

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Química Tecnológica

Instituto de Química

**ESTUDO DE MATRIZES SILOXANO-POLIÉTER COMO
SISTEMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DO PEPTÍDEO Hs05**

Gabriel Henrique Mariano da Silva

Orientador: **Prof. Juliano Chaker**

Co-orientador: **Prof. Guilherme Dotto Brand**

Brasília –DF

2019

Sumário

1. Introdução	1
2. Resistência microbiana.....	7
3. Sistemas de liberação sustentada	9
4. Objetivos	18
5. Metodologia	19
6. Resultados	23
7. Conclusão	36
8. Bibliografia	37

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo de um material nanocompósito visando aplicações como bandagem para pele humana capaz de promover a assepsia de feridas cutâneas através da liberação sustentada de peptídeos intragênicos antimicrobianos (IAPs). O material nanocompósito é um filme polimérico híbrido orgânico-inorgânico constituído de copolímero triblock PPO-PEO-PPO ligado covalentemente a um grupo silanol reticulável. Este material sofre reações de hidrólise e condensação que promovem a formação de ligações cruzadas entre suas cadeias, levando a gelificação em uma estrutura rígida capaz de imobilizar ativos de interesse em seus interstícios e de promover sua liberação sustentada com o tempo.

A molécula de escolha do estudo foi o peptídeo antimicrobiano HS05 – sintetizado e purificado previamente a este estudo por de Sá em sua dissertação de mestrado.

O procedimento de formulação dos géis foi realizado em placa de 48 poços a partir do filme híbrido, uma solução de concentração conhecida do peptídeo e quantidades diferentes de HCl. Filmes translúcidos circulares foram obtidos apresentando propriedades bioadesivas.

As propriedades térmicas das amostras foram caracterizadas por análise termogravimétrica. A análise molecular foi realizada por espectroscopia de absorção no infravermelho, bandas em 1645, referente a ligação C=O e 842 cm^{-1} , referente ao estiramento Si-O-Si foram atribuídos a estrutura do híbrido e da matriz reticulada formada, respectivamente. A identificação do peptídeo na matriz foi realizada via MALDI Imaging. Os ensaios de liberação do peptídeo foram monitorados pela absorção dos comprimentos de onda 215 e 225 em função do tempo. Foram encontradas diferenças nos mecanismos de liberação do peptídeo para diferentes processos de síntese da matriz nanocompósita. Foi verificado que a quantidade de catalizador ácido utilizado na síntese da matriz bem como o tempo de envelhecimento das amostras altera o mecanismo de liberação do peptídeo em solução.

1. Introdução

1.1. Peptídeos antimicrobianos

A necessidade de distinção entre alimentos, outros organismos e si próprio, atrelado a pressões seletivas ao longo de eras, gerou mecanismos de percepção altamente específicos¹. Isso possibilitou a formação de um conjunto de órgãos, tecidos e moléculas especializados no reconhecimento e defesa contra patógenos, o sistema imune. Na primeira linha de defesa contra organismos estranhos estão as moléculas e células do sistema imune inato, sendo os peptídeos antimicrobianos (AMPs) moléculas chave na contenção destes invasores e na prevenção de infecções. Estes fragmentos protéicos conservados entre os seres vivos são sintetizados mediante um estímulo extracelular de partículas patogênicas, como peptoglicanos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos. O estímulo de receptores do tipo Toll, expressos em membranas de células do sistema imune², desencadeia uma cascata sinalizadora que ativa o fator de transcrição NfκB, este por sua vez adentra o núcleo da célula na qual se liga a genes pró-inflamatórios, aumentando a produção de proteínas pró-inflamatórias e peptídeos antimicrobianos³.

Suas características físico-químicas gerais como carga líquida, hidrofobicidade média e estrutura secundária permite uma distinção entre os AMPs e outras moléculas do sistema imune, além de determinar seu mecanismo de ação. Notavelmente, em eucariotos ditos superiores, estes peptídeos também podem desempenhar características imunomodulatórias, dando origem a uma nova denominação, os *host defense peptides (HDP)*, como é o caso das catelicidinas, nos humanos representada pelo peptídeo LL-37⁴.

Em linhas gerais os AMPs possuem um pequeno tamanho, entre 10 e 60 resíduos de aminoácidos, em sua maioria básicos, ou seja, em pH fisiológicos são protonados, adquirindo uma carga positiva, além de conter resíduos hidrofóbicos que se alinham em três dimensões dependendo do meio⁵. Esta característica de compartimentalização de

hidrofobicidade conferem a estrutura características anfífilas que estão diretamente relacionadas com seu mecanismo de ação.

1.1.1. Mecanismo de ação

A interação eletroestática entre a estrutura catiônica dos AMPs e membranas plasmáticas negativamente carregadas permite uma primeira aproximação entre estas moléculas e agentes patogênicos, como bactérias e fungos que possuem membranas ricas em lipídios aniônicos⁶. Uma vez próxima ao agente infeccioso suas características anfífilas conferem ao AMP a possibilidade de penetrar estas membranas. A região hidrofílica interage com a interface da membrana enquanto a região hidrofóbica interage com a porção acil interna. A característica catiônica também confere ao AMP ação seletiva contra organismos patogênicos em relação as próprias células do hospedeiro, pois as células mamíferas são em geral compostas por fosforilcolina, a qual é zwitteriônica, além da esfingomiélin, a qual também apresenta carga líquida neutra em pH fisiológico.

Os AMPs podem adquirir diversas estruturas secundárias. A família das cecropinas, que ocorre naturalmente em insetos, é formada por duas α -hélice conectadas por um laço⁵, já as proteínas encontradas em suínos são compostas por folhas- β ricas em cisteínas, responsáveis pela estabilização da estrutura⁷. Algumas estruturas apresentam conformação não definida, porém, uma vez presente em um meio que mimetize membranas biológicas estes AMPs podem adquirir uma regularidade ao se estruturarem na membrana, como é o caso das catelicidinas⁴.

Essas moléculas membrano-ativas atuam através da desestabilização do equilíbrio osmótico do patógeno provocando por fim lise celular por meio de alguns mecanismos de formação de poros como demonstrado na figura 1. Segundo *Oren & Shai*, a lise celular se inicia com a inserção de no mínimo dois monômeros na estrutura da membrana para formação do poro⁸, estando associada a um dos modelos de permeação:

1.1.1.1. *Barrel-stave pore*^{8,9}

Neste modelo há uma interação lateral entre os peptídeos, formando uma estrutura que lembra o de uma proteína transmembrana.

1.1.1.2. *Poros toroidal*⁹

Diferentemente do modelo anterior, na formação toroidal não há interação peptídeo-peptídeo presentes na membrana. O que ocorre é uma cooperação entre os peptídeos ocasionando em uma alteração da curvatura local da membrana.

1.1.1.3. *Modelo Carpet-like*^{8,9}

Descreve a situação na qual os peptídeos inicialmente se ligam a superfície da membrana cobrindo-a. Neste caso a membrana é permeada somente acima de um limite de concentração de peptídeos em sua superfície. Alternativamente aos modelos anteriores, o peptídeo não é inserido no núcleo hidrofóbico e sim liga-se aos grupos polares de fosfolípidios.

1.1.1.4. *Modelo Detergente*^{9,5}

Modelo utilizado para descrever o mecanismo de ação mediante uma alta concentração de AMP. Neste caso os AMPs se inserem na membrana formando clusters não estruturados. Embora utilizado por alguns autores para enfatizar o efeito da concentração nas células¹⁰ este modelo ainda está em estudo uma vez que lhe falta uma base molecular ou físico-química para promover a permeação.

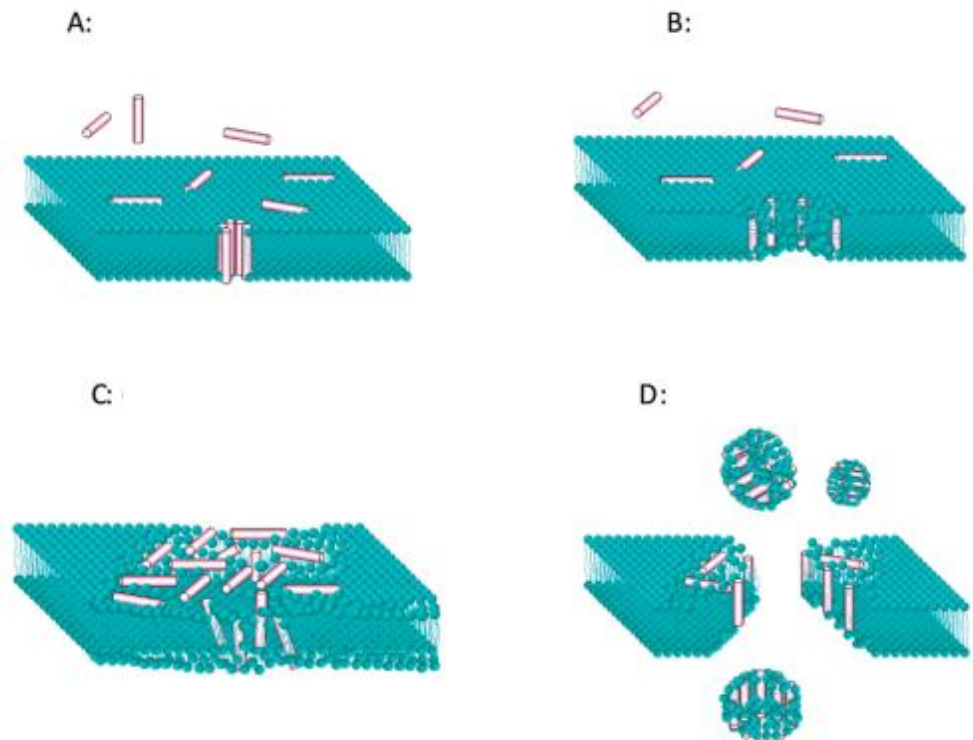


Figura 1: Modelos propostos para a atividade membrano-ativa de peptídeos antimicrobianos. Os modelos barrel-stave (a), toroidal (b), carpet-like (c) e detergente (d) são representados acima, simulando o contato entre o peptídeo e uma membrana bacteriana.⁹

1.2. Expressão, regulação e processamento de AMPs

Peptídeos antimicrobianos são produzidos por vários tipos de células em mamíferos, incluindo neutrófilos¹¹, linfócitos¹², monócitos e queratinócitos¹³. Muitos AMPs são produzidos na forma de precursores, os quais apresentam alta massa molar, sendo armazenados em vesículas celulares e gerados via clivagem proteolítica¹⁴.

A família das catelicidinas são precursores de peptídeos antimicrobianos em mamíferos. Este grupo é caracterizado pela sua porção amino-terminal conservada entre os mamíferos e este domínio foi batizado de catelina por ser uma estrutura análoga a proteínas de leucócitos suínos responsáveis por inibir a enzima catepsina L.^{15,14} O domínio C-terminal da família das catelicidinas está relacionada com a atividade antimicrobiana. Em bovinos e suínos, o peptídeo antimicrobiano é liberado de seu contexto proteico por clivagem mediadas por elastases,

porém em humanos o precursor hCAP-18 possui um sítio de clivagem diferente¹⁶, mediado pela enzima proteinase 3^{4,16,17}.

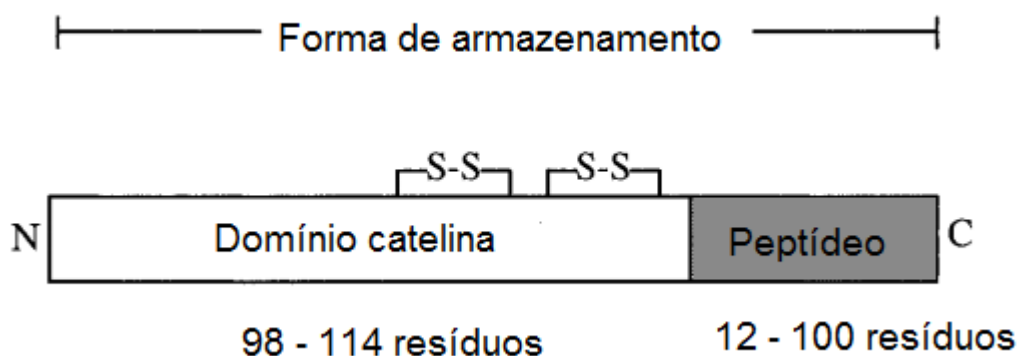


Figura 2: Exemplo de forma de armazenamento de peptídeos antimicrobianos representado pela família das catelicidinas como precursores compostos de um domínio conservado amino-terminal e um domínio antimicrobiano c-terminal⁴.

O precursor proteico mantém o peptídeo antimicrobiano em sua forma inativa, de forma a regular sua atividade uma vez que a super expressão de peptídeos antimicrobianos como o LL-37 está relacionado com doenças autoimunes como psoríase e dermatite atópica¹⁸.

Baseado neste conceito de peptídeos antimicrobianos encriptados em contextos proteicos maiores é que foi encontrado a sequência referente ao peptídeo antimicrobiano Hs05.

1.3. Desenvolvimento de novos peptídeos antimicrobianos

Um método prático para identificação de sequências antimicrobianas é fundamentado no uso de técnicas de bioinformática para se obter possíveis candidatos.

Partindo dos princípios físico-químicos gerais que regem o mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos e técnicas de bioinformática, Brand et al desenvolveu um software capaz de prospectar sequências proteicas encriptadas em genomas, os chamados IAPs (intrinsic antimicrobial peptides)¹⁹.

O Kamal¹⁹, software desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia, realiza uma prospecção *in silico* em bancos de dados genômicos de uma espécie a fim de se obter peptídeos antimicrobianos que residem dentro de proteínas parentais. Essa procura é feita baseada em parâmetros físico-químicos gerais de peptídeos antimicrobianos como carga líquida, hidrofobicidade média e estrutura secundária.

Com isso, possíveis candidatos são gerados e estes podem ser reprocessados manualmente baseado na separação de cargas produzida pela estrutura gerada, hidrofobicidade média, momento hidrofóbico e proteína parental. A seleção diminui o espaço amostral gerado e aumentando a probabilidade de a sequência obtida ser de fato antimicrobiana.

Este modo de análise modifica e otimiza a velha metodologia de obtenção de peptídeos antimicrobianos baseadas na síntese extensiva de estruturas análogas a sequências já conhecidas para só então ser executada a verificação de sua bioatividade.

1.4. Obtenção do peptídeo Hs05

Utilizando o banco de dados livre UniProt (www.uniprot.org) foi prospectado proteínas do genoma de mamíferos, conforme executado por de Sá em sua tese de mestrado, idealizando a aplicação deste peptídeos em embalagens para a conservação de carnes bovinas²⁰.

Após a prospecção realizada no banco de dados das proteínas da espécie *Bos taurus*, estabelecimento dos parâmetros de filtragem e a filtragem manual obteve-se a sequência Bt01, rebatizada de Hs05, por também estar presente em proteínas codificadas pelo DNA humano.

Tabela 1- Sequência e peso molecular do peptídeo HS05.

Sequência	LMGLFNRIIRKVVKLFN-NH ₂
Peso molecular	2060,2444

O IAP Hs05 encontra-se encriptado em genes homólogos da enzima Acetiltransferase 10, que catalisa a transferência de um grupamento acetil do Acetil-CoA para a região N-terminal de certos polipeptídios²¹.

Após ensaios de mínima concentração inibitória determinou-se que, a uma concentração de 8 μM , o peptídeo Hs05 seria capaz de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*²⁰;

2. Resistência microbiana

O rápido crescimento de resistência adquirida entre bactérias comuns está entre uma das mais importantes ameaças a saúde pública segundo a World Health Organization²². Desde 1989 não há mais descobertas ou desenvolvimentos de novas moléculas antimicrobianas, parte devido ao baixo retorno de investimento^{23,24} e parte devido ao reconhecimento dos perigos da resistência adquirida pela WHO.

A resistência microbiana é um mecanismo que ocorre naturalmente devido a coexistência de microrganismos e moléculas antimicrobianas naturais. Estes organismos se desenvolvem e tornam-se intrinsecamente resistentes a alguns compostos antimicrobianos. A situação torna-se alarmante quando uma população de bactérias que originalmente eram susceptíveis a um tratamento clínico gera parte de sua população insensível a ele. Uma vez que a subpopulação mutante emerge, o antibiótico elimina parte da população que era susceptível e a cepa mutante prevalece.

2.1 Antibióticos e mecanismos de resistência

A maioria dos antibióticos tem como alvo o comprometimento de funções bacterianas ou processos de crescimento de maneira seletiva. Penicilinas e cefalosporinas perturbam a síntese da camada de peptidoglicanos da parede bacteriana enquanto as polimixinas tem como alvo a membrana celular. Há também aquelas moléculas que interferem

com enzimas essenciais para as bactérias, inibem a síntese proteica e atuam atrapalhando os mecanismos de transcrição e/ou tradução²⁵.

Devido a grande plasticidade genética e alta taxa de reprodução, bactérias são capazes de prosperar em meio as estas ameaças por meio de 4 mecanismos gerais, i) Modificação do composto antimicrobiano, ii) Diminuição da captação da droga pela célula, iii) Ativação de mecanismos de efluxo para se expulsar o antibiótico, iv) Mudanças globais em caminhos metabólicos importantes através da modulação de redes regulatórias²⁶.

A baixa especificidade inerente ao mecanismo de ação de peptídeos antimicrobianos confere a estes compostos um diferencial interessante para a saúde pública, uma vez que o desenvolvimento de resistência adquirida é menos provável.

A resistência a AMPs ocorre devido a uma mudança na composição da membrana bacteriana, alterando assim sua carga líquida de forma que diminua a interação eletrostática entre o peptídeo e a bactéria, reduzindo a possibilidade de interação. Este mecanismo é bem descrito para algumas bactérias como *Streptococcus pneumoniae*²⁷. A inserção de resíduos catiônicos de Lisina também é um dos mecanismos propostos para a resistência a AMPs²⁸.

Contudo a farmacodinâmica de um peptídeo antimicrobiano difere de um antibiótico comum. A janela de concentração entre não matar bactérias e matar todas as bactérias é muito menor para AMPs, sendo menos provável a seleção de mutantes resistentes²⁹. De forma geral a taxa máxima de morte gerada por um AMP é maior do que a de antibióticos, observada por um tempo de morte bacteriana mais rápido sob o tratamento com AMPs³⁰.

A assepsia de feridas cutâneas e disbioses dermatológicas torna-se chave para um tratamento clínico em casos de injúrias persistentes e má cicatrização. O peptídeo antimicrobiano Hs05 desponta como um possível adjuvante para o tratamento de tais mazelas evitando a seleção de microrganismos resistentes.

A meia-vida de um peptídeo antimicrobiano em ambiente proteolítico, como ocorre em uma ferida cutânea, torna-se um desafio

chave na implementação da tecnologia. Diversas estratégias foram documentadas na literatura como modificação de regiões terminais^{31,32}, substituição de aminoácidos lábeis³³, PEGilação³⁴ e incorporação de aminoácidos não naturais³⁵, objetivando manter a concentração do peptídeo estável por um período maior de tempo, de modo que sua função biológica possa ser desempenhada de maneira efetiva.

Contudo, tais estratégias envolvem modificação direta do peptídeo, o que modifica também suas características físico-químicas. Para um AMP, isso pode ser um problema uma vez que suas características físico-químicas estão diretamente relacionadas com seu potencial antimicrobiano.

A implementação de um sistema de delivery sustentado torna-se uma ótima forma de se obter uma concentração constante do ativo sem provocar modificações químicas em sua estrutura.

3. Sistemas de liberação sustentada

Liberação sustentada é a propriedade de uma fórmula farmacêutica capaz de manter a taxa de liberação do fármaco por um extenso período de tempo³⁶. Membranas lipídicas^{37,38} e oligossacarídeos, como a Ciclodextrina³⁹ são capazes de formarem estruturas protetoras adequadas permitindo uma lenta difusão do fármaco para o meio receptor. Contudo, materiais poliméricos despontam como os mais amplamente utilizados na formulação de sistemas de liberação sustentada.

3.1. Polímeros

Qualquer macromolécula constituída de múltiplas repetições de unidades derivadas de moléculas de baixa massa molecular ligadas de forma covalente é considerado um polímero⁴⁰. Devido a abrangência do conceito, diversas substâncias podem ser incluídas nesta classe, cada

uma desempenhando propriedades únicas de acordo com sua constituição.

A aplicação tecnológica dos polímeros abrange os mais diversos nichos industriais devido a sua versatilidade. A partir de um planejamento racional é possível obter-se polímeros com propriedades físico-químicas específicas para a finalidade desejada. Ademais, estas substâncias tornam-se ainda mais interessantes pela possibilidade de modular suas propriedades de acordo com os materiais utilizados em seu preparo.

A potencialidade desta classe de materiais e as limitações intrínsecas relacionadas a administração convencional de fármacos guiam a criação de diferentes sistemas poliméricos de *delivery* de drogas, como os hidrocoloides, formados a partir de gelificação de suspensões coloidais e os hidrogéis, polímeros estruturados contendo grupos altamente hidrofílicos capazes de armazenar água⁴¹.

Assim como demonstrado por Santos⁴² em sua dissertação de mestrado, diferentes hidrogéis, em proporções distintas, misturados com um polímero híbrido geram características físico-químicas interessantes no que diz respeito a liberação controlada do fármaco Piroxicam, aplicação útil para minimizar os efeitos colaterais causados pela porcentagem de fármaco livre em circulação sistêmica.

3.1.1. Nanocompósitos poliméricos orgânicos-inorgânicos

Os nanocompósitos híbridos orgânico inorgânicos são materiais bifásicos no qual a interpenetração das fases orgânica e inorgânica se dá em escala nanométrica. A combinação de polímeros orgânicos com grupamentos inorgânicos de siloxano conferem ao material final propriedades inéditas, que diferentes dos matérias de partida. Dentre as propriedades resultantes destacam-se a estabilidade mecânica, ópticas e térmicas, típicas de materiais cerâmicos (inorgânicos), associados a flexibilidade dos compostos e polímeros orgânicos⁴³.

Os nanocompósitos orgânico-inorgânicos materiais podem ser divididos em 3 diferentes classes baseados na interação entre os compostos orgânicos e inorgânicos no material:

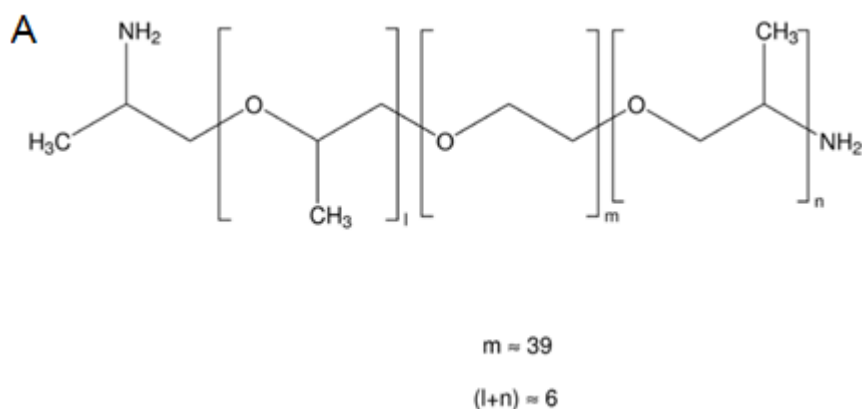
Classe 1: A interação entre o componente orgânico e inorgânico é estabelecida por forças de van der Waals ou eletroestáticas.

Classe 2: Componentes orgânico e inorgânico ligados de forma covalente ou ionocovalente.

Classe 3: Combinação das duas interações.

Alguns trabalhos descrevem a elaboração de nanocompósitos poliméricos a partir de polióxidos e alcóxissilanos^{44,45,46}. Em particular poli(propileno óxido)(PPO) e poli(etileno óxido)(PEO) compoendo a fase orgânica e motivos de siloxano modificados, identificados como componentes inorgânicos, a fim de promover a formação de um aduto ligados por pontes de ureia, úteis na elaboração de sistemas de *drug delivery*^{47,48}.

Neste trabalho foi obtido um nanocompósito orgânico-inorgânico a partir da reação entre o 3-isocianotopropiltriétoxisilano (IsoTrEOS) e o copolímero 2-aminopropil PPO-PEO-PPO (Figura 3). O ataque nucleofílico da amina terminal do copolímero ao grupamento isocianato do IsoTrEOS promove a formação do precursor híbrido, como mostrado na Figura 4.



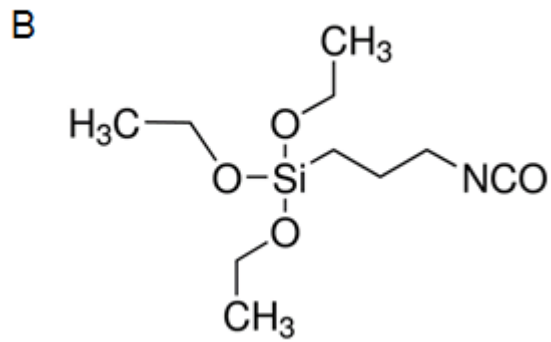


Figura 3: Estrutura química do copolímero 2-aminopropil PPO-PEO-PPO (A) e estrutura química do IsoTrEOS (B), materiais de partida para a formulação do nanocompósito polimérico.

O siloxano trifuncional do aduto é o sítio da reticulação do filme, sucedida posteriormente graças ao processo sol-gel, gerando uma rede tridimensional interconectada.

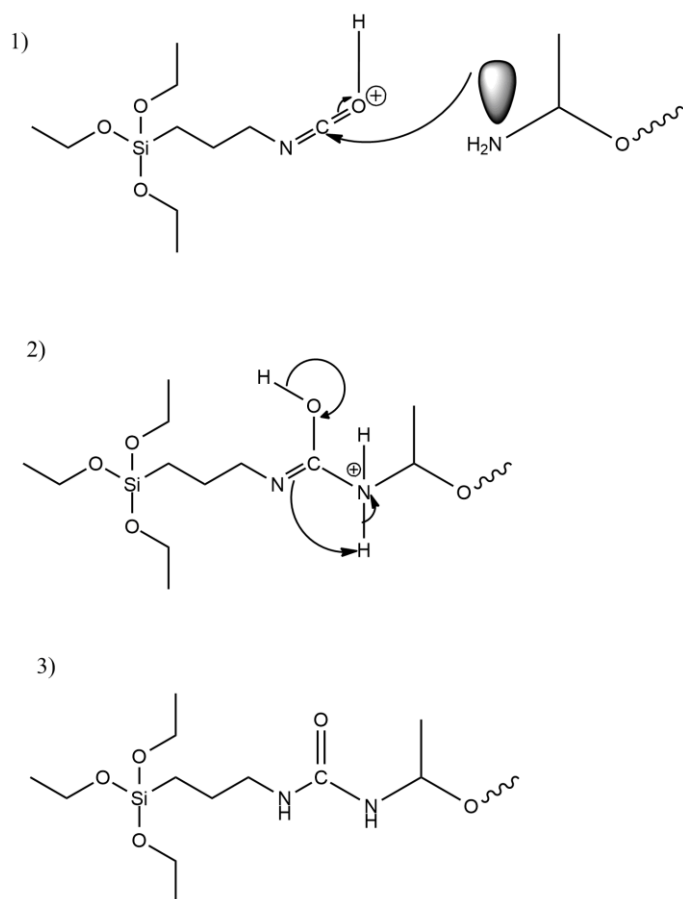


Figura 4: Ataque nucleofílico realizado pelos elétrons não ligantes do nitrogênio do copolímero PPO-POE-PPO a região com baixa densidade eletrônica do grupo isocianato do IsoTrEOS.

3.1.1.1. Processo sol-gel

O interesse por este processo começou em meados de 1800 a partir de estudos de materiais inorgânicos como a sílica gel⁴⁹. Percebeu-se que a hidrólise de silicatos sob condições ácidas era capaz de produzir materiais poliméricos unidos por cadeias de SiO₂, gerando, posteriormente, uma alternativa para a produção de tecnologias como lentes óticas e películas⁵⁰. As condições brandas para a formulação destes materiais possibilitou a introdução de compostos orgânicos⁵¹, levando a formação de sistemas híbridos orgânico-inorgânico, expandindo a diversidade de materiais e aplicações possíveis.

O processo ocorre devido a reações de hidrólise e condensação de um sol, substância constituída de partículas coloidais em um líquido. A partir dessas reações obtém-se um gel, caracterizado por uma estrutura

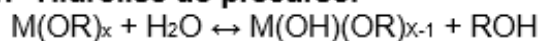
rígida de partículas coloidais ou por cadeias poliméricas que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios⁵².

A reação de hidrólise do precursor ocorre devido a adição de água na esfera de coordenação da espécie M gerando o ligante aquo, H_2O^+-M . Ligantes do tipo M-OH também são gerados quando a adição de água promove a saída de um grupamento alcóxido que é estabilizado como álcool. A hidrólise torna a espécie M em questão mais reativa possibilitando a posterior reação de condensação^{53,43}.

A condensação via oxalação ocorre devido ao ataque nucleofílico dos ligantes M-OH as espécies H_2O^+-M e M^+-OH-R geradas na hidrólise. Deste modo a cinética desta etapa depende da retirada dos grupos H_2O e ROH^{53,43}.

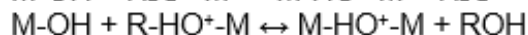
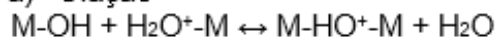
Em uma situação de saturação de ligantes M-OH devido a hidrólise do precursor a condensação ocorre via eliminação oxalação. Espécies M-OH podem reagir tanto consigo mesmo quanto com espécies não hidrolisadas gerando o aduto de condensado M-O-M^{53,43}.

1. Hidrólise do precursor

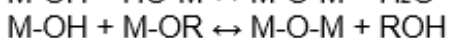
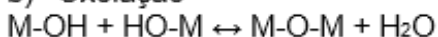


2. Condensação

a) Olação



b) Oxolação



M = Si, Sn, Ti, Mo, etc

Figura 5: Equações químicas de hidrólise geradas a partir da adição de água e retirada de grupos alcóxidos (1), seguidas de reações de condensação (2) que podem ocorrer via olação, através de um mecanismo de substituição nucleofílica das espécies geradas na hidrólise ou via oxolação, na qual a saturação dos grupos M-OH promove a formação do aduto M-O-M.

A estrutura do gel é fortemente dependente das taxas de hidrólise e condensação dos precursores, que por sua vez é influenciada pela natureza do catalisador adicionado na reação. Catálises básicas ocorrem via substituição nucleofílica e aumentam a taxa de hidrólise das reações, gerando cadeias mais ramificadas. Já para a catálise ácida, é sabido que causa um aumento na taxa de condensação, gerando cadeias mais longas via reações eletrofílicas^{43,54}.

Durante o processo de gelificação a viscosidade da mistura tende a aumentar com o tempo, resultando em uma estrutura aparentemente inalterável. Porém, uma vez formada, alterações na configuração estrutural do filme podem ocorrer com o tempo devido a ocorrência concomitante do processo de envelhecimento e secagem do filme polimérico formado^{52,55}.

As reações de condensação e poli condensação ainda continuam ocorrendo enquanto grupos silanóis (SiOH) gerados pela hidrólise estiverem perto o suficiente para reagir, deixando a rede mais reticulada, conferindo-a maior resistência mecânica. Esses resultados foram comprovados por Kelts et al., via RMN Si²⁹ ao apresentar sinais expressivos para o aumento proporcional de espécies Q³ e Q⁴ após o ponto de gel⁵⁶.

Após a etapa de formação do gel úmido segue-se com a etapa de envelhecimento do gel. Nesta etapa ocorre o prosseguimento das reações de hidrólise e condensação como também trocas gasosas também ocorrem entre o filme formado e o ambiente. Com o término da etapa de envelhecimento procede-se com a etapa de secagem do gel e a evaporação dos solventes de sua constituição. A estrutura formada sofre retração devido a pressão capilar causada⁵⁷. A porosidade é formada quando, devido à progressão da reticulação durante o processo de envelhecimento, o filme torna-se suficientemente rígido para opor-se às forças causadas pela tensão superficial devido a evaporação⁵².

As reações descritas pelas figuras 4 e 5 são capazes de promover a formação de um sistema de filme polimérico de baixa toxicidade, bioadesivo devido a seus presença de grupamentos OH que podem estabelecer ligações de hidrogênio com tecidos biológicos e transparente,

gerando características estéticas agradáveis⁴⁷. Além disso é um sistema altamente modulável com relação a sua hidrofobicidade, podendo solubilizar tanto drogas hidrofóbicas como o Paclitaxel⁵⁸, quanto drogas solúveis em água como o diclofenaco de sódio⁴⁸ dependendo da proporção de PPO e PEO em sua composição inicial do híbrido. O poli(etileno óxido)(PEO) é um polímero hidrofílico que está mais relacionado com a bioadesão, porém por ser hidrofílico, é passível de erosão quando em contato com moléculas polares do estrato corneum. Para reduzir estas limitações adaptou-se este polímero ao poli(propileno óxido)(PPO) que possui características mais hidrofóbicas, gerando o copolímero triblock mostrado na figura 3.

Outra característica passível de ajuste é o grau de reticulação entre as cadeias do nanocompósito. A quantidade de mols do catalisador que promove a hidrólise no processo sol-gel está intimamente relacionada com a interconexão das moléculas do precursor. Uma rede mais reticulada promove uma resistência maior a difusão do fármaco caracterizando-se como uma liberação sustentada.

3.2. Cinética de liberação sustentada

A cinética de liberação do fármaco está associada a permeabilidade do fármaco através do dispositivo polimérico que por sua vez envolve mecanismos de dissolução, migração e difusão do fármaco em função da sua solubilidade, partição, intumescimento e erosão⁵⁹.

A estrutura do dispositivo de liberação controlada pode permitir a permeabilidade do ativo de maneira mais lenta se for constituída de motivos cristalinos ou mais rápida se for composta por moléculas amorfas⁶⁰.

A dissolução é definida como a taxa de transferência de massa de uma superfície sólida em um meio de dissolução ou solvente sobre condições padrões como: a interface sólida/líquida, temperatura e composição do solvente⁶¹ e a difusão é o nome do fenômeno de transporte que ocorre neste processo.

Para caracterização dos mecanismos de dissolução e difusão são descritos por diversos autores alguns modelos matemáticos a fim de definir como este transporte de massa ocorre em cada tipo de material^{59,62,63}.

3.2.1. Modelo de Korsmeyer-Peppas e Ritger-Peppas

Este modelo descreve a liberação de fármacos em sistemas poliméricos. Segundo o modelo tem-se a expressão:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad \text{Equação (1)}$$

Onde M_t/M_∞ é a fração do fármaco liberada no tempo t , K é a constante de liberação e n é o expoente de liberação.

Este modelo é descrito especificamente para liberação de drogas por matrizes de hidrogel. O modelo leva em consideração dois mecanismos independentes que podem se sobrepor, um relativo a difusão e outro relativo ao relaxamento da matriz pelo intumescimento e/ou erosão⁶⁴.

A aplicação do modelo no perfil de liberação obtido permite a determinação do coeficiente de difusão n , capaz de estabelecer os diferentes mecanismos de liberação. A tabela 2 mostra os valores dos expoentes e seus respectivos mecanismos⁶³.

Tabela 2. Expoente de difusão e seus respectivos mecanismos de liberação do fármaco para diferentes sistemas de liberação controlada.

Expoente de difusão (n)	Mecanismo de Liberação de Fármaco
$n < 0,5$	Dissolução de materiais porosos
0,5	Difusão Fickiana
$0,5 < n < 0,89$	Difusão anômala (Não Fickiana)
0,89	Transporte Caso II(Intumescimento)
$n = 1$	Ordem zero

Fonte: Adaptada de MOLINA, 2010.

Valores de n próximos 1,0 estão relacionados com mecanismos de liberação do tipo ordem zero onde a liberação do ativo é uma função do tempo e acontece em uma taxa constante independentemente da concentração do ativo.

Valores de n entre 0,89 e 1,0 estão relacionados a liberação de transporte caso II, que são regidas pelo fenômeno do intumescimento do polímero. Casos $0,5 < n < 0,89$ correspondem a uma superposição de taxas de intumescimento da matriz e difusão do ativo. O transporte do fármaco é associado com transição dos estados vítreos do polímero hidrofílico que intumescem na água e sofrem erosão.

Para valores de n igual a 0,5, o mecanismo principal, que controla a liberação do ativo é a difusão Fickiana clássica onde a liberação é dependente do gradiente de potencial químico. Neste caso a taxa de difusão é muito maior do que o relaxamento da matriz. Já para valores de n inferiores a 0,5, o mecanismo de liberação é regido por uma dissolução por poros, na qual interações entre o ativo e a matriz ocasionam em uma liberação mais lenta e gradual.

4. Objetivos

Desenvolvimento de um sistema de liberação controlada constituída de um filme polimérico híbrido aderente como matriz e o peptídeo Hs05 como potencial fármaco promotor de assepsia local.

4.1. Objetivos específicos

- Desenvolver metodologia de incorporação do peptídeo Hs05 em matriz híbrida siloxano PPO-PEO-PPO.

- Estudar o processo de reticulação dos grupamentos silanóis e correlacionar com o perfil de liberação do peptídeo.
- Avaliar o processo de liberação do peptídeo e determinar o mecanismo principal envolvido.

5. Metodologia

5.1. Síntese do híbrido

As matrizes foram preparadas em duas etapas, a primeira referente a formação do aduto de poliéter siloxano ligados por pontes de ureia, gerando o híbrido e a segunda referente a gelificação ocorrida durante o processo sol-gel utilizando quantidades diferentes de HCl como agente catalisador da reação, ocasionando na formação da matriz nanocompósita.

Foi transferido 40 g do copolímero triblock (PPO-PEO-PPO) contendo grupamentos amino terminais (Jeffamine® ED-900) para um balão de fundo redondo de 250 mL. Foi adicionado 70 mL de etanol absoluto ao balão e a mistura foi homogeneizada sob aquecimento com manta a 40 °C. Após a solubilização a temperatura foi elevada para 60 °C e 10,35 mL de 3-isocianatopropiltrióxido de silano (IsoTrEOS) foram adicionados ao balão. A mistura foi colocada em refluxo a 80 °C por 24 h. Após o término da reação o solvente foi eliminado sob aquecimento em pressão reduzida em rotaevaporador a 60 °C.

5.2. Obtenção do peptídeo Hs05

O peptídeo Hs05 foi sintetizado e purificado previamente a este estudo conforme descrito na dissertação de Sá²⁰.

5.3. Incorporação do peptídeo Hs05 e gelificação do híbrido

Em placa de 48 poços foi adicionado o híbrido, o peptídeo Hs05 e quantidades diferentes de HCl alcoólico com o objetivo de promover diferentes níveis de reticulação no polímero, levando a tempos de liberação diferentes em função da proporção $R = [H^+] / [Matriz]$. Além disso a influência do processo de envelhecimento foi avaliada por meio do armazenamento, em diferentes tempos, dos filmes em local livre de umidade. Será utilizada uma concentração de 1% (m/m) do peptídeo na matriz. Após o tempo de gelificação e envelhecimento se iniciará o ensaio de liberação.

5.4. Ensaio de liberação

O filme carregado com peptídeos foi transferido para uma cubeta de quartzo de 10 mm na qual foi adicionada 3 mL de água pura. Com o auxílio de um espectrofotômetro (Hitachi modelo U-3900H spectrophotometer) foi medida a absorbância do meio na faixa de 200 a 300 nm em um ciclo de intervalo de 5 em 5 minutos por 1 hora e de 15 em 15 minutos por mais 23 horas sob temperatura ambiente.

Tabela 3 – Composição dos filmes poliméricos.

$R = [H^+] / [Matriz]$	Massa de peptídeo (mg)	Massa do híbrido (mg)	Volume de HCl 0,3 M (μ L)
2,1	0,5	100	300
3,6	0,5	100	500
5,0	0,5	100	700
7,2	0,5	100	1000

5.4.1. Cálculo da concentração do peptídeo

A liberação do peptídeo foi monitorada pelos comprimentos de onda referente a ligação peptídica (215 e 225 nm). Sua quantidade é dada pela forma empírica⁶⁵:

$$CP(\mu\text{g.mL}^{-1}) = \frac{(A_{215} - A_{225}) \times 144}{2} \quad \text{Equação (2)}$$

CP = Concentração do peptídeo

A₂₁₅ = Absorbância em 215 nm

A₂₂₅ = Absorbância em 225 nm

5.5. Avaliação da estabilidade térmica e hidratação residual por análise termogravimétrica

Monitoramento da massa relacionada a perda de água e estabilidade térmica foi executada por analisador termogravimétrico da marca Shimadzu modelo DTG-60H da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília. Foi utilizando um gradiente de temperatura de 10 °C/min até 600 °C sob atmosfera inerte.

5.6. Caracterização molecular por Espectroscopia no infravermelho

A identificação e atribuição de bandas conforme descrito na literatura por meio de análise via reflexão atenuada total (FTIR-ATR) foi realizada em um aparelho Varian modelo 640-IR disponibilizado pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília. Medidas foram feitas no intervalo de 4000 a 600 cm⁻¹, com 16 scans e 4 cm⁻¹ de resolução. A análise foi executada com uma amostra íntegra e o espectro foi gerado em função da transmitância obtida.

5.7. Dispersão do peptídeo na matriz polimérica

A lâmina contendo o filme foi colocada sob vácuo para secagem por 1 h. Pequenas gotas de α -ciano-4-hydroxicinamico (5 mg/ml) dissolvida em acetonitrila/água/3% ácido trifluoroacético (5:4:1), foram depositadas sobre o filme com o auxílio de micropipeta manual. Após 15 minutos de secagem, a lâmina foi novamente colocada sob vácuo para secagem por 1 h.

A amostra foi então submetida à aquisição em espectrômetro de massa MALDI UltraFlex III TOF/TOF (Bruker Daltonics) no modo refletido positivo cedido pelo Laboratório de Espectrometria de Massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. A varredura automática das amostras e a aquisição dos dados foram controladas com o software FlexImaging 4.0 (Bruker Daltonics), ajustado para rastrear as áreas determinadas em passos únicos de 100 μm , com 200 disparos em cada posição e laser com intensidade constante igual a 30%.

O mapeamento foi ajustado para a detecção dos componentes com m/z entre 780 e 3900. A calibração do espectrômetro foi realizada utilizando uma mistura de peptídeos (peptide calibration standard II – Bruker Daltonics) depositada sobre uma região do filme analisado. A análise das imagens obtidas foi realizada utilizando o software FlexImaging 4.0 (Bruker Daltonics).

5.8. Determinação de mecanismo de liberação

Ajuste de curvas cinéticas de liberação com modelo matemático de Korsmeyer-Peppas e Ritger-Peppas descritos pela literatura a fim de determinar os mecanismos de liberação envolvidos.

A filtragem dos dados de absorbância foi executada via software R e o tratamento dos dados foi executado com o auxílio do software gráfico Origin8, aplicando-se a derivada para identificação e distinção da primeira e segunda fase de liberação.

6. Resultados

6.1. Incorporação do peptídeo Hs05 na matriz nanocompósita

O peptídeo Hs05 diluído em água e quantificado foi adicionado no aduto de siloxano poli éter que se encontrava em placa de 48 poços. Após a adição com auxílio de micropipeta, quantidades diferentes de HCl 0,3 M foram adicionadas em cada poço para promover a reticulação do filme seguida de sua homogeneização.

A gelificação do híbrido foi rápida, durando menos de 1 h. A placa com os filmes já gelificados foi armazenada a temperatura ambiente em cuba dessecadora contendo sílica para retirar solventes residuais presentes no filme. Depois de passados os tempos de envelhecimento pré-estabelecidos o filme foi retirado da cuba e foi executado os ensaios.

Como resultado obteve-se um filme flexível de largura e espessura controláveis de acordo com o recipiente em que a reticulação foi executada e quanto de solução foi adicionada na mistura, como mostrado na figura 8.

O filme obtido apresenta uma estética transparente, tornando-se um diferencial em relação aos sistemas de tratamento dermais convencionais uma vez que este permite a visualização da ferida enquanto o tratamento é aplicado. Além disso sua baixa viscosidade e boa estabilidade térmica (mostrada no gráfico de termogravimetria) garantem sua integridade quando aplicada na pele.

O estratum córneo possui um fator de umidade natural causada por compostos hidrofílicos que absorvem água da atmosfera, mantendo a pele hidratada. Os grupos CO do filme obtido são capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com a água do estratum córneo, promovendo sua bioadesão⁴⁷.

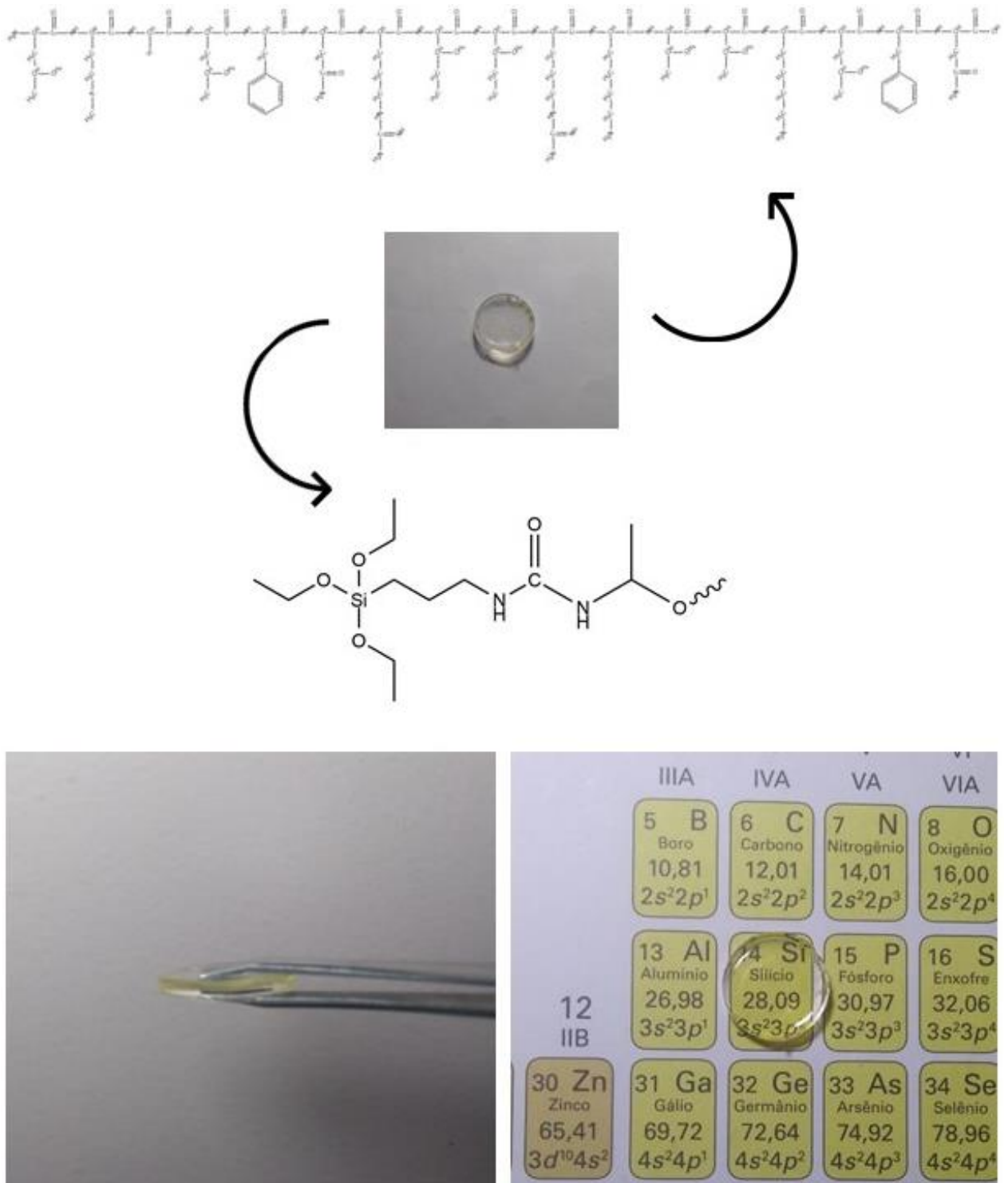


Figura 8: Exemplo de matriz nanocompósita obtida pelo processo sol-gel incorporando o peptídeo HS05. Principais componentes presentes no filme (acima), detalhe da espessura do filme obtido como exemplo (abaixo e a esquerda), destaque da propriedade óptica de transparência do filme formado (abaixo e a direita).

6.2. Avaliação da estabilidade térmica e hidratação residual por análise termogravimétrica.

A análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas em uma amostra (R = 2) envelhecida por 1 mês objetivando demonstrar a termo estabilidade e hidratação residual da amostra.

Nota-se a partir dos gráficos da figura que a perda de massa do filme ocorreu em dois estágios endotérmicos. Uma inicial perda de aproximadamente 0,02 mg ocorreu próximo a 55°C podendo ser atribuída ao desprendimento de solventes residuais da síntese sol-gel, neste caso o etanol.

A perda relativamente baixa indica que a amostra foi bem armazenada e que a maioria do solvente presente em sua composição foi retirado antes da análise, gerando o fenômeno bem documentado de encolhimento^{55,52}.

A segunda perda de massa ocorreu devido a degradação estrutural da matriz siloxano polimérica, termoestável até aproximadamente 310 °C que pode ser atribuído a decomposição das pontes de ureia⁶⁶. Este parâmetro pode ser também modulado de acordo as características dos materiais iniciais, parâmetros como quantidade de ligações siloxano^{67,68} tem um grande impacto na termo estabilidade do filme formado.

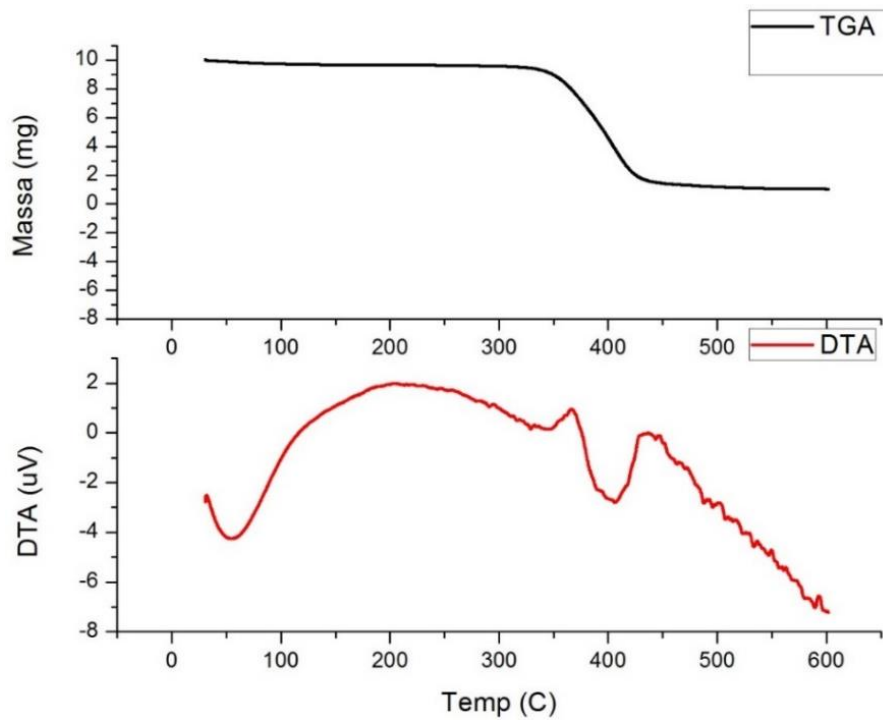


Figura 9: Análise termogravimétrica (acima) e análise térmica diferencial (abaixo) evidenciando as perdas endotérmicas de massa referentes a liberação de água e decomposição da matriz.

6.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho

A análise por espectroscopia de absorção no infravermelho (FTI-ATR) foi realizada para um filme híbrido formulado.

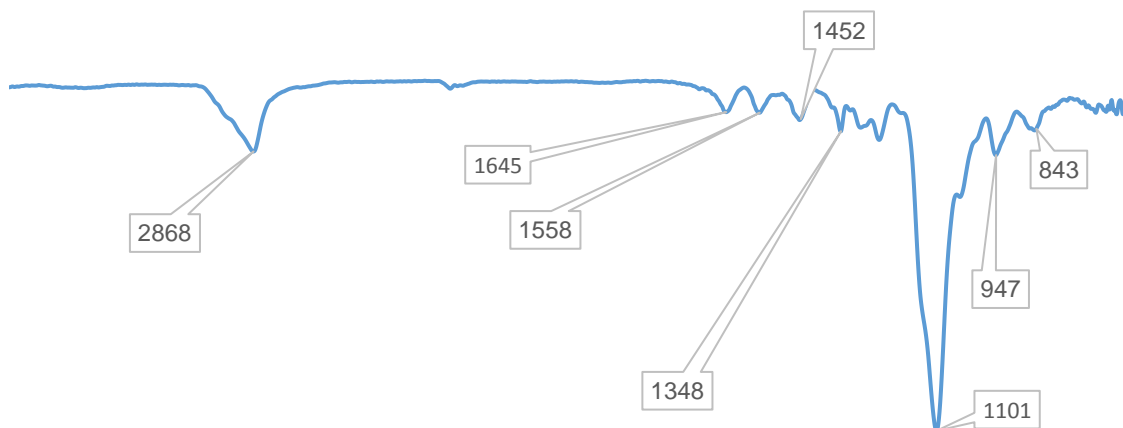


Figura 10: Espectro de FTIR-ATR do híbrido de poli éter siloxano carregado com o peptídeo HS05.

A partir das bandas de obtidas no espectro de infravermelho mostrado acima fez a atribuição dos tipos de vibrações encontradas no espectro.

Tabela 4: Atribuições as bandas de FTIR

Número de onda	Tipo de vibração
2868	CH ₂ estiramento assimétrico
1645	vC=O (amida)
1558	δN-H (II)
1452	CH ₂
1348	δC-N (terciária)
1101	v _{as} Si-O-Si
947	vSi-OH
843	vSi-O-Si

As bandas referentes a parte inorgânica do híbrido encontram-se em 842, 946 e 1101 cm⁻¹ ⁶⁹. A intensidade do pico referente ao número de onda 1101 confirma a reticulação dos grupos Si ocasionado pelo processo sol-gel mostrado na figura 5. A presença da banda em 946,89 indica a presença de grupos SiOH, demonstrando que o processo de reticulação não foi absoluto. A evidência da banda referente a presença de ligações C=O comprova a formação do híbrido.

6.4. Dispersão do peptídeo na matriz polimérica

Um filme polimérico fino carregado com o peptídeo Hs05 foi gelificado em uma placa de MALDI como prova de conceito para evidenciar a presença do ativo na matriz. A figura 11 demonstra que o peptídeo Hs05 foi evidenciado pela detecção da razão m/z 2060,5, disperso na matriz polimérica de forma homogênea.

A detecção da razão m/z 2060,5 indica que o processo sol-gel de reticulação da matriz polimérica preserva a estrutura original do ativo.

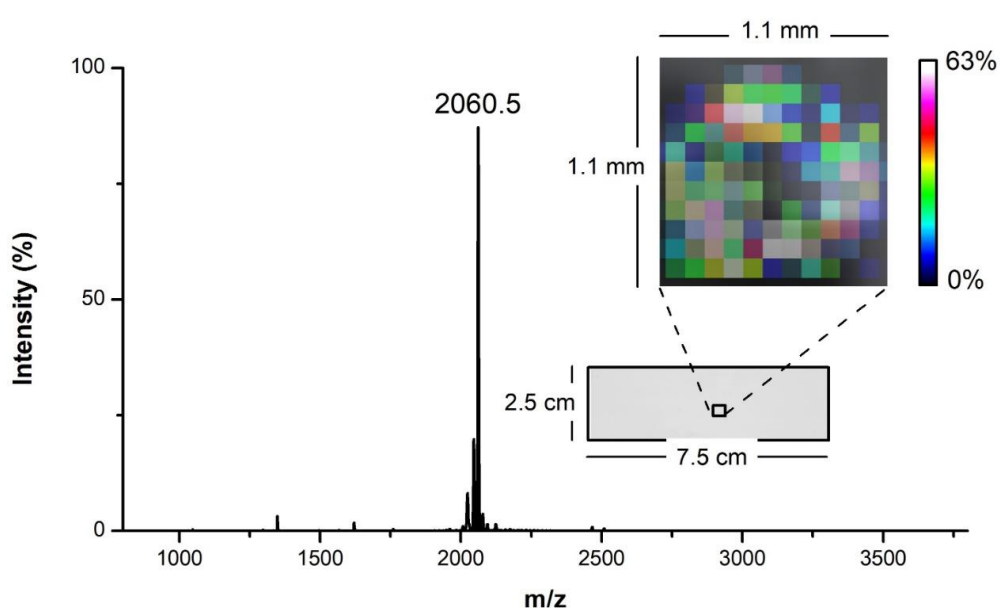


Figura 11: Razão m/z do peptídeo HS05 detectada em um espaço de 1,1 x 1,1 mm da matriz carregada com intensidades que variam de 0 a 63%.

6.5. Ensaio de liberação

6.5.1. Influência do envelhecimento na cinética de liberação

Os ensaios de liberação foram realizados conforme metodologia descrita no item, 5.4 valendo-se do cálculo experimental demonstrado por Waddell et al. para obter-se a concentração do peptídeo em solução. O experimento foi realizado com o intuito de avaliar como diferentes tempos

de envelhecimento impactam no processo de liberação do peptídeo do filme polimérico.

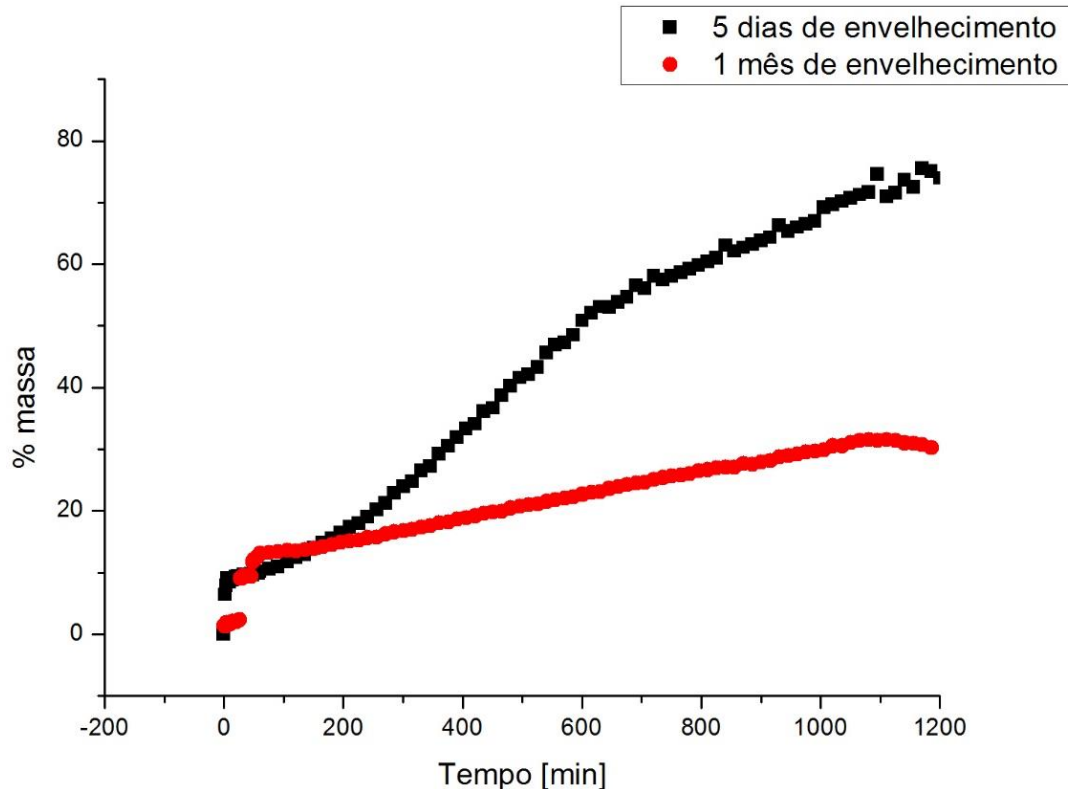


Figura 12: Perfil de liberação de massa de peptídeo do filme por tempo para dois filmes poliméricos formulados com a mesma proporção $[H^+] / [Matriz]$, $R = 2$, envelhecido em diferentes tempos.

A figura 9 mostra a porcentagem do peptídeo Hs05 liberado em função do tempo para dois filmes poliméricos $R=2$ de diferentes tempos de envelhecimento. É possível notar que ambas as liberações ocorrem em um regime de duas etapas, como descrito por Balcerzak⁷⁰. No primeiro estágio da liberação ocorre a dissolução rápida do peptídeo que se encontra nas áreas mais próximas da interface matriz-líquido, o chamado “burst effect”. Já no segundo estágio a liberação pode ser vista como consequência da difusão do fármaco por entre a rede reticulada do filme polimérico.

A amostra de 5 dias de envelhecimento possui uma primeira fase mais abrupta, prosseguindo de maneira imediata para a segunda fase, atingindo uma quantidade máxima de liberação de 80% da massa inicial. Já a amostra com 1 mês de envelhecimento apresenta em ambas as

fases uma cinética de liberação mais lenta, com o seu máximo de liberação em 30,25% da massa inicial.

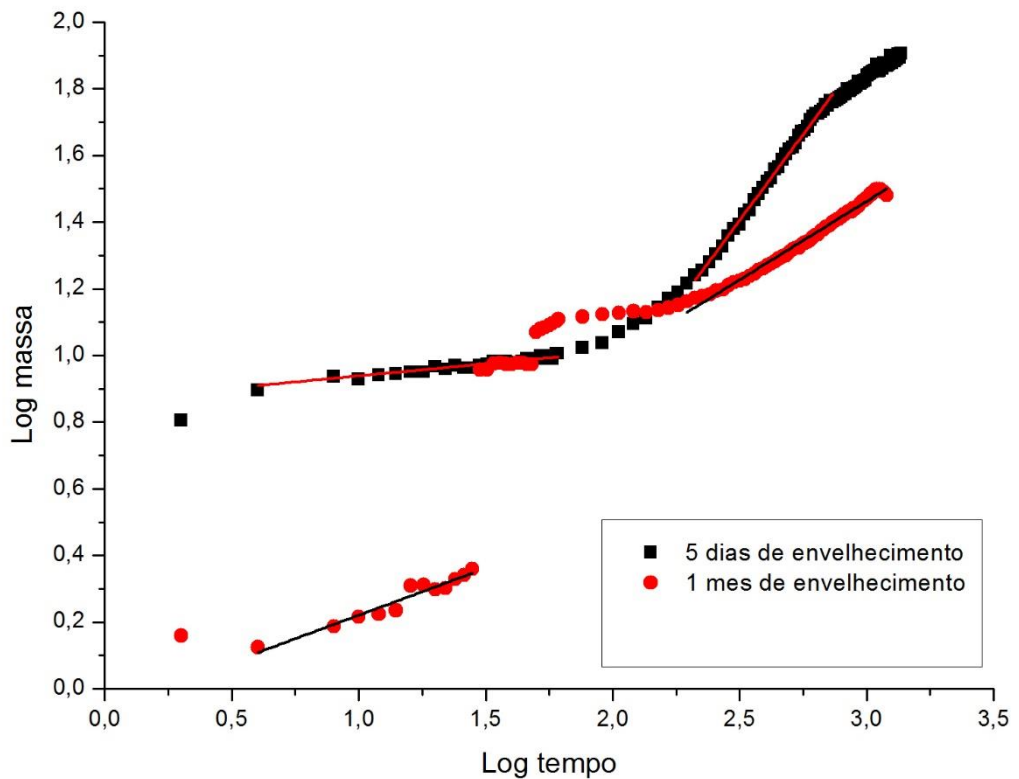


Figura 13: Perfil de liberação linearizado em escala log-log para filmes $R=2$ envelhecidos em diferentes tempos.

Empregando-se a escala bi-logarítma é possível definir, a partir das inclinações geradas, o mecanismo de liberação dos filmes poliméricos ao se aplicar o modelo de Korsmeyer-Peppas descrito em 3.2.1.

O modelo implementado gera valores de correlação de 0,86 a 0,99 para os dados obtidos. A primeira fase para ambas as amostras é definida por um mecanismo de dissolução de poros, $n < 0,5$. Já na segunda fase, o caráter “vazado” da amostra de 5 dias é ressaltado pela maior inclinação da reta gerada, conferindo a esta fase um mecanismo de ordem zero, ou seja, um aporte constante de peptídeos no meio.

Tabela 4: Expoente de difusão, correlação e mecanismo de liberação das amostras envelhecidas em diferentes tempos.

	1º fase	2º fase
5 dias de envelhecimento	n = 0,076 R ² = 0,863 Materiais porosos	n = 1,03 R ² = 0,996 Ordem zero
1 mês de envelhecimento	n = 0,28 R ² = 0,938 Materiais porosos	n = 0,47 R ² = 0,989 Materiais porosos

Diferentemente, a amostra envelhecida durante 1 mês tem seu mecanismo de liberação por poros sustentado durante toda o ensaio. Neste caso, o meio receptor preenche os poros do filme polimérico em um primeiro momento e depois o fármaco é difundido de forma lenta através da rede reticulada gerada durante e após o processo sol gel.

Isso corrobora para a hipótese de reações continuadas mesmo após o ponto de gel, de forma a consumir todos os grupos silanóis (SiOH) restantes aumentando a interpenetração da rede^{71,72}. Assim quanto maior o tempo de envelhecimento mais reticulado será o filme, visto que a proporção R é a mesma, isso dificultará mais a difusão do peptídeo pela matriz levando a um mecanismo de liberação mais lento.

6.5.2. Influência da proporção $R = [H^+] / [Matriz]$ na cinética de liberação

Para este ensaio foram utilizados filmes formulados com diferentes proporções R e suas características estruturais avaliadas de acordo com o consequente perfil de liberação de cada formulação. Em cada formulação foram adicionadas quantidades de soluções ácidas cada vez maiores.

Avaliando a figura 11 fica claro uma forte influência da proporção R no perfil de liberação do peptídeo. Neste caso dois parâmetros de influências teoricamente opostas no perfil de liberação podem ser citados, i) uma maior quantidade de ácido promovendo uma maior quantidade de

reticulação na estrutura do filme; ii) uma maior quantidade de solução aumentando o volume do filme formado, diminuindo a concentração de reticulações formadas no espaço.

O perfil gerado indica uma proporção limítrofe para a influência i) demonstrado pela proporção $R = 3,6$. Até esta proporção o efeito reticulador do ácido adicionado promove uma maior retenção do peptídeo em seu interior, esse efeito é observável tanto na primeira quanto na segunda fase das proporções 2,1 e 3,6.

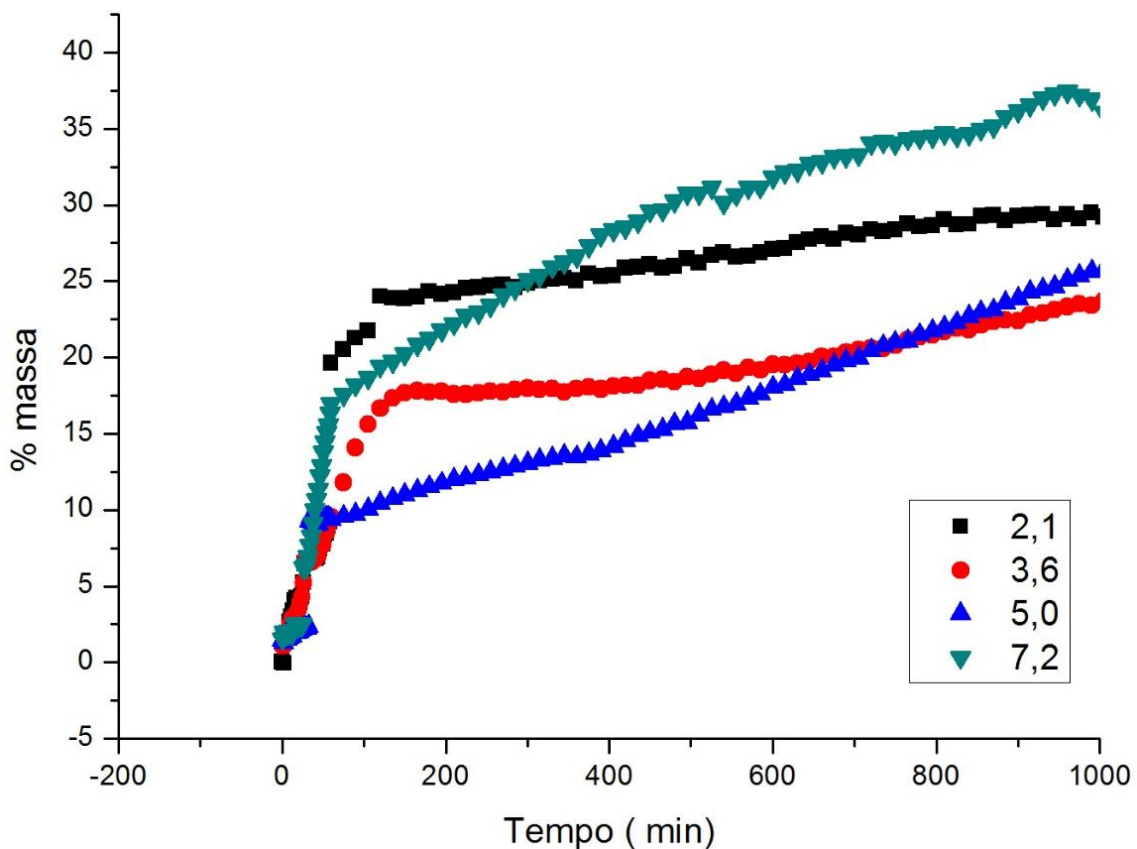


Figura 14: Perfil de liberação de massa de peptídeo do filme por tempo para filmes poliméricos com diferentes proporções $R = [H^+] / [Matriz]$.

Com o contínuo aumento da quantidade de solução ácida o efeito ii) torna-se mais preponderante, caracterizando uma segunda fase com uma liberação mais rápida do que as demais, para as proporções 5,0 e 7,2. Como mencionado por Brinker, em uma condição de excesso de água espera-se a promoção de reações despolimerização⁷³, uma vez que pelo

princípio de Le Châtelier o equilíbrio será regido pela reação reversa apresentadas na figura 5.

Outro estudo mostra que a quantidade de água, inversamente proporcional a concentração de matriz, aumenta a viscosidade do gel até certo ponto, depois deste marco a viscosidade adquirida pelo gel diminui com a adição de água⁷².

Em outras palavras a difusão molecular do sistema é restringida pelo aumento de solvente inicial e, depois de certo ponto, este excesso facilita a difusão, pois a viscosidade é inversamente proporcional a difusão no sistema.

Sendo a liberação máxima de cada filme uma síntese da influência das duas fases no perfil obtido, a figura 12 descreve essa tendência.

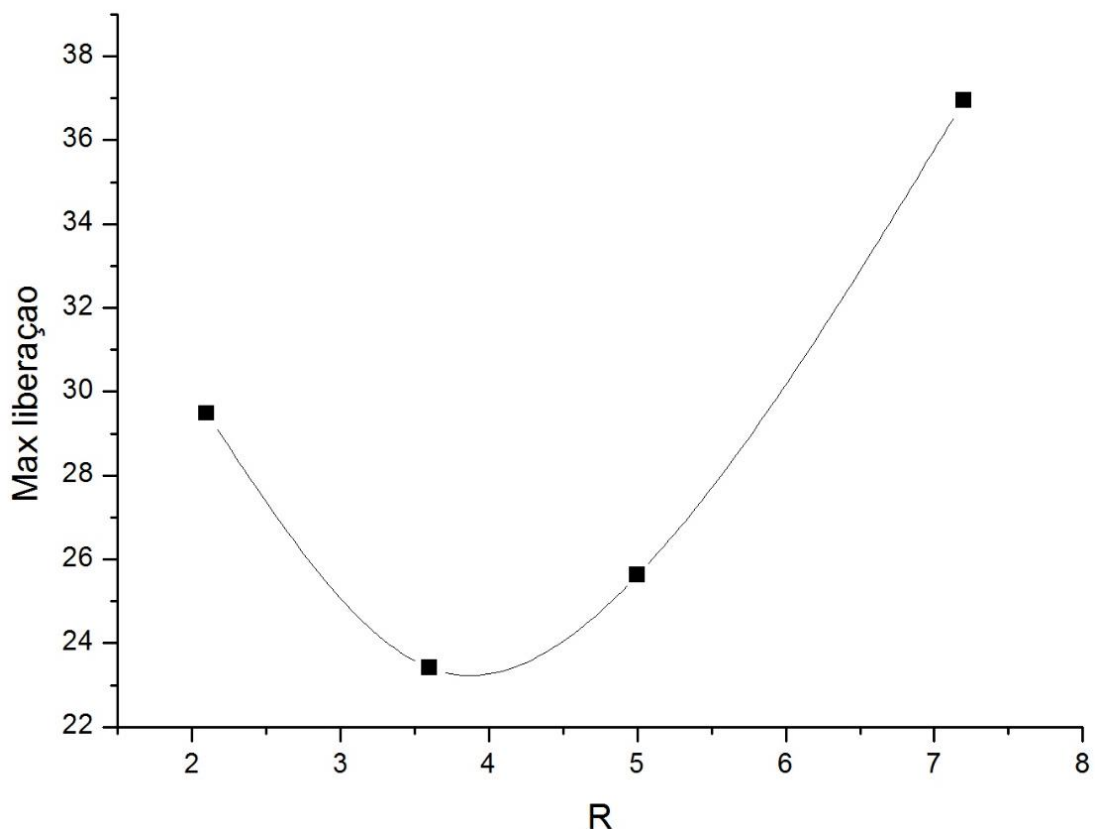


Figura 15: Pontos máximos de liberação em função das diferentes proporções R para um tempo de 1000 minutos.

Aplicando o modelo matemático de Korsmeyer-Peppas nas curvas do perfil de liberação obteve-se uma correlação média de 0,869 para as primeiras fases e 0,982 para a correlação as segundas fases.

Tabela 5: Expoente de difusão, correlação e mecanismo de liberação das amostras de diferentes proporções R envelhecidas durante 1 mês.

R	1º fase	2º fase
2,1	n = 0,733 R ² = 0,968 Não Fickiana	n = 0,129 R ² = 0,959 Materiais porosos
3,6	n = 0,833 R ² = 0,947 Não Fickiana	n = 0,356 R ² = 0,991 Materiais porosos
5,0	n = 0,188 R ² = 0,827 Materiais porosos	n = 0,341 R ² = 0,946 Materiais porosos
7,2	n = 0,193 R ² = 0,732 Materiais porosos	n = 0,301 R ² = 0,981 Materiais porosos

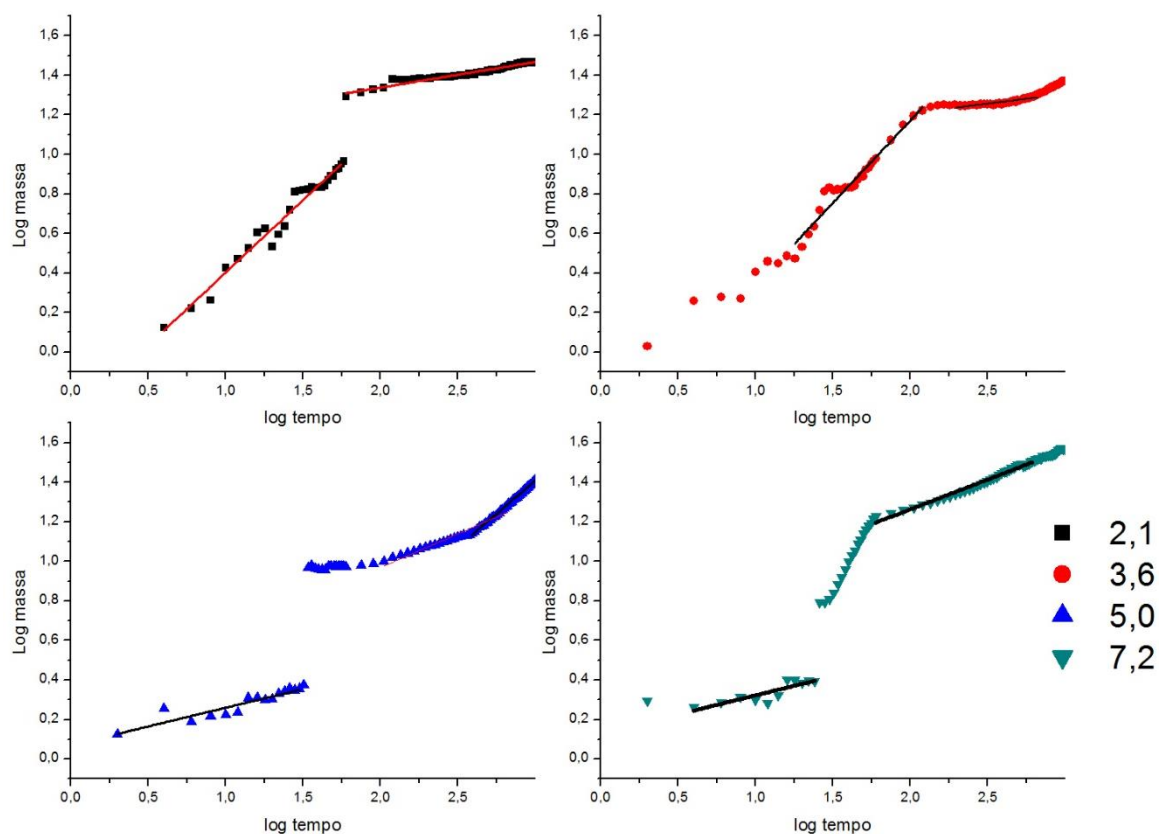


Figura 16: Perfil de liberação linearizado em escala log-log para filmes de proporções R diferentes envelhecidos por 1 mês.

O mecanismo não Fickiano descrito pelas primeiras fases das frações 2,1 e 3,6 envolve além da difusão molecular do peptídeo, fenômenos de intumescimento e erosão da matriz polimérica provocando um aumento brusco na concentração do peptídeo no meio receptor. Esse fenômeno ocorre devido ao monômero hidrofílico de óxido de polietileno (PEO) presente na estrutura do filme⁷⁴, podendo ser solubilizado uma vez que o meio for polar e também promover a absorção de água. Logo, uma maior concentração de matriz é capaz de alterar bruscamente a primeira fase de liberação visto que a taxa de dissolução matricial é mais elevada para maiores concentrações de grupos POE.

Já para a segunda fase de liberação o mecanismo descrito se dá por dissolução dos poros, caracterizado por uma liberação mais gradual e aparentemente independente da proporção de R.

Valores máximos de liberação obtidos revelam concentrações do peptídeo HS05 indo de 19 μM até aproximadamente 27 μM . Experimentos em meio bacteriano são necessários para se definir uma formulação otimizada do filme de modo que obtenha uma taxa de liberação necessária para a eliminação de microrganismos patogênicos.

7. Conclusão

Para o estudo da formulação de filmes poliméricos carreadores de drogas é levado em consideração diversas variáveis. Fatores estruturais da matriz, além de características do ativo e a interação entre ambos interferem na taxa de liberação do ativo para o meio receptor.

Embora a liberação seja regida por um conjunto complexo de variáveis isso também nos indica que há vários parâmetros capazes de modular esse processo que vão desde a escolha dos materiais iniciais até a natureza do catalisador utilizado na gelificação do híbrido.

Esta tecnologia, atrelada ao desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos de amplo espectro, torna-se uma poderosa ferramenta no combate contra mazelas causadas por microrganismos patogênicos no contexto de resistência microbiana atual.

8. Bibliografia

1. NORMAN, P. Immunobiology: The immune system in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* (1995). doi:10.1016/s0091-6749(95)70025-0
2. Gay, N. J. & Gangloff, M. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annu. Rev. Biochem.* (2007). doi:10.1146/annurev.biochem.76.060305.151318
3. Hetru, C., Troxler, L. & Hoffmann, J. A. *Drosophila melanogaster* Antimicrobial Defense. *J. Infect. Dis.* (2003). doi:10.1086/374758
4. Zanetti, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* (2004). doi:10.1189/jlb.0403147
5. Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y. & Su, Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* (2012). doi:10.1016/j.peptides.2012.07.001
6. Sohlenkamp, C. & Geiger, O. Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews* (2015). doi:10.1093/femsre/fuv008
7. Kandasamy, S. K. & Larson, R. G. Binding modes of protegrin-1, a beta-strand antimicrobial peptide, in lipid bilayers. in *Molecular Simulation* (2007). doi:10.1080/08927020701313737
8. Oren, Z. & Shai, Y. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* (1998). doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F
9. Wimley, W. C. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology* (2010). doi:10.1021/cb1001558
10. Bechinger, B. & Lohner, K. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (2006). doi:10.1016/j.bbamem.2006.07.001
11. Sørensen, O., Arnljots, K., Cowland, J. B., Bainton, D. F. & Borregaard, N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood* (1997).
12. Agerberth, B. *et al.* The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and α -defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* (2000).
13. Frohm, M. *et al.* The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J. Biol. Chem.* (1997). doi:10.1074/jbc.272.24.15258
14. Fry, D. E. Antimicrobial peptides. *Surg. Infect. (Larchmt)*. **19**, 804–811 (2018).
15. Ritonja, A., Kopitar, M., Jerala, R. & Turk, V. Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes. *FEBS Lett.* (1989). doi:10.1016/0014-5793(89)81093-2
16. Sørensen, O. E. *et al.* Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* (2001). doi:10.1182/blood.V97.12.3951
17. Pazgier, M. *et al.* Structural and functional analysis of the pro-domain of human cathelicidin, LL-37. *Biochemistry* (2013). doi:10.1021/bi301008r

18. Kahlenberg, J. M. & Kaplan, M. J. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. *J. Immunol.* (2013). doi:10.4049/jimmunol.1302005
19. Brand, G. D. *et al.* Probing Protein Sequences as Sources for Encrypted Antimicrobial Peptides. *PLoS One* **7**, (2012).
20. Sá, L. G. G. de. PROSPECÇÃO, SÍNTESE E APLICAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS INTRAGÊNICOS COM POTENCIAL NA CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS. (Universidade de Brasília, 2018).
21. Starheim, K. K., Gevaert, K. & Arnesen, T. Protein N-terminal acetyltransferases: When the start matters. *Trends in Biochemical Sciences* (2012). doi:10.1016/j.tibs.2012.02.003
22. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. *World Heal. Organ.* (2014). doi:9789241564748
23. Nathan, C. & Goldberg, F. M. Outlook: The profit problem in antibiotic R&D. *Nat. Rev. Drug Discov.* (2005). doi:10.1038/nrd1878
24. Spellberg, B., Powers, J. H., Brass, E. P., Miller, L. G. & Edwards, J. E. Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. *Clin. Infect. Dis.* (2004). doi:10.1086/420937
25. Finberg, R. W. *et al.* The Importance of Bactericidal Drugs: Future Directions in Infectious Disease. *Clin. Infect. Dis.* (2004). doi:10.1086/425009
26. JOSE M. MUNITA CESAR A. ARIAS. Antibiotic Resistance Mechanisms. *Journeys Med. Res. Three Cont. Over 50 Years* 95–99 (2017). doi:10.1142/9789813209558_0015
27. LaRock, C. N. & Nizet, V. Cationic antimicrobial peptide resistance mechanisms of streptococcal pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (2015). doi:10.1016/j.bbmem.2015.02.010
28. Ernst, C. M. *et al.* The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathog.* (2009). doi:10.1371/journal.ppat.1000660
29. Yu, G., Baeder, D. Y., Regoes, R. R. & Rolff, J. Predicting drug resistance evolution: Insights from antimicrobial peptides and antibiotics. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* (2018). doi:10.1098/rspb.2017.2687
30. Fantner, G. E., Barbero, R. J., Gray, D. S. & Belcher, A. M. Kinetics of antimicrobial peptide activity measured on individual bacterial cells using high-speed atomic force microscopy. *Nat. Nanotechnol.* (2010). doi:10.1038/nnano.2010.29
31. Green, B. D. *et al.* Metabolic stability, receptor binding, cAMP generation, insulin secretion and antihyperglycaemic activity of novel N-terminal Glu9-substituted analogues of glucagon-like peptide-1. *Biol. Chem.* (2003). doi:10.1515/BC.2003.171
32. Brinckerhoff, L. H. *et al.* Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-127-35 peptide: Implications for peptide vaccines. *Int. J. Cancer* (1999). doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19991029)83:3<326::AID-IJC7>3.0.CO;2-X
33. Werle, M. *et al.* The potential of cystine-knot microproteins as novel pharmacophoric scaffolds in oral peptide drug delivery. *J. Drug Target.* (2006). doi:10.1080/10611860600648254
34. Wu, X., Li, X., Zeng, Y., Zheng, Q. & Wu, S. Site-directed PEGylation of human basic fibroblast growth factor. *Protein Expr. Purif.* (2006). doi:10.1016/j.pep.2006.02.002
35. Hodgson, D. R. W. & Sanderson, J. M. The synthesis of peptides and proteins containing non-natural amino acids. *Chemical Society Reviews* (2004). doi:10.1039/b312953p
36. Delivery, C. D. Controlling drug delivery. *Pharm. Drug Deliv. Target.* (1999).
37. Lian, T. & Ho, R. J. Y. Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2001). doi:10.1002/jps.1023
38. Prausnitz, M. R. & Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology* (2008).

doi:10.1038/nbt.1504

39. Ribeiro, L. N. M. *et al.* Advances in Hybrid Polymer-Based Materials for Sustained Drug Release. *International Journal of Polymer Science* (2017). doi:10.1155/2017/1231464
40. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology. IUPAC Compendium of Chemical Terminology* (2009). doi:10.1351/goldbook
41. Bharambe, S. V., Darekar, A. B. & Saudagar, R. B. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *International Journal of Pharmacy and Technology* (2013). doi:10.1002/jps.21210
42. Santos, M.-K. M. S. ESTUDO DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS SILOXANOPOLIÉTER COMO DISPOSITIVOS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA DE PRINCÍPIOS ATIVOS. *Diss. (Mestrado em Ciências e Tecnol. em Saúde)—Universidade Brasília* (2015). doi:http://dx.doi.org/10.26512/2015.04.D.19293
43. José, N. M. & Sanchez De Almeida Prado, L. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. *Quimica Nova* (2005).
44. Souza, L. K. *et al.* Ureasil-polyether hybrid film-forming materials. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* (2013). doi:10.1016/j.colsurfb.2012.06.009
45. Oshiro, J. A. *et al.* Drug delivery systems obtained from silica based organic-inorganic hybrids. *Polymers* (2016). doi:10.3390/polym8040091
46. Sobczak, M., Debek, C., Oledzka, E. & Kozłowski, R. Polymer systems of antimicrobial peptides-strategies and potential applications. *Molecules* (2013). doi:10.3390/molecules181114122
47. Oshiro Junior, J. A., Carvalho, F. C., Soares, C. P., Chorilli, M. & Chiavacci, L. A. Development of cutaneous bioadhesive ureasil-polyether hybrid films. *Int. J. Polym. Sci.* (2015). doi:10.1155/2015/727324
48. Santilli, C. V., Chiavacci, L. A., Lopes, L., Pulcinelli, S. H. & Oliveira, A. G. Controlled drug release from ureasil-polyether hybrid materials. *Chem. Mater.* (2009). doi:10.1021/cm801899u
49. Hench, L. L. The sol-gel process - Chemical Reviews (ACS Publications). *Chem. Rev.* (1990).
50. Livage, J. Inorganic Materials, Sol-Gel Synthesis of. in *Encyclopedia of Materials: Science and Technology* 4105–4107 (Elsevier, 2001). doi:10.1016/b0-08-043152-6/00721-x
51. Livage, J. Sol-gel synthesis of hybrid materials. *Bull. Mater. Sci.* **22**, 201–205 (1999).
52. Brinker, C. J. & Scherer, G. W. Sol → gel → glass: I. Gelation and gel structure. *J. Non. Cryst. Solids* (1985). doi:10.1016/0022-3093(85)90103-6
53. Fonseca, M. G. da & Airoidi, C. Híbridos inorgânico-orgânicos derivados da reação de filossilatos com organossilanos. *Quim. Nova* (2003). doi:10.1590/s0100-40422003000500014
54. Judeinstein, P. & Sanchez, C. Hybrid organic-inorganic materials: A land of multidisciplinary. *J. Mater. Chem.* (1996). doi:10.1039/JM9960600511
55. Brinker, C. J., Hurd, A. J., Schunk, P. R., Frye, G. C. & Ashley, C. S. Review of sol-gel thin film formation. *Journal of Non-Crystalline Solids* (1992). doi:10.1016/S0022-3093(05)80653-2
56. Kelts, L. W., Effinger, N. J. & Melpolder, S. M. Sol-gel chemistry studied by ¹H and ²⁹Si nuclear magnetic resonance. *J. Non. Cryst. Solids* (1986). doi:10.1016/0022-3093(86)90248-6
57. Hench, L. L. & Wilson, M. J. R. Processing of gel-silica monoliths for optics. Drying behavior of small pore gels. *J. Non. Cryst. Solids* (1990). doi:10.1016/0022-3093(90)90138-C
58. Bae, K. H., Lee, Y. & Park, T. G. Oil-encapsulating PEO-PPO-PEO/PEG shell cross-linked nanocapsules for target-specific delivery of paclitaxel. *Biomacromolecules* (2007). doi:10.1021/bm0608939
59. Siegel, R. A. & Rathbone, M. J. Overview of controlled release mechanisms. in *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (2012). doi:10.1007/978-1-4614-0881-9_2

60. Petit, J. M., Roux, B., Zhu, X. X. & Macdonald, P. M. A new physical model for the diffusion of solvents and solute probes in polymer solutions. *Macromolecules* (1996). doi:10.1021/ma951159c
61. Gautam Singhvi, M. S. In-vitro drug release characterization models. *Int. J. Pharm. Stud. Res.* (2011).
62. Higuchi, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.* (1961). doi:10.1002/jps.2600501018
63. Ritger, P. L. & Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *J. Control. Release* (1987). doi:10.1016/0168-3659(87)90034-4
64. Mathematical models of drug release. in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (2015). doi:10.1016/b978-0-08-100092-2.00005-9
65. Waddell, W. J. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *J. Lab. Clin. Med.* (1956).
66. Barbosa, P. C. *et al.* Di-Ureasil hybrids doped with LiBF₄: Attractive candidates as electrolytes for 'Smart Windows'. *Int. J. Electrochem. Sci.* (2011).
67. Jovanovic, J. D., Govedarica, M. N., Dvornic, P. R. & Popovic, I. G. The thermogravimetric analysis of some polysiloxanes. *Polym. Degrad. Stab.* (1998). doi:10.1016/S0141-3910(97)00135-3
68. Vlad, S., Vlad, A. & Oprea, S. Interpenetrating polymer networks based on polyurethane and polysiloxane. *Eur. Polym. J.* (2002). doi:10.1016/S0014-3057(01)00233-6
69. Silva, S. S. *et al.* Functional nanostructured chitosan-siloxane hybrids. *J. Mater. Chem.* (2005). doi:10.1039/b505875a
70. Balcerzak, J. & Mucha, M. Analysis of Model Drug Release Kinetics from Complex Matrices of Polylactide-Chitosane. *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv.* (2010).
71. Brinker, C. J. *et al.* Structure-property relationships in thin films and membranes. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* (1995). doi:10.1007/BF00491678
72. Hench, L. L. & West, J. K. The Sol-Gel Process. *Chem. Rev.* (1990). doi:10.1021/cr00099a003
73. Brinker, C. J. Hydrolysis and condensation of silicates: Effects on structure. *J. Non. Cryst. Solids* (1988). doi:10.1016/0022-3093(88)90005-1
74. Wu, N., Wang, L. S., Tan, D. C. W., Moochhala, S. M. & Yang, Y. Y. Mathematical modeling and in vitro study of controlled drug release via a highly swellable and dissoluble polymer matrix: Polyethylene oxide with high molecular weights. *J. Control. Release* (2005). doi:10.1016/j.jconrel.2004.11.002