



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**APLICAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUZIDOS
POR VIA BIOLÓGICA EM SISTEMAS DE VEICULAÇÃO DE
FÁRMACOS**

Trabalho submetido por
Pedro Manuel Morgado Martinho
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2013



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**APLICAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUZIDOS
POR VIA BIOLÓGICA EM SISTEMAS DE VEICULAÇÃO DE
FÁRMACOS**

Trabalho submetido por
Pedro Manuel Morgado Martinho
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora M. Catarina M. Dias de Almeida

Outubro de 2013

Agradecimentos

Expresso os meus agradecimentos, em primeiro lugar, à minha orientadora; a Professora Dra. Catarina Almeida, pela sua orientação, conselhos e disponibilidade que sempre apresentou para me ajudar nesta monografia.

Aos meus pais e irmãs por todo o apoio que me deram e pela sua paciência inesgotável ao longo de todo este tempo, aqui vos deixo um profundo agradecimento.

Por último, aos amigos que me acompanharam ao longo destes anos e que marcaram este percurso da minha vida e por serem sempre os primeiros a expressarem palavras de motivação, o meu muito obrigado.

Resumo

Actualmente, os sistemas de veiculação de fármacos são uma área da farmacologia de grande importância. A capacidade de melhorar a utilização de fármacos, no que diz respeito às suas limitações terapêuticas, é fundamental para a evolução do tratamento de diversas patologias. Os polihidroxialcanoatos são um grupo de biopolímeros produzidos por uma grande variedade de microrganismos, como reserva de carbono e energia. As suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e possibilidade de modificação das suas propriedades têm vindo a despertar um grande interesse em diversas aplicações médicas, incluindo a veiculação de fármacos. Neste trabalho serão abordadas as diferentes propriedades deste grupo de polímeros assim como as suas aplicações na área da veiculação de fármacos.

Palavras-chave: polihidroxialcanoatos; biopolímeros; biossíntese; veiculação de fármacos

Abstract

Nowadays, drug delivery systems are an important field of pharmacology. The ability to improve the application of different drugs, concerning their therapeutical restraints, is fundamental to the development of the treatment of several pathologies. Polyhydroxyalkanoates (PHA) are a class of biopolymers synthesized by a number of microorganisms, as a carbon and energy storage compound. PHA's biodegradability, biocompatibility and capability of modification have developed a great interest in multiple medical applications, including drug delivery systems. This paper will address the different properties of this group of biopolymers as well as their application in drug delivery systems.

Keywords: polyhydroxyalkanoates; biopolymers; biosynthesis; drug delivery systems

Índice

1. Introdução.....	17
2. Polihidroxialcanoatos	19
3. Biossíntese de PHA	23
4. Propriedades de PHA	31
4.1. Modificações	32
4.2. Biodegradabilidade.....	33
4.3. Biocompatibilidade.....	34
5. Aplicações de PHA.....	37
6. Utilização de PHA em Sistemas de Veiculação de Fármacos.....	41
6.1. Micro/Nanopartículas	42
6.2. Tipos de Fármacos Utilizados	45
6.3. Tipos de Sistemas de Veiculação de Fármacos	47
7. Conclusão	51
8. Bibliografia.....	53

Índice de Figuras

Figura 1 - Acumulação de PHA no interior de bactérias (a barra representa 0,5 μm). Adaptado de Sudesh, Abe & Doi (2000).	19
Figura 2 – Estrutura química geral de um polímero de PHA produzido em bactérias. Adaptado de H. Wu et al. (2003).	21
Figura 3 – Estrutura de um grânulo de PHA e seus constituintes. Adaptado de Grage et al. (2009).	24
Figura 4 - Utilização de PHA em engenharia de tecidos. Adaptado de S. F. Williams, Martin, Horowitz & Peoples (1999).	38
Figura 5 - Variadas aplicações médicas de PHA. (A) - Esófago artificial; (B) - Enxerto vascular; (C) - Tecido condutor de um nervo; (D) - Cartilagem de uma articulação. Adaptado de Q. Wu et al., (2009).	40
Figura 6 - Representação da estratégia de micelas com ligandos específicos a partir de blocos de copolímeros de P3HB-proteína com incorporação de fármaco com agregação autónoma. Adaptado de H. N. Kim et al. (2009).	45
Figura 7 - Imagens de microscópio electrónico de varrimento ilustrando os diferentes efeitos da incorporação de ácido fusídico em micropartículas de P3HB3HV (A-D) e a sua degradação ao fim de 1 semana (E-H). Adaptado de Yang et al. (2009).	50

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Possíveis polímeros formados por diferentes radicais. Adaptado de Wu <i>et al.</i> (2003) e Reemmer (2009).....	22
Tabela 2 – Características de vários PHA. Adaptado de Koller et al. (2010); D. Y. Kim et al. (2007); Sudesh et al. (2011) e Williams & Martin (2002).....	31

Lista de Abreviaturas

FDA - *Food and Drug Administration*

ISO - *International Organization for Standardization*

lclPHA - PHA de cadeia longa (*long length chain*)

mclPHA - PHA de cadeia média (*medium length chain*)

P3HB - poli-3-hidroxi butirato

P3HB3HHx - poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato)

P3HB3HO - poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi octanoato)

P3HB3HV - poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)

P3HB4HB - poli (3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato)

P3HN - poli-3-hidroxi nonanoato

P3HO - poli-3-hidroxi octanoato

P3HO3HHx - poli (3-hidroxi octanoato-co-3-hidroxi hexanoato)

P3HP - poli-3-hidroxi propionato

P3HUD - poli-3-hidroxi undecanoato

P3HV - poli-3-hidroxi valerato

P4HB - poli-4-hidroxi butirato

P5HV - poli-5-hidroxi valerato

PEG - polietilenoglicol

PHA - polihidroxi alcenoatos

PhaP - proteínas estruturais de grânulos de PHA

PI3Ks - fosfatidilinositol-3-quinases

PLA - ácido polilático

PLGA - ácido poli-lático-glicólico

sclPHA - PHA de cadeia curta (*short chain length*)

1. Introdução

O estudo de sistemas de veiculação de fármacos tem sido intenso nos últimos anos devido à necessidade de potenciar os efeitos terapêuticos de diversos fármacos (Kim, Lee, Kim & Kim, 2009). O *design* de sistemas de veiculação de fármacos controlada é uma linha de farmacologia promissora e de rápida evolução (Shishatskaya, Goreva, Kalacheva & Volova, 2009).

Os biopolímeros são uma das possíveis soluções para substituir alguns polímeros extraídos do petróleo (Chanprateep, 2010). Embora alguns polímeros biodegradáveis sintéticos tenham sido desenvolvidos para aplicações médicas, o uso de polímeros biodegradáveis naturais mantém-se atractivo devido à sua abundância na natureza, boa biocompatibilidade e capacidade de serem modificados (Errico, Bartoli, Chiellini & Chiellini, 2009).

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são os bioplásticos microbianos mais produzidos mundialmente e têm sido propostos como sendo um dos biopolímeros fisiologicamente mais importantes juntamente com os poliisoprenóides, polipéptidos, polissacáridos e polinucleótidos. As suas propriedades permitem a sua utilização na veiculação de fármacos e em aplicações médicas, entre outras (Lee et al., 2011; Suriyamongkol, Weselake, Narine, Moloney & Shah, 2007).

Os PHA têm sido investigados nas áreas da microbiologia, biologia molecular, bioquímica, engenharia química e biológica e investigação médica. Foram desenvolvidas aplicações de PHA como bioplásticos, biomateriais de implante, fármacos e biocombustíveis. Nos últimos 10 anos, os PHA têm sido desenvolvidos rapidamente para encontrar aplicações em várias áreas. Tal diversidade permitiu o desenvolvimento de várias aplicações, incluindo plásticos biodegradáveis, fibras, implantes biodegradáveis e biocompatíveis e veiculadores de fármacos com libertação controlada (G.-Q. Chen, 2010).

2. Polihidroxialcanoatos

Os PHA são uma classe de poliésteres alifáticos produzidos por uma grande diversidade de microorganismos. Representam um grupo de compostos de reserva de carbono e energia (Chanprateep, 2010). São os únicos bioplásticos completamente sintetizados por microorganismos (G.-Q. Chen, 2010; Demarco, 2005). Este grupo de poliésteres, que pode ser constituído por mais de 150 monómeros diferentes, apresenta uma panóplia de propriedades e funcionalidades (Chanprateep, 2010; Feng, Yoshie & Asakawa, 2004). Os PHA são considerados uma potencial alternativa renovável aos plásticos obtidos através do petróleo (Sudesh, Bhubalan, Chuah & Kek, 2011). Na Figura 1 está exemplificada a acumulação deste polímero no interior de bactérias.

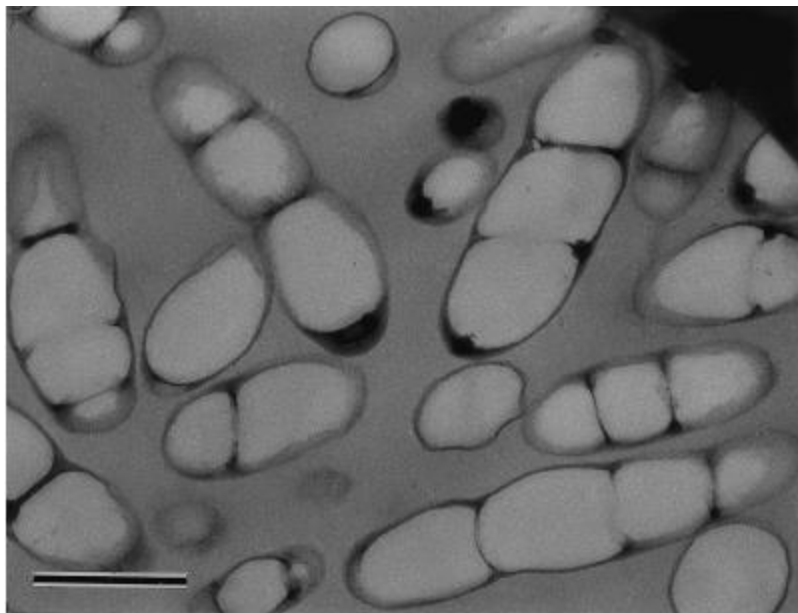


Figura 1 - Acumulação de PHA no interior de bactérias (a barra representa 0,5 μm). Adaptado de Sudesh, Abe & Doi (2000).

Diferentes composições proporcionam polímeros com propriedades físicas variadas (Wu, Wang & Chen, 2009), sendo algumas comparadas com as propriedades de plásticos convencionais (Tokiwa & Calabia, 2004). Propriedades como a biocompatibilidade e biodegradabilidade têm sustentado o interesse neste grupo de polímeros nas últimas décadas (Grage, Jahns & Parlane, 2009). Os PHA diferem dos polímeros sintetizados quimicamente como o polietileno e o polipropileno pela sua biosíntese a partir de fontes renováveis e pela sua fácil biodegradabilidade tanto em condições aeróbias como em condições anaeróbias, por microorganismos que se

encontram no solo, água, entre outros habitats (Chanprateep, 2010; Demarco, 2005; Jendrossek & Handrick, 2002).

É considerado que a natureza biológica e biodegradável dos PHA possa vir a ter vantagens a longo prazo de reduzir a acumulação de resíduos dos plásticos, aquecimento global, poluição e dependência de combustíveis fósseis (Sudesh et al., 2011). Embora a substituição dos plásticos derivados do petróleo por bioplásticos, produzidos a partir de fontes renováveis, seja um objectivo a longo prazo, esta ainda não é possível devido aos seus custos de produção actuais. No entanto, os PHA continuam a representar uma classe de polímeros com enorme potencial na área das aplicações médicas, incluindo a veiculação de fármacos (Zinn, Witholt & Egli, 2001).

O primeiro PHA a ser conhecido, o poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), foi descoberto e extraído durante os anos 20 do interior de células de *Bacillus megaterium* por um cientista francês, Maurice Lemoigne (Philip, Keshavarz & Roy, 2007; Wampfler, Ramsauer & Rezzonico, 2010). Embora esta descoberta tenha sido feita relativamente cedo no século passado, a maioria dos PHA conhecidos actualmente só foram descobertos a partir dos anos 80 (Williams & Martin, 2002).

Hoje são conhecidos mais de 90 géneros de diferentes bactérias onde é possível encontrar PHA (D. Y. Kim, Kim, Chung & Rhee, 2007). A comercialização do P3HB teve início nos anos 60 (Philip et al., 2007; Wampfler et al., 2010). No entanto, embora tenha sido o P3HB a desencadear o interesse neste tipo de polímeros, as suas características, tais como a sua estrutura altamente cristalina e rígida, tornam-no um polímero frágil e pouco elástico, não tendo propriedades adequadas para determinadas aplicações práticas. Este facto limita o tipo de aplicações possíveis e diminuiu algum do interesse inicial (Feng et al., 2004; Tsuge, 2002).

O polímero BIOPOL[®] (um copolímero de 3-hidroxi-butirato e 3-hidroxi-valerato, (P3HB3HV)), que surgiu nos anos 80, melhorou as características apresentadas pelo P3HB, apresentando-se como um polímero mais resistente e flexível (Philip et al., 2007).

O aparecimento destes dois polímeros promoveu o seu estudo como biomateriais para aplicações médicas. O interesse para este tipo de aplicações tem sido crescente e é a "Tepha inc." que nos dias de hoje lidera a tecnologia no que diz respeito a polímeros

como os PHA e a sua aplicação em variados dispositivos médicos (Philip et al., 2007; Williams & Martin, 2002).

Apenas alguns PHA são, actualmente, produzidos em larga escala, sendo o P3HB, poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) e poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) (P3HB3HHx) os principais (Chanprateep, 2010). A produção de novos polímeros de PHA tem sido estudada, como é o caso do poli(3-hidroxi octanoato-co-3-hidroxi hexanoato) (P3HO3HHx), o poli-4-hidroxi butirato (P4HB) e o poli(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato) (P3HB4HB) (Williams & Martin, 2002).

A estrutura geral de um polímero de PHA está representada na Figura 2. Esta estrutura repete-se entre cem a algumas milhares de vezes por polímero e dependendo do radical substituído (grupo metilo, etilo, propilo, etc.) diferentes polímeros são formados (H. Wu, Sheu & Lee, 2003).

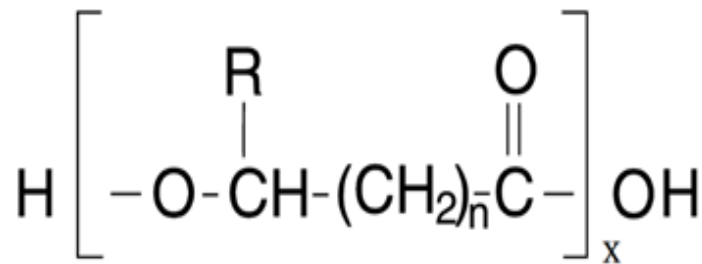


Figura 2 – Estrutura química geral de um polímero de PHA produzido em bactérias. Adaptado de H. Wu et al. (2003).

Os PHA estão agrupados três classes, dependendo do número de átomos de carbono do monómero: os PHA de cadeia curta (*short chain length*, scIPHA) cujos monómeros contêm 4-5 átomos de carbono; os PHA de cadeia média (*medium chain length*, mcIPHA), com 6-14 átomos de carbono; e os PHA de cadeia longa (*long chain length*, lcIPHA), com 15 ou mais átomos de carbono (Jendrossek & Handrick, 2002; Koller, Salerno, Dias, Reiterer & Braunegg, 2010; Tsuge, 2002; Wampfler et al., 2010; Zinn et al., 2001). A última classe referida deste polímero ainda só foi obtida através de produção *in vitro* (Koller et al., 2010). Alguns dos polímeros formados estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Possíveis polímeros formados por diferentes radicais. Adaptado de Wu *et al.* (2003) e Reemmer (2009)

N	Substituto do Radical	Nome do Polímero
1	Hidrogénio	Poli-3-hidroxiopropionato (P3HP)
	Metilo	Poli-3-hidroxi butirato (P3HB)
	Etilo	Poli-3-hidroxi valerato (P3HV)
	Propilo	Poli-3-hidroxi hexanoato (P3HHx)
	Pentilo	Poli-3-hidroxi octanoato (P3HO)
	Hexilo	Poli-3-hidroxi nonanoato (P3HN)
	Heptilo	Poli-3-hidroxi decanoato (P3HD)
	Octilo	Poli-3-hidroxi undecanoato (P3HUD)
2	Hidrogénio	Poli-4-hidroxi butirato (P4HB)
3	Hidrogénio	Poli-5-hidroxi valerato (P5HV)

Homopolímeros, copolímeros aleatórios e copolímeros em bloco de PHA podem ser produzidos dependendo das espécies bacterianas e condições de crescimento (G.-Q. Chen, 2010). As propriedades físicas e térmicas de copoliésteres microbiais podem ser reguladas variando a sua estrutura molecular e composição monomérica (Feng et al., 2004). Com a modificação química ou com a criação de copolímeros é possível obter materiais com grande diversidade de propriedades (Grage et al., 2009). Os copolímeros em bloco consistem na repetição de regiões poliméricas ligadas covalentemente entre elas, permitindo conjugar as propriedades individuais dos polímeros utilizados e dando origem a novas propriedades que só desta forma são possíveis (Philip et al., 2007). De seguida a biossíntese destes e dos PHA em geral será abordada.

3. Biossíntese de PHA

Os PHA são um grupo de compostos de reserva de carbono e energia que são acumulados por diversas bactérias. Na maior parte dos casos o poliéster é acumulado em meios com excesso de fontes de carbono e falta de um nutriente essencial, por exemplo o azoto, o fósforo ou o magnésio. Os PHA são depositados intracelularmente na forma de corpos de inclusão (grânulos de PHA) e podem corresponder até 90% do peso seco da célula (Grage et al., 2009; Jendrossek & Handrick, 2002). Esta separação do PHA do resto do lúmen celular permite que a pressão osmótica no interior da célula não seja afectada (Zinn et al., 2001). O número e o tamanho dos grânulos por célula variam conforme o tipo de bactéria (Grage et al., 2009).

Na superfície dos grânulos de PHA é possível encontrar proteínas específicas, em maior número do que seria necessária necessário para a síntese de PHA (Jendrossek, 2009). Embora a estrutura dos grânulos de PHA (Fig.3) não esteja totalmente determinada, os seus principais constituintes são uma monocamada fosfolípídica associada a varias proteínas tais como as polimerases (ou sintases) de PHA, despolimerases, proteínas estruturais (phasins ou PhaP) e proteínas reguladoras; e um núcleo hidrofóbico de poliésteres (Grage et al., 2009; Loo & Sudesh, 2007).

Estes grânulos demonstraram ser estruturas complexas e organizadas e não apenas simples inclusões poliméricas, com uma membrana sensível a stress químico e físico (Jendrossek, 2009). O PHA dentro destes grânulos encontra-se na forma nativa, num estado amorfo sendo que as suas moléculas estão móveis. No entanto, o PHA em grânulos danificados abandona a sua forma nativa passando para um estado cristalino, adaptando uma estrutura helicoidal organizada (Jendrossek & Handrick, 2002). Em relação à formação destes grânulos, na literatura actual, têm sido descritos dois modelos, o micelar e o de *budding* (Grage et al., 2009; Rehm, 2007).

O modelo micelar parte do princípio de que a PHA polimerase se encontra presente no citoplasma. Sendo uma enzima hidrofílica, ao produzir a cadeia de PHA (que é hidrofóbica) forma uma cadeia anfipática. Com o aumento de produção destas cadeias, estas agregam-se numa estrutura micelar. Os restantes constituintes da parte externa do grânulo são depois incorporados à medida que este vai aumentando o seu tamanho

(Rehm, 2007). Este modelo é suportado pelo facto de ser possível produzir grânulos de PHA *in vitro* na ausência de membrana celular (Grage et al., 2009).

As últimas evidências têm, no entanto, suportado o modelo de *budding* que defende que a polimerase de PHA se encontra presente na parte interior da membrana celular (seja por defeito ou assim que inicia a polimerização). Desta forma a síntese de PHA é efectuada no espaço intramembranar onde as cadeias se acumulam até que as inclusões de PHA, rodeadas de uma monocamada fosfolipídica, se separam da membrana formando o grânulo (Grage et al., 2009; Rehm, 2007).

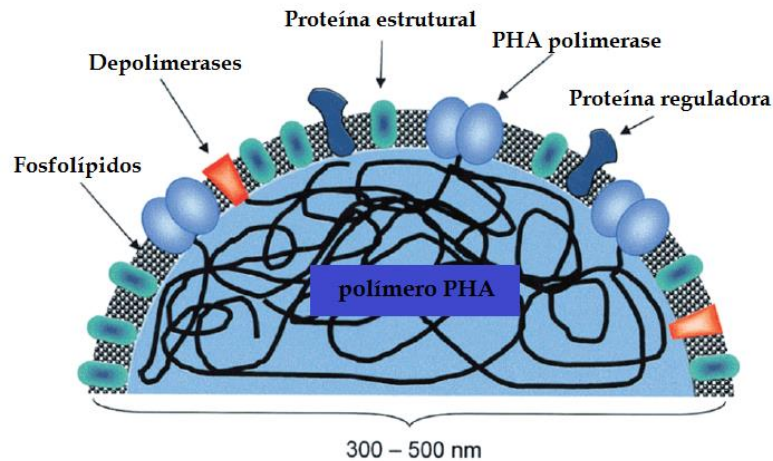


Figura 3 – Estrutura de um grânulo de PHA e seus constituintes. Adaptado de Grage et al. (2009).

Ao longo da última década a biossíntese de PHA tem vindo a ser melhor compreendida. A enzima chave para a biossíntese do PHA é a polimerase de PHA. Esta enzima polimeriza monómeros de 3-hidroxiacilo-CoA em poliésteres com a libertação da coenzima A. Um dos componentes essenciais para a biossíntese de PHA é um dos substratos utilizados para formar o 3-hidroxiacilo-CoA – a acetil-CoA – outros substratos provêm, por exemplo, da β -oxidação de ácidos gordos. Actualmente é possível resumir a biossíntese de PHA em oito diferentes vias dependendo da bactéria e da fonte de carbono que esta utiliza. Diferentes organismos são capazes de utilizar diferentes vias, utilizando diferentes precursores para produzir 3-hidroxiacilo-CoA e diferentes classes de polimerases para produzir polímeros de PHA (G.-Q. Chen, 2010; Grage et al., 2009). As polimerases de PHA estão divididas em quatro classes

diferentes, consoante o seu tamanho, subunidades que a compõem e a sua especificidade de substratos. As polimerases de classe I e classe II são ambas constituídas pela mesma subunidade (PhaC) mas têm especificidades de substratos diferentes, enquanto que a primeira produz preferencialmente sclPHA e o segundo mclPHA. Em relação às classes III e IV, ambas produzem sclPHA mas são compostas por diferentes subunidades, classe III constituída por PhaC e PhaE e a classe IV constituída por PhaC e PhaR (Quillaguamán, Guzmán & Van-Thuoc, 2010; Thomson, Roy, Summers & Sivaniah, 2009).

Os PHA podem também ser sintetizados por métodos químicos. Sendo que a biossíntese de PHA leva a um peso molecular mais elevado quando comparado com os métodos químicos. No entanto, não permite muito controlo sobre as estruturas dos monómeros dos polímeros de PHA; a especificidade da PHA polimerase influencia os monómeros incorporados no polímero (G.-Q. Chen, 2010).

Na maior parte das bactérias que naturalmente acumulam PHA, a síntese de PHA consiste em duas fases; uma fase de crescimento celular e outra de fase de produção de PHA. A primeira consiste na utilização de um meio de cultura, enriquecido nutricionalmente, que promove o crescimento bacteriano. A fase de produção de PHA propriamente dita baseia-se num meio de cultura, em que o crescimento bacteriano está limitado pela restrição de diversos nutrientes necessários para a multiplicação celular, como o oxigénio, azoto, fósforo ou magnésio, que promove as vias metabólicas de síntese PHA (Chanprateep, 2010; da Silva, Gomez, Rocha, Taciro & Pradella, 2007; Suriyamongkol et al., 2007). Hoje em dia, o fornecimento de nutrientes é feito de uma forma automática, uma vantagem em relação à produção clássica. No entanto o processo de produção pode ser ainda mais rentabilizado adoptando-se sistemas de produção contínua. Neste caso, as paragens para processos de limpeza e enchimento do bioreactor são muito menos frequentes do que nos processos descontínuos, sendo o desenvolvimento destes sistemas de grande interesse comercial (Koller et al., 2010).

Sendo que a fonte de carbono utilizada na síntese de PHA é um dos principais factores responsáveis pelo elevado custo de produção deste polímero, torna-se importante uma selecção adequada deste tipo de recursos. No entanto a escolha de fontes de carbono não se deve focar apenas no preço de mercado das mesmas, mas também em recursos renováveis e de ampla disponibilidade (Chanprateep, 2010; Sudesh et al., 2011).

Entre as fontes de carbono mais utilizadas estão açúcares puros como a glucose e a sacarose, tendo sido a produção a partir destes já otimizada (Tsuge, 2002). A utilização de outras fontes de carbono, como o amido, alguns álcoois (metanol, etc.), resíduos industriais e agrícolas, têm sido consideradas, entre outras, para uma produção industrial (Cavalheiro, de Almeida, Grandfils & da Fonseca, 2009; Chanprateep, 2010; Tsuge, 2002). No caso do amido, apesar de ser um recurso abundante, as bactérias apresentam limitações de crescimento diminuindo a sua produtividade. Para além disso, a necessidade de métodos que o processem, de forma a ser utilizado pelo metabolismo das bactérias, tornam o custo de utilização desta fonte de carbono relativamente elevado. Em relação ao álcool, como se trata de uma fonte de carbono estéril, a sua utilização preveniria contaminações. No entanto, este recurso tornou-se importante como uma energia alternativa, tendo o interesse deste recurso para a utilização na síntese de PHA diminuído (Chanprateep, 2010).

Os óleos de plantas têm sido investigados e foram identificados como sendo bastante atractivos para a produção de PHA. Devido à sua mistura complexa de triglicéridos e ácidos gordos, estes têm, teoricamente, um maior rendimento na produção de PHA quando comparadas com outros substratos testados como os açúcares, por exemplo (Sudesh et al., 2011). Outra vantagem dos óleos de plantas é o facto de serem uma fonte de carbono renovável e de baixo custo. No entanto, apresenta desvantagens relacionadas com a taxa de crescimento das bactérias que são capazes de transformar este tipo de fontes de carbono em PHA. Este facto limita a síntese de PHA pois a quantidade de polímero obtida não é ainda suficiente para uma produção industrial rentável. Sendo, portanto, necessário o desenvolvimento de melhores técnicas de fermentação e de estirpes bacterianas capazes de utilizar óleos de plantas como fontes de carbono (Tsuge, 2002). Entre os diversos tipos de óleos de plantas, o óleo de palma é um dos mais rentáveis (Sudesh et al., 2011).

A escolha do microorganismo para produção industrial de PHA varia dependendo de factores que incluem a capacidade celular de utilizar fontes de carbono de baixo custo, o custo do meio de cultura, a taxa de crescimento, a taxa de síntese do polímero, a qualidade e quantidade de PHA e o custo de processos subsequentes. Embora mais de 300 microorganismos sintetizem PHA, incluindo bactérias tanto Gram positivas como negativas, apenas algumas tais como a *Cupriavidus necator* (anteriormente conhecida como *Ralstonia eutropha* ou *Alcaligenes eutrophus*), a *Alcaligenes latus*, a *Azotobacter*

vinelandii, a *Pseudomonas oleovorans*, a *Paracoccus denitrificans*, a *Protomonas extorquens* e *Escherichia coli* recombinante são capazes de produzir PHA em quantidade suficiente para produção em larga escala (Chanprateep, 2010; Quillaguamán et al., 2010; Rodríguez-Carmona & Villaverde, 2010). A bactéria *Cupriavidus necator* é um exemplo clássico de uma bactéria produtora de sclPHA, como o P3HB. Em relação a bactérias produtoras de mclPHA, as mais estudadas são a *Pseudomonas oleovorans* e a *Pseudomonas putida*, sendo que várias espécies de *Pseudomonas* têm a capacidade de acumular este tipo de polímero (Chen, 2010; Zinn et al., 2001). A utilização de culturas de apenas uma bactéria apresenta a desvantagem do seu elevado custo do equipamento de fermentação e condições de esterilidade, essenciais para obter culturas com o grau de pureza necessário (Green, 2010). A utilização de bactérias que produzem PHA naturalmente permite uma acumulação elevada deste polímero, no entanto apresenta na maioria dos casos um tempo de crescimento celular longo e uma difícil extracção do polímero do interior das células. Estas características destas bactérias limitam a sua utilização numa escala industrial (Suriyamongkol et al., 2007).

Com o isolamento das enzimas e genes responsáveis pela produção de PHA foi possível produzir PHA *in vivo* através de organismos transgénicos. Com esta tecnologia, é possível seleccionar o organismo produtor, como é o caso da *E. coli* K12, uma bactéria muito bem caracterizada e já largamente utilizada pela biotecnologia (Williams & Martin, 2002). Através da utilização de *E. coli* recombinante que expresse os genes responsáveis pela biossíntese de PHA é possível obter grânulos de PHA bastantes similares aos produzidos naturalmente (Thomson et al., 2009). A utilização desta bactéria permite a sua manipulação genética, um rápido crescimento celular, o uso de fontes de carbono pouco dispendiosas e uma elevada densidade celular final. Uma grande vantagem da utilização deste tipo de bactérias é o aumento de rendimento de polímero produzido quando comparado com outras bactérias (Chen, 2009; Green, 2010). Com bactérias recombinantes é possível sintetizar copolímeros constituídos por monómeros de sclPHA e mclPHA, como é o caso do P3HB3HHx (Li, Zhang & Qi, 2007; K Sudesh, Abe & Doi, 2000).

A síntese de PHA em sistemas de células eucariótas é uma alternativa que pode vir a reduzir os custos de produção deste polímero. Sistemas de plantas e fungos têm sido estudados como alternativas aos métodos de produção actuais (Abd-El-Haleem, 2009; Reemmer, 2009; Suriyamongkol et al., 2007). Embora o uso destes métodos ainda

necessite de ser melhorado e melhor compreendido para que possa competir com as actuais bactérias utilizadas (Abd-El-Haleem, 2009; Tokiwa & Calabria, 2004), a utilização de plantas apresenta vantagens que continuam a promover o seu estudo (Reemmer, 2009; Suriyamongkol et al., 2007). A utilização de plantas como sistemas produção de PHA apresenta a vantagem de utilizar recursos mais económicos e de ser uma alternativa mais ecológica (Suriyamongkol et al., 2007). O uso de plantas transgénicas têm vindo a ter avanços interessantes mas necessita ainda de melhores métodos de extracção (Reemmer, 2009; Snell & Peoples, 2002).

A produção de PHA por culturas bacterianas mistas tem o potencial de produzir grandes quantidades de PHA a um baixo custo devido a menores requisitos de esterilidade, equipamento, controlo e a capacidade de utilizar uma grande variedade de substratos de baixo custo, incluindo resíduos industriais e agrícolas. A quantidade de PHA produzido com esta tecnologia está equiparada à de culturas puras (Chanprateep, 2010; Green 2010).

A síntese *in vitro* de PHA foi também estudada como uma alternativa que permita uma diminuição dos custos da produção deste polímero. O facto das enzimas se encontrarem isoladas permite uma melhor acessibilidade para métodos de produção contínuos; ao mesmo tempo estas utilizam uma maior variedade de monómeros, pois não estão sujeitas às necessidades de outros processos metabólicos celulares (Thomson et al., 2009). Este método apresenta vantagens ao nível da produção, ao poder ser controlada através de precursores do PHA e co-factores. Para além disso, o isolamento de PHA é mais fácil pois não é necessária a extracção do polímero das células (Zinn et al., 2001). No entanto a aplicação deste método a um nível industrial ainda apresenta alguns problemas que precisam de ser resolvidos. O mecanismo de catabolismo e a estabilidade das enzimas utilizadas necessita de ser melhor compreendido para que se atinja o nível de controlo do sistema pretendido (Thomson et al., 2009).

O último passo da produção de PHA, a purificação (ou extracção) de PHA é um elemento chave pois envolve a separação do polímero do resto dos componentes celulares (resíduos celulares, lípidos, ácidos nucleicos e proteínas), de modo a obter um produto final de elevada pureza (Williams & Martin, 2002). De forma a melhorar a eficiência do extracção de polímeros de PHA de qualquer método utilizado é necessário

concentrar as células onde este se encontra. Métodos como a centrifugação, floculação ou filtração são utilizados para este processo (Zinn et al., 2001).

A escolha do método de extracção depende de diversos factores tais como a bactéria produtora ou a pureza necessária. A extracção directa de PHA da biomassa, a digestão enzimática ou química do material celular que não seja PHA e a lise das células onde o PHA se encontra por uso de meios hipotónicos são as principais estratégias para o isolamento do PHA. (Koller et al., 2010).

A extracção directa, feita através da utilização de um solvente é um método interessante para se utilizar para aplicações médicas pois permite a extracção de endotoxinas. O processo começa com uma liofilização do concentrado de biomassa, o PHA é então extraído do liofilizado através de um solvente (clorofórmio, diclorometano, entre outros). Esta solução é depois filtrada, de forma a remover detritos celulares. Por fim o polímero é precipitado em metanol ou etanol. A separação de sclPHA e mclPHA é possível pois os primeiros não são solúveis em acetona. Com este método é possível uma pureza na ordem dos 98% (Wampfler et al., 2010; Zinn et al., 2001).

A digestão de material não-PHA é um método de extracção de PHA feito por via de enzimas ou químicos. A lise celular através do hipoclorito é uma técnica eficaz para isolar o PHA, no entanto a sua utilização provoca a redução no comprimento das cadeias do polímero. Outra abordagem com esta metodologia é a de esterilização do conteúdo do bioreactor, causando a desnaturação do ADN e proteínas. Posteriormente procede-se a um tratamento com uma mistura de enzimas e um detergente aniónico. O PHA é concentrado através de um processo de filtração e recuperado sob a forma de um látex (Wampfler et al., 2010; Zinn et al., 2001).

O processo de lise celular através de meios hipotónicos já referido é utilizado no caso de bactéria osmofílicas, como é o caso das halobactérias, em que quando expostas a um meio hipotónico conduz a uma destruição da membrana celular libertando o conteúdo celular para o meio. Os grânulos de PHA são recuperados através de processos de filtração ou centrifugação. Caso seja necessário, podem ser utilizados detergentes de modo a destruir os lípidos e proteínas que constituem os grânulos, obtendo-se assim o PHA isolado (Koller et al., 2010).

O PHA obtido através de bactérias Gram negativas contém endotoxinas provenientes da sua membrana externa. A remoção destes compostos pirogénicos é necessária para que o polímero possa ser utilizado em aplicações médicas. O peróxido de hidrogénio ou peróxido de benzoilo são agentes utilizados no caso da extracção de PHA sem solventes para reduzir a contagem de endotoxinas para valores abaixo dos quais o PHA produzido não provoca uma resposta inflamatória aguda no organismo animal (G.-Q. Chen & Wu, 2005; Wampfler et al., 2010).

O custo de produção de PHA é elevado quando comparado com alternativas já existentes, como é o caso do ácido poliláctico (PLA), traduzindo-se numa limitação na utilização deste polímero em larga escala. Assim sendo, é necessário um esforço de modo a reduzir o custo de produção. É urgente a optimização deste processo em pontos já referidos como a bactéria a utilizar, a fonte de carbono e os métodos de extracção (G.-Q. Chen, 2009).

4. Propriedades de PHA

As propriedades do PHA estão relacionadas com o número de carbonos de cada monómero individual e com a estrutura física destes monómeros após a incorporação numa cadeia polimérica por enzimas (J. Lu, Tappel, & Nomura, 2009). O elevado número de monómeros e a composição monomérica variada de PHA resulta numa enorme variação das características físicas e químicas de diferentes PHA (Jendrossek e Handrick, 2002). Os sclPHA em geral são caracterizados como termoplásticos, rígidos e com um grau de cristalinidade e um ponto de fusão elevados quando comparados com os mclPHA que são elastómeros, com uma cristalinidade e temperatura de fusão mais baixas, uma percentagem elevada de alongamento na ruptura e uma força de tensão baixa (D. Y. Kim et al., 2007; H. Wu et al., 2003). Os sclPHA são representados por polímeros como o P3HB, o P4HB, o P3HV e o copolímero P3HB3HV. Polímeros como o poli-3-hidroxiocetanoato (P3HO), e o poli-3-hidroxinonanoato (P3HN) são característicos da classe de mclPHA (Hazer & Steinbüchel, 2007). Algumas características representativas do PHA estão enunciadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Características de vários PHA. Adaptado de Koller et al. (2010); D. Y. Kim et al. (2007); Sudesh et al. (2011) e Williams & Martin (2002).

Polímero	Temperatura de fusão (°C)	Força de tensão (MPa)	Módulo de Young (GPa)	Alongamento na ruptura (%)
P3HB	177	40	3.5	6
P3HB-co-(3%)3HV	170	38	2.9	-
P3HB-co-(20%)3HV	145	32	1.2	50
P4HB	53	104	0.149	1000
P3HB-co-(3%)4HB	166	28	-	45
P3HB-co-(16%)4HB	152	26	-	444
P3HB-co-(64%)4HB	50	17	0.03	591
P3HO-co-(12%)HHx	61	9	0.008	380

Como já foi referido o P3HB apresenta uma elevada cristalinidade e é um material duro e quebradiço, não sendo o material ideal para determinadas aplicações. No entanto, a incorporação de monómeros de 3-hidroxivalerato no polímero P3HB permite baixar a temperatura de fusão e a cristalinidade do polímero, tornando-o também mais elástico. O polímero P4HB é um material termoplástico bastante resistente e maleável, com uma

força de tensão comparável ao polietileno e devido ao seu alongamento na ruptura este polímero tem propriedades extremamente elásticas (Philip et al., 2007). Este polímero pode ser alongado quase dez vezes em relação ao seu comprimento inicial. Durante o alongamento as cadeias do polímero orientam-se, resultando em fibras extremamente fortes (Martin & Williams, 2003). O P3HB4HB demonstra uma grande diversidade de propriedades, desde uma elevada cristalinidade a uma grande elasticidade, dependendo da percentagem de monómero 4-hidroxibutirato (Luo, Wei, & Chen, 2009). Os copolímeros são mais flexíveis, fáceis de moldar e mais resistentes em comparação com homopolímeros de P3HB (Tsuge, 2002).

Apesar das grandes potencialidades do PHA é necessário, por vezes, proceder-se a determinadas modificações de modo a ultrapassar algumas limitações e a cumprir os requisitos necessários para que este polímero possa ser utilizado em aplicações médicas (D. Y. Kim et al., 2007). Estas modificações têm vindo a originar um grande interesse e serão referidos abaixo.

4.1. Modificações

Como já foi referido, as propriedades dos sclPHA nem sempre são as mais adequadas para aplicações médicas (Hazer & Steinbüchel, 2007; D. Y. Kim et al., 2007). Já os mclPHA têm algumas características mais vantajosas para o caso das aplicações médicas, quando comparados com os sclPHA. (D. Y. Kim et al., 2007). No entanto, graças a alguns métodos físicos e químicos, como o *blending*, a ligação cruzada, a copolimerização por *grafting* ou em bloco e a substituição química, é possível tornar o polímero mais apropriado para a utilização pretendida (Hazer & Steinbüchel, 2007; D. Y. Kim et al., 2007).

O *blending* consiste na mistura do PHA com outros polímeros de forma a melhorar determinadas características (D. Y. Kim et al., 2007; Vroman & Tighzert, 2009). Ao longo dos últimos anos foram estudadas variadas misturas com diferentes polímeros como o caso do PLA, do polietilenoglicol (PEG), do ácido poli-láctico-glicólico (PLGA) e do amido, entre outros. Com estas misturas foi possível melhorar características como a força de tensão, temperatura de tensão vítrea, crescimento celular, flexibilidade, cristalinidade, biocompatibilidade ou biodegradabilidade dependendo da utilização pretendida (G.-Q. Chen & Wu, 2005; D. Y. Kim et al., 2007; Vroman & Tighzert, 2009).

A ligação cruzada consiste numa ligação entre duas cadeias poliméricas. Dependendo do número de ligações entre elas é possível alterar, por exemplo a elasticidade ou viscosidade do polímero. Este processo pode ser obtido utilizando químicos como peróxidos, o peróxido de benzoílo, benzofenonas, dimetacrilato de etilenoglicol em combinação com tratamento térmico, ou através de radiação ultra-violeta (Hazer & Steinbüchel, 2007; D. Y. Kim et al., 2007). O método químico consegue boas ligações de *cross-linking*, mas tem a desvantagem de ser necessário purificar os polímeros antes de poderem ser utilizados. No caso dos métodos de irradiação não existe a contaminação do polímero sendo uma alternativa já bastante estudada (D. Y. Kim et al., 2007).

Enquanto que a co-polimerização em bloco consiste em adicionar à estrutura principal de um polímero um segmento de outro polímero, na co-polimerização por *grafting* procede-se à introdução de um segmento de outro polímero numa cadeia lateral de um polímero já existente (Hazer & Steinbüchel, 2007). A introdução de polímeros na estrutura de PHA permite melhorar a biocompatibilidade de polímeros assim como alterar as suas propriedades térmicas e mecânicas (Hazer & Steinbüchel, 2007; D. Y. Kim et al., 2007).

A biodegradabilidade e biocompatibilidade, duas das características mais importantes do PHA serão agora discutidas.

4.2. Biodegradabilidade

A biodegradabilidade do PHA, uma das vantagens mais interessantes deste polímero, depende principalmente das suas propriedades físico-químicas. Polímeros com um menor peso molecular são susceptíveis a uma maior degradação. Factores como a temperatura, humidade, pH, cristalinidade e composição monomérica são também importantes neste processo (Philip et al., 2007; Sudesh et al., 2000). A degradação de PHA é principalmente enzimática, sendo a despolimerase de PHA a enzima preponderante (Chanprateep, 2010; Reddy, Ghai, Rashmi & Kalia, 2003). No entanto a hidrólise não enzimática tem também um papel importante no processo de degradação destes polímeros (Artsis, Bonartsev, Iordanskii, Bonartseva & Zaikov, 2012).

Os PHA são degradados eficazmente pelo ambiente pois muitos microorganismos nos solos são capazes de produzir enzimas que hidrolisam as ligações éster do polímero em

monómeros e oligómeros solúveis em água. Estes produtos de degradação são depois metabolizados em água e dióxido de carbono em condições aeróbias e em metano e dióxido de carbono em condições anaeróbias. A degradação completa do polímero pode demorar até 2/3 anos (Philip et al., 2007).

No entanto a degradação em tecido animais dos PHA decorre de uma forma ligeiramente diferente, sendo que a degradação enzimática é principalmente efectuada por estereases não específicas. A acção dos macrófagos é também responsável pela degradação destes polímeros em humanos. Os monómeros resultantes destes processos de degradação são simples para o organismo eliminar, como é o caso de ácido 3-hidroxi-butírico e 4-hidroxi-butírico que são constituintes normais do organismo, encontrados no sangue, fígado, coração, cérebro, entre outros. Este facto ajuda a explicar a boa biocompatibilidade destes polímeros (Artsis et al., 2012; Bidone et al., 2009; C. Chen et al., 2008; Martin & Williams, 2003).

4.3. Biocompatibilidade

A biocompatibilidade é um factor muito importante a considerar principalmente na área das aplicações médicas (Koller et al., 2010). Em relação a esta propriedade foi já demonstrado que os PHA são bem tolerados pelos organismos dos mamíferos (Grage et al., 2009) e provaram ter uma maior biocompatibilidade do que os plásticos tradicionais (Koller et al., 2010). O PHA não é apenas um polímero de armazenamento inerte e limitado a algumas bactérias. Por exemplo, no caso do P3HB, trata-se de um biopolímero omnipresente e interactivo que está envolvido em importantes funções fisiológicas. O P3HB de baixo peso molecular encontra-se largamente distribuído, sendo encontrado em organismos representativos da maioria dos filos, complexado com outras macromoléculas. Este estado do P3HB permite que este consiga atingir tanto regiões aquosas como hidrofóbicas da célula, sendo encontrado no citoplasma e em fluidos intracelulares assim como em membranas e lipoproteínas. O P3HB complexado tem a característica de dissolver sais e facilitar o seu transporte através de barreiras hidrofóbicas, definindo assim uma potencial função fisiológica no metabolismo celular. Estas características permitem considerar o P3HB e seus monómeros como não tóxicos para as células (G.-Q. Chen & Wu, 2005). No caso do co-polímero P3HB3HHx foi demonstrado uma boa biocompatibilidade com diversas células, incluindo fibroblastos, condrócitos e osteoblastos. Esta co-polymerização melhorou a biocompatibilidade

quando comparado como o P3HB. A utilização de outros métodos de modificação como *blending* provou ser uma excelente forma de melhorar a biocompatibilidade de PHA (Luo et al., 2009). A biocompatibilidade é portanto outra das características mais importantes que tornam a utilização os PHA vantajosa em relação a outras alternativas (Koller et al., 2010),

Outro aspecto importante é o facto da rápida proliferação celular que ocorre em matrizes de PHA poder ou não induzir a formação de células cancerígenas. Estudos como o de Peng et al. (2011) parecem sustentar que tal não acontece e que é seguro a utilização de PHA para suportar o crescimento celular. De acordo com as normas da *International Organization for Standardization (ISO)*, através de testes de toxicidade, o P3HB foi indicado como seguro para ser utilizado como nanopartículas em animais (Shah, Naseer, Choi, & Kim, 2010).

5. Aplicações de PHA

Como referido, devido à capacidade de modificação das suas propriedades, os PHA têm vindo a demonstrar uma grande potencialidade num vasto número de áreas. Contudo apenas alguns destes polímeros estão disponíveis em quantidade suficiente para serem alvo de estudo no diz respeito a certo tipo de aplicações. Como já foi referido, até recentemente apenas o P3HB e o P3HB3HV estavam incluídos neste grupo, no entanto nos últimos anos este grupo tem vindo a crescer com o aumento da produção de polímeros como o P4HB, o P3HB3HHx, entre outros. Por esta razão a maioria dos estudos são feitas a partir destes polímeros (G.-Q. Chen, 2010; Williams & Martin, 2002; Q. Wu et al., 2009).

O interesse inicial começou por ser na sua utilização como um material plástico. A produção de sacos, revestimentos de papel, diversos produtos descartáveis (fraldas, produtos de higiene feminina e recipientes de produtos de cosmética, etc.) foram o foco dos primeiros estudos (G.-Q. Chen, 2009; Reddy et al., 2003). No entanto, e como já referido, o elevado custo tem vindo a ser indicado como uma limitação à utilização dos PHA neste sentido (Q. Wu et al., 2009). Actualmente as áreas de interesse dos PHA são muito mais diversificadas sendo que as aplicações médicas revelam o maior potencial, embora a relevância da utilização de PHA para substituir plásticos convencionais ou da criação de biocombustíveis se mantenha. (G. Q. Chen, 2010; Koller et al., 2010; Peng et al., 2011; Zhang, Luo, Wang, Deng & Chen, 2009).

No que diz respeito à produção de um biocombustível baseado no PHA, foi utilizado metanol para reagir com o monómero 3HB resultando numa forma éster metilado. Este material melhorou a combustão do etanol, e pode ser utilizado como aditivo de outros combustíveis como o do propanolol, gasolina e diesel. Embora este ainda seja um estudo prematuro, o facto de este biocombustível poder ser produzido através de águas residuais torna-se uma alternativa muito interessante a biocombustíveis como o etanol e o biodiesel (G.-Q. Chen, 2009; X. Zhang et al., 2009).

Presentemente existem uma enorme variedade de aplicações médicas. Desde dispositivos médicos passando por matrizes de reparação de tecidos ou construção de órgãos artificiais. (Q. Wu et al., 2009). O esquema da utilização de PHA em engenharia de tecidos pode ser visualizada na Figura 4.

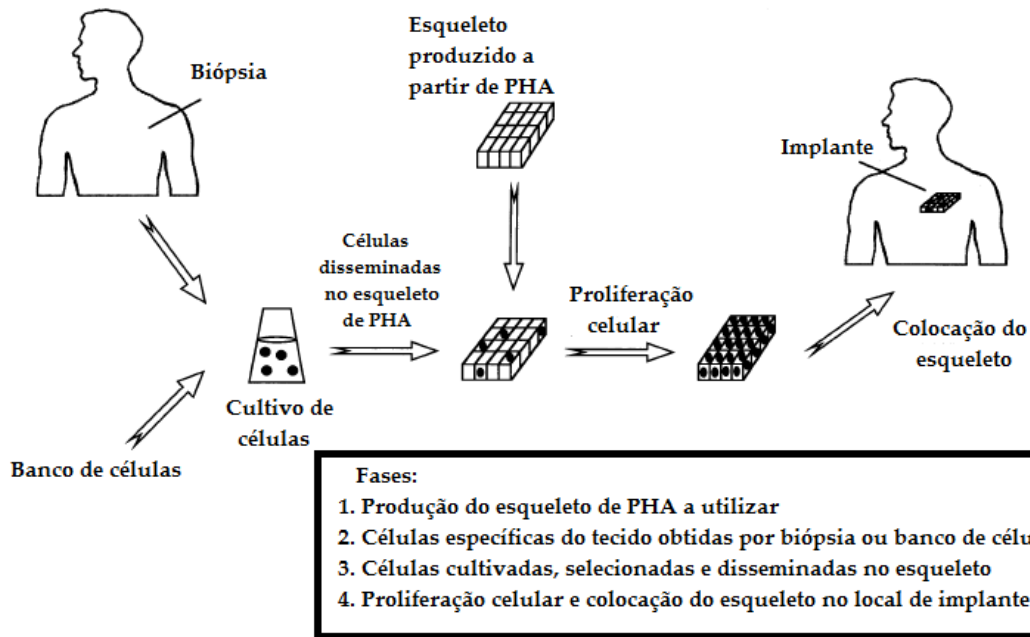


Figura 4 - Utilização de PHA em engenharia de tecidos. Adaptado de S. F. Williams, Martin, Horowitz & Peoples (1999).

Uma das áreas onde os PHA tiveram mais impacto foi a cardiovascular. A "Tepha Inc." tem vindo a desenvolver emplastros pericárdicos, aumentos vasculares, *stents* cardiovasculares, suturas, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, entre outros (Philip et al., 2007; Williams & Martin, 2002; Q. Wu et al., 2009). Os PHA demonstram grande utilidade na engenharia de tecidos devido a propriedades como a sua biocompatibilidade e ser degradável em compostos que não são tóxicos para o organismo. Para além disso, a capacidade de suportar e orientar o crescimento e adesão celular e permitir a passagem de nutrientes são aspectos fundamentais no que diz respeito a este ramo biomédico (Zinn et al., 2001).

O P4HB e o P3HO foram utilizados em diversos estudos para formar um esqueleto de uma válvula cardíaca. Uma vantagem apresentada por estes polímeros foi o facto de ser possível moldar uma válvula tricúspide sem ser necessário recorrer a sutura. Estes polímeros foram também utilizados em ovelhas onde foi possível implantar uma válvula durante quatro meses (G.-Q. Chen & Wu, 2005; Williams et al., 1999).

Esta mesma abordagem é também elaborada em enxertos vasculares. Polímeros como o P3HO, o P4HB e o P3HB foram utilizados na construção de esqueletos para substituição de segmentos de artérias. Nestes esqueletos são disseminadas células e o

enxerto resultante é então implantado no segmento a substituir. Alguns destes enxertos provaram estar prontos para serem implantados cirurgicamente passado três semanas (Martin & Williams, 2003; Williams et al., 1999).

Através do P3HB foi fabricado invólucro para envolver e reparar um nervo de gatos, sem ter ocorrido uma resposta inflamatória. O P4HB foi testado em ratos como um condutor de segmento de um nervo não tendo havido sinais de infecção ou inflamação. Além disso, foi observada uma regeneração com uma taxa de 0,8mm por dia (Philip et al., 2007).

Na medicina dentária, o polímero P3HB3HV foi utilizado para fabricar uma membrana para auxiliar a regeneração do ligamento periodontal e tecido ósseo adjacente. Embora o método de inserção precise de ser melhorado, o polímero demonstrou ser bem tolerado e ter características mais adequadas do que alternativas como é o caso do PLA. A colocação desta membrana permite o isolamento da zona lesada de modo a que o tecido gengival não invada esse espaço permitindo a regeneração do local (Williams & Martin, 2002).

O P3HB3HV e o P3HB3HHx foram utilizados em engenharia de tecidos ósseos, tendo sido o segundo a obter resultados muito promissores. Os osteoblastos que proliferaram no esqueleto fabricado a partir de P3HB3HHx demonstraram uma morfologia normal e o crescimento celular demonstrou ser superior quando comparado com outros polímero como o P3HB. A alteração da percentagem do monómero de 3-HHx altera a afinidade para o crescimento de osteoblastos ou fibroblastos (G.-Q. Chen & Wu, 2005; Williams & Martin, 2002).

Alguns estudos usaram o P3HB3HHx para formar um esófago artificial, demonstraram que o polímero tem boa elasticidade e resistência e pode estimular a regeneração do esófago de cães. Estas características suportam este polímero como um candidato a ser usado como um esófago artificial (G.-Q. Chen & Wu, 2005). Este exemplo de engenharia de tecidos entre outras aplicações médicas estão representadas na Figura 5.

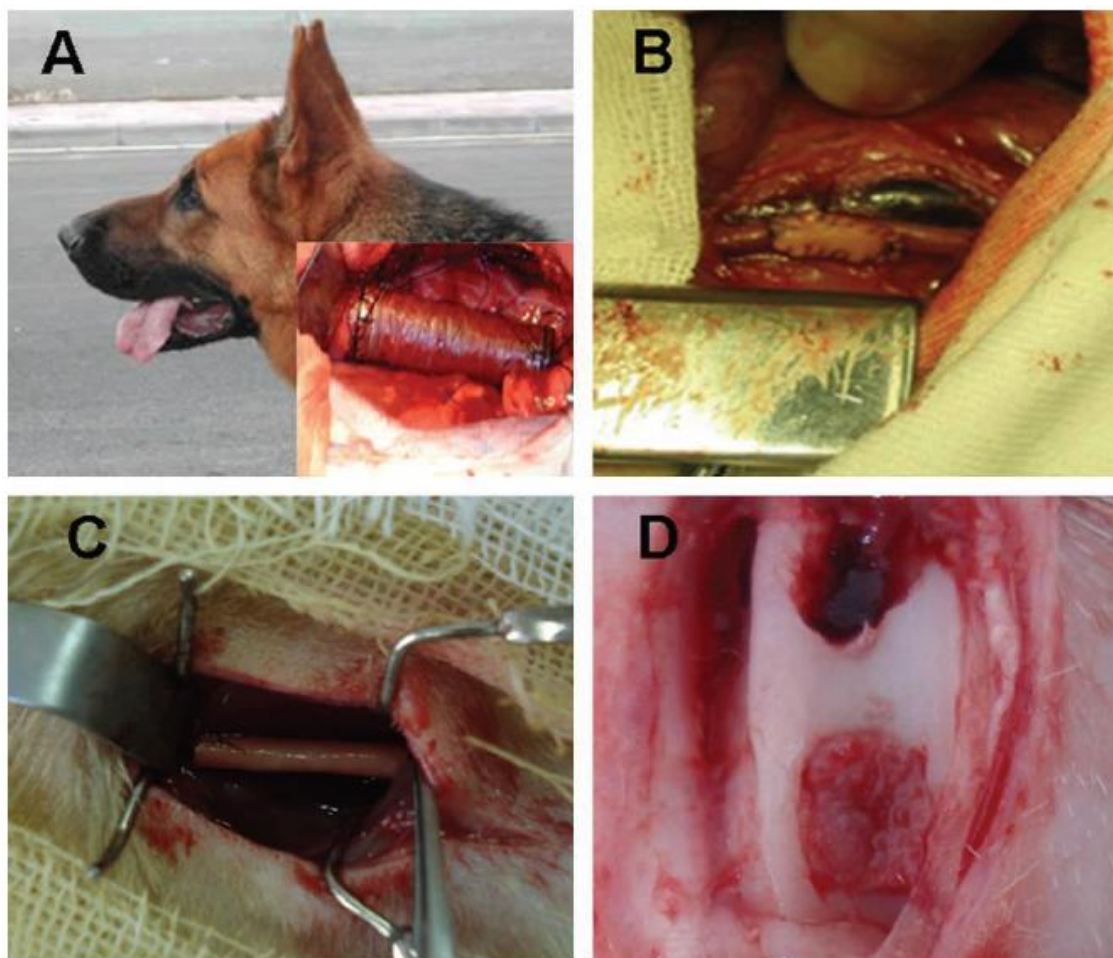


Figura 5 - Variadas aplicações médicas de PHA. (A) - Esófago artificial; (B) - Enxerto vascular; (C) - Tecido condutor de um nervo; (D) - Cartilagem de uma articulação. Adaptado de Q. Wu et al., (2009)

O primeiro produto baseado em PHA comercializado nos Estados Unidos da América, autorizado pela *Food and Drug Administration* (FDA), foi o fio de sutura absorvível TephaFLEX[®] em 2007, que é preparado a partir de P4HB (Q. Wu et al., 2009).

A veiculação de fármacos é uma área de enorme potencial, onde as propriedades de variados PHA podem ser utilizados de diferentes formas. Este tema será abordado no próximo capítulo em maior pormenor.

6. Utilização de PHA em Sistemas de Veiculação de Fármacos

A veiculação de fármacos tornou-se uma importante ferramenta no ramo médico e tem sido extensivamente estudada devido à enorme procura de materiais que permitem a vectorização de fármacos específicos para determinados tecidos, órgãos ou células (Shrivastav, Kim & Kim, 2013). Um sistema de veiculação ideal deve ser estável e seguro para o organismo; maximizar a biodisponibilidade do fármaco; permitir uma veiculação controlada; conferir selectividade específica ao fármaco; garantir que este chega ao local de acção intacto e na maior quantidade possível; aumentar prazo de validade do medicamento; facilitar a administração do fármaco e melhorar a adesão à terapêutica (Jain, 2008). Diversos sistemas veiculadores de fármacos têm aproveitado as propriedades de polímeros na sua elaboração. A utilização de biopolímeros permite conjugar as propriedades físicas de polímeros tradicionais com características como a biocompatibilidade e biodegradação, fundamentais na veiculação de fármacos (Shrivastav et al., 2013).

A utilização de polímeros biodegradáveis em veiculação de fármacos não é novidade, o caso do PLA ou do PGLA são conhecidos. Apesar disso, devido ao facto de a sua degradação ser essencialmente efectuada em massa por hidrólise não é possível controlar completamente a veiculação do fármacos com este tipo de polímeros (Philip et al., 2007). A versatilidade dos polímeros permite uma formulação adaptável ao fármaco, podendo ser alterado de forma a melhorar a capacidade de encapsulação do fármaco e a sua libertação (Magadala, Vlerken, Shahiwala & Amiji, 2008). A potencial elaboração de sistemas veiculadores de fármacos a partir de PHA tem sido abordado em diversos estudos. As características deste polímero possibilitam, como já referido, a construção de variados sistemas. Para além de propriedades como a biodegradabilidade e biocompatibilidade, a degradação das matrizes deste polímero é efectuada por erosão de superfície. Assim sendo o interior da matriz não é degradado enquanto o material circundante não desaparecer, mantendo-se intacto durante mais tempo, ao contrário da erosão em massa em que a degradação ocorre simultaneamente em todo o material. No entanto nem sempre as características do PHA são adequadas à veiculação de fármacos pelo que, muitas vezes, recorre-se à alteração do polímero a utilizar de modo a ajustar as suas características (G.-Q. Chen & Wu, 2005; G.-Q. Chen, 2010; Philip et al., 2007). O PHA pode ser modificado com a adição de cadeias de PEG ou de dendrímeros. A taxa

de degradação do polímero pode ser controlada através do ajuste do seu peso molecular. O tamanho da partícula demonstrou afectar a taxa de libertação do fármaco, sendo que partículas maiores libertam mais rapidamente o fármaco do que partículas de tamanho inferior (Xiong, Yao, Zhan & Chen, 2010).

6.1. Micro/Nanopartículas

A utilização de micro/nanopartículas em terapêutica tem vindo a crescer nos últimos anos em variadas áreas e principalmente na terapêutica anti-cancerígena. A propriedade de aumentar a eficácia terapêutica e diminuir a toxicidade para células normais em simultâneo é uma das grandes utilidades deste tipo de terapêutica, sendo actualmente desenvolvida para diversos fármacos (Masood, Chen, Yasin, Hasan et al., 2013). As micropartículas, quando comparadas com nanopartículas, têm maior dificuldade em passar membranas no organismo (Shah et al., 2010). Ao preparar nanopartículas de PHA é possível veicular fármacos até ao interior de células de uma forma mais eficaz. O seu reduzido tamanho permite que estas penetrem os tecidos, sejam aceites pelas células facilmente e permaneçam em circulação durante mais tempo, possuindo uma *clearance* inferior (Shah et al., 2010; Xiong et al., 2010). Devido às suas características anfipáticas a agregação destas partículas decorre de uma forma autónoma e as suas propriedades termodinâmicas permitem uma maior estabilidade em meio aquoso (Shah et al., 2010). Além das propriedades já referidas, a capacidade destas partículas poderem ser alteradas de forma veicularem um fármaco a alvos específicos representa uma vantagem excelente já que a falta especificidade a células alvo é uma limitação de muitos fármacos (Goldberg, Langer & Jia, 2007). É possível alterar características indesejáveis ou ausentes destes polímeros. As características de porosidade, taxa de erosão e libertação do fármaco de micro/nanopartículas são possíveis de modificar através de diferentes métodos como o de *blending* ou o de copolimerização (Bidone et al., 2009).

De forma a criar estas partículas com um fármaco incorporado é possível aplicar diferentes técnicas adaptadas. O método mais utilizado é o de evaporação/extracção por solvente devido à sua relativa simplicidade e por ser uma técnica adequada para produção em massa. No entanto métodos como a polimerização por emulsão ou *spray drying* também são descritos (Lee et al., 2011; Ré, 2006; C. Wang, Ye, Zheng, Liu & Tong, 2007; Yang, Plackett, Needham & Burt, 2009).

No método de polimerização por emulsão a concentração do polímero, temperatura, solventes para o polímero e fármaco e técnicas de homogenização ou de ultra-sons são parâmetros utilizados para produzir partículas com o tamanho desejado e elevada taxa de incorporação do fármaco (Xiong et al., 2010).

Foi descrito um método de preparação de nanopartículas por diálise que torna o processo mais simples e remove algumas desvantagens comuns a outros métodos, tais como a remoção de solventes e a utilização e respectiva remoção de grandes quantidades de surfactantes. Na formação de nanopartículas de PHB foi possível obter partículas com uma excelente forma esférica e uma variação de diâmetro muito reduzida. Foi possível obter partículas de menor tamanho quando comparado a outras técnicas como a evaporação de solvente. No entanto a eficiência de incorporação do fármaco utilizado neste estudo nas nanopartículas foi bastante baixo (Errico et al., 2009).

A libertação de fármaco é habitualmente constituída por duas fases. A primeira consiste num pico inicial de libertação de fármaco devido a uma rápida dissolução do fármaco próximo da superfície da partícula e uma segunda em que a libertação é exponencial resultante da difusão do fármaco que está no interior da partícula (C. Wang et al., 2007). Yang et al. (2009) demonstrou que a quantidade de fármaco incorporado em micropartículas influencia o nível de libertação na primeira fase. Uma forma encontrada para reduzir este pico de libertação inicial foi encapsular micropartículas de P3HB3HV com múltiplas camadas de filmes de polissacarídeos.(C. Wang et al., 2007).

De forma a vectorizar estas partículas a alvos específicos, para além da utilização de PEG é possível associar ligandos específicos à sua superfície de modo a que as partículas sejam reconhecidas pelas células alvo (Magadala et al., 2008).

O PEG é frequentemente incorporado na superfície de nanopartículas de biopolímeros pois possibilita uma maior resistência à fagocitose e opsonização, obtendo-se desta forma uma maior resistência ao sistema imunitário e período de circulação no sangue mais elevado quando comparado a nanopartículas sem esta associação (C. Chen et al., 2008; C. Chen, Yu, Cheng, Yu & Cheung, 2006; Shah et al., 2010; C. Zhang et al., 2010). Shah et al. (2010) construiu nanopartículas de PHA utilizando bloco de copolímero de P3HB3HV com incorporação de PEG, obtendo resultados que indicam que esta associação permite a vectorização de fármacos hidrofóbicos sem efeitos tóxicos

para as células sãs. Com a utilização de um bloco de polímero constituído por PEG-PHB-PEG foi possível criar nanopartículas em meio aquoso sem a utilização de surfactantes; e com o alongamento da secção de PHB as nanopartículas associam-se mais rapidamente. Estas partículas obtiveram bons resultados na quantidade e eficiência de encapsulação de fármaco e uma libertação de fármaco exponencial (C. Chen et al., 2006). O ibuprofeno foi incorporado em micropartículas constituídas por matrizes de P3HB. Neste caso o método de *blending* foi utilizado para conjugar o P3HB com o copolímero PLA-PEG. Esta associação permitiu um maior controlo na libertação de fármaco (Bidone et al., 2009).

As proteínas estruturais PhaP encontradas nos grânulos de PHA foram utilizadas para produzir um sistema de veiculação de fármacos mediado por um receptor. O sistema consiste na utilização de nanopartículas de PHA como veiculadores de fármacos hidrofóbicos em que as PhaP na sua superfície são fundidas a ligandos que permitem a vectorização do fármaco a um alvo específico (G.-Q. Chen, 2010).

A polimerase de PHA foi também utilizada de forma a criar micelas de PHA de produção autónoma associada a ligandos específicos para células tumorais. Esta é utilizada para produzir um bloco de polímero (neste caso de P3HB) e por sua vez os ligandos são fundidos a esta proteína. Os blocos de P3HB têm tendência a agregar-se autonomamente devido à sua hidrofobicidade permanecendo, no entanto, ligados às respectivas polimerases (de características hidrofílicas) dando origem a micelas, em meio aquoso. O fármaco pode então ser incorporado nestas micelas durante o processo de polimerização e de agregação autónoma. Esta estratégia é representada na Figura 6. Deste forma, é necessário recorrer ao substrato correspondente à sintetase utilizada. Deste modo, utilizando uma quantidade fixa de substrato e aumentando ou diminuindo a quantidade de polimerase é possível determinar o tamanho da micela. Tendo sido comprovado, *in vivo*, que com este sistema foi possível atingir as células pretendidas (células de cancro da mama) (H. N. Kim et al., 2009). Lee et al. (2011) recorreu também à polimerase de PHA para fundir ligandos específicos. No entanto, aplicou o bloco de polímero acima descrito de uma forma diferente, associando-o à superfície de nanopartículas de P3HB.

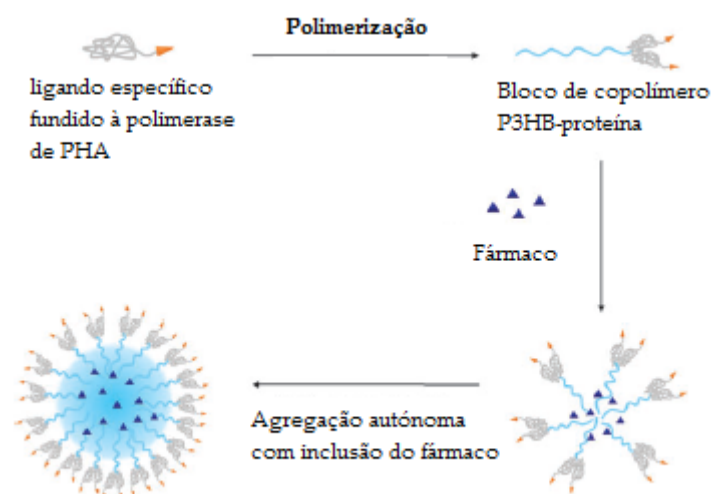


Figura 6 - Representação da estratégia de micelas com ligandos específicos a partir de blocos de copolímeros de P3HB-proteína com incorporação de fármaco com agregação autônoma. Adaptado de H. N. Kim et al. (2009).

6.2. Tipos de Fármacos Utilizados

As proteínas relevantes em terapêutica como anticorpos, citocinas ou enzimas têm um papel importante no tratamento de doenças virais, auto-imunes ou malignas (tumores, por exemplo). No entanto, a sua baixa estabilidade, durabilidade e biodisponibilidade impedem melhores resultados na sua aplicação. A utilização de nanopartículas poliméricas poderá permitir a preservação destas proteínas e assegurar o seu transporte e libertação no local específico de acção de uma forma controlada (Chiellini et al., 2007).

Recentemente, o PHA foi estudado para construir uma vacina contra a *Mycobacterium bovis*, responsável pela tuberculose bovina. Foram utilizadas nanopartículas de P3HB apresentando antigénios micobacterianos na sua superfície. O uso de vacinas proteicas produz habitualmente uma fraca resposta imunitária, no entanto a associação com este tipo de nanopartículas parece aumentar a imunogenicidade produzida, tendo sido atingidos resultados muito promissores em ratos. Além disso, foi comprovado que o tamanho das partículas utilizadas influenciam a resposta imunitária, sendo que partículas de menor tamanho têm melhores resultados (Parlane, Rehm, Wedlock & Buddle, 2013).

Os fármacos anti-cancerígenos têm como principais desvantagens a sua toxicidade, baixa biodisponibilidade oral e vectorização e distribuição tecidual imprecisa, tanto a células cancerígenas como normais. Estas características representam limitações à sua

utilização pelo que a aplicação de nanopartículas poliméricas poderá aperfeiçoar a terapêuticas com estes fármacos (Magadala et al., 2008; Masood, Chen, Yasin, Fatima et al., 2013).

O ácido retinóico é a principal forma biológica activa da vitamina A e é um potente regulador da transcrição de genes, tendo um importante papel na regulação e diferenciação do crescimento celular. No entanto tem uma fraca solubilidade em água e um tempo de semi-vida curta no sangue sendo muito difícil a sua administração parentérica. Em relação à sua administração oral os valores de biodisponibilidade obtidos são inconstantes devido ao efeito de primeira passagem. Devido ao interesse em incluir este composto em terapêuticas anti-cancerígenas foi estudada a sua incorporação em nanopartículas de PHB (Errico et al., 2009).

A elipticina é um alcalóide que possui uma actividade anti-cancerígena destacada tendo demonstrado maior eficácia no carcinoma pulmonar de células não pequenas e em células de tumor cerebral. A sua aplicação clínica está limitado pela sua elevada toxicidade e reduzida solubilidade em água (Masood, Chen, Yasin, Fatima et al., 2013; Masood, Chen, Yasin, Hasan et al., 2013). Através da encapsulamento em nanopartículas de P3HB3HV foi possível duplicar a inibição das células cancerígenas em relação ao fármaco isolado (Masood, Chen, Yasin, Fatima et al., 2013).

As fosfatidilinositol 3-quinases (PI3Ks) são um grupo de quinases envolvidas em múltiplos processos celulares. Desta forma, os inibidores de PI3Ks têm vindo a despertar interesse na terapêutica anti-cancerígena. No entanto, embora com bons resultados *in vitro*, estes inibidores não têm produzido os mesmos resultados *in vivo* devido à sua fraca solubilidade, estabilidade e elevada *clearance*. A encapsulação de um destes inibidores em P3HB permitiu o aumento do seu tempo de semi-vida e melhorou a sua biodisponibilidade. Embora ainda sejam necessários estudos para avaliar o efeito anti-cancerígeno deste sistema de veiculação os resultados parecem promissores (X.-Y. Lu et al., 2011).

A doxorrubicina é utilizada para tratar vários tipos de tumores sólidos. No entanto a sua elevada cardiotoxicidade e a resistência de alguns tumores, quer inerente ou adquirida, limita a sua utilização terapêutica. Os resultados da sua encapsulação em nanopartículas de blocos de PEG-P3HB-PEG foram muito interessantes. A eficiência de encapsulação do fármaco foi bastante elevada, sendo o tamanho das nanopartículas reduzido.

Obtiveram-se bons resultados *in vivo* em relação à acção anti-cancerígena do fármaco, com uma maior permanência do fármaco em circulação e boa penetração no tumor, tendo o tempo de semi-vida do fármaco passado de 10 minutos para 4 horas. Embora os resultados na redução do tumor tenham sido melhores quando o fármaco foi administrado sozinho, a sua associação com este sistema de veiculação permitiu uma redução muito significativa na toxicidade sistémica (T.-H. Kim, Mount, Gombotz & Pun, 2010).

Vários estudos têm utilizado o ácido fólico como ligando específico para determinados tipos de cancro que expressam receptores de folato. No entanto a sua associação a PHA ainda não tinha acontecido. De forma a criar um novo sistema de vectorização de fármacos anti-cancerígenos, a doxorrubicina foi encapsulada em nanopartículas de poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi octanoato) (P3HB3HO). A estas nanopartículas foram associadas PEG e o ácido fólico como ligando específico. Tanto os testes *in vitro* como *in vivo*, obtiveram resultados muito promissores. A citotoxicidade foi muito forte nas células tumorais utilizadas *in vitro* e a actividade anti-cancerígena *in vivo* demonstrou uma eficácia terapêutica muito melhor (C. Zhang et al., 2010).

6.3. Tipos de Sistemas de Veiculação de Fármacos

O uso potencial de PHA em sistemas de veiculação de fármacos tem sido abordado por diversos estudos. Entre estes estudos foi investigada a utilização de PHA como implantes subcutâneos, comprimidos de administração oral ou micropartículas veiculadoras de administração injectável (Williams & Martin, 2002).

A via oral é a via mais utilizada na administração de fármacos, pois permite uma maior adesão à terapêutica por parte do doente e possui uma grande facilidade de administração. No entanto é uma via com numerosas limitações. Os efeitos sistémicos destes fármacos estão sujeitos a variáveis taxas de absorção e concentrações séricas inesperadas. O elevado conteúdo ácido e enzimas enzimáticas do tracto digestivo pode degradar muitos fármacos antes de estes poderem ser absorvidos para a corrente sanguínea. O baixo pH pode também ser responsável pela insolubilidade de determinados fármacos, comprometendo a sua biodisponibilidade. Além disso, o fármaco em si pode ser irritante para a mucosa do sistema gastrointestinal. Por último, o efeito de primeira passagem pode inactivar o fármaco antes de chegar à circulação sistémica (Jain, 2008; Magadala et al., 2008).

Os comprimidos de PHA são formados através da compressão de uma mistura homogénea de polímero e fármaco. A quantidade de fármaco incorporado no polímero demonstrou influenciar a sua taxa de libertação, sendo que baixas quantidades de incorporação resultaram numa taxa de libertação mais prolongada e elevadas taxas de incorporação originaram uma libertação do fármaco consideravelmente mais rápida. A incorporação de pequenas quantidades de polímeros de peso molecular maior levaram a uma libertação mais lenta do fármaco. Percentagens de valerato no polímero mais elevadas provocaram taxas de libertação mais lentas, levando a uma maior compressibilidade do polímero e uma difusão mais lenta do fármaco (Williams & Martin, 2002).

O P3HV foi utilizado como sistema de veiculação de administração oral, através da compressão de matrizes deste polímero, demonstrando vantagens em relação à simplicidade de construção quando comparado com sistemas alternativos (G.-Q. Chen, 2010).

Embora a administração parentérica possua inconvenientes (o reduzido consentimento do doente, a incompatibilidade de alguns fármacos e o facto de ser uma via muito invasiva) representa um método que garante um início de acção rápido, com uma biodisponibilidade praticamente completa e uma alternativa viável à administração oral (Jain, 2008). O *design* de sistemas injectáveis para veiculação de fármacos a partir de biopolímeros tem sido estudado ao longo dos últimos anos. A incorporação de fármacos em nanopartículas já referida é uma das estratégias utilizadas (Bidone et al., 2009).

Foram utilizadas nanopartículas de P3HB para encapsular tramadol com o objectivo de obter uma libertação controlada deste fármaco quando administrado. Esta encapsulação permitiu um efeito analgésico por mais de 20 horas quando administrado por via epidural em ratos; sendo que 50% do fármaco é libertado nas primeiras 24h. Não tendo sido observado qualquer efeito de toxicidade nesta administração. No entanto mais estudos são sugeridos de forma a melhor controlar a libertação do fármaco (Salman et al., 2003).

A veiculação transdérmica de fármacos tem várias das vantagens de um método ideal para a administração de fármacos. No entanto devido às características hidrofóbicas de extracto córneo a utilização deste tipo de veiculação está, actualmente, principalmente limitada a fármacos hidrofóbicos de baixo peso molecular que tenham efeito em baixas

concentrações (Z. Wang et al., 2003a, 2003b; Q. Wu et al., 2009). A utilização de mclPHA para este tipo de sistemas tem originado interesse devido às suas características (Q. Wu et al., 2009). Wang et al. (2003a) desenvolveu um sistema veiculador transdérmico de tansulosina. Este fármaco é muito polarizado e tem uma enorme dificuldade em permear a pele, por isso foi dispersado numa matriz de mclPHA (formado por um copolímero poli-3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxi octanoato). O dendrímero poliamidoamina foi adicionado à matriz de modo a que o fármaco não se depositasse no seu interior. Esta conjugação permitiu aumentar significativamente a quantidade de fármaco permeado através da pele. Fármacos como a clonidina e a cetoprofeno foram mais tarde testados nestas matrizes (Z. Wang et al., 2003b). Os modelos de matrizes de mclPHA têm apresentado um boa adesão à pele (Q. Wu et al., 2009)

Em cirurgias ortopédicas são utilizadas terapêuticas prolongadas com antibióticos de modo a prevenir complicações no pós-operatório. Contudo, frequentemente, esta abordagem não consegue atingir níveis terapêuticos pretendidos nos tecidos lesados. A administração destes antibióticos localmente apresenta vantagens relevantes, sendo possível atingir níveis de concentração nos tecidos mais elevados e durante mais tempo sem os efeitos secundários que a administração sistémica implica. O P3HB3HV foi utilizado para encapsular ácido fusídico de forma a ser administrado no local da lesão. A distribuição do fármaco foi uniforme nas micropartículas formadas com P3HB3HV, ao contrário de outros polímeros também utilizados como o PLA e PGLA. Na Figura 7 é possível observar a degradação das micropartículas ao fim de uma semana dependendo da quantidade de fármaco incorporado (Yang et al., 2009).

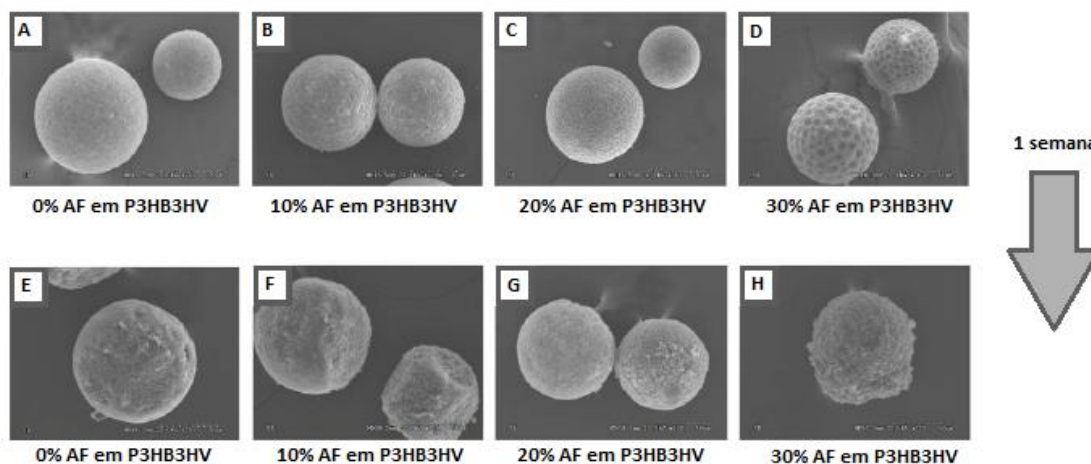


Figura 7 - Imagens de microscópio electrónico de varrimento ilustrando os diferentes efeitos da incorporação de ácido fusídico em micropartículas de P3HB3HV (A-D) e a sua degradação ao fim de 1 semana (E-H). Adaptado de Yang et al. (2009).

O P3HB e o P4HB foram utilizados para desenvolver *shunts* de drenagem ocular para o controlo de glaucoma. Foram incorporados fármacos nestes sistemas de modo a inibir a proliferação de fibroblastos e fibrose. A vantagem de utilizar PHA é o facto de à medida que o polímero se degrada este é substituído por tecido novo que irá reconstituir a drenagem ocular. Os testes *in vitro* demonstraram uma boa inibição dos fibroblastos. Os testes *in vivo* comprovaram a biocompatibilidade dos polímeros, no entanto são necessários estudos mais prolongados. Este sistema apresenta grande potencial tanto com o P3HB como com o P4HB, no entanto é sugerido que o *shunt* seja construído com o P4HB devido à sua melhor flexibilidade e este seja coberto com o P3HB com os fármacos incorporados (Löbner et al., 2011).

A indometacina (anti-inflamatório) e o dipiridamol (anti-trombótico) foram estudados de forma a serem incorporados em filmes de P3HB. Esta incorporação permite em teoria a maior resistência de dispositivos médicos (que tenham contacto com sangue) à formação de trombos e regular o processo inflamatório resultante do implante. A libertação destes fármacos resultou de uma primeira fase de difusão e uma segunda resultante da degradação da matriz polimérica. Estes resultados foram de condições *in vitro* pelo que é necessário aprofundar o estudo destes materiais. É, para já, uma aplicação com grande potencial (Bonartsev et al., 2006).

7. Conclusão

A veiculação de fármacos é uma área cuja importância é crescente. A procura de sistemas de veiculação que permitam melhorar as propriedades de um fármaco, seja a nível de biodisponibilidade, efeito terapêutico, redução de efeitos secundários, vectorização ou alteração da libertação do mesmo tem sido intensa. As propriedades dos PHA produzidos por via biológica, a sua biodegradabilidade, óptima biocompatibilidade e a possibilidade de modificação de forma a adaptar o polímero a inúmeras situações têm alimentado o interesse nestes biopolímeros. A potencialidade é inegável e os resultados alcançados com fármacos que de outra forma têm a sua utilização limitada, permitem olhar para estes polímeros como uma eventual alternativa a outros utilizados na veiculação de fármacos. Outra vantagem que este polímero apresenta é a capacidade de se poder conciliar a veiculação de fármacos a outro tipo de aplicações médicas, como é o caso de implantes.

No entanto, a utilização dos PHA na veiculação de fármacos é ainda limitada por diversos motivos. Apesar de resultados muitos promissores, a compreensão destes polímeros necessita de ser melhorada. Embora a curto e médio prazo os resultados de biocompatibilidade e biodegradabilidade sejam bastantes positivos, diversos autores defendem que é essencial a melhor compreensão destes processos, principalmente a longo prazo. O mesmo se aplica à incorporação do fármaco e à sua libertação, que dependem de diferentes factores, alguns ainda não completamente entendidos. Apesar de, na área de veiculação de fármacos, o custo de PHA não seja uma grande limitação, a sua redução pode incentivar um maior número de estudos relativos a estes polímeros. O número de PHA que são actualmente estudados na área da veiculação é limitado, pelo que o aumento de polímeros estudados iria também contribuir para uma melhor compreensão deste grupo de biopolímeros.

Deste modo, são necessários mais estudos com PHA para que este polímero seja considerado uma alternativa realmente viável na veiculação de fármacos actualmente desenvolvida.

8. Bibliografia

- Abd-El-Haleem, D. A. M. (2009). Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates in Wild type Yeasts. *Polish Journal of Microbiology*, 58(1), 37–41. Retrieved from <http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol5812009037.pdf>
- Artsis, M. I., Bonartsev, a. P., Iordanskii, a. L., Bonartseva, G. a. & Zaikov, G. E. (2012). Biodegradation and Medical Application of Microbial Poly(3-Hydroxybutyrate). *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 555(1), 232–262. doi:10.1080/15421406.2012.635549
- Bidone, J., Melo, A. P. P., Bazzo, G. C., Carmignan, F., Soldi, M. S., Pires, A. T. N. & Lemos-Senna, E. (2009). Preparation and characterization of ibuprofen-loaded microspheres consisting of poly(3-hydroxybutyrate) and methoxy poly (ethylene glycol)-b-poly (D,L-lactide) blends or poly(3-hydroxybutyrate) and gelatin composites for controlled drug release. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 588–593. doi:10.1016/j.msec.2008.10.016
- Bonartsev, a. P., Bonartseva, G. a., Makhina, T. K., Myshkina, V. L., Luchinina, E. S., Livshits, V. a., ... Iordanskii, a. L. (2006). New poly(3-hydroxybutyrate)-based systems for controlled release of dipyridamole and indomethacin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42(6), 625–630. doi:10.1134/S0003683806060159
- Cavalheiro, J. M. B. T., de Almeida, M. C. M. D., Grandfils, C. & da Fonseca, M. M. R. (2009). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44(5), 509–515. doi:10.1016/j.procbio.2009.01.008
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(6), 621–632. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.07.014
- Chen, C., Cheng, Y. C., Yu, C. H., Chan, S. W., Cheung, M. K. & Yu, P. H. F. (2008). In vitro cytotoxicity, hemolysis assay, and biodegradation behavior of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol)-poly(3-

- hydroxybutyrate) nanoparticles as potential drug carriers. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 87(2), 290–8. doi:10.1002/jbm.a.31719
- Chen, C., Yu, C. H., Cheng, Y. C., Yu, P. H. F. & Cheung, M. K. (2006). Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. *Biomaterials*, 27(27), 4804–14. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.04.039
- Chen, G.-Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society reviews*, 38(8), 2434–46. doi:10.1039/b812677c
- Chen, G.-Q. (2010). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. *Plastics from Bacteria*, 14, 17–37. doi:10.1007/978-3-642-03287
- Chen, G.-Q. & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565–78. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.036
- Chiellini, F., Bartoli, C., Dinucci, D., Piras, A. M., Anderson, R. & Croucher, T. (2007). Bioeliminable polymeric nanoparticles for proteic drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 343(1-2), 90–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.05.012
- Da Silva, L. F., Gomez, J. G. C., Rocha, R. C. S., Taciro, M. K. & Pradella, J. G. C. (2007). Produção Biotecnológica de Poli-hidroxialcanoatos para a Geração de Polímeros Biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, 30(7), 1732–1743. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=2e4RN9FwEjQC&oi=fnd&pg=PA7&dq=Revisão&ots=vTs6LcV0It&sig=xIK0ZT245NYcZAJiBDq1M-4apLU>
- Demarco, S. M. (2005). Advances in Polyhydroxyalkanoate Production in Bacteria for Biodegradable Plastic. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal*, 1(1), 1–4. Retrieved from <http://ejournal.vudat.msu.edu/index.php/mmg445/article/viewArticle/40>

- Errico, C., Bartoli, C., Chiellini, F. & Chiellini, E. (2009). Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2009, 571702. doi:10.1155/2009/571702
- Feng, L., Yoshie, N. & Asakawa, N. (2004). Comonomer- Unit Compositions, Physical Properties and Biodegradability of Bacterial Copolyhydroxyalkanoates. *Macromolecular*, 186–198. doi:10.1002/mabi.200300092
- Goldberg, M., Langer, R. & Jia, X. (2007). Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 18(3), 241–68. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3017754&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Grage, K., Jahns, A. & Parlane, N. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10(4), 660–669. doi:10.1042/BJ20031254
- Hazer, B. & Steinbüchel, A. (2007). Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 1–12. doi:10.1007/s00253-006-0732-8
- Jain, K. K. (2008). Drug delivery systems - an overview. *Methods in Molecular Biology*, 437(5), 1–50. doi:10.1007/978-1-59745-210-6_1
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of bacteriology*, 191(10), 3195. doi:10.1128/JB.01723-08
- Jendrossek, D. & Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56, 403–32. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160838
- Kim, D. Y., Kim, H. W., Chung, M. G. & Rhee, Y. H. (2007). Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 45(2), 87–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483792>

- Kim, H. N., Lee, J., Kim, H. & Kim, Y. R. (2009). Enzymatic synthesis of a drug delivery system based on polyhydroxyalkanoate-proteinblock copolymers. *Chemical Communications*, 7345(46), 7104–7106. doi:10.1039/b912871a
- Kim, T.-H., Mount, C. W., Gombotz, W. R. & Pun, S. H. (2010). The delivery of doxorubicin to 3-D multicellular spheroids and tumors in a murine xenograft model using tumor-penetrating triblock polymeric micelles. *Biomaterials*, 31(28), 7386–97. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.06.004
- Koller, M., Salerno, A., Dias, M., Reiterer, A. & Braunegg, G. (2010). Modern Biotechnological Polymer Synthesis: A Review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 255–269. Retrieved from http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=87204
- Lee, J., Jung, S. G., Park, C. S., Kim, H. Y., Batt, C. A. & Kim, Y. R. (2011). Tumor-specific hybrid polyhydroxybutyrate nanoparticle: Surface modification of nanoparticle by enzymatically synthesized functional block copolymer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(10), 2941–2944. doi:10.1016/j.bmcl.2011.03.058
- Li, R., Zhang, H. & Qi, Q. (2007). The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*, 98(12), 2313–2320. doi:10.1016/j.biortech.2006.09.014
- Löbler, M., Sternberg, K., Stachs, O., Allemann, R., Grabow, N., Roock, A., ... Guthoff, R. (2011). Polymers and drugs suitable for the development of a drug delivery drainage system in glaucoma surgery. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 97(2), 388–95. doi:10.1002/jbm.b.31826
- Loo, C. Y. & Sudesh, K. (2007). Polyhydroxyalkanoates: bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal (MPJ)*, 2(2), 31–57. Retrieved from http://www.cheme.utm.my/mpj/images/070202_4kum.pdf
- Lu, J., Tappel, R. C. & Nomura, C. T. (2009). Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Polymer Reviews*, 49(3), 226–248. doi:10.1080/15583720903048243

- Lu, X.-Y., Ciraolo, E., Stefania, R., Chen, G.-Q., Zhang, Y. & Hirsch, E. (2011). Sustained release of PI3K inhibitor from PHA nanoparticles and in vitro growth inhibition of cancer cell lines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(5), 1423–33. doi:10.1007/s00253-011-3101-1
- Luo, L., Wei, X. & Chen, G.-Q. (2009). Physical properties and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) blended with poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 20(11), 1537–53. doi:10.1163/092050609X12464345023041
- Magadala, P., Vlerken, L. E., Shahiwala, A. & Amiji, M. M. (2008). Multifunctional Polymeric Nanosystems for Tumor-Targeted Delivery. *Multifunctional Pharmaceutical Nanocarriers*, 33–66. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/R37P4782465L50G6.pdf>
- Martin, D. P. & Williams, S. F. (2003). Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), 97–105. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X03000408>
- Masood, F., Chen, P., Yasin, T., Fatima, N., Hasan, F. & Hameed, A. (2013). Encapsulation of Ellipticine in poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) based nanoparticles and its in vitro application. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 33(3), 1054–60. doi:10.1016/j.msec.2012.11.025
- Masood, F., Chen, P., Yasin, T., Hasan, F., Ahmad, B. & Hameed, A. (2013). Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-12 mol % 3-hydroxyvalerate) by *Bacillus cereus* FB11: its characterization and application as a drug carrier. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 24(8), 1927–37. doi:10.1007/s10856-013-4946-x
- Parlane, N. a, Rehm, B. H. a, Wedlock, D. N. & Buddle, B. M. (2013). Novel particulate vaccines utilizing polyester nanoparticles (bio-beads) for protection against *Mycobacterium bovis* infection-A review. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2–7. doi:10.1016/j.vetimm.2013.04.002

- Peng, S.-W., Guo, X.-Y., Shang, G.-G., Li, J., Xu, X.-Y., You, M.-L., ... Chen, G.-Q. (2011). An assessment of the risks of carcinogenicity associated with polyhydroxyalkanoates through an analysis of DNA aneuploid and telomerase activity. *Biomaterials*, 32(10), 2546–55. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.051
- Philip, S., Keshavarz, T. & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 82(3), 233–247. doi:10.1002/jctb
- Quillaguamán, J., Guzmán, H. & Van-Thuoc, D. (2010). Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1687–1696. doi:10.1007/s00253-009-2397-6
- Ré, M. I. (2006). Formulation Drug Delivery Systems by Spray Drying. *Drying Technology: An International Journal*, 24(4), 433–446.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi & Kalia, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87(2), 137–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12765352>
- Reemmer, J. (2009). Advances in the synthesis and extraction of biodegradable polyhydroxyalkanoates in plant systems – A review. *MMG 445 Basic Biotechnology eJournal*, 5, 44–49. Retrieved from <http://ejournal.vudat.msu.edu/index.php/mmg445/article/viewArticle/383>
- Rehm, B. (2007). Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. *Current Issues in Molecular Biology*, 9, 41–62. Retrieved from <http://www.horizonpress.com/cimb/v/v9/03.pdf?q=zz-g-x-g>
- Rodríguez-Carmona, E. & Villaverde, A. (2010). Nanostructured bacterial materials for innovative medicines. *Trends in microbiology*, 18(9), 423–430. doi:10.1016/j.tim.2010.06.007
- Salman, M. A., Sahin, A., Onur, M. A., Öge, K., Kassab, A. & Aypar, Ü. (2003). Tramadol encapsulated into polyhydroxybutyrate microspheres: *Acta Anaesthesiol Scandinavica*, 47, 1006–1012.

- Shah, M., Naseer, M., Choi, M. & Kim, M. (2010). Amphiphilic PHA-mPEG copolymeric nanocontainers for drug delivery: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 400(1-2), 165–175. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.08.008
- Shishatskaya, E. (2009). Distribution and Resorption of Intravenously Administrated Polymer Microparticles in Tissues of Internal Organs of Laboratory Animals. *Journal of Siberian Federal University*, 4(2009 2), 453–465. Retrieved from http://www.biotech.sfu-kras.ru/files/191_Shishatskaya_et_al._2009.pdf
- Shrivastav, A., Kim, H.-Y. & Kim, Y.-R. (2013). Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed research international*, 13, 581684. doi:10.1155/2013/581684
- Snell, K. & Peoples, O. (2002). Polyhydroxyalkanoate polymers and their production in transgenic plants. *Metabolic Engineering*, 4, 29–40. doi:10.1006/mben.2001.0214
- Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25, 1503–1555. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670000000356>
- Sudesh, K., Bhubalan, K., Chuah, J. & Kek, Y. (2011). Synthesis of polyhydroxyalkanoate from palm oil and some new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 1373–1386. doi:10.1007/s00253-011-3098-5
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M. & Shah, S. (2007). Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—a review. *Biotechnology Advances*, 25, 148 – 175. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.11.007
- Thomson, N., Roy, I., Summers, D. & Sivaniah, E. (2009). In vitro production of polyhydroxyalkanoates: achievements and applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(6), 760–767. doi:10.1002/jctb.2299
- Tokiwa, Y. & Calabia, B. P. (2004). Degradation of microbial polyesters: A theoretical prediction of molecular weight and polydispersity. *Macromolecules*, (Ici), 1181–1189. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma950314k>

- Tsuge, T. (2002). Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6), 579–584. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172302801980>
- Vroman, I. & Tighzert, L. (2009). Biodegradable Polymers. *Materials*, 2(2), 307–344. doi:10.3390/ma2020307
- Wampfler, B., Ramsauer, T. & Rezzonico, S. (2010). Isolation and purification of medium chain length poly (3-hydroxyalkanoates)(mcl-PHA) for medical applications using nonchlorinated solvents. *Biomacromolecules*, 11(10), 2716–2723. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm1007663>
- Wang, C., Ye, W., Zheng, Y., Liu, X. & Tong, Z. (2007). Fabrication of drug-loaded biodegradable microcapsules for controlled release by combination of solvent evaporation and layer-by-layer self-assembly. *International Journal of Pharmaceutics*, 338(1-2), 165–73. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.01.049
- Wang, Z., Itoh, Y., Hosaka, Y., Kobayashi, I., Nakano, Y., Maeda, I., ... Yamakawa, J. (2003a). Novel transdermal drug delivery system with polyhydroxyalkanoate and starburst polyamidoamine dendrimer. *Journal of Bioscience*, 95(5), 541–543. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172303800592>
- Wang, Z., Itoh, Y., Hosaka, Y., Kobayashi, I., Nakano, Y., Maeda, I., ... Yamakawa, J. (2003b). Mechanism of enhancement effect of dendrimer on transdermal drug permeation through polyhydroxyalkanoate matrix. *Journal of Bioscience*, 96(6), 537–540. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172304701462>
- Williams, S. F. & Martin, D. P. (2002). Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In Y. Doi & A. Steinbüchel (Eds.), *Biopolymers: Polyesters III* (Vol. 4, pp. 91–127). Wiley-VCH: Weinheim, Germany. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Applications+of+PHAs+in+Medicine+and+Pharmacy#0>

- Williams, S. F., Martin, D. P., Horowitz, D. M. & Peoples, O. P. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue: I. Tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 25(1-3), 111–121. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813099000227>
- Wu, H., Sheu, D. & Lee, C. (2003). Rapid differentiation between short-chain-length and bacteria with spectrofluorometry. *Journal of Microbiological Methods*, 53, 131 – 135.
- Wu, Q., Wang, Y. & Chen, G.-Q. (2009). Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, 37(1), 1–12. doi:10.1080/10731190802664429
- Xiong, Y.-C., Yao, Y.-C., Zhan, X.-Y. & Chen, G.-Q. (2010). Application of polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 21(1), 127–40. doi:10.1163/156856209X410283
- Yang, C., Plackett, D., Needham, D. & Burt, H. M. (2009). PLGA and PHBV microsphere formulations and solid-state characterization: possible implications for local delivery of fusidic acid for the treatment and prevention of orthopaedic infections. *Pharmaceutical research*, 26(7), 1644–56. doi:10.1007/s11095-009-9875-5
- Zhang, C., Zhao, L., Dong, Y., Zhang, X., Lin, J. & Chen, Z. (2010). Folate-mediated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) nanoparticles for targeting drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 76(1), 10–6. doi:10.1016/j.ejpb.2010.05.005
- Zhang, X., Luo, R., Wang, Z., Deng, Y. & Chen, G. (2009). Application of (R)-3-hydroxyalkanoate methyl esters derived from microbial polyhydroxyalkanoates as novel biofuels. *Biomacromolecules*, 10, 707–711. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm801424e>
- Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 5–21.

Retrieved

from

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X01002186>