dimensional Printed Biopatches With Conductive Ink Facilitate Cardiac Conduction When Applied to Disrupted Myocardium.** Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology. ISSN 19413084. 12:3 (2019) 1–11. doi: 10.1161/CIRCEP.118.006920.
102. BARUA, Shaswat *et al.* - **Sustainable resource based hyperbranched epoxy nanocomposite as an infection resistant, biodegradable, implantable muscle scaffold.** ACS Sustainable Chemistry and Engineering. ISSN 21680485. 3:6 (2015) 1136–1144. doi: 10.1021/acssuschemeng.5b00069.
103. AZOUDIS, Ioannis *et al.* - **Three-dimensional cell culture of human mesenchymal stem cells in nanofibrillar cellulose hydrogels.** MRS Communications. ISSN 21596867. 7:3 (2017) 458–465. doi: 10.1557/mrc.2017.59.
104. DUGAN, James M. *et al.* - **Oriented surfaces of adsorbed cellulose nanowhiskers promote skeletal muscle myogenesis.** Acta Biomaterialia. ISSN 17427061. 9:1 (2013) 4707–4715. doi: 10.1016/j.actbio.2012.08.050.
105. KUZMENKO, Volodymyr *et al.* - **Tailor-made conductive inks from cellulose nanofibrils for 3D printing of neural guidelines.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 189:October 2017 (2018) 22–30. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.097.
106. GAO, Chuan *et al.* - **Polylysine coated bacterial cellulose nanofibers as novel templates for bone-like apatite deposition.** Cellulose. ISSN 09690239. 18:6 (2011) 1555–1561. doi: 10.1007/s10570-011-9571-6.
107. AZEVEDO, Eduardo P. *et al.* - **Mechanical properties of cellulose: Chitosan blends for potential use as a coronary artery bypass graft.** Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. ISSN 15685624. 24:3 (2013) 239–252. doi:

- 10.1080/09205063.2012.690273.
108. POOYAN, Parisa; TANNENBAUM, Rina; GARMESTANI, Hamid - **Mechanical behavior of a cellulose-reinforced scaffold in vascular tissue engineering.** Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. ISSN 17516161. 7:2012) 50–59. doi: 10.1016/j.jmbbm.2011.09.009.
109. VALLE-DELGADO, Juan José; JOHANSSON, Leena Sisko; ÖSTERBERG, Monika - **Bioinspired lubricating films of cellulose nanofibrils and hyaluronic acid.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. ISSN 18734367. 138:2016) 86–93. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.11.047.
110. TUMMALA, Gopi Krishna *et al.* - **Strain-induced stiffening of nanocellulose reinforced poly(vinyl alcohol) hydrogels mimicking collagenous soft tissues.** Soft Matter. ISSN 17446848. 13:21 (2017) 3936–3945. doi: 10.1039/c7sm00677b.
111. ABUDULA, Tuerdimaimaiti *et al.* - **Electrospun cellulose Nano fibril reinforced PLA/PBS composite scaffold for vascular tissue engineering.** Journal of Polymer Research. ISSN 15728935. 26:5 (2019). doi: 10.1007/s10965-019-1772-y.
112. MALINEN, Melina M. *et al.* - **Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels.** Biomaterials. ISSN 18785905. 35:19 (2014) 5110–5121. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.020.
113. BORGES, Ana C. *et al.* - **Nanofibrillated cellulose composite hydrogel for the replacement of the nucleus pulposus.** Acta Biomaterialia. ISSN 17427061. 7:9 (2011) 3412–3421. doi: 10.1016/j.actbio.2011.05.029.
114. LOU, Yan Ru *et al.* - **The use of nanofibrillar cellulose hydrogel as a flexible three-dimensional model to culture human pluripotent stem cells.** Stem Cells and Development. ISSN 15473287. 23:4 (2014) 380–392. doi: 10.1089/scd.2013.0314.
115. AJDARY, Rubina *et al.* - **Acetylated Nanocellulose for Single-Component Bioinks and Cell Proliferation on 3D-Printed Scaffolds.** Biomacromolecules. ISSN 15264602. 20:7 (2019) 2770–2778. doi: 10.1021/acs.biomac.9b00527.
116. KRONTIRAS, Panagiotis; GATENHOLM, Paul; HAGG, Daniel A. - **Adipogenic differentiation of stem cells in three-dimensional porous bacterial nanocellulose scaffolds.** Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials. ISSN 15524981. 103:1 (2015) 195–203. doi: 10.1002/jbm.b.33198.
117. GUTIÉRREZ-HERNÁNDEZ, José Manuel *et al.* - **In vitro evaluation of osteoblastic**

- cells on bacterial cellulose modified with multi-walled carbon nanotubes as scaffold for bone regeneration. *Materials Science and Engineering C*. ISSN 09284931. 75:2017) 445–453. doi: 10.1016/j.msec.2017.02.074.
118. HOLZER, Judith C. J. *et al.* - **A novel human ex-vivo burn model and the local cooling effect of a bacterial nanocellulose-based wound dressing.** *Burns*. ISSN 18791409. 46:8 (2020) 1924–1932. doi: 10.1016/j.burns.2020.06.024.
119. MORITZ, Sebastian *et al.* - **Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine.** *International Journal of Pharmaceutics*. ISSN 18733476. 471:1–2 (2014) 45–55. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.04.062.
120. FU, Lina *et al.* - **Evaluation of bacterial nanocellulose-based uniform wound dressing for large area skin transplantation.** *Materials Science and Engineering C*. ISSN 09284931. 33:5 (2013) 2995–3000. doi: 10.1016/j.msec.2013.03.026.
121. XU, Wenyang *et al.* - **On Low-Concentration Inks Formulated by Nanocellulose Assisted with Gelatin Methacrylate (GelMA) for 3D Printing toward Wound Healing Application.** *ACS Applied Materials and Interfaces*. ISSN 19448252. 11:9 (2019) 8838–8848. doi: 10.1021/acsami.8b21268.
122. LIU, Jun *et al.* - **Hemicellulose-reinforced nanocellulose hydrogels for wound healing application.** *Cellulose*. ISSN 1572882X. 23:5 (2016) 3129–3143. doi: 10.1007/s10570-016-1038-3.
123. KHALID, Ayesha *et al.* - **Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds.** *Carbohydrate Polymers*. ISSN 01448617. 164:2017) 214–221. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.01.061.
124. WIEGAND, Cornelia *et al.* - **Antimicrobial functionalization of bacterial nanocellulose by loading with polihexanide and povidone-iodine.** *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. ISSN 15734838. 26:10 (2015). doi: 10.1007/s10856-015-5571-7.
125. ESPINOSA, Eduardo *et al.* - **Nanocellulose-based inks—effect of alginate content on the water absorption of 3D printed constructs.** *Bioengineering*. ISSN 23065354. 6:3 (2019). doi: 10.3390/bioengineering6030065.
126. SAINI, Seema *et al.* - **Contact Antimicrobial Surface Obtained by Chemical Grafting of Microfibrillated Cellulose in Aqueous Solution Limiting Antibiotic Release.** *ACS Applied Materials and Interfaces*. ISSN 19448252. 7:32 (2015) 18076–18085. doi: 10.1021/acsami.5b04938.
127. PLAPPERT, Sven F. *et al.* - **Anisotropic nanocellulose gel–membranes for drug**

- delivery: Tailoring structure and interface by sequential periodate–chlorite oxidation.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 226:October 2018 (2019) 115306. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115306.
128. SHI, Xiangning *et al.* - **PH- and electro-response characteristics of bacterial cellulose nanofiber/sodium alginate hybrid hydrogels for dual controlled drug delivery.** RSC Advances. ISSN 20462069. 4:87 (2014) 47056–47065. doi: 10.1039/c4ra09640a.
129. CARLSSON, Daniel O. *et al.* - **Aspirin degradation in surface-charged TEMPO-oxidized mesoporous crystalline nanocellulose.** International Journal of Pharmaceutics. ISSN 03785173. 461:1–2 (2014) 74–81. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.11.032.
130. TEHRANI, Abbas Dadkhah; NEYSI, Elham - **Surface modification of cellulose nanowhisiker throughout graft polymerization of 2-ethyl-2-oxazoline.** Carbohydrate Polymers. ISSN 01448617. 97:1 (2013) 98–104. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.082.
131. DONG, Shuping *et al.* - **Synthesis and cellular uptake of folic acid-conjugated cellulose nanocrystals for cancer targeting.** Biomacromolecules. ISSN 15264602. 15:5 (2014) 1560–1567. doi: 10.1021/bm401593n.
132. EMARA, Laila H. *et al.* - **Nano-crystalline cellulose as a novel tablet excipient for improving solubility and dissolution of Meloxicam.** Journal of Applied Pharmaceutical Science. ISSN 22313354. 6:2 (2016) 032–043. doi: 10.7324/JAPS.2016.60205.
133. THOMAS, Deepa; LATHA, M. S.; THOMAS, K. Kurien - **Synthesis and in vitro evaluation of alginate-cellulose nanocrystal hybrid nanoparticles for the controlled oral delivery of rifampicin.** Journal of Drug Delivery Science and Technology. ISSN 17732247. 46:October 2017 (2018) 392–399. doi: 10.1016/j.jddst.2018.06.004.
134. ZOPPE, Justin O. *et al.* - **Synthesis of cellulose nanocrystals carrying tyrosine sulfate mimetic ligands and inhibition of alphavirus infection.** Biomacromolecules. ISSN 15264602. 15:4 (2014) 1534–1542. doi: 10.1021/bm500229d.
135. HUANG, Lin *et al.* - **Nano-cellulose 3D-networks as controlled-release drug carriers.** Journal of Materials Chemistry B. ISSN 2050750X. 1:23 (2013) 2976–2984. doi: 10.1039/c3tb20149j.
136. L. CACICEDO, Maximiliano *et al.* - **Modified bacterial cellulose scaffolds for**

- localized doxorubicin release in human colorectal HT-29 cells.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. ISSN 18734367. 140:2016) 421–429. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.01.007.
137. KOLAKOVIC, Ruzica *et al.* - **Spray-dried nanofibrillar cellulose microparticles for sustained drug release.** *International Journal of Pharmaceutics*. ISSN 03785173. 430:1–2 (2012) 47–55. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.03.031.
138. PAUKKONEN, Heli *et al.* - **Nanofibrillar cellulose hydrogels and reconstructed hydrogels as matrices for controlled drug release.** *International Journal of Pharmaceutics*. ISSN 18733476. 532:1 (2017) 269–280. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.09.002.
139. MASRUCHIN, Nanang *et al.* - **Characteristics of TEMPO-oxidized cellulose fibril-based hydrogels induced by cationic ions and their properties.** *Cellulose*. ISSN 1572882X. 22:3 (2015) 1993–2010. doi: 10.1007/s10570-015-0624-0.
140. XIAO, Lin *et al.* - **Nanocellulose hyperfine network achieves sustained release of berberine hydrochloride solubilized with β -cyclodextrin for potential anti-infection oral administration.** *International Journal of Biological Macromolecules*. ISSN 18790003. 153:2020) 633–640. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.030.
141. LAVOINE, Nathalie *et al.* - **Controlled release of chlorhexidine digluconate using β -cyclodextrin and microfibrillated cellulose.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. ISSN 18734367. 121:2014) 196–205. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.06.021.
142. EDWARDS, J. Vincent *et al.* - **Peptide conjugated cellulose nanocrystals with sensitive human neutrophil elastase sensor activity.** *Cellulose*. ISSN 09690239. 20:3 (2013) 1223–1235. doi: 10.1007/s10570-013-9901-y.
143. LIU, He *et al.* - **Preparation of silver nanoparticles on cellulose nanocrystals and the application in electrochemical detection of DNA hybridization.** *Cellulose*. ISSN 09690239. 18:1 (2011) 67–74. doi: 10.1007/s10570-010-9464-0.
144. GOMES, Nathalia Oezau *et al.* - **Bacterial cellulose-based electrochemical sensing platform: A smart material for miniaturized biosensors.** *Electrochimica Acta*. ISSN 00134686. 349:2020) 136341. doi: 10.1016/j.electacta.2020.136341.
145. SHAHROKHIAN, Saeed; NADERI, Leila; GHALKHANI, Masoumeh - **Nanocellulose/Carbon Nanoparticles Nanocomposite Film Modified Electrode for Durable and Sensitive Electrochemical Determination of Metoclopramide.** *Electroanalysis*. ISSN 15214109. 27:11 (2015) 2637–2644. doi:

- 10.1002/elan.201500266.
146. RUIZ-PALOMERO, Celia *et al.* - **Fluorescent nanocellulosic hydrogels based on graphene quantum dots for sensing laccase.** *Analytica Chimica Acta*. ISSN 18734324. 974:2017) 93–99. doi: 10.1016/j.aca.2017.04.018.
147. LV, Pengfei *et al.* - **A highly flexible self-powered biosensor for glucose detection by epitaxial deposition of gold nanoparticles on conductive bacterial cellulose.** *Chemical Engineering Journal*. ISSN 13858947. 351:May (2018) 177–188. doi: 10.1016/j.cej.2018.06.098.
148. ORTOLANI, Túlio S. *et al.* - **Electrochemical sensing of purines guanine and adenine using single-walled carbon nanohorns and nanocellulose.** *Electrochimica Acta*. ISSN 00134686. 298:2019) 893–900. doi: 10.1016/j.electacta.2018.12.114.
149. SCHYRR, Bastien *et al.* - **Biosensors based on porous cellulose nanocrystal-poly(vinyl alcohol) scaffolds.** *ACS Applied Materials and Interfaces*. ISSN 19448252. 6:15 (2014) 12674–12683. doi: 10.1021/am502670u.
150. ANIRUDHAN, T. S.; DEEPA, J. R.; BINUSSREEJAYAN - **Electrochemical sensing of cholesterol by molecularly imprinted polymer of silylated graphene oxide and chemically modified nanocellulose polymer.** *Materials Science and Engineering C*. ISSN 09284931. 92:2018) 942–956. doi: 10.1016/j.msec.2018.07.041.
151. ZHANG, Taiji *et al.* - **Biotemplated synthesis of cold nanoparticle-bacteria cellulose nanofiber nanocomposites and their application in biosensing.** *Advanced Functional Materials*. ISSN 1616301X. 20:7 (2010) 1152–1160.
152. DONG, Lili *et al.* - **Poly(diallyldimethylammonium chloride)-cellulose nanocrystals supported Au nanoparticles for nonenzymatic glucose sensing.** *RSC Advances*. ISSN 20462069. 6:8 (2016) 6436–6442. doi: 10.1039/c5ra23935d.
153. SHAHROKHIAN, Saeed; BALOTF, Hamed; GHALKHANI, Masoumeh - **Nano composite coating based on cellulose nanofibers/carbon nanoparticles: application to voltammetric determination of clonazepam.** *Journal of Solid State Electrochemistry*. ISSN 14330768. 19:1 (2015) 251–260. doi: 10.1007/s10008-014-2597-6.
154. LIU, He *et al.* - **Synthesis and characterization of Ag-Pd alloy nanoparticles/carboxylated cellulose nanocrystals nanocomposites.** *Carbohydrate Polymers*. ISSN 01448617. 83:1 (2011) 38–43.
155. **BNC Scaffold - Shaping the future of cultivated meat** (2021). [Acedido a 20 junho de 2021]. Disponível na internet: <https://cassmaterials.com/cellular-agriculture/>

ANEXO I

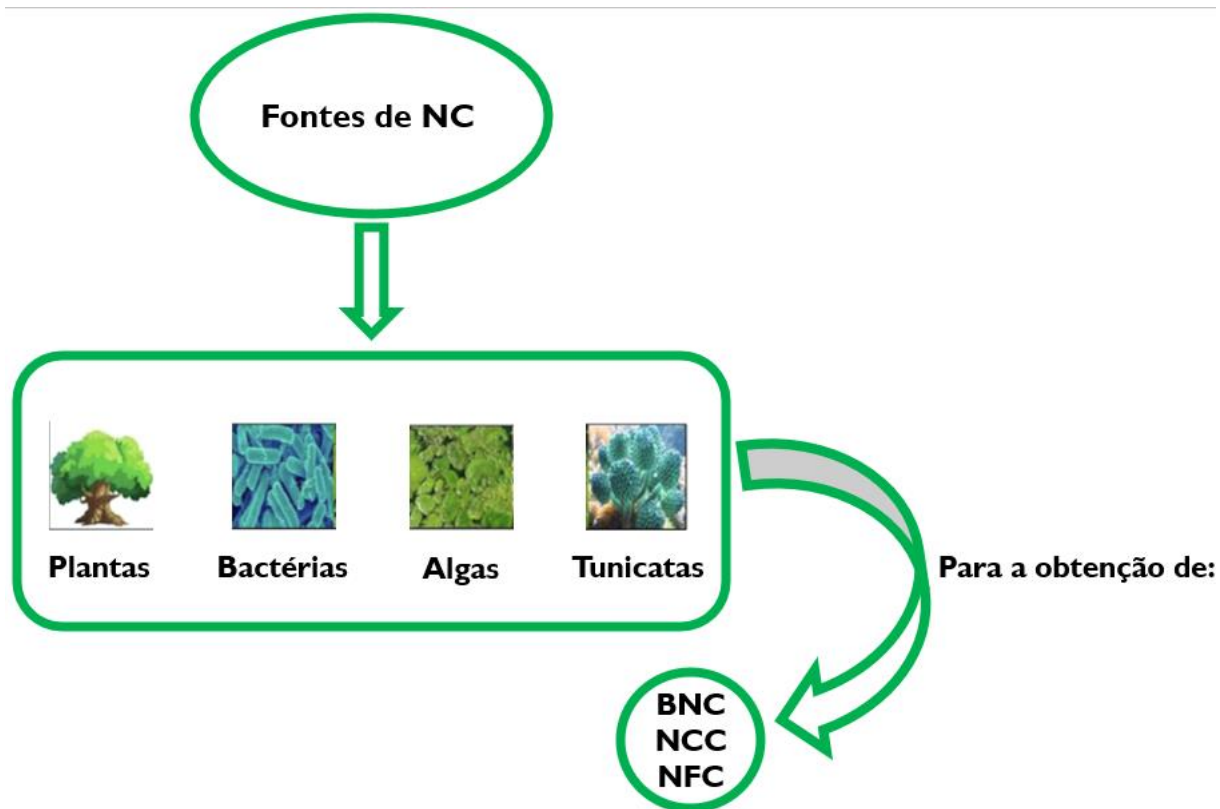


Figura I-1-A. Esquema das diferentes fontes dos três tipos de NC. (Adaptado de RAGHAV *et al.*⁹⁸).

ANEXO 2

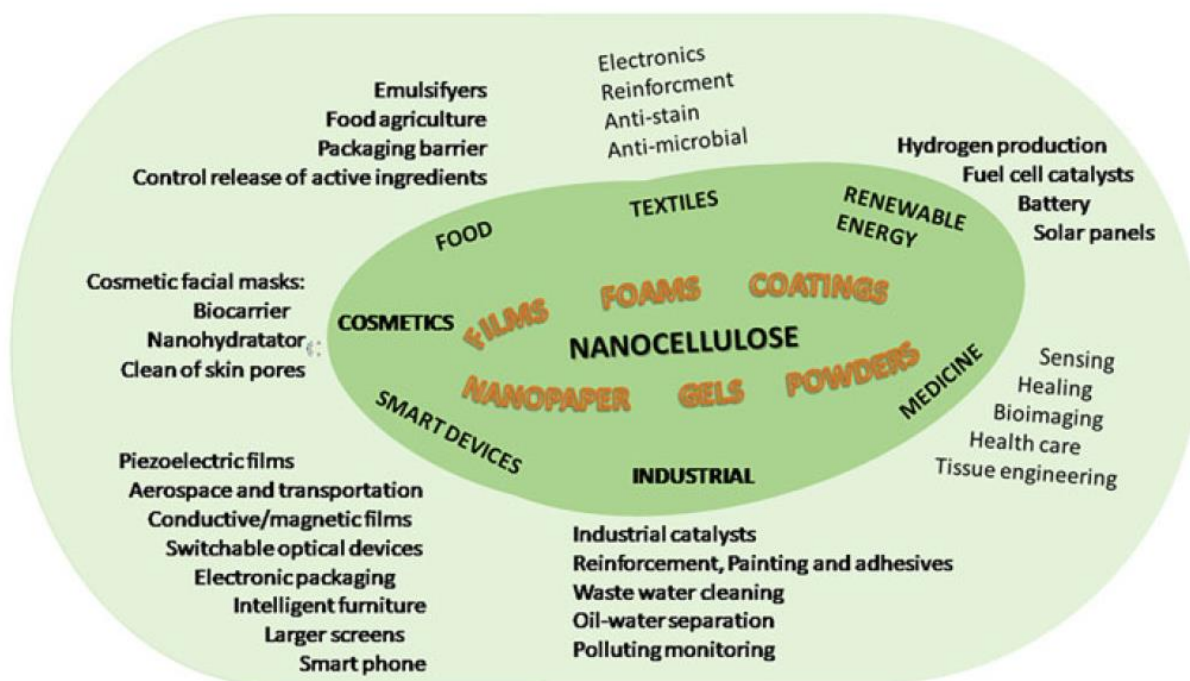


Figura 2-1-A. Esquema com as aplicações mais relevantes da NC. (Adaptado de SORIANO et al.¹⁵).

ANEXO 3

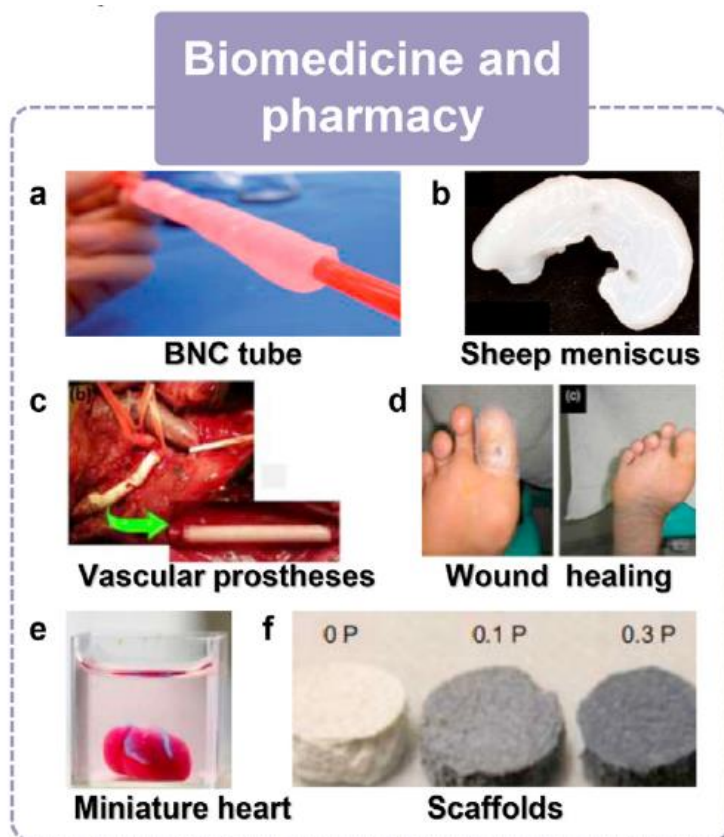


Figura 3-I-A. Aplicações farmacêuticas e na biomedicina da NC. (Adaptado de YU *et al.*⁶⁵).

ANEXO 4

Tabela 4-1-A. Descrição de algumas aplicações dos vários tipos de NC para engenharia de tecidos.

Tipo de nanocelulose	Objetivo	Aplicação	Resultados/Conclusões	Referência
BNC	Desenvolvimento de um composto com BNC, CS e Hep para aplicação num <i>scaffold</i> para a engenharia de tecidos vasculares.	Engenharia de tecidos	Compatibilidade celular apropriada para a proliferação celular.	99
NFC	Bio impressão 3D de hidrogéis com condrócitos humanos através da preparação de uma biotinta de NFC-A para a regeneração da cartilagem auricular.	Engenharia de tecidos	Excelente estabilidade após bio impressão 3D e cultura até 28 dias, sem apresentar citotoxicidade. Promove uma rediferenciação dos condrócitos, reestabelece e mantém o fenótipo condrogénico.	100
BNC	Desenvolvimento de um <i>biopatch</i> 3D para o tratamento da arritmia através de tintas de nanotubos de carbono complexados com BNC.	Engenharia de tecidos	Os <i>biopatches</i> apresentaram condutividade elétrica, revelando ser flexíveis e deformáveis.	101
NFC	Desenvolvimento de um <i>scaffold</i> através de nanocompósitos de CuO-NFC para a regeneração de tecidos musculares.	Engenharia de tecidos	Permitiu o crescimento e proliferação de células musculares L6, apresentando histocompatibilidade. Biodegradável, não tóxico e antimicrobiano.	102
NFC	Desenvolvimento de <i>scaffolds</i> à base de nanocompósitos de CNFs preparados por dissolução parcial como potenciais substitutos de tendões e ligamentos.	Engenharia de tecidos	Boa estabilidade e captação de água, sem citotoxicidade. Resistência e deformação indicadas para esta aplicação. Permitiu a aderência e crescimento dos fibroblastos e HEC com boa expressão fenotípica.	76
NFC	Avaliação da biocompatibilidade e possibilidade de transposição de escala de adMSCs e bmMSCs num hidrogel de NFC comercialmente disponível (GrowDex®).	Engenharia de tecidos	Interação com NFC com distribuição uniforme no hidrogel. As células mantiveram-se viáveis.	103
CNWs	Investigação da superfície de CNWs para induzir orientação de contato na linha celular mioblástica C2C12 do músculo esquelético para promover a sua miogénese.	Engenharia de tecidos	Diferenciação das MSCs em células osteogénicas. Promoção de morfologias orientadas pelos mioblastos C2C12, dependentes do grau de adsorção e orientação de CNWs.	104
NFC	Desenvolvimento de <i>scaffolds</i> à base de celulose para o crescimento e avaliação do tecido nervoso <i>in vitro</i> através de uma tinta condutora composta por NFC/CNT.	Engenharia de tecidos	Fusão e diferenciação terminal de C2C12 para produzir miotubos altamente orientados semelhantes ao tecido nativo.	105
BC	Desenvolvimento de <i>scaffolds</i> de nanofibras de BC revestidas com PLL por reticulação com posterior deposição de HAp em meio com SBF para demonstrar a bioatividade do composto com aplicação na engenharia de tecidos ósseos.	Engenharia de tecidos	Boa aderência à superfície e proliferação. Promissores para a produção de tecidos nervosos funcionais.	106
BC	Desenvolvimento de membranas de tubos ocos de celulose e CS para CABG.	Engenharia de tecidos	Capacidade em imitar a arquitetura de nanofibras de colagénio e HAp em tecido ósseo natural.	107
			Tubos ocos com propriedades mecânicas e compatibilidade celular promissoras para esta aplicação.	

BNC	Preparação de tubos de BNC através de um biorreator patenteado composto por tubos duplos de silício para uma possível prótese vascular.	Engenharia de tecidos	Os materiais de BNC tubulares sintetizados tinham propriedades desejáveis, como espessura uniforme, comprimento controlável e pequeno diâmetro interno, com potencial para implantes vasculares.	45
NCC	Produção de <i>scaffolds</i> de CNCs incorporados com PVA com posterior análise da integração de fibroblastos humanos <i>in vitro</i> .	Engenharia de tecidos	O <i>scaffold</i> não apresentou citotoxicidade e demonstrou uma forte fixação, proliferação e penetração de fibroblastos humanos, tendo potencial para esta aplicação.	49
BNC	Síntese de hidrogéis de BNC perfurados a laser após processamento como possível implante de cartilagem.	Engenharia de tecidos	Os hidrogéis perfurados a laser permitiram o crescimento de condrócitos bem como a sua movimentação por toda a matriz, isto é, são apropriados para reparar a cartilagem <i>in vivo</i> .	75
CNWs	Desenvolvimento de um <i>scaffold</i> para a engenharia de tecidos vasculares através da produção de um biomaterial à base de CNWs incorporado numa matriz de CAP.	Engenharia de tecidos	Excelente desempenho mecânico à temperatura corporal Elevado potencial para aplicação em engenharia de tecidos vasculares para enxertos de pequeno diâmetro.	108
CNWs	Desenvolvimento de um <i>scaffold</i> para a engenharia de tecidos vasculares através da produção de um biomaterial à base de CNWs incorporado numa matriz de CAP.	Engenharia de tecidos	Potencial como plataforma para projetar uma matriz extracelular artificial de um novo enxerto.	74
NFC	Desenvolvimento de um filme composto por NFC com HA para implantes de cartilagem.	Engenharia de tecidos	Os baixos coeficientes de atrito obtidos para estes filmes são da mesma ordem de grandeza dos da cartilagem articular. Os filmes desenvolvidos apresentam um elevado potencial para implantes de cartilagem, devido a uma complementaridade de propriedades da NFC com HA.	109
NCC/NFC	Melhoria das propriedades mecânicas do hidrogel de PVA através da introdução de NCC ou NFC sem alteração do teor em água e transparência para a imitação de tecidos moles de colagénio.	Engenharia de tecidos	Permitiu a produção de um conjunto de hidrogéis mecanicamente fortes, com propriedades semelhantes ao colagénio.	110
BNC	Avaliação das propriedades da BNC para implantes de substituição de cartilagem auricular.	Engenharia de tecidos	A BNC mostrou ser promissora para a produção de implantes auriculares não biodegradáveis com propriedades mecânicas adequadas e formatos específicos para os doentes.	13
NFC	Desenvolvimento de um <i>scaffold</i> através da adsorção de fibronectina à superfície do hidrogel de NFC para melhorar a aderência celular. Posteriormente, realizou-se uma reticulação com iões Ca^{2+} e Fe^{3+} para a investigação do crescimento de fibroblastos C3H10T1/2.	Engenharia de tecidos	A existência de um maior número de células nas superfícies do hidrogel de NFC modificadas com a proteína denota o seu elevado potencial para a aplicação nesta área.	73
NFC	Síntese de <i>scaffolds</i> eletrofiados compostos por PLA e PBS, reforçados por NFC para engenharia de tecidos vasculares.	Engenharia de tecidos	A adição de NFC levou a uma melhoria das características mecânicas do <i>scaffold</i> de PLA/PBS e também a um melhor desempenho ao nível da fixação e proliferação celular.	111

NFC	Síntese de hidrogéis à base de NFC e HG para a obtenção de uma cultura 3D de células hepáticas progenitoras HepaRG.	Engenharia de tecidos	Os hidrogéis mostraram ser boas matrizes para a formação de esferóides de hepatócitos em 3D. Os esferóides apresentaram uma boa expressão de marcadores dos hepatócitos, atividade metabólica e transporte molecular vetorial em direção ao compartimento do ducto biliar.	112
NFC	Síntese de um hidrogel composto por Tween®20, T3, NVP e NFC com posterior avaliação das suas propriedades para a substituição dos discos intervertebrais.	Engenharia de tecidos	Boa viabilidade celular. Bons candidatos para implantes.	113
BNC	Construção de três enxertos (G-BNC, S-BNC e D-BNC) com posterior comparação com um ePTFE usado clinicamente.	Engenharia de tecidos	Os enxertos apresentaram um melhor desempenho ao nível da permeabilidade à água, tempo de recalcificação do plasma, aderência plaquetária e grau de crescimento PIEC, com melhor troca de nutrientes, hemocompatibilidade e endotelização após a implantação, em relação ao ePTFE. G-BNC e D-BNC exibiram propriedades mecânicas adequadas, compatibilidade celular <i>in vitro</i> , o que provavelmente sugere que seriam bons candidatos para vasos sanguíneos artificiais.	42
NFC	Avaliação da capacidade de um hidrogel de NFC para criar um ambiente flexível para a proliferação e diferenciação de hPSCs.	Engenharia de tecidos	Possibilidade de um sistema de cultura 3D, flexível e “xeno-free” para a proliferação e diferenciação de hPSCs.	114
NFC	Obtenção de scaffolds 3D para implantes ao nível da engenharia de tecidos cardíacos a partir de suspensões aquosas de AceNFC.	Engenharia de tecidos	Os scaffolds com impressão 3D mostraram ser compatíveis com células mioblásticas cardíacas, o que possibilitou a proliferação e fixação de células, revelando um comportamento não tóxico.	115
NFC	Preparação de scaffolds porosos por reticulação parcial de hidrogéis de CNFs/SA com íons Ca ²⁺ , para a substituição do tecido duro danificado e reparar defeitos ósseos.	Engenharia de tecidos	Excelentes propriedades mecânicas, elevada resistência à deformação e módulo elástico. Material promissor para a aplicação pretendida.	57
BNC	Obtenção de scaffolds 3D porosos para diferenciação de células estaminais em adipócitos, utilizando células-tronco mesenquimais de uma linha celular (C3H10T1/2).	Engenharia de tecidos	Método promissor para a produção de tecido adiposo.	116
NCC	Formação de um revestimento híbrido de CNCs-BG depositado em aço inoxidável a partir de uma suspensão aquosa para o revestimento de implantes ortopédicos.	Engenharia de tecidos	Os estudos em culturas celulares indicaram que a presença do revestimento CNCs-BG acelerou substancialmente a fixação, proliferação e diferenciação celular, bem como a mineralização da matriz extracelular. Os CNCs regularam a mineralização das partículas de BG, permitindo a obtenção de híbridos de CNCs-BG mineralizados para revestimentos de implantes ortopédicos.	52

BC	Desenvolvimento de um scaffold 3D para a cultura celular de osteoblastos através da utilização de BC combinada com MWNTs.	Engenharia de tecidos	Verificou-se o crescimento de osteoblastos no scaffold bem como a sua proliferação e aderência devido à compatibilidade interfacial entre as células e o scaffold. Bom potencial para a regeneração óssea.	117
----	---	-----------------------	--	-----

Abreviaturas utilizadas na Tabela 4-1-A: **CS** – Quitosano; **Hep** – Heparina; **3D** – Tridimensional; **NFC-A** – Celulose nanofibrilada com alginato; **CuO-NFC** – Celulose nanofibrilada com óxido de cobre; **HEC** – Células endoteliais vasculares humanas; **adMSCs** – Células estaminais mesenquimais derivadas do tecido adiposo; **bmMSCs** – Células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea; **MSCs** – Células estaminais mesenquimais **NFC/CNT** – Celulose nanofibrilada com nanotubos de carbono; **BC** – Celulose bacteriana; **PLL** – Poli-L-Lisina; **HAp** – Hidroxiapatite; **SBF** – Fluido corporal simulado; **CABG** – Enxerto de revascularização do miocárdio; **PVA** – Acetato de polivinilo; **CAP** – Propionato de acetato de celulose; **HA** – Ácido hialurônico; **PLA** – Ácido láctico; **PBS** – Tampão fosfato salino; **HG** – Gelatina de ácido hialurônico; **T3** – Trimetacrilato; **NVP** – N-vinilpirrolidona; **ePTFE** – Vaso sanguíneo artificial; **PIEC** – Células endoteliais ilíacas de porco; **hPSCs** – Células estaminais humanas pluripotentes; **AceNFC** – Nanofibras de celulose acetiladas; **CNFs/SA** – Nanofibras de celulose/alginato de sódio; **BG** – Bioglass 45S5 (fosfossilicato de sódio e cálcio); **CNCs-BG** – Nanocristais de celulose com Bioglass 45S5 (fosfossilicato de sódio e cálcio); **MWNTs** – Nanotubos de carbono de parede múltipla.

Tabela 4-2-A. Descrição de algumas aplicações dos vários tipos de NC em tratamentos para a cicatrização de feridas.

Tipo de nanocelulose	Objetivo	Aplicação	Resultados/Conclusões	Referência
BNC	Incorporação da bromelaína em membranas de BNC para aumentar as propriedades antimicrobianas.	Tratamento de feridas com sistema de libertação de fármacos com bromelaína	Maior atividade antimicrobiana. Possível minimização do tempo de cura e risco de infecção. Promove o conforto e alívio da dor.	39
BNC	Preparação de um explante de tecido humano para avaliar o efeito da BNC em queimaduras.	Tratamento de feridas e redução dos danos da pele impedindo uma perda transepidermica de água	Efeitos de arrefecimento positivos em contacto com queimaduras.	118
NCC	Desenvolvimento de um filme de CNCs revestido com mel, utilizando PVP como ligando para cicatrizar feridas.	NC como sistema de libertação de mel para cicatrizar feridas	Boa cinética de libertação do mel e boas propriedades antimicrobianas.	81
BNC	Incorporação de PHMB e de sericina nas redes da BNC para cicatrização de feridas.	Cicatrização de feridas	Associação muito promissora com diminuição da inflamação e rápida cicatrização.	40
BNC	Incorporação de octenidina em BNC através de um processo de pós-síntese.	Tratamento de feridas agudas e crónicas	Boa biocompatibilidade, cicatrização e controlo da infecção. Sem efeitos adversos. Elevado potencial para o tratamento de feridas.	119
BNC	Produção de BNC e obtenção de filmes com posterior análise das propriedades para tratamento de lesões cutâneas com apósitos.	Tratamento para lesões na pele	Boa biocompatibilidade. Vantagem para a reparação de tecidos e transplante de pele.	120
NFC	Formação de um filme através da adição de PEG com variação do grau de nanofibrilação da NFC com posterior avaliação da aplicação em feridas.	Absorção de exsudatos em feridas crónicas	O grau de fibrilação e a adição de PEG permitem uma otimização dos apósitos para feridas.	55
NFC	Avaliação das propriedades antimicrobianas de suspensões de NFC inoculadas com PAOI e posterior comparação com Aquacel®.	Avaliação das propriedades antimicrobianas em apósitos	Inibição eficaz do crescimento bacteriano.	63
NFC	Avaliação do potencial de NFC como apósitos para queimaduras em nove doentes com pele isolada a partir de doadores.	Promoção da regeneração cutânea em doentes queimados	Boa biocompatibilidade. Boa aderência ao leito da ferida. Bom efeito de cicatrização.	59
BNC	Desenvolvimento de híbridos à base de BNC com AgNPs para a cicatrização de feridas.	Tratamento para feridas	Elevado potencial para cicatrização de feridas.	41
NFC	Impressão 3D de scaffolds de NFC com GelMA para cicatrização de feridas.	Aplicações para tratar feridas	Sem toxicidade. Biocompatível. Promoção da proliferação de fibroblastos.	121

NFC	Incorporação de três tipos de HM a partir de dois métodos distintos, com formação de hidrogéis totalmente à base de polissacarídeos para cicatrização de feridas.	Tratamento para feridas	Elevado potencial para cicatrização de feridas.	122
BNC	Desenvolvimento de nanopartículas de BC com ZnO para queimaduras.	Cicatrização de queimaduras na pele	Inibição do crescimento dos agentes patogénicos estudados. Ótimas propriedades no tratamento e regeneração dos tecidos.	123
NFC	Obtenção de hidrogéis através da reticulação da NFC com Ca^{2+} , utilizando-se dois tipos de NFC.	Tratamento para feridas	Boa biocompatibilidade. Resultados positivos para aplicação na cicatrização de feridas.	60
NFC	Preparação através de liofilização de um scaffold de CNFs com fibroína de seda.	Tratamento para feridas	Boa biocompatibilidade e cicatrização.	82
BNC	Produção de redes de BNC (pBNC e cBNC), incorporadas com PI em comparação com BNC incorporada com PHMB para o tratamento de feridas.	Tratamento de feridas crónicas e infeçadas	BNC incorporada com PI com um perfil de libertação mais lento. BNC incorporada com PHMB mostrou uma melhor janela terapêutica.	124
NFC	Impressão 3D de estruturas porosas de NFC com variação da concentração de alginato para reticulação iónica com $CaCl_2$ com potencial para cicatrização de feridas.	Cicatrização de feridas	Boa aplicabilidade para cicatrização de feridas.	125
MFC	Desenvolvimento de filmes com atividade antimicrobiana de superfície através da modificação da superfície da MFC com o antibiótico benzilpenicilina.	Apósitos com atividade antimicrobiana	Bom efeito antimicrobiano. Resultados promissores para aplicação em sistemas antimicrobianos não lixiviantes.	126

Abreviaturas utilizadas na Tabela 4-2-A: PVP – Polivinil pirrolidona; PHMB – Polihexanida; PEG – Polietilenoglicol; PAOI – *Pseudomonas aeruginosa* PAOI; AgNIPs – Nanopartículas de prata; 3D – Tridimensional; GelMA – Metacrilato de gelatina; HM – Hemicelulose; ZnO – Óxido de zinco; pBNC – Amostras de BNC em placa com 24 poços; cBNC – Amostras de BNC cortadas; PI – Iodopovidona; $CaCl_2$ – Cloreto de cálcio.

Tabela 4-3-A. Descrição de algumas aplicações dos vários tipos de NC em sistemas de liberação de fármacos.

Tipo de nanocelulose	Objetivo	Aplicação	Resultados/Conclusões	Referência
NCC	Desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de PTX, baseado na modificação da superfície do hidrogel de CNCs com HDA e grupos carboxilo.	Terapia contra o cancro	Elevada estabilidade e eficiência na entrega de fármacos no local terapêutico desejado através de um sistema sensível ao pH.	50
NFC	Desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de DOX através da formação de um hidrogel poli-iônico complexo.	Terapia contra o cancro	Boa biocompatibilidade. Bom sistema de liberação controlada de fármacos.	58
NCC	Desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de fármacos hidrofóbicos (DTX, PTX e ETOP) e ionizados (DOX e TET) através da modificação da superfície de NCC com CTAB.	Terapia contra o cancro	Boa biocompatibilidade. Bom sistema de liberação controlada de fármacos.	48
NCC	Desenvolvimento de um sistema de liberação de VC através da preparação de CNC-CSos com encapsulação de VC e posterior formação de complexos CNCs/VC com TPP.	Sistema de liberação de VC	O complexo formado apresentou-se como um sistema antioxidante dinâmico, tendo sido considerado como um excelente candidato para aplicações em cosmecêuticos tópicos.	53
NFC	Desenvolvimento de um sistema de liberação transdérmica de PRX.	Sistema de liberação transdérmica de fármacos (AINEs)	Boa capacidade para liberação controlada do fármaco. Boa aplicabilidade de adesivos à base de NFC para sistemas transdérmicos.	127
BNC	Modulação de sistema de liberação controlada de DCF através de nanocompósitos de PMGly/BNC.	Sistema de liberação controlada de fármacos (AINEs)	Sistema de liberação controlada sensível ao pH. Boa aplicabilidade para sistemas orais e transdérmicos.	84
BNC	Desenvolvimento de um sistema de liberação de IBU através de hidrogéis híbridos compostos por BNC com SA.	Sistema de liberação de fármacos	Resultados promissores como sistemas de liberação controlada de fármacos.	128
NCC	Avaliação da importância das cargas de superfície da NCC mesoporosa na estabilidade química da aspirina em sistemas de liberação de fármacos.	Sistema de liberação de fármacos	Degradação acelerada da aspirina.	129
CNWs	Desenvolvimento de sistemas de entrega de genes através da preparação de CNWs modificados quimicamente.	Sistema de entrega de genes	Potencial como sistema de entrega de genes.	130
NCC	Desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos vetorizados através da síntese de conjugados de ácido fólico com NCC.	Terapia contra o cancro	O sistema atingiu o alvo terapêutico pretendido. Promissores para esta aplicação, sem apresentar citotoxicidade.	131
NCC	Utilização de NCC como excipiente para aumentar a solubilidade e dissolução de MX.	Sistema de liberação de fármacos (AINEs)	Elevado potencial para esta aplicação, com melhoria das propriedades do MX.	132
NCC	Desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de RIF através da síntese de nanopartículas de ALG-NCC por gelificação iônica com Ca ²⁺ , estabilizados com mel.	Sistema de liberação controlada de fármacos	Elevado potencial para esta aplicação por administração oral.	133

NCC	Inibição da infecção por alfavírus através da síntese de CNCs incorporados com ligandos miméticos de sulfato de tirosina.	Inibição da infecção por alfavírus	Resultados promissores para esta aplicação.	134
BNC	Desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de fármacos de duas formas de berberina na BNC.	Sistema de libertação controlada de fármacos	Promissor para administração oral ou transdérmica.	135
BNC	Desenvolvimento de um sistema de libertação de DOX vetorizado através da modificação da BNC com alginato.	Terapia contra o cancro	Promissor para a utilização em terapias contra tumores sólidos.	136
NFC	Desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de fármacos pouco solúveis em água (beclometasona, indometacina e itraconazol) através de uma rede de fibra apertada.	Sistema de libertação controlada de fármacos	Obtenção de um sistema de libertação controlada de fármacos até 3 meses. Não aplicáveis a administração oral.	56
NFC	Desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de indometacina, metoprolol, verapamil, nadolol, ibuprofeno e atenolol através de micropartículas de NFC atomizadas.	Sistema de libertação controlada de fármacos	Obtenção de um sistema de libertação controlada de fármacos até 2 meses. A fibra apertada limita a difusão dos fármacos.	137
NFC	Desenvolvimento de um sistema de libertação controlada através de matrizes de ANFC do tipo reservatório para fármacos e proteínas de elevado PM (lisozima, albumina sérica bovina e dextrano) e de baixo PM (metronidazol, nadolol e cetoprofeno).	Matrizes para libertação controlada de fármacos	Obtenção de sistemas de libertação controlada para os vários tipos de fármacos.	138
MFC/NFC	Desenvolvimento de um hidrogel através de interações iónicas entre os grupos carboxilo carregados negativamente e três aditivos para relacionar o tipo de hidrogel com o seu comportamento como sistema de libertação de fármacos (teofilina).	Sistema de libertação de fármacos.	Existe uma relação própria entre a estrutura e as propriedades dos hidrogéis, tendo estas impacto no tipo libertação de fármacos.	139
BNC	Desenvolvimento de um sistema de libertação controlada da BBH/ β -CD a partir da BNC.	Sistema de libertação controlada de fármacos.	Os hidrogéis mostraram um elevado espectro de ação antibacteriana. Apresentaram boa biocompatibilidade bem como uma libertação controlada da BBH. Resultados promissores para utilização como sistema de administração oral para o tratamento de infeções gastrointestinais.	140
MFC	Desenvolvimento de um sistema de libertação controlada de CHX através da mistura de β -CD e MFC separadamente.	Sistema de libertação controlada de fármacos	O sistema de CHX/ β -CD permitiu uma libertação mais gradual ao longo do tempo. O sistema de CHX/MFC apresentou uma libertação mais rápida ao longo do tempo. O sistema de CHX/MFC/ β -CD conduziu a uma libertação inicial elevada de CHX seguida de uma libertação controlada no restante tempo de estudo.	141

Abreviaturas utilizadas na Tabela 4-3-A: **PTX** – Paclitaxel; **HDA** – Hexadecilamina; **DOX** – Doxorubicina; **DTX** – Docetaxel; **ETOP** – Etoposido; **TET** – Tetraciclina; **CTAB** – Brometo de cetrimônio; **VC** – Vitamina C; **CNC-CS_{os}** – Nanocristais de celulose modificada com oligossacarídeo de quitosano; **CNCS/VC** – Complexo entre VC e CNC-CS_{os}; **TPP** – Tripolifosfato; **PRX** – Piroxicam; **AINEs** – Anti-inflamatórios não esteróides; **DCF** – Diclófenac; **PMGly/BNC** – Nanocompósitos de nanocelulose bacteriana/poli-(N-metacrilil glicina); **IBU** – Ibufrofeno; **SA** – Alginato de sódio; **MX** – Meloxicam; **RIF** – Rifampicina; **ALG – NCC** – Celulose nanocristalina – alginato; **ANFC** – Celulose nanofibrilada aniônica; **PM** – Peso molecular; **BBH/β-CD** – Berberina/β- ciclodextrina; **BBH** – Berberina; **CHX** – Gluconato de clorexidina; **β-CD** – β- ciclodextrina; **CHX/β-CD** – Gluconato de clorexidina/β- ciclodextrina; **CHX/MFC** – Gluconato de clorexidina/celulose microfibrilada; **CHX/MFC/β-CD** – Gluconato de clorexidina/celulose microfibrilada/ β- ciclodextrina.

Tabela 4-4-A. Descrição de algumas aplicações dos vários tipos de NC em biossensores.

Tipo de nanocelulose	Objetivo	Aplicação	Resultados/Conclusões	Referência
NFC	Modificação topológica de filmes resistentes à água por oxidação e reações de acoplamento para imunossaios e diagnóstico.	Biossensores	Deteção de moléculas carregadas positivamente. IgG imobilizados na superfície ativada.	62
NCC	Utilização de CCN para a deteção de HNE.	Biossensores	Utilidade em diagnóstico e aplicações <i>in situ</i> para uma rápida e sensível deteção de HNE em feridas crónicas e outras doenças inflamatórias.	142
NCC/NFC	Formação de CNCs mediado por DES e de CNFs para preparação de um conjugado peptídico-celulósico para deteção de HNE.	Biossensores	O sensor apresentou uma boa sensibilidade e aplicabilidade para a deteção de biomarcadores da protease em feridas crónicas e outras doenças inflamatórias.	16
NCC	Preparação de nanocompósitos de NCC carboxilada com AgNPs para a deteção elétrica de hibridização de ADN.	Biossensores	Método sensível e seletivo.	143
BC	Desenvolvimento de um biossensor eletroquímico em substratos de BC para a deteção de lactato em suor artificial. O eletrodo foi modificado com PBNcs.	Biossensores	A BC permitiu a imobilização da lactato oxidase diretamente na sua superfície após a funcionalização química do biossensor. Apresentou biocompatibilidade, sensibilidade e elevada resistência mecânica.	144
NCC	Desenvolvimento de um biossensor através da imobilização de ChOx num SPE de PANI/NCC revestido com uma camada fina de LI para a deteção do colesterol.	Biossensores	Capacidade de monitorização do colesterol de forma rápida e com elevada sensibilidade. Determinação dos valores de colesterol sem interferências. Resultados satisfatórios em relação à repetibilidade operacional, reprodutibilidade e estabilidade, sugerindo grandes vantagens para a deteção de colesterol em diagnósticos clínicos.	51
NC	Desenvolvimento de um sensor eletroquímico através de um GCE modificado com NC/CNPs para a deteção voltamétrica de MCP.	Sensores	Apresentou um limite de deteção baixo para MCP em preparações farmacêuticas e amostras de soro de sangue humano. Resposta rápida, estabilidade a longo prazo e boa reprodutibilidade.	145

NFC	Construção de hidrogéis fluorescentes através da combinação de NC com S, N-GQDs para monitorização da lacase.	Biossensores	Apresentou boa sensibilidade e especificidade para a lacase. Os sinais óticos de S, N-GQDs foram alcançados mais rapidamente na presença do hidrogel.	146
BC	Obtenção de um biossensor para a deteção de glucose através da deposição epitaxial de nanopartículas de ouro em BC.	Biossensores	Apresentou elevada potência, limite de deteção baixo de glucose e sensibilidade.	147
NC	Obtenção de um NC-SWCNH/GCE para a deteção de guanina e adenina.	Biossensores	Demonstrou elevada sensibilidade e atividade eletrocatalítica para a determinação simultânea de guanina e adenina. Limites de deteção inferiores quando comparado com outros elétrodo utilizados na deteção simultânea de purinas. Fácil preparação e apresentou uma adequada repetibilidade.	148
NCC	Preparação de <i>scaffolds</i> funcionais com elevada área de superfície baseados em NCC e PVA para deteção de fluorescência.	Biossensores	Os <i>scaffolds</i> à base de NCC e PVA demonstraram ser versáteis para o desenvolvimento de novos biossensores para aplicações em diagnóstico de feridas e outras áreas biomédicas.	149
NC	Desenvolvimento de um sensor eletroquímico através da síntese de MIP [(Si-GO-g-CMNC)] para a deteção de colesterol.	Sensores	Apresentou um baixo limite de deteção, boa reprodutibilidade e estabilidade. O sensor mostrou ser adequado para a análise de amostras de sangue: contudo a sua especificidade deverá ser melhorada.	150
BC	Preparação de nanocompósitos à base de ouro e BC, com utilização de PEI como agente redutor e de ligação para aplicação em biossensores.	Biossensores	Verificou-se um efeito sinérgico entre o ouro e a BC. Apresentou uma deteção de H ₂ O ₂ de 1 μmol. Resultados promissores para imobilização de enzimas e fabrico de biossensores.	151
NCC	Deposição de AuNPs em CNCs funcionalizados com PDDA para deteção eletroquímica da glucose.	Biossensores	Verificou-se uma boa deteção eletroquímica da glucose. Potencial para aplicações futuras.	152
NFC	Desenvolvimento de um sensor eletroquímico através de um GCE modificado com CNFs/CNPs para a deteção voltamétrica de CLNP.	Sensores	Apresentou boa reprodutibilidade, excelente repetibilidade e baixo limite de deteção. Sensor com elevado potencial para a deteção de CLNP em preparações farmacêuticas e clínicas.	153
NCC	Integração de PPy/CNCs com GOx para obtenção de uma nova forma de deteção de glucose.	Biossensores	Este sensor apresentou uma boa estabilidade, reprodutibilidade, elevada sensibilidade e rápida transferência de eletrões.	85
NCC	Incorporação de nanocompósitos constituídos por nanopartículas de ligas de Ag-Pd em NCC carboxilada para a deteção eletroquímica de hibridização de ADN.	Biossensores	Os resultados confirmaram a aplicabilidade do composto para o objetivo pretendido.	154

Abreviaturas utilizadas na Tabela 4-4-A: IgG – Imunoglobulina G; CCN – Nanocristais de celulose de algodão conjugados com peptídeos; HNE – Elastase neutrofílica humana; DES – Deep eutectic solvent; solvente eutéctico profundo; AgNPs – Nanopartículas de prata; ADN – Ácido desoxirribonucleico; BC – Celulose bacteriana; PBNCs – Nanocubos de azul da Prússia; ChOx – Colesterol oxidase; SPE – Elétrodo serigrafado de carbono; PNAi/NCC – Polianilina/celulose nanocristalina; LI – Líquido iónico; GCE – Elétrodo de carbono vítreo; NC/CNPs – Composto à base de nanopartículas de carbono com nanocelulose; MCP – Metoclopramida; S, N-GQDs – S, N-pontos quânticos de grafeno; NC-SWCNH/GCE – Elétrodo de carbono vítreo à base de nanocelulose e *nanohorn* de carbono de parede única; PVA – Acetato de polivinilo; MIP [(Si-GO-g-CMNC)] – Óxido de grafeno sililado modificado quimicamente com nanocelulose; PEI – Polietilenoimina; H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio; AuNPs – Nanopartículas de ouro; PDDA – Cloreto de polidialildimetilamónio; CNFs/CNPs – Nanofibras de celulose/nanopartículas de carbono; CLNP – Polipirrol/nanocristais de celulose; GOx – Glucose oxidase; Ag-Pd – Prata-paládio.

ANEXO 5

Nanocellulose Market, Revenue (%), by End-user Industry, Global, 2020

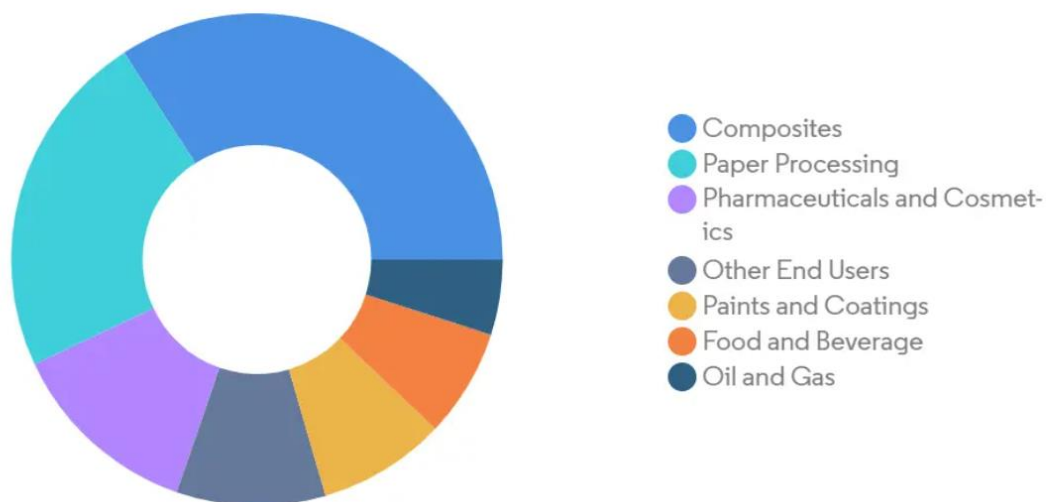


Gráfico 5-1-A. Representação das diferentes aplicações do mercado da NC e respectivas receitas em percentagem por indústria em 2020. (Adaptado de MORDOR INTELLIGENCE®).

BNC

SCAFFOLD

Product Technical Specification

BNC Sheets



This unique *in vitro* cell culture and tissue engineering scaffold is made from 100% Bacterial NanoCellulose.

Product Description

The BNC Sheet's three-dimensional matrix is designed to be used in small to large scale tank reactors for animal cell culture. Made from 100% cellulose, this all-natural scaffold is a dietary and edible fibre. The nano-fibres have diameters ranging from 20-100nm, which gives the BNC Sheet a very large surface area for cell attachment. The BNC Sheet has excellent mechanical and thermal stability.

Features & benefits

Edible
 High Fibre
 Biodegradable

Features	Benefits
Physical dimensions	A 3-D cellulose matrix with nano-fibrils ranging in diameter from 20-100nm.
All natural and non-synthetic	Totally biodegradable.
Dietary	Bacterial nanocellulose is a dietary edible fibre.
Stability	The BNC Sheet has excellent mechanical and thermal stability.
Porosity	Interconnecting pores throughout the matrix will allow cells to migrate throughout the scaffold. Also allows media permeation and gas exchange for long term cell survival.
Density	<0.1g/cm ³
Shape	BNC Sheets can be manufactured in all shapes and sizes.
Shipping and Storage	As the scaffold is made from cellulose, it can be shipped and stored at room temperature.
Sterility	Unsterile
Colour	White
Moisture Retention	Up to 14x own dry weight.
Harvesting of Cells	Because the BNC Sheet is made from an edible cellulose fibre, there is no need to separate cells from the scaffold.
Usage and Purpose	Samples for research and development purposes only. Refer to MSDS.

Instructions for use

Rehydration

The dry BNC Sheet is hydrated in a calcium and magnesium free PBS (10g/L). The air trapped in the BNC Sheet, causing it to float, is removed using a mild vacuum. The BNC Sheet will sink once all the trapped air is removed. Once rehydrated, the BNC Sheet will become flexible.

Sterilisation

Without removing the PBS, the BNC Sheet can be sterilised by autoclaving (for example 121°C for 15 minutes at 15psi).

Washing

Remove the PBS either by suction or decanting, add new PBS and mix. Remove PBS and add culture medium.

Product of Cass Materials

cassmaterials.com

Figura 6-1-A. Scaffold de BNC já comercializado. (Adaptado de CASSMATERIALS¹⁵⁵).