

Universidade do Minho
Escola de Ciências

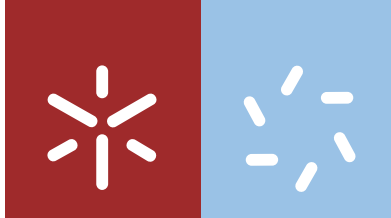
Ana Rita Melo Ribeiro

**Síntese e aplicação de péptidos
antimicrobianos no desenvolvimento de
pensos para cicatrização de feridas
cutâneas**

Ana Rita Melo Ribeiro **Síntese e aplicação de péptidos antimicrobianos no desenvolvimento de pensos para cicatrização de feridas cutâneas**

UMinho | 2020

dezembro de 2020



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Rita Melo Ribeiro

**Síntese e aplicação de péptidos
antimicrobianos no desenvolvimento de
pensos para cicatrização de feridas
cutâneas**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Sílvia Pereira Lima
e da
Doutora Helena Felgueiras

Direitos de Autor e Condições de Utilização do Trabalho por Terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



**Atribuição
CC BY**

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agradecimentos

A ciência, a investigação e a procura por novos projetos desafiantes é, de certa forma, um desafio em períodos normais, porém, num ano tão atípico como o que acabamos de enfrentar, os obstáculos que foram necessários enfrentar superaram todas as minhas expectativas. Foram muitos percalços pelo caminho, muitas imposições e limitações. Todos passamos por algo inimaginável, no entanto, previsível de ocorrer a qualquer momento, em qualquer altura. 2020, o ano da minha dissertação no Mestrado de Técnicas de Caracterização e Análise Química, não deveria ter sido a altura escolhida, mas sendo um assunto fora do nosso controlo, coube-nos a hercúlea tarefa de fazer com que resultasse.

Não poderia estar mais orgulhosa por tudo o que alcancei a nível pessoal, académico e profissional, desde o exponencial crescimento do meu currículo científico, ao culminar da entrega desta dissertação. Este projeto envolve por si só muito amor à ciência, mas também muito amor próprio e muito amor social que nos foi retirado nestes últimos tempos.

Tudo isto não seria possível sem o constante apoio incondicional da minha família, especialmente dos meus pais e irmão, que nunca me deixaram desistir face a todas as adversidades que foram aparecendo. A eles devo tudo. Ao Tiago, por toda a paciência, amor e dedicação. Às minhas amigas por todo o incentivo e por serem sempre um porto seguro.

Por me devolverem o amor à química e à investigação, fico eternamente grata à Professora Doutora Sílvia Pereira Lima e Professora Doutora Susana Costa por sempre me mostrarem para lá daquilo que era visível aos olhos e por serem sempre uma luz ao fundo de um túnel. À Doutora Helena e à Martinha, por me darem a conhecer o mundo de possibilidades que a têxtil representa, por toda a inovação e conhecimento científico sem o qual este trabalho nunca poderia ter avançado. Gostava ainda de agradecer ao Centro de Ciência e Tecnologia Têxtil (2C2T) por permitir a realização deste projeto nos seus laboratórios e ainda à Fundação da Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento do projeto onde este trabalho foi inserido, projeto PEPTEx PTDC/CTM-TEX/28074/2017 (POCI-01-0145-FEDER-028074).

Agradeço ao Departamento de Química da Universidade do Minho pela oportunidade de desenvolver grande parte do meu projeto de investigação e essencialmente por me ter colocado no Lab.40, junto à Maria José, à Carolina e à Cátia, que tantas vezes nos rimos com os fracassos obtidos, mas nos rimos ainda mais por todos os sucessos alcançados e conhecimentos adquiridos.

Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho

Resumo

Síntese e aplicação de péptidos antimicrobianos no desenvolvimento de pensos para cicatrização de feridas cutâneas

Uma ferida cutânea se não for devidamente tratada pode incorrer numa ferida crónica suscetível a infeções generalizadas, as quais podem resultar na morte do paciente. Atualmente, a engenharia de tecidos é descrita como um campo interdisciplinar que combina princípios de engenharia, química e biologia para gerar soluções que permitam reparar, restaurar e/ou melhorar as funções de tecidos lesados. No mesmo sentido, a área têxtil aborda soluções com base em fibras poliméricas, produzidas a partir de uma vasta gama de polímeros, que permitem gerar estruturas com uma grande área superficial, porosidade e resistência mecânica passivas de serem utilizadas como pensos bioativos que promovam uma atividade cicatrizadora e antimicrobiana eficiente.

Os péptidos com atividade antimicrobiana (AMPs) têm despertado muita atenção pela possibilidade de serem uma alternativa promissora aos antibióticos, na busca de agentes mais eficazes contra as bactérias, evitando que estas desenvolvam resistência e por ser possível a sua síntese e manipulação para serem aplicados como o elemento biomédico nos pensos bioativos. Este projeto resulta da colaboração entre o Departamento de Química e o Centro de Ciência e Tecnologia Têxtil (2C2T), e visa a síntese dos AMPs Peptaibolin e Tiger 17, através de metodologias de síntese em fase sólida assistida por micro-ondas, a sua caracterização química, estrutural e antimicrobiana, e posterior imobilização em estruturas nanofibrosas poliméricas produzidas por eletrospinning. Para atingir este objetivo, técnicas como a Ressonância magnética nuclear de próton ($^1\text{HMRN}$) e a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram aplicadas na caracterização do péptido, assim como testes antimicrobianos de concentração mínima inibitória ou cinética de evolução microbiana. A técnica de eletrospinning foi utilizada para o processamento de nanofibras a partir do polímero natural, acetato de celulose (CA), e do sintético, policaprolactona (PCL). As matrizes poliméricas geradas foram caracterizadas recorrendo a técnicas como MO, SEM, ATR-FTIR, TGA, DSC, ensaios de hidratação e determinação indireta de porosidade, e medições de ângulos de contacto e, conseqüente, determinação da energia de superfície.

Sendo possível concretizar todos os objetivos propostos para este trabalho, e fruto de uma extensa otimização de processos e investigação futura, esta inovação poderá resultar numa terapia única com vista a proteger as feridas contra infeções, e simultaneamente acelerar a cicatrização e regeneração dos tecidos.

Palavras-chave: Biomateriais; Péptidos antimicrobianos; Resistência bacteriana; Síntese peptídica em fase sólida assistida por microondas.

Abstract

Synthesis and application of antimicrobial peptides in cutaneous wound dressings

A skin wound if not properly treated can result in a chronic wound susceptible to widespread infections, which can result in the patient's death. Currently, tissue engineering is described as an interdisciplinary field that combines principles of engineering, chemistry and biology to generate solutions that allow to repair, restore and/or improve the functions of injured tissues. In the same sense, the textile area addresses solutions based on polymeric fibers, produced from a wide range of polymers, which allow the generation of structures with a large surface area, porosity and mechanical resistance that can be used as bioactive dressings that promote a healing and efficient antimicrobial activity.

Antimicrobial peptides (AMPs) have attracted a lot of attention due to the possibility of being an alternative to antibiotics in the search for more effective agents against bacteria, preventing them from developing resistance. They can be applied as the biomedical element in bioactive dressings because their synthesis and manipulation are possible.

This project results from the collaboration between the Department of Chemistry and the Center for Science and Textile Technology (2C2T), and aims at the synthesis of AMPs Peptaibolin and Tiger 17, through solid phase synthesis methodologies assisted by microwave, their chemical, structural and antimicrobial characterization, and subsequent immobilization on polymeric nanofiber structures produced by electrospinning. To achieve this objective, techniques such as Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H RMN) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were applied to the peptide characterization, as well as antimicrobial tests with minimal inhibitory concentration or kinetics of microbial evolution. The electrospinning technique was used to process nanofibers from the natural polymer, cellulose acetate (CA), and the synthetic, polycaprolactone (PCL). The polymeric matrices generated were characterized using techniques such as MO, SEM, ATR-FTIR, TGA, DSC, hydration tests and indirect porosity determination, measurements of contact angles and, consequently, determination of surface energy.

As it is possible to achieve all the objectives proposed for this work, and as a result of extensive optimization process and future research, this innovation may result in a unique therapy with a view to protecting wounds against infections, while simultaneously accelerating healing and tissue regeneration.

Keywords: Antimicrobial peptides; Bacteria resistance; Biomaterials; Microwave assisted solid-phase peptide synthesis.

Índice

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE ESQUEMAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XIV
ABREVIATURAS	XV
I. INTRODUÇÃO	1
1. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS: O MERCADO E A INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	2
2. PÉPTIDOS TERAPÊUTICOS	4
2.1 PÉPTIDOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	8
2.1.1 Mecanismo de ação dos AMPs	10
2.1.2 Aplicações dos AMPs	15
3. SÍNTESE PEPTÍDICA	17
3.1 REAGENTES DE ACOPLAMENTO	17
3.2 SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA	21
3.2.1 Suportes sólidos	25
3.2.2 Grupos protetores	27
3.3 SÍNTESE PEPTÍDICA EM FASE SÓLIDA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	30
4. BIOMATERIAIS PARA A CICATRIZAÇÃO E REGENERAÇÃO DA PELE EM FERIDAS CUTÂNEAS	31
4.1 TIPOS DE BIOMATERIAIS	34
4.2 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS PELA TÉCNICA DE ELETROSPINNING	38
4.3 ESTRATÉGIAS PARA INCORPORAÇÃO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	41
4.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	43
4.4.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (¹ H RMN)	43
4.4.2 Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC)	44
4.5 ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOFIBRAS	44
4.5.1 Microscopia Ótica de Campo Claro	45
4.5.2 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)	45
4.5.3 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)	46

4.5.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada a Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR).....	50
4.5.5 Ângulo de Contacto e Energia de Superfície.....	51
II. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
1. SÍNTESE DE PÉPTIDOS EM FASE SÓLIDA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	55
1.1 SÍNTESE DO PÉPTIDO PEPTAIBOLIN (AC-LEU-AIB-LEU-AIB-PHOL).....	55
1.1.1 Estudo da Solubilidade.....	58
1.1.2 Concentração Mínima Inibitória do Peptaibolin.....	59
1.2 SÍNTESE DO PÉPTIDO TIGER 17 C[TRP-CYS-(LYS-PRO) ₃ -ARG-CYS-HIS-NH ₂].....	59
1.2.1 Clivagem do Tiger 17 sem recorrer a <i>scavenger</i>	60
1.2.2 Clivagem do Tiger 17 com recurso a <i>scavenger</i>	62
1.2.3 Análise por HPLC.....	63
1.2.4 Concentração Mínima Inibitória do Tiger 17.....	64
2. PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS VIA ELETROSPINNING	65
2.1 OTIMIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES POLIMÉRICAS.....	65
2.2 PARÂMETROS DE PROCESSAMENTO.....	66
3. ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS	66
3.1 VISUALIZAÇÃO AO MO E SEM.....	66
3.2 CARACTERIZAÇÃO POR ATR-FTIR.....	69
3.3 CARACTERIZAÇÃO POR TGA.....	70
3.4 CARACTERIZAÇÃO POR DSC.....	72
3.5 TESTES DE <i>SWELLING</i> E POROSIDADE.....	73
3.5.1 <i>Swelling</i>	73
3.5.2 Porosidade.....	74
3.6 AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTACTO E ENERGIA DE SUPERFÍCIE.....	74
4. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	76
4.1 INCORPORAÇÃO DO TIGER 17C NOS FILMES POLIMÉRICOS.....	76
III. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	79
1.1 PERSPETIVAS FUTURAS.....	81
IV. SECÇÃO EXPERIMENTAL	83
1. MATERIAIS E REAGENTES.....	84
1.1 SÍNTESE DO PÉPTIDO PEPTAIBOLIN (AC-LEU-AIB-LEU-AIB-PHOL) POR MW-SPPS NA RESINA WANG.....	85
1.1.1 Reagente de acoplamento: DIC/HOBt.....	85
1.1.2 Reagente de acoplamento: DIC/Oxima.....	87

1.1.3 Caracterização do péptido Peptaibolin: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	88
1.2 SÍNTESE DO PÉPTIDO TIGER 17 C[TRP-CYS-(LYS-PRO) ₃ -ARG-CYS-HIS-NH ₂], POR MW-SPPS NA RESINA FMOC-RINK AMIDE	89
1.2.1 Caracterização do péptido Tiger 17: Cromatografia em Camada Fina (TLC).....	91
1.2.2 Caracterização do péptido Tiger 17: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	91
1.3 CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC) DO PEPTAIBOLIN E DO TIGER 17C	91
1.4 PREPARAÇÃO DAS MISTURAS POLIMÉRICAS DE PCL E PCL/CA	92
1.5 PRODUÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS POR ELETROSPINNING.....	93
1.6 CARACTERIZAÇÃO DAS FIBRAS	94
1.6.1 Tamanho, Porosidade e Morfologia.....	94
1.6.2 Análise por ATR-FTIR.....	94
1.6.3 Estabilidade Térmica: Análise por TGA E DSC	95
1.6.4 Medição de Ângulo de Contacto e Energia de Superfície	95
1.6.5 Grau de Swelling.....	96
1.7 FUNCIONALIZAÇÃO DAS FIBRAS COM TIGER 17C	96
1.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	97
1.8.1 Teste de Cinética do Crescimento Microbiano com Fibras funcionalizadas com Tiger 17C	97
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura química do lipopéptido com propriedades antibióticas, comercializado com o nome Cubicin®	5
Figura 2 - Estrutura química do péptido Bivalirudin, comercializado com o nome Angiomax® ..	5
Figura 3 – a) Ponte ditiol, ligando dois resíduos de cisteína, e consequentemente ciclizando a sequência peptídica e b) Ligação amida entre N-terminal e o C-terminal de uma cadeia de aminoácidos ciclizando uma sequência peptídica.	7
Figura 4 - Classes estruturais dos AMPs: a) estrutura em folhas β , b) estrutura em α -hélices anfipáticas, c) estrutura em loop, e d) estrutura distendida. ²⁴	9
Figura 5 - Modelo do tapete. A região hidrofóbica do péptido interage com a bicamada lipídica presente na membrana celular que possui características hidrofílicas. Essa interação, atingindo uma determinada concentração de AMP, desintegra a membrana, formando micelas. ³²	11
Figura 6 - Modelo toroidal. O AMP insere-se perpendicularmente na bicamada lipídica formando uma curvatura que dá origem a um poro. ³²	12
Figura 7 - Modelo do barril. É possível visualizar a formação de um poro na membrana citoplasmática pelo AMP. ³²	12
Figura 8 - a) Estrutura do ácido aminobutírico (Aib). b) As duas conformações possíveis do aminoácido isovalina (Iva).	14
Figura 9 - Sequência de aminoácidos presentes no Peptaibolin (Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Phol).	14
Figura 10 - a) Estrutura tridimensional do peptaibol Alamecicina que possui 19 aminoácidos em comparação com a b) estrutura tridimensional do peptaibol Peptaibolin com apenas 4 aminoácidos. ³⁹	15
Figura 11 - Sequência de aminoácidos dos AMPs Tigerinina 1 e 3.....	16
Figura 12 - Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos.....	17
Figura 13 - Exemplos de carbodiamidas que podem ser utilizadas como reagentes de acoplamento.....	18
Figura 14 - Estruturas de dois nucleófilos auxiliares utilizados como reagentes de acoplamento, HOBt e Oxima.....	21
Figura 15 - Estrutura da resina de Wang e estrutura da resina de cloreto de 2-clorotritilo.	26
Figura 16 - Estrutura da resina Fmoc-Rink-Amide.	27
Figura 17 - Grupos protetores temporários da cadeia lateral de aminoácidos como Cys e Arg.28	

Figura 18 - Estruturas químicas dos grupos protetores do terminal amino, Fmoc e Boc.	29
Figura 19 - Ação da energia de micro-ondas durante o crescimento da cadeia peptídica.	31
Figura 20 - Estrutura do acetato de celulose.	36
Figura 21 - Esquema representativo de um equipamento de eletrospinning.	39
Figura 22 - Representação de uma curva típica de TGA através de um gráfico de TG.	47
Figura 23 - Representação esquemática de um equipamento de DSC.	49
Figura 24 - Exemplo de uma curva típica de DSC, onde é possível visualizar as diferentes transições ocorridas.	49
Figura 25 - Representação do caminho efetuado por um feixe de IV em contacto com uma amostra no equipamento de ATR.	50
Figura 26 - Método da gota séssil (a) numa superfície com boa hidrofiliabilidade ou (b) boa hidrofobicidade. θ_{ca} é o ângulo de contato do líquido e γ_{SL} , γ_{SG} e γ_{LG} representam as interfaces sólido/líquido, sólido/gás e líquido/gás, respetivamente.	52
Figura 27 - Espetro de ^1H RMN do Peptaibolin com a combinação de reagentes de acoplamento DIC/HOBt.	56
Figura 28 - Espetro de ^1H RMN do Peptaibolin com a combinação de reagentes de acoplamento DIC/Oxima.	57
Figura 29 - Picos obtidos por HPLC analítico do Peptaibolin. a) Combinação DIC/HOBt e b) Combinação DIC/Oxima.	57
Figura 30 - Espetro de ^1H RMN do Tiger 17 (f) com a combinação de reagentes de acoplamento DIC/Oxima.	63
Figura 31 - Picos obtidos por HPLC analítico do Tiger 17. a) Tiger 17 (f) num eluente ACN/ H_2O (1:1)+0,1% TFA e b) Tiger 17 (f) num eluente ACN/ H_2O (1:3)+0,1% TFA. Para ambas as injeções foram utilizados fluxos de 0,4 mL/h e comprimento de onda de 215 nm.	64
Figura 32 – Imagens obtidas por microscopia ótica. a) PCL/CA 14%:10%wt (1:3) com condições de: 25 kV, 0,8 mL/h, 18 cm e b) PCL/CA 14%:10%wt (1:3) com condições de: 29 kV, 0,8 mL/h, 17 cm.	67
Figura 33 - Imagens obtidas por microscopia ótica de uma solução polimérica PCL/CA 14%:10%wt (1:1) com condições de: 25 kV, 2,5 mL/h, 18 cm.	67
Figura 34 - Imagens obtidas por microscopia ótica de uma solução polimérica (a) PCL 14% e (b) PCL/CA 14% 10% (3:1).	68
Figura 35 - Imagens de SEM com uma ampliação de 10.000x e respetivo gráfico de distribuição de diâmetros. Em a) PCL 14%wt em CDCl_3/DMF em condições de 12 kV, 0,7 mL/h e 17 cm e b) PCL/CA 14%:10%wt (3:1) em condições de 24,7 kV, 3,2 mL/h e 21 cm.	69

Figura 36 - Espetro de ATR-FTIR obtido para os dois filmes poliméricos de PCL e PCL/CA.....	70
Figura 37 - Gráfico de TG de % perda de massa vs temperatura (°C) dos dois filmes poliméricos PCL e PCL/CA.	71
Figura 38 - Gráfico da derivada de TG (dTG) dos dois filmes poliméricos PCL e PCL/CA.	72
Figura 39 - Gráfico de DSC de fluxo de calor (mW) em função da temperatura (°C) numa gama de 0-250°C, dos dois filmes poliméricos PCL e PCL/CA.	73
Figura 40 – Imagens retiradas do equipamento goniómetro e valores das médias dos ângulos de contacto para cada solvente testado. a) PCL em H ₂ O; b) PCL/CA em H ₂ O; c) PCL em benzeno; d) PCL/CA em benzeno; e) PCL em PEG; f) PCL/CA em PEG.	75
Figura 41 - a) Evolução do número de bactérias <i>S. aureus</i> ao longo do tempo (até 24h de incubação), em contato com o Tiger 17C (T17C). O controlo positivo para esta bactéria atingiu $\approx 8,1 \times 10^5$ unidade de formação de colónias (UFC)/mL. (b) Redução do log de <i>S. aureus</i> em relação ao tempo 0h.	77

Índice de Esquemas

Esquema 1 - Processo de ação das carbodiiâmidas como agentes de acoplamento, na presença de HOBt.	19
Esquema 2 - Mecanismo de racemização no carbono α . São possíveis duas vias: A) Enolização direta e B) Formação de oxazolona.....	20
Esquema 3 - Esquema geral da síntese peptídica em solução.....	22
Esquema 4 - Esquema geral de SPPS com recurso ao grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo) para proteção do terminal amina.....	24
Esquema 5 - Mecanismo de remoção do grupo Fmoc por ação da piperidina.....	29
Esquema 6 - Potencialidades dos AMPs para promover a cicatrização e regeneração de feridas cutâneas.....	33
Esquema 7 – Vias possíveis para a síntese do polímero PCL por três vias possíveis: (1) abertura do anel da ϵ -caprolactona por polimerização usando catalisadores aniônicos, catiónicos ou de coordenação ou (2) abertura do anel do radical livre de 2-metileno-1,3-dioxepano ou (3) condensação do ácido 6-hidroxicapróico.....	37

Índice de Tabelas

Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos péptidos em relação a biomoléculas sintéticas mais pequenas.....	6
Tabela 2 - Parâmetros que afetam a produção de nanofibras pela técnica de eletrospinning. ⁹²	39
Tabela 3 - Propriedades dos solventes utilizados na realização deste projeto para preparação das soluções poliméricas. ⁹⁰	41
Tabela 4 - Diferentes métodos de imobilização de péptidos em nanofibras produzidas por eletrospinning.	42
Tabela 5 - Fatores que afetam as curvas obtidas pela técnica de TGA e DSC.....	48
Tabela 6 – Comparação entre as duas sínteses do Peptaibolin, tendo em conta a combinação de reagentes de acoplamento.	55
Tabela 7 - Solventes testados e o seu efeito em contacto com o Peptaibolin num volume total de 1 mL.	58
Tabela 8 - Condições aplicadas e resultados obtidos na 1ª síntese de Tiger 17 usando TFA:H ₂ O (95:5) na clivagem do péptido da resina.....	61
Tabela 9 - Condições aplicadas e resultados obtidos na 2ª síntese de Tiger 17 usando TFA:TIPS:H ₂ O (95:2,5:2,5) na clivagem do péptido da resina.	62
Tabela 10 – Grau de swelling (%) dos filmes poliméricos de PCL e PCL/CA em contacto com 1 mL de SBF num período de 7 dias.	74
Tabela 11 – Porosidade (%) dos filmes poliméricos de PCL e PCL/CA em contacto com 1 mL de etanol por um período de 7 dias.....	74
Tabela 12 – Componente Polar e Dispersiva da energia superficial para os solventes testados onde γ_L é o valor da tensão superficial total do solvente e γ_L^d e γ_L^p são os valores da componente dispersiva e polar da energia superficial do solvente, respetivamente. ¹¹⁴	76
Tabela 13 - Condições testadas no equipamento eletrospinning para otimização da produção de fibras.	93

Abreviaturas

^1H RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
ACN	Acetonitrilo
Aib	Ácido aminoisobutírico
AMPs	Péptidos com atividade antimicrobiana (do inglês <i>Antimicrobial Peptides</i>)
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier acoplada a um equipamento de reflexão total atenuada (do inglês: <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance</i>)
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
CA	Acetato de celulose
DCC	<i>N,N'</i> -diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria diferencial de varredura (do inglês: <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
Eq.	Equivalentes
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Administração de alimentos e fármacos (do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>)
Fmoc	Grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo
Glu	Glutamina
Gly	Glicina
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato
His	Histidina
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazole
HOBt	<i>N</i> -Hidroxibenzotriazole
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: <i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i>)

Iva	Isovalina
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Leu	Leucina
MeOH	Metanol
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês: <i>Minimum Inibitory Concentration</i>)
MO	Microscópio ótico
MW-SPPS	Síntese peptídica em fase sólida assistida por micro-ondas (do inglês: <i>Microwave Assisted Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
Oxima	2-ciano-2(hidroxiimino)acetato de etilo
Oxima	Etil-2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato
Pbf	2,2,4,6,7-pentametill-2,3-dihidrobenzofurano-5-sulfonil
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietilenoglicol
Phe	Fenilalanina
Phol	Fenilalaninol
PLA	Poliácido lático
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
ppm	Partes por milhão
R&D	Investigação e Desenvolvimento (do inglês: <i>Research and Development</i>)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
SBF	Fluido Corporal Simulado (do inglês: <i>Simulated Body Fluid</i>)
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês: <i>Scanning Eletron Microscopy</i>)
SPPS	Síntese Peptídica em Fase Sólida (do inglês: <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
TFA	Ácido trifluoroacético
TGA	Termogravimetria
THC	Clorohidrato de Tetraciclina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em Camada Fina (do inglês: <i>Thin-Layer Chromatography</i>)
Trt	Tritilo
UFC	Unidade de formação de colônias

“A cura fundamental para a pobreza não é dinheiro, mas conhecimento”

Sir Arthur Lewis, Prémio Nobel em Ciências Económicas, 1979

I. INTRODUÇÃO

1. Resistência aos Antibióticos: O Mercado e a Indústria Farmacêutica

Em pleno século XXI, o desenvolvimento de fármacos é considerado uma ciência estabelecida por parte das indústrias farmacêuticas que requer uma compreensão e interligação de várias disciplinas, implicando uma parceria entre especialistas em diversos assuntos, desde a química à economia. O crescimento da indústria e do mercado farmacêutico permitiu a descoberta de novos fármacos, resultando numa maior esperança média de vida, assim como, melhor qualidade de vida tendo consequentemente, nas últimas décadas, representado enormes ganhos em saúde para a humanidade.

Com o decorrer dos anos, tornou-se cada vez mais evidente que as indústrias farmacêuticas gastam recursos significativos para a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, resultando muitas vezes em aumentos substanciais dos custos dos cuidados de saúde.¹ Estima-se que no ano de 2019, 20,7% das despesas industriais em pesquisa e desenvolvimento (R&D) de todo o mundo, foi apenas na indústria farmacêutica. Em Portugal, só no último ano, as indústrias farmacêuticas gastaram uma média de 100 milhões de euros nesses mesmos processos para novos lançamentos e otimização de fármacos já existentes no mercado.^{2,3} O processo de R&D sofreu diversas alterações ao longo dos anos, sendo agora a etapa mais rigorosa e restrita de todo o processo de desenvolvimento de um fármaco e o seu alcance do mercado. Este processo incorpora desde a descoberta do composto ativo mais apropriado para um dado propósito, até à compreensão de todas as vias metabólicas relacionadas com uma patologia específica e a necessidade de as modificar para assegurar a segurança e eficácia do fármaco. Numa etapa posterior são realizados milhares de testes para provar a segurança, eficácia, capacidade de fabrico, qualidade da forma de dosagem, entre outros, seguida de uma outra fase de ensaios clínicos onde o fármaco é efetivamente administrado a humanos.⁴ Porém, o desenvolvimento de um fármaco e o seu lançamento no mercado não é um processo fácil ou rápido, sendo que se estima que entre 10000 a 50000 compostos ativos que são estudados, apenas 1 desenvolve potencialidades para ser admitido como fármaco devido à falta de eficácia, elevada toxicidade e baixa segurança.^{5,6} Após essa descoberta, em média, o tempo de alcance do mercado desde a primeira síntese do composto ativo escolhido é de 12 anos, tornando lógica a

necessidade do elevado investimento de tempo e dinheiro por parte das indústrias farmacêuticas. Atualmente, para que um dado fármaco chegue ao mercado é necessário seguir um conjunto de regras restritas impostas pelo governo e autoridades de saúde as quais, na maioria das vezes, representam um grande obstáculo a que novos fármacos cheguem ao seu destino final, exigindo um investimento cada vez maior por parte das indústrias.^{7,8,9}

De forma a combater este problema e tentar tornar todo o processo de R&D e lançamento no mercado de um novo fármaco o mais breve possível, as indústrias farmacêuticas procuraram novas soluções, tendo sido uma delas o processo de transformação de uma biomolécula ativa num fármaco. Esta solução demonstrou-se igualmente favorável no combate a um dos maiores problemas de saúde global do século XXI: a resistência aos antibióticos. No início do século, apenas uma pequena percentagem do desenvolvimento e investigação das grandes indústrias farmacêuticas foi em antibióticos e tal acontece por duas razões maioritárias: primeiro, o desenvolvimento de antibióticos não representa lucros para a indústria farmacêutica, visto ser um fármaco usado apenas para o tratamento de patologias temporárias, não sendo necessário um consumo constante como acontece com fármacos prescritos para diversas doenças crónicas, como por exemplo, a insuficiência cardíaca; a segunda maior razão depreende-se pelos inúmeros obstáculos colocados às farmacêuticas por parte das entidades reguladoras que exigem toda uma burocracia extenuante desde as fases clínicas até ao controlo de efeitos secundários, resultando num maior investimento que acaba por não alcançar um lucro rentável.^{10,11} Dessa forma, os vários anos em que não existiu desenvolvimento de novos compostos com atividade antibacteriana aliada ao consumo excessivo dos antibióticos para travar patologias e sintomas que muitas vezes não estão ligados a infeções bacterianas, fez com que os organismos patogénicos desenvolvessem resistência aos antibióticos mais convencionais, deixando estes de ter o efeito desejado no tratamento de doenças.

Como tal, a introdução de péptidos com potencialidades terapêuticas nos processos de R&D de grandes farmacêuticas tornou-se uma opção para lidar com estes dois grandes problemas ao mesmo tempo e, que até agora, tem mostrado resultados verdadeiramente positivos.

2. Péptidos Terapêuticos

Os péptidos são biomoléculas envolvidas numa diversidade de processos bioquímicos e funções fisiológicas. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), um péptido pode conter até 40 aminoácidos, possuindo um peso molecular baixo em comparação com compostos sintéticos e proteínas, e podem deter estruturas secundárias e terciárias.¹² Os péptidos são na sua maioria seletivos para um determinado alvo, atuam a baixas concentrações, possuem um elevado grau de eficácia, especificidade, atividade, e baixa toxicidade, evitando efeitos secundários indesejáveis ao serem biologicamente aceites pelo metabolismo humano através da sua capacidade de mimetização de diversas vias metabólicas, tornando-se assim um dos melhores candidatos para o desenvolvimento de fármacos.^{13,14} Devido a estas propriedades, o uso de péptidos como fármacos tem ganho imensa atenção por parte da indústria farmacêutica, resultado este dos desenvolvimentos nas áreas da biotecnologia e bioengenharia.

Foi no século XX que os péptidos começaram a ser utilizados como fármacos, sendo que inicialmente eram extraídos de fontes naturais, como microorganismos e plantas transgênicas.¹⁵ Desde o aparecimento e evolução dos processos de síntese peptídica que a utilização de péptidos como soluções terapêuticas evoluiu ao longo do tempo, representando neste momento uma boa parte do mercado farmacêutico. Até agora, cerca de 60 fármacos de natureza peptídica foram aprovados pela FDA e chegaram ao mercado para serem comercializados como tratamento para as mais diversas patologias, como a diabetes, osteoporose, diversos tipos de cancro, doenças cardiovasculares (**Figura 1**) e em tratamentos antimicrobianos (**Figura 2**) e antifúngicos. Além disso, 155 tipos de péptidos estão atualmente em desenvolvimento e em fases clínicas e pré-clínicas avançadas, exemplificando a demanda urgente de péptidos.^{16,17}

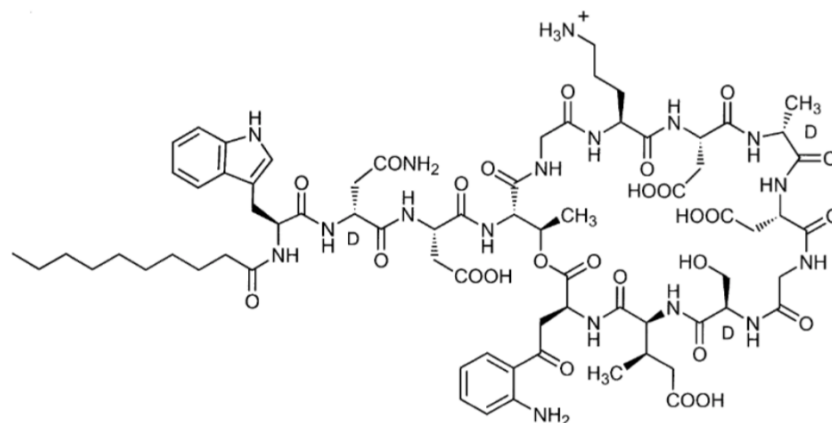


Figura 1 - Estrutura química do lipopéptido com propriedades antibióticas, comercializado com o nome Cubicin®. Este fármaco atua ao nível das bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus*, no tratamento de infeções cutâneas.

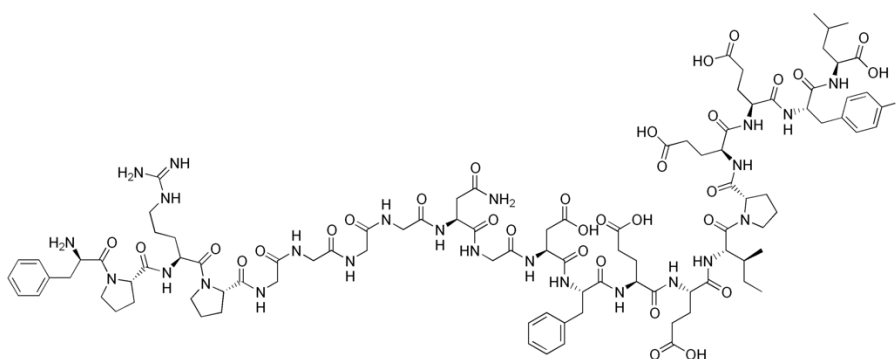


Figura 2 - Estrutura química do péptido Bivalirudin, comercializado com o nome Angiomax®. Este fármaco atua como inibidor da trombina, ligando-se diretamente ao seu local ativo, reduzindo o risco de complicações a nível isquémico e de morte por enfarte do miocárdio.

Numa primeira fase existiam imensas limitações à utilização de péptidos como possíveis fármacos terapêuticos porque, comparativamente aos fármacos sintéticos, apresentavam baixa biodisponibilidade quando administrados oralmente, um reduzido tempo de vida, uma rápida metabolização e excreção, menor seletividade perante diversos alvos, pouca estabilidade, e baixa capacidade para ultrapassar diversas barreiras fisiológicas.^{6,16,18}

Apesar dos fármacos sintéticos com um tamanho mais reduzido serem geralmente administrados por via oral devido a possuírem uma boa estabilidade metabólica e a serem de fácil produção e baixo custo, estes fármacos continuam a apresentar demasiados obstáculos que não

podem ser ultrapassados e que resultam na maior parte das vezes em efeitos secundários indesejáveis. Contrariamente, a forte ligação e especificidade dos péptidos e proteínas aos seus alvos moleculares pode reduzir a quantidade necessária a ser administrada para um mesmo efeito. Esta elevada seletividade leva a menores efeitos secundários, o que é considerado como um dos maiores benefícios dos péptidos relativamente a biomoléculas mais pequenas (**Tabela 1**).¹⁴ Apesar das vantagens ultrapassarem as desvantagens, os péptidos continuam a ter limitações, o que faz com que ainda hoje existam restrições na sua utilização. Uma das maiores limitações continua a ser a sua baixa biodisponibilidade devido à degradação enzimática, característica do metabolismo humano. Um fator importante é também o seu tamanho, uma vez que permite que os péptidos possam ser facilmente excretados por diversas vias, mas ao mesmo tempo, isso pode ser um benefício pois permite uma maior facilidade de ultrapassar as membranas celulares. A necessidade urgente de alternativas fez com que a investigação se aprofundasse no campo de novas vias de administração (por exemplo, cutânea e subcutânea), no prolongamento do tempo de vida dos fármacos baseados em péptidos e modificações químicas e/ou estruturais de forma a obter a melhor versão possível.^{19, 20}

Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos péptidos em relação a biomoléculas sintéticas mais pequenas.

Vantagens	Desvantagens
Elevada atividade, especificidade e seletividade	Baixa estabilidade metabólica
Poucos efeitos secundários	Risco de efeitos secundários imunogénicos
Não possui/menor degradação tóxica de produtos resultantes	Menor tempo de vida
Não existência de interação fármaco-fármaco	Elevado custo de síntese
Possibilidade de efetuar interações proteína-proteína	Baixa biodisponibilidade oral
Variados locais de interação	Baixa permeabilidade membranas
Variedade química e biológica	Eliminação corporal rápida se o peso for <5.000 Da
Maior predictabilidade <i>in-vivo</i>	Baixa solubilidade em água

De forma a superar certas limitações, novas abordagens foram aplicadas sobre os péptidos. O seu perfil farmacocinético, o efeito biológico que produz e a sua imunogenicidade são parâmetros que necessitaram de ser estudados de maneira a modificar quimicamente os péptidos para se tornarem adequados para desenvolverem uma atividade farmacológica mais eficaz. A otimização dos péptidos passa por responder positivamente a três fatores: **1)** qual será o seu comportamento face ao elemento patogénico, **2)** ao hospedeiro, e **3)** quais os custos implicativos para a indústria. Um *design* adequado é baseado na relação estrutura-atividade, por isso, é necessário alterar parâmetros químicos e físicos induzindo-se ciclizações, substituições de ligações peptídicas e de resíduos de aminoácidos, mudanças estereoquímicas e encurtamentos para se obterem péptidos com estruturas cíclicas ou peptidomiméticos ou pseudo-péptidos.^{6,18} Por exemplo, os péptidos de estrutura cíclica são obtidos através da conexão entre o *N*-terminal e o *C*-terminal da cadeia de aminoácidos por uma ligação amida ou através da inserção de uma ponte ditiol, ligando dois resíduos de cisteína (**Figura 3**). Esta modificação num determinado péptido pode melhorar a sua estabilidade e atividade.²¹

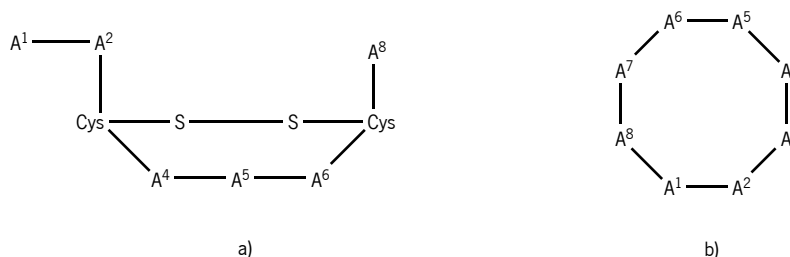


Figura 3 – a) Ponte ditiol, ligando dois resíduos de cisteína, e consequentemente ciclizando a sequência peptídica e b) Ligação amida entre N-terminal e o C-terminal de uma cadeia de aminoácidos ciclizando uma sequência peptídica.

Da mesma forma, encurtando o número de aminoácidos numa determinada sequência peptídica, reduz custos de manufatura e melhora a permeabilidade dos fármacos peptídicos. Optando também pela racemização dos aminoácidos, substituindo *L*- por *D*- aminoácidos, é possível otimizar a hidrofobicidade e resistência dos péptidos na penetração das membranas celulares, características especialmente interessantes no que toca à atividade antimicrobiana e antiviral por permitirem a permeação das membranas das bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas. Estes péptidos com atividade antimicrobiana (AMPs), como são conhecidos, tornaram-se uma ótima estratégia terapêutica no combate a infecções causadas por bactérias multirresistentes a uma vasta gama de antibióticos.^{22,23}

Nas últimas décadas, a produção de péptidos terapêuticos foi revolucionada por novos métodos e estratégias de abordagem automatizada, o que simplifica a fabricação destes e o contínuo interesse da indústria farmacêutica em desenvolver fármacos baseados em péptidos.

2.1 Péptidos com Atividade Antimicrobiana

A descoberta dos antibióticos é considerada uma das maiores e melhores conquistas do mundo científico e da indústria farmacêutica. Durante anos, foram o tratamento mais eficaz contra uma das maiores causas de morte em todo mundo, as infecções sistêmicas, provocadas por um amplo espectro de microorganismos patogênicos.²⁴ Contudo, no mundo atual, estes já não são uma solução totalmente eficaz no combate de infecções bacterianas devido ao desenvolvimento de resistência por parte das bactérias, incluindo Gram-positivas como Gram-negativas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.^{25, 26} Nas infecções localizadas em tecidos lesados é mais comum encontrar a bactéria *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), dado que esta é a principal causa de infecções bacterianas em humanos em todo o mundo. Entrando em contacto com os tecidos danificados a *S. aureus* pode invadir vários tipos de células e perturbar todo o microbioma, resultando em infecções crônicas ou recorrentes.²⁷

Nos EUA, a resistência aos antibióticos está associada a aproximadamente 3 milhões de infecções anuais, das quais 35000 resultam em morte do indivíduo, tornando este um problema de saúde global que exige uma demanda rápida por soluções eficazes. Nas últimas décadas, a infecção específica por *S. aureus* tornou-se cada vez mais difícil de tratar devido ao surgimento e rápida disseminação desta bactéria que se tornou resistente a todos os antibióticos β -lactâmicos conhecidos. O desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas é a abordagem mais óbvia para combater o aumento da resistência microbiana. Porém, isto tem-se tornado num grande desafio visto que as várias bactérias continuam a demonstrar resistência a novos antibióticos produzidos sinteticamente uma vez que o agente ativo permanece similar ao estratégias antigas. Para além disso, o mecanismo de ação dos antibióticos convencionais passa, geralmente, por penetrar na membrana celular do microrganismo atuando em alvos específicos e mantendo a

integridade da bactéria, ou seja, a morfologia bacteriana é conservada e a bactéria adquire resistência.²⁸

Os AMPs surgiram como uma alternativa promissora, dando origem a uma nova geração de antibióticos cujo mecanismo de defesa imunitário é primitivo.^{29, 30} Os AMPs podem ser encontrados em plantas, animais e microrganismos e possuem um amplo espectro de ação contra bactérias, fungos e protozoários. São geralmente moléculas relativamente curtas, entre 10–100 resíduos de aminoácidos, e são classificados com base na composição dos seus aminoácidos, tamanho e estruturas secundárias conformacionais, incluindo péptidos com folhas β , α -hélices anfipáticas, estrutura em *loop* e estruturas distendidas (**Figura 4**).^{31, 32}

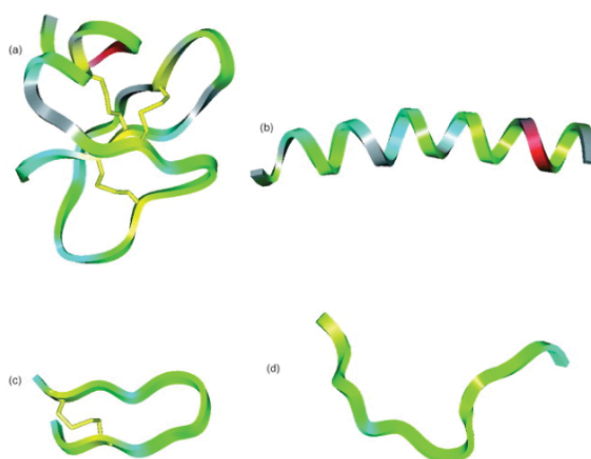


Figura 4 - Classes estruturais dos AMPs: a) estrutura em folhas β , b) estrutura em α -hélices anfipáticas, c) estrutura em loop, e d) estrutura distendida.²⁴

Estas estruturas estão diretamente relacionadas com o teor de aminoácidos que cada péptido contém e a forma como interagem com as membranas celulares. Péptidos contendo uma elevada percentagem de aminoácidos como glicina (Gly), histidina (His) e arginina (Arg) adotam geralmente uma estrutura distendida. Já os péptidos com conformação em folha β , são estabilizados através de pontes ditiol, permitindo agregação. Curiosamente, alguns AMPs não possuem nenhum tipo de estrutura característica até ao momento em que contactam com as membranas dos microorganismos. Nessa altura, devido às suas propriedades anfipáticas, o péptido ao entrar em contacto com uma membrana carregada negativamente reorganiza-se e adquire uma conformação que permite a penetração na membrana de forma mais facilitada.³³

A eficácia dos AMPs traduz-se nos seus mecanismos de ação, afetando as membranas celulares de diferentes maneiras, alterando a sua permeabilidade ou provocando a sua rutura completa. Tais mecanismos não são comuns a todos os tipos de péptidos e dependem das suas propriedades moleculares e do tipo de alvo bacteriano e/ou celular, incluindo DNA, RNA, enzimas regulatórias ou outras proteínas. Geralmente, os danos provocados pelos AMPs nas bactérias são difíceis de corrigir pelo que se acredita que a possibilidade de estas desenvolverem resistência aos péptidos, seja remota. Atualmente, essa vantagem é alvo de diversas investigações onde é também estudada a relação entre AMPs e antibióticos convencionais no sentido de desenvolverem uma relação vantajosa no combate à resistência aos antibióticos.

Os péptidos com atividade antimicrobiana são extremamente rápidos a provocar a morte celular das bactérias e possuem como alvo primário a sua membrana citoplasmática, como já foi dito. Neste local, ocorre a interação eletroestática entre os aminoácidos positivamente carregados dos AMPs e a carga negativa característica dos ligandos da superfície celular. A maioria dos AMPs são catiónicos, porém, os aniônicos possuem a capacidade de formar interações hidrofóbicas entre o péptido e a membrana fosfolipídica, formando poros e permitindo criar aberturas na membrana bacteriana. Neste ponto, os antibióticos convencionais podem penetrar a membrana mais facilmente, alcançando o interior da célula com concentrações maiores, deste modo estabelecendo uma relação de simbiose vantajosa.^{33,34}

2.1.1 Mecanismo de ação dos AMPs

As características dos AMPs tais como a sua estrutura anfipática, a sua carga iónica, a composição de aminoácidos e o tamanho, fazem com que exista facilidade de interação e inserção do péptido nas membranas fosfolipídicas dos microrganismos. Os mecanismos de ação dos AMPs podem provocar a morte de uma bactéria através de vários fatores: **(1)** alterando a formação do septo da membrana citoplasmática; **(2)** inibindo a síntese da parede celular e de ácidos nucleicos; **(3)** inibindo a síntese de proteínas; ou **(4)** inibindo a atividade enzimática da própria bactéria. Devido a essa diversidade, existem estratégias de ação baseadas em mecanismos transmembranares pela formação de poros, e estratégias que permitem aos AMPs provocar a morte celular de uma bactéria através de processos intracelulares. Dos mecanismos transmembranares, destacam-se três modelos de ação: o **modelo do tapete**, **modelo toroidal**

e o **modelo do barril**. O modelo do tapete (**Figura 5**) é uma estratégia descrita como a ligação inicial entre um péptido contendo α -hélices anfipáticas à superfície de uma membrana, cobrindo-a. Após esse primeiro passo, a membrana alvo pode ser permeada depois de ser atingida uma concentração tida como limite. Aqui o péptido atua ligando-se aos fosfolípidos presentes na membrana. A interação inicial acontece devido a forças electroestáticas existentes entre o péptido que se encontra carregado positivamente e a membrana alvo com carga negativa. O passo seguinte consiste na rotação da molécula levando à reorientação dos resíduos hidrofóbicos em direção ao núcleo hidrofóbico da membrana até que, por último, rompem a curvatura da bicamada, desintegrando toda a membrana e formando micelas sem qualquer utilidade possível.

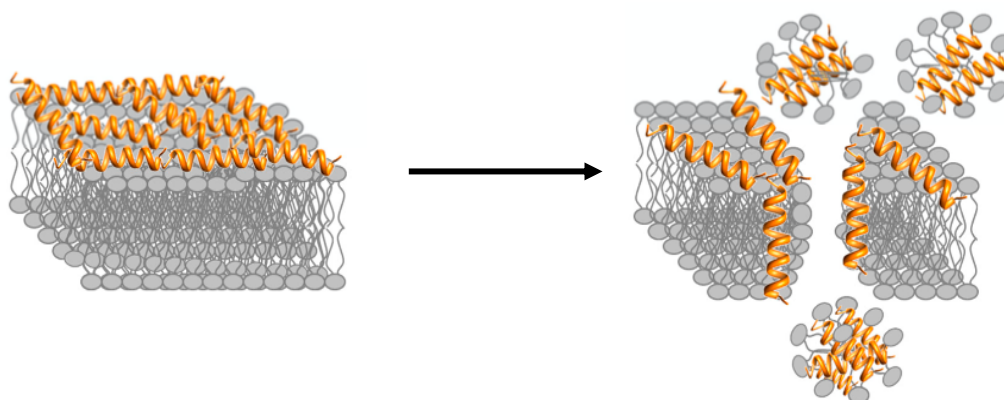


Figura 5 - Modelo do tapete. A região hidrofóbica do péptido interage com a bicamada lipídica presente na membrana celular que possui características hidrofílicas. Essa interação, atingindo uma determinada concentração de AMP, desintegra a membrana, formando micelas.³²

No modelo toroidal (**Figura 6**), os péptidos inserem-se perpendicularmente na bicamada lipídica, induzindo uma curvatura local. Aí, ligam-se aos fosfolípidos e inserem-se na membrana através de feixes que interagem com as moléculas aquosas, formando canais. Através desses poros, os AMPs podem penetrar na célula, atuando ao nível dos componentes intracelulares.^{35, 32}

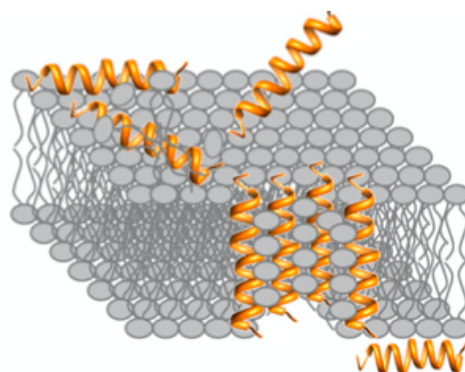


Figura 6 - Modelo toroidal. O AMP insere-se perpendicularmente na bicamada lipídica formando uma curvatura que dá origem a um poro.³²

O modelo do barril (**Figura 7**) foi visualizado pela primeira vez ao se estudar o AMP Alametecina. Este péptido adota uma configuração helicoidal que forma poros através de bicamadas orientadas que atravessam a membrana. As regiões hidrofóbicas do péptido alinham-se com o conteúdo lipídico da bicamada e as regiões hidrofílicas orientam-se para o interior, formando a região interna do poro. Estes poros induzidos pela Alametecina podem conter entre 3 a 11 moléculas helicoidais paralelas com diâmetros externos e internos de aproximadamente 4.0 nm e 1.8 nm, respetivamente. Quanto à espessura do poro, este tem usualmente cerca de 1.1 nm que é aproximadamente o diâmetro da hélice do próprio péptido e é consistente com oito monómeros de Alametecina, formando um octâmero.^{36,37}

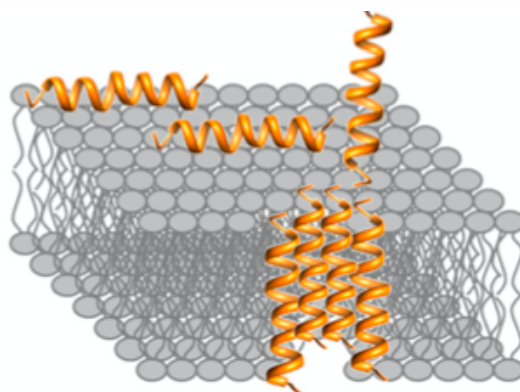


Figura 7 - Modelo do barril. É possível visualizar a formação de um poro na membrana citoplasmática pelo AMP.³²

Apesar da maioria dos AMPs conhecidos até ao momento seguirem um dos mecanismos de ação expostos acima, vários péptidos continuam a ser investigados por apresentarem mecanismos diferentes. Na sua generalidade, este tipo de péptidos leva à morte celular através de processos intracelulares, não atuando diretamente nas membranas. Por exemplo, o mecanismo de ação do péptido PP-39 atua ao nível da inibição da síntese de proteínas induzindo também a degradação das proteínas necessárias para a replicação do ADN, interrompendo dessa forma o normal funcionamento das células.³⁸

Entre a diversidade de estruturas e mecanismos de ação que os AMPs podem apresentar, este projeto focou-se inicialmente numa família de péptidos naturais denominada peptaibols. Os peptaibols foram isolados, numa primeira fase, da estirpe de fungos *Trichoderma* e possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas. A principal característica deste tipo de AMP é a presença de aminoácidos não-proteínogénicos, ou seja, que não são codificados pelo ADN (exemplo, o ácido α -aminobutírico (Aib) e a isovalina (Iva)) (**Figura 8**). Esta classe de aminoácidos é frequentemente usada em péptidos com interesse farmacológico uma vez que não são reconhecidos por enzimas hidrolíticas, melhorando a sua biodegradabilidade e aumentando a sua biodisponibilidade. O terminal amino é geralmente acetilado e o terminal carboxilo é um β -amino álcool que pode variar entre um fenilalaninol, leucinol, valinol e isoleucinol. Esta família de péptidos ganhou especial interesse em estudos para compreender a conformação α -hélice e de que forma esta interagia com as membranas.³⁹ Foi demonstrada que a ação antimicrobiana dos peptaibols ocorre pela dispersão do material citoplasmático dentro do microrganismo, resultando na morte celular. Os mecanismos de ação diferem dentro da própria família de peptaibols, onde geralmente os que possuem uma maior cadeia de aminoácidos atuam ao nível da formação de canais iónicos na membrana celular, enquanto que os peptaibols com menor peso molecular, tendem a penetrar a membrana através da flutuação na bicamada lipídica.^{40,41}

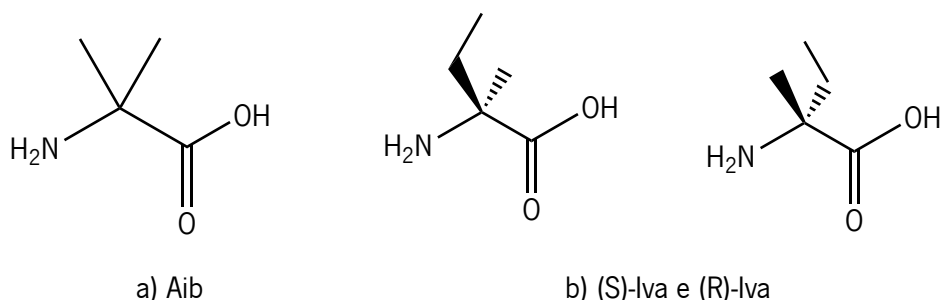


Figura 8 - a) Estrutura do ácido aminobutírico (Aib). b) As duas conformações possíveis do aminoácido isovalina (Iva).

No presente projeto, especial atenção foi prestada ao Peptaibolin, o péptido mais pequeno da família dos peptaibols que possui uma estrutura tridimensional equiparável aos peptaibols maiores (**Figura 9**): um grupo acetilo *N*-terminal e um resíduo de fenilalaninol (Phol) *C*-terminal juntamente com apenas 4 aminoácidos (Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Phol).

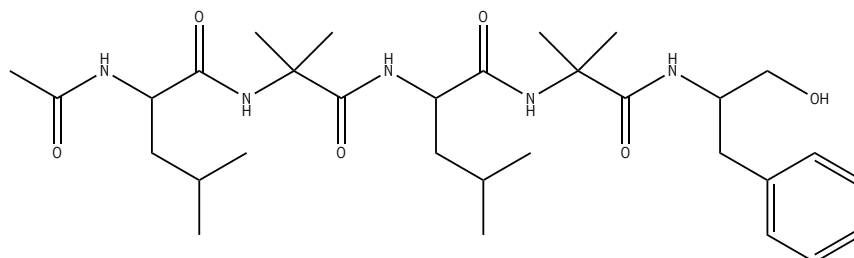


Figura 9 - Sequência de aminoácidos presentes no Peptaibolin (Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Phol).

Crima *et al.* estudaram o Peptaibolin e chegaram à conclusão que este pequeno péptido possuía atividade antimicrobiana, ainda que moderada, em bactérias Gram-positivas. O seu modo de ação baseia-se na permeabilização da membrana celular provocando a sua rutura. Através de estudos conformacionais por cristalografia de raio-X foi comprovado que o Peptaibolin possui uma estrutura secundária tipo α -hélice extremamente dobrada (**Figura 10**) e a sua atividade antimicrobiana lhe está diretamente relacionada com este facto, visto que essa conformação permite a agregação, característica pouco usual em péptidos com poucos resíduos de aminoácidos.⁴⁰

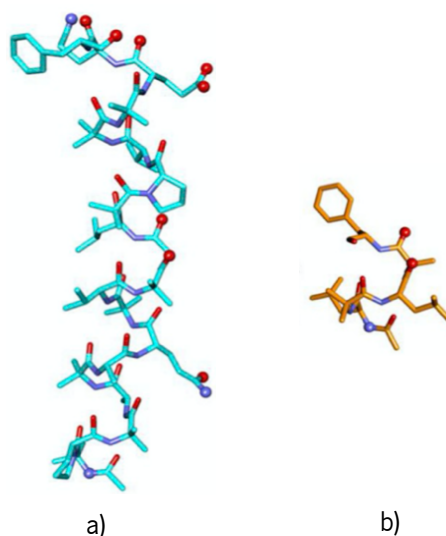


Figura 10 - a) Estrutura tridimensional do peptaibol Alameticina que possui 19 aminoácidos em comparação com a b) estrutura tridimensional do peptaibol Peptaibolin com apenas 4 aminoácidos.³⁹

A síntese do Peptaibolin e de todos os peptaibols no geral é significativamente prejudicada pelo impedimento estereoquímico em resíduos como o Aib, onde a reatividade durante a reação de acoplamento é diminuída em comparação com resíduos de outros aminoácidos. Para superar essa dificuldade é necessário utilizar uma seleção de reagentes de acoplamento adequados que permitam a melhor ativação possível do terminal carboxilo do aminoácido Aib.⁴² Em contexto laboratorial, Peptaibolin foi sintetizado através de Síntese Peptídica em Fase Sólida assistida por Microondas (MW-SPPS) com o intuito de avaliar a sua atividade antimicrobiana contra um leque de bactérias tanto Gram-positivas como Gram-negativas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2.1.2 Aplicações dos AMPs

Alguns AMPs, tal como os da família peptaibols, têm um papel determinante enquanto alternativas aos antibióticos. Esses péptidos além de utilizarem vários dos mecanismos de ação contra bactérias acima referidos são parte integrante do sistema imunológico inato, deste modo não sendo reconhecidos como organismos estranhos pelo corpo humano.

Recentemente, uma nova vertente de péptidos com atividade antimicrobiana tem vindo a ser investigada pelo seu importante potencial de promover a cicatrização cutânea ao mesmo tempo

que atua como barreira à invasão de microrganismos. Tang *et al.* sintetizaram pela primeira vez um péptido chamado Tiger 17, baseado em tigerininas. As tigerininas são AMPs identificados em secreções cutâneas de *Fejervarya cancrivora*, um anfíbio da família *Ranidae* encontrado no Sudeste Asiático. Essa classe de AMPs foi descoberta em 2001 por Sai *et al.* quando foram purificados e caracterizados três péptidos entre 11-12 resíduos de aminoácidos (**Figura 11**), encontrados em secreções cutâneas da espécie *R. tigerina*. Esses péptidos possuem dois resíduos de cisteína ligados entre si formando uma ponte ditiol, ciclizando numa sequência de 9 aminoácidos, conhecida por anel nonapeptídico e adotam uma conformação em folha β , tendo um terminal -COOH.^{43,44}

Phe-Cys-Thr-Met-Ile-Pro-Ile-Pro-Arg-Cys-Tyr-NH₂

Tigerinina 1

Arg-Val-Cys-Tyr-Ala-Ile-Pro-Leu-Pro-Ile-Cys-Tyr-NH₂

Tigerinina 3

Figura 11 - Sequência de aminoácidos dos AMPs Tigerinina 1 e 3.

Tendo como ponto de partida os AMPs da família das Tigerininas, o péptido Tiger 17 possui 11 aminoácidos e um peso molecular de 1377 Da. De acordo com Tang *et al.* este AMP demonstrou uma grande capacidade de cicatrização de feridas profundas demonstrado *in vivo* em estudos com ratos. O Tiger 17 exerceu efeitos significativos nas três etapas mais fulcrais do processo de cicatrização de feridas. Estas etapas incluem **(1)** a indução do recrutamento de macrófagos para o local do ferimento aquando da reação inflamatória; **(2)** a promoção da migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos, levando à reepitelização e formação de novo tecido; e **(3)** fase de remodelação do tecido, devolvendo a sua estrutura e funcionalidade. Com os resultados obtidos, os investigadores concluíram que o péptido Tiger 17 é capaz de promover com sucesso a proliferação e migração de células até ao local da ferida cutânea, assegurando a reepitelização do local afetado e acelerando o processo de cicatrização.⁴⁵ Até à data, nenhuma investigação foi publicada avaliando o potencial antimicrobiana deste péptido, permanecendo assim uma incógnita.

3. Síntese Peptídica

A versatilidade e elevada afinidade para os seus alvos terapêuticos conduziram a estudos aprofundados dos péptidos ao longo dos anos, por forma a compreender os seus mecanismos e princípios biológicos e consequentemente aperfeiçoar as suas propriedades terapêuticas para posterior aplicação médica e farmacêutica.⁴⁶

Um péptido é uma combinação de diferentes aminoácidos ligados através de uma ligação peptídica. Para formar essa ligação é necessário que uma reação de condensação entre um terminal carboxílico de um aminoácido e o terminal amina funcional de outro α -aminoácido ocorra, acompanhada por perda de água. A formação desta ligação engloba dois passos, sendo que o primeiro é a ativação do grupo carboxílico de um dos aminoácidos recorrendo a reagentes de acoplamento, e o segundo passo corresponde ao ataque nucleofílico do terminal amina de um outro aminoácido (**Figura 12**). Embora a ligação peptídica seja o esqueleto fundamental na produção de péptidos, a presença destas ligações não é restrita a um contexto biológico visto que também é possível encontrá-las em diversas moléculas, como por exemplo, fármacos sintéticos.^{47,48}

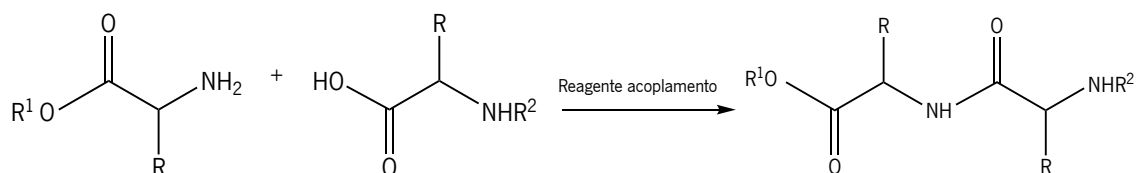


Figura 12 - Formação da ligação peptídica entre dois aminoácidos.

3.1 Reagentes de acoplamento

De forma a obtermos uma ligação peptídica no processo de síntese de péptidos, o terminal carboxilo de um resíduo de aminoácido tem de ser funcionalizado de forma a tornar-se numa espécie eletrofílica, para assim permitir o ataque nucleofílico do terminal amina de um outro resíduo de aminoácido.

Reagentes de acoplamento baseados em carbodiiâmidas, como o *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e o *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) (**Figura 13**) são considerados

ativadores fortes capazes de fornecer a energia necessária para a ativação do grupo carboxílico, pelo que têm vindo a ser utilizadas na maior parte das sínteses peptídicas das últimas décadas.^{47,49}

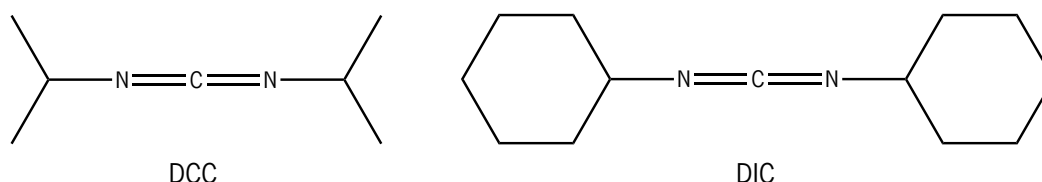
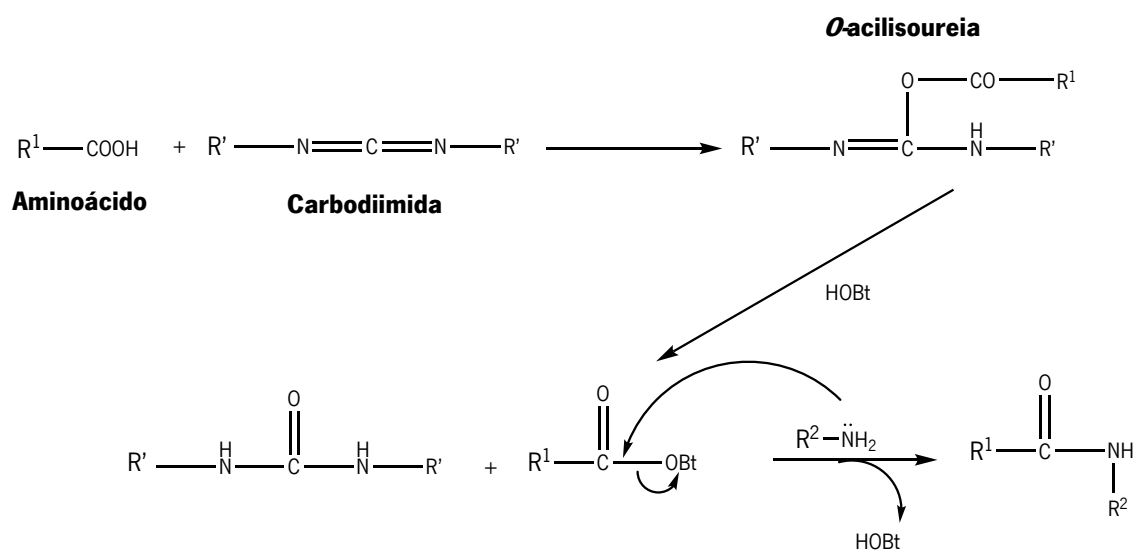


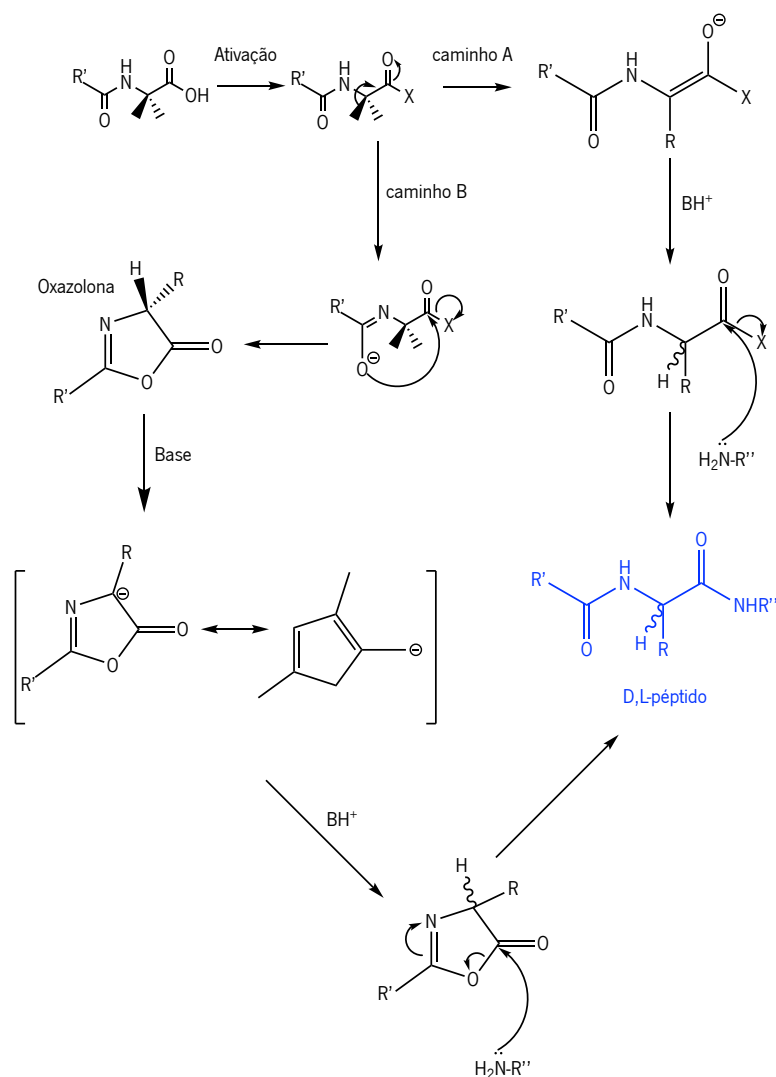
Figura 13 - Exemplos de carbodiimidas que podem ser utilizadas como reagentes de acoplamento.

Porém, este tipo de reagente de acoplamento pode promover a racemização do aminoácido (conversão da espécie opticamente ativa em inativa) durante o passo de ativação, podendo causar a perda de quiralidade do resíduo carboxílico e resultar em fracos rendimentos de reação. Para superar esse obstáculo é adicionado um supressor de racemização ou nucleófilo auxiliar, sendo que um dos mais utilizados é o 1-hydroxibenzotriazole (HOBt) (**Figura 14**). Na presença de uma carbodiimida, um aminoácido *N*-protegido forma uma *O*-acilisourea, em que o HOBt aprisiona a *O*-acilisourea e ataca o grupo carbonilo, libertando a ureia e formando um éster ativo, tornando assim o átomo de carbono do terminal carboxilo mais suscetível ao ataque nucleofílico que parte do terminal amina e impedindo a racemização (**Esquema 1**).^{50,51}



Esquema 1 - Processo de ação das carbodiimidas como agentes de acoplamento, na presença de HOBT.

Estes nucleófilos ajudam a assegurar a integridade ótica do aminoácido evitando a racemização do carbono α . A racemização pode ocorrer no terminal C do aminoácido durante a reação de acoplamento devido à remoção do hidrogénio no carbono α e/ou à formação de um intermediário de oxazolona (**Esquema 2**). A taxa de racemização depende do efeito dos aceitadores de eletrões da cadeia de aminoácido, da temperatura, do solvente e da base ativadora.^{52, 51}



Esquema 2 - Mecanismo de racemização no carbono α . São possíveis duas vias: A) Enolização direta e B) Formação de oxazolona.

Atualmente, existe uma grande variedade de reagentes de acoplamento disponíveis comercialmente desde as carbodiiâmidas mais tradicionais referidas acima (DCC, DIC), com os nucleófilos auxiliares como HOBt e 1-hidroxi-7-azabenzotriazole (HOAt) ou reagentes baseados em sais de urônio e fosfônio como o 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametilurônio hexafluorofosfato (HBTU).⁵⁰ Em 2009, foi introduzido no mercado a Oxima (etil-2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato) (**Figura 14**), um novo nucleófilo auxiliar para o reagente de acoplamento DIC que possui uma elevada capacidade de supressão de racemização e uma grande eficácia de acoplamento. Esta

alternativa revelou-se ainda mais positiva pelo facto de permitir substituir o tradicional HOBt com as suas propriedades explosivas.^{53,54,55}



Figura 14 - Estruturas de dois nucleófilos auxiliares utilizados como reagentes de acoplamento, HOBt e Oxima.

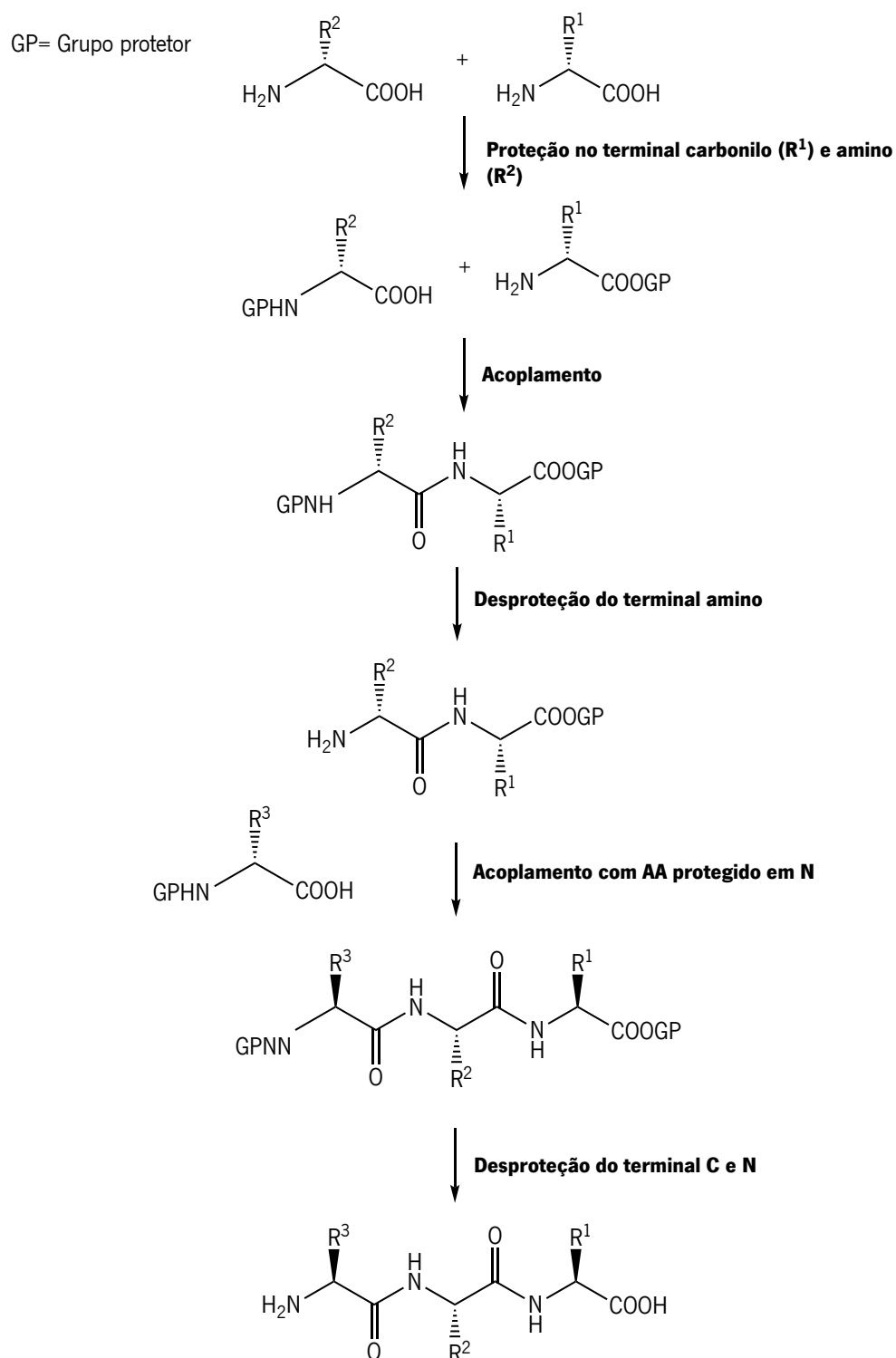
Dependendo do número de aminoácidos a acoplar e de condições químicas como solubilidade e estabilidade, é de elevada relevância a escolha do reagente de acoplamento adequado, oferecendo uma maior reatividade através da redução simultânea da epimerização. A epimerização é um processo estereoquímico em que há mudança na configuração de apenas um centro quiral, formando um diastereómetro. Esta mudança, em determinadas situações, pode levar à toxicidade ou inativação da molécula.⁵⁶

3.2 Síntese peptídica em fase sólida

Foi em 1963 que Bruce Merrifield publicou pela primeira vez a síntese de um tetrapéptido utilizando o método agora conhecido como síntese peptídica em fase sólida (SPPS-“*Solid Phase Peptide Synthesis*”). Porém, durante as décadas de 50 e 60 em pleno século XX, a descoberta de péptidos biologicamente ativos de ocorrência natural estimulou a procura e desenvolvimento de outros métodos que serviram de base para futuros trabalhos na área da síntese de péptidos e proteínas.^{14, 46}

Antes da descoberta do método de SPPS, os péptidos eram sintetizados via métodos clássicos de síntese em solução (**Esquema 3**) que requeriam um enorme dispêndio de tempo, reagentes e purificação de intermediários, finalizando com baixos rendimentos. Com a inovação da SPPS, a

purificação e a síntese de péptidos passou de durar meses para ser atingida em apenas algumas horas ou dias, tendo-se tornado no método de síntese preferencial.

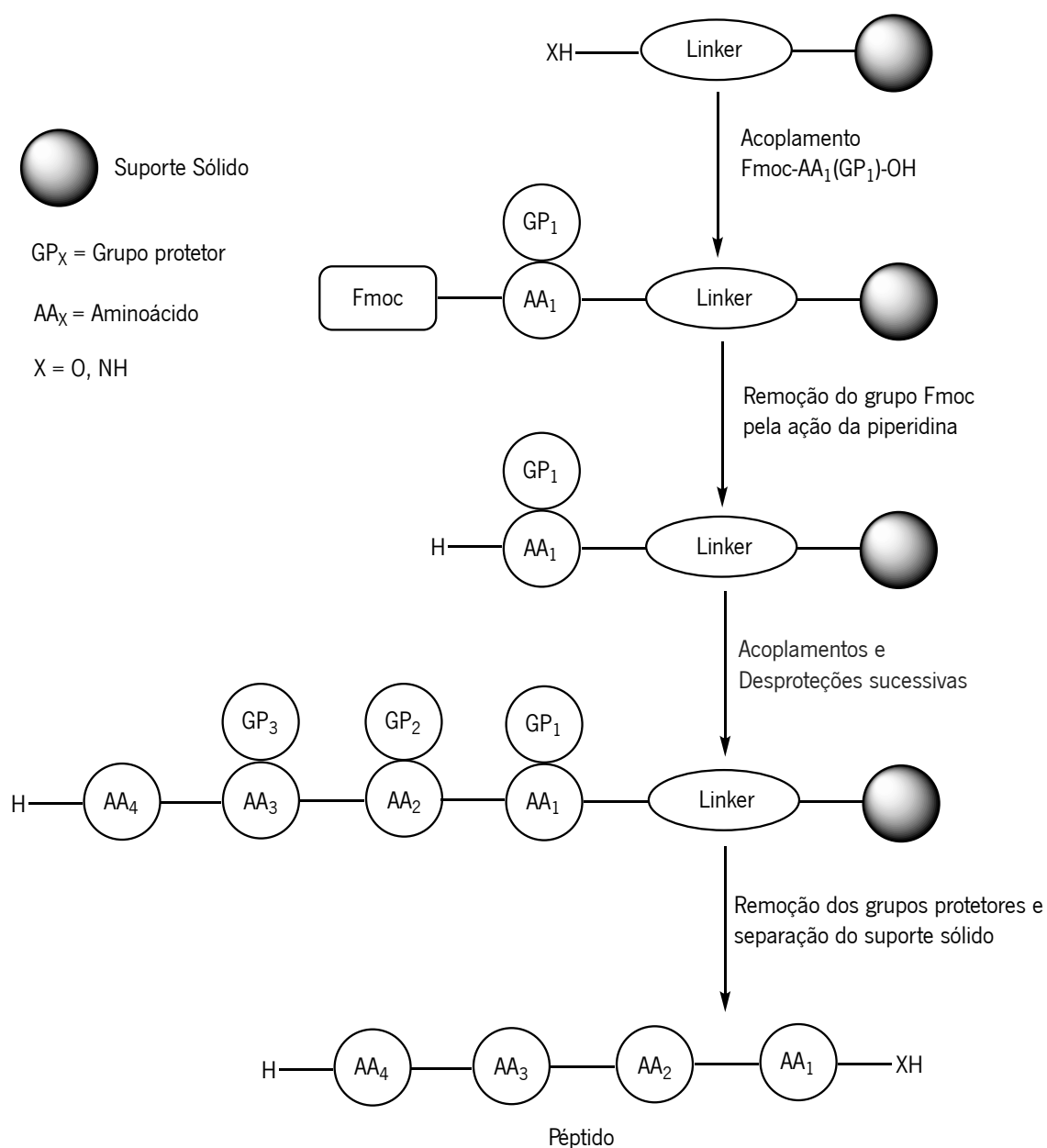


Esquema 3 - Esquema geral da síntese peptídica em solução.

Por definição, a síntese peptídica em fase sólida é um processo em que o primeiro aminoácido é acoplado geralmente através do terminal carboxilo a uma resina, que consiste numa matriz polimérica, protegendo o aminoácido de possíveis reações indesejadas e de seguida ocorre a formação da ligação covalente através do seu terminal amina a um outro aminoácido, alongando-se a partir desse ponto através da ligação ordenada e sistemática de vários resíduos de aminoácidos até se obter o péptido desejado.⁵⁷

Neste projeto, optou-se pela utilização de um método de SPPS via sequencial, com acoplamentos e desproteções repetitivas a cada novo aminoácido, uma metodologia considerada apropriada para sequências peptídicas curtas (**Esquema 4**).⁴⁹

Para proteger o aminoácido de reações indesejadas, o grupo $N\text{-}\alpha$ -amino e a cadeia lateral dos mesmos aminoácidos necessitam de proteção por intermédio de um grupo protetor. Os grupos protetores ligados ao terminal $N\text{-}\alpha$ -amino são temporários e geralmente removidos no fim de cada etapa de acoplamento de um novo aminoácido - ciclo de desproteção. O péptido permanece acoplado à resina durante toda a síntese garantindo uma proteção permanente contra reações indesejadas. No terminal carboxilo os aminoácidos da sequência pretendida são adicionados em etapas alternadas de ciclos de acoplamento e desproteção, repetidos até à obtenção da cadeia peptídica desejada. Na etapa final, o grupo protetor do aminoácido N terminal é removido e o aminoácido pode sofrer uma última transformação química, como uma acetilação após a qual o péptido se encontra disponível para ser separado do seu suporte sólido. A clivagem é um dos passos mais importantes em síntese peptídica em fase sólida. Expor uma resina a um *cocktail* de reagentes com propriedades de clivagem não é uma ação simples, é essencial que os reagentes e as condições de reação sejam as apropriadas, caso contrário o péptido pode ser modificado ou danificado irreversivelmente.⁵⁸



Esquema 4 - Esquema geral de SPPS com recurso ao grupo Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) para proteção do terminal amina.

O sucesso de qualquer síntese peptídica por SPPS depende de determinadas variáveis que devem ser sempre tidas em conta para garantir o melhor rendimento possível. Desde a escolha do suporte sólido, à combinação de agentes de acoplamento, os métodos de ancoragem do peptído à resina e a necessidade de uso de reagentes em excesso são apenas algumas das

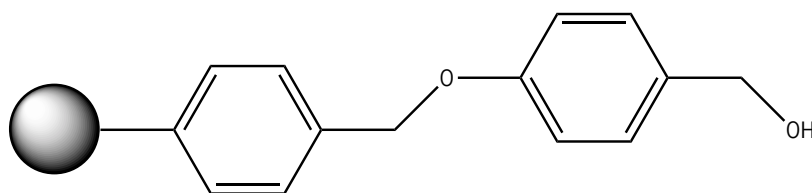
variáveis que tornam o método de SPPS suscetível a desvios e erros; porém, continua a demonstrar mais vantagens do que desvantagens na sua utilização. O método de SPPS permite realizar todas as reações num único local, ou seja, no vaso reacional. Após uma etapa de acoplamento, os reagentes em excesso e subprodutos podem ser facilmente removidos por ciclos de lavagem, que tornam redundante a purificação dos intermediários. Com base no uso de quantidades excessivas de reagentes é possível obter altos rendimentos de acoplamento e obter sequências peptídicas mais complexas.⁵⁹

Nos últimos anos, sintetizar péptidos tornou-se num processo simples e rápido o que permitiu a sua automatização, sendo neste momento o método principal utilizado por diversas indústrias para a síntese de péptidos com propriedades terapêuticas.

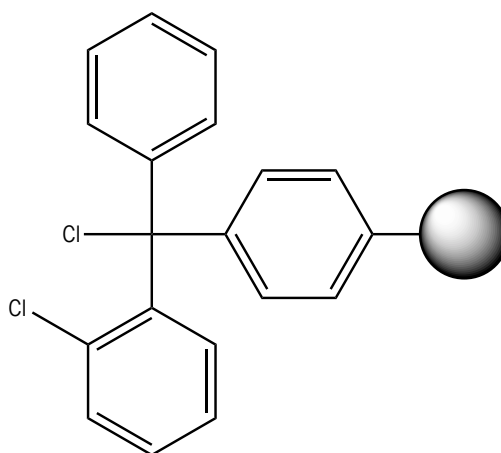
3.2.1 Suportes sólidos

Em SPPS, a sequência de aminoácidos que forma o péptido é obtida pela ancoragem de um resíduo de aminoácido a um suporte sólido insolúvel (resina). Nos primórdios da síntese peptídica em fase sólida era geralmente utilizada uma matriz polimérica de poliestireno misturada com 2% de divinilbenzeno. No entanto, com o avanço da pesquisa e a procura por sínteses mais complexas, foi necessário explorar suportes sólidos mais variados de forma a obter melhores rendimentos de síntese e a melhorar as propriedades mecânicas dos suportes sólidos.⁶⁰

Atualmente, as resinas mais usadas mantêm-se como uma matriz polimérica com 1% de divinilbenzeno co-polimerizada com polistireno, com forma esférica e uma ampla distribuição de tamanho de partícula. A proporção de 1% oferece o melhor equilíbrio entre as propriedades de dilatação e a estabilidade mecânica. Existem diversos tipos de resinas para ser utilizadas em SPPS, como por exemplo a resina cloreto de 2-clorotritilo e a resina Wang (**Figura 15**), variando no tipo de grupos funcionais presentes na matriz polimérica.



Resina de Wang



Resina de cloreto de 2-clorotritilo

Figura 15 - Estrutura da resina de Wang e estrutura da resina de cloreto de 2-clorotritilo.

A escolha da resina deve ser feita tendo em conta os objetivos da síntese peptídica e parâmetros como o péptido a sintetizar, grupos protetores usados, tipo de clivagem a ser efetuada e as condições de reação. Para permitir a ancoragem do primeiro aminoácido, a resina deverá ser previamente ativada através da modificação química dos seus grupos funcionais e deverá possuir ainda determinadas propriedades mecânicas que permitam uma elevada estabilidade. Essas propriedades após ciclos de acoplamento e desproteção não devem ser perdidas. Contudo, a resina deve apresentar uma capacidade de dilatação (*swelling*) favorável para que os reagentes atinjam todos os locais de reação no interior da resina. É também de extrema importância que a resina contenha uma quantidade de funcionalização adequada (*loading*) de forma a impedir que uma funcionalização excessiva comprometa a manutenção das propriedades e impeça a clivagem do péptido finalizado. Por fim, o suporte sólido terá de ser resistente a mudanças de temperatura e ser inerte aos diferentes tipos de reagentes utilizados durante a síntese.^{58,61}

Para a síntese de determinados péptidos é por vezes necessária a utilização de um *linker*, ou seja, um pequeno espaçador orgânico entre o suporte sólido e o primeiro aminoácido para criar espaçamento entre o péptido e a resina de forma a minimizar a formação de agregados e minimizar o impedimento estereoquímico provocado pela resina. Utilizando um *linker*, assegura-se o melhor acoplamento do primeiro aminoácido, não colocando em causa o crescimento da cadeia peptídica.⁵⁷

Para a síntese do péptido Tiger 17, a resina utilizada foi a Fmoc-Rink Amida (**Figura 16**), uma resina apropriada para a síntese de péptidos com grupos amida *C*-terminais e que contém já incorporado o *linker* Rink com o grupo protetor temporário Fmoc.

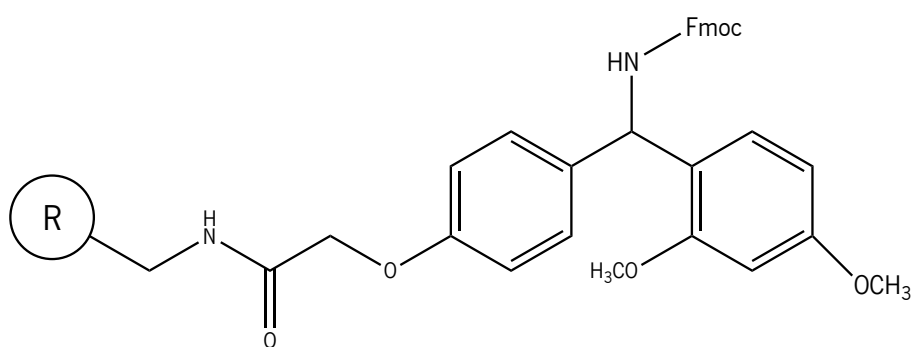


Figura 16 - Estrutura da resina Fmoc-Rink-Amide.

3.2.2 Grupos protetores

Para sintetizar um péptido através do método de SPPS, proteger os aminoácidos e os seus grupos funcionais de reações secundárias ou da formação de ligações químicas indesejáveis, é um dos principais requisitos. Os grupos protetores devem garantir uma incorporação simples na molécula desejada, uma alta estabilidade contra várias condições de reação, bem como uma remoção fácil e segura para o péptido em crescimento. Como cada aminoácido contém grupos diferentes nas suas cadeias laterais, os grupos protetores que impedem que esses mesmos grupos reajam, variam de acordo com o aminoácido e a metodologia utilizada.^{60,62} Existem duas categorias de grupos protetores: grupos que permitem a proteção temporária dos grupos α -amino e α -carboxilo da cadeia principal dos aminoácidos, e os grupos de proteção permanentes que bloqueiam as funcionalidades da cadeia lateral dos aminoácidos durante o crescimento da

sequência peptídica. Os grupos protetores das cadeias laterais são apenas removidos no último passo da síntese peptídica, quando ocorre a clivagem do péptido da resina. Em SPPS, existem dois grupos protetores mais frequentemente utilizados para bloquear o terminal amino: o *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) e o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc). O método inicial aplicado por Merrifield foi baseado no uso do grupo Boc como grupo protetor temporário para a função amina, e o tritilo (Trt) e o 2,2,4,6,7-pentametil-2,3-dihidrobenzofurano-5-sulfonil (Pbf) (**Figura 17**) ou grupos protetores relacionados para as cadeias laterais de aminoácidos trifuncionais como por exemplo, Cys, His, Glu, Lys e Arg.⁶²

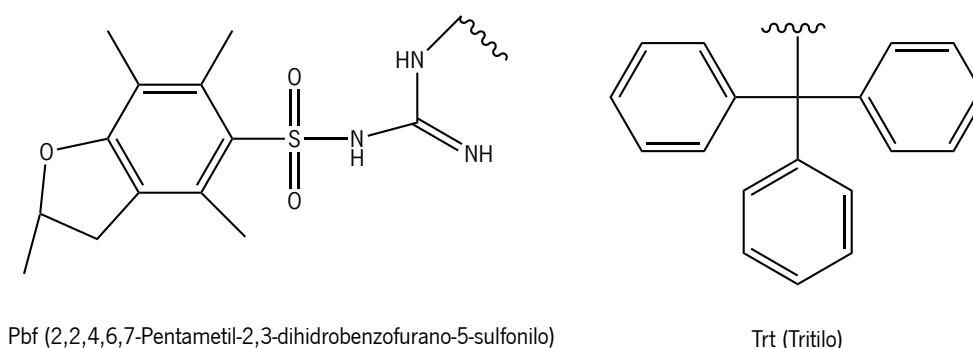
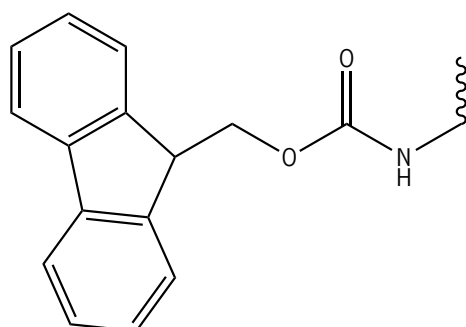
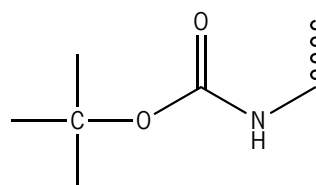


Figura 17 - Grupos protetores temporários da cadeia lateral de aminoácidos como Cys e Arg.

Embora o grupo Boc tenha sido utilizado durante os primeiros anos de SPPS, a introdução do grupo Fmoc abriu caminho para um conceito de síntese novo e mais variável (**Figura 18**). Aqui, o grupo Fmoc que pode ser removido por condições básicas, serve como grupo protetor temporário da função N- α e oferece a grande vantagem da ortogonalidade. Este conceito permite a remoção seletiva dos grupos protetores usando condições químicas e mecanismos de clivagem completamente diferentes, o que garante reações gerais mais suaves comparativamente com o Boc. A ortogonalidade é o principal benefício do conceito baseado em Fmoc, permitindo uma maior flexibilidade para estratégias complexas durante a síntese. Além disso, utilizar o grupo Fmoc em SPPS não requer o uso de vasos de reação especiais nem de reagentes tóxicos e corrosivos como o TFA durante a síntese, e pode ser facilmente removido através de uma solução de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF) (**Esquema 5**).^{46,59} A síntese peptídica, especialmente o processo de SPPS recorrendo à utilização do grupo Fmoc é, atualmente, a escolha mais popular no que toca à síntese de péptidos.

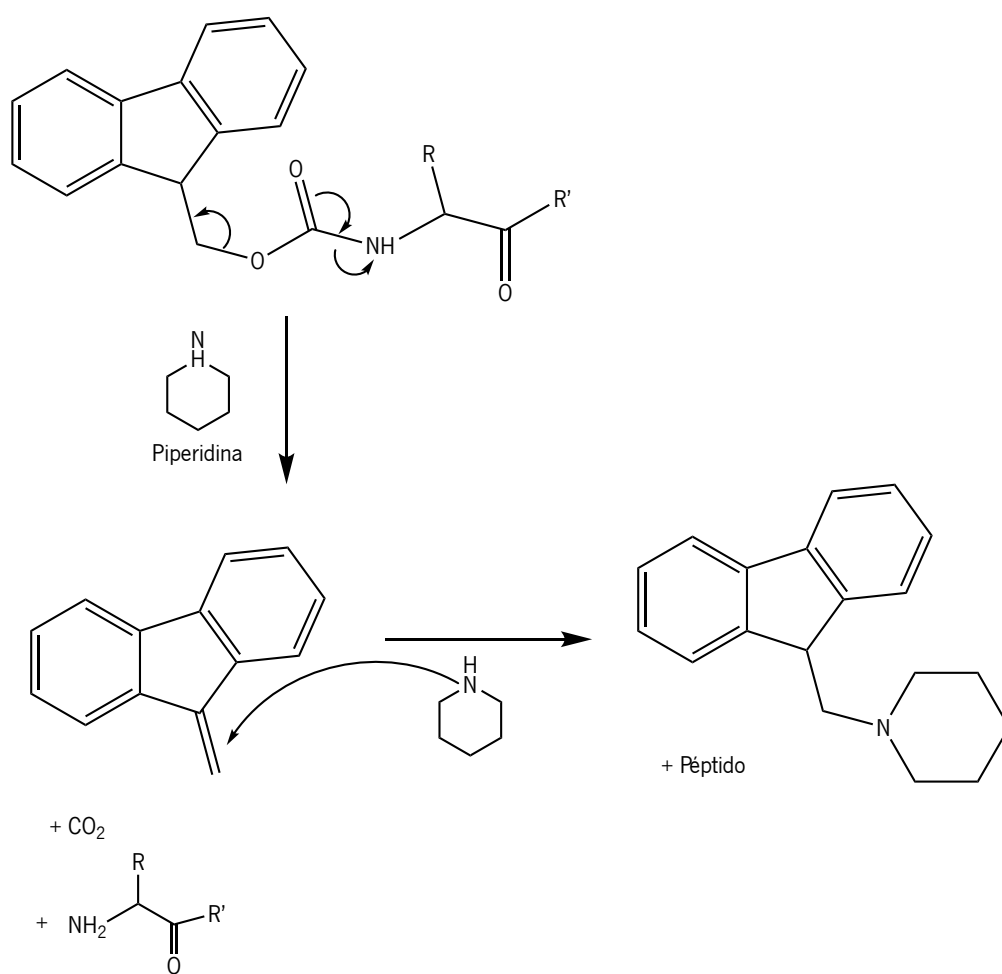


Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo)



Boc (*ter*-butiloxycarbonilo)

Figura 18 - Estruturas químicas dos grupos protetores do terminal amino, Fmoc e Boc.



Esquema 5 - Mecanismo de remoção do grupo Fmoc por ação da piperidina.

3.3 Síntese peptídica em fase sólida assistida por micro-ondas

Nos anos 90, o uso de aquecimento por radiação micro-ondas em síntese orgânica tornou-se num novo parâmetro para melhorar a velocidade e rendimento das reações. Desde esse momento, a radiação micro-ondas passou a ser amplamente usada em síntese de péptidos permitindo melhores rendimentos, produtos com elevado grau de pureza, menores percentagens de racemização e capacidade de síntese peptídica com um maior número de aminoácidos.^{63,64 65} O aquecimento via micro-ondas ocorre através da irradiação de energia diretamente no solvente e/ou reagentes, devido à interação do material com um campo elétrico alternado, aquecendo o meio reacional. Contrariamente, no aquecimento convencional condutivo, a energia é transferida para a mistura de reação através de correntes convectivas ou condutividade térmica, não proporcionando um aquecimento tão rápido. Para se obter um aquecimento rápido, é importante escolher adequadamente os solventes, sendo preferível que sejam capazes de absorver a energia de micro-ondas e de converter essa energia absorvida em calor.⁶⁶ Alguns desses solventes são o DMF, o acetonitrilo (ACN) , o butanol, cetonas e água (H₂O). Para além do aquecimento, as micro-ondas oferecem outro benefício relacionado com o facto de os péptidos em crescimento no suporte sólido terem a tendência a enrolar-se à medida que o tamanho da cadeia aumenta. O aquecimento por micro-ondas promove uma agitação das moléculas impossibilitando agregações inter e intramoleculares que tende a existir nos aminoácidos que são propensos a formar folhas β , devido à presença de ligações de hidrogénio e forças hidrofóbicas, estendendo assim a cadeia peptídica e expondo os grupos funcionais terminais, facilitando a reação **(Figura 19)**.^{67,68}

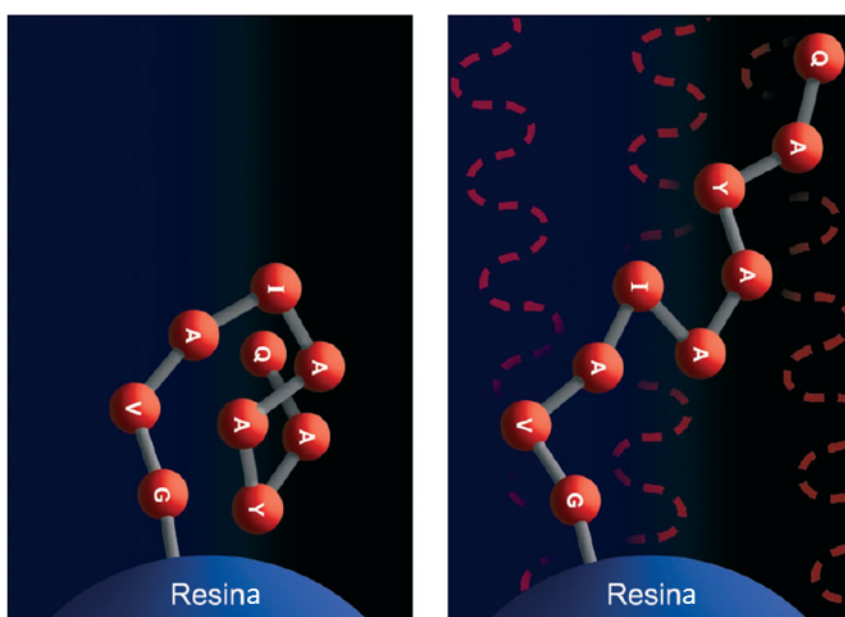


Figura 19 - Ação da energia de micro-ondas durante o crescimento da cadeia peptídica.

Utilizando a radiação micro-ondas, uma reação orgânica consegue ser concluída num curto espaço de tempo porque ainda que a irradiação não afete diretamente o valor da energia de ativação dos reagentes, a energia que é irradiada é suficiente para superar essa barreira mais rapidamente, sendo também possível controlar a temperatura e a pressão no interior do equipamento. Apesar de todas as vantagens que este método proporciona, realizar uma síntese peptídica assistida por micro-ondas acarreta um elevado dispêndio económico tendo em conta os custos do equipamento e das resinas compatíveis. Para além disso, quando estamos na presença de aminoácidos como Cys, His e Asp, as condições de utilização têm de ser ajustadas.^{69,70}

4. Biomateriais para a Cicatrização e Regeneração da Pele em Feridas Cutâneas

Recentemente, os péptidos com atividade antimicrobiana têm sido estudados em combinação com biomateriais por forma a que a sua atividade possa ser expandida a outras aplicações ou controlada para uma libertação direcionada. Existem inúmeros AMPs já investigados que demonstraram uma elevada eficácia no combate a enfermidades, como feridas cutâneas, resultantes de diversas patologias. Muitos desses péptidos possuem uma atividade antibacteriana

eficaz contra as bactérias mais comuns encontradas em feridas cutâneas, e podem ainda acelerar o processo de cicatrização. Enquanto objeto de estudo deste projeto, é pretendido verificar se estas duas propriedades são também elas encontradas em simultâneo no péptido Tiger 17.

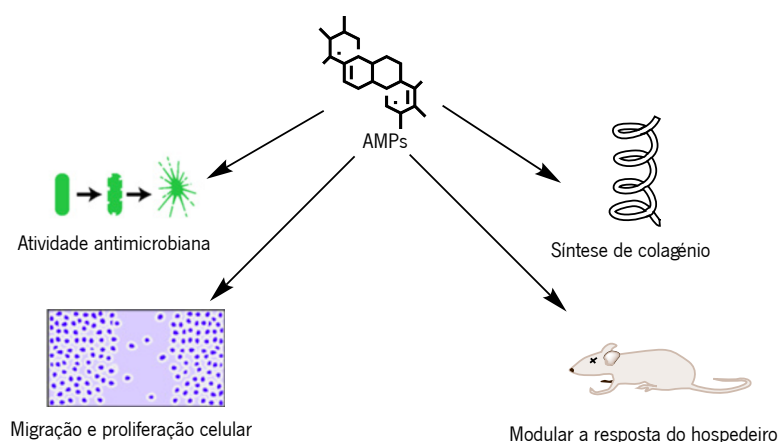
O desenvolvimento de novos biomateriais para a reparação e cicatrização da pele requer numa primeira instância o reconhecimento da estrutura da pele e do processo de cicatrização e restauração da barreira cutânea. A cicatrização de feridas é um processo bem organizado onde existe uma resposta por parte do organismo a uma rutura física de um tecido ou órgão e visa restabelecer a homeostasia. Este processo decorre em diferentes fases: **(1)** inflamação; **(2)** proliferação e **(3)** remodelação do tecido danificado. Na primeira fase de inflamação, o sistema imunitário tenta repor a homeostasia removendo o tecido que foi danificado e assegurando uma resposta eficaz para prevenir infeções por microrganismos. Já na fase proliferativa, que acontece 4-21 dias após a lesão, inicia-se a formação do tecido saudável e o recrutamento e proliferação de células do tecido conjuntivo levando à reepitelização superficial da ferida. Por fim, a última fase é caracterizada pela deposição de uma matriz extracelular acompanhada da remodelação do tecido e contração da ferida.⁷¹

Numa ferida crónica, o processo normal de cicatrização é interrompido e a degradação gradual dos tecidos pode ocorrer, na qual agentes químicos e bioquímicos, como enzimas proteolíticas derivadas de neutrófilos, estão envolvidas. Muitos dos tratamentos para este tipo de feridas tornam-se ineficazes para muitos indivíduos devido às diferenças biológicas existentes de pessoa para pessoa, designando-se as feridas como microambientes muito próprios, tornando o processo de desenvolvimento de um método 100% eficaz para uma população em geral, extremamente exaustivo.^{72,73} Os antibióticos usados atualmente foram desenvolvidos principalmente para atingir microrganismos em crescimento exponencial, e são geralmente pouco eficazes contra a formação e combate de biofilmes. Um biofilme, por definição, é um conjunto de células microbianas que se encontram irreversivelmente associadas a uma superfície e envolvidas numa matriz de material principalmente polissacarídeo.

Diversas estratégias foram desenvolvidas ao longo do tempo de forma a atuar direta ou indiretamente nos mecanismos envolvidos na formação dos biofilmes como, por exemplo, impedindo o processo de adesão bactéria-superfície. A estratégia de anti-adesão, utilizada para combater a formação de biofilmes, passa por impedir a interação das bactérias com as superfícies de biomateriais através da sua modificação. Geralmente, quando já estamos na presença de um

biofilme em estado avançado de agregação, estes têm tendência a desenvolver uma crescente resistência e tolerância a antibióticos, impedindo a eficácia dos diversos tratamentos atualmente estipulados em ambiente clínico. Essa resistência é desenvolvida devido aos microrganismos intitulados como “persistentes”. Esses microrganismos são geralmente bactérias que desenvolvem um determinado fenótipo que lhes permite sobreviver na presença de 1000 vezes mais do que a concentração mínima inibitória (MIC) de vários antibióticos, tornando-se dessa forma praticamente impenetrável.^{74,75,76}

Durante o processo de cicatrização da pele numa ferida cutânea, os pensos são usados como proteção da integridade da derme e dos tecidos epidérmicos. Atualmente, a fabricação de pensos atingiu um elevado patamar de qualidade de forma a criar um ambiente adequado para que ocorra um processo de cicatrização e regeneração da pele em condições ótimas por forma a acelerar o processo e evitar a colonização microbiana. Os pensos bioativos tornaram-se nos últimos anos sistemas com uma importância relevante visto que combinam as propriedades físicas e bioquímicas dos polímeros naturais e sintéticos, com compostos ativos que possuem propriedades benéficas para a cicatrização e regeneração de feridas cutâneas. Os AMPs são a aquisição mais recente destes sistemas, onde controlar a proliferação e colonização microbiana de bactérias, promover a síntese de proteínas essenciais para a cicatrização como o colagénio, potenciar a migração e proliferação celular e modular a resposta imune do hospedeiro são os principais objetivos (**Esquema 6**).^{77,78} A eficácia antimicrobiana de um penso está dependente da estabilidade e atividade exibida pelo AMPs enquanto este permanecer ativo e funcionalizado à superfície das suas fibras.



Esquema 6 - Potencialidades dos AMPs para promover a cicatrização e regeneração de feridas cutâneas.

4.1 Tipos de biomateriais

De acordo com o *National Institute of Health* um biomaterial é definido como “qualquer matéria, superfície ou construção que interaja com sistemas biológicos. Os biomateriais podem ser **derivados da natureza** ou **sintetizados em laboratório** usando componentes metálicos, polímeros, cerâmicas ou materiais compostos. Dispositivos médicos feitos de biomateriais são frequentemente usados para **substituir** ou **aumentar uma função natural**.⁷⁹ Os biomateriais têm recebido especial atenção por parte de diversos investigadores pelas suas potencialidades em diversos campos. Como aplicação biomédica, estes materiais podem ter como alvo as fases inflamatórias, proliferativas ou de remodelação do tecido, assim como modular as vias de sinalização celular, desencadeando o crescimento, a diferenciação e o funcionamento dos principais agentes do processo de cicatrização como os fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e células endoteliais. Dentro de um vasto leque de biomateriais, os biopolímeros têm sido amplamente aplicados como material no tratamento de feridas devido às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, regeneração, baixa antigenicidade, capacidade de suportar o crescimento celular, biodegradabilidade e durabilidade.^{80,81} Um dos pré-requisitos mais essenciais para definir um material como biomaterial é definitivamente a sua biocompatibilidade, ou seja, a capacidade de um material funcionar com uma resposta apropriada ao hospedeiro dependendo da sua ação específica. A resposta por parte do hospedeiro depende de diversos fatores que vão desde as propriedades químicas, físicas e biológicas dos materiais até à forma e estrutura do *scaffold* (estrutura tridimensional) usado. Algumas das propriedades inerentes aos biomateriais de origem polimérica que podem afetar a sua biocompatibilidade são: as características químicas do polímero, peso molecular, solubilidade, forma e estrutura, propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas, tensão superficial, absorção de água e degradação. O segundo pré-requisito mais importante é a biodegradabilidade dos materiais e para este fator é indispensável que a biocompatibilidade seja demonstrada ao longo do tempo. Os *scaffolds* poliméricos quando aplicados a organismos vivos devem persistir sem alterações físicas e químicas durante tempo suficiente para permitir a formação de novo tecido, mas também é necessário que tenham a capacidade de se degradar em tempo útil de forma a serem substituídos pelo novo tecido.^{82,83}

Os polímeros de origem natural possuem na sua estrutura sequências ou apenas monómeros de aminoácidos e ácidos nucleicos que ligados por ligações covalentes podem formar péptidos,

polissacarídeos, polifenóis, etc. São produzidos de forma natural por organismos vivos tais como plantas, animais, fungos e algas e dentro dos mais comuns encontramos a celulose, o quitosano, o alginato e o ácido hialurônico. Todos estes biopolímeros apresentam propriedades medicinais diferentes, entre elas: efeito anti-inflamatório, atividade antimicrobiana, poder cicatrizante, etc. Apesar dos seus benefícios em termos biológicos, as suas propriedades mecânicas tendem a ser insuficientes para suportar os movimentos e esforços mecânicos inerentes a muitas áreas do corpo, incluindo a pele. Misturas com polímeros de origem sintética oferecem múltiplos benefícios neste sentido, para além de tornarem o seu processamento por técnicas de nano e micro fiação muito mais simples.

No presente projeto, o acetato de celulose, polímero de origem natural, foi combinado com o polímero sintético policaprolactona (PCL) para a produção de nanofibras a partir da técnica de eletrofiação (eletrospinning). A celulose é o biopolímero mais abundante na natureza, estando presente nas paredes celulares das plantas e é também produzida por certas bactérias pertencentes aos géneros *Acetobacter*, *Sarcina ventriculi* e *Agrobacterium*. Após um processo de extração, purificação e acetilação, a celulose é convertida no seu éster, acetato de celulose (CA) (**Figura 20**), visto esta forma molecular permitir um manuseamento mais fácil.⁸⁴ A sua utilização em pensos bioativos deve-se às suas propriedades de retenção de humidade o que em feridas crónicas é visto como um fator positivo por induzir uma cicatrização mais rápida devido ao fornecimento adequado de fatores de crescimento e outras moléculas essenciais para os tecidos em cicatrização. Ao mesmo tempo, auxilia na absorção de exsudatos, é um material de baixo custo, resistente ao calor e a sua estrutura porosa resultante das repetições de β -D-glucose imita a matriz extracelular da pele, agilizando o processo de regeneração.⁸¹

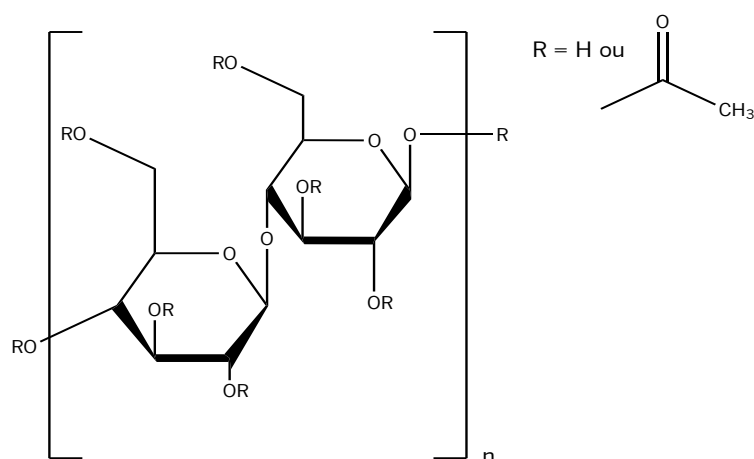
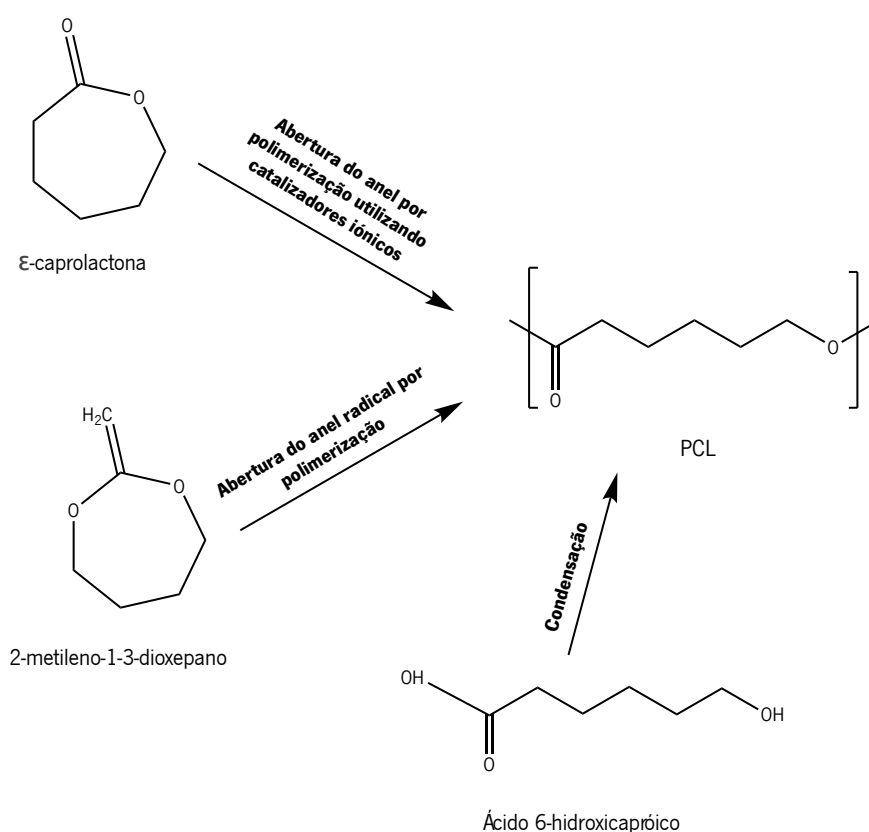


Figura 20 - Estrutura do acetato de celulose.

Este polímero de origem natural é várias vezes encontrado na literatura juntamente com outros tipos de polímeros de origem sintética pois dessa forma, os *scaffolds* produzidos beneficiam da relação simbiótica entre a origem natural, eficaz em contacto com tecidos vivos, e a origem sintética com todas as suas vantagens mecânicas.

Um dos biopolímeros mais utilizados com o CA é a PCL. O PCL é um polímero hidrofóbico, semi-cristalino, com boa solubilidade e baixo ponto de fusão pertencente à família dos poliésteres alifáticos. Foi produzido sinteticamente pela primeira vez em 1930 pelo grupo de investigação de Wallace Carothers e durante décadas caiu no esquecimento. Recentemente, foi ressurgindo em vários trabalhos de investigação pela sua ótima capacidade de mistura com outros tipos de biopolímeros para ser aplicado em nanofibras com potenciais biomédicos. O seu interesse reemergiu pela necessidade crescente de polímeros de baixo custo e que ao mesmo tempo tenham propriedades mecânicas específicas, como a viscoelasticidade, que sejam não imunogénicos e que sejam reabsorvidos naturalmente pelo organismo numa escala de meses e/ou anos (muito mais tempo do que os poliésteres alifáticos projetados para usos semelhantes).^{85,86} Este polímero pode ser preparado por três vias: **(1)** abertura do anel da ϵ -caprolactona por polimerização usando uma variedade de catalisadores aniônicos, catiónicos e de coordenação; **(2)** abertura do anel do radical livre de 2-metileno-1-3-dioxepano via polimerização; e **(3)** condensação do ácido 6-hidroxicapróico (sendo que esta via é mais rara de todas) **(Esquema 7)**.⁸⁷



Esquema 7 – Vias possíveis para a síntese do polímero PCL por três vias possíveis: (1) abertura do anel da ϵ -caprolactona por polimerização usando catalisadores aniônicos, catiónicos ou de coordenação ou (2) abertura do anel do radical livre de 2-metileno-1,3-dioxepano ou (3) condensação do ácido 6-hidroxicapróico.

Nina Liao *et al.* investigaram o poder antimicrobiano e a capacidade de proliferação celular do antibiótico clorohidrato de tetraciclina (THC). Este foi aplicado a *scaffolds* para feridas cutâneas produzidos pela técnica de eletrospinning através da mistura de CA, PCL e dextrano. A utilização do CA deve-se à sua excelente compatibilidade com o corpo humano e o seu baixo custo; porém, a sua baixa resistência mecânica e eletrospinabilidade limitou a sua aplicação individual. De forma a superar estes obstáculos, o PCL foi utilizado na mistura para fornecer toda a resistência mecânica que anteriormente estava em falta.⁸⁸ Também Kamyar Khoshnevisan *et al.* produziram nanofibras recorrendo à técnica de eletrospinning com uma solução polimérica de CA/PCL. Após a obtenção das fibras, observadas por microscopia eletrônica de varrimento (SEM), procederam a um processo de imobilização por impregnação de extrato de própolis, conhecido pelas suas propriedades terapêuticas e medicinais, incluindo atividade antibacteriana, anti-inflamatória,

antifúngica, antiviral e anti tumoral. O *scaffold* produzido demonstrou atividade antimicrobiana e alta atividade antioxidante tendo sido considerado uma superfície biocompatível e biodegradável para aplicação na cicatrização de feridas.⁸⁹

4.2 Produção de Nanofibras pela Técnica de Eletrospinning

A técnica de eletrospinning é um método simples e eficaz que usa a força electroestática para produzir fibras em nanoescala a partir de polímeros de origem natural e sintética. A sua invenção data de há 120 anos, mas apenas a partir da década de 80 é que começou a ganhar mais atenção pela sua versatilidade, reprodutibilidade, a escala a que opera, relação volume-superfície, porosidade ajustável e possibilidade de produzir fibras maleáveis que se adaptam a uma ampla variedade de tamanhos e formas e, pela possibilidade de controlar facilmente a composição das fibras para atingir as propriedades e funcionalidade desejadas.

No geral, o funcionamento desta técnica assenta em três princípios fundamentais: **(1)** a fonte de alimentação elétrica; **(2)** o uso de um *spinneret* (a agulha através da qual sai a solução polimérica para formar a fibra); e **(3)** o coletor (**Figura 21**).⁹⁰ De forma sucinta, no eletrospinning uma solução polimérica é preparada nos solventes apropriados e introduzida numa seringa ligada diretamente ao *spinneret*. O próximo passo é a aplicação de um elevado potencial elétrico (kV) entre a agulha e o coletor. Quando o campo elétrico aplicado ultrapassa a tensão superficial da gota, um feixe carregado da solução polimérica é expelido da ponta da agulha. A este feixe dá-se o nome de “Cone de Taylor” que adquire a forma de um cone ao sair da agulha tornando-se mais longo e fino consoante as altas voltagens aplicadas, acabando por se subdividir geometricamente em feixes de nanofibras que são coletadas a uma distância ideal, terminando na solidificação dos polímeros devido à evaporação do solvente. Assim, as nanofibras solidificadas são depositadas no coletor até formar um filme com uma espessura apropriada para a utilização pretendida.

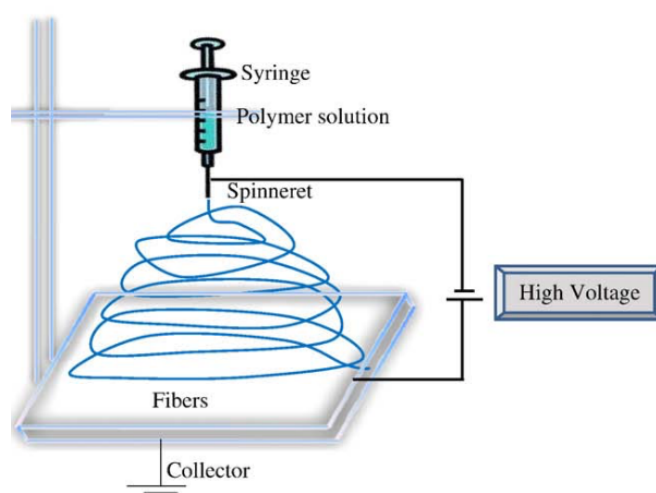


Figura 21 - Esquema representativo de um equipamento de eletrospinning.

Apesar de todas as suas vantagens, produzir nanofibras recorrendo à técnica de eletrospinning pode ser um processo desafiante. Há uma variedade de parâmetros que são necessários controlar e otimizar para que se obtenham filmes fibrosos com uma boa orientação de fibras e uma morfologia e topografia específicas (**Tabela 2**). As propriedades ideais para filmes nanofibrosos aplicados ao tratamento de feridas cutâneas devem abranger os seguintes valores: diâmetro de fibra entre 50-500 nm, um rácio elevado de volume por área superficial, uma elevada porosidade da fibra (60-90%), e elevada resistência mecânica.⁹¹

Tabela 2 - Parâmetros que afetam a produção de nanofibras pela técnica de eletrospinning.⁹²

Parâmetros da Solução Polimérica	Parâmetros Operacionais
Concentração do polímero	Voltagem aplicada
Peso molecular do polímero	Fluxo
Viscosidade	Diâmetro da agulha
Tensão superficial	Forma do coletor
Condutividade	Distância ao coletor
Volatilidade dos solventes	Condições ambientais do ambiente circulante

Os parâmetros operacionais são otimizados no decorrer do processo de eletrospinning pela visualização da estabilidade do feixe produzido. No que toca à voltagem, utilizar valores mais altos pode aumentar as forças repulsivas eletrostáticas no jato e, portanto, o diâmetro da fibra diminui,

o solvente evapora rapidamente e não ocorre formação de agregados. Ainda assim existem alguns polímeros que requerem valores de voltagem mais baixos, como o é o caso do PCL (13 kV). O fluxo deve também ser ajustado consoante a solução polimérica a utilizar; porém, preferencialmente, devem ser usados fluxos mais baixos para permitir a evaporação do solvente. A distância da ponta da agulha até ao coletor é usada para controlar a morfologia e o diâmetro da fibra. Por fim, a humidade relativa do ar e a temperatura ambiente do local onde se encontra o equipamento de eletrospinning também afeta a morfologia e a produção de fibras pois existe uma correlação direta entre a volatilidade do solvente e a temperatura. Por exemplo, a tensão superficial da solução polimérica e a viscosidade são afetadas pela temperatura.⁹³ Por outro lado, o ajuste dos parâmetros para obter uma solução polimérica adequada à produção de nanofibras requerem um conhecimento prévio aprofundado acerca dos solventes e dos polímeros escolhidos. No que toca aos polímeros, a sua concentração influencia a forma das nanofibras enquanto que o seu peso molecular tem um efeito significativo na viscosidade, tensão superficial e condutividade. Por exemplo, uma solução com um peso molecular muito baixo tende a formar agregados em vez de fibras e uma solução com elevado peso molecular produz uma solução polimérica com uma viscosidade desejável para serem formadas nanofibras. A viscosidade (com máximo entre 1-215 poise) da solução desempenha um papel importante na determinação do tamanho e morfologia da fibra. É necessário alcançar um equilíbrio pois com viscosidades muito baixas não há formação de uma fibra contínua e com viscosidades muito alta a solução polimérica tem dificuldade a ser injetada através da agulha.

Os solventes escolhidos para a solução polimérica também representam uma parte importante do sucesso da técnica de eletrospinning (**Tabela 3**). É crucial que estes tenham propriedades como boa volatilidade, ponto de ebulição baixo, serem capazes de manter a integridade da solução mesmo após a dissolução estar concluída, e devem possuir um valor de pressão adequado para que a evaporação do solvente aquando da injeção seja a mais rápida possível. Ao mesmo tempo é importante que a tensão superficial se mantenha em valores baixos pois elevados provocam instabilidade do feixe, originando gotículas e consequentemente agregados, ao contrário das fibras pretendidas. Por fim, conclui-se que solventes com propriedades altamente condutoras são instáveis na presença de um campo elétrico com valores elevados, levando a uma ampla distribuição do diâmetro das nanofibras.

Tabela 3 - Propriedades dos solventes utilizados na realização deste projeto para preparação das soluções poliméricas.⁹⁰

Solventes	Tensão superficial (mN/m)	Constante dielétrica	Ponto de ebulição (°C)	Densidade (g/mL)
Acetona	25,2	21	56,1	0,786
Ácido acético	26,9	6,2	117,9	1,049
Clorofórmio	26,5	4,8	61,2	1,498
Dimetilformamida (DMF)	37,1	38,3	153	0,994
Tetrahidrofurano (THF)	26,4	7,5	66	0,886

4.3 Estratégias para Incorporação de Péptidos Antimicrobianos

Vários biopolímeros são convertidos em *scaffolds* através de técnicas de eletrospinning com sucesso, dando origem a membranas nanofibrosas. Nestes polímeros incluímos poliésteres alifáticos, como poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poliácido láctico (PLA) e PCL, que são predominantemente aplicados à engenharia de tecidos pelas suas propriedades biodegradáveis e não tóxicas e excelente resistência mecânica. Contudo, por não possuírem propriedades hidrofóbicas e pela falta de grupos funcionais a sua biocompatibilidade fica comprometida sendo necessário recorrer a outros materiais, nomeadamente a polímeros naturais e a biomoléculas ativas.⁹⁴ A incorporação de biomoléculas ativas é na realidade um dos passos fulcrais no desenvolvimento de pensos bioativos para aplicações no tratamento de feridas cutâneas. Antibióticos sintetizados em ambiente laboratorial, péptidos com atividade antimicrobiana, antiviral ou antifúngica, e extratos de plantas (ex. óleos essenciais) podem ser aplicados em fibras ou nanofibras aquando ou após o seu processo de fabricação através de estratégias de imobilização e tratamentos específicos.

No contexto deste projeto metodologias para a imobilização de AMPs foram investigadas. Existem diversas estratégias de imobilização de péptidos como, por exemplo, através de um processo de imobilização à superfície, *co-spinning*, ligação covalente por grupos funcionais tanto da fibra como do péptido utilizado, método de camada por camada, entre outros (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Diferentes métodos de imobilização de péptidos em nanofibras produzidas por eletrospinning.

	Definição	Vantagens	Desvantagens	Ref.
Co-eletrospinning	Dissolução dos polímeros e do AMP no mesmo solvente.	Processamento simples; Permite uma libertação controlada do péptido apenas por modificação dos seus rácios.	Os polímeros e o péptido utilizados nas misturas devem apresentar características hidrofílicas/hidrofóbicas e solubilidades semelhantes. É estritamente necessário o conhecimento da natureza dos elementos utilizados.	95,96,97
Imobilização à Superfície (Physical adsorption)	Imobilização do AMP na superfície da nanofibra previamente fabricada via <i>eletrospinning</i> apenas mergulhando a nanofibra na solução apropriada.	Proporciona uma ação intermédia de libertação do AMP: previne uma libertação descontrolada e evita uma libertação demasiado lenta; Evita a desnaturação do AMP causada por elevadas voltagens ou solventes orgânicos.	É estritamente necessário o conhecimento da natureza dos elementos utilizados.	95,96,98
Modificação da superfície por métodos químicos (Wet chemical method)	Modificação da superfície das nanofibras através do tratamento com grupos amina, carboxilos, hidroxilos ou tióis sob condições ácidas ou básicas.	Torna as nanofibras quimicamente mais estáveis para o AMP imobilizado; Fácil controlo da quantidade de AMP imobilizado; Permite uma maior penetração em nanofibras com diâmetros maiores.	Poderá ocorrer perda de propriedades mecânicas da nanofibra.	98
Camada a camada (Layer by Layer)	Deposição iónica impulsional por forças eletrostáticas entre substratos carregados, resultando em revestimento por multicamada.	Utilização de dois tipos de AMP com funções distintas; Facilmente sintetizável; Possibilidade de utilizar qualquer tipo de substratos e qualquer tipo de composição nas camadas.	Os polímeros escolhidos, assim como os péptidos utilizados, têm de possuir características químicas e físicas muito comuns.	95,98

4.4 Técnicas de Caracterização de Péptidos Antimicrobianos

4.4.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (^1H RMN)

As técnicas espectroscópicas fornecem informações acerca da estrutura de compostos orgânicos e são, geralmente, das primeiras técnicas de caracterização a serem usadas após a síntese peptídica. A utilização de espectroscopia de RMN é uma das mais utilizadas e mais poderosas técnicas para determinação e/ou confirmação da estrutura química de um péptido. Existem vários núcleos possíveis de serem estudados, mas os mais comuns são o núcleo de protão (^1H) e o núcleo de carbono (^{13}C). Neste projeto, optou-se por utilizar apenas o estudo por ^1H pelo facto do péptido alvo Tiger 17 ser de carácter bastante complexo, ou, no caso do Peptaibolin, um péptido extensivamente já estudado.

Os princípios fundamentais da técnica de RMN assentam nas propriedades magnéticas dos núcleos. Um elemento químico, para ser detetado numa análise por RMN, necessita de ter *spin*, ou seja, momento angular nuclear. No caso do protão, o número de *spin* é igual a 1 e a sua carga presente no núcleo juntamente com esse valor, permite gerar um campo magnético adjacente a esse mesmo protão.⁹⁹ Assim, num equipamento de RMN, a amostra a ser analisada é introduzida num campo magnético e irradiada com energia na gama das ondas rádio. Ocorre a transição dos núcleos de um estado de *spin* de menor energia para maior energia, como resultado da absorção de energia, e a energia libertada é detetada. Essa energia libertada depende de um fator chamado de frequência de ressonância e é característica de cada núcleo. Essa frequência vai ser influenciada pelo ambiente que rodeia o protão, como a sua vizinhança que posteriormente, no espectro obtido, permite comparar quais os sinais que são adjacentes.¹⁰⁰

Para analisar os sinais num espectro de RMN existem fatores importantes a ter em conta como: o número de sinais obtidos, o seu desvio químico, a intensidade e o desdobramento. Através de todos esses valores obtidos, e sabendo qual o composto químico que estamos a analisar, é possível prever se os sinais obtidos correspondem ou não à molécula em análise e confirmar a sua estrutura química.¹⁰¹

4.4.2 Cromatografia de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a mais poderosa de todas as técnicas cromatográficas, frequentemente alcançando separações e análises que seriam difíceis ou impossíveis com outros tipos de cromatografia. Para este trabalho em particular, esta técnica foi utilizada para confirmar a pureza ou presença de contaminações nos péptidos sintetizados.

Em geral, amostras podem ser separadas por HPLC de acordo com três características principais: polaridade, carga e tamanho de partícula. Esta separação ocorre com o auxílio de uma coluna onde o eluente é forçado através da mesma, sob altas pressões (até 400 atm). Esta técnica permite usar um tamanho de partícula muito menor para o material de empacotamento da coluna, o que dá uma área de superfície muito maior para as interações entre a fase estacionária (coluna) e as moléculas que passam por ela permitindo uma separação muito melhor dos componentes da mistura em análise.¹⁰¹

Existem duas variantes de HPLC, fase normal e fase reversa, sendo que a utilizada foi a fase reversa. Isto significa que a coluna utilizada possuía natureza apolar e, como tal, detém maior afinidade para eluentes polares e compostos apolares. Os compostos apolares na mistura eluente/amostra terão tendência a formar ligação com a fase reversa devido à presença de forças de van der Waals e isso irá retardar o seu percurso através da coluna. Portanto, neste caso, as compostos polares atravessarão a coluna mais rapidamente, possuindo menores tempos de retenção. À medida que os compostos de interesse são eluídos da coluna, um detetor regista os seus tempos de retenção através do desenho dos respetivos picos. A análise destes picos permite compreender se a amostra injetada no equipamento de HPLC contém impurezas ou se se encontra pura.^{101,102}

4.5 Análise e Caracterização de Nanofibras

A técnica de eletrospinning permite produzir filmes fibrosos à nano escala. Contudo, não é possível acompanhar a sua produção a olho nu, assim como visualizar a morfologia das nanofibras. Como tal, é indispensável recorrer a técnicas de análise e caracterização de alta resolução por forma a confirmar que características ideais como uniformidade e ausência de defeitos são atingidas para garantir a produção de nanofibras funcionais. Após confirmação, é de

interesse avaliar as propriedades físicas, químicas e mecânicas das nanofibras obtidas com o intuito de verificar se a escolha de polímeros, solventes e parâmetros de processamento são os adequados para a obtenção de estruturas com potencial para dar origem a pensos bioativos.

4.5.1 Microscopia Ótica de Campo Claro

Numa primeira fase, a confirmação da presença de nanofibras nos filmes de eletrospinning é feita utilizando um microscópio ótico (MO). Existem misturas poliméricas onde é possível visualizar, apenas com este equipamento, se existem ou não fibras; porém, alguns polímeros onde os índices de refração não são compatíveis com o componente ótico do microscópio, esta tarefa não é possível.

A microscopia ótica é uma das técnicas mais fáceis de usar. Com recurso a um sistema de lentes e à manipulação da amostra numa ampla variedade de condições de iluminação é possível obter imagens óticas. Isto significa que há um caminho direto da fonte de iluminação para o observador e, portanto, na ausência de amostras ou utilizando amostras transparentes, a região será brilhante. A morfologia da amostra será visível apenas se esta absorver a luz ou a espalhar com força suficiente em grandes ângulos para que parte da luz não seja recolhida pela lente objetiva. Quando pretendemos analisar a morfologia de superfícies contendo polímeros é necessário ter em atenção que estes são, na sua maioria transparentes e, portanto, a distribuição de pigmentos ou outras partículas pode ser vista em MO apenas se as amostras forem relativamente espessas. Na presença de misturas poliméricas, o contraste de fase é um método comum usado para visualizar amostras que têm pouco ou nenhum contraste. Se os vários polímeros são transparentes, muitas vezes têm uma pequena diferença no índice de refração resulta em pouca ou nenhuma absorção e num espalhamento fraco.¹⁰³ No entanto, se a amostra possuir agregados, estes serão facilmente visualizados graças à acumulação dos polímeros ou à presença de solventes.

4.5.2 Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

Quando nanofibras ou agregados não são passíveis de visualização através do MO recorre-se ao SEM. O SEM é uma técnica de microscopia eletrónica que capta imagens de uma superfície

de amostra por meio da varredura de um feixe de elétrons energético focalizado. É uma das ferramentas mais comuns para estudar a morfologia de superfícies, pois permite uma resolução de imagem muito superior ao MO (até 1000x mais), até 1 nm, podendo não só confirmar-se a presença de fibras, mas também o seu diâmetro e distribuição de porosidades.¹⁰⁴ Em estudos utilizando SEM, e especialmente quando a amostra é polimérica, esta deverá ser eletricamente condutora, pelo menos à superfície, de forma a evitar a sobrecarga de energia electroestática e a presença de artefactos nas imagens obtidas. Como tal, materiais poliméricos são geralmente cobertos por um revestimento ultrafino de um material eletricamente condutor, como ouro.¹⁰⁵ Após esse tratamento inicial, a amostra é colocada no equipamento SEM onde os elétrons primários interagem com os átomos na superfície da amostra emitindo vários sinais. Estes elétrons são emitidos por um canhão de elétrons tais como: cátodos de filamento de tungsténio ou cátodos de hexaboreto de lantânio (LaB₆). Os elétrons são normalmente acelerados com uma energia de 2 - 40 keV e focalizados espacialmente por uma ou duas lentes condensadoras num ponto de cerca de 0,4 - 5 nm de diâmetro. Ao atingir a amostra, os elétrons perdem energia devido ao seu espalhamento pela superfície e a absorção dos elétrons pela própria amostra. Esta absorção vai permitir a emissão dos elétrons secundários a diferentes profundidades (5 - 10 nm), fornecendo vários sinais de morfologia da amostra a diferentes graus de profundidade. Os sinais emitidos são recolhidos por detetores especializados e amplificados, transformando-se em imagens.¹⁰⁶

4.5.3 Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A análise do comportamento dos polímeros na presença de temperatura pode ser seguido através das técnicas de TGA e DSC.

A técnica de TGA é utilizada para medir variações de massa de uma determinada amostra aquando o seu aquecimento (ou arrefecimento) ou quando mantida a uma temperatura específica. Esta perda de massa pode ocorrer através de diferentes fenómenos, nomeadamente evaporação, decomposição, sublimação ou até oxidação, e podem ser originados pela formação ou rutura de ligações químicas e libertação de produtos voláteis. Para serem detetadas estas variações de massa, o equipamento de TGA contém uma termobalança que permite a pesagem contínua da

amostra em função da temperatura, cuja gama pode atingir um máximo de 1000°C sob uma atmosfera inerte (nitrogénio, hélio ou árgon).

As curvas de variação de massa obtidas permitem tirar conclusões sobre a estabilidade térmica da amostra, sobre a sua composição e estabilidade dos compostos intermediários e sobre a composição dos resíduos resultantes. Geralmente, os polímeros exibem perda de massa pelo facto de a elevadas temperaturas ocorrer a evaporação de compostos voláteis.¹⁰⁷ Através do TGA são obtidos dois tipos de gráficos: o gráfico TG, onde é dada a progressão da perda de massa ao longo da temperatura (**Figura 22**), e o gráfico de dTG que é simplesmente a derivada do primeiro gráfico onde é possível ver um vértice que representa a temperatura do momento principal de degradação da amostra.

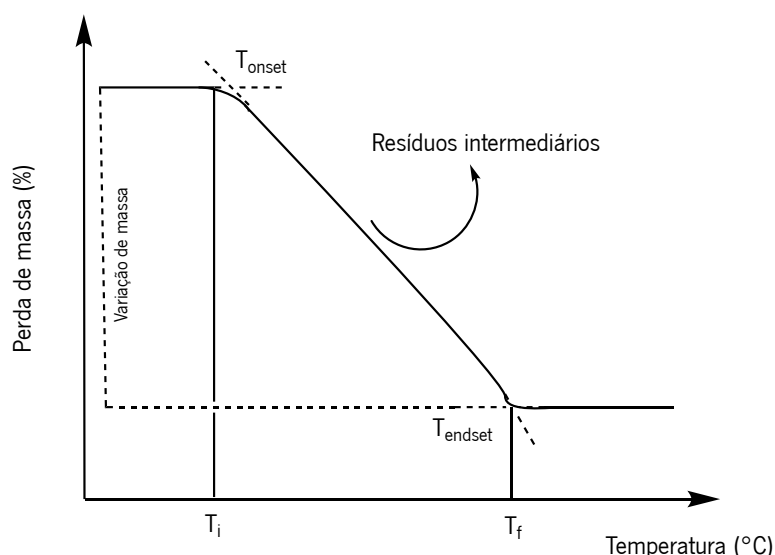


Figura 22 - Representação de uma curva típica de TGA através de um gráfico de TG.

Existem diversos fatores que podem afetar o comportamento de uma dada amostra em determinada gama de temperatura, influenciando as curvas obtidas. No que toca a fatores condicionados pelo equipamento, estes são controlados pelo fabricante ou pelo operador enquanto que os fatores ligados à amostra dependem do seu pré-tratamento, manuseamento e das suas propriedades intrínsecas (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Fatores que afetam as curvas obtidas pela técnica de TGA e DSC.

Fatores Instrumentais	Características da Amostra
Velocidade de aquecimento do forno	Compactação da amostra
Atmosfera	Quantidade de amostra
Sensibilidade da balança	Natureza da amostra
Posição da amostra no forno	Tamanho das partículas
Material dos cadinhos (DSC)	Condutividade Térmica
Termopares (DSC)	Natureza dos resíduos intermediários

Comparativamente a outras técnicas de análise térmica, o DSC é a mais utilizada pelo facto de permitir analisar o comportamento térmico de uma amostra através da comparação com um material de referência quando a amostra é exposta a um programa controlado de temperatura. Esta técnica origina gráficos de fluxo de calor (mW) em função da temperatura e fornece informações tais como: determinação da temperatura de transição vítrea, de cristalização polimérica e de derretimento; o calor de fusão; calor de reação; determinação de pureza; avaliação cinética de reações químicas (ex. degradação térmica oxidativa), etc. Pela sua natureza abrangente, e o facto de necessitar de pouca quantidade de amostra, esta é uma técnica geralmente aplicada a polímeros e fármacos, sendo também possível analisar moléculas orgânicas e inorgânicas.¹⁰⁸

Em DSC é possível determinar qualitativamente e quantitativamente as mudanças na temperatura em termos de capacidade exotérmica, endotérmica, e térmica de um material. Para a técnica de DSC é necessário a utilização de cadinhos, nos quais a amostra é colocada assim como o material de referência. Utilizam-se geralmente cadinhos de alumínio, colocados em cima de termopares, e o material de referência é usualmente a alumina (**Figura 23**). Esta técnica baseia-se na medição da diferença de temperatura entre a amostra e o material de referência enquanto tanto a amostra como a referência são submetidas a um programa de temperatura controlada. O registo depende da diferença entre as capacidades caloríficas da amostra e da referência, da velocidade de aquecimento (dT/dt), e da resistência térmica. Tal como no TGA, existem também fatores relacionados tanto com o equipamento como com a amostra (**Tabela 5**).¹⁰⁷

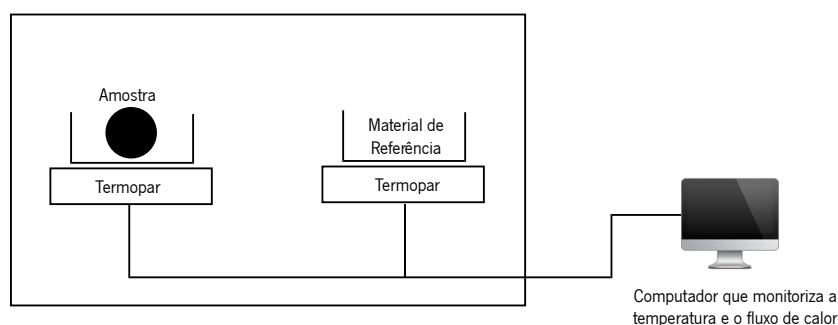


Figura 23 - Representação esquemática de um equipamento de DSC.

O resultado da técnica de DSC é exibido na forma de um gráfico ou curva, conhecido como curva DSC. Este gráfico é traçado com base no fluxo de calor em função da temperatura ou tempo, sendo mais usual a utilização da medida de temperatura. Numa curva típica de DSC, podem estar representados eventos exotérmicos e endotérmicos, caracterizados por picos com direção para cima ou para baixo (**Figura 24**). Essa curva obtida é usada para medir as entalpias de transições de fase, integrando o pico que corresponde a determinada transição, utilizando para isso a equação apropriada.¹⁰⁷

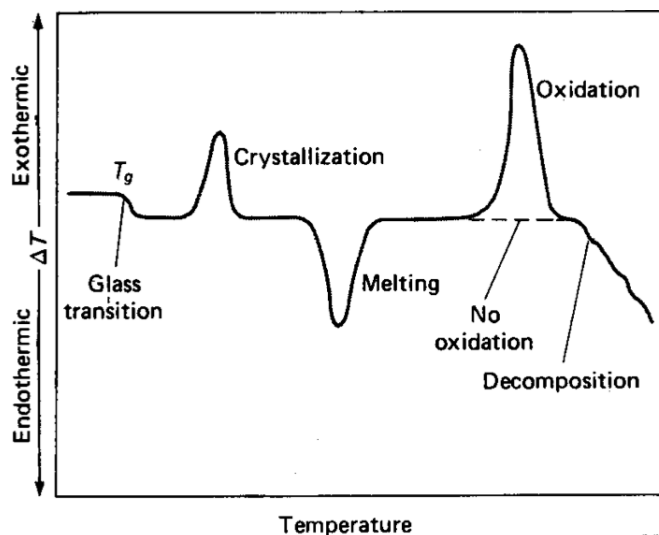


Figura 24 - Exemplo de uma curva típica de DSC, onde é possível visualizar as diferentes transições ocorridas.

4.5.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada a Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)

Para a caracterização química de determinado material, em especial amostras poliméricas no formato de filmes nanofibrosos, é utilizado o ATR-FTIR. Em geral, os materiais poliméricos ao longo do tempo sofrem diferentes reações químicas que provocam a sua degradação, induzindo alterações nas cadeias poliméricas por rutura dessa mesma cadeia, por intermédio de processos químicos de *crosslinking*, ou pela formação de novos grupos funcionais. Para estudar essas modificações ou seguir ao longo do tempo a evolução da amostra, a análise por ATR-FTIR estuda as características químicas dos materiais (neste caso, as nanofibras), fornecendo uma “impressão digital” acerca de todos os elementos que as compõe.¹⁰⁹

A imagem obtida por FTIR usando equipamento ATR representa uma abordagem complementar ao uso da imagem FTIR nos modos de transmissão ou reflexão. O equipamento ATR é a ferramenta mais amplamente utilizada juntamente com um equipamento FTIR por ser a mais rápida. O ATR-FTIR permite a análise de amostras pequenas, sem preparação prévia, e fornece todas as informações necessárias sobre a transformação de diferentes grupos funcionais na estrutura polimérica. Uma das principais vantagens do ATR é a sua capacidade de penetração na amostra, qualquer que seja a sua espessura, utilizando um único feixe de infravermelhos. Nesta técnica, a amostra é pressionada contra um diamante, um selenito de zinco ou um cristal de germânio, e a absorção da onda evanescente é medida (**Figura 25**).¹¹⁰

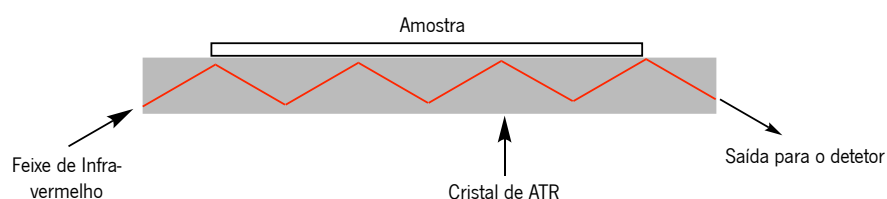


Figura 25 - Representação do caminho efetuado por um feixe de IV em contacto com uma amostra no equipamento de ATR.

O feixe que atravessa o cristal do equipamento ATR e entra em contacto com a amostra é depois recolhido por um detetor onde as imagens FTIR são obtidas com recurso a um computador. A medição consecutiva numa série de pontos na amostra permite obter um mapa de espectros

com bandas a diferentes comprimentos de onda (cm^{-1}) com uma determinada percentagem de transmitância, que pode ser usada para gerar espectros da composição química da amostra.

4.5.5 Ângulo de Contacto e Energia de Superfície

O ângulo de contacto de uma superfície resulta da medição da molhabilidade de um sólido, neste caso de uma superfície, por um solvente teste. É definido geometricamente como o ângulo formado entre a superfície sólida e a superfície líquida quando estas se encontram.¹¹¹ A medição do ângulo de contato é comumente usado para a caracterização da hidrofiliicidade/hidrofobicidade da superfície de um biomaterial. Sendo um dos métodos mais antigos usados para analisar superfícies de biomateriais, fornece informações muito úteis para o campo das aplicações biomédicas, pois a hidrofiliicidade de uma superfície é crucial para as funções dos biomateriais, nomeadamente a adesão e propagação celular.¹¹² É um método relativamente simples para amostras sólidas e normalmente não é necessário nenhum tipo de preparação especial da amostra, sendo apenas necessário estarem suficientemente limpas e não modificarem o seu comportamento e morfologia em contacto com os solventes testados, como por exemplo, o filme dissolver em contacto com um dos solventes teste.

Há duas formas de descrever os fenómenos que acontecem quando o solvente entra em contacto com a superfície: uma é a abordagem termodinâmica que tem em conta a adsorção, e a outra afeta as tensões superficiais correspondentes. As medições são efetuadas utilizando o método da gota séssil onde uma gota de solvente puro é depositada verticalmente na superfície da amostra e os ângulos de contacto são medidos por meio de um goniómetro, fornecendo informações acerca da simetria, estabilidade e capilaridade da superfície da amostra analisada (**Figura 26**).¹¹³

Normalmente são testados tanto solventes polares como apolares e a água destilada serve como solvente padrão. Além da química da superfície, a rugosidade da superfície também é um fator crucial para a medição do ângulo de contacto.¹⁰⁶

A energia superficial é uma medida relativa de energia de uma determinada superfície, relacionada com a força das interações químicas no material e a sua área de exposição. Este valor é calculado recorrendo a um conjunto de equações e, geralmente, uma energia superficial alta

significa uma maior molhabilidade das superfícies, resultando em ângulos de contacto menores.^{114,115,116}

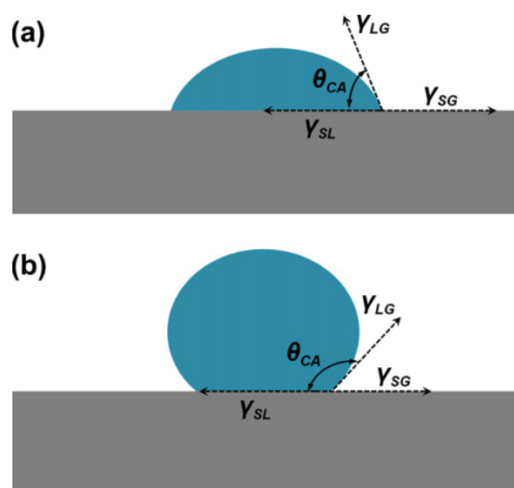


Figura 26 - Método da gota sésil **(a)** numa superfície com boa hidrofilicidade ou **(b)** boa hidrofobicidade. θ_{CA} é o ângulo de contato do líquido e γ_{SL} , γ_{SG} e γ_{LG} representam as interfaces sólido/líquido, sólido/gás e líquido/gás, respetivamente.

II. Resultados e Discussão

Em resposta ao aumento da resistência a antibióticos por parte de microorganismos patogénicos, a aplicação de AMPs com um amplo espectro de atividade é recebida pela comunidade ciência e médica como uma possível solução capaz de reduzir este fenómeno. O desenvolvimento de soluções para a cicatrização de feridas cutâneas, com recurso a pensos antimicrobianos modificados com estas biomoléculas, tenta prevenir o aparecimento de infeções crónicas e ajudar ao normal funcionamento do processo de cicatrização. Entre os vários tipos de AMPs já descritos anteriormente, existe o Peptaibolin com uma estrutura carateristicamente helicoidal que tem sido alvo de estudos de relação estrutura-atividade com vista ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos antimicrobianos. Outros AMPs, possuem atividade promotora de cicatrização, contudo pouco se sabe sobre a sua contribuição antimicrobiana, como é o caso do Tiger 17.

O objetivo deste trabalho de investigação foi a síntese do Peptaibolin e Tiger 17, através de metodologias de síntese em fase sólida assistida por micro-ondas, respetiva caracterização estrutural e avaliação da sua capacidade antimicrobiana. Simultaneamente, foram produzidas matrizes poliméricas nanofibrosas com recurso à técnica de eletrospinning com o objetivo de imobilizar as biomoléculas desenvolvidas e criar assim potenciais veículos para uma ação antimicrobiana local e sustentável (libertação controlada). Por forma a verificar as suas propriedades físicas e químicas técnicas de caracterização avançada foram utilizadas: ATR-FTIR, TGA, DSC, ângulo de contacto e energia de superfície, determinação indireta de porosidade e hidratação (*swelling*), SEM.

1. Síntese de Péptidos em Fase Sólida Assistida por Micro-ondas

1.1 Síntese do péptido Peptaibolin (Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Phol)

O Peptaibolin foi sintetizado de acordo com a estratégia MW-SPPS, usando o grupo Fmoc como grupo N-protetor e uma resina de Wang como suporte sólido. Apesar deste péptido ser amplamente estudado, cujos mecanismos de ação e caracterização estrutural foram já comprovados a busca por diferentes combinações de reagentes de acoplamento nunca foi muito abordada, assim como a comprovação da sua eficácia antimicrobiana.

Duas combinações de reagentes de acoplamento foram testadas: DIC/HOBt e DIC/Oxima. As condições de reação foram mantidas iguais para as duas sínteses, tendo-se modificando apenas o nucleófilo auxiliar. As reações de acoplamento decorreram sob irradiação micro-ondas durante 5 minutos a uma potência de 25 W a 75°C usando uma mistura de acoplamento constituída pelo Fmoc-aminoácido, DIC e HOBt ou Oxima em DMF seca com 5 eq. de excesso relativamente ao *loading* da resina. As reações de desproteção do grupo Fmoc ocorreram também sob irradiação micro-ondas a uma potência de 50 W a 75°C, em dois ciclos, um de 30 segundos e outro de 3 minutos com uma solução de 20% de piperidina em DMF. Assim, partindo de 1.1 g de resina Fmoc-Phe-Wang com um grau de funcionalização de 0,51 mmol/g, acoplou-se sequencialmente os aminoácidos Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Aib-OH e Fmoc-Leu-OH. Após um processo de N-acetilação, separou-se o péptido da resina usando condições redutoras para conseguir a redução do resíduo de Phe C-terminal ao álcool respetivo (Phol). Obteve-se um sólido branco, com igual caracterização estrutural, mas diferentes graus de pureza, e o rendimento de síntese foi calculado (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Comparação entre as duas sínteses do Peptaibolin, tendo em conta a combinação de reagentes de acoplamento.

Reagentes de acoplamento	Massa (g)	Rendimento (%)	Tempos de Retenção (min)
DIC/HOBt	0,1222	40,6	6,232
DIC/Oxima	0,1520	50,0	6,942

A combinação dos reagentes de acoplamento DIC/Oxima apresentou maior quantidade de massa, refletindo-se num maior rendimento. Como seria de esperar, tendo em conta que o processo de síntese dos dois péptidos foi muito similar, a caracterização estrutural por ^1H RMN revelou apenas mínimas diferenças, tendo-se confirmado que todos os aminoácidos estariam acoplados, como foi possível visualizar pelos espectros obtidos (**Figura 27**) (**Figura 28**).

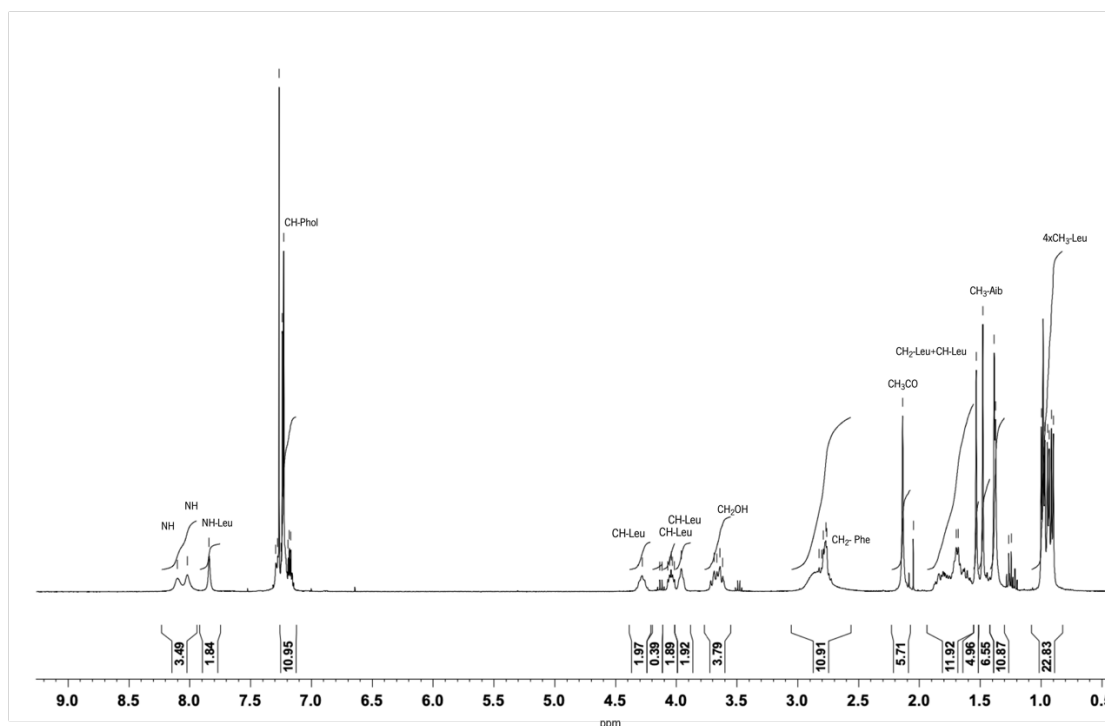


Figura 27 - Espectro de ^1H RMN do Peptaibolin com a combinação de reagentes de acoplamento DIC/HOBt.

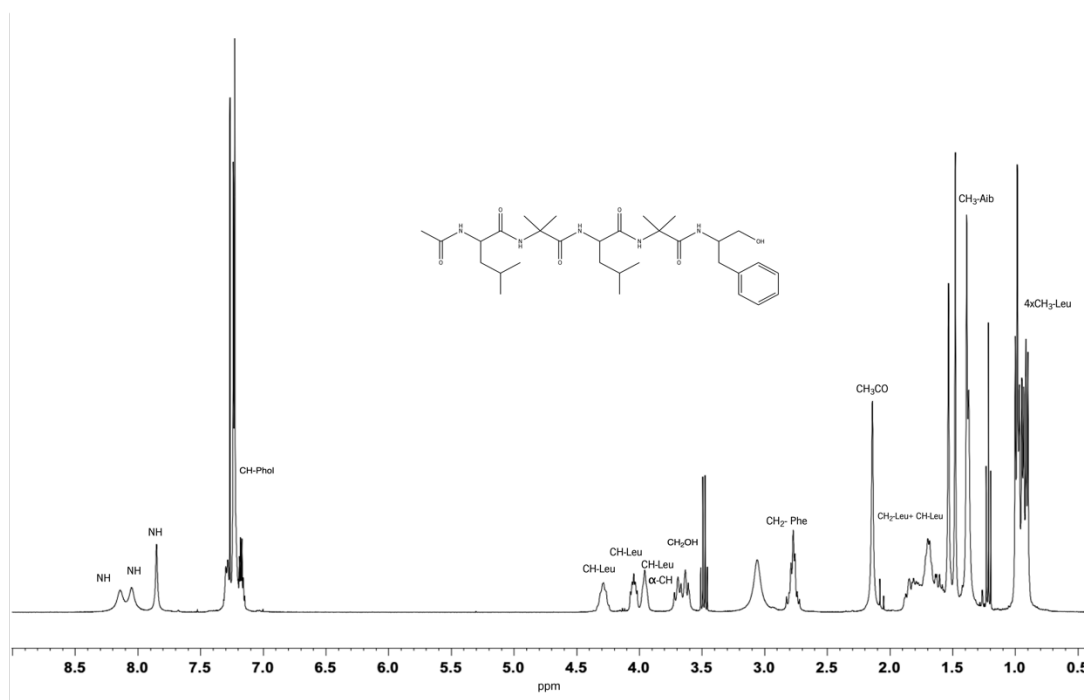


Figura 28 - Espectro de ^1H RMN do Peptaibolin com a combinação de reagentes de acoplamento DIC/Oxima.

Visto que este é um péptido já conhecido, não foi realizada a caracterização por ^{13}C RMN e bidimensional. Para confirmação da pureza, recorreu-se à técnica de HPLC analítico utilizando ACN/ H_2O (1:1) + 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) como eluente, um fluxo de 1mL/h a um comprimento de onda de 215 nm, tendo-se verificado que o péptido obtido com a combinação de reagentes de acoplamento DIC/Oxima apresentava um grau de pureza mais elevado (**Figura 29**).

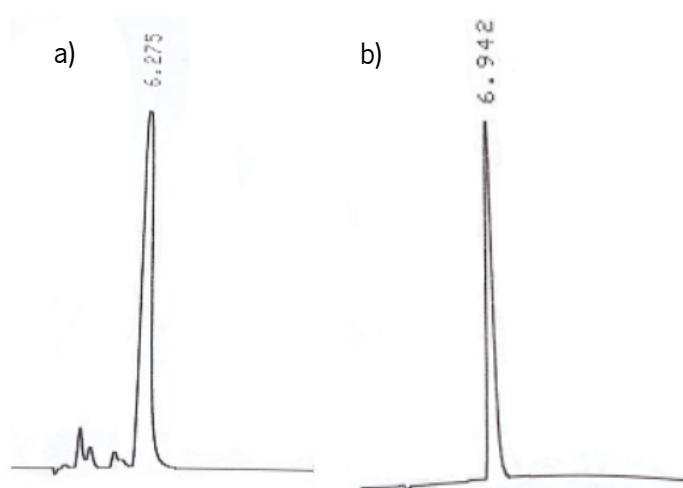


Figura 29 - Picos obtidos por HPLC analítico do Peptaibolin. a) Combinação DIC/HOBt e b) Combinação DIC/Oxima.

Atualmente, há uma variedade de reagentes de acoplamento comercialmente disponíveis a partir dos carbodiamidas mais tradicionais, como DIC, que é mais frequentemente usado em SPPS para auxiliar nucleófilos como o HOBt. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a combinação DIC/Oxima, além de manter as características do Peptaibolin, proporciona melhores rendimentos com maior nível de pureza. Além disso, essa alternativa é ainda mais positiva porque substitui o tradicional HOBt, que possui características explosivas.

1.1.1 Estudo da Solubilidade

A solubilidade de um AMP é um fator importante e é crucial que o péptido seja solúvel em solventes adequados, não tóxicos e compatíveis com testes biológicos, incluindo antimicrobianos. Os testes de solubilidade foram realizados apenas no péptido sintetizado com DIC/Oxima, principalmente por causa da maior quantidade obtida. O solvente mais adequado deverá ser 100% H₂O devido às suas propriedades inertes, certificando-se de que não interfere nos resultados antibacterianos. No entanto, por ser um péptido pequeno e de características apolares, esperava-se que a sua dissolução em H₂O fosse um obstáculo.

Foram testados diversos solventes (**Tabela 7**) e concluiu-se que o péptido não era solúvel em água, sendo necessária a adição de uma percentagem de solvente orgânico ou mesmo conduzir a dissolução do péptido num volume total de solvente orgânico, tornando-o impróprio para aplicações biomédicas.

Tabela 7 - Solventes testados e o seu efeito em contacto com o Peptaibolin num volume total de 1 mL.

Solventes Testados (V _T = 1 mL)	Efeito de dissolução
10% DMSO/H ₂ O	Solúvel
ACN/H ₂ O	Dissolve apenas com grandes volumes de ACN
NaCl/H ₂ O	Não dissolve
Ácido acético/H ₂ O	Precipitação do péptido
PBS	Não dissolve
10% HCl/H ₂ O	Não dissolve
100% HCL	Não dissolve
100% H ₂ O	Não dissolve
10% CDCl ₃	Dissolve parcialmente

1.1.2 Concentração Mínima Inibitória do Peptaibolin

Após as conclusões retiradas do estudo da solubilidade do Peptaibolin, seria expectável que a dissolução do péptido para utilização em testes microbianos afetasse a possível atividade antimicrobiana revelada. Estes testes iniciaram-se pelas avaliações de MIC, que foram conduzidas usando o solvente 10% dimetilsulfóxido (DMSO) em água. Este foi considerado o solvente mais adequado para o péptido e, como tal, foi aplicado em contato com a bactéria. Foram utilizadas as bactérias teste: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*. Após 24 h de incubação, foram detetados precipitados na maioria dos poços concentrados de Peptaibolin, nomeadamente aqueles que continham 4 mg/mL da solução de péptido. A par da precipitação do péptido, também as bactérias cresceram durante o período de incubação, demonstrando a sua resistência à atividade do AMP. Os dados não relataram nenhuma ação contra os microrganismos selecionados, o que significa que se fosse possível encontrar um MIC para esse péptido, ele seria superior a 4 mg/mL. Esse valor, em termos de aplicações biomédicas ou farmacológicas, é considerado muito elevado e, como tal, não adequado para uma produção economicamente sustentável.

Assim, apesar do sucesso da síntese peptídica e a sua confirmação estrutural, este não demonstrou qualquer atividade antimicrobiana tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas.

Após estas observações, o Peptaibolin foi desconsiderado e tendo em conta que o péptido não apresentava as melhores características quanto à solubilidade, afetando diretamente a sua possível atividade antimicrobiana, optou-se por delinear outra estratégia tendo sido escolhido outro tipo de AMP, com potencial tanto na atividade antimicrobiana como cicatrizadora.

1.2 Síntese do péptido Tiger 17 c[Trp-Cys-(Lys-Pro)₃-Arg-Cys-His-NH₂]

O AMP Tiger 17 ressurgiu nos últimos anos graças à sua potencialidade como promotor de cicatrização. Pela sua investigação ser ainda recente não existem registos da sua síntese em ambiente laboratorial académico, o que significa que todo o processo de síntese peptídica e caracterização necessitou de otimização.

Utilizou-se o método de síntese peptídica MW-SPPS pela sua comodidade, rapidez e maior probabilidade de obtenção de valores mais elevados de massa e rendimento, tendo em conta que

é um péptido constituído por 11 resíduos de aminoácido. As reações de desproteção do grupo Fmoc ocorreram sob irradiação micro-ondas a uma potência de 50 W a 75°C, em dois ciclos, um de 30 segundos e outro de 3 minutos com uma solução de 20% de piperidina em DMF. As reações de acoplamento decorreram também sob irradiação micro-ondas durante 5 minutos a uma potência de 25 W a 75°C usando uma mistura de acoplamento constituída pelo Fmoc-aminoácido, DIC e Oxima em DMF seca com 6; 7,5 e 10 eq. de excesso (dependendo do aminoácido), relativamente ao *loading* da resina. A resina escolhida foi Fmoc-Rink-Amide com um grau de funcionalização de 0,53 mmol/g. A escolha desta resina incide no facto de possuir já incorporado o *linker* Rink, que permite a obtenção de péptidos na forma amida C-terminal. Acoplaram-se sequencialmente os aminoácidos deste modo: Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, 3x(Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH), Fmoc-Cys(Trt)-OH e por fim, Fmoc-Trp(Boc)-OH.

Foram efetuadas duas sínteses do Tiger 17 nas mesmas condições, tendo variado apenas o processo de clivagem do péptido da resina.

1.2.1 Clivagem do Tiger 17 sem recorrer a *scavenger*

A mistura de clivagem seleccionada na maioria da literatura onde consta o tipo de resina utilizada é TFA:H₂O numa proporção 95:5. Geralmente, é referida a necessidade de adição de um *scavenger* apropriado para péptidos que contenham cisteínas, sendo um elemento auxiliador à clivagem do péptido e impedindo a formação de pontes ditiol.¹¹⁷ Apesar disso, foi delineada uma estratégia de clivagem sem recorrer a *scavengers* para também ser testado até que ponto a simples mistura TFA:H₂O seria suficiente para uma separação do péptido da resina e dos grupos protetores laterais.

Numa primeira fase trabalhou-se apenas com metade do péptido na resina após o acoplamento do último aminoácido, de forma a preservar algum péptido caso o procedimento de clivagem testado não fosse o ideal. Foi submetido a tratamento com TFA:H₂O (95:5) à temperatura ambiente durante 2 h. Ao fim desse tempo, a resina foi filtrada e o péptido precipitado do filtrado por adição de éter etílico. Atendendo a que a massa de péptido obtida correspondia a um rendimento muito baixo (Tabela 8- Tiger 17 (a)) a resina foi novamente colocada em nova mistura de clivagem por mais 2 h (Tabela 8- Tiger 17 (b)).

Tabela 8 - Condições aplicadas e resultados obtidos na 1ª síntese de Tiger 17 usando TFA:H₂O (95:5) na clivagem do péptido da resina.

	1ª Metade da Resina		2ª Metade da Resina	
	Tiger 17 (a)	Tiger 17 (b)	Tiger 17 (c)	Tiger 17 (d)
Tempo da 1ª exposição (h)	2	-	4	-
Tempo da 2ª exposição (h)	-	2	-	<i>overnight</i>
Massa (g)	0,0399	0,4795	0,0232	0,1039
Rendimento (%)	18,23 ^a	219,05 ^b	10,60 ^a	47,46 ^a

^a Rendimento após ciclicação.^b Rendimento sem ciclicação.

De acordo com os dados apresentados na **Tabela 8**, após a segunda exposição à mistura de clivagem obteve-se uma grande quantidade de sólido, ultrapassando drasticamente o valor de rendimento máximo. Uma vez que entre a primeira tentativa de separação e a segunda passou praticamente uma semana, prevê-se que o sólido em excesso esteja relacionado com a degradação da resina. Para confirmação destas suposições, recorreu-se a um teste de cromatografia em camada fina (TLC) onde foi possível visualizar várias manchas, confirmando a ideia de que o segundo precipitado continha vários componentes. Apesar deste resultado, o ¹H RMN de ambos os precipitados não apresentava diferenças significativas.

Optou-se por avançar com a separação do péptido da segunda metade da resina usando a mesma mistura de clivagem, mas aumentando o tempo de clivagem para 4 h (Tabela 8- Tiger 17 (c)), seguida de reação *overnight* com nova mistura de clivagem (Tabela 8- Tiger 17 (d)).

Como os ¹H RMN dos sólidos obtidos apresentavam sinais que poderiam corresponder aos aminoácidos esperados (exceto o Tiger 17 (d)) decidiu-se colocar os sólidos Tiger 17 (a) e (c) numa mistura de H₂O:ácido acético (AcOH) 95:5, geralmente usada para promover a formação das ligações ditiole entre as cisteínas.¹¹⁸ Após 48 h em agitação a mistura foi liofilizada para remoção de solvente e o sólido obtido analisado por HPLC.

1.2.2 Clivagem do Tiger 17 com recurso a *scavenger*

Em face dos resultados obtidos o péptido foi sintetizado novamente e foi testada a clivagem com uma mistura contendo um *scavenger*. O *scavenger* selecionado foi o Triisopropil silano (TIPS) na proporção TFA:TIPS:H₂O (95:2,5:2,5).

Desta vez, foi utilizada a totalidade da resina de uma única vez para o procedimento de clivagem. Como na primeira tentativa de síntese se verificou que a exposição da resina à mistura de clivagem por períodos longos não melhorava os resultados, optou-se por submeter a resina a 2 h de exposição à mistura de clivagem seguida de 2 h com nova mistura ambas sob atmosfera de nitrogénio (requisito na utilização deste *scavenger*). O sólido obtido por precipitação com éter etílico foi submetido às condições de formação da ponte ditiol, anteriormente descritas. Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Condições aplicadas e resultados obtidos na 2^a síntese de Tiger 17 usando TFA:TIPS:H₂O (95:2,5:2,5) na clivagem do péptido da resina.

2^a Síntese		
	Tiger 17 (e)	Tiger 17 (f)
Tempo da 1^a exposição (h)	2	-
Tempo da 2^a exposição (h)	-	2
Massa (g)	0,1459	0,1777g
Rendimento (%)	40,0 ^a	48,71 ^a

^a Rendimento após ciclicização

Na segunda síntese a quantidade de sólido obtido estava mais dentro daquilo que era expectável, permitindo a obtenção de melhores rendimentos. Mais uma vez, o espectro de ¹H RMN (**Figura 30**) mostrou-se bastante complexo, o que não foi surpresa visto que o péptido é composto por 11 aminoácidos e possivelmente deverá estar impuro. Existem alguns sinais que teoricamente correspondem a elementos presentes no péptido (zona aromática e zona alifática), porém dada a imensidão de sinais e a falta de uma linha de base mais estável, não foi possível identificar sinais que nos permitisse distinguir o que poderia ser o péptido ou contaminações.

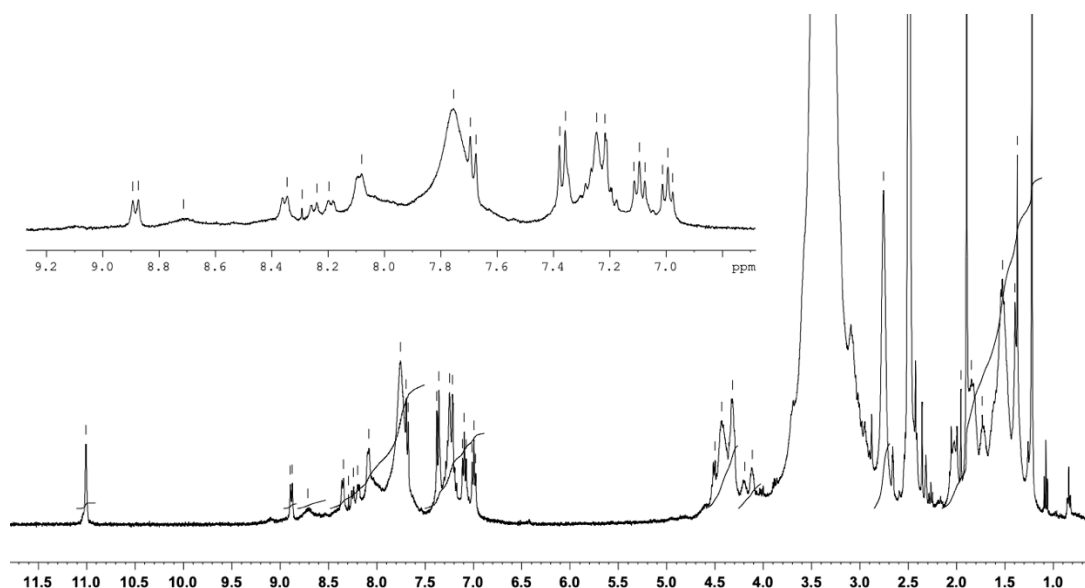


Figura 30 - Espectro de ^1H RMN do Tiger 17 (f) com a combinação de reagentes de acoplamento DIC/Oxima.

1.2.3 Análise por HPLC

Foi usada uma coluna RP-18 e testada uma gama de eluentes, com polaridades maiores e menores. Numa corrida de HPLC, o desejado é a obtenção de períodos de retenção que não sejam muito curtos, uma vez que a obtenção de tempos de retenção curtos significa que o analito correu apenas o “tempo de circuito” do equipamento não sofrendo qualquer separação na coluna.

Foram testadas diversas misturas eluentes de diferentes polaridades variando entre ACN/ H_2O (1:9) e ACN 100% com 0,1% de TFA. Este estudo foi necessário porque na maior parte das misturas testadas o tempo de retenção era muito pequeno indicando que muito provavelmente estava a ser eluído tudo ao mesmo tempo da coluna, sem qualquer retenção. Na **Figura 31** estão apresentados os perfis cromatográficos obtidos com as misturas eluentes que apresentaram maior tempo de retenção.

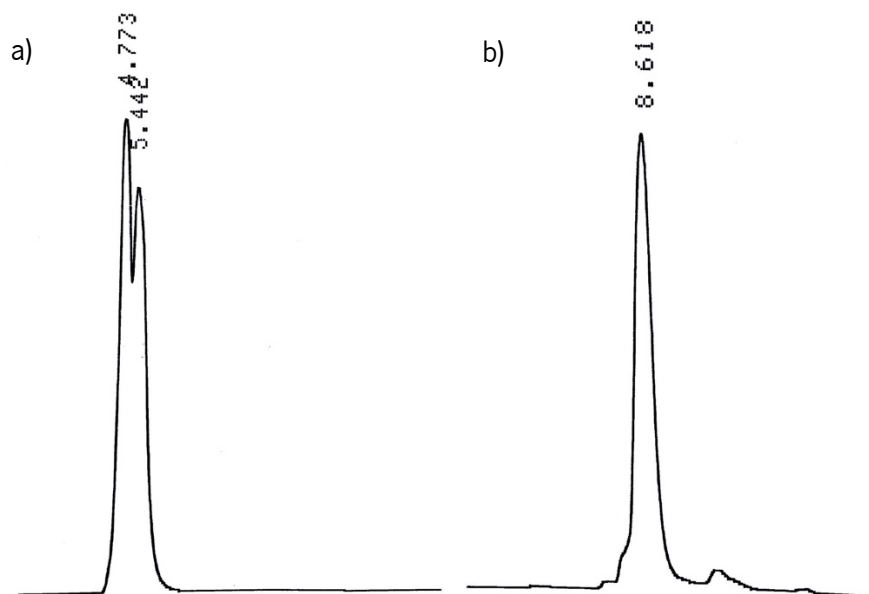


Figura 31 - Picos obtidos por HPLC analítico do Tiger 17. a) Tiger 17 (f) num eluente ACN/H₂O (1:1)+0,1% TFA e b) Tiger 17 (f) num eluente ACN/H₂O (1:3)+0,1% TFA. Para ambas as injeções foram utilizados fluxos de 0,4 mL/h e comprimento de onda de 215 nm.

Os resultados de HPLC com a mistura ACN/H₂O (1:1)+0,1% TFA confirmaram o resultado dos espectros de ¹H RMN, o péptido está impuro.

Para a confirmação da existência efetiva do péptido nos sólidos obtidos, dever-se-ia recorrer à técnica de espectroscopia de massa, mas até à data de entrega desta dissertação, os resultados não foram conhecidos e, consequentemente, o péptido não foi submetido a testes microbiológicos para avaliação da sua atividade antimicrobiana. Em alternativa avaliou-se a atividade antimicrobiana do péptido Tiger 17 comercial, por forma a estabelecer as características bases do péptido no combate a microrganismos, nunca antes verificadas.

1.2.4 Concentração Mínima Inibitória do Tiger 17

O MIC do Tiger 17, nomeadamente da sua formulação comercial (Tiger 17C) foi estabelecido contra a bactéria *S. aureus*, uma das mais prevalentes e difíceis de eliminar em infeções cutâneas. Após 24 h de incubação, o MIC foi determinado em 250 µg/mL. Este é o primeiro relatório sobre a capacidade do Tiger 17 de prevenir a ação microbiana. Considerando que o seu efeito foi mais importante é registado na indução da regeneração de tecidos e cicatrização de feridas crónicas, a adição de recursos antimicrobianos à sua ação é extremamente promissora em engenharia de tecidos e aplicações biomédicas, particularmente na cicatrização de feridas.

2. Produção de Nanofibras via Eletrospinning

Após todo o processo de síntese peptídica e caracterização, e tendo em vista a aplicação no tratamento de feridas cutâneas, decidiu-se aliar a química analítica à área têxtil, nomeadamente à produção de filmes poliméricos nanofibrosos. Considerando os dados anteriores, apenas o péptido Tiger 17 foi considerado para imobilização nas fibras. Contudo, até chegar a essa etapa, foi necessária uma extensa otimização tanto da solução polimérica, como dos parâmetros de processamento requeridos para a produção de nanofibras pela técnica de eletrospinning.

2.1 Otimização das Soluções Poliméricas

Para a produção de filmes nanofibrosos por eletrospinning é exigido que a solução polimérica possua um rácio apropriado, nomeadamente entre o CA e o PCL, que ambos os polímeros sejam dissolvidos em solventes compatíveis, e que a viscosidade, a tensão superficial e a condutividade sejam favoráveis. Previamente ao início deste trabalho, sabíamos que a relação entre os dois polímeros escolhidos poderia ser um obstáculo e que uma solução polimérica envolvendo os dois polímeros poderia ser “*não eletrospinável*”. Para avaliar todas as vertentes, estudou-se uma gama de soluções poliméricas com diferentes rácios de PCL e CA em diferentes solventes. Apesar de saber que o PCL produziria nanofibras mais facilmente, para a aplicação biomédica seria de interesse possuímos um maior rácio de CA, visto que é o CA que promove uma maior adesão celular. No entanto, um rácio superior de PCL pode fornecer melhores propriedades mecânicas às nanofibras, característica igualmente importante tendo em conta a aplicação em meios fisiológicos.

Para que a obtenção de fibras seja alcançada, não basta que os polímeros sejam os ideais, é também necessário que estes estejam dissolvidos em solventes ideais. Numa primeira fase, os solventes utilizados eram o ácido acético/acetona (para dissolver o PCL) e ácido acético (para dissolver o CA). Porém, utilizando estes solventes, era possível visualizar ao MO e SEM a presença de agregados e não de fibras. Isto pode dever-se ao facto de o ácido acético (solvente utilizado nos dois polímeros), apesar de possuir um bom efeito de dissolução tanto para o PCL como o CA, formar gotículas ao sair da agulha de eletrospinning e, portanto, favorecer a produção de agregados de solvente e não de fibras. Pela literatura, um dos solventes mais adequados para o PCL seria o clorofórmio dado que dissolve em perfeitas condições o PCL e, para além disso sempre

que foi utilizado, a obtenção de fibras foi geral.¹¹⁹ Já em relação ao CA, o melhor solvente é a acetona graças ao seu poder de dissolução para este polímero. Infelizmente, este solvente graças à sua elevada volatilidade não pode ser usado isoladamente, sendo necessário recorrer a uma mistura de solventes.¹²⁰ Para esta mistura, optou-se pela DMF, um solvente comum e que em estudos anteriores, provou que em combinação com alguns polímeros (como PCL e CA) favorece a formação de fibras uniformes.

Assim, testaram-se quinze combinações poliméricas tendo-se chegado à conclusão que a solução PCL a 14%wt em CDCl_3 /DMF era a ideia, e que conforme se aumentava a % do PCL na mistura PCL/CA fibras mais regulares eram obtidas, tendo-se chegado à conclusão de que PCL/CA 14%:10%wt (3:1) em acetona/DMF (para o CA) e CDCl_3 /DMF (para o PCL) era a melhor opção. Optou-se por produzir filmes utilizando as duas soluções de forma a que as fibras PCL 14%wt em CDCl_3 /DMF servissem como controlo. Fibras exclusivamente de CA não foram passíveis de processar devido à instabilidade do feixe elétrico e à incapacidade de produzir fibras de modo contínuo e sem defeitos.

2.2 Parâmetros de Processamento

Os parâmetros mais importantes para o eletrospinning são: o fluxo, a voltagem aplicada, a altura ao coletor e o diâmetro da agulha utilizada. Ao testar ambas as soluções poliméricas, todos esses parâmetros foram variados, à exceção da agulha, que se manteve com um diâmetro de 18 gauge (G). Ao fazer variar as condições de eletrospinning é preciso encontrar um equilíbrio entre todos os fatores e, muitas vezes, um feixe estável não significa que uma nanofibra esteja a ser produzida.

Para a solução polimérica de PCL/CA 14%:10%wt (3:1), as condições otimizadas foram: 24,7 kV, 3,2 mL/h e 21 cm. Já para a solução de PCL 14%wt em CDCl_3 /DMF foram: 12 kV, 0,7 mL/h e 17 cm.

3. Análise e Caracterização das Fibras

3.1 Visualização ao MO e SEM

Obtidos os filmes poliméricos procedeu-se à sua caracterização física e química. A prioridade inicial era avaliar que de facto a obtenção de nanofibras foi concretizada, recorrendo-se para tal a

equipamentos de microscopia. Todo o processo de otimização da solução polimérica e dos parâmetros de processamento referidos anteriormente foi acompanhada pela análise por MO no qual foi possível avaliar a existência de fibras ou não, utilizando lentes (objetiva mais ocular) com uma ampliação de até 1000x. Como visualizado na **Figura 32**, as soluções poliméricas com maior teor polimérico de CA apresentaram em todas as combinações a presença de agregados.

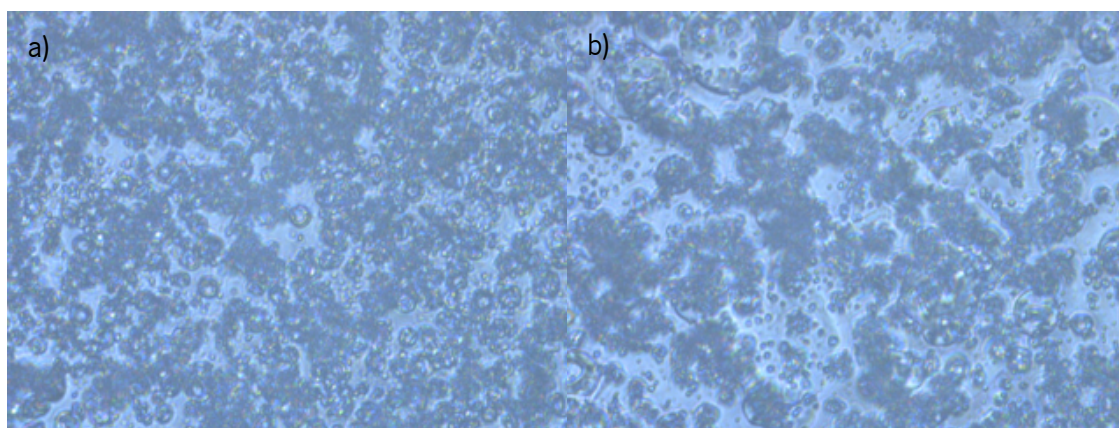


Figura 32 – Imagens obtidas por microscopia ótica. **a)** PCL/CA 14%:10%wt (1:3) com condições de: 25 kV, 0,8 mL/h, 18 cm e **b)** PCL/CA 14%:10%wt (1:3) com condições de: 29 kV, 0,8 mL/h, 17 cm.

Após uma mudança de estratégia e com recurso a diferentes condições de otimização, verificou-se que, de igual forma, as soluções poliméricas com maior conteúdo de CA, testando soluções com rácios equilibrados (1:1) de CA e PCL e aumentando o peso molecular de PCL para 80.000, mantinham a presença de agregados e não fibras (**Figura 33**).

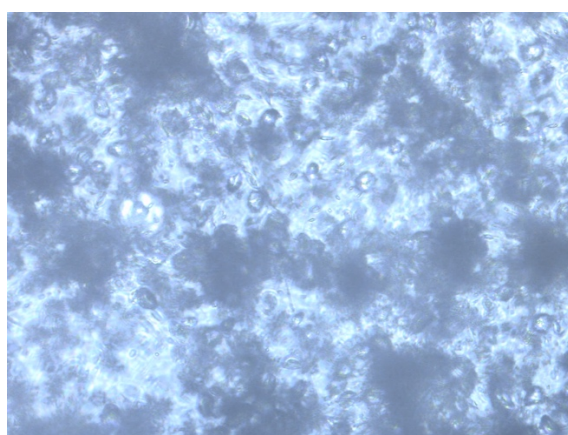


Figura 33 - Imagens obtidas por microscopia ótica de uma solução polimérica PCL/CA 14%:10%wt (1:1) com condições de: 25 kV, 2,5 mL/h, 18 cm.

Por fim, aquando analisadas as soluções poliméricas que posteriormente foram consideradas ideais, PCL/CA 14%:10%wt (3:1) em 24,7 kV, 3,2 mL/h e 21 cm e PCL 14%wt em CDCl_3/DMF em 12 kV, 0,7 mL/h e 17 cm, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios sendo possível visualizar a presença de fibras mesmo em MO (**Figura 34**).

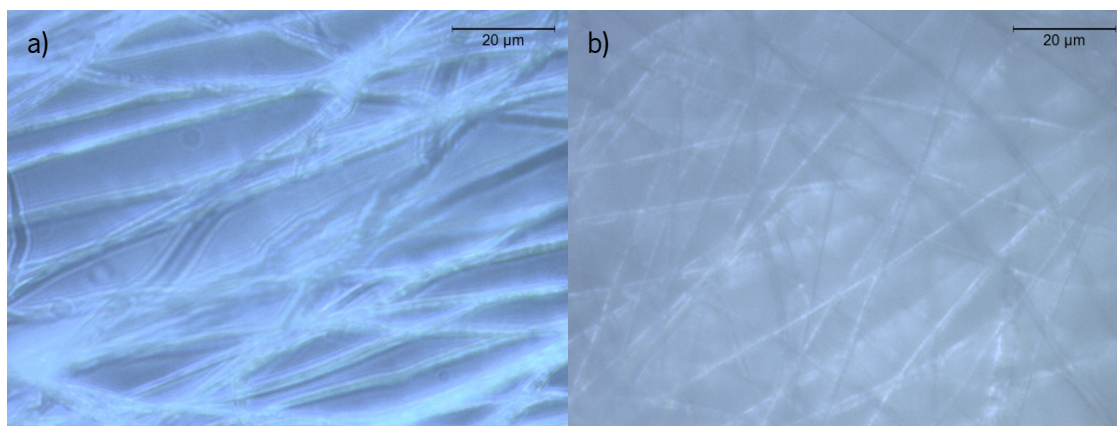


Figura 34 - Imagens obtidas por microscopia ótica de uma solução polimérica (a) PCL 14% e (b) PCL/CA 14% | 10% (3:1).

Após confirmação por MO, os mesmos filmes foram analisados através de SEM para verificar a morfologia e os diâmetros das fibras. Para a obtenção dos diâmetros das fibras recorreu-se a micrografias de uma ampliação de 10.000x das quais se fez uma medida de 100 diâmetros de cada imagem. Por análise das imagens e gráficos de distribuição de diâmetros da **Figura 35**, o PCL isolado formou fibras com maiores diâmetros, porém, era esperado que a distribuição de diâmetros fosse o mais uniforme possível. Tal não aconteceu visto que o desvio padrão obtido representa um valor bastante elevado. Esse acontecimento pode justificar-se por diversos fatores da natureza química do polímero como a possível ocorrência de interações químicas e electroestáticas com o solvente.

Analisando os resultados obtidos em (b), retirados da combinação polimérica de PCL/CA, pela imagem SEM é notória a presença de fibras com diâmetros elevados e outras com diâmetros bastante menores. A interação entre o CA e PCL através de ligações de hidrogénio é estabelecida entre o grupo hidroxilo do CA e o grupo carbonilo do PCL. No entanto, como o desvio padrão tem um valor elevado isso sugere que há apenas uma parcial miscibilidade entre o CA e o PCL.

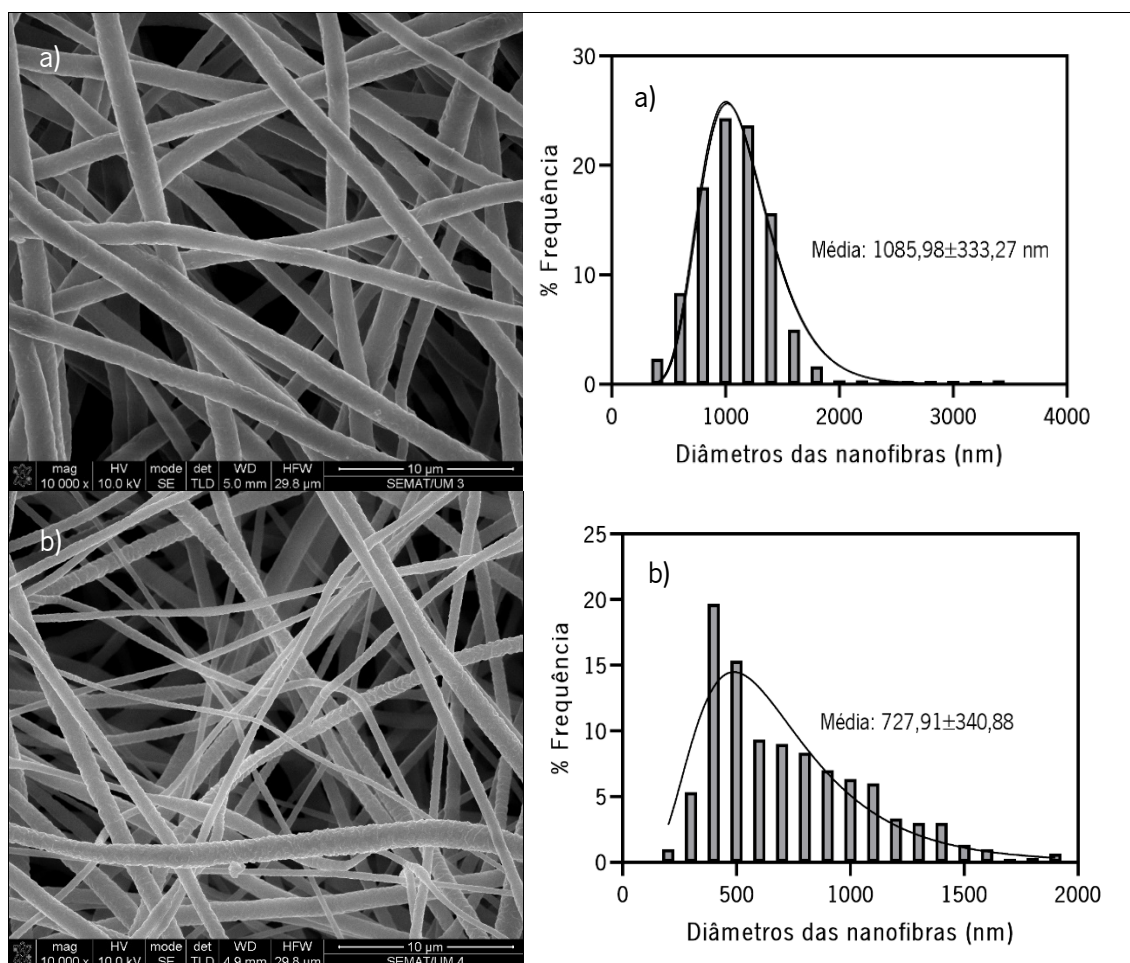


Figura 35 - Imagens de SEM com uma ampliação de 10.000x e respetivo gráfico de distribuição de diâmetros. Em **a)** PCL 14%wt em CDCl₃/DMF em condições de 12 kV, 0,7 mL/h e 17 cm e **b)** PCL/CA 14%:10%wt (3:1) em condições de 24,7 kV, 3,2 mL/h e 21 cm.

Fibras com diâmetros menores são vantajosas para este tipo de aplicações biomédicas visto que promovem uma maior adesão celular e aumentam a porosidade dos filmes poliméricos, resultando numa maior permeabilidade ao oxigénio e vapor de água.

3.2 Caracterização por ATR-FTIR

A composição química das fibras formadas pelo polímero PCL e pela mistura PCL/CA foi avaliada por espectros de ATR-FTIR. Os dois espectros PCL e PCL/CA são mostrados na **Figura 36**. Pela literatura, a estrutura do PCL é caracterizada por bandas de absorção típicas a 2948 e 2868 cm⁻¹ correspondendo ao grupo químico CH₂, a 1725 cm⁻¹ do grupo C=O e a 1246 e 1166 cm⁻¹ do grupo C–O–C. Por comparação, à primeira vista os dois espectros obtidos (PCL isolado e mistura

PCL/CA) aparentam ser iguais apenas com % de transmitância mais intensas em alguns picos característicos. Esses picos são a 1369 cm^{-1} e 1236 cm^{-1} do grupo CH_3 , 1167 cm^{-1} correspondendo às vibrações simétricas de alongamento $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (maior presença no PCL) e a 1048 cm^{-1} do grupo funcional $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (maior presença no CA). O pico 1728 cm^{-1} característico do grupo $\text{C}=\text{O}$ (presente em ambos os polímeros) não apresenta qualquer diferença de intensidade. Isto pode dever-se ao estabelecimento de ligações entre os polímeros pelo grupo carbonilo do PCL e o grupo hidroxilo de CA.

Era já esperado que os espectros não fossem muito variáveis tendo em conta que mesmo na mistura polimérica, o rácio de PCL ultrapassa em três vezes o do CA (3:1).

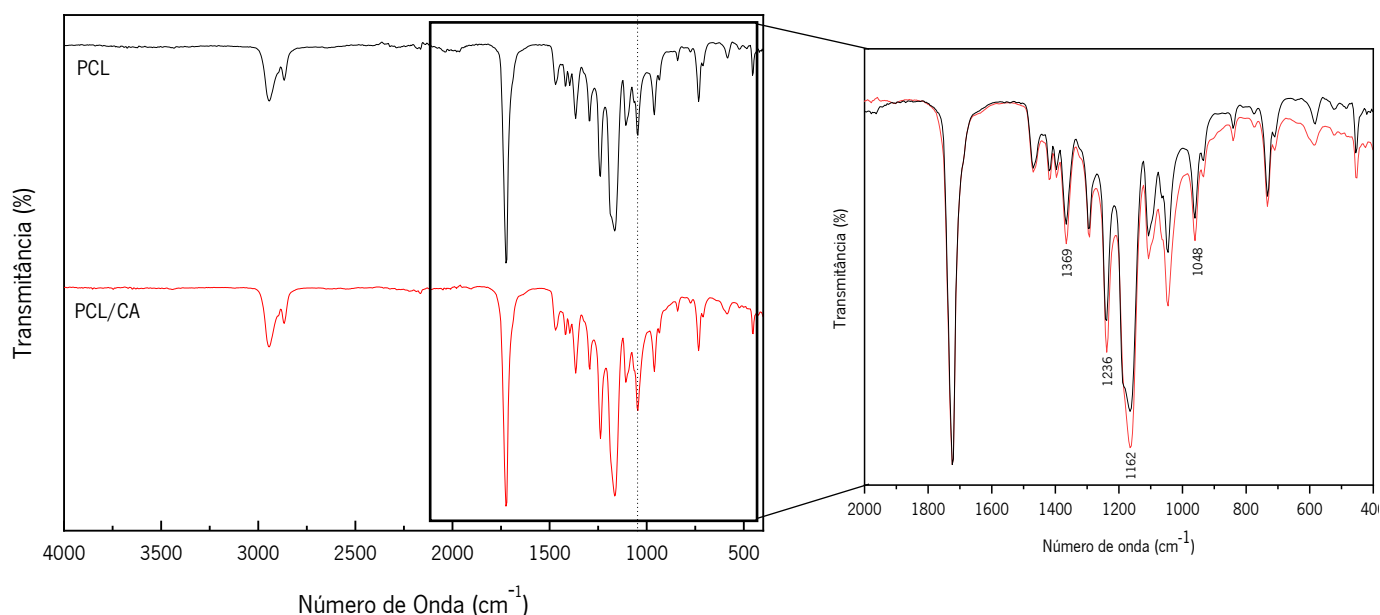


Figura 36 - Espectro de ATR-FTIR obtido para os dois filmes poliméricos de PCL e PCL/CA.

3.3 Caracterização por TGA

A estabilidade térmica dos filmes poliméricos foi determinada pela técnica de TGA (**Figura 37**). Considerando que a mistura polimérica de PCL/CA era composta de 75% de PCL e apenas 25% de CA era esperado que o comportamento térmico deste filme fosse, mais uma vez, similar ao do filme contendo apenas PCL. No entanto, com a presença do CA, é notório que a amostra possui uma maior degradação e que esta se inicia a menores temperaturas (290°C) do que quando temos apenas PCL (300°C). Conclui-se que a temperatura de decomposição térmica das

fibras PCL/CA foi diminuída em comparação com PCL puro. Tal é explicado pelas propriedades do PCL que apresentam uma maior resistência térmica e na presença de uma mistura dos dois polímeros, esta característica desvanece.

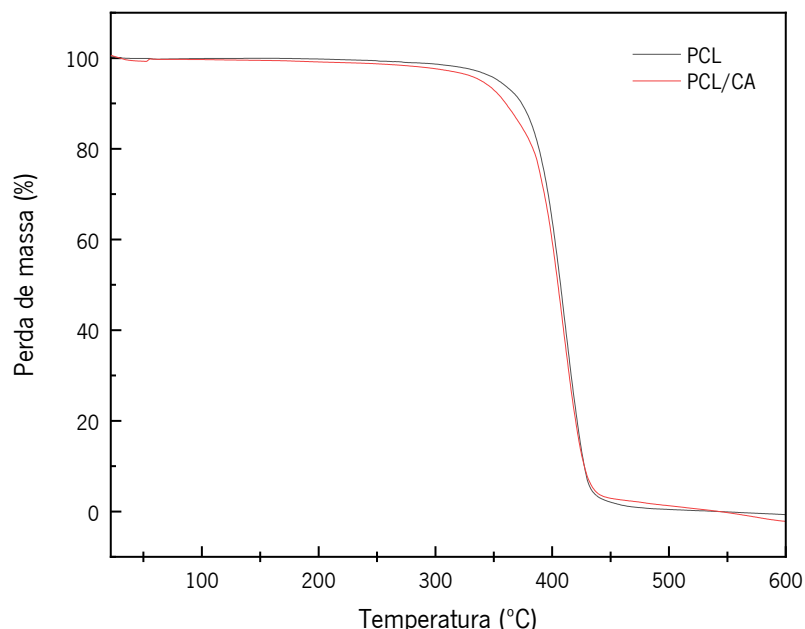


Figura 37 - Gráfico de TG de % perda de massa vs temperatura (°C) dos dois filmes poliméricos PCL e PCL/CA.

Pelo gráfico da **Figura 38**, a derivada do gráfico de perda de massa mostra a temperatura a que o polímero mais degradou, ou seja, qual foi o pico de perda de massa da amostra. Quanto à mistura, esta apresenta um “*shoulder*” entre uma gama de 320-372°C, mostrando que a essas temperaturas iniciou-se a degradação da amostra. O PCL puro teve o fenómeno de degradação ocorrido por volta dos 325°C. Ambos os termogramas revelam que a decomposição dos dois filmes se iniciou por volta dos 320°C. No entanto, o dTG revela que o PCL/CA começa a degradar-se com maior intensidade, revelando que a presença de CA reduz a resistência térmica. Estas observações corroboram as conclusões obtidas pelo gráfico do TGA.

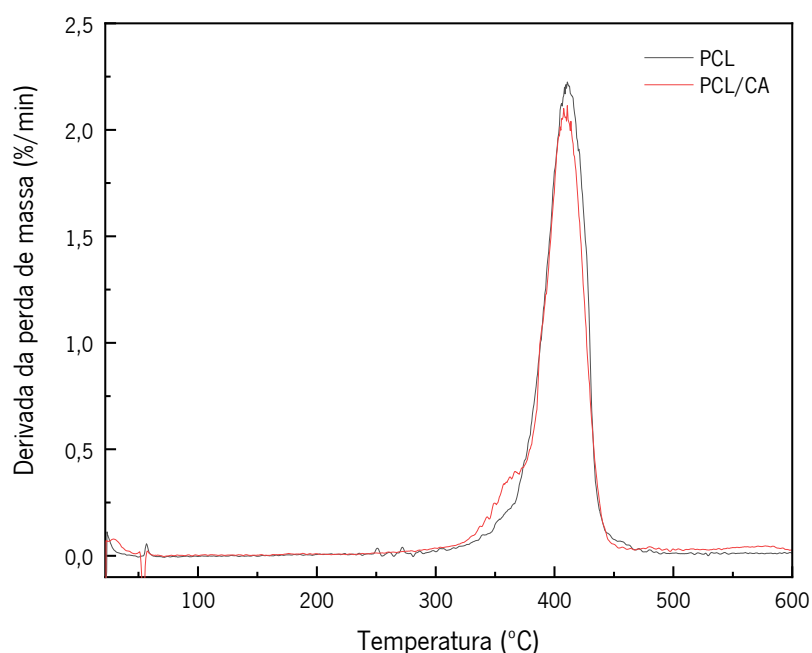


Figura 38 - Gráfico da derivada de TG (dTG) dos dois filmes poliméricos PCL e PCL/CA.

3.4 Caracterização por DSC

A técnica de DSC mede as transformações físicas e químicas que os filmes de PCL e PCL/CA sofrem quando submetidos a aquecimento. Termogramas DSC de ambos os filmes foram adquiridos entre 0 e 250°C (**Figura 39**). Para o filme de PCL, o primeiro pico endotérmico foi detetado numa temperatura entre 45 e 75°C e no filme de PCL/CA este fenómeno ocorreu num intervalo de temperatura de 50 e 75°C. Demonstrou-se que o pico endotérmico muda para regiões de temperatura mais altas com a adição do CA ao polímero PCL. Este pico refere-se à presença de moléculas de água ligadas aos polímeros, que podem advir da humidade do ar. Com a ligação do CA ao PCL, o número de grupos hidroxilo fica mais reduzido e consequentemente é registado um menor pico. Também na presença de CA, ocorre um segundo pico endotérmico muito ténue a uma temperatura aproximada de 200°C onde começa a existir alguma degradação das cadeias poliméricas do CA, nomeadamente as secundárias, tal como aconteceu em TGA.

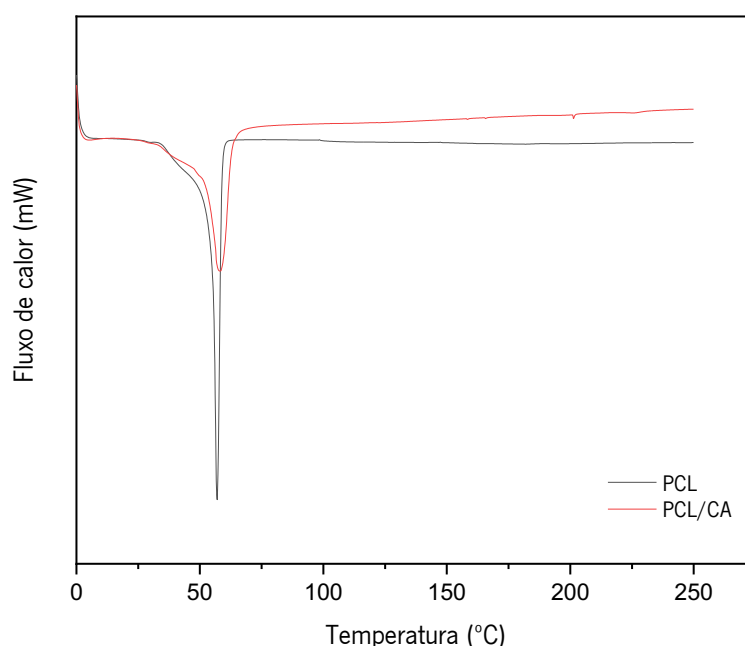


Figura 39 - Gráfico de DSC de fluxo de calor (mW) em função da temperatura (°C) numa gama de 0-250°C, dos dois filmes poliméricos PCL e PCL/CA.

3.5 Testes de *Swelling* e Porosidade

3.5.1 *Swelling*

O grau de hidratação ou *swelling* dos filmes poliméricos foi determinado medindo as variações de peso após 7 dias de imersão em fluido corporal simulado (SBF) a 37°C. Estudos prévios mostraram que a absorção de água ou meios fisiológicos altera a distribuição e as ligações químicas existentes nos filmes poliméricos, tornando-os hidratados e diminuindo a sua resistência mecânica.¹²¹ Os dados da **Tabela 10** mostram uma diminuição do grau de *swelling* quando o CA está presente. Tal não era esperado uma vez que o conteúdo em CA deveria ter um maior efeito de retenção de fluidos visto que torna os filmes poliméricos menos hidrofóbicos. Contudo, tal como foi observado no DSC, é provável que muitos dos seus grupos hidroxilo tenham ficado condicionados em combinações com o PCL ou protegidos por esse polímero. Deste modo não só foram perdidos grupos do PCL como do CA, reduzindo as ligações possível com as moléculas de água do meio.

Tabela 10 – Grau de swelling (%) dos filmes poliméricos de PCL e PCL/CA em contacto com 1 mL de SBF num período de 7 dias.

	<i>Grau de Swelling (%)</i>
PCL 14%wt	74,839
PCL/CA (3:1)	55,303

3.5.2 Porosidade

A porosidade é um fator importante na resistência mecânica de um filme polimérico. A determinação da porosidade dos filmes foi efetuada indiretamente através da imersão de filmes poliméricos em etanol (**Tabela 11**). O etanol é um solvente que não incha as fibras, não comprometendo a sua estrutura.¹²² Aqui, o conteúdo de CA desempenha um papel importante na definição da estrutura porosa do filme. Como tal, na presença de CA o filme polimérico torna-se menos compacto e mais suscetível a rutura, apresentado uma maior percentagem de porosidade. As observações feitas pelas análises SEM confirmam estes dados.

Tabela 11 – Porosidade (%) dos filmes poliméricos de PCL e PCL/CA em contacto com 1 mL de etanol por um período de 7 dias.

	Densidade (g/cm³)	Volume	Porosidade em Etanol (%)
PCL 14%	0,789	3,800	44,360
PCL/CA (3:1)		11,400	78,158

3.6 Avaliação do Ângulo de Contacto e Energia de Superfície

As medições do ângulo de contato das superfícies poliméricas de PCL e PCL/CA estão representadas na **Figura 40**. Os solventes testados foram H₂O (solvente polar), benzeno (apolar) e polietilenoglicol (PEG) (natureza polar e apolar). O filme polimérico de PCL, em contacto com a água (**a**) gera ângulos de contacto elevados, característica da sua natureza hidrofóbica. Ao mesmo tempo, também o filme polimérico de PCL/CA, no mesmo solvente, produz ângulos de contacto ainda mais elevados, confirmando que apesar da presença do CA, o filme manteve as suas características hidrofóbicas, o que também pode explicar os resultados do swelling e as

observações do DSC. As figuras designadas com **c)** e **e)** correspondem aos filmes poliméricos de PCL no solvente benzeno e PEG, respetivamente, onde é possível concluir que os ângulos de contato desta superfície são superiores aos ângulos de contacto do PCL/CA (**d)**, **f)**). Os valores de ângulo de contacto em PCL/CA, em solventes apolares, demonstra que a superfície apresenta um comportamento hidrofóbico, pelo que a adição de CA não contribuiu para uma melhor hidrofiliicidade da superfície polimérica.

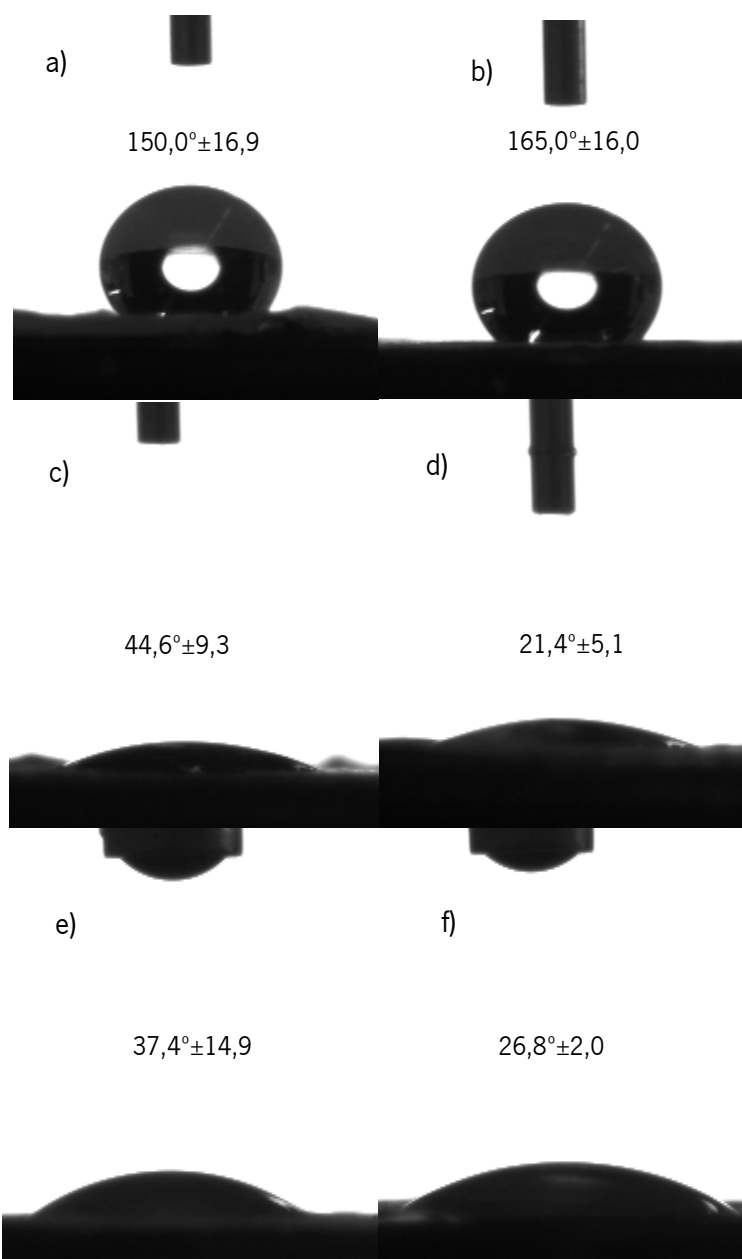


Figura 40 – Imagens retiradas do equipamento goniómetro e valores das médias dos ângulos de contacto para cada solvente testado. **a)** PCL em H₂O; **b)** PCL/CA em H₂O; **c)** PCL em benzeno; **d)** PCL/CA em benzeno; **e)** PCL em PEG; **f)** PCL/CA em PEG.

Obteve-se para o filme de PCL uma energia superficial total de 53,0 mN/m e para o filme PCL/CA, 31,4 mN/m. Estes valores foram obtidos seguindo o modelo matemático *Owens-Wendt-Rabel & Kaelble*, e utilizando as componentes polar e dispersiva registadas na **Tabela 12**. Contrariamente à literatura, a superfície com maior valor de energia superficial (PCL) foi a que obteve maiores ângulos de contacto, exceto na presença de água. A adição do CA fez com que o valor da energia superficial diminuísse, o que deveria significar que os ângulos de contacto seriam maiores visto que as interações químicas seriam mais fracas. Tal não se comprovou, tendo em conta que mesmo com o solvente benzeno (apolar), os ângulos de contacto foram os mais baixos. Com essa perspetiva, conclui-se que haverá falta de uniformidade do polímero PCL e CA no filme polimérico, onde por vezes poderemos encontrar o PCL mais à superfície, tornando o filme bastante mais hidrofóbico e noutro momento, poderá estar o CA mais à superfície, aumentando apenas ligeiramente a hidrofilicidade do filme polimérico. Esta conclusão vai de encontro aos resultados obtidos por SEM e MO, onde através dos diâmetros das fibras se concluiu que haveria apenas uma miscibilidade parcial entre o PCL e o CA.

Tabela 12 – Componente Polar e Dispersiva da energia superficial para os solventes testados onde γ_L é o valor da tensão superficial total do solvente e γ_L^d e γ_L^p são os valores da componente dispersiva e polar da energia superficial do solvente, respetivamente.¹¹⁴

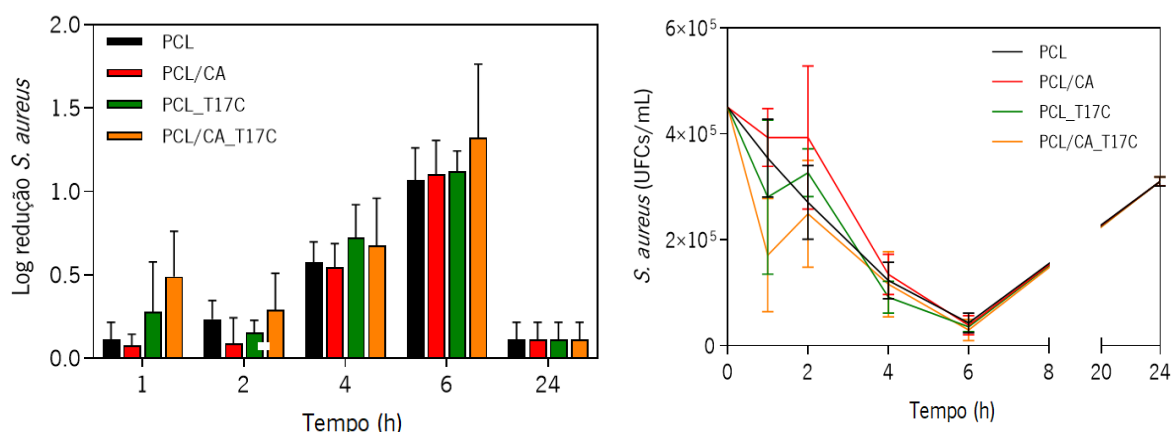
	γ_L (mJ/m ²)	γ_L^d (mJ/m ²)	γ_L^p (mJ/m ²)
H ₂ O	72,8	21,8	51,0
Benzeno	28,9	27,1	1,8
PEG	48,0	29,0	19,0

4. Análise da Atividade Antimicrobiana

4.1 Incorporação do Tiger 17C nos Filmes Poliméricos

A imobilização do péptido na superfície dos filmes poliméricos foi avaliada recorrendo a um teste antimicrobiano de cinética de crescimento microbiano. Este teste foi efetuado em filmes imobilizados e não imobilizados com o péptido e avaliado pelo número de bactérias viáveis em períodos de incubação específicos, 1, 2, 4, 6 e 24 h, assim como a redução logarítmica associada

(Figura 41). Os dados relataram uma ação antimicrobiana melhorada nos filmes imobilizados com o péptido apenas na primeira hora de cultura.



Os filmes foram modificados com o péptido Tiger 17C, no valor 2xMIC, por 72 h. No entanto, devido à natureza altamente hidrofóbica dos filmes baseados em PCL, a repulsão do péptido era esperada mesmo após um período de contacto tão longo (os filmes permaneceram no banho de incubação do péptido). Esses resultados demonstram que a quantidade de péptido ligado foi pequena e que este foi libertado muito rapidamente. É provável que o péptido ligado à superfície tenha interagido com os polímeros por meio de ligações fracas. Dos dois filmes poliméricos, o PCL/CA parecia ter mais ligação ao Tiger 17C. Este é um resultado muito interessante, considerando que a hidrofobicidade dos filmes PCL/CA foi ainda mais importante do que a do PCL. É provável que devido à exposição prolongada dos filmes ao péptido, algumas moléculas se tenham encaminhado para os grupos hidroxilo livres do CA, formando mais interações. Após 2 h de incubação, uma redução contínua no número de células é observada para todas as superfícies. Isso é promovido pelos filmes poliméricos nanoestruturados, que retêm muitas células bacterianas. Ainda, entre as 6 h as 24 h de cultura, a importância da estrutura do filme é anulada pelo contínuo crescimento da bactéria. Sem o péptido antimicrobiano para inibir o seu

crescimento, as bactérias continuaram a evoluir, superando a redução inicial introduzida ou pelo péptido ou pelo filme polimérico.

Para melhorar a relação entre os filmes poliméricos e o péptido, seria de interesse que em trabalho futuro os filmes fossem submetidos a tratamentos específicos de forma a anular alguma da sua hidrofobicidade que impede uma ligação mais eficaz com o Tiger 17. Algumas alternativas passam, por exemplo, por submeter os filmes a um tratamento por oxidação na superfície (por exemplo por UV ou plasma), imersão em solução de NaOH/EtOH para gerar radicais livres e proporcionar mais pontos de ligação entre o péptido e a superfície polimérica e, assim, aumentar a hidrofilicidade dos filmes poliméricos.

III. Conclusão e Perspetivas Futuras

Este projeto de investigação foi assente na ambição de criar soluções para combater um grande problema de saúde global: a resistência aos antibióticos e o seu impacto nas feridas cutâneas. A resistência de microorganismos a antibióticos não é um tópico recente, porém, nos últimos anos tem ganho um enorme destaque devido às elevadas estatísticas de mortalidade em todo o mundo. O seu uso inadequado e excessivo fez com que bactérias desenvolvessem mecanismos naturais de resistência tornando os antibióticos, na sua maioria, ineficazes. A bactéria *S.aureus* tem uma elevada incidência em tecidos lesados e sendo uma das bactérias com maior poder de sobrevivência a antibióticos β -lactâmicos, provoca infeções crónicas e generalizadas. A utilização de AMPs surgiu como uma resposta eficaz a este problema, tendo substituído os antibióticos convencionais em diversas utilizações.

Uma delas é a aplicação desses mesmos AMPs em pensos bioativos de forma a reparar mais rapidamente, por intermédio de uma ação localizada, uma ferida com um determinado grau de infeção ou já considerada crónica. Neste momento, a forma de travar a exposição de uma ferida ao ambiente circundante é pela aplicação de um penso que previna qualquer sujidade e contaminação exterior. Um penso pode ser constituído por vários tipos de tecidos e a busca por soluções inteligentes, mais económicas e automatizadas é um dos pilares da evolução da indústria têxtil. Pensos bioativos contêm elementos biológicos que permitem que o próprio penso produza uma ação médica consequente da sua ligação às fibras. Estas fibras são, geralmente, provenientes de materiais poliméricos com características químicas e mecânicas aprazíveis para a aplicação biomédica.

Neste trabalho, sintetizou-se o AMP Peptaibolin através do método de síntese MW-SPPS, numa resina de Wang, com o objetivo de avaliar a sua atividade antimicrobiana e possível imobilização em fibras produzidas pelo equipamento de eletrospinning. O Peptaibolin, por ter natureza apolar, era expectável que a sua dissolução num solvente apropriado para os testes microbianos fosse um obstáculo, o que se comprovou, visto que este AMP se solubilizou apenas em 10% DMSO/H₂O. De qualquer forma, o teste de MIC foi conduzido utilizando as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, onde se concluiu que o péptido não apresentava qualquer atividade antimicrobiana tanto nas bactérias Gram-positivas como Gram-negativas e, portanto, deixou de ser o objeto de estudo para este projeto.

Outro péptido foi igualmente sintetizado, o Tiger 17, no mesmo método de MW-SPPS, mas numa resina Fmoc-Rink-Amide. Embora seja um péptido pouco explorado (até agora), era de interesse testar se este péptido poderia ter atividade antimicrobiana contra as bactérias mais prevalentes em feridas cutâneas, nomeadamente a *S. aureus*, visto que estudos prévios já haviam demonstrado a sua elevada capacidade cicatrizante em tecidos lesados. Por ser um péptido nunca antes sintetizado em contexto laboratorial académico, procedeu-se a diversos processos de otimização, tendo-se concluindo que o péptido sintetizado se encontrava impuro e sem condições para que os testes microbianos fossem realizados.

Como forma de estabelecer a sua atividade antimicrobiana característica, o péptido Tiger 17 obtido comercialmente foi submetido a testes microbianos de MIC e cinética de crescimento microbiano onde se demonstrou que este péptido possui atividade antimicrobiana que aliada à sua capacidade de regeneração de tecidos e cicatrização de feridas crónicas se torna numa alternativa extremamente promissora em engenharia de tecidos e aplicações biomédicas, particularmente na cicatrização de feridas.

Para aplicação dos AMPs, todo um método de produção de nanofibras teve de ser otimizado. O equipamento utilizado foi o eletrospinning que permite a produção de nanofibras através da aplicação de elevadas voltagens a uma solução polimérica previamente preparada. Com uma mistura polimérica de PCL/CA e uma solução controlo de PCL, obtiveram-se filmes poliméricos nanofibrosos, cuja gama de diâmetros foi confirmada por MO e SEM. Estes filmes poliméricos foram submetidos a diversos testes de análise e caracterização de superfícies, de entre os quais se pode destacar o ATR-FTIR, TGA e DSC, testes de *swelling*, porosidade e molhabilidade.

Ambos os filmes de PCL e PCL/CA são considerados de natureza hidrofóbica e resistentes à temperatura e a adição do CA não permitiu um aumento de forma eficaz de características vantajosas para a utilização dessas fibras em pensos bioativos. É possível que o grau de miscibilidade entre os dois polímeros não seja suficiente o que justifica que o péptido possua fraca imobilização na superfície polimérica e seja necessário alcançar melhores soluções para que os péptidos tenham uma ação e libertação mais controlada.

1.1 Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos em tempo útil para a escrita desta dissertação são, sem dúvida, de uma matéria bastante promissora no campo da engenharia têxtil, aliada à química e à engenharia

de tecidos. Contudo, considerando as inconveniências provocados pela situação pandémica atual, que restringiram a atividade prática e a utilização dos equipamentos de processamento e caracterização, algumas questões ficaram por responder e por aprofundar. Num futuro próximo, é de interesse estudar mais estratégias de otimização para que a síntese do Tiger 17, por forma a aumentar a sua eficácia. A utilização de outras técnicas de caracterização estrutural e de massa, permitiria ainda a confirmação de parâmetros como pureza, essencial para que testes antimicrobianos sejam conduzidos com maior sucesso.

A nível de produção de nanofibras, apesar de já ter sido efetuado um exaustivo processo de otimização de parâmetros de processamento e de solução polimérica, seria importante o estudo de novos rácios entre PCL e CA ou de novas formas de tratamento dos filmes poliméricos pós-produção para que a sua molhabilidade seja aumentada. Mais ainda, um estudo mais aprofundado sobre os tipos de ligações geradas entre os polímeros e a influência da sua natureza para a produção de soluções homogêneas seria extremamente útil para a compreensão dos fenómenos observados.

IV. Secção Experimental

1. Materiais e Reagentes

A síntese em micro-ondas foi realizada no sintetizador peptídico manual Discover SPPS (CEM Corporation). Os suportes sólidos usados foram a resina Fmoc-Phe-Wang com um grau de funcionalização de 0,51 mmol/g e a resina Fmoc-Rink Amide com um grau de funcionalização de 0,53 mmol/g, ambas adquiridas à AAPPtec.

Os espetros de ressonância magnética nuclear de ^1H foram obtidos no aparelho Bruker Avance III 400 numa frequência de 400 MHz para ^1H , usando o pico do solvente como referência interna, a 25°C. O solvente deuterado utilizado foi o clorofórmio (CDCl_3) com grau de deuteração superior a 99,8% (Acros Organics) e DMSO- d_6 com grau de deuteração superior a 99,8% (Acros Organics). Os deslocamentos químicos (δ) estão definidos em partes por milhão (ppm).

Para verificação da pureza e conteúdo de aminoácidos no péptido foi utilizada cromatografia em camada fina (TLC), usando placas de gel de sílica com 0,25 mm de espessura e com indicador de fluorescência F254 (Nagel DC-Fertiplatten Kieselgel 60). A visualização foi feita pela incidência de radiação ultravioleta/visível (UV/vis, λ_{max} 254 e 365 nm) numa câmara CN-6 de luz UV/vis e utilização de uma câmara de iodo.

A análise por HPLC analítico foi realizada com uma coluna Licrospher 100 RP18 (5 μm) num sistema de HPLC composto por uma bomba Jasco PU-980, acoplada a um detetor UV/vis Shimadzu SPD-GAV e um registador Shimadzu C-RGA Chromatopac.

A produção dos filmes fibrosos através da técnica de eletrospinning foi efetuada no equipamento de eletrospinning MECC NF-103.

Os testes de TGA foram realizados no aparelho STA 449 F3 da NETZSCH Q500 utilizando um cadinho de alumínio. A curva de TGA foi obtida numa gama de temperaturas entre 25-600°C em atmosfera de nitrogénio, com um fluxo de 200 mL/min e aumento de temperatura gradual de 10°C/min.

A técnica de DSC foi realizada no aparelho Power Compensation Diamond DSC (Perkin Elmer, MA) com um Intracooler ILP, baseado nas normas ISO 11357-1:1997, ISO 11357-2:1999 e ISO 11357-3:1999. Os testes foram conduzidos sobre atmosfera de nitrogénio com um fluxo de 20 mL/min e uma taxa de aumento de temperatura de 10°C/min.

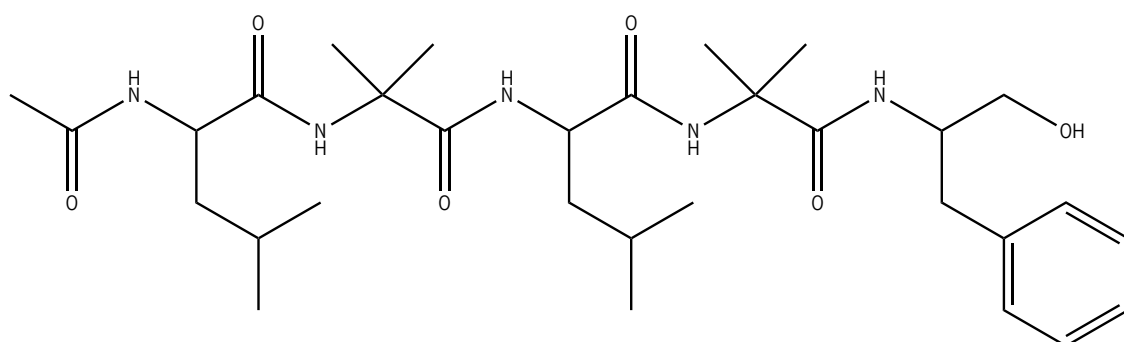
O espectrofotómetro Nicolet Avatar 360 Fourier Transform Infrared (FTIR) (Madison, WI) com um acessório de Refletância Total Atenuada foi usado para traçar os espetros de ATR-FTIR dos

filmes de PCL e PCL/CA. Para cada filme, foram feitos um total de 45 *scans* com uma resolução espectral de 8 cm⁻¹ com um alcance de entre 400-4000 cm⁻¹.

Para os testes antimicrobianos, os meios de cultura caldo de soja triptico (TSB) e agar de soja triptico (TSA) foram adquiridos na VWR (USA). O meio de cultura de Mueller Hinton (MHB) foi obtido do CondaLab (Spain). Todas as bactérias testadas foram fornecidas pela American Type Culture Collection (ATCC, Spain), abrangendo as bactérias Gram-positivas *S. aureus* (ATCC 6538) e *S. epidermidis* (ATCC 35984) e as Gram-negativas *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 25853).

Os reagentes e solventes secos foram usados conforme adquiridos comercialmente (AAPptec, Acros Organic, Sigma Aldrich, Merck). A resina e os aminoácidos que não foram preparados no laboratório foram adquiridos comercialmente (AAPptec).

1.1 Síntese do péptido Peptaibolin (Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Phol) por MW-SPPS na resina Wang



1.1.1 Reagente de acoplamento: DIC/HOBt

Partindo de 1,1 g de resina Fmoc-Phe-Wang (0,51 mmol/g), procedeu-se à remoção do grupo protetor adicionando 5 mL de uma solução de piperidina 20% em DMF ao vaso reacional contendo a resina, colocou-se o vaso reacional com a fibra ótica para medição de temperatura no micro-ondas e escolheu-se o programa de desproteção SPPS a 75°C e 20 W durante 30s. Após esta desproteção inicial, filtrou-se a solução de piperidina 20% em DMF e adicionou-se novamente 7 mL desta solução, tendo-se selecionado novamente o mesmo programa, durante 3 min. Filtrou-se

a solução e realizaram-se as lavagens: DMF (3x) e MeOH (3x), repetindo 4 vezes este ciclo de lavagem.

De seguida, acoplaram-se sequencialmente todos os aminoácidos na ordem Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Aib-OH e Fmoc-Leu-OH. Dissolveu-se o aminoácido *N*-protegido (0,0028 mol, 5 equiv.), HOBt (0,0028 mol, 0,4756 g, 5 equiv.) e DIC (0,0028 mol, 0,35 mL, 5 equiv.), sendo que a mistura reacional contendo o aminoácido Aib necessitava de um período de agitação de 2 h, enquanto a mistura reacional contendo o aminoácido Leu permaneceu em agitação durante 5 min. Após dois ciclos de irradiação com microondas com as condições de 75°C e 20 W durante 5 min, procedeu-se com as seguintes lavagens: DMF (3x) e MeOH (3x), 3 ciclos de lavagem.

Antes da separação do péptido da resina, procedeu-se à acetilação na qual se suspendeu a resina em 7 mL de DMF seca, adicionou-se 1 mL de DIPEA (14 equiv.) e de seguida 0,4 mL de anidrido acético (7 equiv.). Deixou-se a mistura sob agitação durante 1,5 h. Após esse período, lavou-se a resina com DMF (2x), MeOH (2x), DCM (3x) e éter etílico (3x), e posteriormente foi seca no exsiccador à temperatura ambiente.

Após obtenção da sequência final e acetilação procedeu-se à separação redutora do péptido, Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Phol, da resina Wang. Num balão de 3 entradas, suspendeu-se NaBH₄ (5 equiv.) em THF seco (16 mL/g de resina) sob atmosfera de nitrogénio e adicionou-se etanol seco (4 mL/g de resina e LiBr (5 equiv.)). Agitou-se vigorosamente a mistura durante 15 min em banho de gelo e mais 15 min à temperatura ambiente. Adicionou-se a resina à mistura anterior e deixou-se em agitação à temperatura ambiente por um período de 24 h.

A separação da resina da mistura reacional foi feita através da filtração para um funil de placa porosa e lavou-se com THF (2x), EtOH (2x) e EtOAc (2x), diretamente para um balão de fundo redondo de 100 mL. Ácido acético foi adicionado gota a gota de forma a eliminar todo o borohidreto presente na mistura. Evaporou-se o solvente sem aquecimento e procedeu-se à extração, utilizando uma combinação de H₂O:acetato de etilo:solução saturada de NaCl (3x). Recolheu-se a fase orgânica e secou-se utilizando MgSO₄ anidro. Após filtração, o solvente foi evaporado sem aquecimento, à secura. Adicionou-se éter etílico e colocou-se no frio. Centrifugou-se a solução até se obter sólido branco.

Obteve-se 0,1222 g de péptido, correspondente a um rendimento de 40,6% de sólido branco puro, como confirmado por cromatografia de HPLC usando como eluente ACN/H₂O (1:1) com 0,1% de TFA. A estrutura do composto foi confirmada por espectroscopia de ¹H RMN.

1.1.2 Reagente de acoplamento: DIC/Oxima

Partindo de 1,1 g de resina Fmoc-Phe-Wang (0,51 mmol/g), procedeu-se à remoção do grupo protetor adicionando 5 mL de uma solução de piperidina 20% em DMF ao vaso reacional contendo a resina, colocou-se o vaso reacional com a fibra ótica para medição de temperatura no microondas e escolheu-se o programa de desproteção SPPS a 75°C e 20 W durante 30s. Após esta desproteção inicial, filtrou-se a solução de piperidina 20% em DMF e adicionou-se novamente 7 mL desta solução, tendo-se selecionado novamente o mesmo programa, durante 3 min. Filtrou-se a solução e realizaram-se as lavagens: DMF (3x) e MeOH (3x), repetindo 4 vezes este ciclo de lavagem.

De seguida, acoplaram-se sequencialmente todos os aminoácido por esta ordem: Fmoc-Aib-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Aib-OH e Fmoc-Leu-OH. Dissolveu-se o aminoácido *N*-protegido (0,0028 mol, 5 equiv.), Oxima (0,0028 mol, 0,3986 g, 5 equiv.) e DIC (0,0028 mol, 0,35 mL, 5 equiv.), sendo que a mistura reacional contendo o aminoácido Aib necessitava de um período de agitação de 2 h, enquanto que a mistura reacional contendo o aminoácido Leu permaneceu em agitação durante 5 min. Após dois ciclos de irradiação com microondas com as condições de 75°C e 20 W durante 5 min, procedeu-se com as seguintes lavagens: DMF (3x) e MeOH (3x), 3 ciclos de lavagem.

Antes da separação do péptido da resina, procedeu-se à acetilação na qual se suspendeu a resina em 7 mL de DMF seca, adicionou-se 1 mL de DIPEA (14 equiv.) e de seguida 0,4 mL de anidrido acético (7 equiv.). Deixou-se a mistura sob agitação durante 1,5 h. Após esse período, lavou-se a resina com DMF (2x), MeOH (2x), DCM (3x) e éter etílico (3x) e secou-se no exsicador à temperatura ambiente.

Após obtenção da sequência final e acetilação procedeu-se à separação reductora péptido, Ac-Leu-Aib-Leu-Aib-Phol, da resina Wang. Num balão de 3 entradas, suspendeu-se NaBH₄ (5 equiv.) em THF seco (16 mL/g de resina) sob atmosfera de nitrogénio e adicionou-se etanol seco (4 mL/g de resina e LiBr (5 equiv.). A mistura foi agitada vigorosamente durante 15 min em banho de gelo e mais 15 min à temperatura ambiente. Adicionou-se a resina à mistura anterior e deixou-se em agitação à temperatura ambiente por um período de 24 h.

A separação da resina da mistura reacional foi feita através da filtração para um funil de placa porosa e lavou-se com THF (2x), EtOH (2x) e EtOAc (2x), diretamente para um balão de fundo redondo de 100 mL. Ácido acético foi adicionado gota a gota, de forma a eliminar todo o

borohidreto presente na mistura. Evaporou-se o solvente sem aquecimento e procedeu-se à extração, utilizando uma combinação de H₂O:acetato de etilo:solução saturada de NaCl (3x). Recolheu-se a fase orgânica e secou-se utilizando MgSO₄ anidro. Após filtração, evaporou-se sem aquecimento o solvente à secura. Adicionou-se éter etílico e colocou-se no frio. Centrifugou-se a solução até se obter sólido branco.

Obteve-se 0,1504 g de péptido, correspondente a um rendimento de 50,0% de sólido branco puro, como confirmado por cromatografia de HPLC usando como eluente ACN/H₂O (1:1) com 0,1% de TFA. Devido à diversidade de estudos que tem como alvo este péptido, a estrutura do composto foi unicamente confirmada por espectroscopia de RMN.

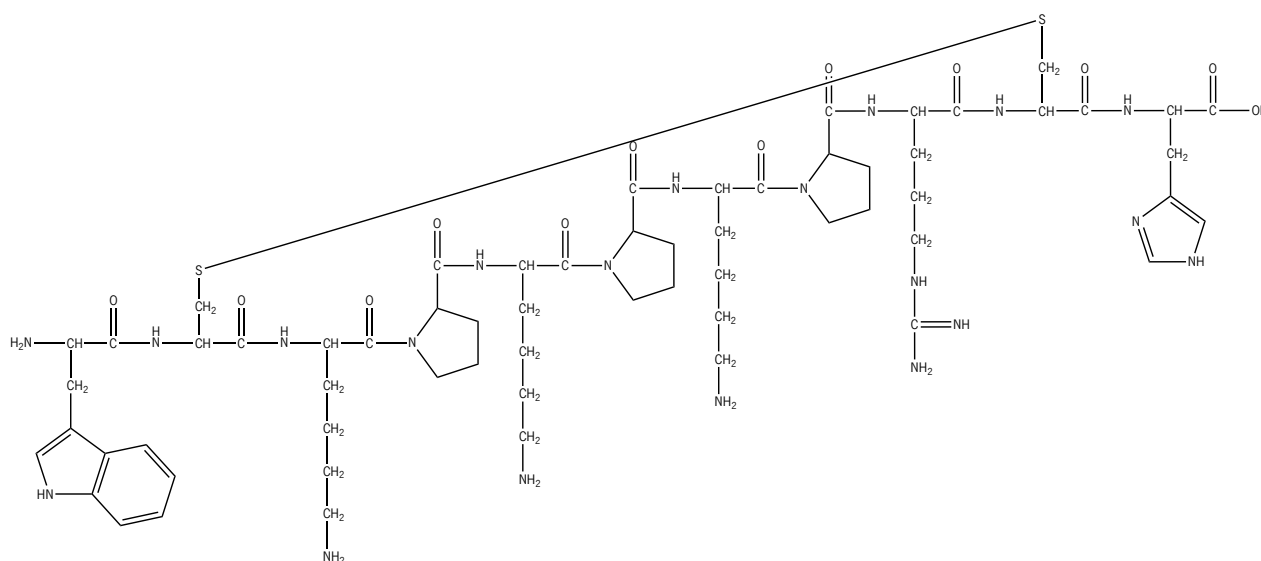
Para confirmação estrutural, foram dissolvidos 5 mg de péptido em 500 µL de d₆-CDCl₃ e transferidos para um tubo de RMN. O espectro de RMN foi registrado a 400 MHz, usando o pico de solvente como referência interna.

¹H RMN (CDCl₃d₆, 400 MHz) δ_H = 0,97-1,00 (12H, m, 4xCH₃-Leu); 1,38 (3H, s, CH₃-Aib); 1,39 (3H, s, CH₃-Aib); 1,48 (3H, s, CH₃-Aib); 1,54 (3H, s, CH₃-Aib); 1,58-1,89 (6H, m, βCH₂-Leu+ γCH-Leu); 2,14 (3H, s, CH₃CO); 2,73-2,83 (5H, m, βCH₂-Phe); 3,61-3,72 (2H, m, CH₂OH); 3,96 (1H, s, α-CH); 4,02-4,08 (1H, m, αCH-Leu); 4,29 (1H, s, α-CH-Leu); 7,15-7,30 (5H, m, CH-Phol); 7,86 (1H, s, NH); 8,06 (1H, s, NH); 8,15 (1H, s, NH).

1.1.3 Caracterização do péptido Peptaibolin: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para confirmação da pureza do Peptaibolin, três soluções de eluente foram preparadas. Os eluentes acetonitrilo/água (ACN/H₂O) (1:1), ACN/H₂O (2:1) e ACN/H₂O (1:2) foram preparados após filtração dos solventes adicionando 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA). Todas as soluções foram colocadas em banho de ultrassons por 10 min para desgaseificação. O péptido foi dissolvido em 500 µL de ACN/H₂O (2:1) e efetuou-se injeções de 20 µL com fluxo de 1 mL/h e a detecção a 215 nm com *range*=0,64.

1.2 Síntese do péptido Tiger 17 c[Trp-Cys-(Lys-Pro)₃-Arg-Cys-His-NH₂], por MW-SPPS na resina Fmoc-Rink Amide



Partindo de 0,6 g de resina Fmoc-Rink-Amide (0,53 mmol/g), procedeu-se à remoção do grupo protetor adicionando 3 mL de uma solução de piperidina 20% em DMF ao vaso reacional contendo a resina, colocou-se o vaso reacional com a fibra ótica para medição de temperatura no micro-ondas, e escolheu-se o programa de desproteção SPPS a 75°C e 20 W durante 30s. Após esta desproteção inicial, filtrou-se a solução de piperidina 20% em DMF e adicionou-se novamente 4 mL desta solução, tendo-se selecionado novamente o mesmo programa, durante 3 min. Filtrou-se a solução e realizaram-se as lavagens: DMF (3x) e MeOH (3x), repetindo 4 vezes este ciclo de lavagem.

De seguida, introduziu-se sequencialmente Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH e Fmoc-Pro-OH. Dissolveu-se os aminoácidos *N*-protegidos (0,00265 mol, 6 equiv.), Oxima (0,00265 mol, 0,2720 g, 6 equiv.) e DIC (0,0028 mol, 0,24 mL, 6 equiv.) e colocou-se a mistura em agitação por um período de 15 min. Após três ciclos de irradiação com microondas com as condições de 75°C e 20 W durante 5 min, procedia-se com as seguintes lavagens: DMF (3x) e MeOH (3x), 3 ciclos de lavagem.

Para o aminoácido Fmoc-Lys(Boc)-OH dissolveu-se o aminoácido *N*-protegido (0,00318 mol, 10 equiv.), Oxima (0,00318 mol, 0,4519 g, 10 equiv.) e DIC (0,00318 mol, 0,42 mL, 10 equiv.) e procedeu-se a 5 ciclos de irradiação com microondas nas mesmas condições anteriores.

Para os últimos 2 aminoácidos, Fmoc-Cys(Trt)-OH e Fmoc-Trp(Boc)-OH, dissolveu-se os aminoácidos *N*-protegidos (0,00238 mol, 7,5 equiv.), Oxima (0,00238 mol, 0,3389 g, 7,5 equiv.)

e DIC (0,00238 mol, 0,32 mL, 7,5 equiv.) e procedeu-se de igual forma a três ciclos de irradiação com microondas.

Foram efetuadas duas sínteses de Tiger 17 com as mesmas condições de síntese e a mesma combinação de reagentes de acoplamento, distinguindo-se apenas no método de clivagem do péptido da resina e dos grupos protetores das cadeias laterais:

Sem scavenger. Partindo de 0,6974 g de resina, procedeu-se à remoção do grupo Fmoc do último aminoácido acoplado nas condições descritas acima. Em seguida, num balão de fundo redondo (50 mL) adicionou-se uma mistura de TFA/água (95:5, 10 mL) em banho de gelo e com agitação. Transferiu-se a resina para o interior do balão e a mistura foi mantida em agitação suave durante 2 h. Por fim, filtrou-se a mistura de clivagem e lavou-se a resina com 2 mL de TFA/água (95:5) em alíquotas de 0,5 mL. Ao filtrado, juntaram-se 20 mL de éter etílico frio e deixou-se a precipitar no frigorífico durante a noite. Centrifugou-se o precipitado.

Para o processo de oxidação para formação da ponte ditioi entre os dois resíduos de cisteína presentes no péptido, dissolveu-se o precipitado em H₂O/AcOH (95:5) e a mistura foi mantida em agitação, exposta ao ar e à temperatura ambiente durante 26 h, obtendo-se um sólido após liofilização.

Com scavenger. Antes de iniciar o processo de clivagem, procedeu-se à remoção do grupo Fmoc do último aminoácido acoplado nas condições descritas acima. Num balão de fundo redondo (50 mL) adicionou-se uma mistura de TFA:TIPS:H₂O (95:2,5:2,5) (15 mL) em banho de gelo, com agitação e em atmosfera de nitrogénio. Transferiu-se a resina para o interior do balão e a mistura foi mantida em agitação suave durante 2 h. Por fim, filtrou-se a mistura de clivagem e lavou-se a resina com 5 mL de TFA/água (95:5) em alíquotas de 0,5 mL. Ao filtrado, juntou-se 20 mL de éter etílico frio e deixou-se a precipitar no frigorífico durante a noite. Centrifugou-se o precipitado.

Para o processo de oxidação para formação da ponte ditioi entre os dois resíduos de cisteína presentes no péptido, dissolveu-se os precipitados em H₂O/AcOH (95:5) e a mistura foi mantida em agitação, exposta ao ar e à temperatura ambiente durante 48 h, obtendo-se um sólido após liofilização.

Para confirmação estrutural do péptido Tiger 17, foram dissolvidos 5 mg de péptido em 500 µL de DMSO-d₆ e transferidos para um tubo de RMN. O espectro de ¹H RMN foi registado a 400 MHz, usando o pico de solvente como referência interna.

1.2.1 Caracterização do péptido Tiger 17: Cromatografia em Camada Fina (TLC)

Dissolveram-se 2 mg de péptido num menor volume possível de acetona pura. Numa placa de gel de sílica com 0,25 mm de espessura e com indicador de fluorescência. Com o auxílio de um capilar, foram depositadas 3 gotas de solução. A placa de TLC foi colocada em câmara de eluente com uma mistura de eluente $\text{CDCl}_3/\text{MeOH}$ (6:4) e deixou-se o eluente subir até ao limite. Visualizou-se a placa de TLC pela incidência de radiação UV/vis (λ_{max} 254 e 365 nm) numa câmara de luz UV/vis e utilizou-se também uma câmara de iodo.

1.2.2 Caracterização do péptido Tiger 17: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para confirmação da pureza do péptido Tiger 17, várias soluções de eluente foram preparadas. Filtrando todos os solventes, preparam-se 150 mL de cada solução de eluente: ACN/ H_2O (1:9), ACN/ H_2O (1:3), ACN/ H_2O (1:2), ACN/ H_2O (1:1), ACN/ H_2O (2:1), ACN/ H_2O (3:1), ACN/ H_2O (5:1) e ACN 100% às quais foi adicionado 0,1% de TFA. Todas as soluções foram colocadas em banho de ultrassom por 10 minutos para desgaseificação. As condições do equipamento testadas foram: fluxo de 1 mL/h, 0,8 mL/h, 0,4 mL/h, comprimento de onda de 215 e 280 nm, e *range* de 0,32 e 0,64.

1.3 Concentração Mínima Inibitória (MIC) do Peptaibolin e do Tiger 17C

As soluções de trabalho a 8 mg/mL para o Peptaibolin e a 4 mg/mL para o Tiger 17 comercial, foram preparadas usando o solvente mais adequado. Aliquotas foram adicionadas à primeira coluna de uma placa com 96 poços com um volume de 100 μL . Diluições em série (1:2) foram feitas com MHB nos poços consecutivos, até um volume final de 50 μL . De seguida, a cada um desses poços, foram adicionados 50 μL das suspensões de bactérias preparadas a 2×10^7 unidades formadoras de colónias (UFCs)/mL em MHB (inoculadas de uma colónia e cultivadas durante a noite a 37°C e 100 rpm). Suspensões de bactérias livres de agentes (positivas) e meios de cultura (negativos) foram usados como controlos. As leituras de absorbância foram feitas a um

comprimento de onda de 600 nm (EZ READ 2000 Microplate Reader, Biochrom, UK), antes e após a incubação da placa por 24 h a 37°C e 100 rpm. O valor MIC para cada combinação de péptido/bactéria foi estabelecido como a concentração na qual a bactéria não apresentou nenhum crescimento, determinado visualmente e confirmado pelas diferenças nas leituras de absorbância.

1.4 Preparação das Misturas Poliméricas de PCL e PCL/CA

Foram preparadas diversas combinações de solução polimérica de forma a otimizar o processo de obtenção das fibras. Numa primeira fase, preparou-se PCL/CA 10%:10%wt (1:3), PCL/CA 12%:10%wt (1:3) e PCL/CA 14%:10%wt (1:3) com PCL (peso molecular: 78 000, 88% hidrolisado da Polysciences Europe GmbH) e CA (peso molecular: 30 000 com 39.8% wt de conteúdo acetilo, da Sigma). O CA foi dissolvido em 10% (w/v) em ácido acético, enquanto que a PCL foi dissolvida numa mistura de acetona/ácido acético (3:7). Num frasco de 100 mL foram pesadas as quantidades corretas para um volume de solução de 30 mL e os reagentes foram dissolvidos com auxílio de agitação a 300 rpm com uma temperatura de 90°C durante 1 h.

Numa segunda fase, utilizando PCL e CA da mesma gama anterior, prepararam-se 30 mL das combinações PCL/CA 14%:10%wt (1:3) e PCL/CA 16%:10%wt (1:3) onde se dissolveram os polímeros nos seus solventes respetivos: ácido acético para o CA e acetona/ácido acético (3:7) para o PCL. A dissolução ocorreu com auxílio de agitação a 300 rpm com uma temperatura de 90°C durante 1 h.

Numa terceira tentativa de otimização, utilizando desta vez PCL de peso molecular: 80 000 (88% hidrolisado da Polysciences Europe GmbH), prepararam-se 4 combinações de solução polimérica: PCL/CA 14%:10%wt (1:1), PCL/CA 14%:10%wt (1:2), PCL/CA 14%:10%wt (1:3) e PCL/CA 10%:18%wt (1:1). Para as 3 combinações de PCL/CA 14%:10%wt, dissolveu-se separadamente o CA em ácido acético e o PCL numa combinação de acetona/ácido acético (1:3). A solução PCL/CA 10%:18%wt (1:1) teve como solventes: acetona/dimetilacetamida (DMAc) (2:1) para CA e DMF/THF (1:1) para PCL. A dissolução ocorreu com auxílio de agitação a 300 rpm com uma temperatura de 90°C durante 2 h. Ao fim desse período, os polímeros foram misturados e a solução permaneceu em agitação durante 24 h.

Por fim, testaram-se ainda mais 4 variações: PCL/CA 14%:10% (2:1) dissolvido em 100% ácido acético para o CA e acetona/ácido acético (3:7) para o PCL; PCL/CA 14%:10%wt (3:1)

dissolvido em acetona/DMF (2:1) para o CA e DMF/ CDCl_3 (1:9) para o PCL, e PCL sozinho a 14%wt dissolvido em duas combinações de solventes THF/DMF (1:1) e CDCl_3 /DMF (9:1).

1.5 Produção de Filmes Poliméricos por Eletrospinning

No equipamento de eletrospinning testou-se inicialmente as soluções poliméricas de PCL/CA 12%:10%wt e PCL/CA 14%:10%wt fazendo variar parâmetros como a voltagem, o fluxo, a distância da agulha ao coletor, e o diâmetro interno da agulha. Foram testadas diversas condições com voltagens entre 16-25 kV, fluxos entre 0,4-2 mL/h, distâncias entre 10-20 cm e diâmetros de agulha entre 18-22G. Com as restantes combinações de solução polimérica, foi iniciado um estudo de otimização onde foram testadas diversas condições para se alcançar a formação de fibras (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Condições testadas no equipamento eletrospinning para otimização da produção de fibras.

Combinação polimérica	Voltagem (kV)	Fluxo (mL/h)	Distância ao coletor (cm)	Diâmetro agulha (G)
PCL/CA 14% 10% (1:3)	25,0	0,8	18,0	18
PCL/CA 14% 10% (1:3)	29,0	0,8	17,0	
PCL/CA 14% 10% (1:3)	25,0	0,8	17,0	
PCL/CA 18% 10% (1:3)	Não se obteve estabilidade do feixe			
PCL/CA 14% 10% (1:1)	25,0	2,5	18,0	
PCL/CA 14% 10% (1:1)	15,6	1,4	16,0	
PCL/CA 14% 10% (1:1)	15,6	2,2	15,0	
PCL/CA 14% 10% (1:2)	15,6	2,2	15,0	
PCL/CA 14% 10% (1:2)	15,6	2,2	14,5	
PCL/CA 14% 10% (1:2)	15,6	1,7	15,0	
PCL/CA 14% 10% (3:1)	24,7	3,2	21,0	
PCL 14% em THF/DMF	13,0	0,7	16,0	
PCL 14% em THF/DMF	13,0	0,7	18,0	
PCL 14% em THF/DMF	12,0	0,8	17,0	
PCL 14% em CDCl ₃ /DMF	12,0	0,8	17,0	

Foram produzidos 3 filmes da combinação PCL/CA 14%:10%wt (3:1) e 5 filmes da combinação PCL 14%wt em CDCl_3 /DMF com uma duração de 2 h cada.

1.6 Caracterização das Fibras

1.6.1 Tamanho, Porosidade e Morfologia

Imagens de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) com canhão de emissão de campo (FEG-SEM) foram recolhidas dos filmes de PCL e PCL/CA (NOVA 200 Nano SEM FEI Company) com uma voltagem de aceleração de 10 kV. Os filmes foram inicialmente revestidos com uma película fina (10 nm) de Au-Pd (80-20% em peso) usando um aplicador de alta resolução 208HR (Cressington Company, Watford WD19 4BX, Reino Unido) acoplado a um controlador de espessura de alta resolução (MTM-20 Cressington). A distribuição de diâmetros das fibras obtidas de cada filme foi determinada fazendo 100 medições do diâmetro das fibras em três imagens de cada tipo de composição, simulando a distribuição de diâmetros com uma função log normalizada. As imagens usadas foram as de magnitude de 10.000x e foram processadas com o software ImageJ (versão 1.53).

A porosidade dos filmes foi avaliada indiretamente medindo as diferenças de massa antes e depois da imersão em etanol. Amostras de 11 mm de diâmetro, recolhidas de cada combinação de polímero, foram examinadas durante 7 dias de incubação a 37°C (valor de massa constante). A porosidade (ϵ) foi calculada usando a seguinte equação. Em que W_2 é o peso antes da imersão em etanol e W_1 o peso após imersão.

$$\% \text{ Porosidade} = \frac{W_2 - W_1}{\rho V} \times 100$$

1.6.2 Análise por ATR-FTIR

Os grupos químicos característicos dos polímeros foram analisados por ATR-FTIR. Os espectros ATR-FTIR foram desenhados usando um espectrofotómetro IRAffinity-1S, SHIMADZU (Kyoto, Japão), com um cristal de diamante. Aqui, aplicou-se uma resolução espectral de 8 cm^{-1} , para 45 varreduras, numa gama de 4000-400 cm^{-1} .

1.6.3 Estabilidade Térmica: Análise por TGA E DSC

As propriedades térmicas, incluindo a degradação térmica dos filmes de PCL e PCL/CA, foram analisadas por TGA e DSC. O TGA avaliou as variações de perda de peso com aumento de temperatura na faixa de 25-600°C, a uma taxa de aquecimento de 10°C/min e uma taxa de fluxo de 200 mL/min (atmosfera inerte de nitrogénio) num STA 7200 Hitachi® (Fukuoka, Japão), usando cadinhos de alumínio. A massa inicial de cada amostra era de 5±2 mg. Os resultados foram extrapolados como percentagem de perda de massa vs temperatura. O DSC também foi utilizado para avaliar a estabilidade térmica dos filmes. Aqui, foi usado um DSC 822 Mettler Toledo (Columbus, EUA). Os filmes foram submetidos a uma única etapa de aquecimento de 0-250°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de nitrogénio e um fluxo de 20 mL/min (ambiente inerte). As curvas DSC foram traçadas com fluxo de calor vs temperatura em que os picos exo tem direção para cima.

1.6.4 Medição de Ângulo de Contacto e Energia de Superfície

O ângulo de contacto e a energia superficial das superfícies dos filmes PCL e PCL/CA para dH₂O (líquido polar), benzeno (líquido apolar) e polietilenoglicol (apolar e polar), foi avaliada usando um equipamento OCA 200 (medição de ângulo de contacto ótico e sistemas de análise de contorno, instrumentos Dataphysics, Filderstadt, Alemanha) juntamente com o Software OCA15 plus (versão 1.2), seguindo o método da gota sêssil. O volume das gotas de líquido foi estabelecido em 5 µL. Os valores dos ângulos foram recuperados 8 segundos após o contacto com a superfície. O valor de ângulo de contacto é reportado como a média de 6 valores de ângulos consecutivos na mesma superfície. A energia superficial das superfícies foi calculada aplicando o seguinte conjunto de equações.^{114,123}

$$\sigma_s = \sigma_s^D + \sigma_s^P$$

σ_s é o valor total da energia superficial de uma superfície e σ_s^P e σ_s^D são as componentes polar e dispersiva da energia superficial de uma superfície, respetivamente.

$$\frac{\sigma_l(\cos \theta + 1)}{2(\sqrt{\sigma_l^D})} = (\sqrt{\sigma_s^P}) \frac{(\sqrt{\sigma_l^P})}{(\sqrt{\sigma_l^D})} + (\sqrt{\sigma_s^D})$$

σ_l é o valor total da energia superficial de um solvente, σ_l^P e σ_l^D são as componentes polar e dispersiva da energia superficial de um solvente, respetivamente.

1.6.5 Grau de Swelling

Amostras secas de 11 mm de diâmetro de cada filme foram cortadas e pesadas (m_d em mg). De seguida, foram incubadas numa solução de fluido corporal simulado (SBF a pH 7,4) a 37°C por 1, 3 e 7 dias. As amostras foram pesadas após cada intervalo e o grau de hidratação ou *swelling* (DS) foi calculado como:

$$DS (\%) = \frac{(m_w - m_d)}{m_w} \times 100$$

onde m_w é o peso húmido da amostra (mg). Os períodos de pesagem foram definidos com o objetivo de garantir a saturação total da superfície.

1.7 Funcionalização das Fibras com Tiger 17C

Os filmes PCL e PCL/CA foram funcionalizados com Tiger 17C-NH₂ por meio de adsorção física. Amostras de 6 mm de diâmetro foram imersas numa solução de péptido 2xMIC, preparada em dH₂O, por 24 h a 37°C e 100 rpm. Esta estratégia e período de imobilização foram selecionados para garantir uma ligação ideal com os filmes, sem risco de perder da configuração cíclica do péptido. Após a incubação, os filmes foram lavados três vezes com PBS, durante 5 min, sob agitação constante de 100 rpm, para remover moléculas de péptido fracamente ligadas.

1.8 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

1.8.1 Teste de Cinética do Crescimento Microbiano com Fibras funcionalizadas com Tiger 17C

Amostras de filmes de 6 mm de diâmetro funcionalizadas com o péptido a 2xMIC foram combinadas com suspensões de *S. aureus* ajustadas para 1×10^5 UFC/ mL em TSB. Filmes não modificados foram usados como controlo. Soluções de filme polimérico imobilizado com a bactéria foram incubados a 37°C e 100 rpm, seguindo as diretrizes da norma ASTM-E2149-01. Após 0 (antes da ação do agente), 1, 2, 4, 6 e 24 h de incubação, as bactérias foram diluídas em série (10^1 a 10^4 em PBS), cultivadas em placas de TSA e posteriormente incubadas por mais 24 h a 37°C. A atividade antimicrobiana foi apresentada quantitativamente em termos de % de redução bacteriana calculada como a razão entre o número de colónias de bactérias sobreviventes presentes nas placas de TSA, antes e após o contacto com os filmes. A redução logarítmica em relação ao tempo 0 h foi também apresentada.

V. Referências Bibliográficas

- (1) DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Costs. *J. Health Econ.* **2003**, *22* (2), 151–185.
- (2) Hernández, H.; Grassano, N.; Tübke, A.; Amoroso, S.; Csefalvay, Z.; and Gkotsis, P. *2019 EU Industrial R&D Investment Scoreboard*, 2020.
- (3) *The Pharmaceutical Industry in Figures*, 2020.
- (4) Mittal, B. Pharmaceuticals: A Highly Innovative Business. In *How to Integrate Quality by Efficient Design (QbED) in Product Development*, Elsevier Inc., 2020; pp 27–57.
- (5) Sánchez-Serrano, I. Global Health Care Crisis, the Pharmaceutical Industry, and the Core Model. In *The Core Model*, Academic Press, 2019; pp 103–124.
- (6) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. Synthetic Therapeutic Peptides: Science and Market. *Drug Discov. Today* **2010**, *15* (1–2), 40–56.
- (7) DiMasi, J. A.; Hansen, R. W.; Grabowski, H. G. The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Costs. *J. Health Econ.* **2003**, *22* (2), 151–185.
- (8) Van Norman, G. A. Drugs, Devices, and the FDA: Part 1: An Overview of Approval Processes for Drugs. *JACC Basic to Transl. Sci.* **2016**, *1* (3), 170–179.
- (9) Thomas, D.; John, D.; Ashoush, N.; Lega, F.; Li, H. Chapter 17-Market Access, Pharmaceutical Pricing, and Healthcare Costs. In *Clinical Pharmacy Education, Practice and Research*, Elsevier Inc., 2019; pp 249–259.
- (10) Fair, R. J.; Tor, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect. Medicin. Chem.* **2014**, *6*, 25–64.
- (11) Högberg, L. D.; Heddini, A.; Cars, O. The Global Need for Effective Antibiotics: Challenges and Recent Advances. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31* (11), 509–515.
- (12) Impact Story: Developing the Tools to Evaluate Complex Drug Products: Peptides | FDA <https://www.fda.gov/drugs/regulatory-science-action/impact-story-developing-tools-evaluate-complex-drug-products-peptides> (accessed Oct 24, 2020).
- (13) Chandrudu, S.; Simerska, P.; Toth, I. Chemical Methods for Peptide and Protein Production. *Molecules* **2013**, *18* (4), 4373–4388.
- (14) Mäde, V.; Els-Heindl, S.; Beck-Sickinger, A. G. Automated Solid-Phase Peptide Synthesis to Obtain Therapeutic Peptides. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1197–1212.

- (15) Akash, M. S. H.; Rehman, K.; Tariq, M.; Chen, S. Development of Therapeutic Proteins: Advances and Challenges. *Turkish J. Biol.* **2015**, *39* (3), 1–16.
- (16) Lau, J. L.; Dunn, M. K. Therapeutic Peptides: Historical Perspectives, Current Development Trends, and Future Directions. *Bioorganic Med. Chem.* **2018**, *26* (10), 2700–2707.
- (17) Stevenson, C. Advances in Peptide Pharmaceuticals. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10* (1), 122–137.
- (18) Henninot, A., Collins, J. C., & Nuss, J. M. The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future? *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (4), 1382–1414.
- (19) Mason, J. M. Design and Development of Peptides and Peptide Mimetics as Antagonists for Therapeutic Intervention. *Futur. Med. Chem.* **2010**, *2* (12), 1813–1822.
- (20) Sato, A. K.; Viswanathan, M.; Kent, R. B.; Wood, C. R. Therapeutic Peptides : Technological Advances Driving Peptides into Development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *17*, 638–642.
- (21) Joo, S. H. Cyclic Peptides as Therapeutic Agents and Biochemical Tools. *Biomolecules and Therapeutics.* **2012**, *20* (1), 19-26.
- (22) Di Grazia, A.; Cappiello, F.; Cohen, H.; Casciaro, B.; Luca, V.; Pini, A.; Di, Y. P.; Shai, Y.; Mangoni, M. L. D-Amino Acids Incorporation in the Frog Skin-Derived Peptide Esculentin-1a(1-21)NH₂ Is Beneficial for Its Multiple Functions. *Amino Acids* **2015**, *47* (12), 2505–2519.
- (23) Gomes, B.; Augusto, M. T.; Felício, M. R.; Hollmann, A.; Franco, O. L.; Gonçalves, S.; Santos, N. C. Designing Improved Active Peptides for Therapeutic Approaches against Infectious Diseases. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36* (2), 415–429.
- (24) Dosler, S. Antimicrobial Peptides: Coming to the End of Antibiotic Era, the Most Promising Agents. *Istanbul J. Pharm.* **2017**, *47* (17), 72–76.
- (25) Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A. K. M.; Wertheim, H. F. L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G. L.; Gould, I. M.; Goossens, H.; Greko, C.; So, A. D.; Bigdeli, M.; Tomson, G.; Woodhouse, W.; Ombaka, E.; Peralta, A. Q.; Qamar, F. N.; Mir, F.; Kariuki, S.; Bhutta, Z. A.; Coates, A.; Bergstrom, R.; Wright, G. D.; Brown, E. D.; Cars, O. Antibiotic Resistance-the Need for Global Solutions. *Lancet Infect. Dis.* **2013**, *13* (12), 1057–1098.
- (26) Rossolini, G. M.; Arena, F.; Pecile, P.; Pollini, S. Update on the Antibiotic Resistance Crisis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, *18*, 56–60.

- (27) Lehar, S. M.; Pillow, T.; Xu, M.; Staben, L.; Kajihara, K. K.; Vandlen, R.; DePalatis, L.; Raab, H.; Hazenbos, W. L.; Hiroshi Morisaki, J.; Kim, J.; Park, S.; Darwish, M.; Lee, B. C.; Hernandez, H.; Loyet, K. M.; Lupardus, P.; Fong, R.; Yan, D.; Chalouni, C.; Luis, E.; Khalfin, Y.; Plise, E.; Cheong, J.; Lyssikatos, J. P.; Strandh, M.; Koefoed, K.; Andersen, P. S.; Flygare, J. A.; Wah Tan, M.; Brown, E. J.; Mariathasan, S. Novel Antibody-Antibiotic Conjugate Eliminates Intracellular *S. Aureus*. *Nature* **2015**, 527(7578), 323–328.
- (28) Marr, A. K.; Gooderham, W. J.; Hancock, R. E. Antibacterial Peptides for Therapeutic Use: Obstacles and Realistic Outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6 (5), 468–472.
- (29) U.S. Department of Health and Human Services, CDC. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019 (2019 AR Threats Report)*; 2019.
- (30) Chandra Datta Sumi, Byung Wook Yang, In-Cheol Yeo, and Y. T. H. Antimicrobial Peptides of the Genus *Bacillus*: A New Era for Antibiotics. *Can. J. Microbiol.* **2015**, 61, 93–103.
- (31) SimoneMaria-Neto, Keyla Caroline de Almeida, Maria Ligia RodriguesMacedo, O. L. F. Understanding Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides: From the Surface to Deep Inside. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2015**, 1848(11), 3078–3088.
- (32) Kumar, P.; Kizhakkedathu, J. N.; Straus, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility in Vivo. *Biomolecules* **2018**, 8(1), 4.
- (33) Hollmann, A.; Martinez, M.; Maturana, P.; Semorile, L. C.; Maffia, P. C. Antimicrobial Peptides: Interaction with Model and Biological Membranes and Synergism with Chemical Antibiotics. *Front. Chem.* **2018**, 6, 1–13.
- (34) Pushpanathan, M.; Gunasekaran, P.; Rajendhran, J. Antimicrobial Peptides: Versatile Biological Properties. *Int. J. Pept.* **2013**, 675391, 15.
- (35) Felgueiras, Helena; Amorim, T. Antimicrobial Peptides in Infected Wounds. In *Research Trends of Microbiology*, MedDocs, 2019.
- (36) Brogden, K. A. Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3(3), 238–250.
- (37) Oren, Z.; Shai, Y. Mode of Action of Linear Amphipathic α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biopolymers* **1998**, 47(6), 451–463.
- (38) Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. Antimicrobial Peptides: Premises and Promises.

- Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, 24 (6), 536–547.
- (39) Das, S.; Ben Haj Salah, K.; Djibo, M.; Inguibert, N. Peptaibols as a Model for the Insertions of Chemical Modifications. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, 658, 16–30.
- (40) Crisma, M.; Barazza, A.; Formaggio, F.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Kamphuis, J.; Toniolo, C. Peptaibolin: Synthesis, 3D-Structure, and Membrane Modifying Properties of the Natural Antibiotic and Selected Analogues. *Tetrahedron* **2001**, 57 (14), 2813–2825.
- (41) Castro, V. I. B.; Carvalho, C. M.; Fernandes, R. D. V.; Pereira-Lima, S. M. M. A.; Castanheira, E. M. S.; Costa, S. P. G. Peptaibolin Analogues by Incorporation of α,α -Dialkylglycines: Synthesis and Study of Their Membrane Permeating Ability. *Tetrahedron* **2016**, 72 (7), 1024–1030.
- (42) Ben Haj Salah, K.; Inguibert, N. Efficient Microwave-Assisted One Shot Synthesis of Peptaibols Using Inexpensive Coupling Reagents. *Org. Lett.* **2014**, 16 (6), 1783–1785.
- (43) Sai, K. P.; Jagannadham, M. V.; Vairamani, M.; Raju, N. P.; Devi, A. S.; Nagaraj, R.; Sitaram, N. Tigerinins: Novel Antimicrobial Peptides from the Indian Frog *Rana Tigerina*. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (4), 2701–2707.
- (44) Song, Y.; Lu, Y.; Wang, L.; Yang, H.; Zhang, K.; Lai, R. Purification, Characterization and Cloning of Two Novel Tigerinin-like Peptides from Skin Secretions of *Fejervarya Cancrivora*. *Peptides* **2009**, 30 (7), 1228–1232.
- (45) Tang, J.; Liu, H.; Gao, C.; Mu, L.; Yang, S.; Rong, M.; Zhang, Z.; Liu, J.; Ding, Q.; Lai, R. A Small Peptide with Potential Ability to Promote Wound Healing. *PLoS One* **2014**, 9 (3), e92082.
- (46) Jaradat, D. M. M. Thirteen Decades of Peptide Synthesis: Key Developments in Solid Phase Peptide Synthesis and Amide Bond Formation Utilized in Peptide Ligation. *Amino Acids* **2018**, 50, 39–68.
- (47) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, 16 (2), 97–116.
- (48) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (2), 606–631.
- (49) Williams, P.; Albericio, F.; Giralt, E. . *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*; CRC Press 1997; Vol. 10.

- (50) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
- (51) Benoiton, N. L. *Chemistry of Peptide Synthesis*, 2005, CRC Press.
- (52) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (11), 6557–65602.
- (53) Caporale, A.; Doti, N.; Monti, A.; Sandomenico, A.; Ruvo, M. Automatic Procedures for the Synthesis of Difficult Peptides Using Oxyma as Activating Reagent: A Comparative Study on the Use of Bases and on Different Deprotection and Agitation Conditions. *Peptides* **2018**, *102*, 38–46.
- (54) Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (37), 9394–9403.
- (55) Gabriel, C. M.; Keener, M.; Gallou, F.; Lipshutz, B. H. Amide and Peptide Bond Formation in Water at Room Temperature. *Org. Lett.* **2015**, *17* (16), 3968–3971.
- (56) Roy, J. The Stability of Medicines. *An Introd. to Pharm. Sci.* **2011**, 153–181.
- (57) Dax, S. L. Chapter 1. General Overview. In *Linker Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis*; John Wiley & Sons Ltd., 2009; pp 3–23.
- (58) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154.
- (59) Engelhard, M. Quest for the Chemical Synthesis of Proteins. *J. Pept. Sci.* **2016**, *22*, 246–251.
- (60) Kates, S.; Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*; Marcel Dekker, Inc., 2000.
- (61) Guillier, F.; Orain, D.; Bradley, M. Linkers and Cleavage Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis and Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (6), 2091–2157.
- (62) Isidro-Llobet, A.; Álvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (6), 2455–2504.
- (63) Kappe, C. O.; Pieber, B.; Dallinger, D. Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality? *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *52* (4), 1088–1094.
- (64) Pedersen, S. L.; Tofteng, A. P.; Malik, L.; Jensen, K. J. Microwave Heating in Solid-Phase

- Peptide Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1826–1844.
- (65) Tala, S. R.; Schnell, S. M.; Haskell-Luevano, C. Microwave-Assisted Solid-Phase Synthesis of Side-Chain to Side-Chain Lactam-Bridge Cyclic Peptides. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, 25 (24), 5708–7711.
- (66) Behrendt, R.; White, P.; Offer, J. Advances in Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Sci. an Off. Publ. Eur. Pept. Soc.* **2016**, 22 (1), 4–27.
- (67) Palasek, S. A.; Cox, Z. J.; Collins, J. M. Limiting Racemization and Aspartimide Formation in Microwave-Enhanced Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. *J. Pept. Sci.* **2007**, 13, 143–148.
- (68) Hayes, B. L. *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*; Hayes, B. L., Ed.; CEM Pub, 2002.
- (69) Yu, H. M.; Chen, S. T.; Wang, K. T. Enhanced Coupling Efficiency in Solid-Phase Peptide Synthesis by Microwave Irradiation. *J. Org. Chem.* **1992**, 57 (18), 4781–4784.
- (70) Bacsa, B.; Desai, B.; Dibó, G.; Kappe, O. Rapid Solid-Phase Peptide Synthesis Using Thermal and Controlled Microwave Irradiation. *J. Pept. Sci.* **2006**, 12 (10), 633–638.
- (71) Scalise, A.; Bianchi, A.; Tartaglione, C.; Bolletta, E.; Pierangeli, M.; Torresetti, M.; Marazzi, M.; Di Benedetto, G. Microenvironment and Microbiology of Skin Wounds: The Role of Bacterial Biofilms and Related Factors. *Semin. Vasc. Surg.* **2015**, 28 (3–4), 151–159.
- (72) Plotczyk, M.; Higgins, C. A. Skin Biology. In *Biomaterials for Skin Repair and Regeneration*; Elsevier Ltd, 2019; Vol. 1, pp 3–25.
- (73) Dickinson, L. E.; Gerecht, S. *Engineered Biopolymeric Scaffolds for Chronic Wound Healing*, *Frontiers in physiology*, **2016**, 7, 341.
- (74) Beloin, C.; Renard, S.; Ghigo, J. M.; Lebeaux, D. Novel Approaches to Combat Bacterial Biofilms. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2014**, 18, 61–68.
- (75) Donlan, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2002, pp 881–890.
- (76) Felgueiras, H. P.; Teixeira, M. A.; Tavares, T. D.; Homem, N. C.; Zille, A.; Amorim, M. T. P. Antimicrobial Action and Clotting Time of Thin, Hydrated Poly(Vinyl Alcohol)/Cellulose Acetate Films Functionalized with LL37 for Prospective Wound-Healing Applications. *J.*

- Appl. Polym. Sci.* **2020**, 137(18), 1–12.
- (77) Mangoni, M. L.; Mcdermott, A. M.; Zasloff, M. Antimicrobial Peptides and Wound Healing: Biological and Therapeutic Considerations. *Exp. Dermatol.* **2016**, 25 (3), 167–173.
- (78) Felgueiras, H. P.; Amorim, M. T. P. Functionalization of Electrospun Polymeric Wound Dressings with Antimicrobial Peptides. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, 156, 133–148.
- (79) Glossary of Terms | National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering <https://www.nibib.nih.gov/science-education/glossary/b> (accessed Oct 29, 2020).
- (80) Birla, R. Biomaterials for Tissue Engineering. *Introd. to Tissue Eng.* **2014**, 84–129.
- (81) Sahana, T. G.; Rekha, P. D. Biopolymers: Applications in Wound Healing and Skin Tissue Engineering. *Mol. Biol. Rep.* **2018**, 45 (6), 2857–2867.
- (82) Castilla-Cortázar, I.; Más-Estellés, J.; Meseguer-Dueñas, J. M.; Escobar Ivirico, J. L.; Mari, B.; Vidaurre, A. Hydrolytic and Enzymatic Degradation of a Poly(ϵ -Caprolactone) Network. *Polym. Degrad. Stab.* **2012**, 97 (8), 1241–1248.
- (83) Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32 (8–9), 762–798.
- (84) Felgueiras, H. P.; Teixeira, M. A.; Tavares, T. D.; Amorim, M. T. P. New Method to Produce Poly(Vinyl Alcohol)/Cellulose Acetate Films with Improved Antibacterial Action. *Mater. Today Proc.* **2020**, 10–13.
- (85) Woodruff, M. A.; Hutmacher, D. W. The Return of a Forgotten Polymer - Polycaprolactone in the 21st Century. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35 (10), 1217–1256.
- (86) Baker, S. R.; Banerjee, S.; Bonin, K.; Guthold, M. Determining the Mechanical Properties of Electrospun Poly- ϵ -Caprolactone (PCL) Nanofibers Using AFM and a Novel Fiber Anchoring Technique. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, 59, 203–212.
- (87) Guarino, V.; Gentile, G.; Sorrentino, L.; Ambrosio, L. *Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications*, In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons Ltd., 2017.
- (88) Liao, N.; Unnithan, A. R.; Joshi, M. K.; Tiwari, A. P.; Hong, S. T.; Park, C. H.; Kim, C. S. Electrospun Bioactive Poly (E[open]-Caprolactone)-Cellulose Acetate-Dextran Antibacterial

- Composite Mats for Wound Dressing Applications. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *469*, 194–201.
- (89) Khoshnevisan, K.; Maleki, H.; Samadian, H.; Doostan, M.; Khorramizadeh, M. R. Antibacterial and Antioxidant Assessment of Cellulose Acetate/Polycaprolactone Nanofibrous Mats Impregnated with Propolis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *140*, 1260–1268.
- (90) Bhardwaj, N.; Kundu, S. C. Electrospinning: A Fascinating Fiber Fabrication Technique. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28* (3), 325–347.
- (91) Abrigo, M.; McArthur, S. L.; Kingshott, P. Electrospun Nanofibers as Dressings for Chronic Wound Care: Advances, Challenges, and Future Prospects. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14* (6), 772–792.
- (92) Thenmozhi, S.; Dharmaraj, N.; Kadirvelu, K.; Kim, H. Y. Electrospun Nanofibers: New Generation Materials for Advanced Applications. *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* **2017**, *217*, 36–48.
- (93) Ibrahim, H. M.; Klingner, A. A Review on Electrospun Polymeric Nanofibers: Production Parameters and Potential Applications. *Polym. Test.* **2020**, *90* (February), 106647.
- (94) Meng, Z. X.; Zeng, Q. T.; Sun, Z. Z.; Xu, X. X.; Wang, Y. S.; Zheng, W.; Zheng, Y. F. Immobilizing Natural Macromolecule on PLGA Electrospun Nanofiber with Surface Entrapment and Entrapment-Graft Techniques. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2012**, *94*, 44–50.
- (95) Son, Y. J.; Kim, W. J.; Yoo, H. S. Therapeutic Applications of Electrospun Nanofibers for Drug Delivery Systems. *Arch. Pharm. Res.* **2014**, *37* (1), 69–78.
- (96) Rasouli, R.; Barhoum, A.; Bechelany, M.; Dufresne, A. Nanofibers for Biomedical and Healthcare Applications. *Macromol. Biosci.* **2019**, *19* (2), 1–27.
- (97) Bilginer, R.; Arslan Yildiz, A. A Facile Method to Fabricate Propolis Enriched Biomimetic PVA Architectures by Co-Electrospinning. *Mater. Lett.* **2020**, *276*, 128191.
- (98) Yoo, H. S.; Kim, T. G.; Park, T. G. Surface-Functionalized Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (12), 1033–1042.
- (99) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds 7ed 2005 - Silverstein, Webster & Kiemle.Pdf. *Microchemical Journal*. 2005,

- p 496.
- (100) Mishra, R. K.; Cherusseri, J.; Bishnoi, A.; Thomas, S. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*; Elsevier Inc., 2017; Vol. 2, pp 369–415.
 - (101) Tanzi, M. C.; Farè, S.; Candiani, G. Techniques of Analysis. In *Foundations of Biomaterials Engineering*; Elsevier Ltd., 2019; pp 393–469.
 - (102) Lozano-Sánchez, J.; Borrás-Linares, I.; Sass-Kiss, A.; Segura-Carretero, A. Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In *Modern Techniques for Food Authentication*; Elsevier Ltd., 2018; pp 459–526.
 - (103) Grubb, D. T. Optical Microscopy. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set*; Elsevier B.V., 2012; Vol. 2, pp 465–478.
 - (104) Parry V, K. D. Microscopy : An Introduction. *III-Vs Rev.* **2000**, *13* (4), 40–44.
 - (105) Sinha Ray, S. Structure and Morphology Characterization Techniques. *Clay-Containing Polym. Nanocomposites* **2013**, 39–66.
 - (106) Wang, H.; Chu, P. K. Surface Characterization of Biomaterials. In *Characterization of Biomaterials*; Elsevier, 2013; pp 105–174.
 - (107) Akash, M. S. H.; Rehman, K.; Akash, M. S. H.; Rehman, K. Ultraviolet-Visible (UV-VIS) Spectroscopy. In *Essentials of Pharmaceutical Analysis*; Springer, 2020; pp 29–56.
 - (108) Menczel, J. D.; Prime, R. B. Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications. In *Thermal Analysis of Polymers: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons Ltd., 2008; pp 1–688.
 - (109) Barbeș, L.; Rădulescu, C.; Stihi, C. ATR-FTIR Spectrometry Characterisation of Polymeric Materials. *Rom. Reports Phys.* **2014**, *66* (3), 765–777.
 - (110) Kazarian, S. G.; Chan, K. L. A. Applications of ATR-FTIR Spectroscopic Imaging to Biomedical Samples. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2006**, *1758* (7), 858–867.
 - (111) Toshev, B. V.; Platikanov, D. Wetting: Gibbs' Superficial Tension Revisited. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *291* (1–3), 177–180.
 - (112) Biazar, E.; Heidari, M.; Asefnejad, A.; Montazeri, N. The Relationship between Cellular Adhesion and Surface Roughness in Polystyrene Modified by Microwave Plasma Radiation.

- Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 631–639.
- (113) Rodríguez-Valverde, M. A.; Cabrerizo-Vilchez, M. A.; Rosales-López, P.; Páez-Dueas, A.; Hidalgo-Álvarez, R. Contact Angle Measurements on Two (Wood and Stone) Non-Ideal Surfaces. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, *206* (1–3), 485–495.
- (114) Jańczuk, B.; Wójcik, W.; Zdziennicka, A. Determination of the Components of the Surface Tension of Some Liquids from Interfacial Liquid-Liquid Tension Measurements. *J. Colloid And Interface Sci.* **1993**, *157* (2), 384–393.
- (115) Jańczuk, B.; Białopiotrowicz, T. Surface Free-Energy Components of Liquids and Low Energy Solids and Contact Angles. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *127* (1), 189–204.
- (116) Kozbial, A.; Li, Z.; Conaway, C.; McGinley, R.; Dhingra, S.; Vahdat, V.; Zhou, F.; Durso, B.; Liu, H.; Li, L. Study on the Surface Energy of Graphene by Contact Angle Measurements. *Langmuir* **2014**, *30* (28), 8598–8606.
- (117) Amblard, M.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J.; Subra, G. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. *Mol. Biotechnol.* **2003**, *33*, 239–254.
- (118) Mergler, M.; Durieux, J. P. *The Bachem Practice of SPPS*; Bachem, 2005.
- (119) Mochane, M. J.; Motsoeneng, T. S.; Sadiku, E. R.; Mokhena, T. C.; Sefadi, J. S. Morphology and Properties of Electrospun PCL and Its Composites for Medical Applications: A Mini Review. *Appl. Sci.* **2019**, *9* (11), 1–17.
- (120) Wsoo, M. A.; Shahir, S.; Mohd Bohari, S. P.; Nayan, N. H. M.; Razak, S. I. A. A Review on the Properties of Electrospun Cellulose Acetate and Its Application in Drug Delivery Systems: A New Perspective. *Carbohydr. Res.* **2020**, *491*, 107978.
- (121) Young, C. D.; Wu, J. R.; Tsou, T. L. Fabrication and Characteristics of PolyHEMA Artificial Skin with Improved Tensile Properties. *J. Memb. Sci.* **1998**, *146* (1), 83–93.
- (122) Adeli, H.; Khorasani, M. T.; Parvazinia, M. Wound Dressing Based on Electrospun PVA/Chitosan/Starch Nanofibrous Mats: Fabrication, Antibacterial and Cytocompatibility Evaluation and in Vitro Healing Assay. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *122*, 238–254.
- (123) Owens, D. K. . W. R. C. Estimation of the Surface Free Energy of Polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1969**, *13*, 1741–1747.