

Universidade do Minho
Escola de Ciências

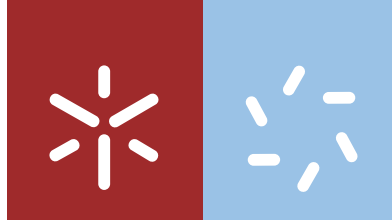
Ana Francisca Gomes da Silva

**Síntese de péptidos antimicrobianos
e imobilização em estruturas microfibrosas
produzidas por *wet-spinning* com potencial
para o tratamento de feridas cutâneas**

Ana Francisca Gomes da Silva **Síntese de péptidos antimicrobianos e imobilização em estruturas microfibrosas produzidas por *wet-spinning* com potencial para o tratamento de feridas cutâneas**

UMinho | 2021

dezembro de 2021



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Ana Francisca Gomes da Silva

**Síntese de péptidos antimicrobianos
e imobilização em estruturas microfibrosas
produzidas por *wet-spinning* com potencial
para o tratamento 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.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho:



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações

CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Ao longo do desafiante período de desenvolvimento deste trabalho, foi-me confidenciado em alturas de maior dificuldade, por aqueles que me orientaram ao longo deste percurso, que o objetivo da tese de mestrado é a aprendizagem. Assim sendo, estou certa de que o objetivo foi alcançado na íntegra. Orgulho-me de ter cumprido o objetivo pessoal de conciliar a realização deste trabalho com a expansão do meu currículo científico. E que o fiz com a resiliência de quem se esforça, com a convicção de que, mais tarde ou mais cedo, o esforço é recompensado.

Agradeço aos meus pais e irmã, que foram uma fonte de incentivo nos momentos difíceis, compreendendo a minha ausência, enfatizando a minha mãe, que sempre me ensinou que desistir não é palavra que “faça parte do nosso dicionário”. Ao Luís, agradeço o amor, paciência e dedicação completamente indispensáveis. As minhas amigas, agradeço a força constante que me enviaram, mesmo quando só foi possível fazê-lo à distância. A todos agradeço algo que parecem ter em comum, acreditar mais em mim do que eu própria.

Agradeço a infinita paciência para comigo à Professora Doutora Sílvia Lima, levo os seus ensinamentos, agradeço à Doutora Helena Felgueiras a generosidade de me receber como parte da sua equipa, e agradeço à Professora Doutora Susana Costa pelo exemplo na ciência, que nos incentiva a traçar o nosso próprio rumo. Agradeço ao Departamento de Química da Universidade do Minho por ter permitido o desenvolvimento de grande parte deste trabalho nas suas instalações. Desta forma voltei ao laboratório 40, e agradeço aos meus colegas porque o companheirismo foi uma constante.

Agradeço ao Centro de Ciência e Tecnologia Têxtil (2C2T) da Universidade do Minho pela disponibilidade para que fosse desenvolvida parte do trabalho nas suas instalações e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo financiamento do projeto onde este trabalho se insere, o projeto PEPTX PTDC/CTMTEX/28074/2017 (POCI-01-0145-FEDER-028074). Agradeço à equipa do 2C2T que me acolheu, especialmente à Catarina por ter batalhado comigo na reta final e à Martinha pelo carinho.

Sinto a necessidade de dedicar este trabalho a uma das pessoas que mais me incentivou a ser persistente no meu percurso académico, e que é uma das pessoas que mais admirei, à minha avó Matilde.

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.

Título: Síntese de péptidos antimicrobianos e imobilização em estruturas microfibrosas produzidas por *wet-spinning* com potencial para o tratamento de feridas cutâneas

Resumo

O crescente surgimento e desenvolvimento de feridas crónicas tem-se tornado um problema grave a nível mundial. Com o aumento da esperança média de vida e o envelhecimento da população, a incidência de doenças venosas e arteriais, que levam ao aparecimento destas feridas tende a agravar-se, sendo já considerado pela Organização Mundial de Saúde uma epidemia global. Estas feridas não estão somente associadas a uma diminuição drástica da qualidade de vida dos pacientes, como também a graves infeções, desregulações do sistema imunitário e até à morte. A aplicação de péptidos antimicrobianos e/ou imunoregulatórios no tratamento destas feridas surge como uma alternativa de elevado potencial para ultrapassar estas dificuldades.

Neste trabalho foram sintetizados através da técnica de síntese peptídica em fase sólida os péptidos AAPV, dotado de capacidades para regular a atividade da elastase de neutrófilos humanos (HNE), demasiado elevada em feridas crónicas, e o péptido CW49, capaz de estimular a fase de angiogénese e de diminuir a prolongada ação inflamatória também característica das feridas crónicas. Os péptidos foram estruturalmente caracterizados por ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa com ionização por *electrospray* e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada. A sua pureza foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência.

Foram produzidas por *wet-spinning* fibras com estrutura co-axial. A camada externa foi construída com alginato de sódio (2% m/v) combinado com *N*-carboximetilquitosano (ao dobro da sua concentração mínima bactericida estabelecida contra a bactéria *Staphylococcus aureus*), um polímero responsivo a pH neutro e básico, e um núcleo por policaprolactona (10% m/v) e o péptido AAPV (a 1,5 µg/mL, concentração que garante mais de 40% de inibição da HNE). As fibras foram quimicamente e morfologicamente avaliadas por ATR-FTIR e microscopia ótica de campo claro, o seu grau de hidratação e perfil de degradação a 28 dias estudados e a sua capacidade de inibir a HNE assim como a sua atividade antimicrobiana contra *S. aureus* confirmadas. Os dados recolhidos demonstraram o potencial das fibras co-axiais de SA-NCMC-PCL-AAPV para o desenvolvimento de uma nova geração de pensos bioativos para o tratamento de feridas crónicas.

Palavras-chave: feridas crónicas; pensos bioativos; péptidos antimicrobianos.

Title: Antimicrobial peptide synthesis and functionalization into microfibers produced by wet-spinning with potential to the chronic wounds treatment

Abstract

The emergence and development of chronic wounds has become a huge problem worldwide. With the increase in average life expectancy and consequent ageing populations, the frequency of venous and arterial diseases, that lead to the appearance of this wounds tends to get worse. It is already considered a global epidemic by the World Health Organization. These wounds are not just associated to a drastic decrease of patient life quality, they are also associated to serious infections, immune system dysregulations and even dead. The application of antimicrobial peptides emerges as an alternative to overcome these difficulties with high potential.

In this work, the peptides AAPV, with the ability to regulate the human neutrophil elastase (HNE) activity, too high in chronic wounds, and the CW49 peptide, capable of stimulating the angiogenesis and decreasing the prolonged inflammatory stage characteristic of chronic wounds, were synthesized by solid phase peptide synthesis. The peptides were structurally characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy, electrospray ionization mass spectrometry and Fourier transform infrared spectroscopy–attenuated total reflectance, and its purity accessed by high performance liquid chromatography.

Coaxial fibers were produced by wet-spinning techniques, with the external layer constituted by sodium alginate (2% w/v) and *N*-carboxymethyl chitosan (at the double of its minimum bactericidal concentration established against *Staphylococcus aureus*), a responsive polymer to neutral-basic pH, and a core of polycarolactone (10% w/v) and AAPV peptide (at 1.5 µg/mL, the concentration that ensures more than 40% inhibition of HNE). The fibers were chemically and morphologically characterized by ATR-FTIR and brightfield microscopy, its swelling degree and degradation profile at 28 days studied and its capacity of HNE inhibition as well as its antibacterial activity against *S. aureus* confirmed. Data showed the potential of SA-NCMC-PCL-AAPV coaxial fibers in the development of a new generation of bioactive wound dressings.

Keywords: antimicrobial peptides; bioactive dressings; chronic wounds.

Índice geral

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Declaração de integridade	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice geral	vii
Índice de figuras.....	x
Índice de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas e siglas	xiv
Comunicações.....	xvii
1. Introdução	1
1.1. Potencial terapêutico dos péptidos.....	1
1.2. Péptidos antimicrobianos	4
1.3. Tratamento de feridas agudas e crónicas.....	6
1.4. Péptidos antimicrobianos no tratamento de feridas agudas e crónicas.....	8
1.4.1. Alanina-Alanina-Prolina-Valina (AAPV)	8
1.4.2. CW49.....	10
1.5. Síntese peptídica em fase sólida.....	12
1.5.1. Suportes sólidos e <i>linkers</i>	14
1.5.2. Reagentes de acoplamento.....	15
1.5.3. Grupos protetores.....	19
1.5.4. Radiação micro-ondas.....	20
1.6. Pensos ou <i>wound dressings</i>	22
1.7. Produção de microfibras.....	23
1.7.1. <i>Wet-spinning</i>	23
1.7.1.1. <i>Wet-spinning</i> co-axial.....	24
1.7.1.2. Modificação de fibras produzidas por <i>wet-spinning</i> com agentes ativos.....	25
1.7.2. Polímeros.....	26
1.7.2.1. Alginato de sódio.....	27

1.7.2.2.	Gelatina	28
1.7.2.3.	Quitossano	29
1.7.2.4.	Policaprolactona	30
1.8.	Objetivo	31
2.	Resultados e discussão	32
2.1.	Síntese e caracterização de péptidos bioativos	32
2.1.1.	Péptido Ala-Ala-Pro-Val	32
2.1.2.	Péptido CW49	46
2.2.	Avaliação da atividade antibacteriana do péptido AAPV e do polímero NCMC	58
2.3.	Inibição da atividade da enzima elastase pelo péptido AAPV	59
2.4.	Produção de fibras co-axiais	59
2.4.1.	SA-NCMC-GN-AAPV	60
2.4.2.	SA-NCMC-PCL-AAPV	62
2.5.	Viscosidade das soluções poliméricas	63
2.6.	Caracterização química e física das fibras	64
2.6.1.	Microscopia ótica de campo claro	64
2.6.2.	ATR-FTIR	66
2.6.3.	Grau de hidratação	67
2.6.4.	Degradação das fibras	68
2.7.	Atividade antimicrobiana das fibras	70
2.8.	Inibição da HNE das fibras	71
3.	Conclusões e perspetivas futuras	74
4.	Secção experimental	77
4.1.	Materiais e reagentes	77
4.2.	Procedimentos gerais de SPPS	78
4.2.1.	Ligação do primeiro aminoácido à resina cloreto de 2-clorotritilo	78
4.2.2.	Determinação do <i>loading</i> da resina	78
4.2.3.	Desproteção do <i>N</i> -terminal dos aminoácidos	78
4.2.4.	Acoplamento dos aminoácidos	79
4.2.5.	Testes TNBS	79
4.2.6.	Separação do péptido da resina cloreto de 2-clorotritilo	79
4.2.7.	Desproteção das cadeias laterais dos aminoácidos	80

4.2.8.	HPLC analítico e preparativo.....	80
4.2.9.	ESI-MS	80
4.3.	Péptido AAPV	80
4.3.1.	SPPS assistida por micro-ondas.....	80
4.3.2.	SPPS convencional	82
4.4.	Síntese do CW49	83
4.5.	Testes de atividade antimicrobiana (MIC e MBC: AAPV e NCMC).....	84
4.6.	Inibição HNE pelo AAPV	85
4.7.	Produção de fibras	86
4.7.1.	Preparação de soluções poliméricas	86
4.7.2.	Teste de viscosidade das soluções poliméricas.....	86
4.7.3.	Produção de fibras co-axiais SA-NCMC-GN-AAPV por <i>wet-spinning</i>	87
4.7.4.	Produção de fibras co-axiais SA-NCMC-PCL-AAPV por <i>wet-spinning</i>	87
4.8.	Caracterização física e química	88
4.8.1.	Microscopia ótica de campo claro	88
4.8.2.	ATR-FTIR	88
4.8.3.	Grau de hidratação	89
4.8.4.	Degradação das fibras	89
4.9.	Atividade antimicrobiana das fibras.....	89
4.10.	Inibição da HNE pelas fibras	90
5.	Referências bibliográficas.....	91

Índice de figuras

Figura 1- Péptido <i>Afamelanotide (Scenesse®)</i> , a rosa os dois aminoácidos que diferem do seu análogo natural (adaptado da referência 13).	3
Figura 2- Estrutura química do <i>Enfortumab Vedotin-ejfv (Padcev®)</i> . Legenda: (preto) molécula 6-maleimido-1-hexanol que se liga ao anticorpo pelo átomo de enxofre; (cor-de-rosa) péptido valina-citrulina; (roxo) espaçador p-aminobenzil carbamato; (vermelho) fármaco, o péptido MMAE (adaptado da referência 13).....	3
Figura 3- Alguns dos modos de ação dos péptidos antimicrobianos que facilitam o processo de cura de feridas (adaptado da referência 22).	4
Figura 4- Mecanismos mais comuns de disrupção da membrana microbiana por parte dos péptidos antimicrobianos (adaptado da referência 27).	5
Figura 5- Processo de regeneração de tecidos em feridas, subdividido em quatro fases interligadas (adaptado da referência 37).....	7
Figura 6- Estrutura do péptido AAPV.	9
Figura 7- a) Sítio ativo da HNE, com os resíduos positivos representados a azul e os negativos a vermelho, e as posições dos subsítios a amarelo; b) esquema ilustrativo da nomenclatura Schechter and Berger (1967), os subsítios S da enzima acomodam os resíduos P do substrato. A numeração começa a seguir ao sítio de clivagem, P_1 e P_1' e continua no sentido do terminal $N(P_2, P_3)$ e do terminal $C(P_2', P_3')$ (retirado da referência 52).....	10
Figura 8- Estrutura do péptido CW49.	11
Figura 9- Representação de um péptido protegido ligado a um suporte sólido através de um <i>linker</i>	12
Figura 10- Processo de síntese de péptidos por SPPS.	13
Figura 11- Estruturas dos grupos funcionais de algumas resinas (adaptado da referência 65).....	15
Figura 12- Formação da ligação peptídica. X= grupo eletroretirador (adaptado da referência 67).....	15
Figura 13- Mecanismos de racemização durante o passo de ativação do acoplamento de aminoácidos (adaptado da referência 68).....	16
Figura 14- Reagentes de acoplamento mais utilizados (adaptado da referência 69).....	16
Figura 15- Estruturas das carbodiímidas, <i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiímida (DIC) e <i>N,N'</i> -díciclohexilcarbodiímida (DCC) (adaptado da referência 69).....	17
Figura 16- Mecanismo de acoplamento mediado por carbodiímidas (adaptado da referência 68).....	17

Figura 17- Estrutura de alguns dos aditivos utilizados com as carbodiimidas para prevenção da racemização (adaptado da referência 70).	18
Figura 18- Esquema de acoplamento mediado por esteres ativos (adaptado da referência 68).	18
Figura 19- Estrutura dos grupos de proteção α -amino <i>tert</i> -butiloxicarbonilo (Boc) e de proteção da cadeia lateral benzilo (Bn) (adaptado da referência 72).	19
Figura 20- Estrutura dos grupos de proteção α -amino 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) e de proteção da cadeia lateral <i>tert</i> -butilo (<i>t</i> Bu) e tritilo (Trt) (adaptado da referência 65).	19
Figura 21- Remoção do grupo Fmoc mediada por base (piperidina) (adaptado da referência 68).	20
Figura 22- Representação ilustrativa de: a) uma forma de aquecimento convencional; b) do aquecimento proporcionado por irradiação micro-ondas (retirado da referência 77).	21
Figura 23- Efeito da radiação micro-ondas na cadeia peptídica (retirado da referência 2).	21
Figura 24- Alguns tipos de <i>wound dressings</i> (adaptado da referência 84).	23
Figura 25- Aparelho de <i>wet-spinning</i> (retirado da referência 87).	24
Figura 26- Sistema de <i>wet-spinning</i> co-axial (adaptado da referência 88).	24
Figura 27- Estrutura de um bloco de ácido D-manurónico, alginato de sódio (SA).	28
Figura 28- Estrutura da gelatina (GN).	29
Figura 29- Estruturas de: a) quitosano; b) <i>N</i> -carboximetilquitosano (NCCM).	30
Figura 30- Estrutura do polímero policaprolactona (PCL).	31
Figura 31- Esquema das condições de reação utilizadas para a síntese do péptido AAPV.	33
Figura 32- Cromatograma HPLC do péptido AAPV obtido na primeira síntese após recristalização. ...	34
Figura 33- Espectro de RMN de ^1H do AAPV em CD_3OD	36
Figura 34- Espectro de RMN de ^{13}C do AAPV em CD_3OD	36
Figura 35- Espectro de HMQC do AAPV em CD_3OD	37
Figura 36- Espectro de HMBC do AAPV em CD_3OD	38
Figura 37- Espectro de RMN de ^1H do AAPV em DMSO-d_6 com TFA.	40
Figura 38- Espectro de RMN de ^{13}C do AAPV em DMSO-d_6 com TFA.	40
Figura 39- Espectro de HMQC do AAPV em DMSO-d_6 com TFA.	41
Figura 40- Espectro de HMBC do AAPV em DMSO-d_6 com TFA.	42
Figura 41- Espectro de ATR-FTIR do péptido AAPV.	44
Figura 42- Espectro de massa do AAPV, obtido por ESI-MS em modo de ionização negativa.	45
Figura 43- Espectro de massa do AAPV, obtido por ESI-MS em modo de ionização negativa, com ionização do fragmento m/z 355.	45

Figura 44- Estrutura do péptido CW49..	46
Figura 45- Estrutura do péptido CW49 com os grupos de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos.....	47
Figura 46- Esquema das condições de reação utilizadas para a síntese do péptido CW49.	49
Figura 47- Cromatograma HPLC do péptido: a) obtido na primeira síntese da primeira metade; b) obtido na primeira síntese da segunda metade da resina; c) obtido na segunda síntese.....	50
Figura 48- Esquema ilustrativo da formação de péptidos de deleção que leva à utilização de resinas de baixa funcionalização.....	51
Figura 49- Imagens dos testes TNBS a) controlo positivo; b) resultado positivo; c) resultado negativo.....	52
Figura 50- Ativação da Fmoc-Arg(Pbf)-OH e formação de uma δ -lactama (retirado da referência 135).	52
Figura 51- Cromatograma HPLC do péptido: a) obtido na terceira síntese; b) obtido na quarta síntese..	54
Figura 52- Espectro de ATR-FITR das fibras produzidas com SA, GN e NCMC e dos polímeros individuais na forma de pó.....	61
Figura 53- Fotografias das fibras co-axiais SA-PCL (o PCL a branco no interior das fibras e SA transparente no exterior).	63
Figura 54- Variação da viscosidade das soluções poliméricas com a temperatura.	63
Figura 55- Imagens de microscopia ótica de campo claro capturadas com ampliação 10 \times	65
Figura 56- Experiência com SA e PCL. Colocou-se SA até à linha preta (assinalada com uma seta) e de seguida adicionou-se PCL.	66
Figura 57- Espectro de ATR-FTIR das fibras produzidas com SA, PCL, NCMC e AAPV.	67
Figura 58- a) Evolução do número de bactérias <i>S. aureus</i> ao longo do tempo (até 24 horas de incubação), em contato com as fibras produzidas; b) Logaritmo da redução do número de colónias viáveis da bactéria <i>S. aureus</i> ao longo do tempo (até 24 horas de incubação) em relação ao controlo.	71
Figura 59- Inibição da atividade da HNE pelo AAPV incorporado nas fibras PCL-AAPV, SA-PCL-AAPV e SA-NCMC-PCL-AAPV, durante um período de 24 horas de incubação em 0,1 M PBS, pH 7,5, a 37°C.	72

Índice de tabelas

Tabela 1- Comparação do rendimento das quatro sínteses de AAPV realizadas.	33
Tabela 2- Tabela resumo da atribuição dos sinais de RMN ¹ H e ¹³ C, do péptido AAPV em CD ₃ OD.	39
Tabela 3- Tabela resumo da atribuição dos sinais de RMN ¹ H e ¹³ C, do péptido AAPV em DMSO-d ₆ com TFA.	43
Tabela 4- Condições testadas para o acoplamento do aminoácido Arg (3 ^a e 4 ^a sínteses CW49).	53
Tabela 5- Comparação do rendimento das sínteses de CW49 realizadas.	54
Tabela 6- Tabela resumo da atribuição dos sinais de RMN ¹ H e ¹³ C, do péptido CW49 em DMSO-d ₆ com TFA.	56
Tabela 7- Diâmetros das fibras determinados a partir de 5 imagens de ampliação 5× sobre as quais 5 medições foram realizadas por imagem, com recurso ao software ImageJ.	65
Tabela 8- Grau de hidratação (%) dos diferentes tipos de fibra produzidos após 24 horas de imersão em PBS.	68
Tabela 9- Perfil de degradação das fibras durante um período de 28 dias em 0,1 M PBS a pH 7,5 e 37°C. Os dados são apresentados em percentagem de redução de massa ± desvio padrão (n=3).	69

Lista de abreviaturas e siglas

a.a.	aminoácido
ACD	Conjugado fármaco-anticorpo (do inglês: <i>Antibody Drug Conjugate</i>)
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
ATR-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (do inglês: <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy – Attenuated Total Reflectance</i>)
Bn	Grupo benzilo
Boc	Grupo <i>tert</i> -butiloxicarbonilo
br s	Singleto largo (do inglês: <i>broad singlet</i>)
CFUs	Unidades Formadoras de Colônias (do inglês: <i>Colony Forming Units</i>)
Cys	Cisteína
d	Dupleto
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclo-hexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DEPT	Aumento do sinal sem distorção por transferência de polarização (do inglês: <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
dH ₂ O	Água destilada
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	Diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N'</i> -Dimetilformamida
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DVB	Divinilbenzeno
EE	Éter etílico
ESI-MS	Espectrometria de massa com Ionização por <i>Electrospray</i> (do inglês: <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>)
eNOS	Sintase endotelial do óxido nítrico (do inglês: <i>Endothelial nitric oxide synthase</i>)

eq.	Equivalentes
FDA	Administração de Alimentos e Fármacos dos EUA (do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>)
Fmoc	Grupo 9-fluorenilmetiloxicarbonilo
Gly	Glicina
GN	Gelatina (do inglês: <i>gelatin</i>)
HIF-1 α	Fator indutível por hipóxia 1 alfa (do inglês: <i>Hypoxia-inducible factor</i>)
HMBC	Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (do inglês: <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
HMQC	Correlação heteronuclear múltipla quântica (do inglês: <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>)
HNE	Elastase de neutrófilos humanos (do inglês: <i>Human neutrophil elastase</i>)
HOBT-6-Cl	6-cloro-1-hidroxibenzotriazole
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: <i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i>)
HOAt	<i>N</i> -Hidroxiabenzotriazole
HOBT	<i>N</i> -Hidroxibenzotriazole
IL-6	Interleucina-6 (do inglês: <i>Interleukin-6</i>)
Ile	Isoleucina
iNOS	Sintase indutível do óxido nítrico (do inglês: <i>Inducible nitric oxide synthase</i>)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MBC	Concentração mínima bactericida (do inglês: <i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)
Me	Metilo
Met	Metionina
MHB	Caldo <i>Mueller Hinton</i> (do inglês: <i>Mueller Hinton broth</i>)
MIC	Concentração mínima inibitória (do inglês: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MMAE	Monometil auristatina E
MW-SPPS	Síntese peptídica em fase sólida assistida por micro-ondas (do inglês: <i>Microwave Assisted Solid Phase Peptide Synthesis</i>)
NCMC	<i>N</i> -carboximetilquitosano
Nle	Norleucina

Oxyrna®	Etilcianogloxilato-2-oxima
Pbf	Grupo 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês: <i>Phosphate buffer saline solution</i>)
PCL	Policaprolactona
PEG	Polietileno glicol
Phe	Fenilalanina
PS	Poliestireno
Pro	Prolina
PVA	Álcool polivinílico (do inglês: <i>poly(vinyl alcohol)</i>)
q	Quarteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
SA	Alginato de sódio (do inglês: <i>sodium alginate</i>)
SLPI	Inibidor da protease de leucócito secretor (do inglês: <i>Secretory leucocyte protease inhibitor</i>)
SPPS	Síntese peptídica em fase sólida (do inglês: <i>Solid phase peptide synthesis</i>)
<i>t</i> Bu	Grupo <i>terc</i> -butilo
TFA	Ácido trifluoroacético (do inglês: <i>trifluoroacetic acid</i>)
TFE	Trifluoroetanol (do inglês: <i>trifluoroethanol</i>)
Thr	Treonina
TIPS	Triisopropililano
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (do inglês: <i>2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral α (do inglês: <i>Tumour necrosis factor-α</i>)
Trt	Grupo tritilo
TSA	Agar com triptona e soja (do inglês: <i>trypticase soy agar</i>)
UV-Vis	Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível
Val	Valina

Comunicações

O trabalho aqui descrito foi apresentado em congressos científicos:

- Silva, A. F. G.; Felgueiras, H. P.; Costa, S. P. G.; Pereira-Lima, S. M. M. A. Exploring the antibacterial potential of human neutrophil elastase inhibitor Ala-Ala-Pro-Val synthesized using microwave-assisted solid phase, The 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1–30 November 2020, MDPI: Basel, Switzerland, doi:10.3390/ECMC2020-07414
- Silva, A. F. G.; Felgueiras, H. P.; Costa, S. P. G.; Pereira-Lima, S. M. M. A. Synthesis of the human neutrophil elastase inhibitor Ala-Ala-Pro-Val using microwave-assisted solid phase, 14-16 July 2021, comunicação oral no XXVII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química
- Miranda, C. S.; Silva, A. F. G.; Teixeira, M. O.; Pereira-Lima, S. M. M. A; Costa, S. P. G.; Homem, N. C.; Felgueiras, H. P.; pH-responsive, wet-spun coaxial microfibers loaded with Ala-Ala-Pro-Val peptide for prospective chronic wound care, 31st Conference of the European Society for Biomaterials, 5-9 September 2021

Durante o desenvolvimento do trabalho aqui apresentado, colaborou-se também nos seguintes artigos:

- Antunes, J. C.; Domingues, J. M.; Miranda, C. S.; Silva, A. F. G.; Homem, N. C.; Amorim, M. T. P.; Felgueiras, H. P. Bioactivity of Chitosan-Based Particles Loaded with Plant-Derived Extracts for Biomedical Applications: Emphasis on Antimicrobial Fiber-Based Systems. *Mar. Drugs* 2021, 19 (7). <https://doi.org/10.3390/md19070359>.
- Miranda, C. S.; Silva, A. F. G.; Pereira-Lima, S. M. M. A.; Costa, S. P. G.; Homem, N. C.; Felgueiras, H. P. Tunable spun fiber constructs in biomedicine: influence of processing parameters in the fiber's architecture. *Pharmaceutics* 2021 (submetido)

1. Introdução

1.1. Potencial terapêutico dos péptidos

Os péptidos, tal como as proteínas, são compostos por aminoácidos conectados por ligações amida. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), os péptidos são frequentemente caracterizados por possuírem baixo peso molecular, sendo formados por menos de 100 aminoácidos.¹ Estas moléculas estão envolvidas em inúmeros processos bioquímicos e fisiológicos desde o metabolismo à comunicação celular.² Algumas delas têm atividades terapêuticas, tais como atividade anti-inflamatória, analgésica e anticancerígena, daí o interesse para a formulação de fármacos. No entanto a sua administração enfrenta alguns obstáculos, que dificultam o aproveitamento do seu potencial farmacêutico.

As propriedades físico-químicas dos péptidos determinam as suas características farmacocinéticas e, conseqüentemente, se são bons candidatos a fármacos. A farmacocinética abrange o estudo da absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco.³ Aqui, várias propriedades são determinantes, incluindo a solubilidade do péptido em água, lipofilicidade, capacidade de formar pontes de hidrogénio, estabilidade química e estabilidade metabólica (degradação enzimática), e a capacidade de atravessar membranas biológicas e barreiras celulares. São atribuídas aos péptidos algumas limitações derivadas das suas propriedades, tais como, um tempo de vida curto por causa da rápida degradação pelo ácido clorídrico do estômago, por enzimas proteolíticas presentes no restante sistema digestivo e no plasma sanguíneo; baixa biodisponibilidade oral (motivo pelo qual são frequentemente aplicados de forma intravenosa ou subcutânea); pouca habilidade para atravessar barreiras fisiológicas; e rápida remoção da circulação pelo fígado (clearance hepática) e rins (clearance renal).^{4,5}

As peptidases (enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas) são uma das grandes ameaças aos péptidos terapêuticos.⁶ Encontram-se em grandes quantidades, por exemplo, no lúmen do intestino delgado, podem ser secretadas pelo pâncreas (tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidases, etc.) e também estão presentes na membrana microvilosa das células epiteliais.⁷ No entanto, ao comparar péptidos com outras moléculas destinadas a fins terapêuticos, como por exemplo pequenas moléculas orgânicas que constituem os medicamentos tradicionais, algumas vantagens sobressaem: os produtos da degradação de péptidos são aminoácidos, o que reduz os riscos de toxicidade; interações fármaco-fármaco são minimizadas; e devido ao seu curto tempo de meia vida, poucos péptidos ficam acumulados em tecidos (redução dos riscos de complicações causadas pelos seus metabolitos).^{4,8,9} Relativamente às proteínas e anticorpos, os péptidos por apresentarem menor tamanho, têm maior facilidade em penetrar

nos tecidos. Adicionalmente, têm também menos custos de produção do que as proteínas e anticorpos (produção sintética *vs* recombinante), e têm menor probabilidade de provocar uma resposta do sistema imunitário.¹⁰

A maioria dos péptidos terapêuticos utilizados, que derivam de péptidos naturais, têm como objetivo ativar os recetores alvo, sendo classificados como péptidos agonistas. Estes requerem menores quantidades do que os antagonistas para serem eficazes (5-20% da população do recetor).¹¹ Os fármacos antagonistas têm como objetivo inibir as interações ligando-recetor e devem ocupar mais de 50% da população do recetor para serem efetivos.¹²

Apesar das inerentes limitações de utilização, os péptidos têm vindo a tornar-se sérios candidatos a fármacos graças a novas estratégias de administração, nomeadamente estratégias de entrega local, que ultrapassam as dificuldades farmacocinéticas destas moléculas. Os péptidos começaram por ser administrados por via subcutânea, intramuscular ou intravenosa. Contudo, alternativas foram investigadas devido ao desconforto que estas estratégias causavam ao paciente. Recentemente, a administração por intermédio de *sprays* nasais, entrega sublingual e/ou via pensos e autocolantes tem-se destacado.⁴ Outra opção muito eficaz para ultrapassar as limitações dos péptidos e aumentar a sua estabilidade metabólica durante a administração consiste na sua modificação química, o que favorece significativamente a farmacocinética do péptido. Esta estratégia foi inclusivamente utilizada em alguns dos péptidos aprovados nos últimos anos pela FDA.

Entre 2016 e 2019 foram aprovados pela FDA 11 péptidos com fins terapêuticos, o que corresponde a aproximadamente 6% da totalidade de drogas aprovadas neste período. Entre os fármacos aprovados podemos encontrar fármacos que são 100% peptídicos, fármacos em que o péptido ativo é transportado por outras moléculas e fármacos em que o péptido serve de ligação entre o fármaco ativo e o transportador. Como resultado, os péptidos estão presentes em 6 dos 48 fármacos aprovados em 2019, o que reflete a sua crescente relevância em aplicações biomédicas.¹³ Um desses foi o *Afamelanotide* (*Scenesc[®]*), um péptido com 13 aminoácidos que é um análogo estrutural da hormona estimulante α -melanócito (α -MSH) (Figura 1). Difere no quarto e sétimo aminoácido do seu análogo natural, substituindo a metionina (Met) e a fenilalanina (Phe) pela norleucina (Nle) e D-Phe, respetivamente. Esta modificação melhorou a resistência do péptido à degradação enzimática, aumentou o seu tempo de meia vida e melhorou a sua atividade biológica.¹⁴ Além disso, apresenta um risco mínimo de induzir a produção de anticorpos antifármaco mesmo depois de 6 anos de tratamento continuado, ao contrário do seu análogo natural α -MSH.

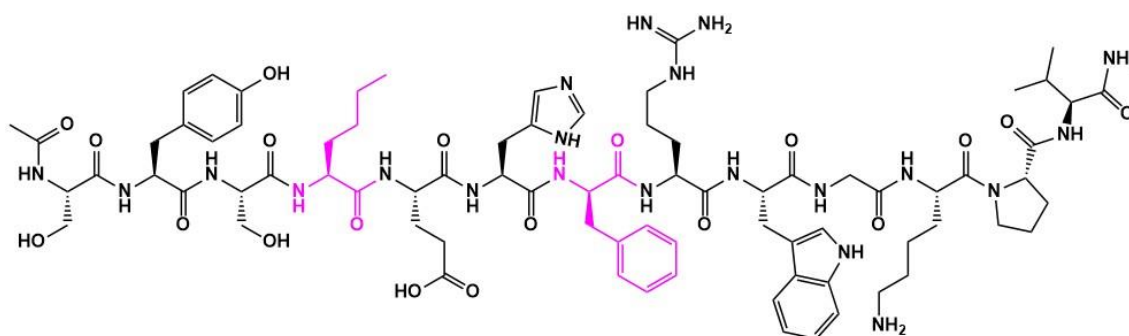


Figura 1- Péptido *Afamelanotide* (*Scenesse®*), a rosa os dois aminoácidos que diferem do seu análogo natural (adaptado da referência 13).

Este péptido, administrado de forma subcutânea, é utilizado no tratamento da protoporfíria eritropoiética e estimula a produção de eumelanina (uma forma de melanina) nos melanócitos, aumentando a sua densidade na pele o que proporciona uma maior tolerância à exposição solar direta.¹⁵

Outro exemplo de um dos fármacos aprovados em 2019 é o *Enfortumab Vedotin-eifv* (*Padcev®*) (Figura 2), que é utilizado como coadjuvante de agentes quimioterapêuticos no tratamento de certos tumores, sendo administrado de forma intravenosa. Faz parte das terapias que conjugam um fármaco com um anticorpo (ACD- *Antibody Drug Conjugate*), para minimizar a toxicidade do fármaco dirigindo-o diretamente às células cancerígenas. A nectina-4 é a proteína alvo do anticorpo, que se expressa em vários tecidos cancerígenos.¹⁶

Em termos peptídicos, o fármaco, monometil auristatina E (MMAE; *Vedotin*) (a vermelho na figura 2), é um análogo do péptido natural dolastatina 10 e funciona como um agente inibidor da divisão celular através da desagregação da rede de microtúbulos no interior da célula. Para além do péptido ativo também na ligação deste ao anticorpo é usado um péptido (valina-citrulina - a rosa na figura 2).¹⁷ Este é reconhecido e clivado pela catepsina-B na célula tumoral, libertando o MMAE.

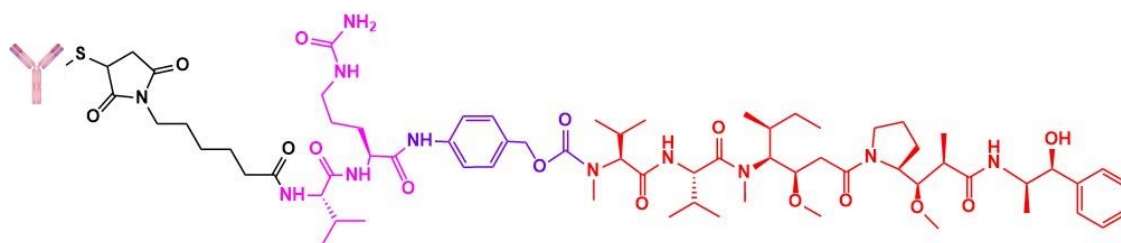


Figura 2- Estrutura química do *Enfortumab Vedotin-eifv* (*Padcev®*). Legenda: (preto) molécula 6-maleimido-1-hexanol que se liga ao anticorpo pelo átomo de enxofre; (cor-de-rosa) péptido valina-citrulina; (roxo) espaçador p-aminobenzil-carbamato; (vermelho) fármaco, o péptido MMAE (adaptado da referência 13).

1.2. Péptidos antimicrobianos

Como forma de defesa contra agentes patogénicos, os animais, plantas, fungos e bactérias desenvolveram várias estratégias. De entre elas destaca-se a produção de péptidos antimicrobianos, codificados nos seus genes. Os péptidos antimicrobianos endógenos são constituídos, geralmente, por 5-100 aminoácidos e constituem uma rápida e efetiva defesa. Apresentam atividade contra várias classes de invasores, como bactérias, vírus e fungos. Os péptidos que atuam contra bactérias, também designados como antibacterianos, são a classe mais comum de péptidos antimicrobianos.^{18,19}

A influência positiva dos péptidos antimicrobianos no processo de cura de feridas acontece de várias formas, como pelo recrutamento de macrófagos, modelação da produção de citocinas, proliferação e migração celular e estimulação da angiogenese (Figura 3).^{20,21}

O seu mecanismo de ação está profundamente relacionado com a sua estrutura. Na sua maioria os péptidos antimicrobianos são catiónicos, de carácter anfipático, ou seja, com zonas polares e não polares, e interagem com as bactérias por intermédio da sua membrana. O seu mecanismo de ação inicia-se com a atração eletrostática entre os péptidos catiónicos e a parede celular aniónica dos microrganismos que estão a colonizar a ferida.²² A morte do microrganismo acontece geralmente devido à disrupção da integridade da sua membrana celular.

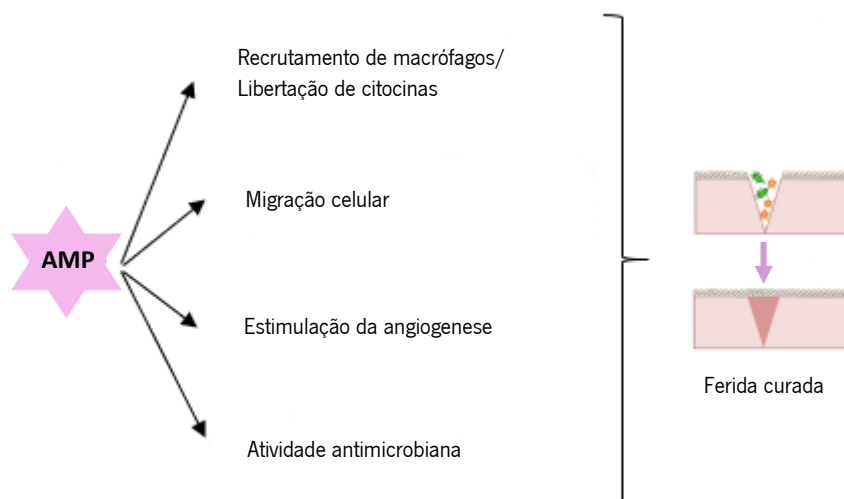


Figura 3- Alguns dos modos de ação dos péptidos antimicrobianos que facilitam o processo de cura de feridas (adaptado da referência 23).

Os modelos mais comuns utilizados para descrever os mecanismos de ação transmembranar dos péptidos antimicrobianos, pós interação eletrostática, são o poro toroidal, o barril e o tipo-tapete.²⁴ Estes

modelos são representados na Figura 4. Aqui os péptidos antimicrobianos tendem a assumir uma estrutura secundária em α -hélice, que juntamente com a estrutura secundária em folhas β , compreendem as estruturas mais comumente exibidas por estes péptidos.²⁵

No modelo do poro toroidal, os péptidos são inseridos perpendicularmente na membrana induzindo uma curvatura local na bicamada lipídica. A interação entre os grupos polares dos péptidos e as cabeças fosfolipídicas levam à formação de um poro, a bicamada lipídica dobra continuamente até se formar um orifício. A diferença entre este modelo e o de barril é que no modelo toroidal os péptidos estão sempre associados aos grupos polares da membrana, mesmo depois da formação do poro.²²

No modelo de barril, os péptidos estão inicialmente orientados paralelamente à membrana, sendo eventualmente inseridos perpendicularmente ao plano da camada lipídica formando um “barril”. Inicia-se com a ligação de um péptido à membrana, mas progressivamente mais péptidos são recrutados para aumentar o tamanho do poro. Este mecanismo promove interações laterais péptido-péptido, com as regiões hidrofóbicas do péptido a interagirem com a membrana lipídica e a sua parte hidrofílica a formar o interior do canal.

No modelo tipo-tapete, os péptidos antimicrobianos formam uma camada paralela à bicamada lipídica bacteriana que causa a perda de integridade da membrana devido às interações iniciais estabelecidas entre as cabeças aniônicas dos fosfolipídios e a carga positiva do péptido. A uma concentração crítica, a lise abrupta da célula microbiana é desencadeada formando-se micelas, numa ação comparada à dos detergentes. Primeiro formam-se poros toroidais transientes que permitem a entrada de mais péptidos e finalmente a membrana desintegra-se dando origem às micelas.²⁶

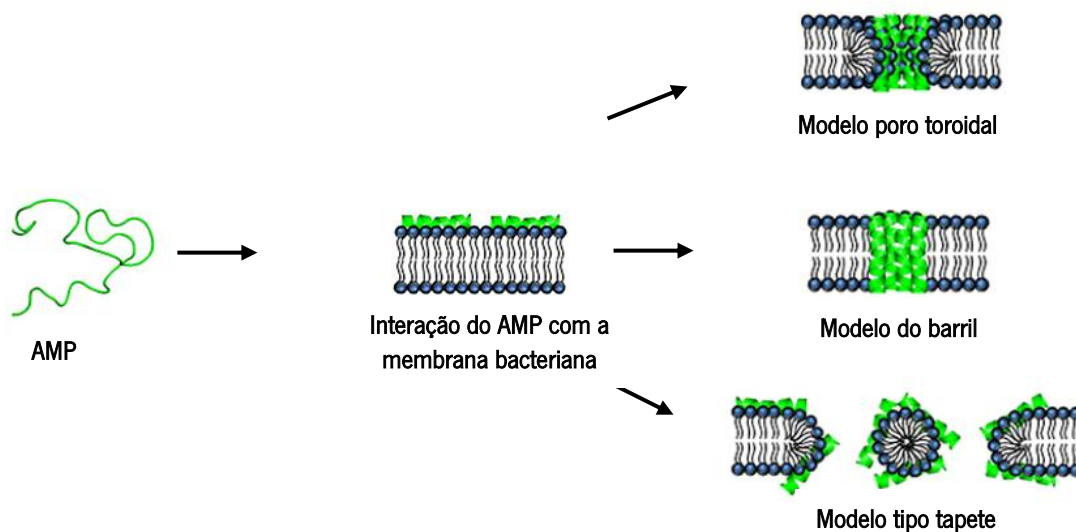


Figura 4- Mecanismos mais comuns de disrupção da membrana microbiana por parte dos péptidos antimicrobianos (adaptado da referência 27).

Estes mecanismos de ataque à membrana bacteriana acarretam uma menor probabilidade de desenvolvimento de resistência por parte de microrganismos contra os péptidos antimicrobianos. Isto sucede porque a resistência bacteriana tende a ser impulsionada pela modificação da membrana destes microrganismos, nomeadamente a sua composição lipídica.²⁰

Além dos mecanismos de desintegração membranar, a penetração do péptido na célula bacteriana pode afetar alvos intracelulares, como inibir a ação enzimática ou interferir na síntese de ácidos nucleicos e proteínas.²⁶ As suas propriedades terapêuticas, que incluem a sua atividade antimicrobiana intrínseca e a capacidade de atuarem sem permitir que bactérias desenvolvam resistência, torna os péptidos antimicrobianos verdadeiramente apelativos enquanto soluções para o combate a infeções causadas por bactérias resistentes a antibióticos, cuja incidência em feridas crónicas é muito elevada.

1.3. Tratamento de feridas agudas e crónicas

O crescente surgimento e desenvolvimento de feridas crónicas tem-se tornado num problema médico grave. As falhas nos mecanismos subjacentes à recuperação dos tecidos lesados durante um ferimento podem levar à formação de uma ferida crónica. Alguns dos fatores que mais impulsionam o seu desenvolvimento são doenças venosas e arteriais, diabetes e infeções microbianas. Organismos patogénicos oportunistas podem colonizar as feridas da pele formando biofilmes.²⁸ As bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* são das mais prevalentes neste tipo de feridas.²² As bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus* estão inclusivamente abrangidas na recente lista de agentes patogénicos resistentes prioritários da Organização Mundial de Saúde (OMS), devido à sua resistência à ação de antibióticos.²⁹ Isto torna a erradicação destas bactérias mais difícil e, conseqüentemente, o tratamento da ferida. Além disso, as toxinas libertadas pelas bactérias, provocam uma resposta excessiva das células do sistema imunitário do hospedeiro, contribuindo para uma resposta inflamatória exagerada e prejudicial.²⁰

O tratamento de feridas crónicas tem colocado um grande fardo sobre o sistema de saúde de muitos países por todo o mundo, ano após ano. Doenças cuja prevalência aumenta, como a diabetes *mellitus*, obesidade e hipertensão, são algumas das causas principais do aparecimento destas feridas.³⁰ Em todo o mundo estima-se que 1-2% da população seja afetada por elas.³¹ Em Portugal, estudos recentes relacionam uma tendência de crescimento do aparecimento de feridas crónicas com o envelhecimento

da população e comorbidades associadas. No Alentejo, um estudo realizado em unidades de cuidados continuados reportou uma prevalência de feridas de 17,5%, sendo que destas 82% eram classificadas como crónicas.³² Com o aumento da esperança média de vida e o previsto envelhecimento da população a nível mundial, a incidência de doenças que provocam estas feridas deverá agravar-se, sendo já considerada pela OMS uma epidemia global.³³ De notar que estas feridas crónicas não estão só associadas a uma drástica diminuição da qualidade de vida dos pacientes, podem evoluir para infeções graves, levando por vezes a que seja necessário recorrer a amputações, ou mesmo à morte.^{34,35}

A pele funciona como um escudo, tendo a função fundamental de separar e proteger o ambiente corporal interno do ambiente externo. Considerando que está exposta a diversas agressões, incluindo exposição excessiva a radiação ultravioleta, desidratação e desenvolvimento de possíveis queimaduras, feridas e infeções microbianas, o processo de regeneração celular da pele torna-se essencial para a sobrevivência do organismo. Este é um processo faseado e complexo que culmina com o restauro do tecido danificado e das suas funções. Geralmente resumido em quatro fases, hemóstase, inflamação, proliferação e remodelação do tecido, requer a coordenação de vários tipos diferentes de células. Estas fases são integradas e sobrepostas, culminando no tratamento da ferida (Figura 5).³⁶

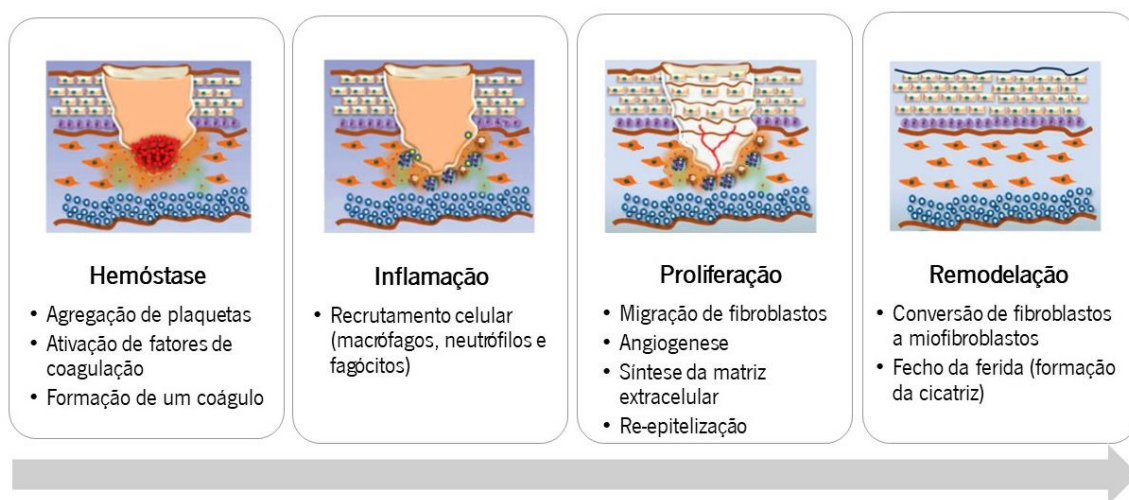


Figura 5- Processo de regeneração de tecidos em feridas, subdividido em quatro fases interligadas (adaptado da referência 37).

A hemóstase inicia imediatamente após o surgimento da ferida, com as plaquetas a aderirem às paredes do vaso sanguíneo danificado e desencadeando a formação de um coágulo com a ativação dos fatores de coagulação (inclui plaquetas, glóbulos vermelhos e moléculas da matriz extracelular). Depois de algumas horas ou dias inicia-se a fase inflamatória com os neutrófilos, fagócitos e macrófagos a entrarem no coágulo. Os macrófagos secretam as quimiocinas responsáveis pelos eventos subsequentes,

nomeadamente a angiogénese, deposição da matriz, re-epitelização e migração de fibroblastos. As quimiocinas fazem parte de uma família especializada de citocinas que funcionam como potentes reguladores de inflamação, pela habilidade de recrutar populações específicas de glóbulos brancos. A angiogénese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos nas zonas danificadas. A formação do tecido de granulação resulta em re-epitelização pela migração e proliferação dos fibroblastos e células endoteliais. A matriz é progressivamente enriquecida em colagénio pelos fibroblastos, que depois se transformam em miofibroblastos. O processo termina com a transição do tecido de granulação para a formação de uma cicatriz.^{38,39}

1.4. Péptidos antimicrobianos no tratamento de feridas agudas e crónicas

1.4.1. Alanina-Alanina-Prolina-Valina (AAPV)

Como já referido, as feridas crónicas resultam de alterações nos processos fisiológicos relacionados com a formação de novo tecido celular e a remoção de tecido danificado. São ainda caracterizadas por uma prolongada fase inflamatória que não avança pelos normais estágios de regeneração e cicatrização da pele, fixando-se num estado de não-cura, que despoleta uma resposta elevada dos neutrófilos. Estes neutrófilos acumulam-se nos sítios de inflamação e libertam grandes quantidades de protéases, o que inclui a enzima elastase de neutrófilos humanos (HNE) e as metaloproteases da matriz celular. A HNE é uma protéase de serina da família das quimiotripsinas e é armazenada nos grânulos primários dos neutrófilos polimorfonucleares. Em quantidades normais, a HNE está relacionada com o processo de cicatrização de feridas. Contudo, quando em quantidades descontroladas, a HNE associa-se á degradação de proteínas da matriz extracelular (como a elastina, fibrina, fibronectina) e de fatores de crescimento importantes, o que compromete o processo de regeneração da pele e a cicatrização da ferida. Em condições normais a sua atividade é regulada por inibidores endógenos, tais como o inibidor da protéase $\alpha 1$, o inibidor da protéase de leucócito secretor (SLPI) e a elafina. Todavia, nestes casos a inibição não é suficiente. Além disso, em condições patológicas, estes inibidores naturais podem sofrer oxidação, o que diminui consideravelmente a sua capacidade de inibir a HNE.⁴⁰ O desregular da atividade da HNE está relacionado com várias doenças crónicas inflamatórias, tais como psoríase, artrite reumatoide e doença crónica obstrutiva pulmonar. Por este motivo tem existido uma grande aposta no design e desenvolvimento de inibidores sintéticos, que permitam reforçar a atividade dos inibidores

naturais desta enzima, por forma a controlar minuciosamente a sua atividade.⁴¹ Estudos recentes mostram que a atividade da HNE é reduzida em feridas em fase de cicatrização ($2,89 \pm 1,27$ U/mL) e elevada em fluidos oriundos de feridas crónicas ($22,97 \pm 13,27$ U/mL).⁴² Já foi inclusivamente pensada a produção de pensos inteligentes, que seletivamente capturassem o excesso de enzima elastase numa ferida crónica, contudo, até à data não existe nada disponível no mercado.^{43,44}

O tetrapéptido Alanina-Alanina-Prolina-Valina (Ala-Ala-Pro-Val ou AAPV, Figura 6) tem sido investigado enquanto inibidor da enzima HNE, restaurando os níveis normais de atividade da enzima e evitando os desenvolvimentos patológicos acima mencionados.^{45,46}

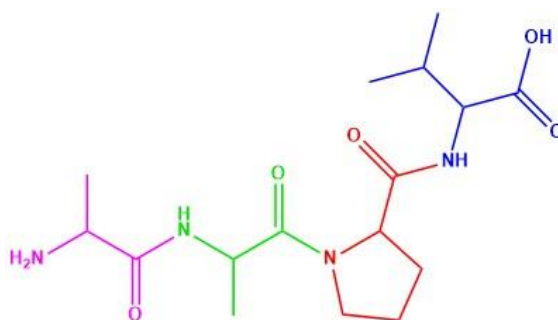


Figura 6- Estrutura do péptido AAPV.

Foram elaborados vários estudos com a HNE ao longo das últimas décadas, tentando desenvolver novos inibidores da enzima. Estes envolveram testes da atividade enzimática com várias sequências peptídicas, algumas delas partindo das de inibidores naturais da enzima (inibidor da protease α_1). Foram utilizados ainda péptidos de sequência conhecida reportados na literatura e sequências de aminoácidos reconhecidas por outras enzimas, com o intuito de se desenvolverem inibidores sintéticos da HNE de baixo peso molecular.⁴⁷⁻⁵⁰ Neste processo de otimização os vários resíduos foram alterados e os resultados indicaram que os resíduos valina (Val) em P_1 , prolina (Pro) em P_2 , e alanina (Ala) em P_3 e P_4 inibem competitivamente a HNE com um K_i de aproximadamente 10^{-4} M (na Figura 6 a azul, vermelho, verde e cor-de-rosa, respetivamente).⁵¹ A interação entre o resíduo P_1 e o respetivo sítio de ligação, S_1 do local ativo, é a principal determinante da especificidade do substrato entre as diferentes proteases de serina (Figura 7). O aminoácido valina foi o resíduo mais utilizado em P_1 em inibidores da HNE, satisfazendo a preferência de S_1 por resíduos hidrofóbicos de tamanho médio. Em P_2 foi com a prolina que se obtiveram os melhores resultados presumivelmente devido à curvatura que impõe à estrutura do péptido. Já nos sítios de ligação S_3 e S_4 existe uma relativa tolerância, mas a alanina foi o mais consensual.

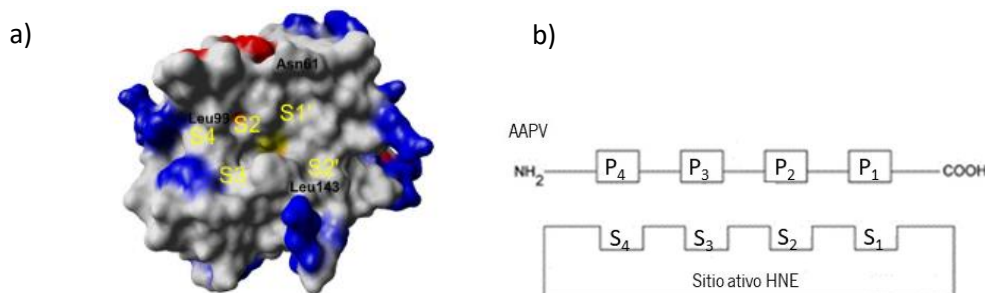


Figura 7- a) Sítio ativo da HNE, com os resíduos positivos representados a azul e os negativos a vermelho, e as posições dos subsítios a amarelo; **b)** esquema ilustrativo da nomenclatura Schechter and Berger (1967), os subsítios S da enzima acomodam os resíduos P do substrato. A numeração começa a seguir ao sítio de clivagem, P₁ e P₁' e continua no sentido do terminal N (P₂, P₃) e do terminal C (P₂', P₃') (retirado da referência 52).

São reportados na literatura alguns inibidores da HNE que utilizam como base o péptido AAPV, mas que possuem estruturas adicionais não peptídicas nos grupos terminais, incluindo grupos funcionais específicos ou cadeias lipofílicas.^{48-51,53,54}

1.4.2. CW49

Os anfíbios são conhecidos pela elevada eficiência dos seus organismos na reparação de feridas, ao ponto de serem capazes de regenerar um membro inteiro ou uma cauda inteira quando ainda jovens. O seu processo de regeneração tissular tem sido extensivamente estudado numa tentativa de clarificar os mecanismos moleculares que levam ao completo restauro dos seus tecidos, e à ausência de uma cicatriz.³⁸

Há vários anos que a pele de anfíbio é aplicada no tratamento de feridas. Mais recentemente, péptidos vêm a ser extraídos desse órgão e examinados pelas suas capacidades de regeneração.⁵⁵ O CW49 é um péptido de 11 aminoácidos (Figura 8), identificado na pele de sapo *Odorrana grahami*, capaz de promover o processo de cicatrização em feridas crónicas. Está envolvido na regulação da angiogénese e da fase inflamatória.

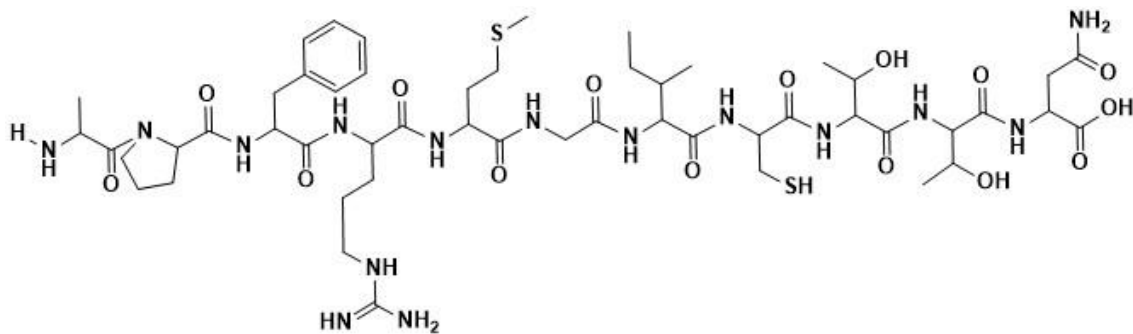


Figura 8- Estrutura do péptido CW49.

Um estudo desenvolvido por H. Liu *et. al* demonstrou que o CW49 aumenta a expressão das proteínas envolvidas na angiogénese. Aqui, a quantidade de proteínas angiogénicas do tipo fator indutível por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α), sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS) e sintase indutível do óxido nítrico (iNOS) foi significativamente reduzida em ratos diabéticos comparativamente a não diabéticos. Pela análise da sua presença, concluíram que o péptido CW49 promove significativamente a expressão destas três proteínas em feridas diabéticas. A sua aplicação tópica em ratos com incisões dorsais expôs o efeito regenerativo do péptido, pela regulação dos níveis de proteínas angiogénicas relevantes.⁵⁶ Adicionalmente, o CW49 foi ainda identificado como capaz de prevenir a inflamação excessiva, característica de feridas crónicas geradas pela diabetes *mellitus*. Os macrófagos M1 produzem citocinas pro-inflamatórias e os macrófagos M2 citocinas anti-inflamatórias. Apesar das citocinas pro-inflamatórias promoverem a migração e divisão das células envolvidas na fase proliferativa, essenciais ao tratamento da ferida, os seus níveis devem ser regulados.⁵⁷ Nas feridas crónicas diabéticas há um recrutamento continuado e, conseqüentemente, excessivo de macrófagos M1, que produzem citocinas pro-inflamatórias e que em quantidades excessivas se tornam destrutivas, induzindo a apoptose celular. O péptido CW49 exibiu um efeito inibitório em macrófagos, que apesar de não ser muito vantajoso em feridas agudas, pode ser bastante benéfico em feridas crónicas causadas pela diabetes, prevenindo uma resposta inflamatória excessiva. O efeito inibitório no recrutamento dos macrófagos e o conseqüente efeito na diminuição da secreção de citocinas pro-inflamatórias, nomeadamente o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), podem ser decisivos no tratamento destas feridas.⁵⁶

1.5. Síntese peptídica em fase sólida

A ideia da síntese peptídica em fase sólida (SSPS) surgiu em 1959 a Robert Bruce Merrifield, que publicou em 1963 um artigo em que descrevia a utilização da técnica.⁵⁸ Este feito valeu-lhe, em 1984, o prémio Nobel da química.⁵⁹

Na técnica de SSPS é utilizado um suporte sólido, constituído por partículas de um polímero insolúvel, onde o péptido a sintetizar é ancorado. O suporte sólido possui grupos funcionais na sua superfície e no seu interior. A estes grupos funcionais são acoplados, sequencialmente, os aminoácidos que constituem o péptido desejado. O primeiro aminoácido é geralmente acoplado ao suporte sólido pelo terminal carboxilo.⁶⁰ Segue-se o acoplamento dos restantes aminoácidos, até o péptido estar completo, na direção de *C*-terminal para *N*-terminal. O terminal amino dos aminoácidos que estão a ser adicionados deve estar protegido com um grupo protetor temporário. Este é removido após cada acoplamento, deixando livre o terminal amino do aminoácido acoplado para reagir com terminal carboxílico do próximo aminoácido da sequência peptídica.⁶¹

A cadeia lateral de alguns aminoácidos também deve ser protegida durante a síntese peptídica, para evitar reações indesejadas. Para tal são utilizados grupos protetores da cadeia lateral, que geralmente servem como proteção até ao final da síntese (Figura 9).

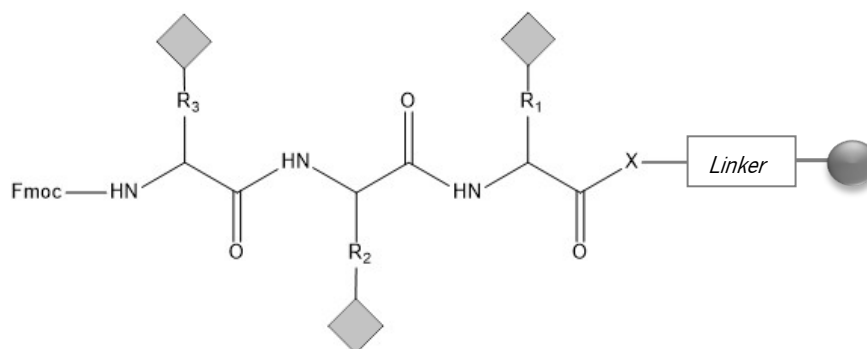


Figura 9- Representação de um péptido protegido ligado a um suporte sólido através de um *linker*.

Basicamente são realizados passos de acoplamento e *N*-desproteção alternados até que todos os aminoácidos que constituem o péptido sejam acoplados. (Figura 10) No final é utilizada uma mistura de clivagem capaz de separar o péptido da resina (suporte sólido). É ainda utilizada uma mistura de reagentes que faz a clivagem dos grupos protetores de cadeia lateral dos aminoácidos quando oportuno (a mistura de clivagem da resina e dos grupos protetores da cadeia lateral pode ser a mesma).⁶²

Em alguns trabalhos em que o objetivo seja fazer modificações extra no péptido, por exemplo a inserção de grupos cromóforos, os grupos protetores da cadeia lateral podem ser mantidos até ao final de todas as reações implicadas no processo, para evitar reações indesejadas.

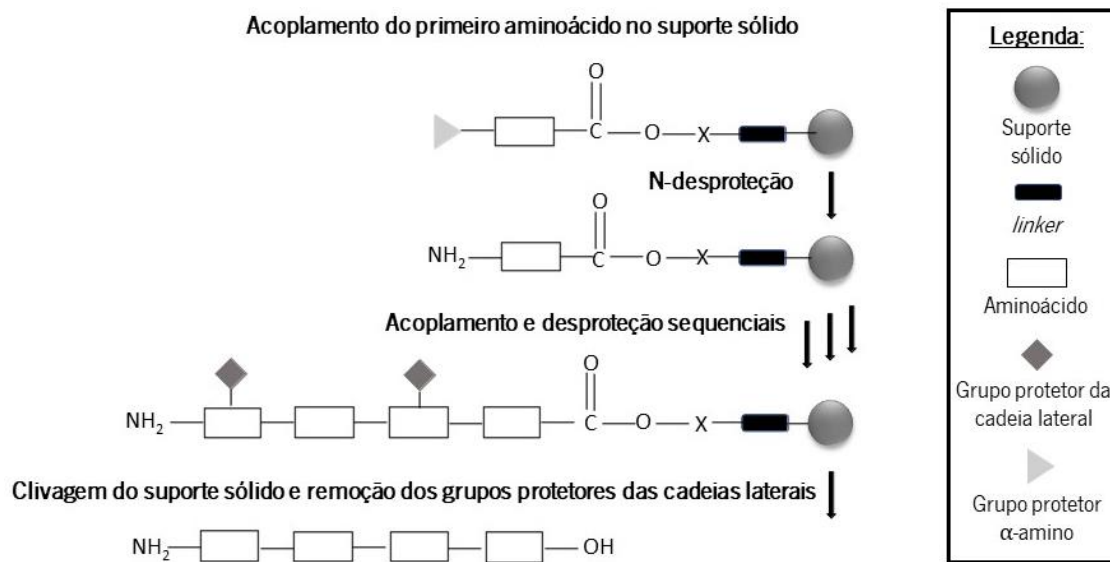


Figura 10- Processo de síntese de péptidos por SPPS.

Cada passo de acoplamento e desproteção é acompanhado por uma série de lavagens e filtrações.⁶³ Nestas lavagens são utilizados solventes orgânicos como dimetilformamida (DMF) e metanol (MeOH) que têm como função inchar e encolher a resina, respetivamente. É essencial que o suporte sólido se encontre inchado durante o processo de síntese para que aconteça a difusão dos reagentes para o interior do polímero. Tal permite que os grupos funcionais no interior da resina reajam, ancorando o péptido, e deste modo garantindo um melhor rendimento e a produção completa do péptido. Assim, as lavagens com este tipo de solventes são fundamentais para que os resíduos depois de cada reação de acoplamento e desproteção sejam devidamente eliminados, evitando reações indesejadas em passos subsequentes da síntese.⁶⁴

A SPPS apresenta várias vantagens em relação à síntese em solução, como o facto de todas as reações serem realizadas num único recipiente. O excesso de aminoácidos e reagentes utilizados para obter reações mais completas são depois facilmente eliminados nas lavagens, não existindo necessidade de passos de purificação intermediários. Adicionalmente, esta técnica consiste em passos sequenciais alternados que podem facilmente ser automatizados. Por outro lado, os reagentes e resinas utilizados, acarretam mais custos, e na síntese em solução é mais fácil a ampliação da escala de síntese de mg para kg.⁶⁵

1.5.1. Suportes sólidos e *linkers*

Existem essencialmente três grupos distintos de resinas, as de poliestireno (PS), as de PS com polietileno glicol (PEG), e as de PEG. Maioritariamente são usados suportes de PS na SPPS, com 1 ou 2% de divinilbenzeno (DVB) como agente de reticulação. O polímero tem determinados grupos funcionais onde serão ancorados o *linker* ou o primeiro aminoácido.⁶⁵

A funcionalização ou *loading* (mmol/g) de cada resina refere-se à quantidade de grupos funcionais por grama de resina que estão disponíveis para os acoplamentos. Habitualmente, um *loading* de 0,4 a 0,7 mmol/g é versátil e adequado para várias aplicações. No entanto, há situações em que deve ser utilizado um *loading* mais elevado e noutras um mais baixo para garantir a otimização da síntese. Uma resina com elevada funcionalização vai permitir obter mais produto na medida em que dispõe de mais grupos funcionais que podem ancorar o péptido tornando-se economicamente mais viável. Contudo, pode favorecer a agregação do péptido e outras interações intermoleculares indesejadas, por exemplo entre as cadeias laterais dos aminoácidos. Pode ainda propiciar problemas de impedimento estéreo, quando são péptidos com aminoácidos muito volumosos, ou com aminoácidos protegidos nas suas cadeias laterais por grupos muito volumosos (devido a uma maior quantidade de cadeias peptídicas).⁶⁶

A escolha da funcionalização do suporte sólido a utilizar depende do péptido que queremos obter e deve ser pensada juntamente com a estratégia de proteção, para que sejam compatíveis. Por vezes a ligação direta do primeiro aminoácido à resina pode ser difícil, nestes casos, recorreremos à utilização de um pequeno espaçador orgânico que fica colocado entre a resina e o primeiro aminoácido (*linker*). A funcionalização do suporte sólido/*linker* é também escolhida mediante o péptido que se pretende obter, condicionando o grupo funcional presente no terminal carboxilo do péptido (amida, ácido carboxílico ou álcool). Alguns dos suportes sólidos mais utilizados, são a resina Wang (ácidos carboxílicos e álcoois), a resina cloreto de 2-clorotritilo (ácidos carboxílicos), a resina Rink amida (amidas) (Figura 11).

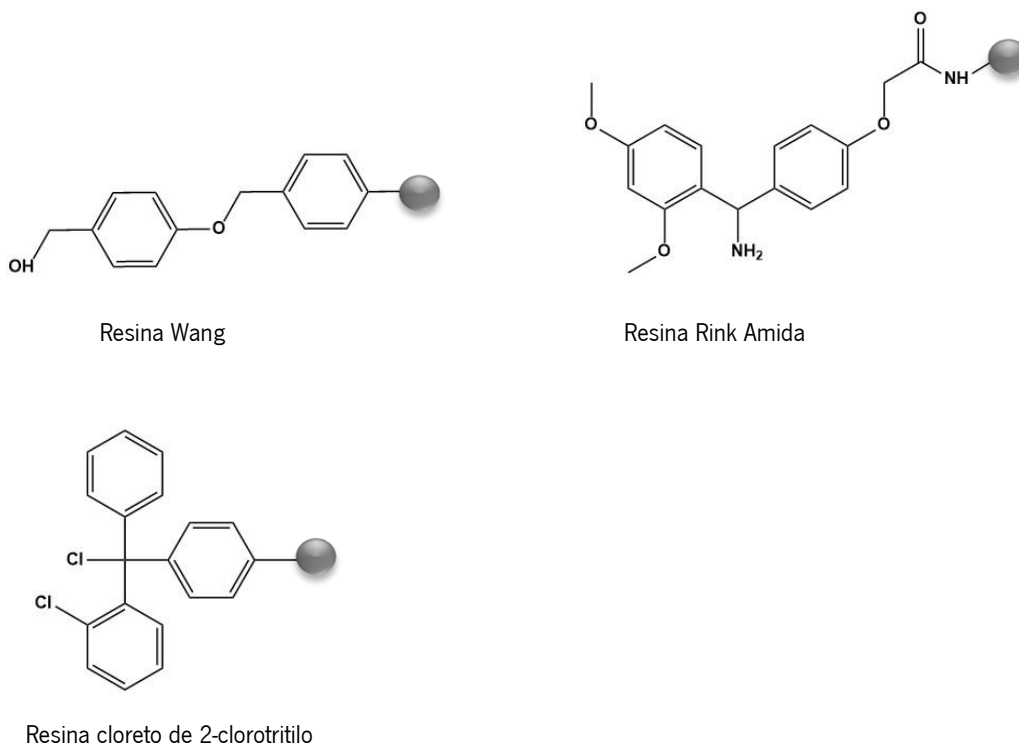


Figura 11- Estruturas dos grupos funcionais de algumas resinas (adaptado da referência 65).

1.5.2. Reagentes de acoplamento

A formação de uma ligação peptídica entre dois aminoácidos envolve dois passos: (1) ativação do grupo carboxílico de um dos aminoácidos, e (2) ataque nucleofílico do grupo amino do outro aminoácido ao grupo carboxílico ativado (Figura 12).⁶⁷

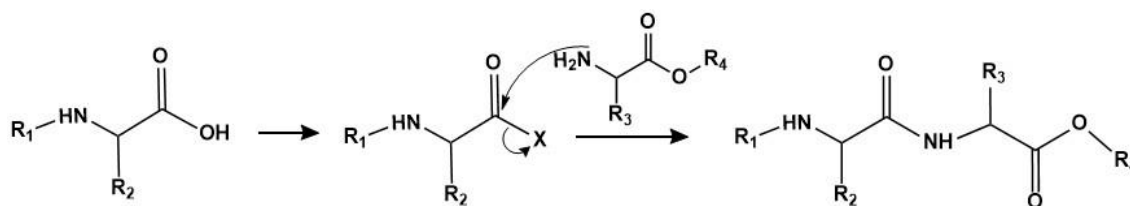


Figura 12- Formação da ligação peptídica. X= grupo eletroretirador (adaptado da referência 67).

O reagente de acoplamento vai ativar o grupo carboxílico tornando o OH num melhor grupo de saída. Assim, o grupo carboxílico sofre um ataque nucleofílico pelo grupo amino do outro aminoácido.

Nas reações de acoplamento pode ocorrer racemização durante a ativação. Este processo está reconhecido como tendo dois caminhos principais: a formação de 5(4*H*)-oxazolona (caminho A) e a enolização direta (caminho B), que levam à formação de um péptido racémico (Figura 13).⁶⁸

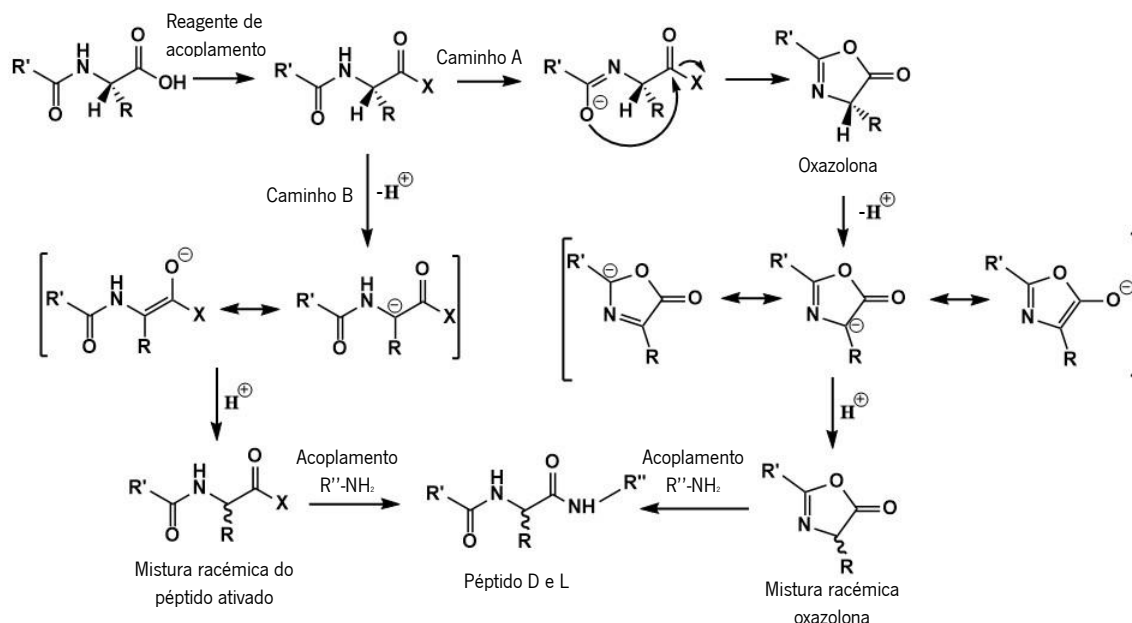


Figura 13- Mecanismos de racemização durante o passo de ativação do acoplamento de aminoácidos (adaptado da referência 68).

Existem 3 categorias principais de reagentes de acoplamento mais utilizados em SPPS: as carbodiímidas, os sais de fosfônio, e os sais de amínio (Figura 14).⁶⁹

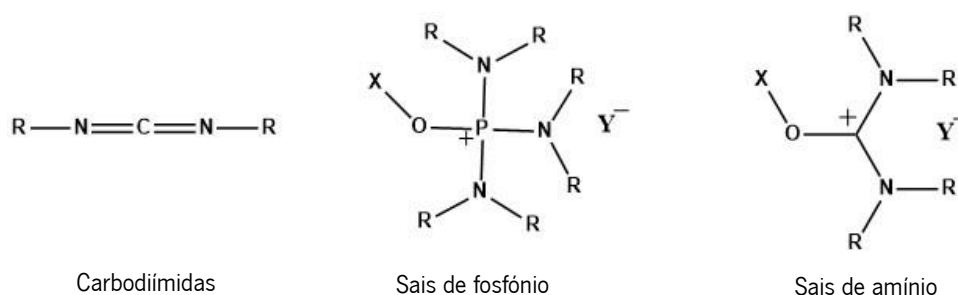


Figura 14- Reagentes de acoplamento mais utilizados (adaptado da referência 69).

As carbodiímidas são dos reagentes de acoplamento mais populares, sendo as duas mais utilizadas a *N,N'*-diisopropilcarbodiímida (DIC) e a *N,N'*-dicio-hexilcarbodiímida (DCC) (Figura 15). Uma vez que DIC dá origem a ureias mais solúveis que a DCC; a primeira é mais utilizada em SPPS, já a DCC costuma

ser mais usada em síntese em solução. As ureias solúveis da DIC podem ser facilmente removidas durante as lavagens da SPPS.

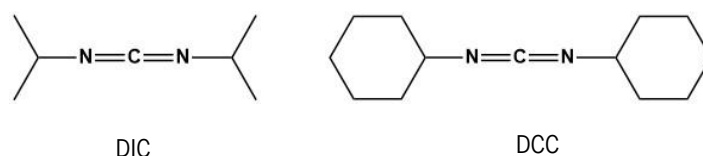


Figura 15- Estruturas das carbodiímidas, *N,N'*-diisopropilcarbodiímida (DIC) e *N,N'*-dicio-hexilcarbodiímida (DCC) (adaptado da referência 69).

As reações de acoplamento com carbodiímidas podem seguir dois caminhos (Figura 16). O primeiro inclui o ataque do aminoácido α -amino protegido (o aminoácido que queremos acoplar ao péptido) a uma das ligações C=N da carbodiímida para dar origem a uma *O*-acilisourea, que é uma espécie intermediária ativa. A *O*-acilisourea pode sofrer um ataque pelo componente amino do aminoácido que constitui o péptido, formando-se a ligação amida entre os dois aminoácidos e libertando um subproduto de ureia. No segundo caminho possível, uma outra molécula de aminoácido α -amino protegido reage com a *O*-acilisourea, levando à formação de um anidrido simétrico. Este pode ser atacado pelo grupo amina livre do aminoácido que constitui o péptido levando também à formação de uma nova ligação peptídica. Assim, um novo aminoácido, devidamente protegido no seu grupo amino, é acoplado ao péptido já existente.⁶⁹

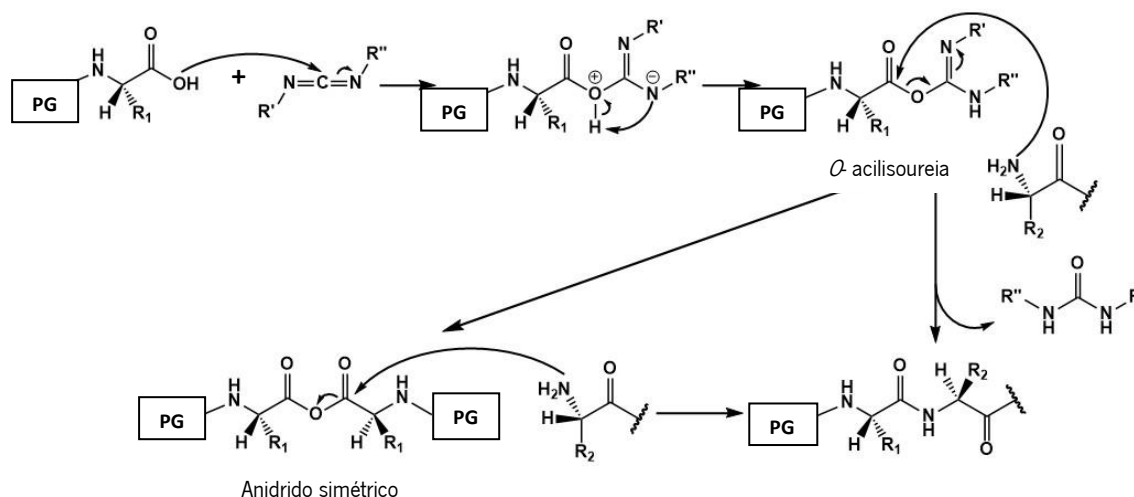


Figura 16- Mecanismo de acoplamento mediado por carbodiímidas (adaptado da referência 68).

Para diminuir a racemização durante o processo de ativação, pode ser utilizado um aditivo juntamente com as carbodiímidas, um derivado de hidroxilamina, como o *N*-hidroxibenzotriazole (HOBT), o *N*-hidroxiazabenzotriazole (HOAt), o 6-cloro-1-hidroxibenzotriazole (HOBT-6-Cl), ou o etilcianogloxilato-2-oxima (Oxyma®) (Figura 17). Foram reportadas algumas características potencialmente explosivas no HOAt e o HOBT, inicialmente mais usados, motivo pelo qual foi introduzido o HOBT-6-Cl. Na década de 70 apareceram as oximas. As oximas e os seus derivados apresentam resultados de eficácia de acoplamento que competem com os aditivos anteriormente mencionados.⁷⁰

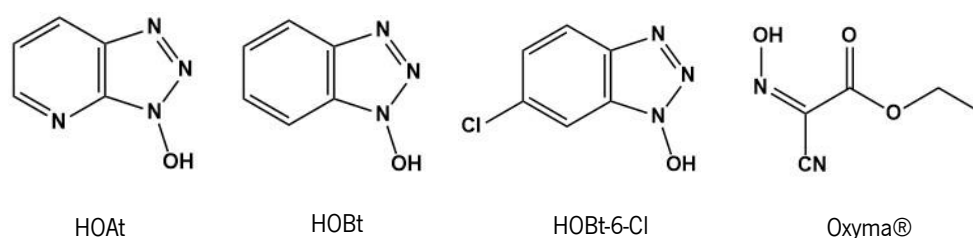


Figura 17- Estrutura de alguns dos aditivos utilizados com as carbodiímidas para prevenção da racemização (adaptado da referência 70).

Com a reação do grupo carboxílico livre do aminoácido α -amino protegido (o aminoácido que será acoplado) com um derivado de hidroxilamina, na presença de uma carbodiímida, forma-se um éster ativo (Figura 18). Este intermediário reage com o grupo amina livre do aminoácido que constitui o péptido, formando uma ligação peptídica. A eletrofilicidade do carbono carbonilo do éster ativo é aumentada pelas propriedades eletroretiradoras do grupo Y do éster, que podem diminuir a densidade eletrônica no átomo de carbono carbonílico do grupo éster. Logo, melhora a sua reatividade em relação a nucleófilos, tendo como consequência a redução da perda de configuração no carbono α do resíduo ativado.⁶⁸

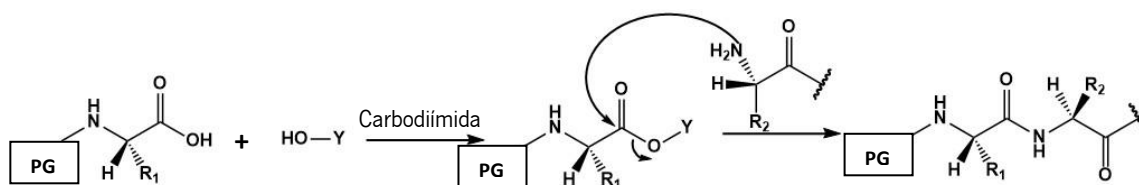


Figura 18- Esquema de acoplamento mediado por ésteres ativos (adaptado da referência 68).

1.5.3. Grupos protetores

Existem duas estratégias mais usadas para a conjugação dos grupos protetores em SPPS. A primeira é a estratégia *tert*-butiloxicarbonilo (Boc)/benzilo (Bn), na qual o grupo protetor Boc funciona como a proteção temporária α -amino, sendo clivado em condições ácidas, como por exemplo com ácido trifluoroacético (TFA) (Figura 19). Como proteção das cadeias laterais dos aminoácidos é utilizado o grupo Bn, este grupo requer condições mais ácidas para ser removido, como por exemplo ácido fluorídrico.⁷¹

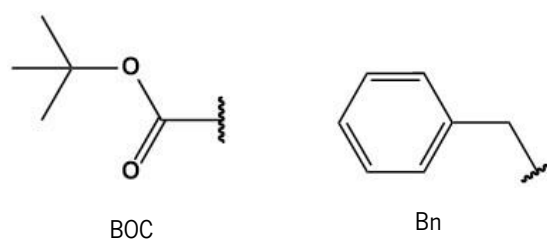


Figura 19- Estrutura dos grupos de proteção α -amino *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) e de proteção da cadeia lateral benzilo (Bn) (adaptado da referência 72).

Existe também a estratégia de proteção baseada em 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc)/*tert*-butilo (*t*Bu) (Figura 20). O grupo Fmoc faz proteção α -amino, sendo facilmente clivado em condições básicas após cada acoplamento. Já o grupo *t*Bu ou o grupo tritilo (Trt), assim como alguns outros grupos protetores da cadeia lateral, são clivados em condições ácidas, com TFA.⁷³ Esta estratégia é a mais utilizada em SPPS.

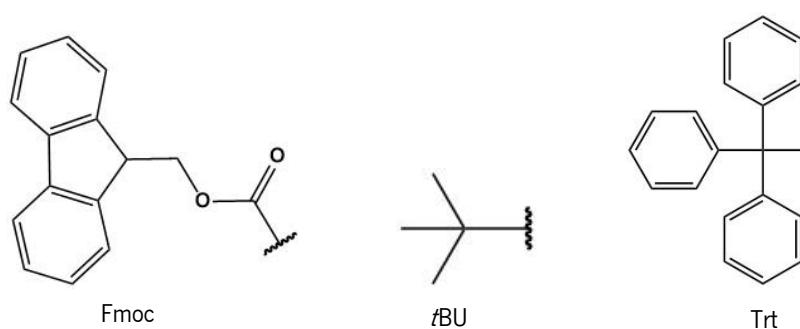


Figura 20- Estrutura dos grupos de proteção α -amino 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) e de proteção da cadeia lateral *tert*-butilo (*t*Bu) e tritilo (Trt) (adaptado da referência 65).

A remoção do grupo de proteção α -amino Fmoc realiza-se em meio básico, com piperidina 20% em DMF, e conduz à obtenção do aminoácido com o grupo amino desprotegido. A reação acontece via

formação de um aduto fulveno-piperidina como consequência da reação entre o dibenzofulveno e piperidina (Figura 21).⁶⁸

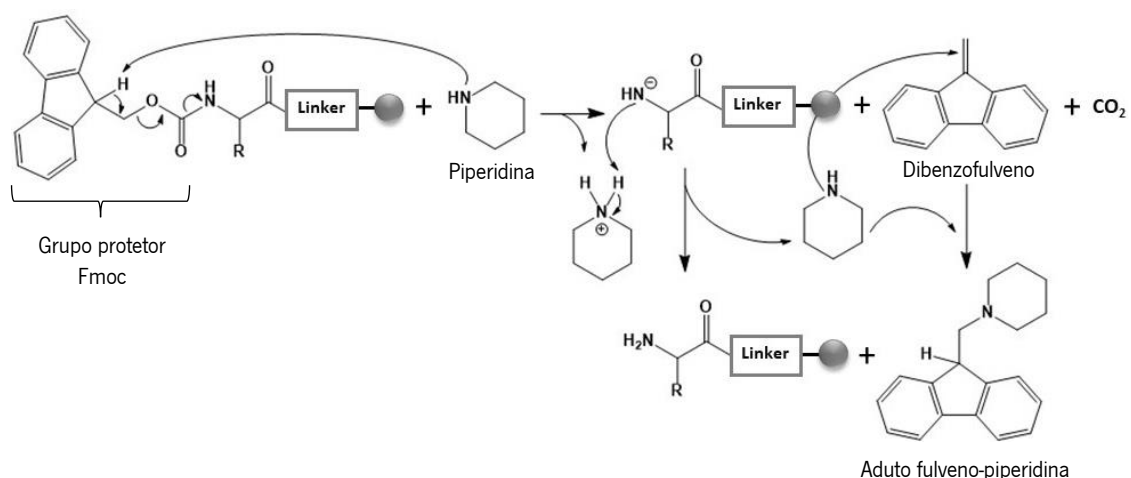


Figura 21- Remoção do grupo Fmoc mediada por base (piperidina) (adaptado da referência 68).

1.5.4. Radiação micro-ondas

Recentemente, observou-se o aparecimento da SPPS assistida por radiação micro-ondas. A irradiação por micro-ondas durante os passos de acoplamento e desproteção de aminoácidos tem vantagens significativas no processo de síntese. As duas vantagens principais da utilização de micro-ondas em comparação com a síntese convencional são a diminuição drástica do tempo de reação e o aumento da pureza e rendimento do produto da síntese.⁷⁴

A radiação é formada por um campo elétrico e um campo magnético, e o campo elétrico é responsável pela transferência de energia que proporciona um rápido aquecimento a nível molecular dos reagentes. Esta técnica tira proveito do fenómeno de aquecimento da mistura reacional provocado pela radiação eletromagnética. O aquecimento promovido pelas micro-ondas é diretamente absorvido pelos reagentes. Esta ativação molecular direta limita as reações indesejadas e proporciona um aquecimento instantâneo, direto e homogêneo (Figura 22 b).⁷⁵

Nos métodos convencionais de aquecimento, como placas e mantas de aquecimento ou banhos de óleo, a energia é transferida indiretamente. O aquecimento é aplicado à superfície do vaso reacional aquecendo-o primeiro e só depois chega até aos reagentes (figura 22 a). Esta forma de aquecimento é lenta e pode criar gradientes de temperatura. Outro benefício é que com micro-ondas a energia é

desligada instantaneamente, enquanto que com uma técnica convencional o arrefecimento é lento e gradual, o que dificulta o controlo da temperatura e pode originar reações laterais.⁷⁶

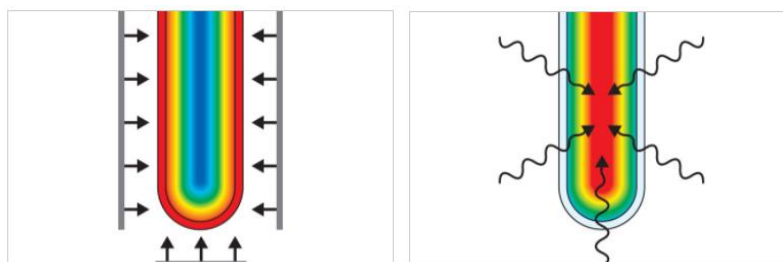


Figura 22- Representação ilustrativa de: **a)** uma forma de aquecimento convencional; **b)** do aquecimento proporcionado por irradiação micro-ondas (retirado da referência 77).

O aumento da temperatura das moléculas ajuda a limitar a agregação da cadeia peptídica, que acontece devido às interações intra- e intermoleculares, nomeadamente formação de pontes de hidrogénio ou ligações hidrofóbicas. Com isto facilita o acesso ao final da cadeia do péptido pelo aminoácido a acoplar (Figura 23).⁷⁸

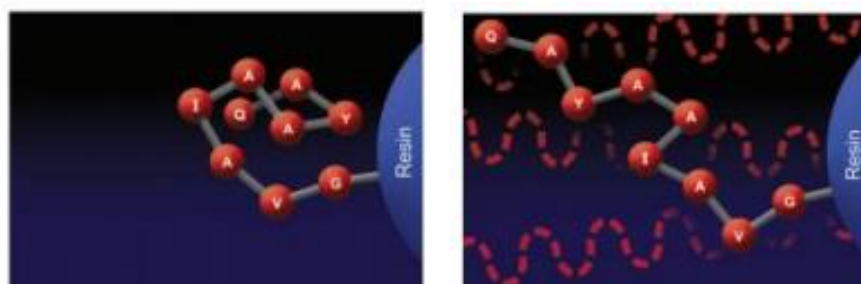


Figura 23- Efeito da radiação micro-ondas na cadeia peptídica (retirado da referência 2).

De facto, a associação de irradiação micro-ondas à SPPS permite a obtenção de péptidos com processos de síntese mais difíceis, com um rendimento/pureza expressivos. A dificuldade de síntese de alguns péptidos pode estar relacionada com a sua constituição. O péptido pode ser composto por aminoácidos mais difíceis de acoplar, ser de tamanho elevado ou ter tendência a agregar.⁶⁸

Com irradiação micro-ondas é essencial uma boa agitação da mistura reacional. Uma agitação insuficiente não permite expor homogeneamente o aminoácido e reagentes de acoplamento à radiação, o que compromete o rendimento e pureza da síntese. Os solventes comumente utilizados, como DMF, absorvem fortemente a energia micro-ondas, pelo que numa agitação insuficiente pode causar também uma diminuição da penetração das micro-ondas.⁷⁸ A importância da agitação já foi demonstrada por

S. Coantic *et. al*/que sintetizou um nonapéptido com e sem o agitador magnético, e obteve uma pureza de 76% vs. 42%, respetivamente.⁷⁹

A síntese assistida por micro-ondas veio permitir realizar um enorme leque de reações químicas em poucos minutos, que demorariam horas ou dias a finalizar, abrindo assim as portas à evolução científica.

1.6. Pensos ou *wound dressings*

Os pensos ou *wound dressings* podem ser classificados de acordo com as suas funções e/ou materiais utilizados na sua produção, em passivos, interativos e bioativos.⁸⁰ Os pensos passivos oferecem uma barreira física protetora, servindo unicamente para revestir a ferida. Foram o primeiro tipo de penso para feridas a aparecer e são, portanto, os mais simples e comuns. Indicados para feridas superficiais, ajudam a minimizar a colonização por bactérias, mas acarretam também desvantagens como o facto de poderem ficar agarrados à ferida e causar danos acrescidos quando retirados.⁸¹ Como o próprio nome indica, estes não apoiam na cicatrização da ferida, mas ajudam a protegê-la do ambiente externo. Os mais conhecidos são as gazes e as ligaduras.

Os pensos interativos são compostos por polímeros naturais ou sintéticos, e providenciam uma barreira efetiva contra a passagem de microrganismos. Ajudam a manter o ambiente húmido, propício para o processo de regeneração da pele, estimulando o aumento da proliferação celular. Aparecem sob a forma de hidrogel, espuma, filme adesivo, entre outras (Figura 24). São adequados para feridas mais graves do que a categoria anterior, nomeadamente feridas agudas e crónicas. Estes pensos têm a particularidade de serem capazes de absorver exsudados e manterem o seu equilíbrio. Contudo, o meio húmido que garantem à ferida tende a gerar um ambiente condutivo à proliferação microbiana, o que pode agravar infeções pré-existentes.²²

A mais recente categoria de pensos são os bioativos que, como o próprio nome indica, desempenham um papel ativo no tratamento das feridas, por conterem na sua estrutura fibrosa moléculas especializadas, como por exemplo fármacos ou agentes antimicrobianos. Aqui, as fibras podem ser obtidas por técnicas de *spinning* e permitem uma libertação gradual de moléculas bioativas diretamente na área afetada.⁸² Por vezes, é ainda considerada a categoria dos pensos inteligentes, aqueles capazes de garantir uma monitorização em tempo real do ambiente da ferida através da utilização de sensores.⁸³



Figura 24- Alguns tipos de *wound dressings* (adaptado da referência 84).

1.7. Produção de microfibras

1.7.1. *Wet-spinning*

A técnica de *wet-spinning* ou fiação a húmido permite a produção de fibras numa escala maioritariamente micrométrica. O *wet-spinning* baseia-se no princípio da precipitação. O polímero é inicialmente dissolvido num solvente apropriado e posteriormente a solução polimérica é impulsionada através de uma fileira (*spinneret*) ou agulha e extrudida. À medida que o filamento polimérico vai sendo impulsionado para o exterior, a solução é mergulhada num banho de coagulação contendo um líquido não solvente do polímero. É neste líquido que ocorre a precipitação, causada por ligações intermoleculares e, conseqüente, solidificação da fibra. Durante este período, o solvente da solução polimérica vai-se dispersando no banho, até que seja completamente eliminado do polímero.⁸⁵

A fieira é uma peça metálica com orifícios de número e tamanho selecionados mediante a aplicação pretendida para as fibras. Depois de saírem da fieira e coagularem, as fibras são recolhidas continuamente a uma velocidade controlada por rolos de estiramento ou podem ser organizadas em *scaffolds* tridimensionais. O controlo dos parâmetros de processamento, nomeadamente o tipo de banho de coagulação, a temperatura, a velocidade de extrusão e estiramento, e a concentração e viscosidade da solução polimérica, são cuidadosamente definidos para a obtenção de fibras com as características desejadas.

Em escala laboratorial, o aparato padrão envolve uma seringa conectada a uma agulha ou *spinneret* (extrusor), através da qual a bomba peristáltica impulsiona a saída da solução polimérica para o banho

de coagulação, a uma velocidade controlada (Figura 25). Depois de obtidas, e dependendo da aplicação, as fibras podem ser sujeitas a alguns tratamentos como alongamento, lavagem e/ou secagem.⁸⁶

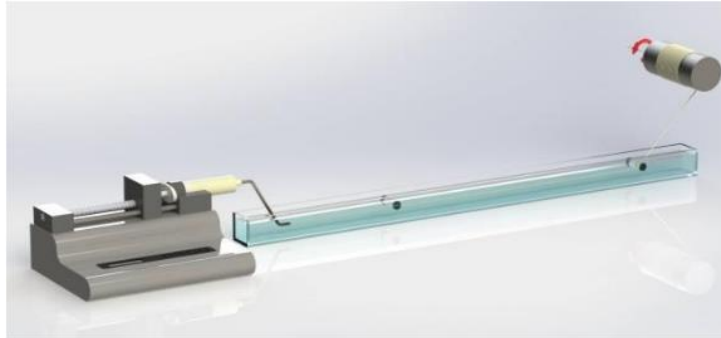


Figura 25- Aparelho de *wet-spinning* (retirado da referência 87).

1.7.1.1. *Wet-spinning* co-axial

As fibras produzidas por *wet-spinning* podem apresentar diferentes configurações estruturais, sendo uma das mais cobiçadas para transporte de moléculas ativas, a co-axial. Nos sistemas co-axiais dois polímeros diferentes são injetados juntos numa fieira co-axial e são simultaneamente expelidos e mergulhados no banho de coagulação, obtendo-se uma fibra com estrutura "núcleo-casca". Para tal a fieira co-axial tem dois orifícios, A e B (Figura 26), por onde entram o polímero que vai constituir o revestimento e o que vai formar o núcleo da fibra, respetivamente.⁸⁸

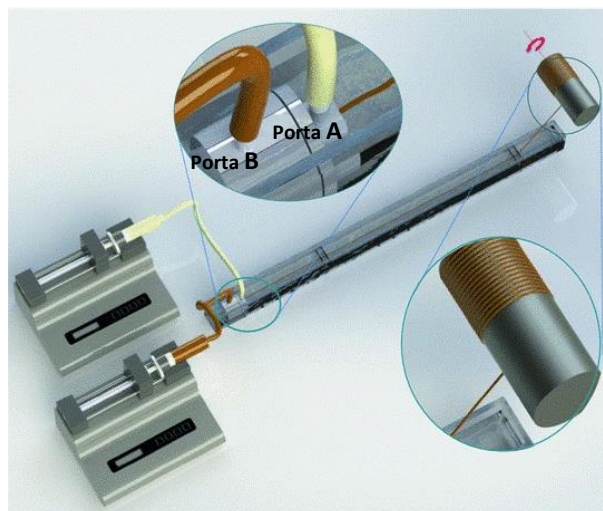


Figura 26- Sistema de *wet-spinning* co-axial (adaptado da referência 88).

Existe ainda a possibilidade de se criarem estruturas co-axiais ocas em que apenas o polímero externo é injetado, utilizando ar ou o banho de coagulação para criar a estrutura central oca.⁸⁶ Nestes sistemas, a estrutura interna em vez de ser composta por um polímero pode ser substituída por uma solução contendo uma biomolécula de interesse, gerando assim um transportador ativo. Contudo, por forma a garantir que a biomolécula não é perdida durante o processo de extrusão ou no banho de coagulação, é frequente incorporar o agente ativo na solução polimérica que dará origem ao núcleo da fibra, sendo que a camada polimérica de revestimento funciona como uma barreira protetora para a sua difusão controlada. Assim, tanto as fibras “núcleo-casca” como as fibras ocas têm elevado potencial para aplicação no âmbito da libertação controlada de biomoléculas e fármacos.^{89,90}

1.7.1.2. Modificação de fibras produzidas por *wet-spinning* com agentes ativos

O método mais simples para incorporação de agentes bioativos nas fibras produzidas por *wet-spinning*, através do sistema convencional, é pela sua junção na solução polimérica antes desta ser expelida através da fieira. No entanto, o contacto do agente bioativo com o solvente pode levar à perda de bioatividade da molécula ou à sua aglomeração à superfície da fibra, e consequentemente conduzir a uma libertação inicial brusca e pouco controlada ao longo do tempo.⁹¹ Contudo, continua a ser um método amplamente utilizado para a incorporação de agentes com variadas bioatividades. No *wet-spinning* pode também ser utilizado o método de adição de agentes bioativos através do banho de coagulação. Neste caso, a sua incorporação na matriz polimérica acontece durante a precipitação dos polímeros e consequente formação das fibras.⁸⁹

À semelhança das estruturas co-axiais, podem também ser produzidas fibras por *wet-spinning* com estrutura tri-axial, na qual as fibras são compostas por três camadas poliméricas e/ou de agentes bioativos ao invés de apenas duas. Aqui, a imobilização de agentes bioativos pode ocorrer em duas camadas internas distintas.⁹²

Graças à sua versatilidade é ainda possível alterar o número de agulhas e de seringas utilizadas no sistema, podendo assim vir a adaptar-se conceitos de outras técnicas de *spinning*. Por exemplo, estratégias já muito conhecidas do *electrospinning*, tais como *side-by-side*, *multi-jet* e *surface immobilization*, podem ser também aplicadas. O método *side-by-side* ou “lado a lado” baseia-se na extrusão de duas soluções poliméricas, ou uma solução polimérica e uma solução com o agente bioativo, através

de duas feiras colocadas lado a lado. Neste método, os polímeros ou polímero/agente bioativo não precisam ser solúveis num solvente comum. As fibras produzidas serão compostas por duas camadas poliméricas diferentes, a superior e a inferior. O método *multi-jet* consiste na utilização de várias feiras que podem conter várias soluções poliméricas e agentes ativos diferentes, permitindo assim a produção de fibras em maior quantidade ou fibras de diferentes polímeros/agentes bioativos misturados.⁹³ Estes métodos são considerados técnicas de imobilização não covalente.

A *surface immobilization* é um método de imobilização de caráter covalente. Ao contrário das técnicas de imobilização não covalente que priorizam interações eletrostáticas, pontes de hidrogénio, hidrofóbicas e forças de van der Waals, na imobilização covalente há uma diminuição da fuga de biomoléculas e maior estabilidade a longo prazo, o que pode resultar numa menor toxicidade.^{22,94}

A versatilidade da técnica de *wet-spinning* no que respeita à gama de polímeros passíveis de utilização, morfologia e organização estrutural das fibras produzidas, e métodos de imobilização de agentes bioativos, tem conduzido a uma crescente procura e, conseqüente, aplicação na área biomédica, por exemplo, *scaffolds* para engenharia de tecidos de músculo, cartilagem e vasos sanguíneos e, mais recentemente, em pensos para o tratamento de feridas agudas e crónicas.⁸⁹

1.7.2. Polímeros

As características mais aliciantes dos polímeros para aplicações biomédicas são a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade aliadas ao fácil processamento, flexibilidade, taxa de degradação controlável, elevada disponibilidade e serem, na sua grande maioria, recicláveis.⁹⁵ Contudo, estas características tendem a variar entre polímeros de origem natural e sintética. Os polímeros de origem natural, tal como o alginato de sódio, a gelatina ou o quitosano, são não tóxicos e, como tal, são seguros para o contacto com o organismo humano. São obtidos da natureza de forma ilimitada e renovável, sendo produzidos por sistemas biológicos como microrganismos, animais e plantas.⁸⁵ Os metabolitos ou produtos secundários (*byproducts*) oriundos destes polímeros podem ser usados pelo organismo humano ou facilmente eliminados ao nível renal.⁹⁶

Muitos polímeros biodegradáveis têm sido utilizados na produção de pensos fibrosos. A técnica de *wet-spinning* permite produzir fibras a partir de polímeros biodegradáveis de origem natural cujo processamento via outras técnicas de *spinning* é condicionado, por exemplo, devido à sua instabilidade térmica (exemplo, *melt-spinning*).⁸⁶ Os polímeros de origem natural podem ter atividade antibacteriana

intrínseca, não ameaçam o sistema imunitário e são biocompatíveis. Muitas vezes são processados em forma de fibras em conjunto com polímeros de origem sintética, já que as suas propriedades mecânicas tendem a ser mais limitadas. Os polímeros de origem sintética podem ser obtidos a partir da polimerização de monómeros e apresentam outras vantagens, nomeadamente propriedades físicas e mecânicas ajustáveis que facilitam a sua utilização em técnicas de *spinning*.⁹⁷ São também frequentemente utilizados em engenharia de tecidos e medicina regenerativa graças a essa versatilidade obtida através da manipulação das suas propriedades.⁹⁶

1.7.2.1. Alginato de sódio

O alginato de sódio (*SA-sodium alginate*) é um polímero natural extraído das algas castanhas. Este polímero linear é constituído por três tipos de segmentos poliméricos: ácido poli- β -D-manurónico, ácido poli- α -L-gulurónico e blocos de ácido D-manurónico e L-gulurónico alternados (Figura 27). O alginato de sódio está disponível comercialmente com diferentes pesos moleculares, que alteram as propriedades físicas dos géis resultantes, nomeadamente a viscosidade.⁹⁸ O alginato é não tóxico, é biocompatível, biodegradável, tem propriedades antissépticas e é relativamente acessível (economicamente). O alginato foi já investigado pela sua capacidade de aprisionar a elastase de neutrófilos ou de se ligar a citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-8, cujos níveis se encontram demasiado elevados em feridas crónicas, com resultados bastante promissores. A sua atividade antioxidante foi também demonstrada.⁹⁹

A gelificação de uma solução aquosa de alginato é garantida através de agentes reticulantes como catiões divalentes; o cloreto de cálcio é um dos agentes mais frequentemente utilizados. Durante o *wet-spinning*, a reticulação do SA ocorre de forma espontânea, desde que a extrusão seja feita num banho de coagulação adequado.^{98,100}

Pensos para feridas fabricados com alginato são capazes de manter um ambiente húmido adequado ao processo de cura e minimizam as infeções bacterianas na ferida. São conhecidos por serem altamente absorventes, ou por garantirem a hidratação de feridas secas, prevenindo a formação de cicatrizes ou a libertação de odores. Graças a essas propriedades, pensos ricos em SA são capazes de promover a formação de tecido de granulação e uma rápida epitelização.^{101,102}

Este polímero é habitualmente utilizado em conjunto com outros dotados de características enriquecedoras para a aplicação pretendida. A gelatina (GN-*gelatin*) em combinação com o SA é desejável para aplicações relacionadas com a libertação controlada de biomoléculas e fármacos.^{100,103} Por sua vez,

scaffolds de alginato e quitosano têm sido produzidos com resultados interessantes na engenharia de tecidos para ligamentos e tendões.¹⁰⁴

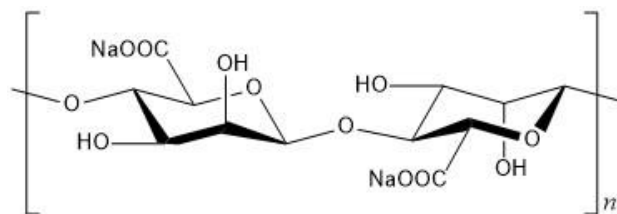


Figura 27- Estrutura de um bloco de ácido D-manurónico, alginato de sódio (SA).

1.7.2.2. Gelatina

A GN é também um polímero natural biodegradável, obtido a partir do colagénio, que é a proteína principal da matriz extracelular e pode ser extraída de tecidos animais. Durante a produção de GN, a conformação em tripla hélice do colagénio, que consiste em três cadeias polipeptídicas interligadas, é desfeita, assim, a estrutura terciária é perdida dando origem a colagénio desnaturado.¹⁰⁵ A GN é uma mistura de polipéptidos, cada um com 50-1000 aminoácidos, contendo maioritariamente resíduos de glicina (Gly), prolina e 4-hidroxiprolina (Figura 28). A sua temperatura de transição sol-gel é de aproximadamente 35°C.¹⁰⁶

A GN não provoca resposta imunitária, é citocompatível e é economicamente mais viável que o colagénio, mostrou ainda ter capacidade de promover a adesão, a proliferação e a diferenciação celular, motivos pelos quais é habitualmente incorporada em pensos, nomeadamente em hidrogéis.^{107,108} Existem dezenas de pensos de gelatina disponíveis no mercado, para controlo de hemorragia em procedimentos clínicos, para absorver exsudados de feridas e manter o ambiente propício à cura de feridas. Existem também pensos de GN com agentes incorporados, nomeadamente extratos de plantas, para libertação controlada de moléculas com atividade terapêutica (antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, etc.), muitos deles produzidos por técnicas de *spinning*.¹⁰⁶ Apesar do potencial terapêutico da GN, a sua aplicação em formulações médicas pode ser limitada pela sua rápida degradação em ambientes aquosos.¹⁰⁹ A GN deve ser modificada com agentes reticulantes para que as suas propriedades mecânicas e estabilidade física respondam às necessidades das aplicações.¹¹⁰ Além de pensos, é comumente utilizada em sistemas de libertação controlada de fármacos e em *scaffolds* para engenharia de tecidos.

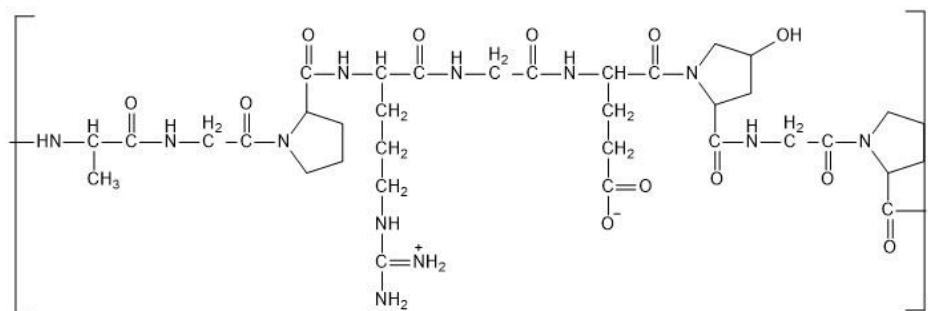


Figura 28- Estrutura da gelatina (GN).

1.7.2.3. Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação da quitina, um dos polímeros naturais mais abundantes extraído do exoesqueleto dos artrópodes. Composto por unidades de glucosamina e *N*-acetilglucosamina, é um polímero parcialmente acetilado e as suas propriedades mecânicas e biológicas dependem largamente do seu grau de desacetilação.¹¹¹ Apresenta atividade antibacteriana e é um reconhecido interveniente nas várias fases de regeneração de feridas. O quitosano é capaz de promover a coagulação sanguínea durante a hemóstase e promover a migração de neutrófilos e macrófagos no decorrer da fase inflamatória. Além disso, é capaz de promover a granulação dos tecidos, induzindo a proliferação de fibroblastos, culminando no acelerar do processo de regeneração tissular.¹¹²

A utilização de quitosano e seus derivados no campo da regeneração de feridas continua a despoletar um crescente interesse. Por exemplo, a aplicação de quitosanos modificados na libertação controlada de drogas tem sido amplamente explorada.¹¹¹ Fibras com base em quitosano foram também já produzidas por *wet-spinning*, revelando importantes características mecânicas para a produção de pensos para feridas.¹¹³ Contudo, o quitosano, apresenta uma grande limitação ao seu uso generalizado, a sua fraca solubilidade a pH superior a 6,5, o que o torna incompatível com o pH fisiológico (7,4).¹¹⁴ Com o intuito de contornar esta limitação modificações químicas são frequentemente aplicadas. Para o propósito deste estudo, atenção será dada ao *N*-carboximetilquitosano (NCMC), obtido através da carboximetilação dos grupos amina do quitosano (Figura 29).

O NCMC é um derivado do quitosano, solúvel a pH neutro e básico (compatível com feridas crónicas cujo pH varia entre 7.5 e 9.0), biodegradável e não tóxico. Exibe estabilidade térmica e resistência mecânica superiores ao seu predecessor, o quitosano.¹¹⁵ Além disso, estudos demonstram o seu

potencial para aplicações em cosmética e conservação de alimentos, tendo sido igualmente testado em produtos para aplicações bucais, como pastas de dentes, com resultados bastante satisfatórios.^{116,117} Em sistemas de liberação controlada de fármacos, o potencial do NCMC foi comprovado para a administração oral de drogas.¹¹⁸ As características deste polímero, nomeadamente a sua solubilidade a pH fisiológico, despertam o interesse na sua aplicação em sistemas de auxílio à regeneração de tecidos, nomeadamente pensos para feridas crónicas.

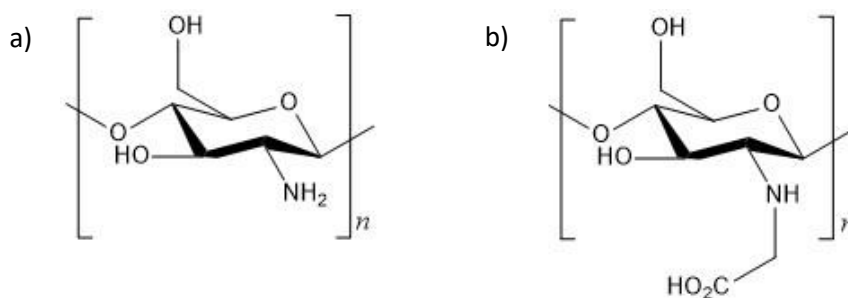


Figura 29- Estruturas de: a) quitosano; b) *N*-carboximetilquitosano (NCMC).

1.7.2.4. Policaprolactona

O polímero policaprolactona (PCL) é um poliéster, obtido da polimerização por abertura de anel da ϵ -caprolactona, derivada de combustíveis fósseis (Figura 30).¹¹⁹ Pertence à classe de polímeros sintéticos completamente biodegradáveis e biocompatíveis. O PCL pode ser degradado em condições fisiológicas através da hidrólise das suas ligações éster, daí despertar especial atenção para aplicações como biomaterial implantável, sistemas de liberação controlada ou *scaffolds* para engenharia de tecidos. É considerado um polímero seguro, tendo sido aprovado pela FDA para uso em humanos.¹²⁰ A sua taxa de degradação mais lenta, em comparação com polímeros da mesma categoria, contribui para a sua utilização em aplicações mais prologadas.¹²¹

Adicionalmente, o PCL é não tóxico, é citocompatível, e apresenta uma elevada flexibilidade com grande resiliência mecânica.^{119,122} Apesar da sua grande versatilidade (intimamente relacionada com o seu peso molecular), a natureza hidrofóbica do PCL tende a limitar a sua interação com tecidos celulares, o que frequentemente é ultrapassado com a conjugação com polímeros de origem natural.¹²³ A facilidade de processamento deste polímero, sozinho ou em combinações poliméricas, permite produzir estruturas com diferentes formatos, incluindo micro e nanofibras obtidas por técnicas de *spinning*.^{124,125}

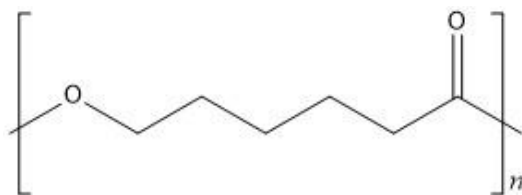


Figura 30- Estrutura do polímero policaprolactona (PCL).

1.8. Objetivo

O presente trabalho visa o desenvolvimento de sistemas fibrosos modificados com biomoléculas, com potencial para servirem como pensos, que desempenhem um papel ativo no restabelecimento das condições propícias ao processo de regeneração de feridas crônicas. Pretende-se alcançar este objetivo através da incorporação de péptidos antimicrobianos e/ou imunoregulatórios, que possam apoiar no combate à crescente tendência de resistência das bactérias e que apresentem atividades promotoras de regeneração celular, em fibras processadas pela técnica de *wet-spinning*.

2. Resultados e discussão

2.1. Síntese e caracterização de péptidos bioativos

Atendendo aos objetivos do trabalho foram escolhidos como alvo dois péptidos. O AAPV, capaz de regular a atividade da HNE que se apresenta em níveis demasiado elevados em feridas crónicas, e o CW49, capaz de estimular a angiogénese e diminuir a prolongada fase inflamatória característica deste tipo de feridas, que foram sintetizados recorrendo à técnica de síntese peptídica em fase sólida. Os péptidos sintetizados foram caracterizados com recurso às técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR), Espectrometria de massa com Ionização por *Electrospray* (ESI-MS) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

2.1.1. Péptido Ala-Ala-Pro-Val

O suporte sólido escolhido para a síntese do AAPV, foi a resina de poliestireno cloreto de 2-clorotritilo, pré-carregada com o aminoácido valina (com uma funcionalização de 0,530 mmol/g).

Os restantes aminoácidos foram acoplados utilizando DIC como agente de acoplamento, na presença de Oxyma®, sob radiação micro-ondas (5 eq. a.a, 5 eq. DIC e 5 eq. Oxyma relativamente à funcionalização da resina). Foram usados dois ciclos de irradiação por micro-ondas de 5 minutos cada (P=25 W, T=75°C). Resultados anteriores obtidos pelo grupo de trabalho reportaram a mistura de acoplamento DIC/Oxyma® como um ótimo cocktail para acoplamento em SPPS assistida por micro-ondas. No acoplamento da Ala à Pro, foram realizados quatro ciclos curtos de micro-ondas ao invés de dois, numa tentativa de assegurar que este aminoácido acoplava à prolina.

Os aminoácidos utilizados estavam *N*-protegidos com o grupo Fmoc, razão pela qual as desproteções foram realizadas com piperidina 20% em DMF sob radiação micro-ondas (30 segundos + 3 minutos, P= 50W, T=75°C). Para separar os péptidos do suporte sólido foi utilizado o cocktail de clivagem ácido acético (AcOH)/trifluoroetanol (TFE)/diclorometano (DCM) 1:2:7 e mantida a agitação 2 horas à temperatura ambiente (Figura 31).

Atendendo à quantidade de AAPV que seria posteriormente necessária para a aplicação do péptido em fibras, e à capacidade do reator de micro-ondas a síntese foi repetida três vezes.

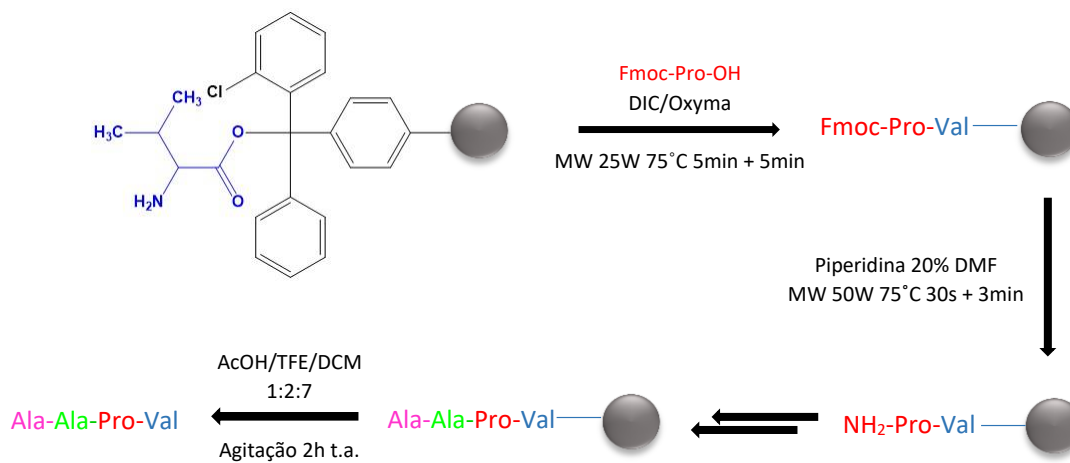


Figura 31- Esquema das condições de reação utilizadas para a síntese do péptido AAPV.

Tabela 1- Comparação do rendimento das quatro sínteses de AAPV realizadas.

	1ª síntese	2ª síntese	3ª síntese	sem MW
Quantidade de resina (g)	1,007	1,007	1,110	0,7350
Massa cruda (g)	0,0834	0,1104	0,1368	0,1306
Rendimento (%)	44,15	58,44	65,24	94,17

A primeira síntese do AAPV teve um rendimento crudo de 44,15% (Tabela 1), no entanto o espectro de RMN ¹H apresentava alguns pequenos sinais extra. Por essa razão a amostra foi submetida a uma recristalização, numa tentativa de aumentar a sua pureza, obtendo-se uma massa de 0,0550 g (η = 29,12%), corresponde a uma perda de composto considerável, de 34,05% relativamente à quantidade inicialmente obtida nesta síntese. Da recristalização resultou uma ligeira melhoria na pureza do péptido avaliada por RMN ¹H. A amostra já recristalizada foi utilizada nas análises seguintes.

De forma a confirmar a pureza do péptido sintetizado foi realizada uma análise de HPLC analítico. Vários eluentes foram testados, nomeadamente uma mistura eluente acetonitrilo (ACN)/H₂O (1:1) com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA), ACN/H₂O (2:1) com 0,1% de TFA, ACN/H₂O (1:2) com 0,1% de TFA e também ACN/H₂O (1:4) com 0,1% de TFA. As análises foram realizadas com um fluxo de 0,6 mL/minuto e um comprimento de onda de deteção de 214 nm, este comprimento de onda era mencionado na literatura para este péptido e é abrangente para uma grande variedade de moléculas biológicas.⁵⁰

Em nenhum dos diferentes eluentes testados foi detetado um contaminante em quantidades significativas. Concluímos que a melhor separação era obtida com o eluente ACN/H₂O (1:4) com 0,1% de TFA (Figura 32), verificando-se que o péptido obtido apresentava uma pureza de 98,45%.

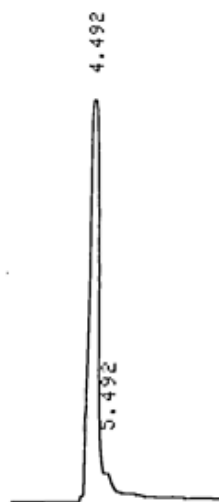


Figura 32- Cromatograma HPLC do péptido AAPV obtido na primeira síntese após recristalização.

Tendo-se suspeitado que o baixo rendimento observado na primeira síntese estaria associado a problemas de agitação no vaso reacional durante a irradiação por micro-ondas, foi tida uma atenção redobrada á agitação da resina ao longo do processo de síntese. Pelo que a agitação foi complementada por agitação manual da resina com a mistura de acoplamento, fazendo algumas pausas para agitação durante os ciclos de micro-ondas. Para além desta alteração, a mistura de acoplamento de cada aminoácido foi deixada em agitação 15 minutos ao invés dos 5 minutos realizados nas sínteses anteriores. Nestas condições, o péptido foi obtido um rendimento de 58,44%. Uma vez que nem o RMN ¹H, nem o HPLC apresentavam contaminações significativas nesta síntese, o péptido não necessitou de recristalização (97,41% de pureza por HPLC).

Para obtenção de maior quantidade de AAPV foi realizada uma terceira síntese nas mesmas condições otimizadas da segunda síntese, obtendo-se o péptido com um rendimento de 65,24% e com 96,80% de pureza por HPLC.

Apesar de observado um aumento de rendimento, este resultado não corresponde ao esperado para um péptido desta dimensão. Esperar-se-iam maiores rendimentos. Após termos encontrado o mesmo tipo de dificuldades nas sínteses do péptido CW49 (Secção 2.2 Síntese do péptido CW49), uma nova revisão bibliográfica foi feita sendo detetado um artigo que reporta a perda de funcionalização da

resina cloreto de 2-clorotritilo nos primeiros acoplamentos quando submetida a radiação micro-ondas. Assim, decidiu-se testar a síntese deste péptido sem irradiação micro-ondas, adaptando as condições de sínteses usadas com micro-ondas às condições referidas por Leronymaki *et al.*¹²⁶

Os aminoácidos foram acoplados utilizando também DIC/Oxyma® mas na proporção de 5 eq. a.a, 5,5 eq. DIC e 5,5 eq. Oxyma relativamente à funcionalização da resina. A mistura reacional ficou em agitação durante 6 horas à temperatura ambiente. Após cada acoplamento o grupo Fmoc foi removido com três soluções de piperidina 20% em DMF adicionadas sucessivamente.

Para separar o péptido do suporte sólido foi utilizado inicialmente um cocktail de clivagem contendo apenas TFE/DCM 3:7 e mantido sob agitação 2 horas à temperatura ambiente, de acordo com as indicações de Leronymaki *et al.*¹²⁶ Desta clivagem foram obtidas 90,80 mg de péptido o que corresponde a um rendimento de 65,47%. Para confirmar a remoção completa do péptido da resina, submeteu-se a resina a nova reação de clivagem usando o cocktail de clivagem AcOH/TFE/DCM 1:2:7 (2 horas em agitação à temperatura ambiente), usado nas sínteses anteriores. Desta clivagem foram obtidas mais 39,80 mg de péptido, que corresponde a 28,70% de rendimento (η total= 94,17%). A análise de HPLC e RMN ¹H do péptido obtido está de acordo com os resultados das sínteses anteriores (98,35% de pureza por HPLC).

Este resultado indica que, efetivamente, houve perdas de funcionalização da resina de poliestireno cloreto de 2-clorotritilo, muito provavelmente derivadas da utilização de radiação micro-ondas. Além disso revelou que o ácido acético é essencial na mistura de clivagem para total separação do péptido da resina.

A estrutura do péptido foi confirmada por Espectroscopia de Ressonância Magnética uni- e bidimensional (¹H, ¹³C, Aumento do sinal sem distorção por transferência de polarização (DEPT 135), Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações (HMBC) e Correlação heteronuclear múltipla quântica (HMQC)). Foi necessário testar a solubilidade do péptido em alguns dos solventes comumente usados para RMN, sendo obtidos melhores resultados com CD₃OD e DMSO-d₆. Em seguida são apresentados os espectros RMN ¹H, ¹³C e bidimensionais realizados em CD₃OD.

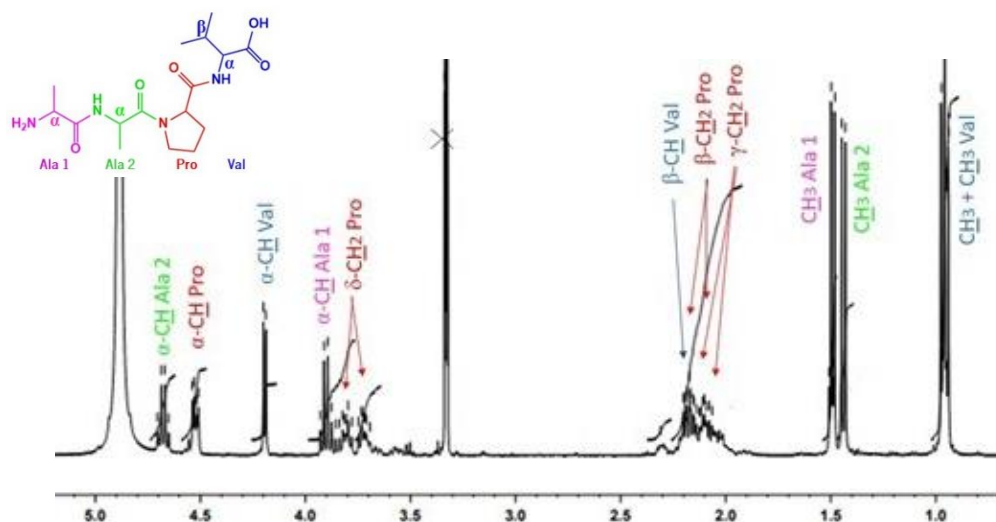


Figura 33- Espectro de RMN de ^1H do AAPV em CD_3OD .

No espectro de RMN ^1H , Figura 33, podemos discernir os diferentes sinais dos aminoácidos que constituem o péptido Ala-Ala-Pro-Val. Entre os 0,5 e 1,5 ppm surgem os CH_3 da Val e de ambas as Ala. De seguida aos 2,0-2,5 ppm surgem os sinais característicos do anel de pirrolidino da Pro, $\beta\text{-CH}_2$ e $\gamma\text{-CH}_2$, e também o $\beta\text{-CH}$ da Val. E por fim surgem a partir dos 3,5 ppm até perto dos 5 ppm os sinais dos $\alpha\text{-CH}$ dos quatro aminoácidos assim como o $\delta\text{-CH}_2$ da Pro. São ainda visíveis sinais a 3,33 e 4,86 ppm, característicos do solvente, CD_3OD .¹²⁷ Neste espectro não são visíveis os NH e NH_2 que constituem o péptido, naturalmente, visto que a análise foi realizada em CD_3OD e pode acontecer a troca entre protão e deutério.

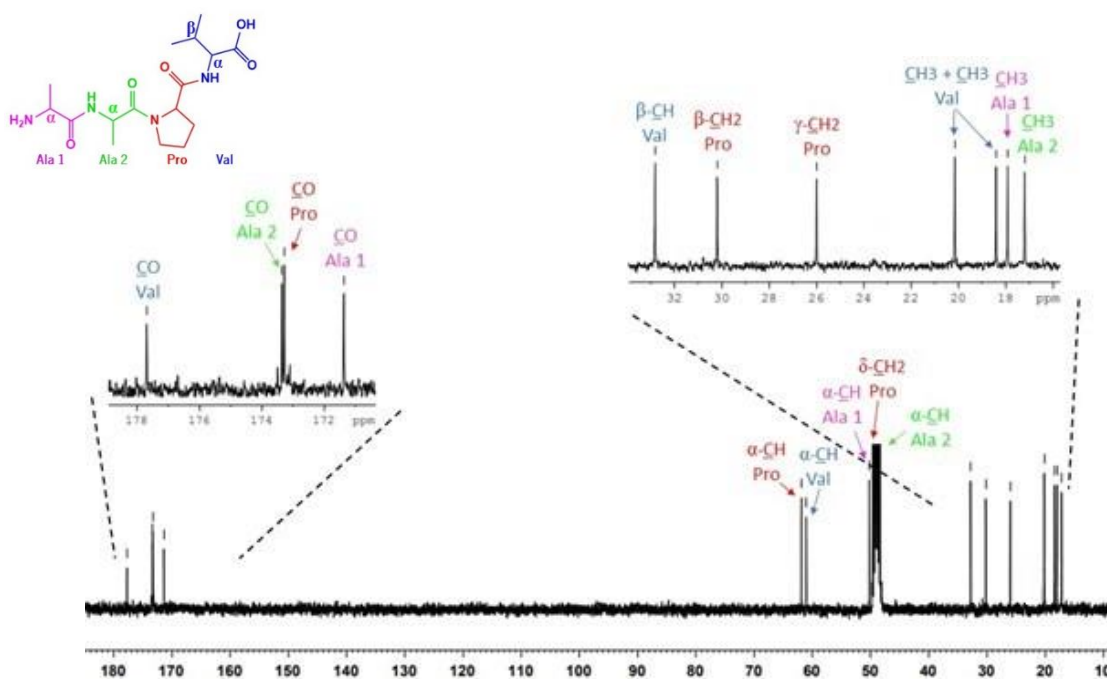


Figura 34- Espectro de RMN de ^{13}C do AAPV em CD_3OD .

Na Figura 34 é apresentado o espectro de RMN de ^{13}C do péptido. Aos 15 ppm surgem os primeiros sinais, que correspondem aos CH_3 das Ala e da Val. De seguida aparecem os carbonos $\beta\text{-CH}_2$ e $\gamma\text{-CH}_2$ da Pro e o carbono $\beta\text{-CH}$ da Val. A partir dos 45 ppm surgem os $\alpha\text{-CH}$ dos quatro aminoácidos e do $\delta\text{-CH}_2$ da Pro. Infelizmente os sinais do $\alpha\text{-CH}$ da Ala 2 e o $\delta\text{-CH}_2$ da Pro estão tapados pelo sinal do CD_3OD , mas foi possível conferir a sua presença com a ajuda dos espectros de correlação $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DEPT 135, HMBC e HMQC.¹²⁷ Os grupos carbonilo surgem após os 170 ppm e permitem confirmar o número de ligações peptídicas.

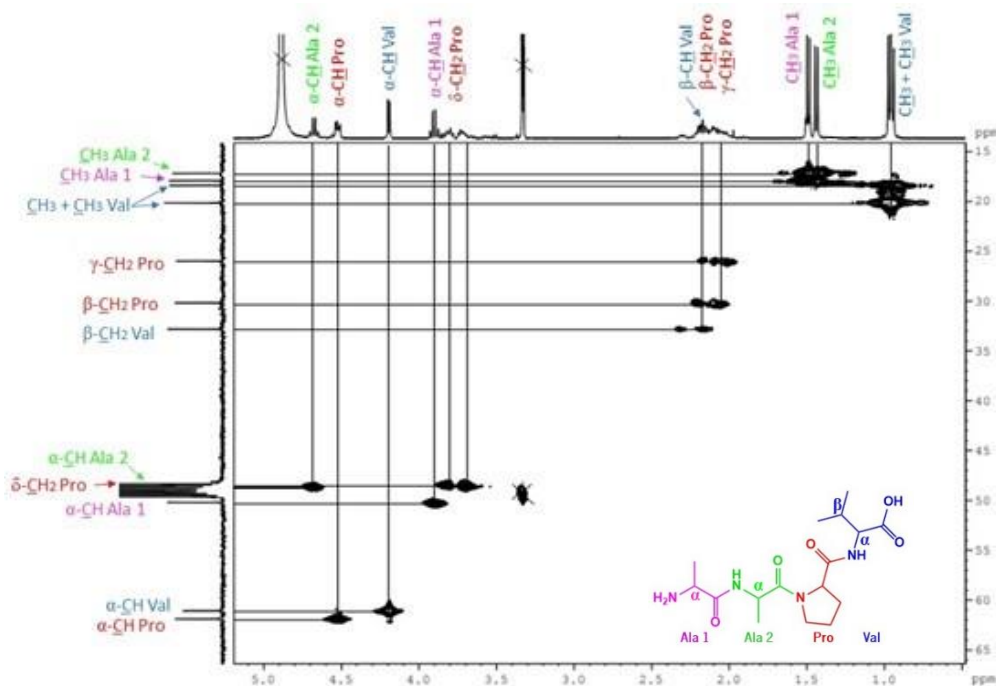


Figura 35- Espectro de HMQC do AAPV em CD_3OD .

O espectro de correlação bidimensional HMQC foi essencial para fazer a correta correlação de alguns sinais (Figura 35). Nomeadamente para fazer a correspondência entre os sinais de ambas as Ala e para localizar os $\alpha\text{-CH}$ da Ala 2 e o $\delta\text{-CH}_2$ da Pro que estão tapados pelo sinal do CD_3OD .¹²⁷

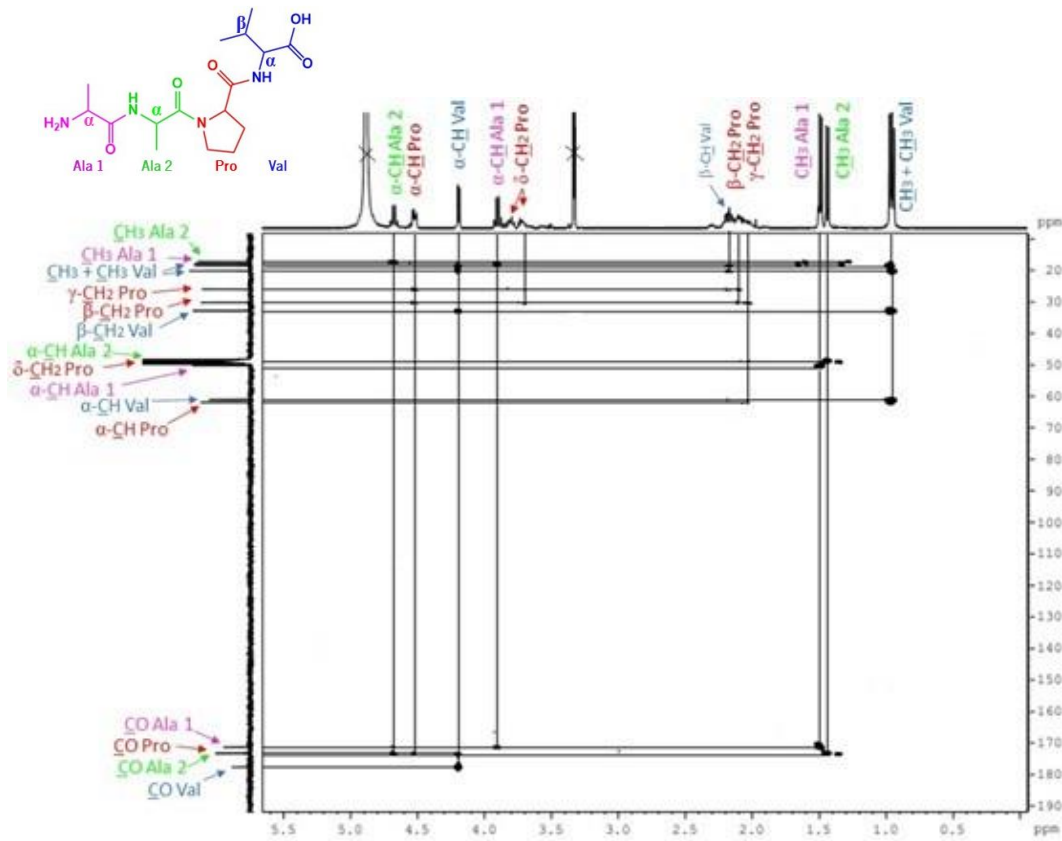


Figura 36- Espectro de HMBC do AAPV em CD₃OD.

O espectro de correlação bidimensional HMBC foi essencial para identificar os grupos carbonílicos do péptido, através da informação na distância de 2-3 ligações (Figura 36). Assim como para fazer a distinção entre os sinais das duas Ala.

Tabela 2- Tabela resumo da atribuição dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C , do péptido AAPV em CD_3OD .

	Desvio químico RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade de sinal	Nº de protões	Atribuição de H	Desvio químico RMN ^{13}C (ppm)	Atribuição de C
Ala 1	1,49	d	3	CH_3	17,42	CH_3
	3,91	q	1	$\alpha\text{-CH}$	50,21	$\alpha\text{-CH}$
	-	-	-	-	171,36	C=O
Ala 2	1,44	d	3	CH_3	17,18	CH_3
	4,68	q	1	$\alpha\text{-CH}$	48,36	$\alpha\text{-CH}$
	-	-	-	-	173,35	C=O
Pro	2,06-2,20*	m	5*	$\beta\text{-CH}_2$	25,99	$\gamma\text{-CH}_2$
				$\gamma\text{-CH}_2$	30,18	$\beta\text{-CH}_2$
	3,69-3,75	m	1	$\delta\text{-CH}_2$	48,57	$\delta\text{-CH}_2$
	3,78-3,88	m	1			
	4,51-4,54	m	1	$\alpha\text{-CH}$	61,87	$\alpha\text{-CH}$
-	-	-	-	173,27	C=O	
Val	0,94-0,97	m	6	$2x \gamma\text{-CH}_3$	18,40	CH_3
					20,14	CH_3
	2,06-2,20*	m	5*	$\beta\text{-CH}$	32,81	$\beta\text{-CH}$
	4,19	d	1	$\alpha\text{-CH}$	61,05	$\alpha\text{-CH}$
-	-	-	-	177,68	C=O	

*Aos sinais assinalados são atribuídos protões de mais de um aminoácido, aparecendo por isso repetidos na tabela. Assim, o número de protões que lhes é atribuído na tabela é apresentado separadamente para cada aminoácido de forma a simplificar a apresentação dos dados.

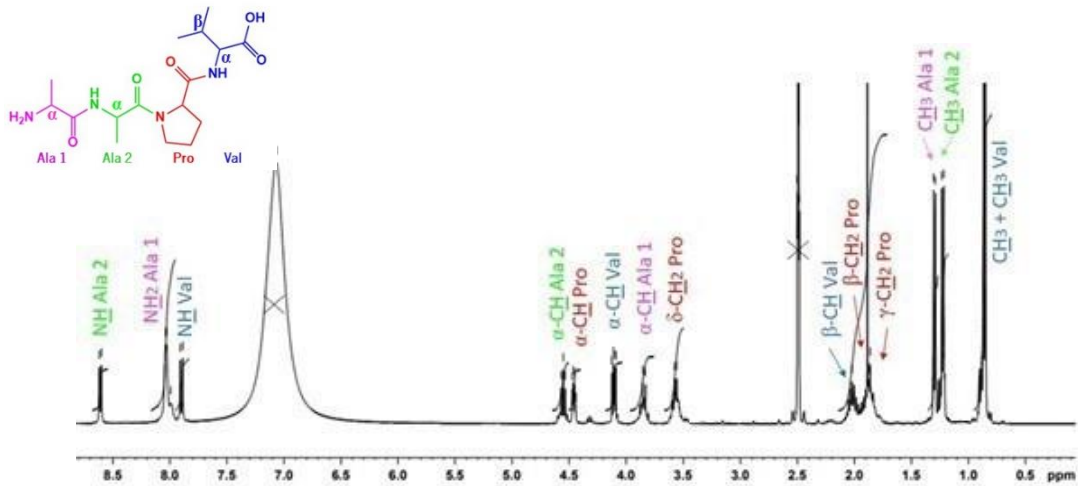


Figura 37- Espectro de RMN de ^1H do AAPV em DMSO-d_6 com TFA.

Foi ainda efetuada a análise de RMN ^1H utilizando 0,02 μL de TFA por mL de DMSO-d_6 , desta forma desviou-se o pico da água, que devido ao DMSO-d_6 ser higroscópico, inicialmente aparecia como um pico largo a 3,47 ppm, escondendo alguns sinais dos $\alpha\text{-CH}$ dos aminoácidos, mas apresenta-se agora a 7 ppm.¹²⁸ No espectro é visível o sinal característico do DMSO-d_6 a 2,49 ppm.¹²⁷ Esta análise foi mais informativa na medida em que permitiu discernir os sinais dos NH e NH_2 que surgem após os 7,5 ppm no espectro de ^1H apresentado na Figura 37.

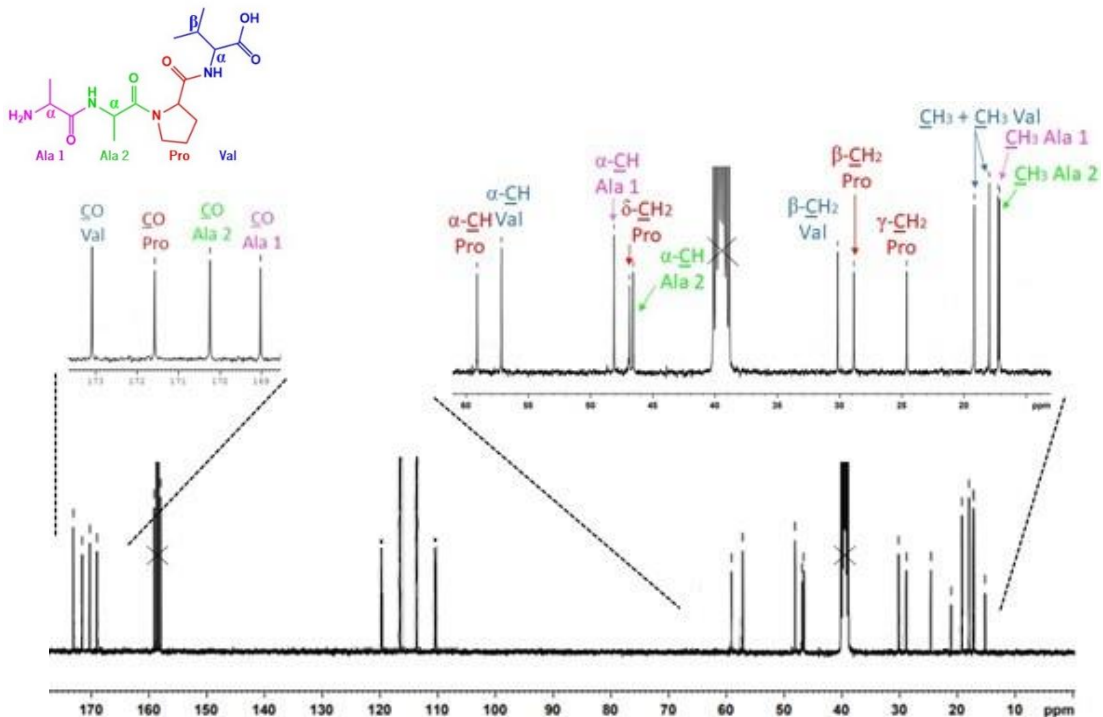


Figura 38- Espectro de RMN de ^{13}C do AAPV em DMSO-d_6 com TFA.

2. Resultados e discussão

A principal diferença entre o espectro de ^{13}C apresentado na Figura 38, em DMSO-d_6 , e anteriormente na Figura 34, em CD_3OD , é que é possível discernir os sinais do $\alpha\text{-CH}$ da Ala 2 e o $\delta\text{-CH}_2$ da Pro que anteriormente se encontravam escondidos pelo sinal do solvente. A 39,5 ppm o sinal do solvente, DMSO-d_6 .¹²⁷

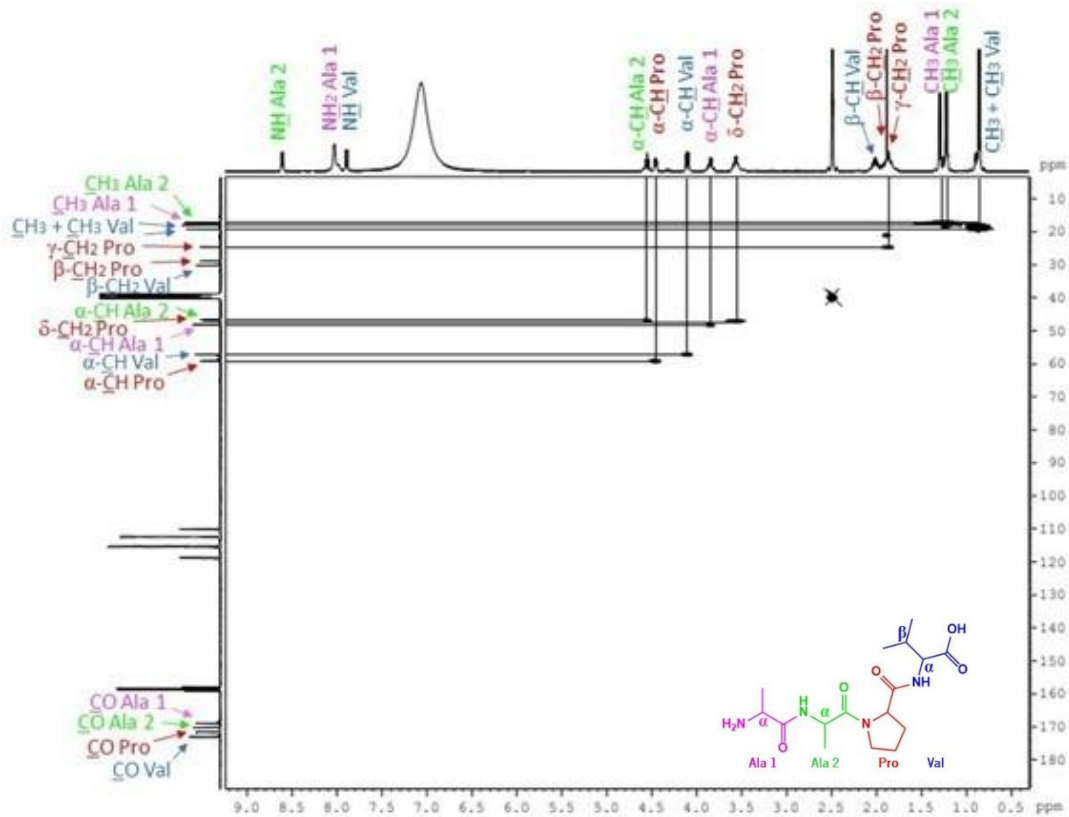


Figura 39- Espectro de HMQC do AAPV em DMSO-d_6 com TFA.

Mais uma vez o espectro de correlação bidimensional HMQC permitiu correlacionar os sinais dos prótons dos carbonos α , β , γ e δ com os mesmos no espectro de ^{13}C , assim como dos grupos CH_3 (Figura 39).

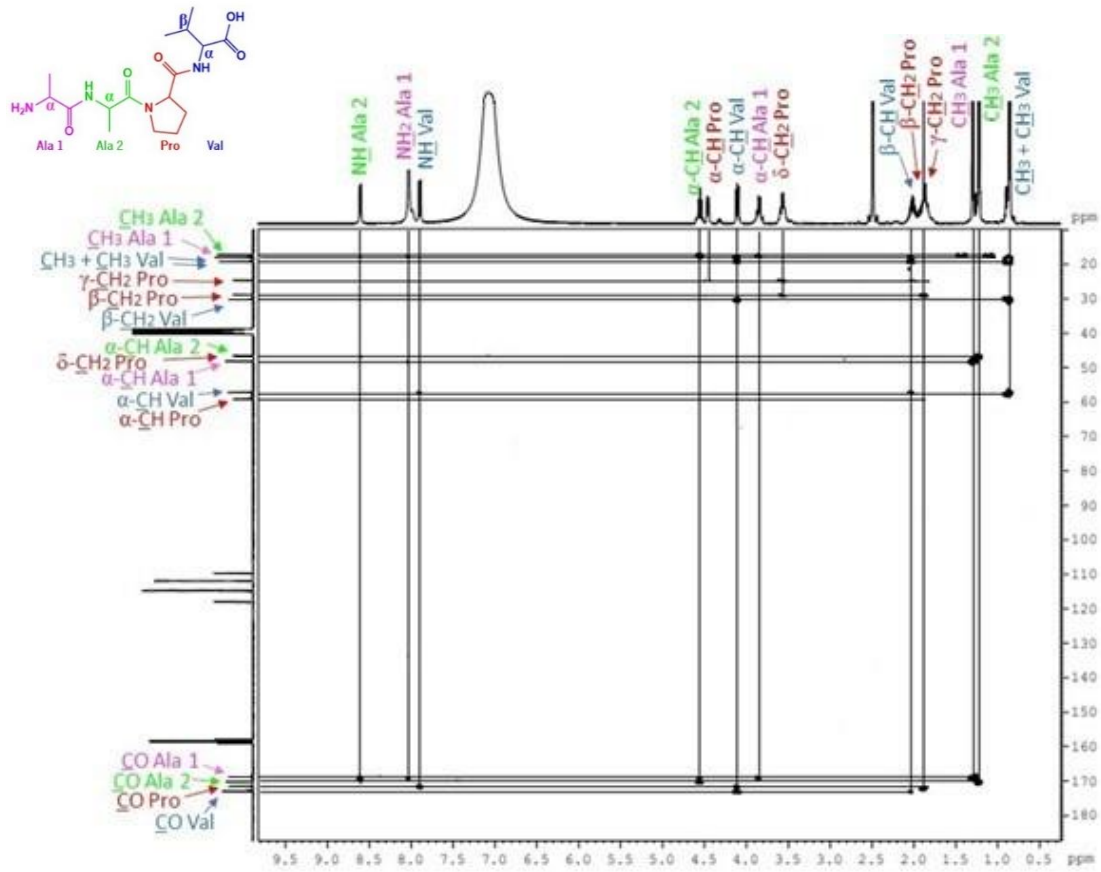


Figura 40- Espectro de HMBC do AAPV em DMSO-d₆ com TFA.

Foi com recurso ao espectro de correlação bidimensional HMBC que foi possível identificar os NH da Ala 2 e da Val assim como o NH₂ da Ala 1 (Figura 40).

Tabela 3- Tabela resumo da atribuição dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C , do péptido AAPV em DMSO- d_6 com TFA.

	Desvio químico RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade de sinal	Nº de protões	Atribuição de H	Desvio químico RMN ^{13}C (ppm)	Atribuição de C
Ala 1	1,30	d	3	CH_3	17,27	CH_3
	3,83-3,85	m	1	$\alpha\text{-CH}$	48,12	$\alpha\text{-CH}$
	8,04	br s	2	NH_2	169,02	C=O
Ala 2	1,22	d	3	CH_3	17,16	CH_3
	4,53-4,57	m	1	$\alpha\text{-CH}$	46,58	$\alpha\text{-CH}$
	8,61	d	1	NH	170,24	C=O
Pro	1,86-2,02*	m	6*	$\beta\text{-CH}_2$	24,61	$\gamma\text{-CH}_2$
				$\gamma\text{-CH}_2$	28,85	$\beta\text{-CH}_2$
	3,56-3,58	m	2	$\delta\text{-CH}_2$	46,87	$\delta\text{-CH}_2$
	4,45-4,47	m	1	$\alpha\text{-CH}$	59,16	$\alpha\text{-CH}$
	-	-	-	-	171,56	C=O
Val	0,85-0,87	m	6	2x $\gamma\text{-CH}_3$	17,98	CH_3
					19,18	CH_3
	1,86-2,02*	m	6*	$\beta\text{-CH}$	30,16	$\beta\text{-CH}$
	4,01-4,12	m	1	$\alpha\text{-CH}$	57,16	$\alpha\text{-CH}$
	7,90	d	1	NH	173,09	C=O

*Aos sinais assinalados são atribuídos protões de mais de um aminoácido, aparecendo por isso repetidos na tabela. Assim, o número de protões que lhes é atribuído na tabela é apresentado separadamente para cada aminoácido de forma a simplificar a apresentação dos dados.

Foi realizada uma caracterização do péptido por ATR-FTIR, o espectro resultante é apresentado na Figura 41.

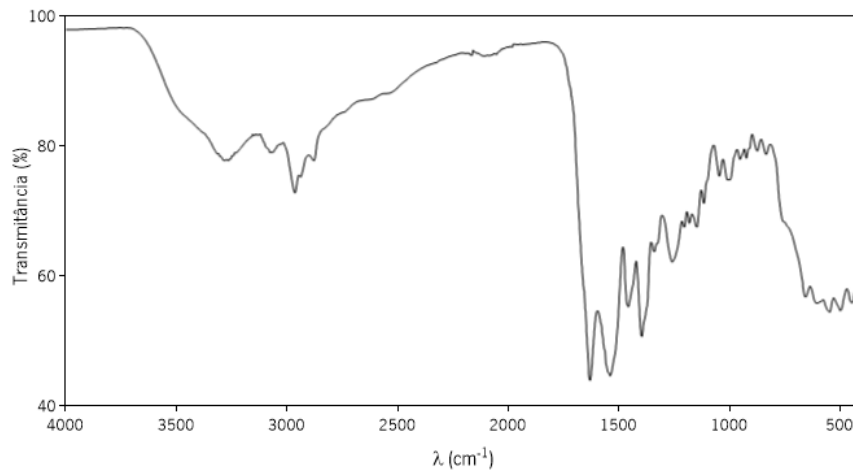


Figura 41- Espectro de ATR-FTIR do péptido AAPV.

A interpretação do espectro de infravermelho, apesar de não permitir uma confirmação total da estrutura do péptido, permite a identificação de ligações presentes, através da medição das frequências de vibração das ligações na molécula.

Na região do espectro dos grupos funcionais, a banda que surge a 3266 cm^{-1} , de forma larga com ponta estreita poderá estar associada à ligação NH dos grupos amida.

A um comprimento de onda de 2963 cm^{-1} surge uma banda atribuída à vibração de alongamento da ligação CH do tipo sp^3 e a correspondente vibração de torção a 1456 e 1395 cm^{-1} .

A 1629 cm^{-1} surge a banda atribuída à vibração de alongamento da ligação C=O dos grupos amida.

A espectrometria de massa é uma técnica amplamente utilizada para confirmação de estruturas peptídicas pela identificação do valor da massa molecular do composto.¹²⁹ Sob condições de ionização por *electrospray*, obteve-se um espectro de massa, que permitiu confirmar a presença do péptido (Figura 42).

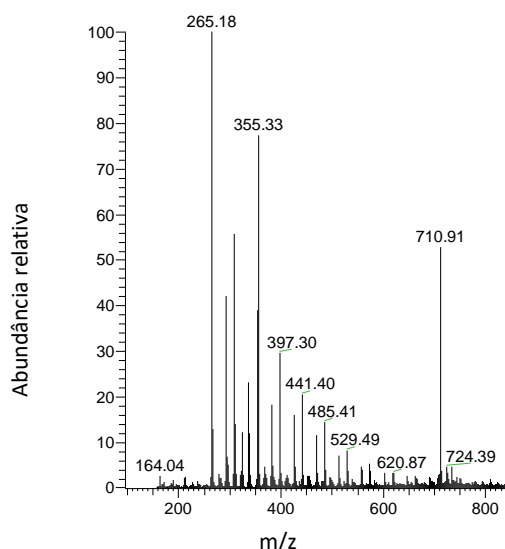


Figura 42- Espectro de massa do AAPV, obtido por ESI-MS em modo de ionização negativa.

O pico que corresponde ao íon molecular aquele a que é atribuído o maior m/z , corresponde geralmente à massa molecular da molécula. Neste caso o maior valor de m/z , de 710, corresponde a um dímero. É frequente a ocorrência de dímeros quando utilizada uma fonte de ionização ESI, correspondendo esse valor a 2 vezes a massa molecular do péptido.¹³⁰ Ao pico a m/z 355 corresponde a massa molecular do péptido AAPV com menos um próton (análise em ionização negativa).

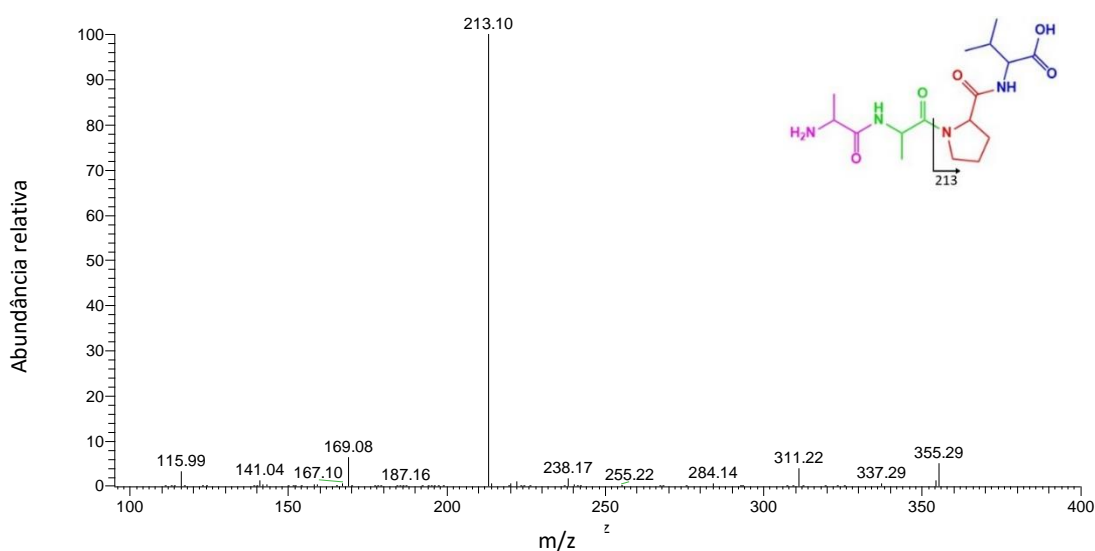


Figura 43- Espectro de massa do AAPV, obtido por ESI-MS em modo de ionização negativa, com ionização do fragmento m/z 355.

As fragmentações em péptidos ocorrem geralmente nas ligações amida. No íon de m/z 355 que corresponde ao péptido AAPV, a fragmentação dá origem ao pico base m/z 213, este fragmento filho

corresponde ao dipéptido Pro-Val (Figura 43). É ainda possível identificar o fragmento filho de m/z 116 que corresponde ao aminoácido Val.

2.1.2. Péptido CW49

O péptido CW49 (Figura 44), foi também sintetizado através da técnica de síntese peptídica em fase sólida com recurso a micro-ondas. Este péptido é composto por 11 aminoácidos: Ala, Pro, Phe, Arg (arginina), Met, Gly, Ile (isoleucina), Cys (cisteína), duas Thr (treonina) e Asn (asparagina).

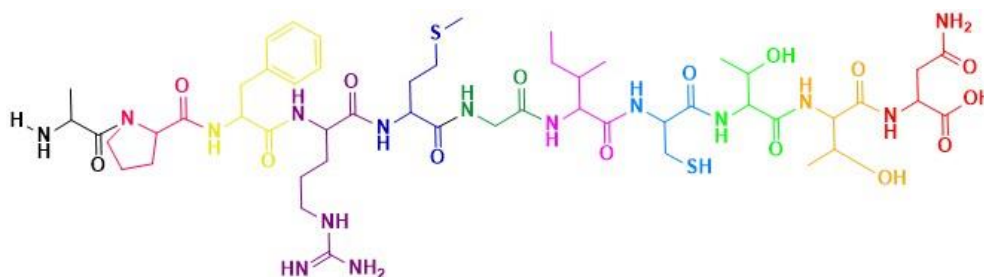


Figura 44- Estrutura do péptido CW49.

Alguns dos aminoácidos utilizados na síntese do CW49 têm cadeias laterais funcionalizadas que necessitam de proteção para que não reajam durante o acoplamento dos seguintes aminoácidos. A Arg tem um grupo guanidino com aminas livres. A Thr, o único aminoácido que se repete neste péptido, tem um grupo hidroxilo na sua cadeia lateral que também deve ser protegido. Quanto à Cys, que é um aminoácido que possui um grupo tiol (-SH) nucleofílico na sua cadeia lateral, pode interagir com outro idêntico formando pontes dissulfureto. A pesar deste péptido só ter uma Cys estas pontes podem formar-se entre diferentes cadeias peptídicas, dando origem a dímeros. O grupo tiol pode ainda sofrer oxidação. Por estas razões deve se trabalhar com este aminoácido com a cadeia lateral protegida.

Por fim a Asn, com uma amida primária na cadeia lateral, por vezes é utilizada desprotegida, mas têm se verificado a existência de problemas de solubilidade e a possibilidade de ocorrerem reações indesejadas, pelo que foi utilizada protegida neste trabalho.¹³¹

Os grupos protetores das cadeias laterais escolhidos foram grupos compatíveis com a estratégia de proteção do grupo amina α -Fmoc, clivado num meio básico com piperidina. Assim, foram utilizados grupos protetores para as cadeias laterais removíveis em meio ácido, com TFA. Os grupos protetores utilizados foram Trt para a Cys e a Asn, *t*bu para as Thr e

2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo (Pbf) para a Arg. O péptido com as cadeias laterais dos seus aminoácidos protegidas é apresentado na Figura 45.

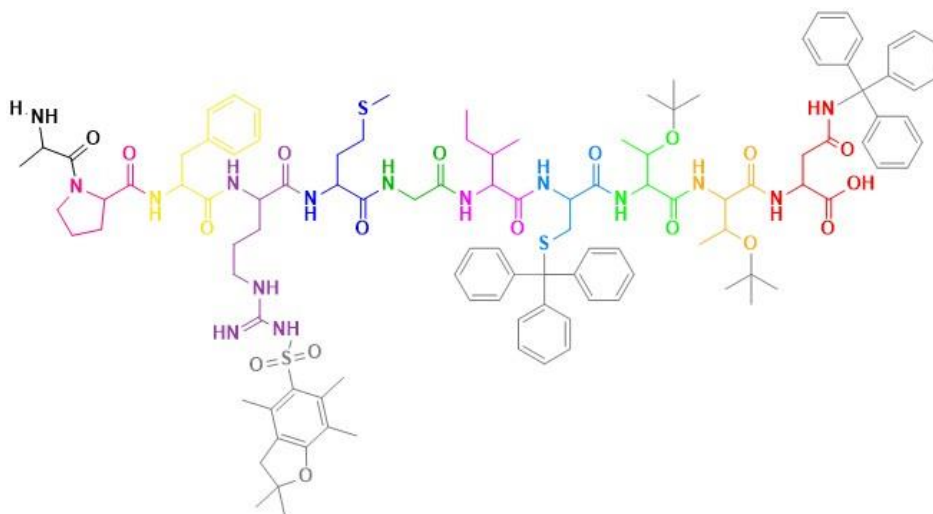


Figura 45- Estrutura do péptido CW49 com os grupos de proteção das cadeias laterais dos aminoácidos.

Para a síntese peptídica foi utilizado um suporte sólido, a resina cloreto de 2-clorotritilo, com um grau de funcionalização de 0,918 mmol/g. O primeiro passo sintético foi o acoplamento do Fmoc-Asn(Trt)-OH, que foi levado a cabo com DIPEA/DCM seco, á temperatura ambiente e deixado a reagir durante a noite (2 eq. a.a e 4 eq. DIPEA relativamente à funcionalização da resina). O processo termina com lavagens da resina com uma mistura contendo MeOH, para bloquear os cloretos que podiam não ter reagido.

De seguida foi determinado o *loading* da resina, de 0,599 mmol/g. Para a determinação do *loading*, utilizou-se um método espectrofotométrico para determinar a quantidade de grupos Fmoc libertados, pela ação da piperidina, através da deteção do aduto fulveno-piperidina (301 nm, $\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).¹³²

O acoplamento dos restantes aminoácidos foi realizado com DIC/Oxyma e assistido por 2 ciclos de irradiação por micro-ondas de 5 minutos cada ($P=25 \text{ W}$, $T=75^\circ\text{C}$). Com exceção do acoplamento da Ala, que foi assistido por 4 ciclos de irradiação micro-ondas de 5 minutos cada. As $N\alpha$ -desproteções foram realizadas com piperidina 20% em DMF e foram assistidas por 2 ciclos curtos de micro-ondas (30 segundos + 3 minutos, $P= 50\text{W}$, $T=75^\circ\text{C}$).

Após o acoplamento do último aminoácido, a resina com o péptido protegido foi separada em duas partes para testar a separação do péptido da resina e remoção dos grupos protetores laterais sem comprometer todo o péptido sintetizado. Assim, em metade da resina, foi utilizado o cocktail de clivagem AcOH/TFE/DCM 1:2:7 e mantida a agitação 2 horas à temperatura ambiente, tal como na síntese do AAPV, obtendo-se 218,1 mg de péptido protegido ($\eta = 21,30\%$). Nesta fase, antes de prosseguirmos para

a desproteção das cadeias laterais foram feitos alguns testes de solubilidade e tentativas de caracterização por RMN, para confirmar se as proteções das cadeias laterais não tinham sido clivadas juntamente com a resina. Não foi possível solubilizar o péptido protegido em CD₃OD e mantiveram-se as dificuldades de solubilização em CDCl₃, motivo pelo qual o resultado do RMN ¹H não foi conclusivo em relação à estrutura do péptido, visto que a amostra estava pouco concentrada e com uma linha de base pouco definida, mesmo após a adição de DMSO-d₆. No entanto, a forte intensidade de sinais na zona aromática permitiu-nos concluir que os grupos protetores aromáticos, nomeadamente o Trt, mais sensível a ácidos, estariam efetivamente presentes, uma vez que o péptido só apresenta um aminoácido aromático, a Phe, que por si só não justificava a intensidade de sinais nessa zona do espectro.⁶⁵

Apesar da falta de caracterização, decidiu-se avançar para a desproteção do péptido obtido. Da revisão da literatura concluiu-se que 95% TFA seria adequado para uma mistura de clivagem capaz de retirar os grupos Trt, *t*bu e Pbf. Na presença de alguns aminoácidos é ainda aconselhado o uso de *scavengers* na mistura de clivagem. Apesar de se recomendar a utilização de 1,2-Etanoditiol para impedir a formação de pontes ditiol entre Cys, não foi possível utilizá-lo devido ao seu manuseamento ser incompatível com as condições do laboratório. Assim utilizou-se uma mistura de 95% TFA, 2,5% TIPS e 2,5% H₂O.^{72,131} A mistura foi mantida sob agitação 3 horas à temperatura ambiente e no final o péptido foi precipitado, centrifugado e seco (Figura 46).

Deste processo obtiveram-se 112,4 mg de composto (η = 18,68% relativamente ao total de resina usada inicialmente), cujo RMN de ¹H em DMSO-d₆ apresentava sinais correspondentes a todos os aminoácidos apesar de estar bastante confuso e aparentemente impuro. A identificação dos sinais foi conseguida com a ajuda do espectro de RMN ¹³C e de espectros de correlação bidimensional: HMBC, HMQC e DEPT.

com péptido CW49 sintetizado reservada, com resultados idênticos. Foi obtido 161,3 mg de péptido desprotegido ($\eta = 26,81\%$ relativamente ao total de resina usada inicialmente), com o mesmo perfil de RMN de ^1H e HPCL (Figura 47 b)). O que corresponde a um rendimento total na primeira síntese de 45,50% de péptido impuro.

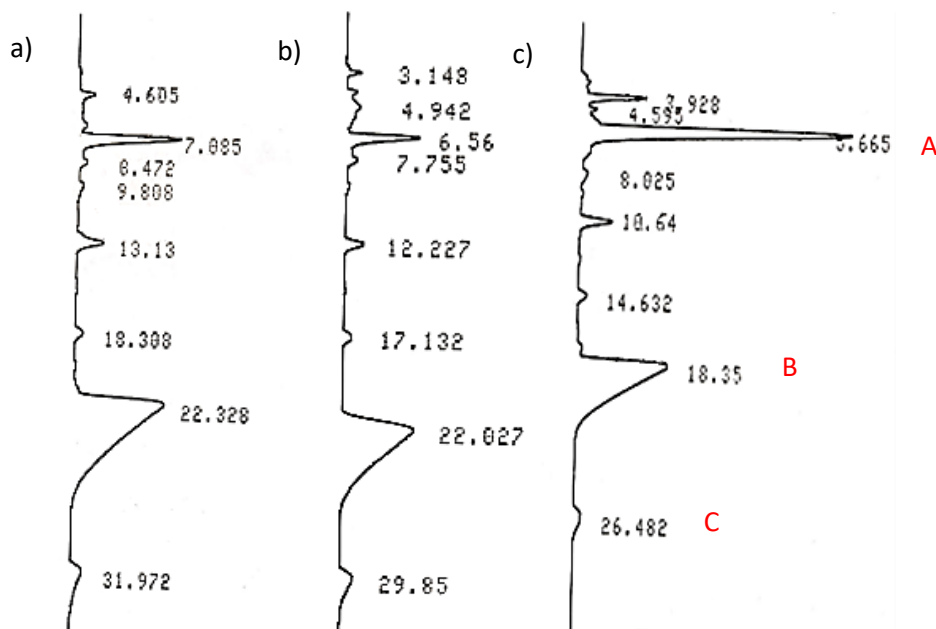


Figura 47- Cromatograma HPLC do péptido: **a)** obtido na primeira síntese da primeira metade; **b)** obtido na primeira síntese da segunda metade da resina; **c)** obtido na segunda síntese.

Com base nos resultados obtidos não conseguimos ter a certeza de qual seria a natureza dos péptidos contaminantes que obtivemos. Suspeitou-se que poderiam ser péptidos de deleção pelo que se resolveu testar a síntese com um grau de *loading* mais baixo. Esta estratégia prende-se com o facto de poder existir impedimento estereoquímico provocado aumento de tamanho das cadeias peptídicas bem como dos grupos protetores utilizados nas cadeias laterais (Figura 48). Assim, na segunda síntese do CW49 para baixar o grau de funcionalização, o tempo da reação de ligação do primeiro aminoácido foi diminuído para 1 hora e 30 minutos e o número de equivalentes, em relação à funcionalização da resina, de Fmoc-Asn(Trt)-OH para 0,8 eq e de DIPEA para 1,6 eq.

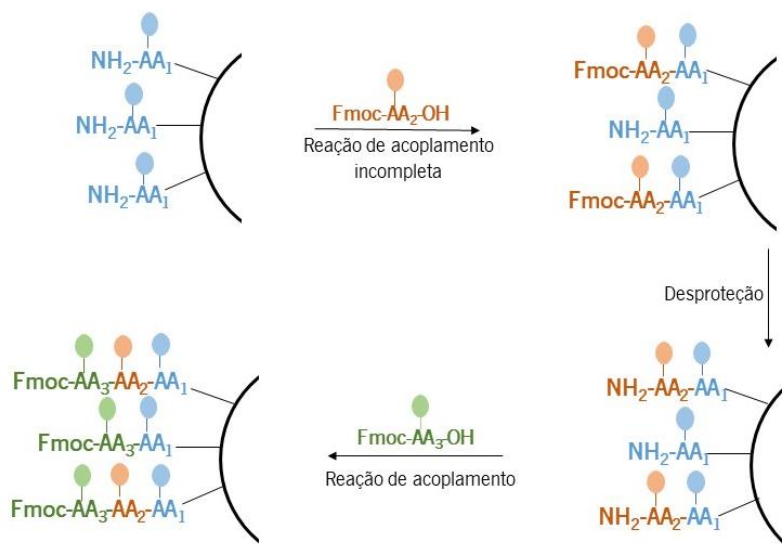


Figura 48- Esquema ilustrativo da formação de peptídeos de deleção que leva à utilização de resinas de baixa funcionalização.

As restantes condições de síntese foram mantidas, tendo-se obtido um rendimento de 43,43%, em tudo semelhante ao resultado da primeira síntese. Este resultado permitiu-nos concluir que a diminuição do grau de funcionalização do acoplamento do primeiro aminoácido da síntese não teve influência no rendimento e pureza do peptídeo obtido.

Foi realizada uma análise por HPLC ao peptídeo obtido da segunda síntese, nas mesmas condições que ao peptídeo obtido na primeira síntese e o resultado foi em tudo comparável, com a presença de dois sinais principais, a aparecem entre os 5-7 minutos (pico A) e os 18-22 minutos (pico B) (Figura 47 c)).

De forma a avaliar se um dos sinais maiores correspondia a um dímero obtido da formação de pontes dissulfureto entre as Cys do peptídeo desprotegidas, foi realizado HPLC analítico na presença de um agente redutor, ditioneitol (DTT), na solução a ser injetada e no eluente.¹³³ O resultado não sofreu alterações pelo que essa possibilidade foi descartada.

Como o resultado nas análises RMN pareceu indicar a presença de todos os aminoácidos no composto obtido e o teste com DDT comprovou a inexistência de pontes entre as Cys, decidiu-se avançar para uma 3ª síntese do peptídeo, auxiliada por testes de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) em todos os passos. Estes permitem confirmar se cada acoplamento foi bem-sucedido, diminuindo a possibilidade de formação de peptídeos de deleção à síntese, que poderiam justificar o cromatograma impuro obtido no HPLC analítico.

Retomou-se a estratégia de *loading* inicial para obtenção de mais quantidade de composto, visto que a diminuição do *loading* não resultou em diferenças significativas no resultado final. De forma a tentar obter um produto mais puro, o número de ciclos de acoplamento com micro-ondas foi aumentado

para pelo menos 3 ciclos, com o intuito de assegurar o acoplamento dos aminoácidos mais difíceis e cujo acoplamento incompleto poderia dar origem a péptidos de deleção à síntese.

O teste TNBS consiste na reação entre ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico e os grupos amina primários em meio básico conferindo coloração vermelha à resina. Se o resultado do teste for positivo após um acoplamento, ou seja, se forem detetados grupos amina primários livres, o acoplamento não foi bem-sucedido, podendo ter ocorrido apenas parcialmente.¹³⁴ Os testes TNBS realizados mostraram existir dificuldade acrescida de acoplamento de alguns dos aminoácidos, nomeadamente na Arg, Phe e Ala, em que foi necessária a utilização de nova mistura de acoplamento seguida de mais ciclos de irradiação por micro-ondas (Figura 49).



Figura 49- Imagens dos testes TNBS **a)** controlo positivo; **b)** resultado positivo; **c)** resultado negativo.

Nesta síntese foram realizados ajustes específicos para o acoplamento de alguns aminoácidos, nomeadamente a Cys e Arg. O acoplamento da Cys foi realizado a $T=50^{\circ}\text{C}$ para limitar a racemização.⁷⁴ O acoplamento da Arg pode ser dificultado pela possibilidade de formação de uma δ -lactama (Figura 50).¹³⁵ As condições testadas para o acoplamento deste aminoácido são apresentadas na Tabela 4.

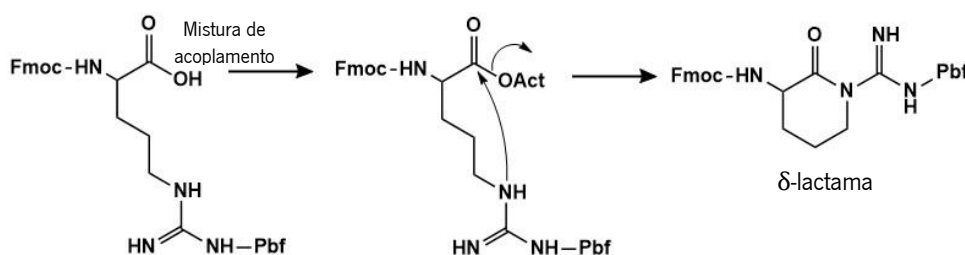


Figura 50- Ativação da Fmoc-Arg(Pbf)-OH e formação de uma δ -lactama (retirado da referência 135).

Tabela 4- Condições testadas para o acoplamento do aminoácido Arg (3^a e 4^a sínteses CW49).

Condições de acoplamento da Arg testadas	Resultado
5 eq a.a, 5 eq DIC, 5 eq Oxima 4 ciclos MW (adição da DIC em último à mistura reacional)	Acoplamento incompleto
2,5 eq a.a, 2,5 eq DIC, 2,5 eq Oxima 2 ciclos MW + 2,5 eq a.a, 2,5 eq DIC, 2,5 eq Oxima 2 ciclos MW (adição da DIC diretamente na resina já com a mistura reacional)	Acoplamento incompleto
5 eq a.a, 5 eq Oxima 2,5 eq DIC 2 ciclos MW + adição de 2,5 eq de DIC 2 ciclos MW (adição da DIC diretamente na resina já com a mistura reacional)	Acoplamento completo

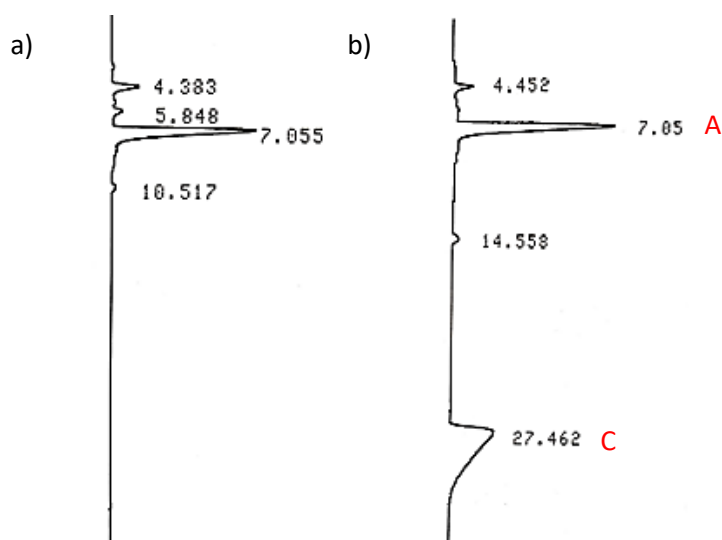
De forma a tirar o máximo partido do pouco tempo de trabalhos restante, iniciou-se, com o decorrer da 3^a síntese, uma 4^a síntese nas mesmas condições, para obtenção de mais massa de produto (devido às limitações de tamanho do vaso reacional MW), que assegurasse as posteriores análises de caracterização/incorporação em fibra/testes antimicrobianos.

O aumento do número de ciclos de MW e o acoplamento diferenciado da Cys e Arg culminaram na obtenção de um produto ligeiramente mais puro. No entanto, suspeitamos que o aumento de ciclos de MW tenham ditado uma grande diminuição no rendimento das sínteses que foi de 13,30% e 21,19% (Tabela 5).

Tal como já foi referido na síntese do AAPV, depois de uma nova pesquisa percebeu-se que foi reportado por Leronymaki *et al* que a utilização de MW com a resina lábil cloreto de 2-clorotritilo culminava numa perda de *loading* mais acentuada, nos primeiros 3/4 aminoácidos acoplados, sendo recomendada a utilização de uma estratégia conjunta de SPPS convencional e SPPS assistida por MW quando utilizado este suporte sólido.¹²⁶ O resultado por nós obtido apresenta concordância com a hipótese desta resina ter essa fragilidade às MW. Aqui, devido à impossibilidade temporal de fazer uma nova síntese deste péptido, sem a utilização de MW de modo a confirmar esta hipótese, só foi realizado o teste na síntese do péptido de menor tamanho, AAPV, sem a utilização de MW. Os resultados são apresentados no capítulo anterior “2.1.1 Péptido Ala-Ala-Pro-Val” e foram concordantes com esta hipótese.

Tabela 5- Comparação do rendimento das sínteses de CW49 realizadas.

	1ª síntese	2ª síntese	3ª síntese	4ª síntese
Quantidade de resina (g)	0,5350	0,5411	0,6271	0,6548
<i>Loading</i> (mol/g)	$0,599 \times 10^{-3}$	$0,264 \times 10^{-3}$	$0,526 \times 10^{-3}$	$0,445 \times 10^{-3}$
Massa cruda (g)	0,2737	0,0995	0,0840	0,1195
Rendimento (%)	45,50	43,43%	13,30%	21,19%

**Figura 51-** Cromatograma HPLC do péptido: **a)** obtido na terceira síntese; **b)** obtido na quarta síntese.

De forma a avaliar e comparar a pureza do péptido sintetizado na 3ª e 4ª sínteses foram realizadas análises de HPLC analítico nas mesmas condições que as anteriores (Figura 51). Concluímos que a pureza foi efetivamente maior devido ao desaparecimento de pequenos sinais dos cromatogramas. No entanto ficou evidente que os picos B e C que surgem nos cromatogramas da 1ª e 2ª sínteses passam a surgir na 4ª síntese exclusivamente a C e na 3ª síntese nenhum dos dois é visível. Este resultado parece indicar tratar-se de uma espécie de comportamento variável podendo estar associada à formação ou não de agregados ou a diferentes níveis de oxidação da Cys.

Por forma a tentar identificar os compostos detetados nos cromatogramas obtidos, foi realizado HPLC preparativo ao produto obtido nas 1ª e 2ª sínteses. Como eluente foi utilizado ACN/H₂O 1:4 com 0,1% TFA, um fluxo de 0,8 mL/min e comprimento de onda de deteção de 214 nm. Foram feitas injeções de 1 mL e recolhidas cerca de 11 frações a cada corrida. Após liofilização, foram obtidas cerca de 24,0 mg das frações recolhidas correspondentes ao sinal B nos cromatogramas, e 11,2 mg das frações recolhidas correspondentes ao sinal A (Figura 47). O que corresponde a uma recuperação de cerca de

9,60% e 4,48% respetivamente, da massa injetada no HPLC preparativo. Conclui-se que as dificuldades de diluição da mistura contendo o péptido, e conseqüente necessidade de filtração da mesma, culminaram numa perda enorme de material. Contudo, com as frações separadas foi possível realizar RMN ^1H e ESI-MS.

Ao contrário do que seria de esperar o resultado dos espectros de RMN ^1H das duas frações separadas por HPLC preparativo foi igual entre si e igual ao inicialmente obtido, indicando que as respetivas composições de aminoácidos seriam iguais.

As frações separadas foram submetidas a análise de ESI-MS. Na amostra A (pico A no cromatograma Figura 47), detetou-se o ião molecular a m/z 1226 que corresponde à massa molecular esperada mais 16 ($[\text{M}+\text{H}]^+ + 16$), o que sugere a presença de um oxigénio a mais na estrutura do péptido obtido, podendo dever-se à oxidação da Cys após desproteção.¹³⁶ Na amostra B (pico B no cromatograma Figura 47) apesar de ser obtido um espectro menos limpo, também se observou a presença do sinal a m/z 1226.

Os resultados de RMN de ^1H e ESI-MS levam-nos a concluir que ambas as amostras correspondem ao mesmo péptido, podendo o diferente comportamento observado no HPLC estar relacionado com a presença de agregados. Estes poderiam ter sido detetados numa análise ESI-MS, no entanto, atendendo ao facto de que o aparelho utilizado para determinação ESI-MS tem um alcance de apenas 2000 D tal não é possível.

O resultado da análise ESI-MS dos crudes peptídicos obtidos nas sínteses 3 e 4 foi idêntico ao das frações A e B obtidas de HPLC preparativo. Na 3^a síntese o pico de ião molecular em modo de análise positiva surge a m/z 1226 e na 4^a síntese surge a m/z 1226 seguido de um a m/z 1210 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). Na quarta síntese, como também indica o HPCL, surgem as duas espécies.

De modo a serem tiradas conclusões destes resultados, estas amostras serão enviadas para uma análise de HPLC-MS de alta resolução, o que permitirá concluir acerca da possível formação de agregados do péptido que dá origem ao pico B/C que surge nos cromatogramas obtidos.

Apesar de ser complexa, a estrutura do péptido foi confirmada por RMN de ^1H e ^{13}C , e os sinais atribuídos são apresentados na Tabela 6. Os sinais foram identificados com a ajuda das análises de espectroscopia bidimensional DEPT 135, HMBC e HMQC. Não foi possível atribuir no espectro de RMN de ^1H os hidrogénios dos NH e NH_2 aos respetivos aminoácidos, apesar da presença destes sinais nos espectros. Além disso, também não foi possível fazer a atribuição da maioria dos sinais dos carbonos carbonilos, no espectro de RMN de ^{13}C , apesar do número destes sinais confirmar a presença dos aminoácidos.

Tabela 6- Tabela resumo da atribuição dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C , do péptido CW49 em DMSO- d_6 com TFA.

	Desvio químico RMN ^1H (ppm)	Multiplicidade de sinal	Nº de prótons	Atribuição de H	Desvio químico RMN ^{13}C (ppm)	Atribuição de C
Asn	4,48-4,57*	m	2*	α -CH	49,43	α -CH
	1,70-1,83*	m	5	β -CH ₂	32,61	β -CH ₂
	1,92-2,02*	m	5*			
Thr (x2)	1,01-1,04	m	6	CH ₃	19,44	CH ₃
				CH ₃	19,86	CH ₃
	4,25-4,32*	m	3*	α -CH	58,59	α -CH
	4,37-4,40*	m	3*	α -CH	58,70	α -CH
	4,01-4,11*	m	3*	β -CH	67,19	β -CH
				β -CH	67,30	β -CH
Cys	4,79	br s	1	α -CH	58,47	α -CH
	3,32-3,42*	m	2*	β -CH ₂	25,53	β -CH ₂
	2,98-3,09*	m	6*			
	-	-	-	-	168,57	C=O
Ile	4,25-4,32*	m	3*	α -CH	57,56	α -CH
	1,22-1,24	m	1	β -CH	31,05	β -CH
	2,98-3,09*	m	6*	γ -CH ₂	37,23	γ -CH ₂
	0,75-0,81	m	6	β -CH ₃	15,77	β -CH ₃
				δ -CH ₃	11,47	δ -CH ₃
Gly	3,68-3,71	m	1	α -CH ₂	42,58	α -CH ₂
	3,88-3,90	m	1			
Met	1,92-2,02*	m	5*	CH ₃	14,99	CH ₃
	4,25-4,32*	m	3*	α -CH	52,73	α -CH
	1,70-1,83*	m	5*	β -CH ₂	29,65	β -CH ₂
	1,92-2,02*	m	5*			
	2,44-2,55*	m	4*	γ -CH ₂	29,54	γ -CH ₂

	Desvio químico RMN ¹ H (ppm)	Multiplicidade de sinal	Nº de protões	Atribuição de H	Desvio químico RMN ¹³ C (ppm)	Atribuição de C
Arg	4,37-4,40*	m	3*	α-CH	52,55	α-CH
	1,70-1,83*	m	5*	β-CH ₂	26,54	β-CH ₂
	1,45-1,46*	m	2*	γ-CH ₂	25,02	γ-CH ₂
	2,98-3,09*	m	6*	δ-CH ₂	41,05	δ-CH ₂
	-	-	-	-	157,36	C=NH
Phe	4,48-4,57*	m	2*	α-CH	54,50	α-CH
	2,80-2,85	m	1	β-CH ₂	37,85	β-CH ₂
	2,98-3,09*	m	6*			
	7,13-7,27	m	5H	CH ar (H ₄)	126,82	CH ar (C-4)
				CH ar (H _{2,6})	129,87	CH ar (C-2,6)
				CH ar (H _{3,5})	128,59	CH ar (C-3,5)
	-	-	-	-	138,07	C1
-	-	-	-	171,57	C=O	
Pro	4,37-4,40*	m	3*	α-CH	60,04	α-CH
	1,45-1,46*	m	1*	β-CH ₂	24,82	β-CH ₂
	1,70-1,83*	m	5*			
	2,44-2,55*	m	4*	γ-CH ₂	30,01	γ-CH ₂
	3,32-3,42*	m	2*	δ-CH ₂	47,31	δ-CH ₂
	3,56-3,60	m	1			
Ala	1,28	d	3	CH ₃	15,98	CH ₃
	4,01-4,11*	m	3*	α-CH	47,76	α-CH

*Aos sinais assinalados são atribuídos protões de mais de um aminoácido, aparecendo por isso repetidos na tabela. Assim, o número de protões que lhes é atribuído na tabela é apresentado separadamente para cada aminoácido de forma a simplificar a apresentação dos dados.

Apesar das técnicas de caracterização RMN e ESI-MS indicarem que o CW49 foi obtido, uma otimização do processo sintético é ainda necessária para que este seja obtido com maior rendimento e evitando-se possíveis os fenómenos de agregação e oxidação. Devendo ser testada a adição à mistura de clivagem dos grupos protetores um agente que possa impedir a oxidação da Cys, por forma a testar

esta teoria despertada pelos resultados das análises de ESI-MS, que, vindo a confirmar-se, possa em parte resolver as questões relacionadas com a estrutura e impureza do produto obtido.

No sentido de otimizar o processo de síntese do CW49, é crucial testar-se a síntese deste péptido com a resina cloreto de 2-clorotritilo sem micro-ondas para comparação de rendimentos. Além disso, adquirir uma outra resina que permita a obtenção de péptidos com C-terminal ácido carboxílico que não seja sensível a MW, preferencialmente já com o primeiro aminoácido ligado.

2.2. Avaliação da atividade antibacteriana do péptido AAPV e do polímero NCMC

As propriedades antimicrobianas do péptido AAPV e do polímero NCMC foram avaliadas pela determinação das concentrações mínima inibitória (MIC) e mínima bactericida (MBC). Tanto o péptido como o polímero foram explorados contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* e contra as Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O MIC e MBC para o AAPV foi estabelecido a 2,0 mg/mL contra todas as bactérias testadas, um valor economicamente inviável e considerado demasiado elevado para aplicações biomédicas. Este péptido poderá porventura ter um mecanismo de ação mais comum, desregulando a membrana extracelular ligando-se a ela, ou, graças ao seu pequeno, tamanho penetrar a membrana bloqueando determinadas funções biológicas dos componentes intracelulares

Por sua vez, o NCMC apenas revelou inibição e comportamentos bactericidas contra as bactérias Gram-positivas; contra a *S. aureus* contabilizou um MIC de 1,6 mg/mL e um MBC de 3,2 mg/mL, enquanto, contra a *S. epidermidis* esses valores aumentaram para MIC de 3,2 mg/mL e MBC de 12,8 mg/mL. Apesar de muito pouco explorado na literatura o mecanismo de ação deste polímero deverá assemelhar-se ao do que lhe dá origem, o quitosano. O quitosano interage com a parede bacteriana através de interações eletrostáticas, provocando a libertação do conteúdo intracelular, eventualmente causando a morte das células bacterianas. Contém grupos funcionais reativos, os grupos amina e os grupos hidroxilo que estabelecem ligações com os grupos disponíveis na membrana bacteriana. Após a modificação do quitosano a NCMC os grupos hidroxilo são os maiores responsáveis dessa ligação, ainda que a substituição não seja completa, existindo ainda vários grupos amina livres.^{117,137} Considerando que a bactéria *S. aureus* é uma das mais prevalentes em feridas crónicas, foi tomada a decisão de o incorporar nas fibras co-axiais com uma concentração de 2×MBC (6,4 mg/mL), relativamente à *S. aureus*.¹³⁸ Esta concentração foi selecionada com base em trabalhos anteriores da equipa do 2C2T, nos

quais é evidente uma perda da atividade antimicrobiana após mistura com outros polímeros, o que torna o agente menos disponível ou mais limitado no contacto com microrganismos.^{100,139,140} A partir deste ponto, a investigação focou-se nesta bactéria em particular.

2.3. Inibição da atividade da enzima elastase pelo péptido AAPV

A capacidade do péptido AAPV em inibir a atividade da enzima HNE foi testada a diferentes concentrações, desde 0,195 µg/mL até 200,000 µg/mL. Após 1 hora de incubação a 37°C, a atividade da enzima foi avaliada através de leituras de absorbância a 405 nm. A concentrações superiores a 2,000 µg/mL, a inibição da enzima HNE foi inferior a 30%. É provável que em soluções tão concentradas, as moléculas do péptido compitam entre si pelos sítios de ligação da enzima ou até que formem aglomerados diminuindo a sua disponibilidade. Em concentrações inferiores a 2,000 µg/mL é observado um aumento da inibição para valores superiores a 40%. Apesar de não ser atingido o IC₅₀ (concentração que inibe 50% da atividade enzimática), a 1,500 µg/mL de AAPV foi possível garantir uma inibição de HNE de 44% (valor mais alto entre as várias concentrações testadas). Esta concentração de AAPV foi determinada como ideal para proceder à incorporação no núcleo das fibras co-axiais. Após incorporação nas fibras poderá existir uma menor disponibilidade do AAPV que culmine numa diminuição desta capacidade inibitória. Contudo, não é um problema, uma vez que não é pretendida uma inibição total da HNE pois esta enzima, como referido anteriormente, faz parte do processo regenerativo, tendo funções de proteção da ferida contra patógenos, sendo libertada pelos neutrófilos, em resposta a estímulos inflamatórios.¹⁴¹ Contrariamente ao estipulado para o NCMC, na secção 2.2, aqui não se utilizou o dobro da concentração definida como ideal por forma a evitar as possíveis limitações associadas à performance do péptido listadas acima (competição e formação de aglomerados).

2.4. Produção de fibras co-axiais

Deu-se início ao processo de produção de fibras de estrutura co-axial através da técnica de *wet-spinning*, utilizando polímeros de origem natural (SA, GN, NCMC) e sintética (PCL) que permitiriam a posterior imobilização de péptidos no seu núcleo.

2.4.1. SA-NCMC-GN-AAPV

Inicialmente, soluções de SA (2% m/v) e GN (1% m/v) foram extrudidas por forma a dar origem a fibras de estrutura simples (monocamada) por *wet-spinning*. Foram testadas soluções individuais ou em misturas de SA-GN 70:30. Não foi possível produzir fibras individuais de GN, em CaCl_2 , mas a produção de fibras de SA e SA-GN foi bem-sucedida, sendo extrudidas a 0,100 mL/min, seguindo-se indicações de trabalhos já reportados na literatura.¹⁰⁰

De seguida promoveu-se a incorporação de NCMC na mistura polimérica, numa proporção de SA-GN-NCMC 70:20:10, e a velocidade de extrusão foi novamente otimizada para 0,100 mL/min. Em todos os casos foi utilizado CaCl_2 a 2% m/v como banho de coagulação (depois de se ter testado também CaCl_2 a 5% m/v e não serem observadas diferenças no processo de extrusão).

Avaliada a viabilidade da produção de fibras nestas condições, avançou-se para a produção de fibras co-axiais de SA-GN, promovendo a extrusão de fibras com o núcleo de GN e o exterior de SA, e fibras co-axiais de SA-NCMC-GN com a camada interna composta por GN e a externa por SA-NCMC. Foi utilizada uma solução de GN (2% m/v) na produção das fibras co-axiais, para aumentar a sua concentração, e de SA (2% m/v) e NCMC (1% m/v), em banho de coagulação CaCl_2 (2% m/v). Foi definida uma velocidade ideal de extrusão das fibras co-axiais para SA/SA-NCMC (casca) de 0,150 mL/min e GN (núcleo) de 0,100 mL/min.

Espectros de ATR-FTIR foram adquiridos por forma a confirmar a presença dos diferentes polímeros na fibra (Figura 52). Contudo, não foi possível verificar nenhuma diferença significativa entre os espectros das fibras de SA e de SA-GN que assegurassem a presença da camada interior de GN na fibra. Isto deve-se à sobreposição das bandas características de cada polímero e eventualmente também à sua baixa concentração. O espectro de SA apresenta a 1600 e 1420 cm^{-1} as bandas associadas às vibrações de alongamento do grupo COO, e a 3300 cm^{-1} dos grupos OH com o possível estabelecimento de pontes de hidrogénio. O espectro da GN apresenta a cerca de 1635 cm^{-1} uma banda que pode ser atribuída a vibrações de alongamento de grupos C=O.¹⁰⁰ Assim, não é óbvia a presença de GN nas fibras co-axiais, visto que o estabelecimento de interações entre os polímeros ou pelo facto de SA se encontrar em maior quantidade, poder mascarar a sua presença. Não fica também clara a presença do NCMC na fibra co-axial de SA-NCMC-GN devido também à sobreposição de bandas de grupos funcionais entre os polímeros, o NCMC apresenta bandas a cerca de 1600 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} atribuídas às vibrações de alongamento do grupo COO.¹⁴² Além disso, este polímero encontra-se numa concentração mais baixa que os restantes. Posto isto, não ficou clara a presença da GN e do NCMC nas fibras co-axiais.

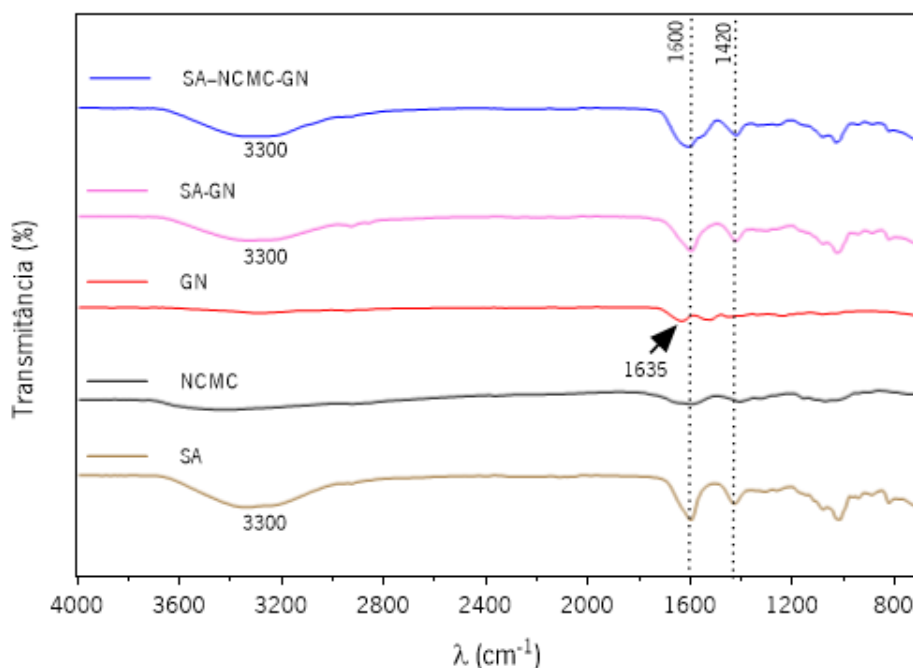


Figura 52- Espectro de ATR-FITR das fibras produzidas com SA, GN e NCMC e dos polímeros individuais na forma de pó.

Para tentar assegurar a presença da GN na fibra e a sua estabilidade física em meio aquoso, que poderia estar a ser comprometida pelo banho de coagulação e, conseqüentemente, levar à sua perda, testes com a incorporação de agentes reticulantes foram realizados. Soluções de GN (2% m/v) com agentes reticulantes como glutaraldeído (0,5% v/v) e formaldeído (0,033; 0,063; 0,088 e 0,200 mmol/mL) foram testados a diferentes concentrações, selecionadas de acordo com a literatura.^{143,144} Com a presença dos agentes reticulantes, não se verificaram melhoras na produção das fibras e com a concentração mais alta testada, a solução polimérica de GN tornou-se demasiado viscosa para ser passível de extrusão via *wet-spinning*. Como alternativa para identificar a presença do GN nas fibras, utilizou-se o corante *Remazol Brilliant Blue*. Este permitiu confirmar visualmente que uma parte bastante significativa da GN (> 70%) se perdia no banho de coagulação à medida que a extrusão da fibra acontecia. Considerando estas observações e a falta de confirmação via ATR-FTIR, a proposta de utilização de GN e AAPV na camada mais interna das fibras co-axiais foi abandonada.

2.4.2. SA-NCMC-PCL-AAPV

Considerando as excelentes propriedades mecânicas do PCL, este polímero foi selecionado como alternativa ao GN para servir de agente protetor e de suporte ao péptido AAPV. O interior das fibras co-axiais ficou assim definido com a composição de PCL e AAPV, enquanto o exterior da fibra seria composto por SA e NCMC, tirando o maior partido das excelentes características do SA (maleabilidade, absorção de exsudatos, afinidade celular, etc.) e da atividade antimicrobiana do NCMC contra um dos microrganismos mais prevalentes em feridas, a *S. aureus*. O objetivo era assim desenvolver um sistema fibroso de duas camadas, em que a mais externa fosse facilmente incorporada pela ferida, abrindo orifícios para o interior à medida que a dissolução do NCMC ocorria (sendo o NCMC responsivo ao pH), e aumentando assim a exposição do AAPV, enquanto que a estabilidade física do *scaffold* era garantida pelo PCL. Procurando-se criar assim um sistema multifacetado de ação em feridas crónicas, que numa fase inicial confere atividade antibacteriana e de seguida um controlo dos excessivos níveis da HNE

Preparou-se a solução de PCL (10% m/v) utilizando DMF como solvente e a de SA (2% m/v) em dH₂O. As soluções foram extrudidas por *wet-spinning* com sucesso formando uma fibra co-axial a 0,100 mL/min (PCL núcleo) e 0,150 mL/min (SA camada externa) num banho de coagulação CaCl₂ (2% m/v). A precipitação do polímero interior, PCL, foi auxiliada pelo contacto com a solução de SA, cuja preparação é feita em água, enquanto que, a reticulação do SA foi conseguida no banho de coagulação de CaCl₂. O NCMC foi incorporado na solução de SA, a uma concentração de 6,4 mg/mL (2×MBC), sendo a sua reticulação igualmente assegurada pelo banho de coagulação utilizado.^{145,146} Por sua vez o péptido AAPV foi combinado com a solução polimérica de PCL, a uma concentração de 1,5 µg/mL (garante mais de 40% de inibição da HNE). Por se tratar da camada mais interna que é extrudida a uma velocidade mais lenta (logo, desde os instantes iniciais, mais protegida) e devido à rápida precipitação do PCL, perdas de AAPV durante produção das fibras foram negligenciadas. À fibra completa atribuiu-se a designação de SA-NCMC-PCL-AAPV.

Por forma a assegurar a presença de todos os componentes nas fibras co-axiais, fibras controlo com os diferentes componentes separados foram também produzidas: fibras de PCL e PCL-AAPV sem a camada exterior, SA e SA-NCMC ocas, e finalmente as fibras co-axiais de SA-PCL, SA-NCMC-PCL e SA-PCL-AAPV. À medida que as fibras eram produzidas, foi imediatamente possível perceber visualmente que estruturas co-axiais eram de facto obtidas, graças à diferença de cor entre polímeros: SA incolor e o PCL branco (Figura 53).

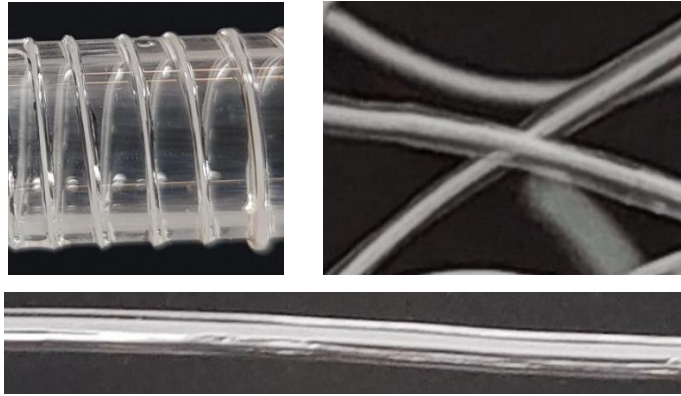


Figura 53- Fotografias das fibras co-axiais SA-PCL (o PCL a branco no interior das fibras e SA transparente no exterior).

2.5. Viscosidade das soluções poliméricas

As viscosidades das soluções poliméricas utilizadas, SA, SA-NCMC, PCL e PCL-AAPV, foram testadas a uma temperatura ambiente variável, mimetizando as condições de produção das fibras por *wet-spinning* (Figura 54). A partir desta análise foi possível verificar que a adição de AAPV não altera a viscosidade do PCL, e que a mesma também não sofre alterações significativas com variações de temperatura entre 17 e 30°C. Contudo, verificou-se uma diminuição na viscosidade da solução de SA com a introdução do NCMC, provocada pela provável interação das cadeias poliméricas destes polímeros. Foi ainda possível verificar, que as soluções contendo SA sofrem uma diminuição de viscosidade quando do aumento a temperatura até 30°C.

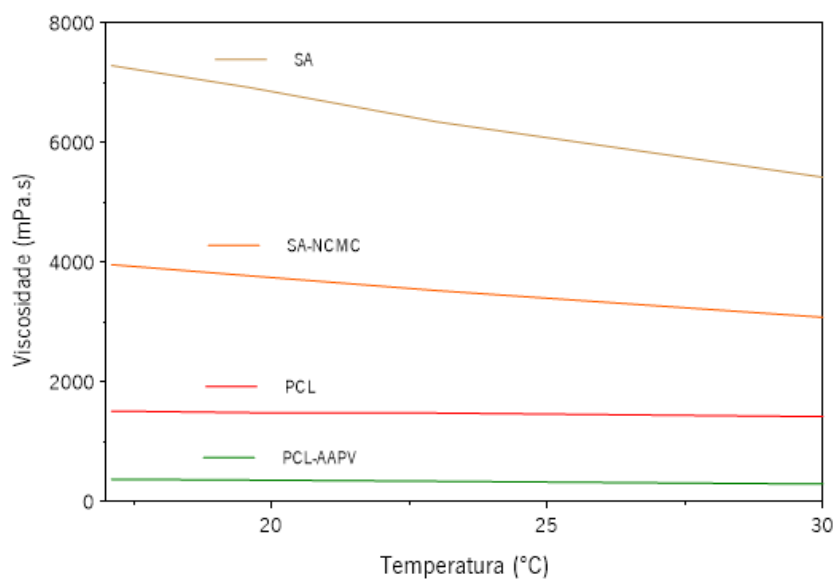


Figura 54- Variação da viscosidade das soluções poliméricas com a temperatura.

2.6. Caracterização química e física das fibras

Proseguiu-se para a caracterização morfológica, química e de estabilidade em meio fisiológico das fibras obtidas através de microscopia de campo claro, ATR-FTIR, estudos do grau de hidratação e do perfil de degradação das fibras.

2.6.1. Microscopia ótica de campo claro

Através da microscopia ótica de campo claro, foi possível comprovar a produção de fibras com estrutura co-axial. Na Figura 55 são apresentadas todas as estruturas fibrosas adquiridas (ampliação de 10×). Verificou-se que após a extrusão, devido ao seu interior oco, a estrutura das fibras SA e SA-NCMC colapsa dando origem a uma fibra mais plana, achatada e onde dobras e torções resultantes do enrolar da fibra durante a recolha ficam visivelmente marcadas. Estas alterações levam a um incremento no diâmetro médio destas fibras (Tabela 7). As fibras de PCL e PCL-AAPV, uma vez que apenas representam o núcleo (controlo), exibem um diâmetro bastante inferior às restantes. Graças à facilidade de extrusão (estrutura menos complicada), variabilidade entre fibras e consequentemente nos diâmetros foi também inferior.

Provas da produção de fibras co-axiais, independentemente de se tratar de controlos ou da formulação completa, foram obtidas (Figura 55). A espessura da camada exterior da fibra, o diâmetro do núcleo e o diâmetro total foram determinados (Tabela 7). Aqui, pequenas oscilações entre diâmetros dentro da mesma tipologia de fibras ou entre fibras com um ou dois componentes extra foram evidenciadas (desvios padrões mais elevados). Estas variações são consideradas inevitáveis durante o processo de *wet-spinning* de sistemas mais complexos, como é o caso das fibras co-axiais, e podem ser justificadas pela temperatura das soluções poliméricas e do banho de coagulação (temperatura ambiente) cuja influência na viscosidade é bastante importante (principalmente nas soluções SA e SA-NCMC Figura 54), condicionando deste modo a uniformidade da extrusão. Além disso, verifica-se que existe uma diferença considerável de viscosidade entre as soluções de PCL e as soluções de SA, que pode explicar algumas dificuldades no processo de extrusão das fibras relacionada com a menor uniformidade da camada exterior de SA ou SA-NCMC, apesar desta ser extrudida a velocidade superior à camada interior.

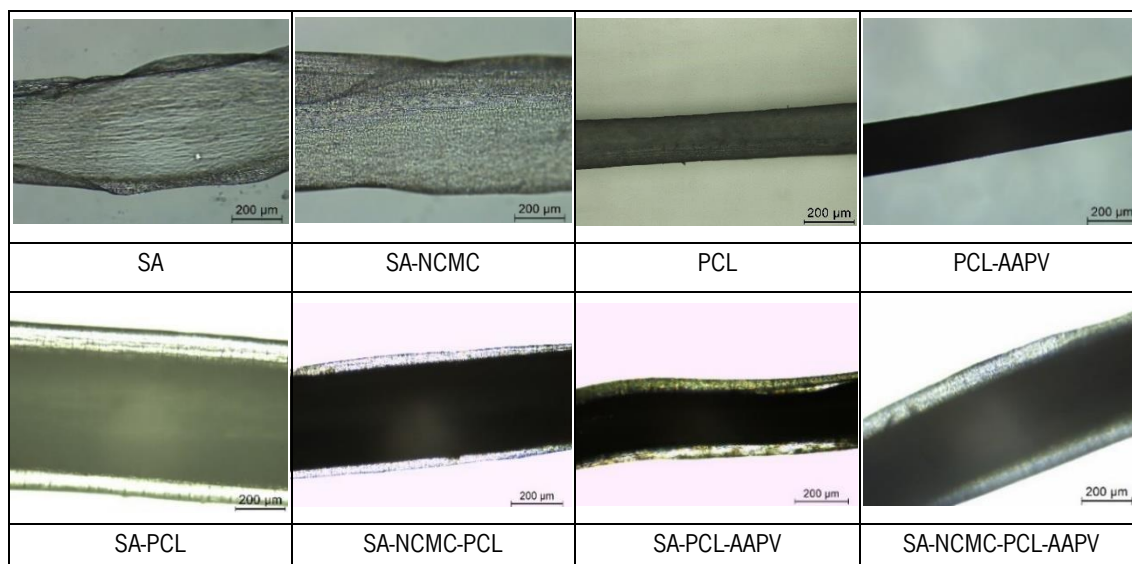


Figura 55- Imagens de microscopia ótica de campo claro capturadas com ampliação 10 \times .

Tabela 7- Diâmetros das fibras determinados a partir de 5 imagens de ampliação 5 \times sobre as quais 5 medições foram realizadas por imagem, com recurso ao software ImageJ.

Tipo de fibra	Espessura da camada exterior (μm)	Diâmetro do núcleo (μm)	Diâmetro total (μm)
SA	–	–	479 \pm 28
SA-NCMC	–	–	566 \pm 14
PCL	–	–	212 \pm 6
PCL-AAPV	–	–	291 \pm 9
SA-PCL	64 \pm 11	521 \pm 29	672 \pm 30
SA-NCMC-PCL	47 \pm 8	345 \pm 46	417 \pm 55
SA-PCL-AAPV	39 \pm 3	306 \pm 21	365 \pm 22
SA-NCMC-PCL-AAPV	42 \pm 4	415 \pm 35	484 \pm 31

O aumento da espessura da camada interna de PCL ou PCL-AAPV nas fibras co-axiais comparativamente às fibras só de PCL ou só de PCL-AAPV deveu-se à incorporação parcial de SA pelo núcleo da fibra durante a coagulação. Para confirmar esta hipótese, foram colocados num pequeno goblé 2 mL de SA (linha preta assinalada com seta na Figura 56) e de seguida foram adicionados 2 mL de PCL. Após alguns instantes, e sem induzir qualquer agitação, observou-se uma interação entre os dois polímeros na qual o PCL além de precipitar incorporou parcialmente a solução de SA, ultrapassando a linha inicialmente traçada no goblé. É expectável que interações por via de pontes de hidrogénio sejam formadas entre os dois polímeros e que, uma vez que o PCL precipita com recurso ao solvente do SA,

incorporação deste polímero na sua matriz seja inevitável.¹⁴⁷ É importante ainda referir que na presença de NCMC ou AAPV esta redução da espessura da camada externa é mais notória. Isto poderá indicar um maior número de ligações a serem geradas entre os componentes da fibra, impulsionadas por uma conformação química diferente que poderá disponibilizar um maior número de grupos OH para ligação.

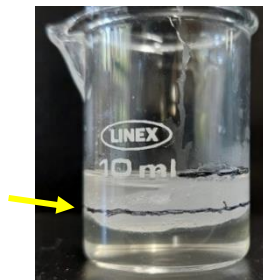


Figura 56- Experiência com SA e PCL. Colocou-se SA até à linha preta (assinalada com uma seta) e de seguida adicionou-se PCL.

2.6.2. ATR-FTIR

Espectros de ATR-FTIR (Figura 57) foram adquiridos com o intuito de confirmar a presença de cada componente nas fibras produzidas. A presença de SA foi confirmada em todas as fibras (em que foi colocada) pelas bandas a 1600 e 1420 cm^{-1} associadas às vibrações de alongamento do grupo COO, e a 3300 cm^{-1} dos grupos OH. Além disso foi possível identificar dois pequenos sinais a 1085 cm^{-1} e 1020 cm^{-1} atribuídos às vibrações de alongamento dos grupos C-O e C-C do típico anel de piranose.¹⁰⁰ A presença de PCL foi também confirmada nas fibras pelos sinais a 1725 cm^{-1} atribuídos às vibrações de alongamento do grupo C=O, que são mais intensos nas fibras compostas unicamente por PCL e PCL-AAPV, apresentando-se muito menos intenso nas fibras co-axiais uma vez que o PCL se encontra na camada mais interna.¹⁴⁸ A presença deste polímero foi ainda verificada por uma banda a 2950 cm^{-1} e 2867 cm^{-1} que podem ser atribuídas à vibração de alongamento da ligação CH do tipo sp^3 . No seu espectro são também visíveis as bandas a 1173 e 1246 cm^{-1} atribuídas à vibração da ligação C-O-C. Relativamente ao NCMC e ao AAPV, não foi possível distingui-los nos espectros das fibras nesta análise devido à baixa concentração em que foram incorporados e pelo facto de muitos dos seus sinais serem coincidentes com os dos polímeros SA e NCMC.

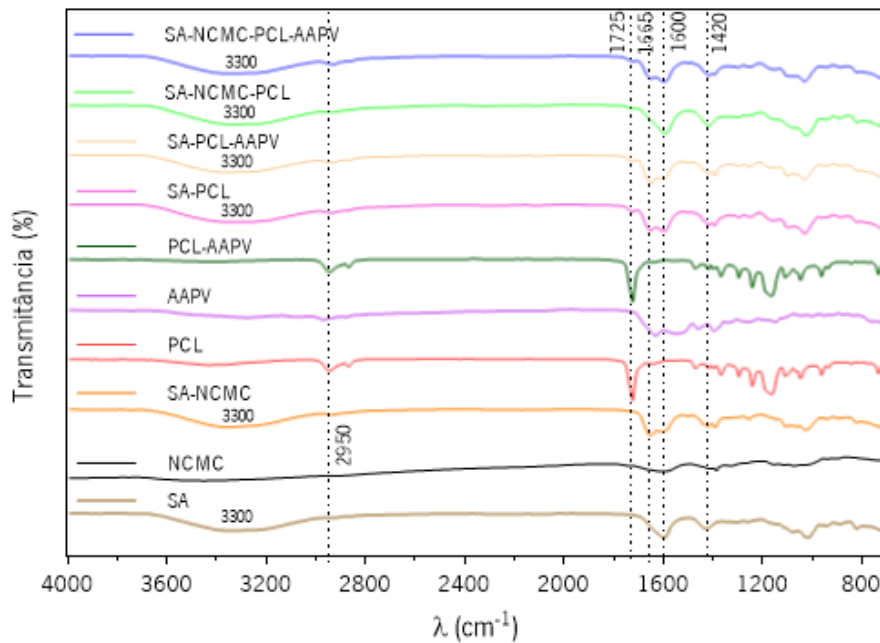


Figura 57- Espectro de ATR-FTIR das fibras produzidas com SA, PCL, NCMC e AAPV.

2.6.3. Grau de hidratação

O grau de hidratação das fibras foi determinado através da variação do peso das amostras secas e após 24 horas de imersão em tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M (pH 7,5) a 37°C. Os resultados são apresentados na Tabela 8. Verificou-se um grau de hidratação de 295,4% e 464,1% para as fibras ocas de SA e SA-NCMC, respetivamente, o que comprova as suas excelentes propriedades de hidratação (neste caso associadas também a uma área superficial maior), características da produção de hidrogéis de SA.¹⁴⁹ Para as fibras de PCL e PCL-AAPV verificou-se um grau de hidratação de 71,1% e 69,4%, respetivamente. Aqui o carácter hidrofóbico do PCL, poderá ter limitado as ligações com as moléculas de água presentes no PBS, reduzindo, assim, o inchamento das fibras relativamente ao SA.¹⁵⁰

As quatro tipologias de fibras co-axiais foram também examinadas, no entanto, verificou-se que no período de 24 horas estas sofrem perda de massa devido a degradação, não sendo assim possível determinar o seu grau de hidratação. Esta diminuição de massa poderá dever-se à perda da camada externa das fibras de SA/SA-NCMC, que poderá ter uma maior contribuição do que a possível hidratação da fibra. Além disso, na produção de fibras co-axiais, devido à maior complexidade do sistema, é mais difícil assegurar a integridade e uniformidade das fibras produzidas (tal como evidenciado na análise morfológica).

Tabela 8- Grau de hidratação (%) dos diferentes tipos de fibra produzidos após 24 horas de imersão em PBS.

Tipo de fibra	Grau de hidratação (%)
SA	295,4 ± 93,9
SA-NCMC	464,1 ± 140,6
PCL	71,1 ± 14,1
PCL-AAPV	69,4 ± 13,8
SA-PCL	-41,4 ± 11,4
SA-PCL-AAPV	-60,8 ± 32,9
SA-NCMC-PCL	-61,7 ± 6,7
SA-NCMC-PCL-AAPV	-65,1 ± 4,8

2.6.4. Degradação das fibras


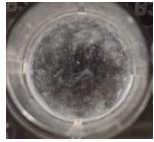


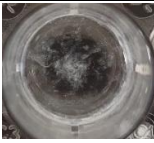

Por forma a testar a estabilidade das fibras em ambiente fisiológico ao longo do tempo (28 dias), testes de variação mássica foram realizadas com amostras de 10 mg (massa seca inicial) das fibras completas (SA-NCMC-PCL-AAPV) e das condições controlo (PCL, PCL-AAPV, SA, SA-NCMC, SA-PCL, SA-PCL-AAPV, SA-NCMC-PCL), imersas em 1 mL de 0,1 M PBS (pH 7,5) a 37°C (NCMC é responsivo a este pH). Os resultados são apresentados na Tabela 9, tendo sido calculados utilizando como massa inicial o peso das amostras após 4 horas de incubação em PBS (tempo considerado suficiente para uma hidratação relativa das fibras) por forma a retirar a influência da hidratação inicial, que poderia mascarar uma perda de peso. Como esperado, as fibras menos estáveis foram as ocas de SA e SA-NCMC. Durante 14 dias sofreram uma redução da massa significativa, sendo que a partir deste período o estado de degradação era tal que já não permitiu que pesagens fossem realizadas. Em contrapartida, a resiliência mecânica e durabilidade do PCL garantiram a estabilidade das restantes fibras. Todas essas experimentaram uma pequena perda de peso inicial, justificada pela possível presença de resíduos salinos oriundos do banho coagulante ou pela degradação parcial do SA e/ou NCMC.¹⁰⁰ Contudo, a partir do dia 4, um aumento de peso foi progressivamente detetado com o tempo. Considerando que o fator comum a todas estas fibras é o PCL, estes resultados revelam uma capacidade de hidratação por parte deste polímero, que vai de encontro a alguns resultados já reportados, que poderá ser benéfica no tratamento de feridas com exsudatos, contribuindo para um ambiente propício à regeneração tissular.¹⁵⁰⁻

¹⁵² Adicionalmente foi demonstrada a resistência que este polímero fornece à estrutura, mantendo-se estável até pelo menos 28 dias de incubação. A camada externa de SA e SA-NCMC não influenciou

2. Resultados e discussão

significativamente as fibras co-axiais devido ao seu pequeno diâmetro, no entanto, o aumento de peso verificado a partir dos 4 dias poderá indicar a possível degradação parcial da camada exterior o que permite um acesso mais facilitado do PCL ao meio envolvente.

Tabela 9- Perfil de degradação das fibras durante um período de 28 dias em 0,1 M PBS a pH 7,5 e 37°C. Os dados são apresentados em percentagem de redução de massa \pm desvio padrão (n=3).

Tipo de fibra	Redução de massa (%)					
	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28
SA	10,8 \pm 10,5	16,3 \pm 0,3	49,0 \pm 26,7			
SA-NCMC	9,8 \pm 4,0	15,8 \pm 5,8	36,9 \pm 24,4			
PCL	9,5 \pm 8,4	-17,7 \pm 18,5	-33,0 \pm 17,8	-33,2 \pm 18,6	-74,6 \pm 22,7	-77,5 \pm 20,8
PCL-AAPV	12,1 \pm 12,9	-30,0 \pm 25,8	-42,1 \pm 31,1	-72,7 \pm 21,3	-91,6 \pm 26,6	-105,2 \pm 24,7
SA-PCL	6,0 \pm 0,0	-30,5 \pm 10,5	-48,4 \pm 8,4	-24,9 \pm 2,7	-67,7 \pm 15,8	-136,2 \pm 42,6
SA-PCL-AAPV	8,2 \pm 13,4	-43,9 \pm 22,3	-58,3 \pm 29,5	-61,4 \pm 11,1	-133,2 \pm 76,2	-180,9 \pm 60,1
SA-NCMC-PCL	1,2 \pm 1,2	-41,9 \pm 20,0	-55,9 \pm 3,5	-10,6 \pm 8,2	-62,9 \pm 15,3	-181,5 \pm 65,3
SA-NCMC-PCL-AAPV	8,6 \pm 1,5	-5,6 \pm 3,5	-31,0 \pm 16,0	-2,6 \pm 13,6	-5,1 \pm 37,4	-46,1 \pm 21,2

Considerando os resultados obtidos poderá ser interessante testar outros polímeros na camada exterior juntamente com NCMC, que possam manter a sua estabilidade durante um período de tempo

mais longo e assegurar que o acesso à camada interna é feito exclusivamente através do polímero NCMC, responsivo a este pH.

2.7. Atividade antimicrobiana das fibras

A inibição da atividade da bactéria *S. aureus* foi avaliada através de um teste de cinética do crescimento, em que as fibras produzidas foram deixadas em contacto com a solução bacteriana por um período máximo de 24 horas, a 37°C sob agitação. Após 1, 2, 4, 6 e 24 horas, alíquotas foram recolhidas, diluídas em PBS e plaqueadas em agar, e após 24 horas as colónias bacterianas crescidas foram contadas. Na Figura 58 a) o crescimento bacteriano é evidente ao longo do tempo, mesmo sem as fibras, o que demonstra a viabilidade celular e das condições de teste, já na Figura 58 b) é possível averiguar a contribuição das fibras para a inibição do crescimento da bactéria *S. aureus*.

As fibras modificadas com NCMC exibem os 3 valores mais baixos de viabilidade bacteriana, nomeadamente SA-NCMC-PCL, SA-NCMC-PCL-AAPV e SA-NCMC. Pela Figura 58 b) é possível constatar que às 6 horas de incubação as fibras com NCMC incorporado promovem uma redução de crescimento de *S. aureus* na gama dos 1,0-1,5, ou seja, 90-99% de redução. É provável que a libertação deste polímero da fibra possa não acompanhar completamente a taxa de crescimento das bactérias, daí não ser atingida uma percentagem de eliminação bacteriana mais significativa.

Relativamente às fibras desprovidas de NCMC, suspeita-se que vestígios dos sais do banho de coagulação, CaCl_2 , tenham ficado retidos nas fibras impulsionando a atividade antibacteriana evidenciada, uma vez que iões de cálcio são dotados de carácter antimicrobiano.¹⁵³ No entanto, no resultado continua a ser possível evidenciar o efeito do NCMC. Este é um resultado promissor, visto que é notória a superior capacidade de eliminação da bactéria *S. aureus* das fibras que contêm NCMC, apesar das condicionantes já mencionadas. De realçar ainda, que o NCMC não se encontra na superfície da fibra, mas numa mistura com SA, o que pode limitar o seu acesso e conseqüente ação. Assim, conclui-se que um aumento da concentração de NCMC incorporada nas fibras será necessária para garantir uma eliminação mais eficaz das bactérias, já que a $2 \times \text{MBC}$ não é atingida uma percentagem de eliminação que garanta uma performance ótima ao longo do tempo (>99%). Atenção redobrada será ainda dada à lavagem das fibras, aumentando os tempos de lavagem, por forma a eliminar quaisquer vestígios dos sais CaCl_2 do banho de coagulação.

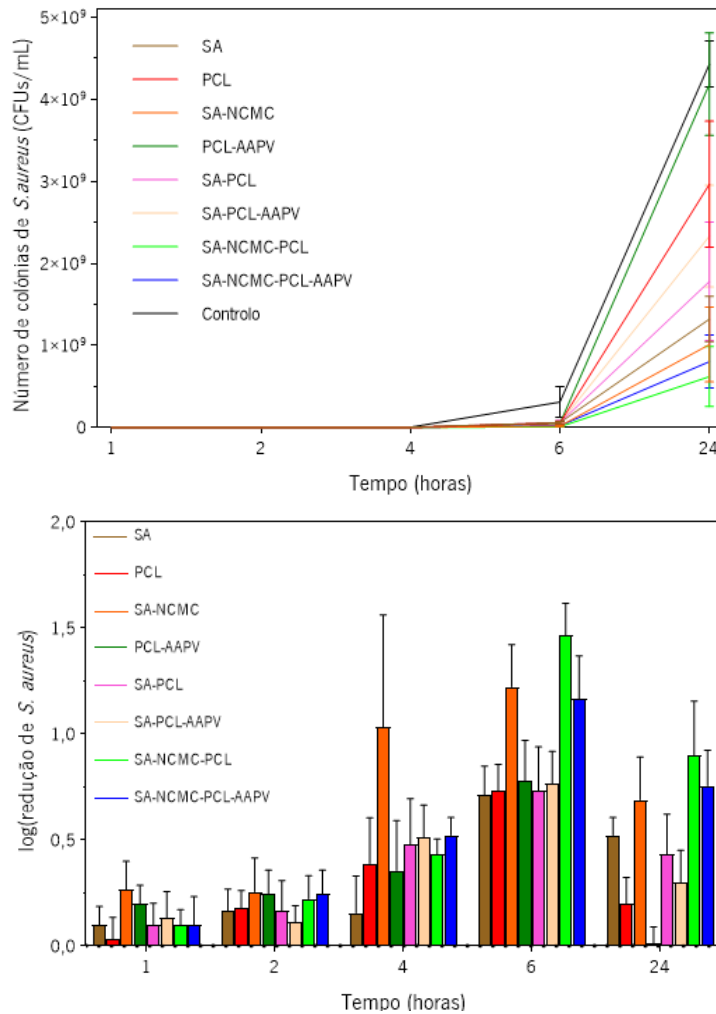


Figura 58- a) Evolução do número de bactérias *S. aureus* ao longo do tempo (até 24 horas de incubação), em contato com as fibras produzidas; **b)** Logaritmo da redução do número de colónias viáveis da bactéria *S. aureus* ao longo do tempo (até 24 horas de incubação) em relação ao controlo.

2.8. Inibição da HNE das fibras

Por forma a confirmar a incorporação do AAPV nas fibras e também demonstrar a sua capacidade inibitória, testes de inibição da enzima HNE foram realizados. Para tal fibras foram incubadas a 37°C em 0,1 M PBS (pH 7,5) durante 24 horas, sendo recolhidas alíquotas após 1, 2, 4, 6 e 24 horas. Estas alíquotas foram então submetidas ao teste de inibição da HNE.

No gráfico da Figura 59 é apresentada a percentagem de inibição da HNE ao longo dos períodos de tempo testados. Fibras sem AAPV foram desconsideradas na apresentação dos resultados já que a inibição da HNE não foi garantida (< 10%). Na primeira hora verifica-se uma percentagem de inibição da HNE inferior, provavelmente resultante de uma menor libertação do péptido das fibras numa fase inicial.

Segue-se uma libertação relativamente constante (com oscilações inevitáveis resultantes do processo de produção de fibras, que dão origem a inconstâncias no diâmetro das camadas poliméricas que as constituem, que podem ter influência na facilidade/dificuldade de libertação do AAPV da camada interna das mesmas (Tabela 7)). Tendo-se observado uma maior constância de inibição ao longo do tempo com a fibra completa.

De ressaltar que, como se verificou pelo teste de degradação apresentado na Secção 2.6.4, no período de tempo avaliado existe uma perda de peso das fibras, associada à libertação dos polímeros da fibra, o que pode condicionar a disponibilidade do péptido em solução e consequentemente a percentagem de inibição da enzima. Considerando que o péptido necessita de estabelecer interações com o centro ativo da enzima, a presença de pequenos fragmentos poliméricos pode inviabilizar essa ligação. Apesar de ter sido obtido um resultado de inibição da atividade da enzima coerente com a concentração de péptido incorporado nas fibras (de 1,5 µg/mL que provoca uma inibição de 44% da atividade da HNE- Secção 2.3), ressalva-se que o resultado poderá estar influenciado pela retenção de parte do péptido pelos polímeros ou mesmo de alguma indisponibilidade da enzima pelo mesmo motivo. No entanto, em condições fisiológicas, com a renovação do meio os resultados serão naturalmente diferentes, e potencialmente mais favoráveis a uma libertação e ação mais direta do AAPV.

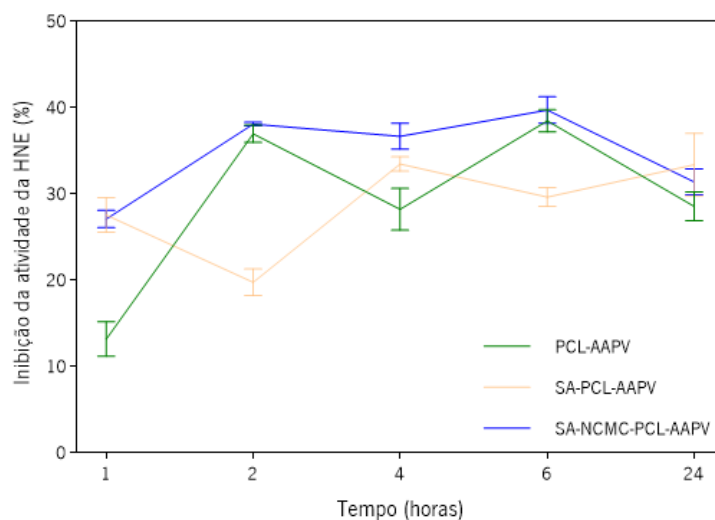


Figura 59- Inibição da atividade da HNE pelo AAPV incorporado nas fibras PCL-AAPV, SA-PCL-AAPV e SA-NCMC-PCL-AAPV, durante um período de 24 horas de incubação em 0,1 M PBS, pH 7,5, a 37°C.

Devido a constrangimentos de tempo provocados pela pandemia, e de fornecimento de material, não foi possível proceder à repetição deste teste e à averiguação mais detalhada da influência dos

polímeros na inibição enzimática. Contudo, este encontra-se já agendado para o mês de janeiro/fevereiro de 2022, de modo que possa ser garantida a reprodutibilidade e fiabilidade destes resultados.

3. Conclusões e perspectivas futuras

O propósito deste trabalho centrou-se na síntese de péptidos através de SPPS e na aplicação dos mesmos em estruturas fibrosas com vista ao desenvolvimento de estratégias de libertação controlada de biomoléculas para o tratamento de feridas crónicas (ou ambientes semelhantes aos sentidos em feridas crónicas). A busca por estratégias de libertação controlada que evitem as dificuldades da utilização terapêutica de péptidos, como a sua baixa biodisponibilidade oral e dificuldade para atravessar barreiras biológicas, tem vindo a aumentar significativamente. Os resultados da presente investigação oferecem uma possível alternativa muito promissora.

Neste trabalho, foi sintetizado o péptido AAPV através de SPPS convencional e assistida por micro-ondas, com rendimentos de 44-94% e purezas na ordem dos 96-98% avaliadas por HPLC analítico. Foi estruturalmente caracterizado recorrendo a técnicas como RMN ^1H , ^{13}C e bidimensional e ATR-FTIR e ESI-MS. Foi possível concluir, que utilizando a resina cloreto de 2-clorotritilo, é obtido um menor rendimento quando a síntese é assistida por MW, do que quando é realizada pelo método convencional. Este resultado confirma a perda de funcionalização apresentada por esta resina quando sujeita a MW. Apesar de não ser conhecida atividade antimicrobiana do AAPV esta foi estudada, tendo-se concluído que este péptido apresenta um MIC/MBC de 2 mg/mL contra *S. aureus*, *S. epidermis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, valor algo elevado para aplicações práticas.

O péptido CW49 foi sintetizado por MW-SPPS, mas apesar do exaustivo trabalho realizado nesse sentido, a sua síntese ainda carece de otimização, uma vez que só foi conseguida com rendimentos baixos (η 13-45%). Nesse sentido poderão ser tomadas várias medidas. Primeiro, realizar análises de HPLC-MS de alta eficiência ao péptido já sintetizado, permitirá tirar conclusões acerca das impurezas/agregados presentes. Caso os resultados das análises de HPLC-MS comprovem que os resíduos de Cys estão oxidados, será necessário adicionar à mistura de clivagem dos grupos protetores um agente que possa impedir essa oxidação.

Em seguida, dever-se-á testar a síntese na resina cloreto de 2-clorotritilo através de SPPS sem micro-ondas, para verificar se se observa o mesmo que se verificou com o péptido AAPV. E posteriormente, testar a utilização de outra resina, que permita igualmente a obtenção de péptidos com C-terminal ácido carboxílico, mas que não apresente a sensibilidade observada a MW. Uma possibilidade seria a resina Wang, de preferência já com o primeiro aminoácido ligado, Asn(Trt).

3. Conclusões e perspectivas futuras

Após a síntese e caracterização do AAPV, foi avaliada a sua capacidade inibitória em relação a HNE tendo-se definido a concentração de 1,5 µg/mL como a concentração ótima para incorporação em estruturas fibrosas, possibilitando uma percentagem de inibição satisfatória para o objetivo proposto.

Foram produzidas fibras de estrutura co-axial por *wet-spinning*, com o núcleo composto por PCL com AAPV incorporado na concentração definida, e uma camada exterior composta por uma mistura polimérica de SA e NCMC. Inicialmente testou-se a utilização de GN no núcleo das fibras co-axiais produzidas, tendo-se concluído que existia uma dificuldade na sua reticulação com os banhos de coagulação testados, tendo-se optado pela utilização de PCL, que traz uma resistência extra à estrutura. O interesse na utilização do NCMC prendeu-se com a sua solubilidade em pH fisiológico, funcionando assim como um gatilho para a libertação controlada do AAPV. Além disso, os testes antimicrobianos realizados demonstraram que este apresenta atividade antibacteriana contra *S. aureus*, uma das bactérias mais prevalentes em feridas crónicas, que está considerada pela OMS na lista de agentes patogénicos resistentes prioritários, devido à sua resistência à ação de antibióticos, tendo apresentado um MIC de 1,6 mg/mL e um MBC de 3,2 mg/mL. Assim a sua incorporação foi realizada a 2xMBC por forma a conferir atividade antibacteriana às fibras produzidas. Contudo, concluiu-se que será interessante testar a produção destas fibras com uma maior concentração deste polímero por forma a ser atingida uma atividade antibacteriana mais expressiva.

As fibras produzidas foram estruturalmente e morfológicamente caracterizadas por ATR-FTIR e microscopia ótica de campo claro, tendo sido confirmada a sua estrutura co-axial. Foi ainda avaliado o grau de hidratação e o perfil de degradação tendo-se concluído que existe uma degradação não só do NCMC como do SA da camada externa, despertando o interesse na testagem de outro polímero a constituir a camada externa juntamente com NCMC em trabalhos futuros. Uma possibilidade seria a produção de fibras com a camada externa composta por uma mistura polimérica de álcool polivinílico (PVA) e NCMC, visto que este polímero é igualmente solúvel em H₂O, podendo ser testada a produção por *wet-spinning* utilizando um banho de coagulação de Na₂SO₄ 8% m/m e NaOH 4% m/m, para avaliar se seria possível produzir fibras PVA-NCMC-PCL-AAPV. O PVA poderá oferecer uma maior resistência à degradação do que o SA, tirando-se partido do funcionamento “gatilho” do NCMC. De qualquer modo, foi possível perceber a resistência do PCL que assegura a integridade do núcleo da fibra até pelo menos 28 dias.

Testou-se a atividade antimicrobiana das fibras, tendo sido confirmada a sua ação contra *S. aureus* e averiguou-se a capacidade de inibição da HNE das mesmas, tendo-se concluído que existe uma libertação do péptido de todas as estruturas fibrosas, que confirma a necessidade de ser testado um

3. Conclusões e perspectivas futuras

polímero que não SA na camada externa, para que seja atingida uma libertação mais prolongada. Mas que atesta o potencial das estruturas produzidas para aplicação em pensos para feridas crónicas porventura ajudando a regular a atividade da HNE. Estão ainda agendadas para breve, análises de calorimetria diferencial de varrimento e termogravimetria e a realização de ensaios de dinamómetro (que devido à indisponibilidade dos equipamentos, não foi possível apresentá-las neste trabalho), assim como a repetição de alguns dos testes realizados, por forma a ser produzida uma publicação científica ilustrativa do potencial dos trabalhos desenvolvidos.

Devido às limitações temporais e dificuldades descritas, não foi possível prosseguir os trabalhos de afinação do processo sintético e posterior incorporação em fibras do péptido CW49 dentro do período de elaboração desta tese. No entanto, este é um trabalho a que se pretende dar continuidade em projetos futuros partindo das conclusões e perspectivas futuras mencionadas. Depois de otimizado o processo sintético, propõe-se a exploração da síntese de miméticos deste péptido e posterior averiguação das respetivas atividades antimicrobianas. Para que deste modo seja retirado o maior partido da sua incorporação em fibras para pensos de aplicação em feridas crónicas dado que as suas atividades intrínsecas são muito promissoras neste sentido.

4. Secção experimental

4.1. Materiais e reagentes

A SPPS foi levada a cabo num sintetizador manual Discover SPPS CEM Corporation. Foi utilizado um evaporador rotativo Butchi Switzerland com um rotor Rotoquimica e uma centrífuga HERMLE QLabo.

O sistema de HPLC analítico usado era composto por uma coluna Lichrospher® RP-18 5 µm, uma bomba Jasco PU-980, um detetor Jasco UV-975 e um registador Shimadzu C-R6A Chromatopac.

O sistema de HPCL preparativo usado era composto por uma coluna Europa Peptide 120 C-18 5 µm 25×1.0, uma bomba Shimadzu LC-SA, um detetor UV-875 Jasco e um registador Shimadzu C-R6A Chromatopac.

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C assim como os ensaios bidimensionais DEPT, HMQC e HMBC foram levadas a cabo num espectrómetro Bruker Avance III 400 (400 Hz para ^1H e 100,6 MHz para ^{13}C). Com os espectros a serem obtidos em CD_3OD e DMSO-d_6 (Acros Organics), com os desvios químicos dados em partes por milhão (ppm) e os valores das constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

As análises de ESI-MS foram realizadas num aparelho ThermoElectron Corp., Finnigan LXQ, que utiliza azoto como gás de nebulização e uma voltagem de *spray* de 5000 kV.

As análises de ATR-FTIR realizadas num espectrómetro Spectrum Two da PerkinElmer com um módulo de ATR UATR Two da PerkinElmer, no software PerkinElmer Spectrum e num espectrómetro IRAffinity-1S Shimadzu acoplado com um módulo de HATR 10 com cristal de diamante.

A morfologia das fibras foi verificada por microscopia ótica de campo claro usando um microscópio Leica DM750 M.

As medidas de absorção UV-Vis foram obtidas num espectrofotómetro Shimadzu UV-2501 PC. Foi também utilizado um Leitor de placas EZ READ 200 Biochrom, para medir UV-Vis.

O aparato de *wet-spinning* utilizado contém duas bombas (NE-1600, New Era Pump Systems, Norleq.) e fiera co-axial de diâmetro 21 G (núcleo) e 15 G (camada exterior). As fibras foram armazenadas num exsiccador Sicco.

O viscosímetro utilizado foi um Brookfield DV-II+Pro com um *spindel* de 21.

Os reagentes, resinas e aminoácidos utilizados no processo de SPPS foram adquiridos comercialmente às empresas NovaBiochem e APPtec, exceto os solventes utilizados nas lavagens dos passos de acoplamento e desproteção de aminoácidos, DMF e MeOH que foram destilados.

Os polímeros SA, GN, quitosano e PCL e o glutaraldeído e formaldeído foram obtidos da Sigma-Aldrich e o CaCl_2 da Chem-Lab. Os reagentes necessários para a preparação do PBS foram adquiridos à Merck (PBS 0,1 M: 1,44 g/L de Na_2HPO_4 , 0,24 g/L de KH_2PO_4 , 8,00 g/L de NaCl e KCl 0,20 g/L)

Os reagentes utilizados no teste de inibição enzimática foram adquiridos à Sigma-Aldrich e a Roche.

As bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) foram fornecidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC). O meio de cultura utilizado nos testes antimicrobianos, agar com triptona e soja (TSA), foi adquirido à VWR e o meio de cultura caldo *Mueller Hinton* (MHB) foi adquirido à CondaLab.

4.2. Procedimentos gerais de SPPS

4.2.1. Ligação do primeiro aminoácido à resina cloreto de 2-clorotritilo

O aminoácido (2 eq. relativamente à funcionalização da resina) foi dissolvido em 10 mL de DCM seco e adicionado DIPEA (4 eq. relativamente à funcionalização da resina). Esta mistura foi adicionada a 1 g de resina cloreto de 2-clorotritilo e deixada em agitação durante a noite à temperatura ambiente.

A resina foi tratada com DCM/MeOH/DIPEA (17:2:1, 3×10mL), DMC (3×10 mL), MeOH (3×10 mL) e EE (2×10 mL), agitando cerca de 5 minutos entre cada uma das lavagens. Posteriormente deixada secar num exsiccador sob vácuo, até o seu peso não variar.

4.2.2. Determinação do *loading* da resina

Num balão volumétrico adicionaram-se 5 mL de solução de piperidina 20% em DMF a uma fração de resina (2 mg) e deixou-se em agitação 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi medida a absorbância da solução num espectrofotómetro UV-Vis a 301 nm ($\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), tendo sido utilizada a solução de piperidina 20% em DMF como branco.

4.2.3. Desproteção do N-terminal dos aminoácidos

Para a remoção dos grupos Fmoc foi adicionada à resina uma solução de 20% piperidina em DMF (5 mL/g de resina) e submetida a 30 segundos de irradiação por micro-ondas (P= 50 W, T= 75°C). Esta

solução foi descartada e substituída por nova solução de piperidina 20% em DMF (7 mL/g de resina) submetendo-se a resina a irradiação por micro-ondas durante 3 minutos (P= 50 W, T= 75°C). De seguida a resina foi lavada com DMF (3×) e MeOH (3×), repetindo-se este ciclo de lavagens 4 vezes.

4.2.4. Acoplamento dos aminoácidos

Para o acoplamento de cada aminoácido (5 eq. relativamente ao loading da resina), por cada g de resina o aminoácido foi dissolvido em 6 mL de DMF seca, tendo-se posteriormente adicionado DIC (5 eq.) e Oxyma® (5 eq.) previamente dissolvidos na quantidade mínima necessária de DMF seca. A mistura reacional ficou em agitação 5-10 minutos e em seguida foi adicionada à resina. Assim, a resina foi submetida a dois ciclos de irradiação por micro-ondas de 5 minutos cada (P= 25 W, T= 75°C), deixando-se arrefecer à temperatura ambiente entre ciclos. De seguida a resina foi lavada com DMF (3×) e MeOH (3×), tendo sido repetido este ciclo de lavagens 3 vezes.

4.2.5. Testes TNBS

Para a realização dos testes TNBS foi preparada uma solução de 10% DIPEA em DMF. A alguns grãos da resina foram adicionadas 2-3 gotas de solução de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico 1% em DMF e 2-3 gotas de solução de 10% DIPEA em DMF. A mistura foi agitada brevemente e deixada 10 minutos. Após esse período a solução foi descartada e os grãos de resina lavados com DMF. De seguida foi avaliada a tonalidade dos mesmos a olho nú e com a ajuda de uma lupa.

4.2.6. Separação do péptido da resina cloreto de 2-clorotritilo

Para a separação do péptido da resina cloreto de 2-clorotritilo foi preparado um cocktail de clivagem de AcOH/TFE/DCM 1:2:7 (10 mL/g de resina), que foi adicionado à resina num balão de fundo redondo e que ficou em agitação 2 horas à temperatura ambiente. A solução foi depois filtrada e o solvente evaporado quase à secura.

Quando o péptido não tem grupos protetores nas cadeias laterais é precipitado por adição de EE e em seguida separado da suspensão por centrifugação e deixado secar num exsiccador sob vácuo.

4.2.7. Desproteção das cadeias laterais dos aminoácidos

Preparou-se uma solução de clivagem dos grupos das cadeias laterais dos aminoácidos, TFA/TIPS/H₂O 95% 2,5% 2,5%, que foi adicionada à solução obtida após a separação do péptido da resina e evaporação do DCM (procedimento geral 4.2.6). Permaneceu em agitação durante 3 horas à temperatura ambiente. Seguiu-se a adição de EE para precipitar o composto, e a solução ficou no frio até ao dia seguinte. Finalmente a solução foi centrifugada e o produto obtido deixado secar num exsiccador sob vácuo.

4.2.8. HPLC analítico e preparativo

As amostras para HPLC analítico foram preparadas pela diluição de 1 mg de amostra em 100 µL de eluente, tendo sido feitas injeções de 20 µL. Os eluentes testados foram filtrados e desgaseificados com recurso a ultrassons. As amostras foram analisadas a um fluxo de 0,6 ou 0,8 mL/min a 214 nm de comprimento de onda de deteção, *range* de 0,64 e atenuação de 6.

As amostras para HPLC preparativo foram preparadas pela diluição da amostra, cerca de 26 mg/mL de eluente ACN/H₂O 1:4 com 0,1% TFA e filtradas com filtro de seringa PVDF 0,45 µm L184490. Foram feitas injeções de 1 mL, com um fluxo de 0,8 mL/min, deteção a 214 nm, *range* de 2,56 e atenuação de 3.

4.2.9. ESI-MS

As análises de ESI-MS foram realizadas com as amostras em ACN/H₂O 1:4 com 0,1% de TFA (ACN *HPLC grade*) na ordem de 10⁻⁴ M. Antes da análise as amostras foram filtradas com filtros de seringa PVDF 0,45 µm L184490.

4.3. Péptido AAPV

4.3.1. SPPS assistida por micro-ondas

A síntese do péptido AAPV foi levada a cabo com uma resina de poliestireno cloreto de 2 clorotritilo, pré-carregada com o aminoácido valina, partiu-se de 1,007-1,110 g de resina (funcionalização de 0,530

mmol/g). Os passos de acoplamento e *N*-desproteção, assim como o procedimento de clivagem do péptido da resina foram realizados como descrito em 4.2.4, 4.2.3 e 4.2.6, respetivamente. Foram obtidos rendimentos de 44,15-65,24% que corresponderam à obtenção de um produto crude de 0,0834-0,1368g. O produto obtido da 1ª síntese foi submetido a uma recristalização na qual foi utilizado MeOH/EE precedido de centrifugação do composto (obtiveram-se 0,0550 g, correspondente a um rendimento de 29,12%). Para a realização das análises de HPLC analítico foram testados os eluentes ACN/H₂O (1:1) com 0,1% de TFA, ACN/H₂O (2:1) com 0,1% de TFA, ACN/H₂O (1:2) com 0,1% de TFA e também ACN/H₂O (1:4) com 0,1% de TFA. As análises foram realizadas com um fluxo de 0,6 mL/minuto nas condições acima descritas. As análises de RMN de ¹H, de ¹³C e bidimensionais, DEPT, HMQC e HMBC foram realizadas em CD₃OD e DMSO-*d*₆ com TFA (0,02 µL de TFA por mL de DMSO-*d*₆). Testou-se a solubilidade do péptido em acetona deuterada e clorofórmio não tendo este sido solubilizado. Para as análises de ATR-FTIR o composto não necessitou de nenhum tipo de preparação, tendo sido a análise conduzida com este no estado sólido. Para a realização das análises ESI-MS foi solubilizada a amostra em MeOH/H₂O 8:2, numa concentração de acordo com o descrito em 4.2.9. (ESI-MS: calculado para C₁₆H₂₈N₄O₅ M:355,21; encontrado: 355,33).

RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ_H: 0,94-0,97 (6H, m, 2×γ-CH₃ Val), 1,44 (3H, d, *J*= 6.8 Hz, CH₃ Ala 2), 1,49 (3H, d, *J*= 7.2 Hz, CH₃ Ala 1), 2,06-2,20 (5H, m, γ-CH₂ Pro + β-CH₂ Pro + β-CH Val), 3,69-3,75 (1H, m, δ-CH₂ Pro), 3,78-3,88 (1H, m, δ-CH₂ Pro), 3,91 (1H, q, α-CH Ala 1), 4,19 (1H, d, *J*=4.8 Hz, α-CH Val), 4,51-4,54 (1H, m, α-CH Pro), 4,68 (1H, q, α-CH Ala 2) ppm.

RMN de ¹³C (CD₃OD, 100,6 MHz) δ_C: 17,18 (CH₃ Ala 2), 17,42 (CH₃ Ala 1), 18,40 (CH₃ Val), 20,14 (CH₃ Val), 25,99 (γ-CH₂ Pro), 30,18 (β-CH₂ Pro), 32,81 (β-CH Val), 48,36 (α-CH Ala 2), 48,57 (δ-CH₂ Pro), 50,21 (α-CH Ala 1), 61,05 (α-CH Val), 61,87 (α-CH Pro), 171,36 (C=O Ala 1), 173,27 (C=O Pro), 173,35 (C=O Ala 2), 177,68 (C=O Val) ppm.

RMN de ¹H (DMSO-*d*₆ + TFA, 400 MHz) δ_H: 0,85-0,87 (6H, m, 2×γ-CH₃ Val), 1,22 (3H, d, *J*= 7.2 Hz, CH₃ Ala 2), 1,30 (3H, d, *J*= 7.2 Hz, CH₃ Ala 1), 1,86-2,02 (6H, m, γ-CH₂ Pro + β-CH₂ Pro + β-CH Val), 3,56-3,58 (2H, m, δ-CH₂ Pro), 3,83-3,85 (1H, m, α-CH Ala 1), 4,01-4,12 (1H, m, α-CH Val), 4,45-4,47 (1H, m, α-CH Pro), 4,53-4,57 (1H, m, α-CH Ala 2), 7,90 (1H, d, *J*= 8.8 Hz, NH Val), 8,03-8,04 (2H, br s, NH₂ Ala 1), 8,61 (1H, d, *J*= 7.2 Hz, NH Ala 2).

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 + TFA, 100,6 MHz) δ_{C} : 17,16 (CH_3 Ala 2), 17,27 (CH_3 Ala 1), 17,98 (CH_3 Val), 19,18 (CH_3 Val), 24,61 ($\gamma\text{-CH}_2$ Pro), 28,85 ($\beta\text{-CH}_2$ Pro), 30,16 ($\beta\text{-CH}_2$ Val), 46,58 ($\alpha\text{-CH}$ Ala 2), 46,87 ($\delta\text{-CH}_2$ Pro), 48,12 ($\alpha\text{-CH}$ Ala 1), 57,16 ($\alpha\text{-CH}$ Val), 59,13 ($\alpha\text{-CH}$ Pro), 169,02 (C=O Ala 1), 170,24 (C=O Ala 2), 171,56 (C=O Pro), 173,09 (C=O Val) ppm.

4.3.2. SPPS convencional

A síntese do péptido AAPV através de SPPS convencional foi realizada com a mesma resina, poliestireno cloreto de 2-clorotritilo pré-carregada com o aminoácido valina, partindo-se de 0,7350 g de resina (funcionalização de 0,530 mmol/g).

O acoplamento dos aminoácidos foi realizado utilizando também DIC/Oxyma® mas na proporção de 5 eq. a.a, 5,5 eq. DIC e 5,5 eq. Oxyma em relação à funcionalização da resina. A mistura reacional ficou em agitação durante 6 horas à temperatura ambiente. Após cada acoplamento o grupo Fmoc foi removido com três vezes piperidina 20% em DMF 5 minutos, 10 minutos e 15 minutos de agitação.

Para separar o péptido do suporte sólido foi utilizado inicialmente um cocktail de clivagem contendo apenas TFE/DCM 3:7 e mantido sob agitação 2 horas à temperatura ambiente. Desta clivagem foram obtidas 90,80 mg de péptido o que corresponde a um rendimento de 65,47%. Para confirmar a remoção completa do péptido da resina, submeteu-se a resina a nova reação de clivagem usando o cocktail de clivagem AcOH/TFE/DCM 1:2:7 (2 horas em agitação à temperatura ambiente), usado nas sínteses anteriores (como descrito em 4.2.6). Desta clivagem foram obtidas mais 39,80 mg de péptido, que corresponde a 28,70% de rendimento (94,17% de rendimento total). A pureza foi verificada por HPLC analítico e a estrutura do péptido obtido confirmada por RMN de ^1H em DMSO- d_6 com TFA.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 + TFA, 400 MHz) δ_{H} : 0,85-0,87 (6H, m, $2\times\gamma\text{-CH}_3$ Val), 1,22 (3H, d, $J=6.8$ Hz, CH_3 Ala 2), 1,30 (3H, d, $J=6.8$ Hz, CH_3 Ala 1), 1,86-2,04 (6H, m, $\gamma\text{-CH}_2$ Pro + $\beta\text{-CH}_2$ Pro + $\beta\text{-CH}$ Val), 3,54-3,59 (2H, m, $\delta\text{-CH}_2$ Pro), 3,83-3,86 (1H, m, $\alpha\text{-CH}$ Ala 1), 4,09-4,12 (1H, m, $\alpha\text{-CH}$ Val), 4,44-4,47 (1H, m, $\alpha\text{-CH}$ Pro), 4,53-4,57 (1H, m, $\alpha\text{-CH}$ Ala 2), 7,90 (1H, d, $J=8.4$ Hz, NH Val), 8,03 (2H, br s, NH_2 Ala 1), 8,61 (1H, d, $J=7.6$ Hz, NH Ala 2).

4.4. Síntese do CW49

A síntese do péptido CW49 foi levada na mesma resina de poliestireno, cloreto de 2-clorotritilo, partindo de 0,5350-0,6548 g de resina (funcionalização de 0,918 mmol/g). O acoplamento do primeiro aminoácido foi realizado como descrito na secção 4.2.1, com exceção da 2ª síntese em que o tempo da reacção de acoplamento foi diminuído para 1 hora e 30 minutos e o número de equivalentes de aminoácido para 0,8 eq. e de DIPEA para 1,6 eq. Terminadas as lavagens a resina ficou a secar num exsiccador sob vácuo durante 2-3 dias. Findo esse período foram determinados os valores de *loading* em cada uma das sínteses realizadas, através do procedimento descrito na secção 4.2.2.

De seguida foram realizados os passos sucessivos de acoplamento e *N*-desproteção dos aminoácidos conforme o procedimento descrito em 4.2.4 e 4.2.3, respetivamente, tendo sido repetido o procedimento de acoplamento quando os testes TNBS realizados deram resultado positivo (nas 3ª e 4ª sínteses). Os testes TNBS foram realizados conforme descrito em 4.2.5. Seguiu-se o processo de clivagem do péptido da resina pelo procedimento geral descrito em 4.2.6. Após a evaporação, num evaporador rotativo, do DCM presente no cocktail de separação do péptido da resina, seguiu-se a clivagem dos grupos protetores do péptido conforme o apresentado na secção 4.2.7. Foram obtidos rendimentos de 13,30-45,98% nas sínteses realizadas.

Seguiram-se as análises de HPCL analítico, testaram-se os eluentes ACN/H₂O 1:1 com 0,1% TFA e ACN/H₂O 1:4 com 0,1% TFA tendo sido obtida uma melhor separação no cromatograma com o último, pelo que foi utilizado em todas as análises. Trabalhou-se com um fluxo de 0,8 mL/min. As amostras para HPLC analítico e preparativo foram preparadas como descrito em 4.2.8.

Para testar a possível formação de pontes ditio, foram repetidas as análises de HPCL analítico do composto obtido da 1ª síntese após recristalização após adição de 0,1 mg/mL de DTT no eluente ACN/H₂O 1:4 com 0,1% TFA e de uma quantidade de DTT, à solução que continha o péptido, correspondente a 2 eq.

Foi necessário filtrar as soluções antes da injeção no HPLC preparativo, utilizaram-se filtros de seringa. Foram feitas injeções de 1 mL e recolhidas cerca de 11 frações em cada corrida. Foram obtidas cerca de 24,0 mg numa das frações recolhidas e 11,2 mg noutra, o que corresponde a uma recuperação de cerca de 9,60% e 4,48% da massa injetada no HPLC preparativo. As restantes frações separadas correspondiam também elas a quantidades muito pequenas, na ordem dos µg. As amostras obtidas da realização de HPLC preparativo à 1ª e 2ª sínteses, foram analisadas por ESI-MS, assim como os produtos crude da 3ª e 4ª sínteses. Para as análises de ESI-MS as amostras foram preparadas conforme descrito em 4.2.9.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 + TFA, 400 MHz) δ_{H} : 0,75-0,81 (6H, m, $\beta\text{-CH}_3$ + $\delta\text{-CH}_3$), 1,01-1,04 (6H, m, CH_3 Thr + CH_3 Thr), 1,22-1,24 (3H, m, $\beta\text{-CH}$ Ile), 1,28 (3H, d, $J=6.8$ Hz, CH_3 Ala), 1,45-1,46 (3H, m, $\gamma\text{-CH}_2$ Arg + $\beta\text{-CH}_2$ Pro), 1,70-1,83 (5H, m, $\beta\text{-CH}_2$ Arg + $\beta\text{-CH}_2$ Pro + $\beta\text{-CH}_2$ Asn + $\beta\text{-CH}_2$ Met), 1,92-2,02 (5H, m, $\beta\text{-CH}_2$ Asn + CH_3 Met + $\beta\text{-CH}_2$ Met), 2,44-2,55 (4H, m, $\gamma\text{-CH}_2$ Met + $\gamma\text{-CH}_2$ Pro), 2,80-2,85 (1H, m, $\beta\text{-CH}_2$ Phe), 2,98-3,09 (6H, m, $\beta\text{-CH}_2$ Phe + $\delta\text{-CH}_2$ Arg + $\gamma\text{-CH}_2$ Ile + $\beta\text{-CH}_2$ Cys), 3,32-3,42 (2H, m, $\beta\text{-CH}_2$ Cys + $\delta\text{-CH}_2$ Pro), 3,56-3,60 (1H, m, $\delta\text{-CH}_2$ Pro), 3,68-3,71 (1H, m, $\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 3,88-3,90 (1H, m, $\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 4,01-4,11 (3H, m, $\beta\text{-CH}$ Thr + $\beta\text{-CH}$ Thr + $\alpha\text{-CH}$ Ala), 4,25-4,32 (3H, m, $\alpha\text{-CH}$ Met + $\alpha\text{-CH}$ Ile + $\alpha\text{-CH}$ Thr), 4,37-4,40 (3H, m, $\alpha\text{-CH}$ Arg + $\alpha\text{-CH}$ Pro + $\alpha\text{-CH}$ Thr), 4,48-4,57 (2H, m, $\alpha\text{-CH}$ Phe + $\alpha\text{-CH}$ Asn), 4,79 (1H, br s, $\alpha\text{-CH}$ Cys), 7,13-7,27 (5H, m, H-4 Phe + H-2,6 Phe + H-3,5 Phe), 7,46 (2H, br s, NH + NH), 7,77-8,39 (13H, m, NH) ppm.

RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 + TFA, 100,6 MHz) δ_{C} : 11,47 (CH_3 Ile), 14,99 (CH_3 Met), 15,77 ($\beta\text{-CH}_3$ Ile), 15,98 (CH_3 Ala), 19,44 (CH_3 Thr), 19,86 (CH_3 Thr), 24,82 ($\beta\text{-CH}_2$ Pro), 25,02 ($\gamma\text{-CH}_2$ Arg), 25,53 ($\beta\text{-CH}_2$ Cys), 26,54 ($\beta\text{-CH}_2$ Arg), 29,54 ($\gamma\text{-CH}_2$ Met), 29,65 ($\beta\text{-CH}_2$ Met), 30,01 ($\gamma\text{-CH}_2$ Pro), 31,05 ($\beta\text{-CH}$ Ile), 32,61 ($\beta\text{-CH}_2$ Asn), 37,23 ($\gamma\text{-CH}_2$ Ile), 37,85 ($\beta\text{-CH}_2$ Phe), 41,05 ($\delta\text{-CH}_2$ Arg), 42,58 ($\alpha\text{-CH}_2$ Gly), 47,31 ($\delta\text{-CH}_2$ Pro), 47,76 ($\alpha\text{-CH}$ Ala), 49,43 ($\alpha\text{-CH}$ Asn), 52,55 ($\alpha\text{-CH}$ Arg), 52,73 ($\alpha\text{-CH}$ Met), 54,50 ($\alpha\text{-CH}$ Phe), 57,56 ($\alpha\text{-CH}$ Ile), 58,47 ($\alpha\text{-CH}$ Cys), 58,59 ($\alpha\text{-CH}$ Thr), 58,70 ($\alpha\text{-CH}$ Thr), 60,04 ($\alpha\text{-CH}$ Pro), 67,19 ($\beta\text{-CH}$ Thr), 67,30 ($\beta\text{-CH}$ Thr), 126,82 (C-4 Phe), 128,59 (C-3,5 Phe), 129,87 (C-2,6 Phe), 138,07 (C-1 Phe), 157,36 (C=NH Arg), 168,57 (C=O Cys), 169,40 (C=O), 170,28 (C=O), 170,39 (C=O), 170,46 (C=O), 171,57 (C=O Phe), 171,66 (C=O), 171,85 (C=O), 171,98 (C=O), 172,29 (C=O), 172,36 (C=O), 173,20 (C=O) ppm.

4.5. Testes de atividade antimicrobiana (MIC e MBC: AAPV e NCMC)

Os MIC foram determinados utilizando o método de microdiluição em caldo, adaptado do publicado pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais e o Comité Europeu da Testagem da Suscetibilidade Antimicrobiana.¹⁵⁴ Utilizou-se uma solução mãe de AAPV de 4 mg/mL preparada em dH_2O e de 102,4 mg/mL de NCMC em dH_2O . Posteriormente, 100 μL desta solução foram adicionados à primeira coluna de uma placa de 96 poços (em triplicado). De seguida, diluições em série (1:2) foram realizadas em MHB nos poços consecutivos atingindo-se um volume final de 50 μL por poço. Uma suspensão de bactérias (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) de 5×10^5 unidades formadoras de colónias (CFUs)/mL em MHB foi adicionada a cada poço a 50 μL . Foram realizados controlos com o meio de

cultura (negativos) e com a suspensão de bactérias (positivos). Mediram-se as absorbâncias a 600 nm, antes e depois de 24 horas de incubação a 37°C e 120 rotações por minuto (rpm), protegidas da luz. O MIC estabeleceu-se na concentração a partir da qual o crescimento da bactéria fosse detetado (diferença entre valores de absorbância).

O MBC foi determinado pela cultura de soluções de bactéria do MIC, e da concentração antes e depois do MIC. Para tal, coletaram-se alíquotas, diluídas em serie em PBS 0,1 M de pH 7,5 (10^3 para 10^4), cultivadas em TSA, e depois incubadas a 37°C por 24 horas, e finalmente as colónias foram contadas.

4.6. Inibição HNE pelo AAPV

Para a determinação da capacidade inibitória da enzima HNE pelo péptido APPV seguiu-se uma adaptação do procedimento descrito por Loser *et al.*¹⁵⁵ Prepararam-se várias soluções em tampão Tris-HCl a pH 7,5 (pH fisiológico), uma solução de substrato da enzima, *N*-MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-p-NA, 1,400 mM, uma solução de inibidor *Soyblan Tripsin* de 0,200 mg/mL e uma solução de enzima de 45 mU/mL. Em feridas crónicas foi reportada uma concentração da elastase de 36-54 mU/mL, daí a seleção dos 45 mU/mL.¹⁵⁶ Foram preparadas soluções de AAPV na gama de concentrações de 0,195 a 200,000 µg/mL de modo a ser estudada a sua inibição.

Adicionaram-se 125 µL de solução de substrato e 50 µL de solução de péptido AAPV a 405 µL de tampão Tris-HCl. De seguida foram adicionados 20 µL da solução de enzima e as amostras foram vortexadas por 1 minuto, e incubadas a 37°C por 1 hora. Posteriormente adicionaram-se 500 µL de solução de inibidor e as amostras foram novamente vortexadas e as absorbâncias lidas a 405 nm. Foram preparadas amostras controlo sem a solução de inibidor, e sem o péptido AAPV. Os testes foram conduzidos em triplicado, com três leituras de absorbância realizadas por réplica (média de nove medidas). A inibição da atividade da HNE foi calculada em relação às amostras sem inibidor, considerando a influência do tampão, substrato, solvente e AAPV.^{141,157}

4.7. Produção de fibras

4.7.1. Preparação de soluções poliméricas

Prepararam-se soluções poliméricas de SA (2% m/v) (de algas castanhas, viscosidade média) e GN (1% e 2% m/v) (gelatina tipo A de pele de porco, ≈ 300 bloom) em dH₂O e mantiveram-se sob agitação a 50°C durante 3 horas e 1 hora, respetivamente. Para preparar a solução SA-GN 70:30, a solução de GN (1% m/v) foi incorporada e a agitação mantida até se obter uma mistura homogénea (1 hora).

O NCMC foi sintetizado a partir de quitosano Mw 100-300 kDa, no Centro de Ciência e Tecnologia Têxtil pela aluna de doutoramento Catarina S. Miranda. Seguiu-se a preparação de uma solução de NCMC (1% m/v) em dH₂O. A preparação da solução de SA-GN-NCMC 70:20:10 foi conseguida através da junção das soluções poliméricas previamente preparadas nas concentrações definidas seguida de agitação 1 hora, a 50°C, para ser obtida uma solução homogénea.

O banho de coagulação CaCl₂ (2% m/v) foi preparado em dH₂O e mantido sob agitação cerca de 20 minutos, prepararam-se ainda banhos de coagulação de etanol (96% v/v) e etanol (70% v/v).

Foram preparadas soluções de GN (2% m/v) com agentes reticulantes, GTA (0,5% v/v), a partir de uma solução de GTA (25% v/v), e formaldeído (0,033; 0,063; 0,088 e 0,200 mmol/mL) em dH₂O, mantendo-se em agitação por 1 hora.

Para a produção de fibras com PCL preparou-se a solução de PCL (10% m/v) (Mw 80 kDa) em DMF e manteve-se em agitação a 50°C durante 1 hora. Foi preparada a solução de AAPV a 1,5 μ g/mL em DMF e posteriormente adicionada à solução de PCL, após esta arrefecer até à temperatura ambiente, manteve-se a agitação por mais 1 hora. O NCMC foi preparado a 6,4 mg/mL (2 \times MBC) em dH₂O. A solução de SA-NCMC foi preparada pela junção das soluções de SA (2% m/v) e NCMC previamente preparadas e a agitação foi mantida por 1 hora, a 50°C. Todas as soluções foram submetidas a ultrassons 10 minutos para a remoção de bolhas de ar.

4.7.2. Teste de viscosidade das soluções poliméricas

As análises foram conduzidas num viscosímetro, com o *spindel* 21, a 40 rpm para as soluções de PCL e PCL-AAPV, 5 rpm para a solução de SA e 10 rpm para a solução de SA-NCMC, a temperaturas de 17-30°C.

4.7.3. Produção de fibras co-axiais SA-NCMC-GN-AAPV por *wet-spinning*

Produziram-se inicialmente fibras simples de SA (2% m/v) e GN (1% m/v) num banho de coagulação de CaCl_2 (2% m/v). Não foi conseguida a extrusão das fibras de GN nestas condições, no entanto foi possível com SA, tendo-se testado a extrusão a 0,100 mL/min e 0,250 mL/min. As fibras simples produzidas de SA-GN 70:30 foram extrudidas, no banho de coagulação definido, e várias velocidades de extrusão foram testadas (0,100; 0,150; 0,200 e 0,250 mL/min), tendo sido obtido um melhor resultado a 0,100 mL/min, à temperatura ambiente, com uma extrusão contínua e sem aglomerados. As fibras foram recolhidas manualmente e deixadas a secar à temperatura ambiente. No entanto, depois de secas apresentavam alguma fragilidade. De seguida promoveu-se a incorporação de NCMC na mistura polimérica, preparou-se a mistura numa proporção de SA-GN-NCMC 70:20:10, e foram testadas as velocidades de extrusão de 0,050, 0,100 e 0,200 mL/min, tendo sido obtida uma fibra mais grossa com o aumento da velocidade de extrusão.

A extrusão de NCMC (1% m/v) sozinho (foi testada a 4% m/v originando uma solução demasiado viscosa para extrudir), num banho de coagulação de CaCl_2 (2% m/v), não funcionou visto que as fibras se desfaziam ainda antes de serem coletadas.

Avançou-se para a produção de fibras co-axiais SA-GN e SA-NCMC-GN com SA (2% m/v) e GN (2% m/v), testando-se algumas velocidades de extrusão (SA/SA-NCMC 0,150 mL/min e GN a 0,100 mL/min, SA/SA-NCMC 0,100 mL/min e GN 0,050 mL/min e SA 0,100 mL/min e GN 0,090 mL/min), em banho de coagulação CaCl_2 (2% m/v), etanol (96% v/v) a 4°C, e etanol (70% v/v) a 4°C. Fibras consistentes foram apenas obtidas com o primeiro banho de coagulação. Foi ainda testada a extrusão de GN (2% m/v) com agentes reticulantes a 0,100 mL/min (velocidade otimizada), no banho de coagulação definido, tendo sido impossível a extrusão com 0,200 mmol/mL de formaldeído devido à elevada viscosidade da solução.

4.7.4. Produção de fibras co-axiais SA-NCMC-PCL-AAPV por *wet-spinning*

Foram testadas algumas velocidades de extrusão das fibras co-axiais SA-PCL nomeadamente: SA e PCL 0,100 mL/min; SA 0,100 mL/min + PCL 0,050 mL/min; SA 0,200 mL/min + PCL 0,100 mL/min; SA 0,150 mL/min + PCL 0,100 mL/min; SA 0,160 mL/min + PCL 0,080 mL/min. Verificou-se que quando as duas camadas são extrudidas à mesma velocidade, é formada uma fibra em monocamada, maioritariamente composta por PCL, uma vez que devido à maior viscosidade da solução de SA, uma

velocidade de extrusão mais elevada é necessária para que seja produzida uma estrutura co-axial. Realizado esse ajuste nas velocidades testadas constatou-se que as fibras mais promissoras eram obtidas a SA 0,100 mL/min + PCL 0,050 mL/min com a obtenção de uma camada exterior de SA facilmente identificada a olho nu, mas com alguma dificuldade de extrusão associada e SA 0,150 mL/min + PCL 0,100 mL/min, com uma camada exterior mais fina de SA mas mais contínua. Testou-se também a solução de PCL (5% m/v) que resultava em fibras co-axiais semelhantes, mas não era consistente quando extrudada sozinha pelo que não permitia produzir a fibra controlo.

Além da fibra completa, de SA-NCMC-PCL-AAPV, foram também produzidas as fibras de controlo, com todas as combinações de componentes, PCL e PCL-AAPV sem camada exterior, SA e SA-NCMC ocas (com a extrusão de banho de coagulação no interior da fibra), e fibras co-axiais de SA-PCL, SA-NCMC-PCL e SA-PCL-AAPV à velocidade de extrusão definida como ótima, de 0,100 mL/min (núcleo) e 0,150 mL/min (camada exterior).

As fibras co-axiais foram produzidas usando uma feira co-axial que permite a extrusão de uma fibra com um núcleo e uma “casca” de diferente composição. O aparato é constituído por duas bombas que tem a si ligadas 2 seringas de 20 mL contendo as soluções poliméricas, e um tabuleiro contendo 1 L de banho de coagulação à temperatura ambiente. As fibras foram recolhidas manualmente e armazenadas num exsiccador a 19°C com uma humidade relativa de 41%.

4.8. Caracterização física e química

4.8.1. Microscopia ótica de campo claro

A morfologia das fibras foi avaliada por microscopia ótica de campo claro. As imagens foram capturadas com uma ampliação de 5× e 10×, após lavagem das fibras em dH₂O. Para a determinação dos diâmetros médios das fibras utilizaram-se as imagens de ampliação de 5× (5 imagens por amostra e 5 medidas por imagem) e o software ImageJ (versão 1,53).

4.8.2. ATR-FTIR

Os espectros de ATR-FTIR foram obtidos com uma gama de comprimentos de onda de 4000-400 cm⁻¹, 200 scans e resolução espectral de 2 cm⁻¹. As amostras foram deixadas a secar durante a noite a 37°C antes de serem realizadas as análises por forma a eliminar a influência de moléculas de água.

4.8.3. Grau de hidratação

O grau de hidratação das fibras foi avaliado em PBS. Amostras de 10 mg foram pré-lavadas através da imersão por 4 horas em dH₂O e posterior secagem a 37°C. Foram incubadas em 1 mL de 0,1 M PBS a pH 7,5 e 37°C. Depois de 24 horas as amostras foram retiradas do meio, o excesso de líquido removido e a massa determinada. O grau de hidratação foi avaliado pelo aumento de peso utilizando a seguinte equação,

$$\text{Aumento de peso (\%)} = \frac{m_{\text{f}} - m_{\text{i}}}{m_{\text{i}}} \times 100$$

onde m_{i} é a massa no tempo inicial, que foi considerada a pesagem das amostras secas, antes da imersão, e m_{f} é a massa no tempo final, ou seja, depois de 24 horas de imersão em PBS.

4.8.4. Degradação das fibras

Amostras de 10 mg foram incubadas em 1 mL de 0,1 M PBS a pH 7,5 e 37°C, com renovação do meio a cada 7 dias. Depois de 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias as amostras foram retiradas do meio, o excesso de líquido removido e a massa medida. A degradação foi avaliada pela perda de peso utilizando a seguinte equação,

$$\text{Perda de peso (\%)} = \frac{m_{\text{i}} - m_{\text{f}}}{m_{\text{i}}} \times 100$$

onde m_{i} é a massa no tempo inicial, que foi considerada a pesagem das amostras ao tempo 0 horas (as fibras foram previamente hidratadas em dH₂O) de imersão em PBS nas condições acima descritas, e m_{f} é a massa no tempo final, ou seja, depois de cada período de incubação pré-estabelecido.

4.9. Atividade antimicrobiana das fibras

Foram preparadas amostras de 10 mg de todas as fibras produzidas, para testar o seu perfil antibacteriano contra *S. aureus*, tendo sido esterilizadas 15 minutos em etanol 70% e 3×15 minutos em 0,1 M PBS. Preparou-se uma suspensão de *S. aureus* de 1×10⁵ CFUs/mL em MHB, e as amostras foram imersas em 1 mL desta suspensão, e incubadas a 37°C e 120 rpm por 24 horas. Foram retiradas

alíquotas nos períodos definidos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas, e diluídas em PBS (10^1 para 10^6) para posterior deposição em TSA. Estas placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e de seguida o número de colónias crescidas contado. Testes foram realizadas em triplicado (com três medições por réplica), e os resultados foram tratados no software GraphPad Prism 8.4.2, sendo expressos sob a forma de redução logarítmica calculada em relação ao controlo (bactérias crescidas na placa de cultura sem contacto com fibras) e número absoluto de colónias sobreviventes.

4.10. Inibição da HNE pelas fibras

Amostras de 10 mg das fibras de PCL-AAPV, SA-PCL-AAPV e SA-NCMC-PCL-AAPV foram incubadas em PBS, a 37°C durante 24 horas. Em períodos de tempo pré-estabelecidos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas (em triplicado), alíquotas foram recolhidas. Estas foram tratadas seguindo o procedimento descrito na secção 4.6.

5. Referências bibliográficas

- (1) Xiaolian, S.; Yesen, L.; Ting, L.; Zijing, L.; Xianzhong, Z.; Xiaoyuan, C. Peptide-Based Imaging Agents for Cancer Detection. *J Autism Dev Disord* **2017**, *47*, 549–562. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823da96d>.Hydrogen.
- (2) Collins, J. M.; Leadbeater, N. E. Microwave Energy: A Versatile Tool for the Biosciences. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1141–1150. <https://doi.org/10.1039/b617084f>.
- (3) Glassman, P. M.; Muzykantov, V. R. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Drug Delivery Systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2019**, *370*, 570–580. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.257113>.
- (4) Vlieghe, P.; Lisowski, V.; Martinez, J.; Khrestchatisky, M. Synthetic Therapeutic Peptides : Science and Market. *Drug Discov. Today* **2010**, *15*, 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.10.009>.
- (5) Antosova, Z.; Mackova, M.; Kral, V.; Macek, T. Therapeutic Application of Peptides and Proteins: Parenteral Forever? *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.009>.
- (6) Witt, K. A.; Gillespie, T. J.; Huber, J. D.; Egleton, R. D.; Davis, T. P. Peptide Drug Modifications to Enhance Bioavailability and Blood-Brain Barrier Permeability. *Peptides* **2001**, *22*, 2329–2343. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00537-X](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00537-X).
- (7) Hooton, D.; Lentle, R.; Monro, J.; Wickham, M.; Simpson, R. The Secretion and Action of Brush Border Enzymes in the Mammalian Small Intestine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2015**, *168*, 59–118. https://doi.org/10.1007/112_2015_24.
- (8) Di, L. Strategic Approaches to Optimizing Peptide ADME Properties. *AAPS J.* **2015**, *17*, 134–143. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9687-3>.
- (9) 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. <https://doi.org/10.3762/bjoc.10.118>.
- (10) Diao, L.; Meibohm, B. Pharmacokinetics and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Correlations of Therapeutic Peptides. *Clin. Pharmacokinet.* **2013**, *52*, 855–868. <https://doi.org/10.1007/s40262-013-0079-0>.
- (11) Lien, S.; Lowman, H. B. Therapeutic Peptides. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 556–562.

- <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.10.005>.
- (12) Pangalos, M. N.; Schechter, L. E.; Hurko, O. Drug Development for CNS Disorders: Strategies for Balancing Risk and Reducing Attrition. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 521–532. <https://doi.org/10.1038/nrd2094>.
- (13) Al Shaer, D.; Al Musaimi, O.; Albericio, F.; de la Torre, B. G. 2019 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ph13030040>.
- (14) Kim, E. S.; Garnock-Jones, K. P. Afamelanotide: A Review in Erythropoietic Protoporphyrria. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2016**, *17*, 179–185. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0184-6>.
- (15) Lane, A. M.; McKay, J. T.; Bonkovsky, H. L. Advances in the Management of Erythropoietic Protoporphyrria – Role of Afamelanotide. *Appl. Clin. Genet.* **2016**, *9*, 179–189. <https://doi.org/10.2147/TACG.S122030>.
- (16) Challita-Eid, P. M.; Satpayev, D.; Yang, P.; An, Z.; Morrison, K.; Shostak, Y.; Raitano, A.; Nadell, R.; Liu, W.; Lortie, D. R.; Capo, L.; Verlinsky, A.; Leavitt, M.; Malik, F.; Avina, H.; Guevara, C. I.; Dinh, N.; Karki, S.; Anand, B. S.; Pereira, D. S.; Joseph, I. B. J.; Donate, F.; Morrison, K.; Stover, D. R. Enfortumab Vedotin Antibody-Drug Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent in Multiple Preclinical Cancer Models. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3003–3013. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1313>.
- (17) Barreca, M.; Spanò, V.; Montalbano, A.; Cueto, M.; Díaz Marrero, A. R.; Deniz, I.; Erdoğan, A.; Bilela, L. L.; Moulin, C.; Taffin-De-Givenchy, E.; Spriano, F.; Perale, G.; Mehiri, M.; Rotter, A.; Thomas, O. P.; Barraja, P.; Gaudêncio, S. P.; Bertoni, F. Marine Anticancer Agents: An Overview with a Particular Focus on Their Chemical Classes. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 1–28. <https://doi.org/10.3390/md18120619>.
- (18) Wang, G.; Li, X.; Wang, Z. APD3: The Antimicrobial Peptide Database as a Tool for Research and Education. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1087–1093. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1278>.
- (19) Reddy, K. V. R.; Yedery, R. D.; Aranha, C. Antimicrobial Peptides: Premises and Promises. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *24*, 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>.
- (20) Mangoni, M. L.; Mcdermott, A. M.; Zasloff, M. Antimicrobial Peptides and Wound Healing: Biological and Therapeutic Considerations. *Exp. Dermatol.* **2016**, *25*, 167–173. <https://doi.org/10.1111/exd.12929>.
- (21) Hilchie, A. L.; Wuerth, K.; Hancock, R. E. W. Immune Modulation by Multifaceted Cationic Host Defense (Antimicrobial) Peptides. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 761–768.

- <https://doi.org/10.1038/nchembio.1393>.
- (22) Cytryńska, M.; Zdybicka-Barabas, A. Defense Peptides: Recent Developments. *Biomol. Concepts* **2015**, *6*, 237–251. <https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0014>.
- (23) Felgueiras, H. P.; Amorim, M. T. P. Functionalization of Electrospun Polymeric Wound Dressings with Antimicrobial Peptides. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *156*, 133–148. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.001>.
- (24) Kobilka, B. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *Bone* **2012**, *23*, 1–7. <https://doi.org/10.1021/cb1001558.Describing>.
- (25) Cunha, N. B.; Cobacho, N. B.; Viana, J. F. C.; Lima, L. A.; Sampaio, K. B. O.; Dohms, S. S. M.; Ferreira, A. C. R.; Fuente-Núñez, C.; Costa, F. F.; Franco, O. L.; Dias, S. C. The next Generation of Antimicrobial Peptides (AMPs) as Molecular Therapeutic Tools for the Treatment of Diseases with Social and Economic Impacts. *Drug Discov. Today* **2017**, *22*, 234–248. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.10.017>.
- (26) Felgueiras, H. P.; Amorim, T. P. Antimicrobial Peptides in Infected Wounds. In *Research Trends of Microbiology*, MedDocs Publishers LLC, 2019; pp 1–7. <https://doi.org/10.33582/research-trends-of-microbiology/antimicrobial-peptides-in-infected-wounds>.
- (27) Mahlapuu, M.; Håkansson, J.; Ringstad, L.; Björn, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>.
- (28) Rajpaul, K. Biofilm in Wound Care. *Br. J. Community Nurs.* **2015**, *20*, 6–11. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2015.20.Sup3.S6>.
- (29) Riool, M.; de Breij, A.; Kwakman, P. H. S.; Schonkeren-Ravensbergen, E.; de Boer, L.; Cordfunke, R. A.; Malanovic, N.; Drijfhout, J. W.; Nibbering, P. H.; Zaat, S. A. J. Thrombocidin-1-Derived Antimicrobial Peptide TC19 Combats Superficial Multi-Drug Resistant Bacterial Wound Infections. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2020**, *1862*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183282>.
- (30) Sen, C. K. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. *Adv. Wound Care* **2021**, *10*, 281–292. <https://doi.org/10.1089/wound.2021.0026>.
- (31) Schreml, S.; Szeimies, R. M.; Prantl, L.; Landthaler, M.; Babilas, P. Wound Healing in the 21st Century. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2010**, *63*, 866–881. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.10.048>.
- (32) Furtado, K. A. X.; Infante, P.; Sobral, A.; Gaspar, P.; Eliseu, G.; Lopes, M. Prevalence of Acute and

- Chronic Wounds – with Emphasis on Pressure Ulcers – in Integrated Continuing Care Units in Alentejo, Portugal. *Int. Wound J.* **2020**, *17*, 1002–1010. <https://doi.org/10.1111/iwj.13364>.
- (33) Ryan, T. J.; Macdonald, J. M. Global impact of the chronic wound and lymphoedema. In *Best Practice Recommendations for Wound and Lymphoedema Management*, World Health Organization, 2020, pp 13-22.
- (34) Martins-Mendes, D.; Monteiro-Soares, M.; Boyko, E. J.; Ribeiro, M.; Barata, P.; Lima, J.; Soares, R. The Independent Contribution of Diabetic Foot Ulcer on Lower Extremity Amputation and Mortality Risk. *J. Diabetes Complications* **2014**, *28*, 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.04.011>.
- (35) Armstrong, D. G.; Swerdlow, M. A.; Armstrong, A. A.; Conte, M. S.; Padula, W. V.; Bus, S. A. Five Year Mortality and Direct Costs of Care for People with Diabetic Foot Complications Are Comparable to Cancer. *J. Foot Ankle Res.* **2020**, *13*, 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13047-020-00383-2>.
- (36) Rodrigues, M.; Kosaric, N.; Bonham, C. A.; Gurtner, G. C. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>.
- (37) Gomes, A.; Teixeira, C.; Ferraz, R.; Prudencio, C.; Gomes, P. Wound-Healing Peptides for Treatment of Chronic Diabetic Foot Ulcers and Other Infected Skin Injuries. *Molecules* **2017**, *22*, 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules22101743>.
- (38) Demori, I.; Rashed, Z. El; Corradino, V.; Catalano, A.; Rovegno, L.; Queirolo, L.; Salvidio, S.; Biggi, E.; Zanotti-Russo, M.; Canesi, L.; Catenazzi, A.; Grasselli, E. Peptides for Skin Protection and Healing in Amphibians. *Molecules* **2019**, *24*, 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules24020347>.
- (39) Bai, Q.; Han, K.; Dong, K.; Zheng, C.; Zhang, Y.; Long, Q.; Lu, T. Potential Applications of Nanomaterials and Technology for Diabetic Wound Healing. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 9717–9743. <https://doi.org/10.2147/IJN.S276001>.
- (40) Barros, S. C.; Louro, R. O.; Micaêlo, N. M.; Martins, J. A.; Marcos, J. C.; Cavaco-Paulo, A. NMR and Molecular Modelling Studies on Elastase Inhibitor-Peptides for Wound Management. *React. Funct. Polym.* **2013**, *73*, 1357–1365. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.02.011>.
- (41) Crocetti, L.; Quinn, M. T.; Schepetkin, I. A.; Giovannoni, M. P. A Patenting Perspective on Human Neutrophil Elastase (HNE) Inhibitors (2014-2018) and Their Therapeutic Applications. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2019**, *29*, 555–578. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1630379>.
- (42) Ferreira, A. V.; Perelshtein, I.; Perkas, N.; Gedanken, A.; Cunha, J.; Cavaco-Paulo, A. Detection of

- Human Neutrophil Elastase (HNE) on Wound Dressings as Marker of Inflammation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 1443–1454. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7889-6>.
- (43) Vincent Edwards, J.; Yager, D. R.; Kelman Cohen, I.; Diegelmann, R. F.; Montante, S.; Bertoniere, N.; Bopp, A. F. Modified Cotton Gauze Dressings That Selectively Absorb Neutrophil Elastase Activity in Solution. *Wound Repair Regen.* **2001**, *9*, 50–58. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2001.00050.x>.
- (44) Daunton, C.; Kothari, S.; Smith, L.; Steele, D. A History of Materials and Practices for Wound Management. *Wound Pract. Res. J. Aust. Wound Manag. Assoc.* **2012**, *20*, 174–176.
- (45) Vasconcelos, A.; Azoia, N. G.; Carvalho, A. C.; Gomes, A. C.; Güebitz, G.; Cavaco-Paulo, A. Tailoring Elastase Inhibition with Synthetic Peptides. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *666*, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.056>.
- (46) Santos, F. C.; Soares, A. M. S.; Gonçalves, M. S. T.; Costa, S. P. G. Phototriggered Release of Tetrapeptide AAPV from Coumarinyl and Pyrenyl Cages. *Amino Acids* **2017**, *49*, 1077–1088. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2405-6>.
- (47) McRae, B.; Nakajima, K.; Powers, J. C.; Travis, J. Studies on Reactivity of Human Leukocyte Elastase, Cathepsin G, and Porcine Pancreatic Elastase Toward Peptides Including Sequences Related to the Reactive Site of A1-Protease Inhibitor (A1-Antitrypsin). *Biochemistry* **1980**, *19*, 3973–3978. <https://doi.org/10.1021/bi00558a013>.
- (48) Powers, J. C.; Gupton, B. F.; Harley, A. D.; Nishino, N.; Whitley, R. J. Specificity of Porcine Pancreatic Elastase, Human Leukocyte Elastase and Cathepsin G Inhibition with Peptide Chloromethyl Ketones. *BBA - Enzymol.* **1977**, *485*, 156–166. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(77\)90203-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(77)90203-0).
- (49) Navia, M. A.; McKeever, B. M.; Springer, J. P.; Lin, T. Y.; Williams, H. R.; Fluder, E. M.; Dorn, C. P.; Hoogsteen, K. Structure of Human Neutrophil Elastase in Complex with a Peptide Chloromethyl Ketone Inhibitor at 1.84-Å Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 7–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.7>.
- (50) Namjoshi, S.; Toth, I.; Blanchfield, J. T.; Trotter, N.; Mancera, R. L.; Benson, H. A. E. Enhanced Transdermal Peptide Delivery and Stability by Lipid Conjugation: Epidermal Permeation, Stereoselectivity and Mechanistic Insights. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 3304–3312. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1420-5>.
- (51) Toth, I.; Christodoulou, M.; Bankowsky, K.; Flinn, N.; Gibbons, W. A.; Godeau, G.; Moczar, E.; Hornebeck, W. Design of Potent Lipophilic-Peptide Inhibitors of Human Neutrophil Elastase: In

- Vitro and in Vivo Studies. *Int. J. Pharm.* **1995**, *125*, 117–122. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)00127-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)00127-5).
- (52) Korkmaz, B.; Horwitz, M. S.; Jenne, D. E.; Gauthier, F. Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. **2010**, *62*, 726–759. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002733.726>.
- (53) Edwards, P. D.; Bernstein, P. R. Synthetic Inhibitors of Elastase. *Med. Res. Rev.* **1994**, *14*, 127–194. <https://doi.org/10.1002/med.2610140202>.
- (54) Ledwoń, P.; Papini, A. M.; Rovero, P.; Latajka, R. Peptides and Peptidomimetics as Inhibitors of Enzymes Involved in Fibrillar Collagen Degradation. *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, 1–28. <https://doi.org/10.3390/ma14123217>.
- (55) Bazaz, M. R.; Mashreghi, M.; Shahri, N. M.; Mashreghi, M.; Asoodeh, A.; Rassouli, M. B. Evaluation of Antimicrobial and Healing Activities of Frog Skin on Guinea Pigs Wounds. *Jundishapur J. Microbiol.* **2015**, *8*, 25–30. <https://doi.org/10.5812/jjm.21218v2>.
- (56) Liu, H.; Duan, Z.; Tang, J.; Lv, Q.; Rong, M.; Lai, R. A Short Peptide from Frog Skin Accelerates Diabetic Wound Healing. *FEBS J.* **2014**, *281*, 4633–4643. <https://doi.org/10.1111/febs.12968>.
- (57) Thapa, R. K.; Diep, D. B.; Tønnesen, H. H. Topical Antimicrobial Peptide Formulations for Wound Healing: Current Developments and Future Prospects. *Acta Biomater.* **2020**, *103*, 52–67. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.12.025>.
- (58) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
- (59) Kimmerlin, T.; Seebach, D. “100 Years of Peptide Synthesis”: Ligation Methods for Peptide and Protein Synthesis with Applications to β -Peptide Assemblies. *J. Pept. Res.* **2005**, *65*, 229–260. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2005.00214.x>.
- (60) Cherkupally, P.; Acosta, G. A.; Ramesh, S.; De La Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; Albericio, F. Solid-Phase Peptide Synthesis (SPPS), C-Terminal vs. Side-Chain Anchoring: A Reality or a Myth. *Amino Acids* **2014**, *46*, 1827–1838. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1746-7>.
- (61) Varnava, K. G.; Sarojini, V. Making Solid-Phase Peptide Synthesis Greener: A Review of the Literature. *Chem. - An Asian J.* **2019**, *14*, 1088–1097. <https://doi.org/10.1002/asia.201801807>.
- (62) Chandrudu, S.; Simerska, P.; Toth, I. Chemical Methods for Peptide and Protein Production. *Molecules* **2013**, *18*, 4373–4388. <https://doi.org/10.3390/molecules18044373>.
- (63) Pires, D. A. T.; Bemquerer, M. P.; Nascimento, C. J. Some Mechanistic Aspects on Fmoc Solid

- Phase Peptide Synthesis. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2014**, *20*, 53–69. <https://doi.org/10.1007/s10989-013-9366-8>.
- (64) Bray, B. L. Large-Scale Manufacture of Peptide Therapeutics by Chemical Synthesis. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 587–593. <https://doi.org/10.1038/nrd1133>.
- (65) Hansen, P. R.; Oddo, A. Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. In *Methods in Molecular Biology*, Humana Press: New York, 2015; Vol. 1348, pp 33–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_5.
- (66) Nakaie, C. R.; Oliveira, E.; Vicente, E. F.; Jubilit, G. N.; Souza, S. E. G.; Marchetto, R.; Cilli, E. M. Solid-Phase Peptide Synthesis in Highly Loaded Conditions. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2011.01.001>.
- (67) El-Faham, A.; Albericio, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557–6602. <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.
- (68) 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. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2516-0>.
- (69) Al-Warhi, T. I.; Al-Hazimi, H. M. A.; El-Faham, A. Recent Development in Peptide Coupling Reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97–116. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.12.006>.
- (70) Jad, Y. E.; de la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma-T, Expanding the Arsenal of Coupling Reagents. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 3523–3525. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.06.109>.
- (71) Stawikowski, M.; Fields, G. B. Introduction to Peptide Synthesis. In *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, 2012; pp 1–13. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1801s69>.
- (72) Conda-Sheridan, M.; Krishnaiah, M. Protecting Groups in Peptide Synthesis. In *Peptide Synthesis Methods and Protocols*, Humana Press: New York, 2020; pp 111-128.
- (73) Höck, S.; Marti, R.; Riedl, R.; Simeunovic, M. Thermal Cleavage of the Fmoc Protection Group. *Chimia (Aarau).* **2010**, *64*, 200–202. <https://doi.org/10.2533/chimia.2010.200>.
- (74) Collins, J. M.; Sandeep, S. K.; Vanier, G. S. Microwave Technology for Solid Phase Peptide Synthesis. *Oligos Pept.* **2012**, *30*, 26–29.
- (75) Kappe, C. O.; Pieber, B.; Dallinger, D. Microwave Effects in Organic Synthesis: Myth or Reality? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1088–1094. <https://doi.org/10.1002/anie.201204103>.
- (76) Kitchen, H. J.; Vallance, S. R.; Kennedy, J. L.; Tapia-Ruiz, N.; Carassiti, L.; Harrison, A.; Whittaker,

- A. G.; Drysdale, T. D.; Kingman, S. W.; Gregory, D. H. Modern Microwave Methods in Solid-State Inorganic Materials Chemistry: From Fundamentals to Manufacturing. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1170–1206. <https://doi.org/10.1021/cr4002353>.
- (77) CEM Corporation - Discover Microwave Synthesizer <https://cem.com/en/discover> (accessed Mar 2, 2021).
- (78) 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. <https://doi.org/10.1039/c1cs15214a>.
- (79) Coantic, S.; Subra, G.; Martinez, J. Microwave-Assisted Solid Phase Peptide Synthesis on High Loaded Resins. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 143–147. <https://doi.org/10.1007/s10989-008-9123-6>.
- (80) Zahedi, P.; Rezaeian, I.; Ranaei-Siadat, S. O.; Jafari, S. H.; Supaphol, P. A Review on Wound Dressings with an Emphasis on Electrospun Nanofibrous Polymeric Bandages. *Polym. Adv. Technol.* **2010**, *21*, 77–95. <https://doi.org/10.1002/pat.1625>.
- (81) Sweeney, I. R.; Miraftab, M.; Collyer, G. A Critical Review of Modern and Emerging Absorbent Dressings Used to Treat Exuding Wounds. *Int. Wound J.* **2012**, *9*, 601–612. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2011.00923.x>.
- (82) Felgueiras, H. P.; Tavares, T. D.; Amorim, M. T. P. Biodegradable, Spun Nanocomposite Polymeric Fibrous Dressings Loaded with Bioactive Biomolecules for an Effective Wound Healing: A Review. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2019**, *634*, 1–7. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/634/1/012033>.
- (83) Ambekar, R. S.; Kandasubramanian, B. Advancements in Nanofibers for Wound Dressing: A Review. *Eur. Polym. J.* **2019**, *117*, 304–336. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.020>.
- (84) Teixeira, M. A.; Paiva, M. C.; Amorim, M. T. P.; Felgueiras, H. P. Electrospun Nanocomposites Containing Cellulose and Its Derivatives Modified with Specialized Biomolecules for an Enhanced Wound Healing. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1–64. <https://doi.org/10.3390/nano10030557>.
- (85) Miranda, C. S.; Ribeiro, A. R. M.; Homem, N. C.; Felgueiras, H. P. Spun Biotextiles in Tissue Engineering and Biomolecules Delivery Systems. *Antibiotics* **2020**, *9*, 1–41. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040174>.
- (86) Puppi, D.; Chiellini, F.; Chemistry, I. Wet-Spinning of Biomedical Polymers: From Single-Fibre Production to Additive Manufacturing of Three-Dimensional Scaffolds. *Polym. Int.* **2017**, *66*, 1690–1696. <https://doi.org/10.1002/pi.5332>.

- (87) Mirabedini, A.; Foroughi, J.; Wallace, G. G. Developments in Conducting Polymer Fibres: From Established Spinning Methods toward Advanced Applications. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 44687–44716. <https://doi.org/10.1039/C6RA05626A>.
- (88) Mirabedini, A. Fabrication of Coaxial Wet-Spun Biofibres Containing Graphene Core. In *Developing Novel Spinning Methods to Fabricate Continuous Multifunctional Fibres for Bioapplications*, 2018; pp 79–106. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95378-6_4.
- (89) Felgueiras, H. P.; Homem, N. C.; Teixeira, M. A.; Ribeiro, A. R. M.; Teixeira, M. O.; Antunes, J. C.; Amorim, M. T. P. Biodegradable Wet-Spun Fibers Modified with Antimicrobial Agents for Potential Applications in Biomedical Engineering. In *Journal of Physics: Conference Series*, 2021; Vol. 1765, pp 1–6. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1765/1/012007>.
- (90) Abdullah, M. F.; Nuge, T.; Andriyana, A.; Ang, B. C.; Muhamad, F. Core-Shell Fibers: Design, Roles, and Controllable Release Strategies in Tissue Engineering and Drug Delivery. *Polymers (Base)*. **2019**, *11*, 1–45. <https://doi.org/10.3390/polym11122008>.
- (91) Fahimirad, S.; Ajalloueiian, F. Naturally-Derived Electrospun Wound Dressings for Target Delivery of Bio-Active Agents. *Int. J. Pharm.* **2019**, *566*, 307–328. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.053>.
- (92) Mirabedini, A.; Lu, Z.; Mostafavian, S.; Foroughi, J. Triaxial Carbon Nanotube/Conducting Polymer Wet-Spun Fibers Supercapacitors for Wearable Electronics. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano11010003>.
- (93) Balaji, A.; Vellayappan, M. V.; John, A. A.; Subramanian, A. P.; Jaganathan, S. K.; Supriyanto, E.; Razak, S. I. A. An Insight on Electrospun-Nanofibers-Inspired Modern Drug Delivery System in the Treatment of Deadly Cancers. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 57984–58004. <https://doi.org/10.1039/C5RA07595E>.
- (94) Liu, M.; Duan, X. P.; Li, Y. M.; Yang, D. P.; Long, Y. Z. Electrospun Nanofibers for Wound Healing. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *76*, 1413–1423. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.034>.
- (95) Ibrahim, I.; Sadiku, E.; Jamiru, T.; Hamam, A.; Kupolati, W. Applications of Polymers in the Biomedical Field. *Curr. Trends Biomed. Eng. Biosci.* **2017**, *4*, 4–7. <https://doi.org/10.19080/ctbeb.2017.04.555650>.
- (96) Asghari, F.; Samiei, M.; Adibkia, K.; Akbarzadeh, A.; Davaran, S. Biodegradable and Biocompatible Polymers for Tissue Engineering Application: A Review. *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.* **2017**, *45*, 185–192. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1146731>.
- (97) Rostamabadi, H.; Assadpour, E.; Tabarestani, H. S.; Falsafi, S. R.; Jafari, S. M. Electrospinning

- Approach for Nanoencapsulation of Bioactive Compounds; Recent Advances and Innovations. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *100*, 190–209. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.012>.
- (98) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- (99) Wiegand, C.; Heinze, T.; Hipler, U. C. Comparative in Vitro Study on Cytotoxicity, Antimicrobial Activity, and Binding Capacity for Pathophysiological Factors in Chronic Wounds of Alginate and Silver-Containing Alginate. *Wound Repair Regen.* **2009**, *17*, 511–521. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00503.x>.
- (100) Homem, N. C.; Tavares, T. D.; Miranda, C. S.; Antunes, J. C.; Amorim, M. T. P.; Felgueiras, H. P. Functionalization of Crosslinked Sodium Alginate/Gelatin Wet-Spun Porous Fibers with Nisin z for the Inhibition of Staphylococcus Aureus-Induced Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms22041930>.
- (101) Andryukov, B. G.; Besednova, N. N.; Kuznetsova, T. A.; Zaporozhets, T. S.; Ermakova, S. P.; Zvyagintseva, T. N.; Chingizova, E. A.; Gazha, A. K.; Smolina, T. P. Sulfated Polysaccharides from Marine Algae as a Basis of Modern Biotechnologies for Creating Wound Dressings: Current Achievements and Future Prospects. *Biomedicines* **2020**, *8*, 1–24. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090301>.
- (102) Aderibigbe, B. A.; Buyana, B. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 1–19. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020042>.
- (103) Wang, Q. Q.; Liu, Y.; Zhang, C. J.; Zhang, C.; Zhu, P. Alginate/Gelatin Blended Hydrogel Fibers Cross-Linked by Ca²⁺ and Oxidized Starch: Preparation and Properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *99*, 1469–1476. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.02.091>.
- (104) Majima, T.; Funakosi, T.; Iwasaki, N.; Yamane, S. T.; Harada, K.; Nonaka, S.; Minami, A.; Nishimura, S. I. Alginate and Chitosan Polyion Complex Hybrid Fibers for Scaffolds in Ligament and Tendon Tissue Engineering. *J. Orthop. Sci.* **2005**, *10*, 302–307. <https://doi.org/10.1007/s00776-005-0891-y>.
- (105) Wang, C. Y.; Sartika, D.; Wang, D. H.; Hong, P. Da; Cherng, J. H.; Chang, S. J.; Liu, C. C.; Wang, Y. W.; Wu, S. T. Wet-Spinning-Based Molding Process of Gelatin for Tissue Regeneration. *J. Vis. Exp.* **2019**, No. 145, 1–7. <https://doi.org/10.3791/58932>.
- (106) Gaspar-Pintilieșcu, A.; Stanciuc, A. M.; Craciunescu, O. Natural Composite Dressings Based on Collagen, Gelatin and Plant Bioactive Compounds for Wound Healing: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *138*, 854–865. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.155>.

- (107) Zhao, X.; Lang, Q.; Yildirimer, L.; Lin, Z. Y.; Cui, W.; Annabi, N.; Ng, K. W.; Dokmeci, M. R.; Ghaemmaghami, A. M.; Khademhosseini, A. Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 108–118. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500005>.
- (108) Xia, W.; Liu, W.; Cui, L.; Liu, Y.; Zhong, W.; Liu, D.; Wu, J.; Chua, K.; Cao, Y. Tissue Engineering of Cartilage with the Use of Chitosan-Gelatin Complex Scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **2004**, *71*, 373–380. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30087>.
- (109) Mousavi, S.; Khoshfetrat, A. B.; Khatami, N.; Ahmadian, M.; Rahbarghazi, R. Comparative Study of Collagen and Gelatin in Chitosan-Based Hydrogels for Effective Wound Dressing: Physical Properties and Fibroblastic Cell Behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *518*, 625–631. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.102>.
- (110) Campiglio, C. E.; Negrini, N. C.; Farè, S.; Draghi, L. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials (Basel)*. **2019**, *12*, 1–23. <https://doi.org/10.3390/ma12152476>.
- (111) Li, J.; Cai, C.; Li, J.; Li, J.; Li, J.; Sun, T.; Wang, L.; Wu, H.; Yu, G. Chitosan-Based Nanomaterials for Drug Delivery. *Molecules* **2018**, *23*, 1–26. <https://doi.org/10.3390/molecules23102661>.
- (112) Patrúlea, V.; Ostafe, V.; Borchard, G.; Jordan, O. Chitosan as a Starting Material for Wound Healing Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>.
- (113) Li, J.; Liu, D.; Hu, C.; Sun, F.; Gustave, W.; Tian, H.; Yang, S. Flexible Fibers Wet-Spun from Formic Acid Modified Chitosan. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *136*, 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.022>.
- (114) Abreu, F. R.; Campana-Filho, S. P. Preparation and Characterization of Carboxymethylchitosan. *Polímeros* **2005**, *15*, 79–83. <https://doi.org/10.1590/s0104-14282005000200004>.
- (115) Santos Miranda, M. E.; Marcolla, C.; Rodriguez, C. A.; Wilhelm, H. M.; Sierakowski, M. R.; Belle Bresolin, T. M.; Alves de Freitas, R. I. The Role of N-Carboxymethylation of Chitosan in the Thermal Stability and Dynamic. *Polym Int* **2006**, *55*, 961–969. <https://doi.org/10.1002/pi>.
- (116) Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Nair, S. V.; Tokura, S.; Tamura, H.; Selvamurugan, N. Novel Carboxymethyl Derivatives of Chitin and Chitosan Materials and Their Biomedical Applications. *Prog. Mater. Sci.* **2010**, *55*, 675–709. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2010.03.001>.
- (117) Fonseca-Santos, B.; Chorilli, M. An Overview of Carboxymethyl Derivatives of Chitosan: Their Use as Biomaterials and Drug Delivery Systems. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *77*, 1349–1362. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.198>.

- (118) Jayakumar, R.; Reis, R. L.; Mano, J. F. Synthesis of N-Carboxymethyl Chitosan Beads for Controlled Drug Delivery Applications. *Mater. Sci. Forum* **2006**, *514–516*, 1015–1019. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.514-516.1015>.
- (119) Niaounakis, M. Definitions of Terms and Types of Biopolymers. In *Biopolymers: Applications and Trends*; Elsevier, 2015; pp 1–90. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35399-1.00001-6>.
- (120) Azimi, B.; Nourpanah, P.; Rabiee, M.; Arbab, S. Poly (ϵ -Caprolactone) Fiber: An Overview. *J. Eng. Fiber. Fabr.* **2014**, *9*, 74–90. <https://doi.org/10.1177/155892501400900309>.
- (121) Sharifi, F.; Kurteshi, D.; Hashemi, N. Designing Highly Structured Polycaprolactone Fibers Using Microfluidics. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, *61*, 530–540. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.04.005>.
- (122) Nouri, M.; Abbasi, M.; Seraj, M.; Mehraz, L. Fabrication and Characterization of Drug-Loaded Wet Spun Polycaprolactone Fibers. *J. Text. Inst.* **2021**, *112*, 462–469. <https://doi.org/10.1080/00405000.2020.1764773>.
- (123) Dikici, B. A.; Dikici, S.; Reilly, G. C.; MacNeil, S.; Claeysens, F. A Novel Bilayer Polycaprolactone Membrane for Guided Bone Regeneration: Combining Electrospinning and Emulsion Templating. *Materials (Basel)*. **2019**, *12*, 1–24. <https://doi.org/10.3390/ma12162643>.
- (124) Jiang, L.; Zhang, J. Biodegradable Polymers and Polymer Blends. In *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications*; Ebnesajjad, S., Ed.; Elsevier Inc, 2013; pp 109–128. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2834-3.00006-9>.
- (125) Conte, A. A.; Sun, K.; Hu, X.; Beachley, V. Z. Effects of Fiber Density and Strain Rate on the Mechanical Properties of Electrospun Polycaprolactone Nanofiber Mats. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00610>.
- (126) Ieronymaki, M.; Androutsou, M. E. Ien.; Pantelia, A.; Friligou, I.; Crisp, M.; High, K.; Penkman, K.; Gatos, D.; Tselios, T. Use of the 2-Chlorotriyl Chloride Resin for Microwave-Assisted Solid Phase Peptide Synthesis. *Biopolymers* **2015**, *104*, 506–514. <https://doi.org/10.1002/bip.22710>.
- (127) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.
- (128) Ross, S. A.; Lowe, G. Downfield Displacement of the NMR Signal of Water in Deuterated Dimethylsulfoxide by the Addition of Deuterated Trifluoroacetic Acid. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3225–3227. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)00355-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)00355-5).

- (129) Zhang, G.; Annan, R. S.; Carr, S. A.; Neubert, T. A. Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry. In *Current Protocols in Protein Science*; John Wiley & Sons, Inc, 2010; pp 1–30. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1601s62>.
- (130) Pan, H. A Non-Covalent Dimer Formed in Electrospray Ionisation Mass Spectrometry Behaving as a Precursor for Fragmentations. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, *22*, 3555–3560. <https://doi.org/10.1002/rcm.3767>.
- (131) Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455–2504. <https://doi.org/10.1021/cr800323s>.
- (132) Al Musaimi, O.; Basso, A.; De La Torre, B. G.; Albericio, F. Calculating Resin Functionalization in Solid-Phase Peptide Synthesis Using a Standardized Method Based on Fmoc Determination. *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21*, 717–721. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.9b00154>.
- (133) Cleland, W. W. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* **1964**, *3*, 480–482. <https://doi.org/10.1021/bi00892a002>.
- (134) Battersby, J. E.; Hancock, W. S. A New Micro-Test for the Detection of Incomplete Coupling Reactions in Solid-Phase Peptide Sulphonic Acid. *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 260–264.
- (135) De La Torre, B. G.; Kumar, A.; Alhassan, M.; Bucher, C.; Albericio, F.; Lopez, J. Successful Development of a Method for the Incorporation of Fmoc-Arg(Pbf)-OH in Solid-Phase Peptide Synthesis Using: N -Butylpyrrolidinone (NBP) as Solvent. *Green Chem.* **2020**, *22*, 3162–3169. <https://doi.org/10.1039/c9gc03784e>.
- (136) Rehder, D. S.; Borges, C. R. Cysteine Sulfenic Acid as an Intermediate in Disulfide Bond Formation and Nonenzymatic Protein Folding. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7748–7755. <https://doi.org/10.1021/bi1008694>.
- (137) Li, J.; Zhuang, S. Antibacterial Activity of Chitosan and Its Derivatives and Their Interaction Mechanism with Bacteria: Current State and Perspectives. *Eur. Polym. J.* **2020**, *138*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109984>.
- (138) Serra, R.; Grande, R.; Butrico, L.; Rossi, A.; Settimio, U. F.; Caroleo, B.; Amato, B.; Gallelli, L.; De Franciscis, S. Chronic Wound Infections: The Role of *Pseudomonas Aeruginosa* and *Staphylococcus Aureus*. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, *13*, 605–613. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1023291>.
- (139) Felgueiras, H. P.; Homem, N. C.; Teixeira, M. A.; Ribeiro, A. R. M.; Antunes, J. C.; Amorim, M. T. P. Physical, Thermal, and Antibacterial Effects of Active Essential Oils with Potential for Biomedical Applications Loaded onto Cellulose Acetate/Polycaprolactone Wet-Spun Microfibers. *Biomolecules*

- 2020, *10*, 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom10081129>.
- (140) Antunes, J. C.; Tavares, T. D.; Teixeira, M. A.; Teixeira, M. O.; Homem, N. C.; Amorim, M. T. P.; Felgueiras, H. P. Eugenol-Containing Essential Oils Loaded onto Chitosan/Polyvinyl Alcohol Blended Films and Their Ability to Eradicate *Staphylococcus Aureus* or *Pseudomonas Aeruginosa* from Infected Microenvironments. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1–22. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020195>.
- (141) Alasbahi, R.; Melzig, M. The In Vitro Inhibition of Human Neutrophil Elastase Activity by Some Yemeni Medicinal Plants. *Sci. Pharm.* **2008**, *76*, 471–483. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0804-25>.
- (142) Song, Q.; Zhang, Z.; Gao, J.; Ding, C. Synthesis and Property Studies of N-Carboxymethyl Chitosan. *J. Appl. Polym. Sci.* **2011**, *119*, 3282–3285. <https://doi.org/10.1002/app.32925>.
- (143) Yang, G.; Xiao, Z.; Long, H.; Ma, K.; Zhang, J.; Ren, X.; Zhang, J. Assessment of the Characteristics and Biocompatibility of Gelatin Sponge Scaffolds Prepared by Various Crosslinking Methods. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1616–1629. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20006-y>.
- (144) De Carvalho, R. A.; Grosso, C. R. F. Properties of Chemically Modified Gelatin Films. *Brazilian J. Chem. Eng.* **2006**, *23*, 45–53. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322006000100006>.
- (145) Tavakol, M.; Vasheghani-Farahani, E.; Hashemi-Najafabadi, S. The Effect of Polymer and CaCl₂ Concentrations on the Sulfasalazine Release from Alginate-N,O-Carboxymethyl Chitosan Beads. *Prog. Biomater.* **2013**, *2*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/2194-0517-2-10>.
- (146) Shi, X.; Du, Y.; Yang, J.; Zhang, B.; Sun, L. Effect of Degree of Substitution and Molecular Weight of Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles on Doxorubicin Delivery. *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, *100*, 4689–4696. <https://doi.org/10.1002/app.23040>.
- (147) Liakos, I. L.; Mondini, A.; Del Dottore, E.; Filippeschi, C.; Pignatelli, F.; Mazzolai, B. 3D Printed Composites from Heat Extruded Polycaprolactone/Sodium Alginate Filaments and Their Heavy Metal Adsorption Properties. *Mater. Chem. Front.* **2020**, *4*, 2472–2483. <https://doi.org/10.1039/d0qm00159g>.
- (148) Huang, A.; Jiang, Y.; Napiwocki, B.; Mi, H.; Peng, X.; Turng, L. S. Fabrication of Poly(ϵ -Caprolactone) Tissue Engineering Scaffolds with Fibrillated and Interconnected Pores Utilizing Microcellular Injection Molding and Polymer Leaching. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 43432–43444. <https://doi.org/10.1039/c7ra06987a>.
- (149) Qin, Y. The Gel Swelling Properties of Alginate Fibers and Their Applications in Wound Management. *Polym. Adv. Technol.* **2008**, *19*, 6–14. <https://doi.org/10.1002/pat.960>.

- (150) Zahedi, P.; Rezaeian, I.; Jafari, S. H.; Karami, Z. Preparation and Release Properties of Electrospun Poly(Vinyl Alcohol)/Poly(É-Caprolactone) Hybrid Nanofibers: Optimization of Process Parameters via D-Optimal Design Method. *Macromol. Res.* **2013**, *21*, 649–659. <https://doi.org/10.1007/s13233-013-1064-z>.
- (151) Gil-Castell, O.; Badia, J. D.; Bou, J.; Ribes-Greus, A. Performance of Polyester-Based Electrospun Scaffolds under in Vitro Hydrolytic Conditions: From Short-Term to Long-Term Applications. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1–19. <https://doi.org/10.3390/nano9050786>.
- (152) Mouro, C.; Gomes, A. P.; Ahonen, M.; Figueiro, R.; Gouveia, I. C. Chelidoniummajus L. Incorporated Emulsion Electrospun PCL/PVA_PEC Nanofibrous Meshes for Antibacterial Wound Dressing Applications. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1–17. <https://doi.org/10.3390/nano11071785>.
- (153) Xie, Y.; Yang, L. Calcium and Magnesium Ions Are Membrane-Active against Stationary-Phase Staphylococcus Aureus with High Specificity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20628–20634. <https://doi.org/10.1038/srep20628>.
- (154) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of Antibacterial Agents by Broth Dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9*, ix–xv. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00790.x>.
- (155) Löser, B.; Kruse, S. O.; Melzig, M. F.; Nahrstedt, A. Inhibition of Neutrophil Elastase Activity by Cinnamic Acid Derivatives from Cimicifuga Racemosa. *Planta Med.* **2000**, *66*, 751–753. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9563>.
- (156) 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*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/app.48626>.
- (157) Benedek, B.; Kopp, B.; Melzig, M. F. Achillea Millefolium L. s.l. - Is the Anti-Inflammatory Activity Mediated by Protease Inhibition? *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.014>.