

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Lídia Pereira Barbosa Cordeiro

Síntese, análise conformacional, avaliação do potencial de liberação em implante de PLGA e ensaios de atividade antiangiogênica e de citotoxicidade do peptídeo PSAIWF-NH₂

Belo Horizonte
2021

UFMG/ICEX/DQ. 1.463
D. 795

Lídia Pereira Barbosa Cordeiro

Síntese, análise conformacional, avaliação do potencial de liberação em implante de PLGA e ensaios de atividade antiangiogênica e de citotoxicidade do peptídeo PSAIWF-NH₂

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof^o Dr. Jarbas Magalhães
Resende

Coorientador: Prof^a Dra. Elionai Cassiana de
Lima Gomes

Belo Horizonte

2021

Ficha Catalográfica

C794s Cordeiro, Lídia Pereira Barbosa
2021 Síntese, análise conformacional, avaliação do
D potencial de liberação em implante de PLGA e ensaios
de atividade antiangiogênica e de citotoxicidade do
peptídeo PSAIWF-NH₂ [manuscrito] / Lídia Pereira
Barbosa Cordeiro. 2021.
[xiv], 88 f. : il.

Orientador: Jarbas Magalhães Resende.
Coorientadora: Elionai Cassiana de Lima Gomes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses. 2. Peptídios - Síntese
- Teses. 3. Neovascularização - Teses. 4. Retina -
Doenças - Teses. 5. Retina - Vasos sanguíneos - Teses.
6. Análise conformacional - Teses. 7. Cromatografia
líquida de alta eficiência - Teses. 8. Espectrometria
de massa - Teses. 9. Copolímeros - Teses. I. Resende,
Jarbas Magalhães, Orientador. II. Gomes, Elionai
Cassiana de Lima, Coorientadora. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Síntese, Análise Conformacional, Avaliação do Potencial de Liberação Em Implante de PLGA e Ensaios de Atividade Antiangiogênica e de Citotoxicidade do Peptídeo PSAlWF-NH₂"

Lídia Pereira Barbosa Cordeiro

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Jarbas Magalhães Resende - Orientador
UFMG

Profa. Elionai Cassiana de Lima Gomes - Coorientadora
UFMG

Profa. Amanda Silva de Miranda
UFMG

Profa. Mariana Ramos de Almeida
UFMG

Belo Horizonte, 22 de setembro de 2021.

Documento assinado eletronicamente por **Jarbas Magalhaes Resende, Professor do Magistério Superior**, em 22/09/2021, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Silva de Miranda, Professora do Magistério Superior**, em 22/09/2021, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elionai Cassiana de Lima Gomes, Professora do Magistério Superior**, em 22/09/2021, às 12:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Ramos de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 22/09/2021, às 12:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0968024** e o código CRC **23C444C7**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus!

Aos meus pais, Eliana e Manoel pela expressão diária de cuidado e amor comigo!

Ao Professor Jarbas por tantas oportunidades concedidas, por toda orientação, apoio e estímulo nessa jornada que começou em 2015 e se estende até aqui! Muito obrigada!

À Professora Elionai (Lili) que com tanto carinho, humanidade e acolhimento tem me orientado! Muito obrigada!

Às minhas amigas Camila, Esther e Adriana!

Aos amigos e irmãos da IBSV!

À Adriana, do LMProt que com tanta disposição me ajudou!

Às amigas que fiz no LMProt, Adriana, Letícia, Aline e Rafaella. Os momentos de tensão com o HPLC foram muito aliviados com os cafés e almoços que tive com vocês!

Ao Júlio por todo estímulo de sempre!

Aos amigos do DQ-UFMG, Diego, Mozart, Nayara e Selma!

A todos os amigos do LASEP com quem pude conviver e aprender muito ao longo desses 6 anos, não somente sobre síntese e purificação, mas sobre a vida - Karla, Filipe, Virgílio, Marco, Breno, Amanda, Cláudia, Lucas, José, Izabella, Jade e Alessandra!

Às professoras Amanda, Mariana e Rosemeire por terem aceitado compor a banca de avaliação deste trabalho! Muito obrigada!

À professora Dayse que me estimulou a fazer a prova do mestrado!

Ao Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, agradeço pela infraestrutura!

Ao professor Armando da Silva Cunha Júnior por disponibilizar o laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG para a execução dos testes *CAM*.

À Lays Dourado do laboratório de Tecnologia Farmacêutica da FaFar, por toda ajuda e suporte nos testes *CAM*!

À Brenda que executou os ensaios *in vitro* na Fundação Ezequiel Dias!

Aos funcionários do Departamento de Química. Ao Victor, Mirra, Sr. Luiz, Alessandra, Simone, Fani, Edson, Edinho e Anderson!

Ao Departamento de Química pela infraestrutura!

Ao Programa de Pós-Graduação em Química!

À Fapemig pela concessão da bolsa de mestrado e às instituições de fomento, CAPES, Fapemig e CNPq pelo financiamento do projeto!

RESUMO

Este trabalho relata a obtenção do peptídeo PSAIWF-NH₂ por estratégia 9-fluorenilmetoxycarbonila (Fmoc) de síntese em fase sólida, sendo que este demonstrou previamente, em ensaios realizados pelo grupo de pesquisa, potencial atividade antiangiogênica. A caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência por detecção ultravioleta (CLAE-UV) e espectrometria de massas MALDI-ToF confirmaram a obtenção do peptídeo em altos rendimentos e pureza.

As análises por espectroscopia de dicroísmo circular evidenciaram que o peptídeo não adota conformação preferencial em meio aquoso, nem em soluções de 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) e água e nem na presença de micelas de n-docecilfosfolina (DPC). Por outro lado, ele apresenta estruturação significativa na presença de vesículas unilamelares grandes (*LUVs*) de POPC:POPG, indicando que o peptídeo possivelmente interage com a membrana aniônica, ou que as mesmas ainda induzem algum tipo de estruturação.

O ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (*CAM*) demonstrou melhor perfil de inibição angiogênica do peptídeo na concentração intermediária testada, o que indica relação não linear na dose-resposta, corroborando o seu potencial antiangiogênico. Além disso, o ensaio *in vitro* em células do epitélio pigmentar da retina (ARPE-19) não mostrou toxicidade do peptídeo nas condições testadas.

Foram produzidos implantes do peptídeo em matriz de poli (ácido lático-co-ácido glicólico) – PLGA. Ao serem testados quanto à liberação do hexapeptídeo, os implantes se mostraram eficientes em liberá-lo de forma prolongada e controlada ao longo de 39 dias. O perfil foi marcado por um *burst* de liberação, com decaimento e manutenção das concentrações, que se mantiveram em níveis comparáveis aos de inibição angiogênica testados no ensaio *CAM*.

Palavras-chave: Síntese de peptídeos, angiogênese, retinopatia, implante, membrana corioalantoica, citotoxicidade.

ABSTRACT

This work reports the synthesis of the peptide PSAIWF-NH₂ using the 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) solid phase approach. In a previous investigation performed by our research group, this peptide showed considerable antiangiogenic activity *in vivo*. Characterizations by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) and mass spectrometry MALDI-ToF confirmed the peptide obtention at higher yield and purity.

The conformational preferences of the peptide were investigated by circular dichroism spectroscopic. No conformational preference is observed neither in aqueous environments nor in 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) aqueous solutions. The absence of conformational preference also takes place in the presence of n-Docecylphosphocholine (DPC). On the other hand the spectra of the peptide in the presence of POPC:POPG (3:1) large unilamellar vesicles (LUVs) are consistent with peptide β -conformations, which indicate either affinity of the peptide to anionic membrane or that the anionic liposomes somehow induce this conformational preference. The *in vivo* assay using chorioallantoic membrane of chicken embryos (CAM) revealed the best profile of angiogenic inhibition at an intermediate concentration, indicating non-linear association between dose and response, corroborating the antiangiogenic potential of the peptide. Furthermore, *in vitro* assay at pigment epithelium retinal cells (ARPE-19) did not show peptide toxicity at tested concentrations.

Finally, the peptide was incorporated into poly(lactic acid-co-glycolic acid) - PLGA implants. As for the hexapeptide release, these implants seemed very efficient in providing controlled and sustained release of the peptide for 39 days. The profile was marked by an initial burst of release and a subsequently decay to concentration levels compatible to that of the angiogenic inhibition observed in the investigated CAM model.

Key-words: Peptide synthesis, angiogenesis, retinopathy, implant, chorioallantoic membrane, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**- Esquemática da estrutura ocular. Adaptada de (MALHOTRA et al., 2011). Com autorização para reprodução (Anexo A). 2
- Figura 2** - Fundoscopia ocular evidenciando estágio de RD proliferativa, destacando-se a presença de exsudato e novos vasos sanguíneos no disco óptico. Figura extraída de artigo de (WONG et al., 2016), com permissão para utilização (Anexo B). 3
- Figura 3** - Esquemática da angiogênese por brotamento. (1) A liberação de *VEGF* é estimulada por fatores como a baixa tensão de oxigênio (hipóxia). (2) O *VEGF* se liga aos receptores *VEGFR2* nas células endoteliais levando à diferenciação das células *tip* e a ativação angiogênica é contrabalanceada pela sinalização *notch*. (3) A partir da diferenciação das células *tip* ocorre a formação do broto vascular que resultará nos novos vasos sanguíneos. Figura extraída e adaptada do servidor biorender.com. 6
- Figura 4** - Estrutura do Fator de crescimento endotelial vascular-A (*VEGF-A*). Extraída do servidor rcsb.org. Protein Data Bank: 2VPF. 6
- Figura 5** - Esquemática do mecanismo angiogênico. Ativação dos receptores tirosina-quinase pelo *VEGF-A*, seguido da dimerização e fosforilação de resíduos de tirosina no segmento citosólico dos receptores *VEGFRs*, ativando as vias sinalizadoras de proliferação, migração e permeabilidade celular que resultam na resposta angiogênica (neoformação vascular). Figura elaborada no servidor biorender.com. 7
- Figura 6** - Conversão do MTT a formazan (roxo) por enzimas oxirredutases mitocondriais. 10
- Figura 7** - Estruturas dos L-aminoácidos essenciais. 12
- Figura 8** - Representações das duas principais conformações secundárias assumidas pelos peptídeos, alfa-hélice e conformação beta (fita-beta em grampo). Adaptada de (ZHANG; ZHAO; ZHENG, 2014), com autorização para reprodução (Anexo C). 13
- Figura 9** - Representação esquemática da resina *Wang*, evidenciando-se as unidades monoméricas: estireno e divinilbenzeno e o ligante álcool 4-benziloxibenzílico. Adaptada de (MARQUARDT; EIFLER-LIMA, 2001). 14
- Figura 10** - Representações das resinas clorotritil, *Merrifield*, diidropirano e *Rink Amide*, evidenciando-se os grupos ligantes de cada uma. 15
- Figura 11** - Esquemática da estratégia Boc/Bn de síntese em fase sólida, evidenciando-se a remoção do grupo Boc pelo emprego de TFA e a remoção do peptídeo pelo uso de HF. Adaptada de (CHAN, WENG; WHITE, PETER, 2000). 16
- Figura 12** - Esquemática da estratégia Fmoc de síntese em fase sólida, utilizando-se a

resina <i>Rink Amide</i> . Adaptado de (VERLY, 2010).....	17
Figura 13 - Estruturas químicas dos ativadores comumente utilizados em SPFS. Adaptado de (AMBLARD et al., 2006a).....	18
Figura 14 - Mecanismo de ativação com DIC e HOBt. Adaptado de (GUSMÃO, 2014).....	19
Figura 15 - Mecanismo de desproteção do grupamento amino protegido com o grupo Boc, empregando-se ácido trifluoroacético. Adaptada de (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).	20
Figura 16 - Mecanismo de desproteção do grupamento amino protegido com o grupo Fmoc, empregando-se 4-metilpiperidina. Adaptada de (GUIMARÃES, 2017).	20
Figura 17 - Mecanismo do teste de Kaiser para o monitoramento das etapas de acoplamento e desproteção. Adaptada de (VERLY, 2010).....	21
Figura 18 - Mecanismo de clivagem de um peptídeo amidado na porção C-terminal. Adaptada de (GUSMÃO, 2014).	22
Figura 19 - Esquematização do processo cromatográfico. Adaptada de (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).	23
Figura 20 - Esquematização das etapas da análise por espectrometria de massas <i>MALDI</i> . Adaptada de (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).	24
Figura 21 - À esquerda, luz planarmente polarizada composta pela sobreposição dos componentes circularmente polarizados à esquerda (L) e à direita (R) opostos e de igual magnitude. À direita, luz elipticamente polarizada, resultante da sobreposição dos componentes circularmente polarizados à esquerda (L) e à direita (R) opostos e de diferentes magnitudes. Extraída de (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Com permissão para reprodução (Anexo D).....	24
Figura 22 - Representação dos espectros de dicroísmo circular associados às estruturas alfa-helicoidal, folha beta e randômica. Adaptada de < https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/ > Acesso em 08 de agosto de 2021.	26
Figura 23 - Estrutura do copolímero PLGA.	27
Figura 24 - Gráfico representativo das etapas de liberação de fármacos a partir de implantes de PLGA, em termos do percentual de liberação acumulada em função do tempo. Adaptado de (LEE et al., 2010).	27
Figura 25 - Estrutura primária do peptídeo PSAIWF-NH ₂	28
Figura 26 - Esquematização das etapas da síntese em fase sólida do peptídeo PSAIWF-NH ₂	30
Figura 27 - Estruturas do detergente e lipídeos usados nas análises de dicroísmo circular. (A)	

n-dodecilsfosfocolina (DPC), (B) 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e (C) 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfo-glicerol (POPG)..... 34

Figura 28 - Fotografias dos ovos usados no ensaio CAM. (A) Ovos embrionados dispostos na incubadora, (B) Ovos embrionados com membranas corioalantoicas expostas e (C) Membrana corioalantoica, evidenciando-se os vasos sanguíneos..... 47

Figura 29 - Esquematização das etapas envolvidas no ensaio CAM. (1) exposição da membrana corioalantoica, (2) instilação da solução na membrana corioalantoica, (3) obtenção das imagens das membranas corioalantoicas e (4) mensuração da área vascular pelo *software* ImageJ. 48

Figura 30 - Esquematização da análise das imagens obtidas no ensaio CAM no *software* ImageJ 2.0. (1) abertura da imagem no *software* ImageJ 2.0, (2) delimitação da área a ser mensurada, (3) alteração da escala de cor evidenciando os vasos sanguíneos e (4) obtenção da área vascular em *pixels*..... 49

Figura 31 - (A) Perfil cromatográfico de purificação do peptídeo PSAIWF-NH₂ evidenciando tempo de retenção de 17,56 minutos, (B) Perfil cromatográfico pós purificação do peptídeo PSAIWF-NH₂ evidenciando tempo de retenção de 20,05 minutos e (C) Espectro de massas do peptídeo PSAIWF-NH₂ evidenciando os sinais de razão massa/carga 718,56, 740,45 e 758,87 correspondentes ao peptídeo protonado e aos adutos de sódio e potássio. 52

Figura 32 - Espectros de dicroísmo circular do peptídeo PSAIWF-NH₂ a 0,1 mg.mL⁻¹. (A) na presença de micelas de DPC (faixa de concentração de detergente de 1 a 20 mmol.L⁻¹), (B) em soluções TFE:H₂O na faixa de concentração de 0 a 80% (v/v) de cossolvente e (C) na presença de LUVs de POPC:POPG (3:1 mol:mol) (faixa de concentração lipídica de 0,5 a 1,5 mmol.L⁻¹)..... 53

Figura 33 - Perfis cromatográficos CLAE-UV pós purificação e rendimentos dos peptídeos PCAIWF-NH₂, PCAIWF-OH, PSAIWF-NH₂ e PSAIWF-OH. (A) Perfil cromatográfico do peptídeo PCAIWF- NH₂ evidenciando-se a detecção em 4,42 minutos e rendimento de 23,5%. (B) Perfil cromatográfico do peptídeo PCAIWF-OH evidenciando-se a detecção em 5,61 minutos e rendimento de 8,3%. (C) Perfil cromatográfico do peptídeo PSAIWF-NH₂ evidenciando a detecção em 3,81 minutos e rendimento de 31,2%. (D) Perfil cromatográfico do peptídeo PSAIWF-OH evidenciando a detecção em 4,76 minutos e rendimento de 11,4%. Resultados obtidos por (CORDEIRO, 2018). 55

Figura 34 - À esquerda, imagens estereomicroscópicas das membranas corioalantoicas dos contoles e do peptídeo PCAIWF-OH nas concentrações de 5,0, 50,0 e 500,0 µg.mL⁻¹. À direita, percentual de área vascular. Controle negativo fixado em 100%. Percentual de

inibição causado pelo controle positivo (bevacizumabe a 250,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e pelo peptídeo nas concentrações supracitadas ($p < 0,05$). Resultados obtidos por CORDEIRO, 2018..... 56

Figura 35 - À esquerda, imagens estereomicroscópicas das membranas corioalantoicas dos controles e dos peptídeos na concentração de 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. À direita, percentual de área vascular. Controle negativo fixado em 100%. Percentual de inibição causado pelo controle positivo (bevacizumabe a 250,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e pelos peptídeos na concentração de 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($p < 0,05$). Resultados obtidos por CORDEIRO, 2018..... 57

Figura 36 - Imagens estereomicroscópicas das membranas corioalantoicas aplicadas com os controles e o PSAIWF-NH₂ nas concentrações de 2,5, 5,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 58

Figura 37 - Viabilidade de células ARPE-19 após incubação por 24, 48 e 72 horas com o peptídeo PSAIWF-NH₂ nas concentrações de 2,5, 5,0, 10, 15 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 60

Figura 38 - Cromatogramas sobrepostos referentes às soluções do peptídeo PSAIWF-NH₂ nas concentrações de 2,503, 4,947, 9,953, 19,668, 39,932, 59,600 e 79,268 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 61

Figura 39 - Gráfico concentração versus resíduo. 62

Figura 40 - Curva analítica sem os pontos outliers, em 7 níveis de concentração do peptídeo PSAIWF-NH₂ na faixa de 2,49 a 78,96 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 65

Figura 41 - (A) Gráfico da distribuição dos resíduos em função das concentrações - indicação qualitativa da homoscedasticidade residual. (B) Tabela com os parâmetros estatísticos do teste de Brown-Forsythe, a estatística t_L é o principal parâmetro que determina a homoscedasticidade residual, devendo ser menor que o valor de t crítico a 97,5% de confiança. (C) Gráfico da distribuição dos resíduos ordenados em função dos valores normais esperados, o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner (R) deve ser maior que o valor de $R_{crítico}$ a 95% de confiança para indicar normalidade dos resíduos. (D) Gráfico de Durbin-Watson da autocorrelação residual. A distribuição aleatória é indicativo qualitativo de que os resíduos são independentes. A estatística d define a 95% de confiança se os resíduos estão autocorrelacionados. 67

Figura 42 - Implantes obtidos de PLGA contendo o peptídeo PSAIWF-NH₂. 69

Figura 43 - Espectro de massas do peptídeo PSAIWF-NH₂ após aquecimento a cerca de 100 °C..... 69

Figura 44 - Perfis de liberação do peptídeo PSAIWF-NH₂ a partir de implantes de PLGA. (A) Perfil percentual de liberação acumulada do peptídeo PSAIWF-NH₂ a partir de implantes de PLGA por 39 dias e (B) Perfil percentual de liberação do peptídeo PSAIWF-NH₂ a partir de implantes de PLGA por 39 dias..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições cromatográficas da análise exploratória da amostra bruta.....	32
Tabela 2 - Condições cromatográficas de purificação do peptídeo PSAIWF-NH ₂	32
Tabela 3 - Condições cromatográficas de caracterização do peptídeo.	33
Tabela 4 - Diluições da solução estoque 0,596 µg.mL ⁻¹	36
Tabela 5 - Diluições da solução estoque 0,590 µg.mL ⁻¹	36
Tabela 6 - Diluições da solução estoque 0,595 µg.mL ⁻¹	37
Tabela 7 - Condições cromatográficas de análise das soluções da curva analítica.	37
Tabela 8 - Equações para estimativa das somas quadráticas, graus de liberdade e médias quadráticas da regressão, dos resíduos, da falta de ajuste e do erro puro.	41
Tabela 9 - Relação das massas pesadas dos derivados de aminoácidos (d.a.) e HOBt, volumes de DIC, DMF e DCM, tempo de cada acoplamento e resultados dos testes de Kaiser da síntese do peptídeo PSAIWF-NH ₂	51
Tabela 10 - Parâmetros da ANOVA do modelo de regressão linear inicial - SQ_R , SQ_r , SQ_{faj} , SQ_{ep} , SQ_T , GL_R , GL_r , GL_{faj} , GL_{ep} , GL_T , MQ_R , MQ_r , MQ_{faj} , MQ_{ep} , MQ_T , R_2 e valores de F calculado e crítico.	63
Tabela 11 - Resíduos padronizados de Jackknife dos respectivos pontos da curva analítica inicial.....	64
Tabela 12 - Parâmetros da ANOVA do modelo de regressão linear inicial - SQ_R , SQ_r , SQ_{faj} , SQ_{ep} , SQ_T , GL_R , GL_r , GL_{faj} , GL_{ep} , GL_T , MQ_R , MQ_r , MQ_{faj} , MQ_{ep} , MQ_T , R_2 e valores de F calculado e crítico.	66
Tabela 13 - Relação da massa total e de peptídeo (mg) dos implantes.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

AIE	Anti-inflamatório Esteroidal
ANOVA	Análise de Variância, do inglês <i>Analysis of Variance</i>
APD	Base de Dados de Peptídeos Antimicrobianos, do inglês <i>Antimicrobial Peptide Database</i>
Bn	Benzil
Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonil
CAM	Membrana Corioalantoica, do inglês <i>Chorioallantoic Membrane</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DHP	Diidropirano
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DM	Diabetes mellitus
DMEM-F12	Meio Eagle Modificado por Dulbecco - Mistura nutriente F-12, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DPC	<i>n</i> -dodecilsfosfocolina, do inglês <i>n-dodecylphosphocholine</i>
DVB	Divinilbenzeno
EMD	Edema Macular Diabético
EPR	Epitélio Pigmentar da Retina
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico, do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i>
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonil
HBTU	hexafluorofosfato <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)urônio
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
IgG1	Imunoglobulina G1
IPA	Isopropanol
LUV	Vesícula Unilamelar Grande, do inglês <i>Large Unilamelar Vesicle</i>
MALDI-ToF	Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo, do inglês <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i>
MTT	3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5,-difeniltetrazolil

NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo
OLSM	Método dos mínimos quadrados ordinários, do inglês <i>Ordinary Least Squares Method</i>
P.A.	Para Análise
Pbf	2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofurano sulfonil
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), do inglês <i>Poly(lactic acid-co-glycolic acid)</i>
PIGF	Fator de Crescimento Placentário, do inglês <i>Placental Growth Factor</i>
POPC	1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina, do inglês <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine</i>
POPG	1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoglicerol, do inglês <i>1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphoglycerol</i>
PS	Poliestireno
PSA	Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina B, do inglês <i>Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B - Nutrient Mixture F-12</i>
PyBOP	benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-hexafluorofosfato de fosfônio
RD	Retinopatia Diabética
RDP	Retinopatia Diabética Proliferativa
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
TBTU	tetrafluoroborato de <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio
TFA	Ácido Trifluoroacético, do inglês <i>Trifluoroacetic Acid</i>
TFE	Trifluoroetanol
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento Beta, do inglês <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TIS	Triisopropilsilano
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa, do inglês <i>TumorNecrosis Factor alpha</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	Receptor para Fator de Crescimento Endotelial Vascular, do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Estrutura ocular e retinopatia diabética.....	1
1.2 Abordagens terapêuticas da retinopatia diabética	4
<i>1.2.1 Fotocoagulação a laser.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.2 Vitrectomia.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.3 Anti-inflamatórios esteroidais intraoculares.....</i>	<i>4</i>
<i>1.2.4 Terapia anti-VEGF.....</i>	<i>5</i>
1.3 Angiogênese.....	5
1.4 Avaliação da angiogênese pelo modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM).....	9
1.5 Citotoxicidade em células ARPE-19.....	9
1.6 Sequências peptídicas com atividade anti-VEGFR.....	10
1.7 Síntese de peptídeo em fase sólida	11
<i>1.7.1 Resinas.....</i>	<i>13</i>
<i>1.7.2 Estratégias Boc e Fmoc</i>	<i>15</i>
<i>1.7.3 Acoplamento</i>	<i>17</i>
<i>1.7.4 Desproteção.....</i>	<i>19</i>
<i>1.7.5 Teste de Kaiser.....</i>	<i>20</i>
<i>1.7.6 Clivagem</i>	<i>21</i>
1.8 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	22

1.9	Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (<i>MALDI-ToF</i>)	23
1.10	Espectroscopia de dicroísmo circular	24
1.11	Sistemas de liberação controlada e prolongada	26
2.	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivos gerais.....	28
2.2	Objetivos específicos	28
3.	METODOLOGIA.....	29
3.1	Materiais	29
3.2	Síntese em fase sólida do peptídeo PSAIWF-NH ₂	29
3.3	Purificação do peptídeo por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterização por espectrometria de massas <i>MALDI-ToF</i>	31
3.4	Espectroscopia de dicroísmo circular	33
3.5	Desenvolvimento de sistemas poliméricos de liberação do peptídeo e quantificação por CLAE	35
3.5.1	<i>Desenvolvimento dos implantes poliméricos de PLGA contendo o peptídeo PSAIWF-NH₂</i>	35
3.5.2	<i>Delineamento experimental</i>	36
3.5.3	<i>Proposição do modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários</i>	38
3.5.3.1	<i>Teste dos resíduos padronizados de Jackknife - detecção de outliers</i>	38
3.5.3.2	<i>Análise de Variância (ANOVA) e limites de detecção e quantificação</i>	39
3.5.3.3	<i>Teste da normalidade dos resíduos de Ryan-Joiner</i>	44
3.5.3.4	<i>Teste de homoscedasticidade de Brown e Forsythe</i>	45
3.5.3.5	<i>Teste de independência dos resíduos de Durbin-Watson</i>	46
3.6	Avaliação da atividade antiangiogênica do peptídeo PSAIWF-NH ₂ em modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha	46
3.7	Avaliação da citotoxicidade do peptídeo PSAIWF-NH ₂ em célula do epitélio	

pigmentar da retina ARPE-19	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Obtenção do peptídeo PSAIWF-NH₂ e caracterização.....	51
4.2 Espectroscopia de dicroísmo circular	53
4.3 Atividade antiangiogênica	54
4.4 Toxicidade <i>in vitro</i>.....	59
4.5 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-UV para quantificação do peptídeo PSAIWF-NH₂.....	60
4.5.1 Proposição do modelo linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários..	60
4.5.2 Detecção de outliers - teste dos resíduos padronizados de Jackknife	63
4.5.3 Curva analítica sem outliers - ANOVA e testes residuais.....	64
4.6 Liberação do peptídeo PSAIWF-NH₂ a partir de implantes de PLGA	67
5. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICE A	80
ANEXO A.....	81
ANEXO B.....	83
ANEXO C.....	85
ANEXO D.....	87

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma das síndromes metabólicas mais prevalentes atualmente, acometendo 425 milhões de adultos em todo o mundo, com estimativa de aumento do número de pessoas acometidas de 62% até 2045 nas Américas do Sul e Central (IDF DIABETES ATLAS, 2019). O estado hiperglicêmico, que marcadamente caracteriza o diabetes, pode acarretar em complicações macro e microvasculares como doença arterial coronariana, neuropatias, nefropatias e retinopatias.

A retinopatia diabética (RD) atinge cerca de um terço das pessoas portadoras de DM e é a causa principal de perda da acuidade visual entre aquelas com idade ativa de trabalho (20-65 anos) (IDF DIABETES ATLAS, 2019). Conforme estimativa da *International Association on the Prevention of Blindness (IAPB)* no ano de 2015, 145 milhões de pessoas apresentaram alguma forma de RD; dessas, 45 milhões sofreram perda da visão.

Além do cuidado preventivo de intenso controle glicêmico, arterial e lipidêmico, o tratamento disponível para os pacientes acometidos pela RD pode proporcionar uma redução da progressão da doença em estágios avançados que têm o componente do processo de neovascularização (angiogênese), como a retinopatia diabética proliferativa (RDP), bem como retardar o surgimento de tal complicação, quando não manifestada. Os tratamentos consistem na fotocoagulação a laser, na vitrectomia e em injeções intravítreas de fármacos que inibem fatores de crescimento endoteliais vasculares - anti-*VEGFs* e, em alguns casos, anti-inflamatórios esteroidais - AIEs (SOLOMON et al., 2017). As injeções intravítreas devem ser aplicadas periodicamente, o que configura um procedimento bastante invasivo, de baixa adesão e comodidade para os indivíduos, uma vez que gera dor e ansiedade bem como o risco de complicações (BOYLE et al., 2014).

Diante dos inconvenientes relacionados às terapias disponíveis para o tratamento da RD, pesquisas têm sido realizadas com o intuito de evidenciar novas moléculas ativas, bem como buscar alternativas de tratamento mais cômodas, por meio da elaboração de formulações farmacêuticas baseadas em sistemas poliméricos de liberação controlada e prolongada, que proporcionariam manutenção dos níveis terapêuticos por um período de tempo maior (DA SILVA et al., 2010; LI, 2012)

1.1 Estrutura ocular e retinopatia diabética

O olho constitui um dos órgãos sensoriais mais complexos do corpo humano, dividindo-se em três camadas: externa, composta pela esclera e a córnea; intermediária,

compreendendo a coróide, corpo ciliar e a íris, e a camada interna, composta pela retina (Figura 1). A esclera é um tecido fibroso e denso, que tem função protetora e mantém a forma ocular, sendo coberta por uma membrana visível, denominada conjuntiva. A córnea é uma camada transparente, com funções refrativa e transmissora da luz para o cristalino (lente) e a retina. Na porção intermediária, a íris controla o tamanho da pupila, de modo a orientar a quantidade de luz que alcança a retina; já o corpo ciliar controla a lente e a produção do humor aquoso (fluido de baixo conteúdo proteico, que preenche as câmaras anterior e posterior do olho). A retina está presente no segmento posterior do olho, sendo composta por células fotorreceptoras (cones e bastonetes), com destaque à fóvea, área de maior acuidade visual (com predomínio de cones) no polo posterior e envolvida pela mácula lútea. O suprimento sanguíneo da retina provém tanto dos vasos retiniais, que suprem a retina interior, quanto dos capilares coroidais, que suprem a retina externa. A câmara vítrea é a maior câmara ocular, localizada na porção posterior do olho e preenchida pelo humor vítreo (também chamado de vítreo), um fluido incolor composto por água e uma mistura de proteínas, colágeno, sais e carboidratos, que desempenha importante função de manutenção da forma ocular e sustentação da retina (WILLOUGHBY et al., 2010). A Figura 1 esquematiza as camadas e componentes oculares.

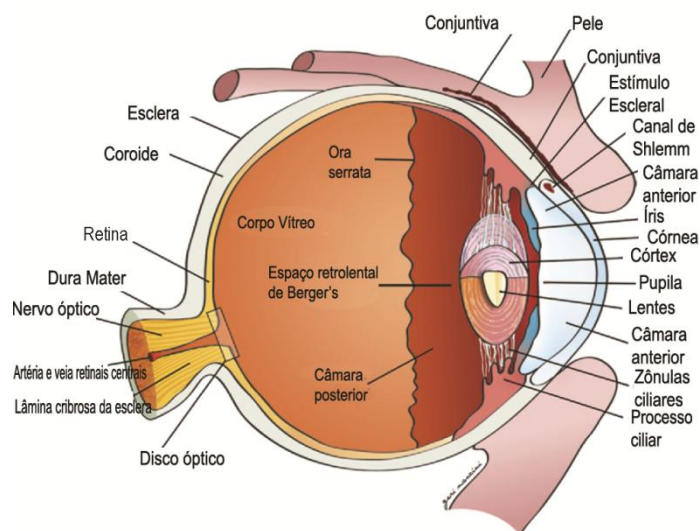


Figura 1- Esquemática da estrutura ocular. Adaptada de (MALHOTRA et al., 2011). Com autorização para reprodução (Anexo A).

Dentre as doenças que acometem a retina, destaca-se a retinopatia diabética (RD), uma complicação microvascular do diabetes mellitus, que pode ser não proliferativa (leve, moderada e grave) e proliferativa (fase caracterizada pelo crescimento anormal de vasos sanguíneos na retina), podendo-se observar em qualquer um dos estágios o desenvolvimento

de edema macular diabético – EMD (WONG et al., 2016). Estudos epidemiológicos têm evidenciado que o risco de desenvolvimento e progressão da retinopatia pode ser reduzido pelo controle dos níveis glicêmicos e da pressão sanguínea (GARDNER, 2012; MOHAMED; GILLIES; WONG, 2009; WONG et al., 2016). Quanto ao tratamento, a fotocoagulação a laser pode ser útil para prevenção da perda de visão leve a moderada em pacientes com EMD ou RD proliferativa. Em associação à fotocoagulação a laser, a terapia anti-fator de crescimento endotelial vascular (anti-VEGF) tem sido relacionada à melhoria da qualidade de vida dos acometidos pelo edema macular e indicada para o tratamento de RD proliferativa (WONG et al., 2016).

O principal fator patogênético associado à RD proliferativa é a hipóxia, que leva ao desequilíbrio entre os fatores angiogênicos e anti-angiogênicos, com predominante estímulo angiogênico, culminando na neovascularização, a principal característica da RD proliferativa (Figura 2). São formados, portanto, vasos frágeis que, conseqüentemente, são propensos ao rompimento, tendendo ao desenvolvimento em direção ao corpo vítreo, onde estão eventualmente ancorados por meio de tecido fibrovascular que, em caso de contração, pode resultar em deslocamento tracional da retina, acompanhado de perda grave da visão. O descolamento retinal e a hemorragia intravítrea constituem o estado avançado da RD (SIMÓ et al., 2006).

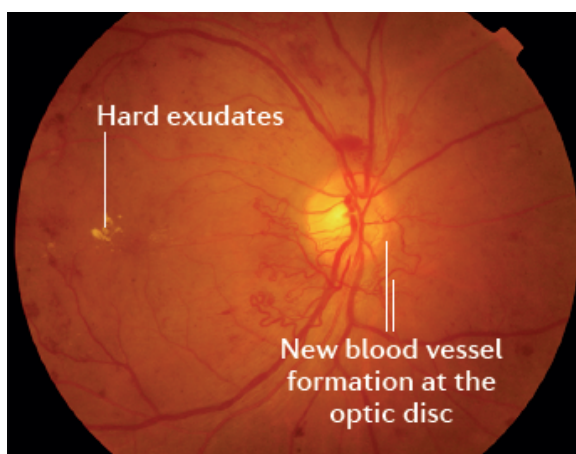


Figura 2 - Fundoscopia ocular evidenciando estágio de RD proliferativa, destacando-se a presença de exsudato e novos vasos sanguíneos no disco óptico. Figura extraída de artigo de (WONG et al., 2016), com permissão para utilização (Anexo B).

1.2 Abordagens terapêuticas da retinopatia diabética

1.2.1 Fotocoagulação a laser

O mecanismo de ação da fotocoagulação a laser não está ainda totalmente elucidado, porém uma hipótese é que o procedimento aliviaria a hipóxia e afetaria a hemodinâmica da circulação da retina. A melhora da oxigenação reduz a neovascularização e a formação de edema, por redução da produção de *VEGFs* e outros fatores. A fotocoagulação é tida como primeira escolha para o tratamento de RD proliferativa por dois estudos clínicos, o “*Diabetic Retinopathy Study*” e o “*Early Treatment Diabetic Retinopathy Study*” (CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2010).

O objetivo principal para muitos pacientes recebendo a terapia a laser é preservar a visão útil e prevenir a perda da acuidade visual. Porém, a fotocoagulação a laser está associada a efeitos adversos oculares significativos como a indução de escotoma – alteração da acuidade visual parcial ou total e neovascularização secundária, devido à natureza destrutiva do laser à retina (WONG et al., 2016).

1.2.2 Vitrectomia

A vitrectomia (remoção cirúrgica do humor vítreo) pode ser necessária àquelas pessoas com grau de RD avançado, as quais não respondem à fotocoagulação a laser e à terapia anti-*VEGF* ou ainda àquelas que têm hemorragia intravítrea persistente e/ou descolamento tracional da retina. O procedimento oferece efeitos benéficos e prejudiciais aos pacientes, reduzindo o risco de neovascularização retinal e edema macular, enquanto aumenta o risco de neovascularização na íris e formação de catarata (CHEUNG; MITCHELL; WONG, 2010).

1.2.3 Anti-inflamatórios esteroidais intraoculares

As administrações intraoculares dos anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e agentes anti-*VEGF's* foram introduzidas no ano 2000 como novas modalidades de tratamento para o EMD e a RD proliferativa. Os AIEs suprimem múltiplas vias de inflamação e têm sido, portanto, associados à opção terapêutica para o edema macular, principalmente em casos de pacientes refratários à fotocoagulação a laser (WONG et al., 2016). Além disso, os AIEs, sub-regulam a expressão dos *VEGFs*, bem como reduzem a indução de tais fatores por mediadores inflamatórios. No entanto, a terapia demonstra risco aumentado de endoftalmite infecciosa, devido às propriedades imunossupressoras dos corticosteroides, demandando cautela na sua

escolha. Alguns exemplos de medicamentos aprovados incluem o Ozurdex[®] (dexametasona) e o Iluvien[®] (fluocinolona acetona).

1.2.4 Terapia anti-VEGF

A angiogênese é um evento chave da RD, particularmente em estágios mais graves (RD proliferativa e EMD). Desta forma a terapia anti-*VEGF* é direcionada à inibição direta do fator de crescimento endotelial vascular-A, de modo a conter a neovascularização. Atualmente existem três fármacos comumente utilizados, bevacizumabe (anticorpo monoclonal), ranibizumabe (fragmento fab do bevacizumabe) e aflibercept (proteína recombinante de porções extracelulares dos *VEGFRs* 1 e 2), os quais têm demonstrado superioridade clínica na melhoria da acuidade visual em comparação à fotocoagulação a laser no tratamento do EMD (KOROBELNIK et al., 2014; RAJENDRAM et al., 2015; SCOTT; STOCKDALE; SUN, 2010).

1.3 Angiogênese

A angiogênese, processo de neoformação vascular a partir de vasos sanguíneos preexistentes, permeia condições fisiológicas como a embriogênese, a cicatrização de feridas e a renovação vascular, assim como é componente patofisiológico do câncer, doenças reumatológicas e retinopatias. Os mecanismos moleculares envolvidos no fenômeno angiogênico são complexos e envolvem uma conjuntura de citocinas e receptores, que culminam na ativação de cascatas sinalizadoras celulares e em respostas de diferenciação, proliferação, migração e permeabilidade vascular (SHAIK et al., 2020) (CARMELIET; JAIN, 2011) (ADAMS; ALITALO, 2007). A Figura 3 esquematiza as etapas do processo angiogênico por brotamento.

Um dos principais estímulos à angiogênese é a hipóxia (baixa tensão de oxigênio), que induz a produção e liberação de fatores pró-angiogênicos como o fator de crescimento fibroblástico (*FGF*) fator de crescimento transformador β (*TGF- β*) e o fator de crescimento endotelial vascular-A (*VEGF-A*), sendo este último o principal mediador pró-angiogênico. A isoforma humana *VEGF-A*₁₆₅ é uma glicoproteína homodimérica de 27 kDa (Figura 4) que, ao se ligar aos receptores tirosina quinase para fatores de crescimento endoteliais vasculares (*VEGFRs*) - especialmente o *VEGFR-2* - promove a dimerização dos receptores, levando à fosforilação de resíduos de tirosina no segmento intracelular citosólico, o que resulta em ativação das vias celulares associadas à proliferação celular - *Ras-Raf-MEK-ErK*, migração celular - *p38-MAPK*, e permeabilidade vascular - *PI3K-Akt*, configurando a resposta

angiogênica. A Figura 5 esquematiza a cascata de ativação angiogênica.

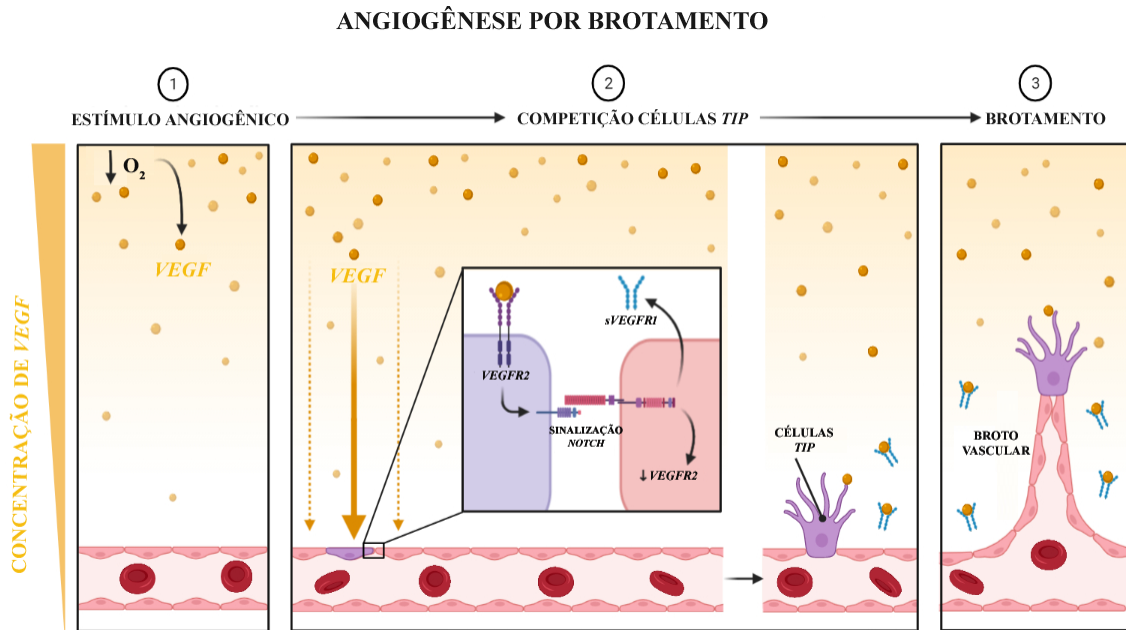


Figura 3 - Esquemática da angiogênese por brotamento. (1) A liberação de *VEGF* é estimulada por fatores como a baixa tensão de oxigênio (hipóxia). (2) O *VEGF* se liga aos receptores *VEGFR2* nas células endoteliais levando à diferenciação das células *tip* e a ativação angiogênica é contrabalanceada pela sinalização *notch*. (3) A partir da diferenciação das células *tip* ocorre a formação do broto vascular que resultará nos novos vasos sanguíneos. Figura extraída e adaptada do servidor biorender.com.

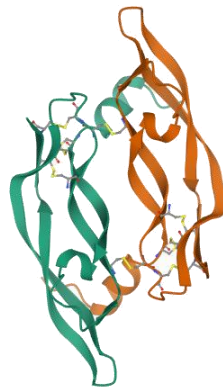


Figura 4 - Estrutura do Fator de crescimento endotelial vascular-A (*VEGF-A*). Extraída do servidor rcsb.org. Protein Data Bank: 2VPF.

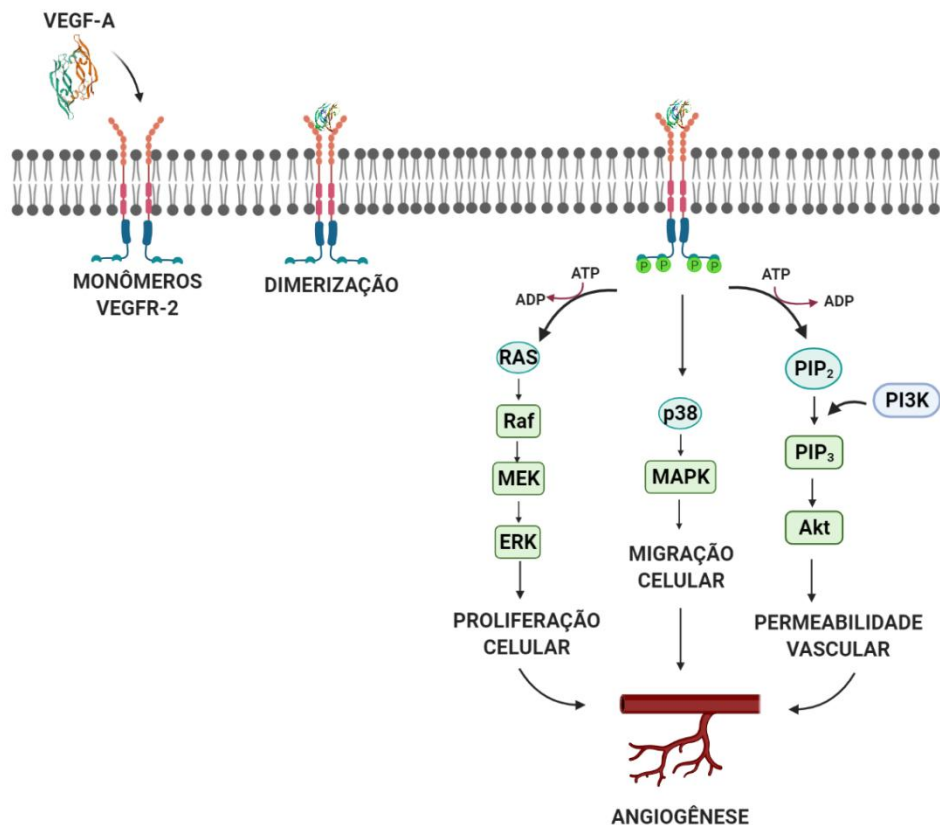


Figura 5 - Esquemática do mecanismo angiogênico. Ativação dos receptores tirosina-quinase pelo *VEGF-A*, seguido da dimerização e fosforilação de resíduos de tirosina no segmento citosólico dos receptores *VEGFRs*, ativando as vias sinalizadoras de proliferação, migração e permeabilidade celular que resultam na resposta angiogênica (neoformação vascular). Figura elaborada no servidor biorender.com.

Tendo em vista as etapas articuladas no processo angiogênico, percebe-se a relevância da intervenção estimulatória ou inibitória da neovascularização, como meio de alterar o curso de muitas doenças que têm o componente angiogênico na sua patogênese. Desta maneira, as terapias inibitórias têm se destacado no tratamento de doenças como o câncer e em diversas condições oftálmicas, de forma a inibir as respostas de sinalização, que culminam na proliferação e na migração celular, bem como na ativação de mecanismos anti-apoptóticos.

A terapia anti-*VEGF* destaca-se neste contexto em virtude da inibição direta do *VEGF-A*. A família *VEGF* compreende, além do *VEGF-A*, o fator de crescimento placentário (*PlGF*), o *VEGF-B*, o *VEGF-C*, o *VEGF-D* e o *VEGF-E*. Dentre estes, o *VEGF-A* é o principal fator desencadeador das respostas angiogênicas e é o alvo fundamental das terapias anti-angiogênicas (MOREIRA; FERNANDES; RAMOS, 2007). Sendo assim, as abordagens terapêuticas principais se baseiam na inibição direta do *VEGF-A*, bem como na inibição dos *VEGFRs*, a exemplo dos fármacos sunitinibe, sorafenibe, pazopanibe, utilizados na quimioterapia do câncer e que estão em fase de estudos pré clínicos e clínicos para a aplicação

no tratamento de doenças oftálmicas, como a retinopatia diabética. No contexto ocular clínico, o tratamento baseia-se em injeções intravítreas de inibidores diretos do *VEGF-A*, a saber, bevacizumabe, ranibizumabe e aflibercept (SUNDSTROM; SIM; ANTONETTI, 2014a).

O bevacizumabe (Avastin[®]) é um anticorpo monoclonal recombinante IgG1 anti-*VEGF*, que se liga ao domínio de ligação das isoformas de *VEGF-A* aos receptores *VEGFRs* 1 e 2, sendo utilizado em terapia *off-label* da degeneração macular relacionada à idade e formas mais graves de retinopatia diabética. O ranibizumabe (Lucentis[®]) é um fragmento do bevacizumabe, com alta afinidade pelo *VEGF-A*, aprovado para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade, edema macular diabético e neovascularização coroidal. Já o aflibercept (Eylea[®]) é uma proteína de fusão de porções dos domínios extracelulares de ligação dos receptores *VEGFRs* 1 e 2 fundidas com a porção Fc da IgG1 humana, indicada para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade neovascularizante, edema macular diabético e neovascularização coroidal. Outro composto utilizado em *off label* é o pegaptanibe, um aptâmero de RNA conjugado com polietilenoglicol, que se liga com alta afinidade à isoforma *VEGF-A*₁₆₅ humana (OSAADON et al., 2014; SUNDSTROM; SIM; ANTONETTI, 2014a).

As terapias utilizadas têm proporcionado reduções significativas da perda de visão, contudo, além do alto custo associado aos medicamentos aprovados, têm-se as inconveniências inerentes às injeções intravítreas que são necessárias em alta frequência, gerando dor, desconforto e muitas vezes falta de adesão ao tratamento. Além do aspecto social e emocional, destacam-se os eventos adversos que compreendem a endoftalmite, o descolamento da retina, a catarata e a hemorragia intraocular (SHIKARI; SILVA; SUN, 2014).

Desta maneira, com o intuito de se ampliar o conjunto de fármacos disponíveis para o tratamento das doenças oftálmicas de componente angiogênico, destacam-se algumas abordagens de tratamento em vigência de estudos pré-clínicos e clínicos, como a inibição direta dos *VEGFRs*, anti-inflamatórios esteroidais, inibidores de outros fatores pró-angiogênicos, como o *TNF-α* e análogos de somatostatotina. Assim, a prospecção de potenciais agentes terapêuticos podem vir a proporcionar tratamentos mais cômodos e efetivos, tendo em vista todos os complicadores associados à terapia anti-*VEGF* (DEDANIA; BAKRI, 2015).

1.4 Avaliação da angiogênese pelo modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha (CAM)

O processo de desenvolvimento de um fármaco requer a condução de ensaios *in vitro* e *in vivo* para o delineamento da toxicidade, dos perfis farmacocinético e farmacodinâmico e para a elucidação do mecanismo de ação da molécula em estudo, demandando assim a utilização de modelos *in vivo*, que implicam na manipulação de animais como ratos, camundongos, coelhos e primatas, culminando na maioria das vezes no sacrifício destes animais. Desta forma, esforços têm sido feitos por metodologias de ensaios alternativas que minimizem a utilização de animais ou reduzam o sofrimento, a exemplo do modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha - *Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM)*, amplamente utilizado para a avaliação da atividade angiogênica (BAGLEY; WATERS; KONG, 1994; CHEN et al., 2021).

A membrana corioalantoica de embrião de galinha é a mais externa do embrião, sendo altamente vascularizada, permitindo as trocas gasosas e de nutrientes com o ambiente. A CAM fornece um modo tecnicamente simples de estudo de sistemas biológicos complexos, com um tecido vascular bem desenvolvido, permitindo avaliar o perfil de atividades angiogênicas e antiangiogênicas de substâncias de interesse. De acordo com o *The Institutional Animal Care and Use Committee* e o *National Institutes of Health, USA*, o embrião de galinha que não alcança o 14º dia de desenvolvimento, não vivenciaria dor e, portanto, poderia ser usado para experimentação sem restrição ética (KUE et al., 2015; RIBATTI, 2016).

1.5 Citotoxicidade em células ARPE-19

O epitélio pigmentar da retina (EPR) é a camada mais externa da retina, com importantes funções de constituição da barreira hematorretiniana, absorção de luz e transporte de nutrientes a partir da vasculatura coroidal. As linhagens de células ARPE-19 que são células do EPR humano são frequentemente avaliadas em termos metabólicos frente aos compostos investigados para tratar doenças oculares, para se ponderar o perfil citotóxico dos compostos. O ensaio de citotoxicidade baseia-se na conversão metabólica por enzimas oxirredutases dependentes de Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo (NADH) do 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5,-difeniltetrazolil (MTT) a formazan, o que pode ser mensurado pela absorbância do formazan a 540 nm, que é proporcional à viabilidade celular das células ARPE-19 (BOULTON; DAYHAW-BARKER, 2001; DUNN et al., 1996). A Figura 6 esquematiza a conversão do MTT a formazan.

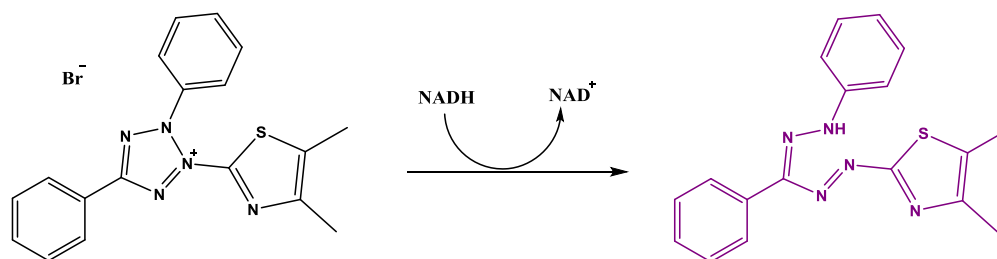


Figura 6 - Conversão do MTT a formazan (roxo) por enzimas oxirredutases mitocondriais.

1.6 Sequências peptídicas com atividade anti-VEGFR

Um estudo conduzido por MICHALOSKI e colaboradores evidenciou, por meio da técnica *phage display*, duas sequências peptídicas compostas por seis resíduos de aminoácidos, a saber, H-Pro-Cys-Ala-Ile-Trp-Phe-OH (PCAIWF) e H-Trp-Val-Cys-Ser-Gly-Gly-OH (WVCSGG), que podem apresentar resultados promissores para a atividade antiangiogênica. Tais moléculas teriam atividades multi-inibitórias dos receptores *VEGFRs*, mediante a ligação ao domínio extracelular de ligação aos *VEGFs* (MICHALOSKI et al., 2016). A técnica de *phage display* é utilizada na identificação e seleção de peptídeos, proteínas e anticorpos, baseando-se na inserção de genes codificadores no genoma de bacteriófagos, que expressam, portanto, as moléculas de interesse na superfície viral.

De acordo com o estudo, o alvo molecular inicial utilizado foi o *VEGFR-3* (receptor altamente expresso nas *tip cells*, células envolvidas na formação dos brotos de vasos sanguíneos no processo angiogênico), tal que a porção extracelular do receptor foi imobilizada em uma placa de microtitulação e incubada com uma biblioteca *phage display* de peptídeos, contendo até seis resíduos de aminoácidos. Após três rodadas de seleção, clones de fagos selecionados randomicamente foram analisados por sequenciamento para identificação dos peptídeos, evidenciando-se que somente duas sequências foram codificadas em todos os genomas analisados: PCAIWF e WVCSGG (MICHALOSKI et al., 2016).

Os pesquisadores realizaram uma série de ensaios, a fim de caracterizarem as interações dos peptídeos com o *VEGFR-3*, em detrimento da interação do ligante endógeno (*VEGF-C*), bem como para avaliar a influência do resíduo de cisteína (presente nas duas sequências) na atividade. Associado ao fato de que as duas sequências peptídicas interagem no mesmo sítio no receptor, foi decidido dar seguimento aos estudos com o fago PCAIWF (MICHALOSKI et al., 2016).

Os resultados mostraram que, quando associado ao bacteriófago, o PCAIWF-OH demonstra seletividade de interação com o *VEGFR-3*, porém os peptídeos sintéticos PCAIWF-OH e PSAIWF-OH apresentaram atividades inibitórias de todos os receptores

VEGFRs. De forma geral, os peptídeos estudados por Michaloski e colaboradores, enfatizando-se a sequência PCAIWF-OH, apresentaram prevenção da angiogênese patológica em modelo animal para retinopatia, sugerindo uma importante aplicação no desenvolvimento de novos inibidores angiogênicos (MICHALOSKI et al., 2016).

Tendo em vista o potencial *pan*-inibitório dos peptídeos PCAIWF-OH e PSAIWF-OH e a possibilidade de serem obtidos os análogos carboxiamidados por protocolos de síntese em fase sólida, foram procedidas as respectivas sínteses por CORDEIRO, 2018 dos quatro peptídeos respectivos, a saber, os carboxilados na porção *C*-terminal descritos por Michaloski e colaboradores e seus análogos carboxiamidados na porção *C*-terminal, a fim de se comparar as estratégias de sínteses em termos de custo, eficiência (rendimentos) e praticidade. Além disso, CORDEIRO, 2018 também analisou comparativamente os perfis de atividade antiangiogênica dos peptídeos em ensaios *CAM*.

Os ensaios foram feitos inicialmente a fim de se determinar a concentração ótima de atividade, em que foram testadas as concentrações de 5,0, 50,0 e 500,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ do peptídeo PCAIWF-OH. Esse ensaio evidenciou o melhor perfil de atividade antiangiogênica na concentração de 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Subsequentemente, os quatro peptídeos foram avaliados nesta concentração, a fim de se determinar(em) aquele(s) com o melhor perfil inibitório nas condições do ensaio, o que indicou o peptídeo PSAIWF-NH₂. Em conclusão, esse foi o peptídeo obtido em rendimento maior, que demanda o protocolo de síntese mais eficiente e simples do conjunto.

A partir dos resultados promissores com o peptídeo PSAIWF-NH₂ apresentados por CORDEIRO, 2018, decidiu-se proceder à análise das preferências conformacionais do hexapeptídeo por espectroscopia de dicroísmo circular e à avaliação antiangiogênica em modelo *CAM* nas concentrações de 2,5, 5,0 e 25,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, também está descrita neste trabalho a formulação de implantes à base do polímero poli(ácido lático-co-ácido glicólico) – PLGA, visando à liberação do peptídeo de forma controlada e prolongada.

1.7 Síntese de peptídeo em fase sólida

Os peptídeos são biomoléculas poliméricas, constituídas por monômeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (amídicas). Na Figura 7 estão representados os 20 aminoácidos essenciais que compõem a maior parte dos peptídeos. Tais moléculas podem assumir diferentes padrões de conformações (perfis de estruturas secundárias), de acordo com a disposição e interação entre os resíduos de aminoácidos, resultando em segmentos como α -hélices, conformações beta e dobras (Figura 8) (NELSON; COX, 2013). A aplicabilidade

desses polímeros é multifacetada, tal que são encontrados em uma variedade de organismos vivos, desempenhando funções imunológicas, manutenção homeostásica metabólica e sistêmica, a exemplo da insulina e da bradiginina. Assim, os peptídeos têm ganhado notoriedade como potenciais agentes terapêuticos frente às diversas doenças como as infecções microbianas, as neoplasias e as doenças inflamatórias, observando-se a catalogação de 3273 peptídeos na *Antimicrobial Peptide Database* (APD), os quais são provenientes de bactérias, protozoários, fungos, plantas e animais, e estão correlacionados com atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, antiparasitárias, antitumorais, antioxidantes, quimiotáticas, inseticidas e cicatrizantes (WANG; LI; WANG, 2018).

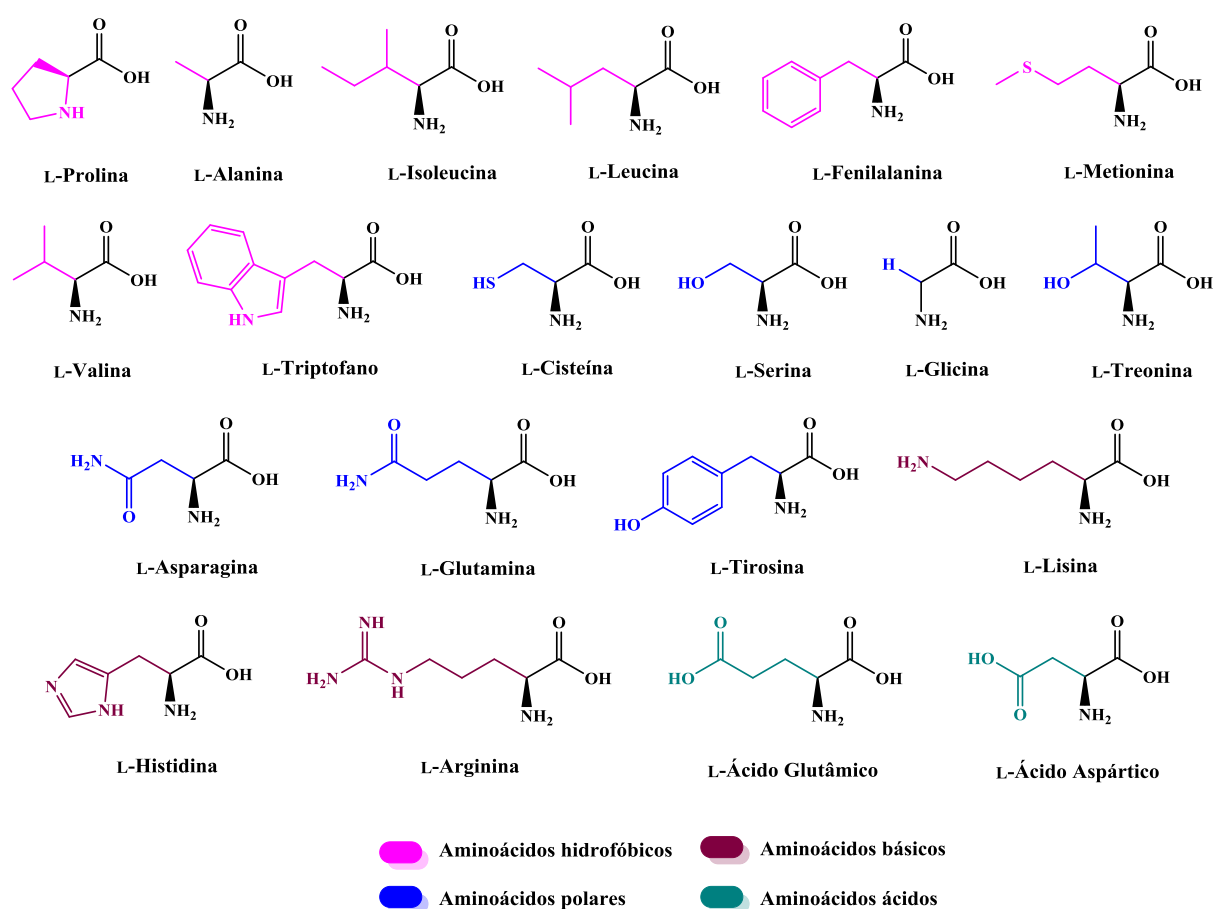


Figura 7 - Estruturas dos L-aminoácidos essenciais.

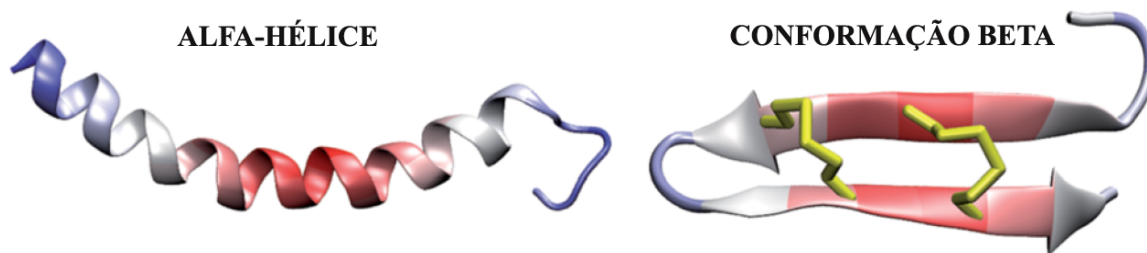


Figura 8 - Representações das duas principais conformações secundárias assumidas pelos peptídeos, alfa-hélice e conformação beta (fita-beta em grampo). Adaptada de (ZHANG; ZHAO; ZHENG, 2014), com autorização para reprodução (Anexo C).

Como essas moléculas são encontradas em concentrações pequenas nos tecidos dos organismos vivos, a obtenção dessas substâncias em maior escala pode ser alcançada por engenharia genética ou pela síntese química (NELSON; COX, 2013). Neste contexto, a síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) baseia-se no emprego de uma resina (suporte polimérico), a qual é constituída por uma porção polimérica e uma porção ligante reativa, que pode formar uma ligação covalente com um primeiro resíduo de aminoácido. De forma geral, a síntese se dá mediante a fixação do primeiro resíduo de aminoácido protegido à resina, com subsequentes etapas de desproteção (remoção do grupo α -amino protetor) e acoplamento dos resíduos de aminoácidos protegidos subsequentes, finalizando-se com a clivagem que proporciona a retirada do peptídeo da resina. Desta maneira, a escolha da resina determina o grupo funcional a ser formado na porção carboxi-terminal do peptídeo, uma vez que a síntese ocorre da porção carboxi-terminal em direção à amino-terminal.

As duas estratégias de SPFS que têm se destacado são as estratégias Boc e a Fmoc, que recebem tais denominações em virtude dos grupos α -amino protetores *tert*-butoxicarbonil (Boc) e 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc). A estratégia Boc caracteriza-se pelo emprego de condições ácidas durante toda a síntese, de forma que para a desproteção do grupamento α -amino, emprega-se geralmente o ácido trifluoroacético (TFA) e para a clivagem da cadeia peptídica utiliza-se o ácido fluorídrico (HF). Em contrapartida, a aplicação do grupo protetor Fmoc fornece uma estratégia ortogonal de síntese, uma vez que são utilizadas condições básicas para a remoção do grupo Fmoc (geralmente piperidina) e condições ácidas de clivagem, geralmente ácido trifluoroacético (MERRIFIELD, 1964).

1.7.1 Resinas

Os suportes poliméricos empregados na SPFS, além de fornecerem o arcabouço para a formação da cadeia peptídica, devem apresentar características que permitam os processos de acoplamento de novo resíduo de aminoácido e sua posterior desproteção, além de etapas de

lavagem após cada uma dessas. Desta forma, as resinas devem ser insolúveis nos solventes de lavagem, permitindo a remoção das espécies químicas que não reagiram, bem como de subprodutos, já que nesses procedimentos é comum o emprego de solventes de diferentes polaridades, que promovem a compactação e descompactação da peptidil-resina (*e.g.*, *N,N*-dimetilformamida, diclorometano, isopropanol, metanol e outros), ressaltando-se que a resina deve ser insolúvel em todos os solventes (MARQUARDT; EIFLER-LIMA, 2001). A maior parte das resinas utilizadas em SPFS são do tipo polímeros-gel, ou seja, são constituídas de poliestireno (PS) e divinilbenzeno (DVB), apresentando alto grau de mobilidade e influência de solventes na compactação e descompactação (Figura 9). Os ligantes determinam, em contrapartida, as condições de clivagem, tipo de reação com o substrato e função química formada após a clivagem (MARQUARDT; EIFLER-LIMA, 2001).

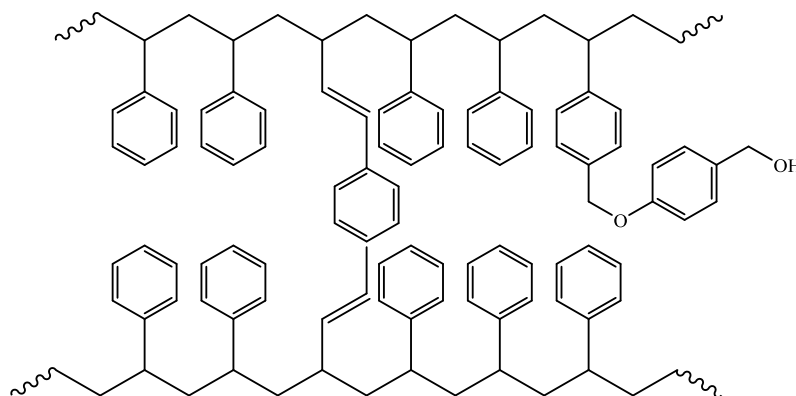


Figura 9 - Representação esquemática da resina Wang, evidenciando-se as unidades monoméricas: estireno e divinilbenzeno e o ligante álcool 4-benziloxibenzílico. Adaptada de (MARQUARDT; EIFLER-LIMA, 2001).

Os polímeros-gel apresentam boa capacidade de descompactação, tal que o seu volume pode aumentar em até cinco vezes. Dentre as resinas disponíveis, destacam-se a Merrifield, a clorotritil, a Wang, a diidropirano (DHP) e a Rink Amide (Figura 10). Outras classes de resinas amplamente utilizadas na SPFS são aquelas baseadas em poliestireno e polietilenoglicol (PS/PEG), beneficiadas pelo balanço de solvatação proporcionado pelo polietilenoglicol, apresentando um índice de expansão relativamente constante, em detrimento das resinas de PS/DVB. Entretanto, as resinas PS/PEG apresentam dificuldade de secagem, baixa capacidade de ligação dos ligantes e facilidade de rompimento da ligação benzil-éter entre o polietilenoglicol e o poliestireno (MARQUARDT; EIFLER-LIMA, 2001).

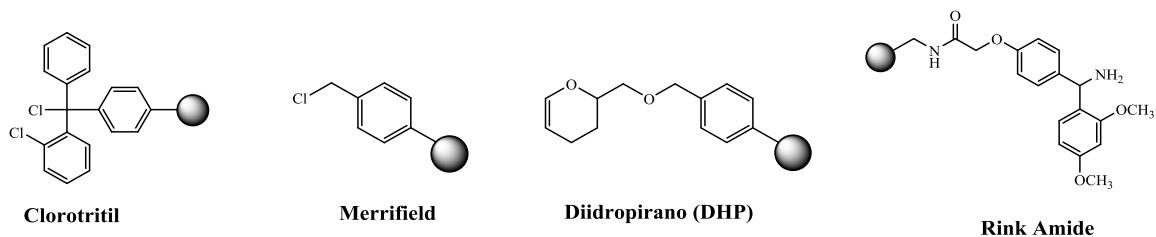


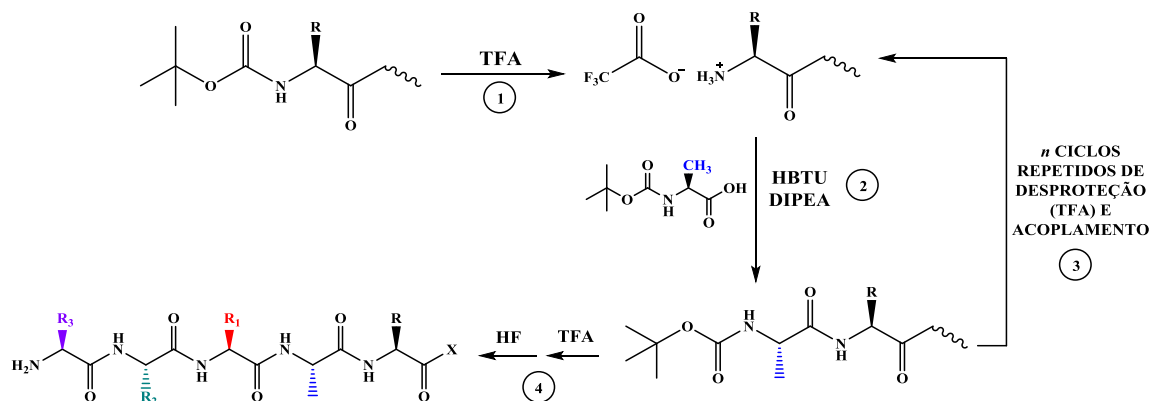
Figura 10 - Representações das resinas clorotritil, *Merrifield*, diidropirano e *Rink Amide*, evidenciando-se os grupos ligantes de cada uma.

1.7.2 Estratégias Boc e Fmoc

A idealização da síntese em fase sólida aplicada à obtenção de peptídeos foi feita por Robert Bruce Merrifield que, em 1964, publicou um estudo descrevendo a obtenção do peptídeo bradicinina, um nonapeptídeo, por meio da inovadora metodologia em fase sólida. As condições empregadas por Merrifield envolviam a utilização do grupo *tert*-butoxicarbonil (Boc) como protetor temporário α -amino e o grupo benzil (Bn) como protetor das cadeias laterais. Desta maneira a retirada dos grupos Boc (desproteção dos grupamentos α -amino) se dava por tratamento da peptidil-resina com solução ácida de TFA e a remoção final do peptídeo se dava paralelamente à desproteção das cadeias laterais mediante a utilização do ácido fluorídrico (HF). Tal metodologia empregando os grupos protetores Boc e Benzil resultou, portanto, na estratégia Boc/Bn (JENSEN; SHELTON; PEDERSEN, 2013; MERRIFIELD, 1964).

A execução da estratégia Boc/Bn (Figura 11) requer a utilização de condições ácidas durante toda a síntese, o que conseqüentemente demanda estabilidade da ligação formada com a resina, assim como da cadeia peptídica em formação. O ponto mais crítico de tal abordagem relaciona-se ao emprego do ácido fluorídrico na etapa final de clivagem, uma vez que se trata de um ácido altamente corrosivo, demandando o uso de equipamentos adequados, contendo politetrafluoretileno (TEFLON[®]) por exemplo, uma vez que o HF apresenta incompatibilidade com vidrarias (JENSEN; SHELTON; PEDERSEN, 2013).

Desta maneira, a estratégia Boc/Bn associa limitada aplicação em virtude das condições ácidas utilizadas, o que pode acarretar em clivagens antecipadas da cadeia peptídica em formação, resultando em baixos rendimentos. Contudo, a metodologia apresenta aplicações vantajosas em casos específicos, em detrimento da estratégia Fmoc, como na obtenção de peptídeos hidrofóbicos (JENSEN; SHELTON; PEDERSEN, 2013).



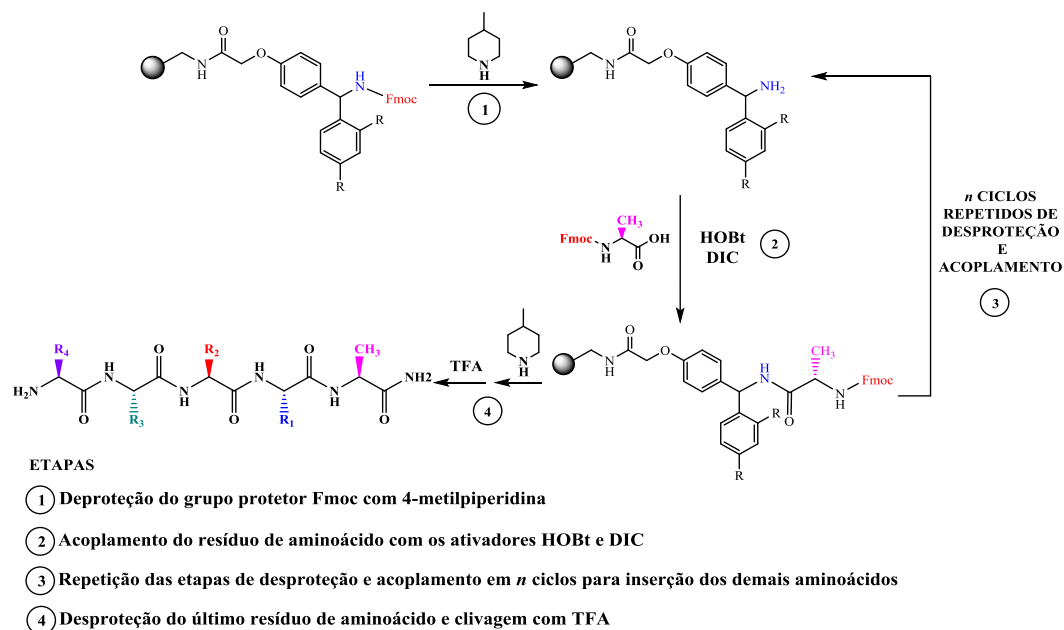
ETAPAS

- ① Desproteção do grupo protetor Boc com ácido trifluoroacético
- ② Acoplamento do resíduo de aminoácido com os ativadores HBTU e DIPEA
- ③ Repetição das etapas de desproteção e acoplamento em n ciclos para inserção dos demais aminoácidos
- ④ Desproteção do último resíduo de aminoácido e clivagem com HF

~~~~ = RESINA      R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = CADEIAS LATERAIS

**Figura 11** - Esquemática da estratégia Boc/Bn de síntese em fase sólida, evidenciando-se a remoção do grupo Boc pelo emprego de TFA e a remoção do peptídeo pelo uso de HF. Adaptada de (CHAN, WENG; WHITE, PETER, 2000).

A estratégia de síntese de peptídeos em fase sólida mais difundida atualmente é a Fmoc (Figura 12), que se baseia na proteção do grupamento  $\alpha$ -amino com o grupo 9-fluorenilmetoxicarbonil, um grupo que pode ser facilmente removido por eliminação  $\beta$ , utilizando-se uma base (geralmente piperidina ou derivados). Por sua vez, as cadeias laterais estão protegidas com grupos lábeis em meio ácido (exemplos de grupos protetores: Pbf = 2,2,4,6,7-pentametildiidrobenzofurano sulfonil, Trt = tritil, Boc = *tert*-butoxicarbonil), os quais podem ser removidos pelo emprego do ácido trifluoroacético. Por ser esta uma estratégia ortogonal de síntese, ou seja, proporcionar seletivamente o emprego de solução básica durante toda a montagem da cadeia peptídica e ao final promover a liberação da molécula em meio ácido, permite maior estabilidade da peptidil-resina, em termos de clivagem precoce da cadeia (JENSEN; SHELTON; PEDERSEN, 2013).

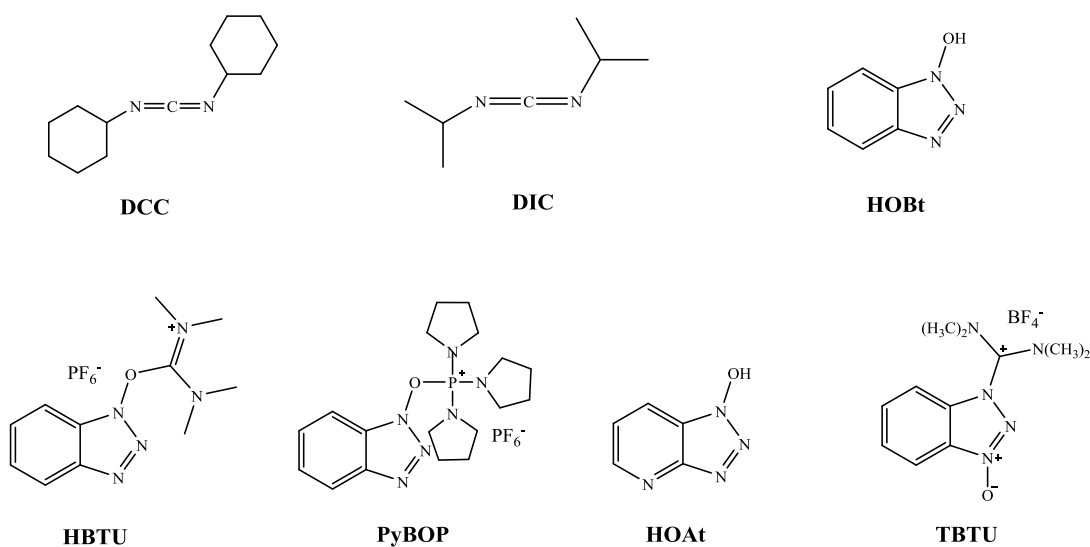


**Figura 12** - Esquemática da estratégia Fmoc de síntese em fase sólida, utilizando-se a resina *Rink Amide*. Adaptado de (VERLY, 2010).

### 1.7.3 Acoplamento

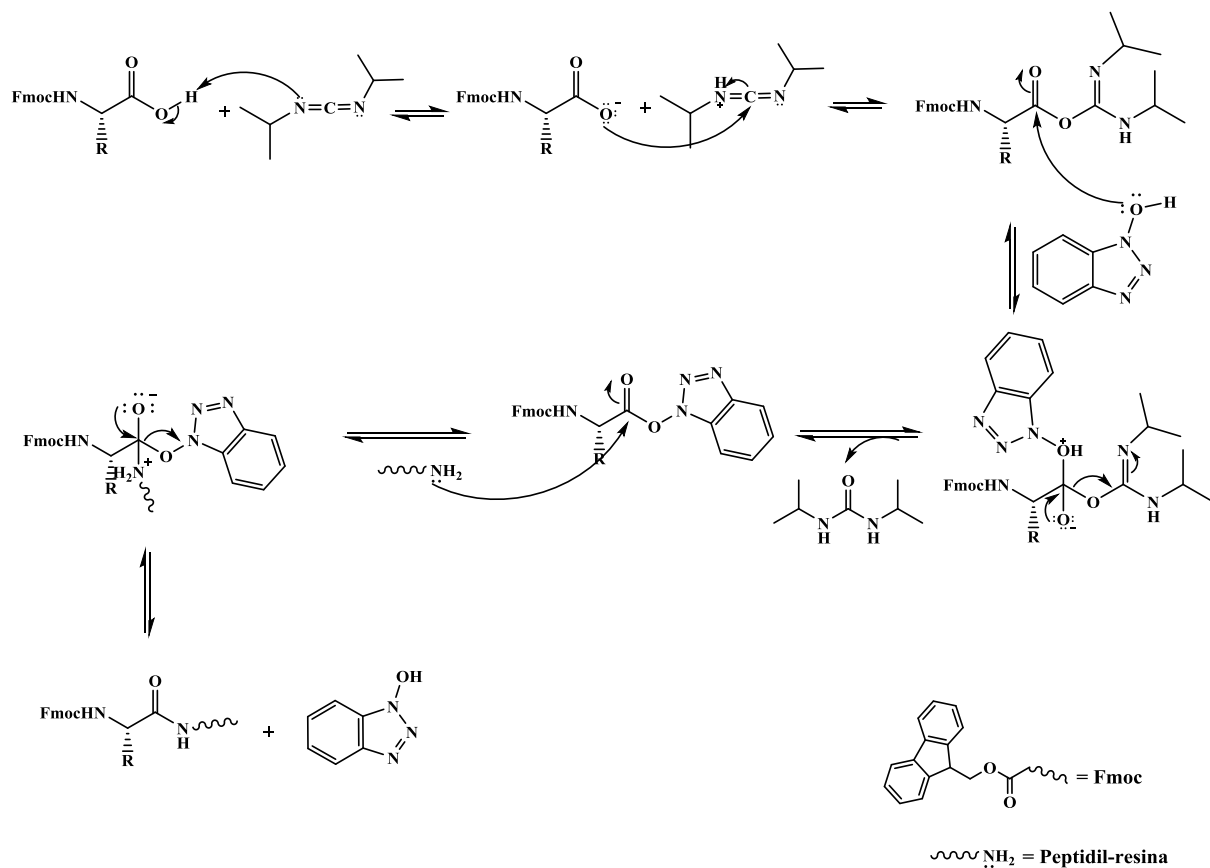
O processo de acoplamento está envolvido na conjugação do primeiro resíduo de aminoácido à resina, bem como nas etapas subsequentes de formação das ligações peptídicas entre os resíduos de aminoácidos. Na obtenção de peptídeos amidados, faz-se necessária a desproteção da resina antes da reação de acoplamento, uma vez que o grupamento amino presente no suporte encontra-se preponderantemente protegido com o Fmoc.

Para que o acoplamento ocorra, é de fundamental importância o emprego de ativadores, que resultam na formação de um éster ativado do derivado de aminoácido, ou seja, favorecem a adição nucleofílica à carbonila do derivado de aminoácido pelo grupo funcional presente na resina (ancoragem) ou grupamento amino livre na peptidil-resina (formação da ligação peptídica). Os ativadores (Figura 13) mais comumente aplicados são  $N,N'$ -dicicloexilcarbodiimida (DCC),  $N,N'$ -diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), hexafluorofosfato  $N,N,N',N'$ -tetrametil- $O$ -(1H-benzotriazol-1-il)urônio (HBTU), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt), benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-hexafluorofosfato de fosfônio (PyBOP), tetrafluoroborato de  $O$ -(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (TBTU).



**Figura 13** - Estruturas químicas dos ativadores comumente utilizados em SPFS. Adaptado de (AMBLARD et al., 2006a).

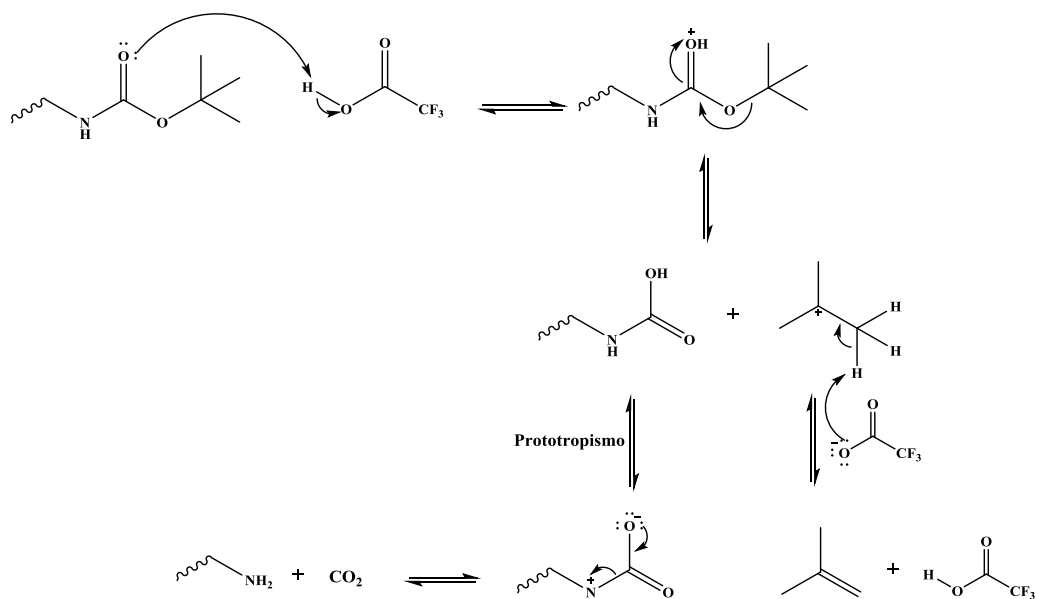
A fim de se otimizar a eficiência de acoplamento, é comum a utilização de uma combinação de ativadores, geralmente um básico e um nucleofílico. Uma associação amplamente empregada é a de uma carbodiimida (DCC ou DIC) e de um benzotriazol (Figura 14). No tocante à obtenção de peptídeos carboxilados, a etapa de acoplamento do primeiro derivado de aminoácido à resina pode ocorrer pela aplicação do chamado método do anidrido simétrico (CHAN, WENG; WHITE, PETER, 2000), que consiste na formação de um anidrido a partir de duas moléculas do primeiro derivado de aminoácido, mediante o emprego de um ativador, geralmente o DIC.



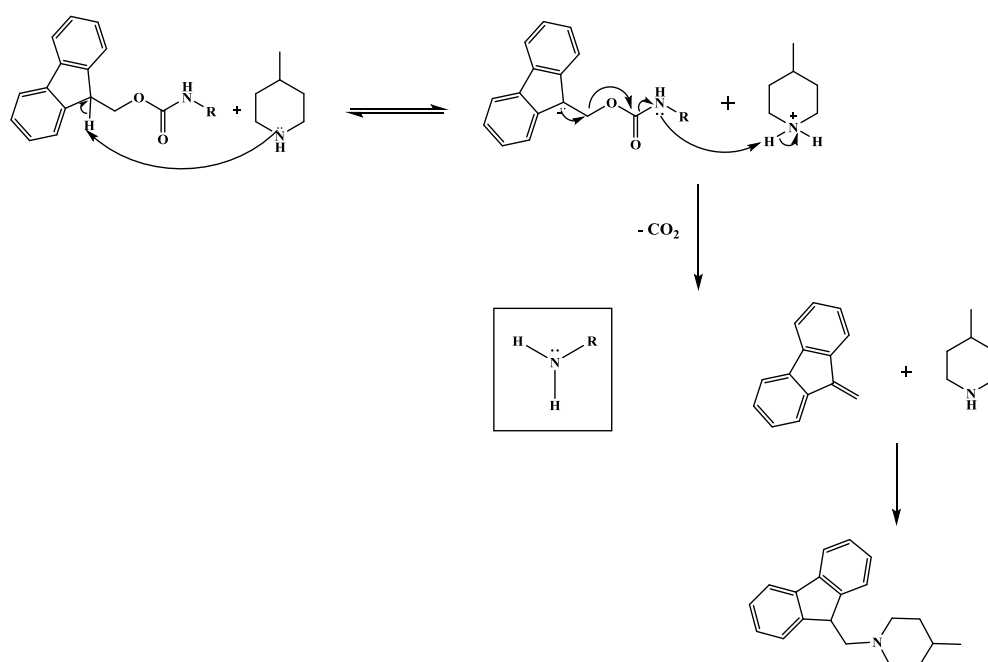
**Figura 14** - Mecanismo de ativação com DIC e HOBt. Adaptado de (GUSMÃO, 2014).

#### 1.7.4 Desproteção

Na estratégia Boc, a exposição do grupo amino se dá mediante o emprego do ácido trifluoroacético, de modo que ocorre a protonação da carbonila do grupo protetor, com formação de um carbocátion terciário, o qual sofre reação de eliminação resultando em um alceno. O carbamato passa por prototropismo, seguindo-se liberação de  $\text{CO}_2$  e a espécie desprotegida é obtida (Figura 15). Já na estratégia Fmoc (Figura 16), a desproteção se desenvolve via reação de eliminação  $\beta$ , pelo emprego de uma base secundária (como a 4-metilpiperidina), resultando na liberação de  $\text{CO}_2$ , de um subproduto conjugado (dibenzofulveno) e da espécie desprotegida (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012; LUNA et al., 2016).



**Figura 15** - Mecanismo de desproteção do grupamento amino protegido com o grupo Boc, empregando-se ácido trifluoroacético. Adaptada de (CLAYDEN; GREEVES; WARREN, 2012).

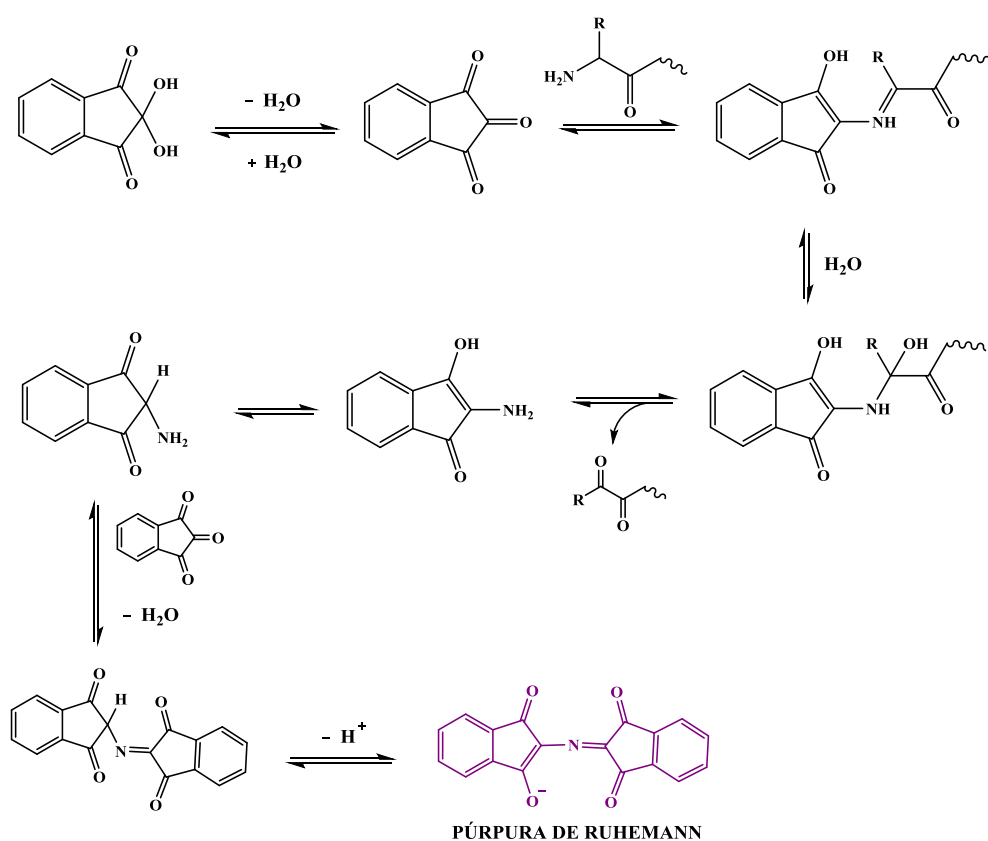


**Figura 16** - Mecanismo de desproteção do grupamento amino protegido com o grupo Fmoc, empregando-se 4-metilpiperidina. Adaptada de (GUIMARÃES, 2017).

### 1.7.5 Teste de Kaiser

O monitoramento da efetividade das etapas de acoplamento e desproteção pode ser feito por meio de um teste qualitativo colorimétrico denominado teste de Kaiser, que se baseia na reação do grupamento amino livre com a ninhidrina, formando um produto colorido - Púrpura de *Ruhemann* (Figura 17). Desta forma, após cada etapa de acoplamento e

desproteção, deve-se tomar uma pequena alíquota da peptidil-resina e colocá-la em contato com a ninhidrina, observando-se a formação do produto colorido após as etapas de desproteção (grupo amino exposto) e ausência do produto colorido após as etapas de acoplamento (reação com a ninhidrina não ocorre, visto que o grupo amino encontra-se protegido). A obtenção de resultado não esperado implica a necessidade de repetição da respectiva etapa de desproteção ou acoplamento. Outra possibilidade de monitoramento se dá pela formação do subproduto, dibenzofulveno, que absorve radiação ultravioleta no comprimento de onda de 310 nm (AMBLARD et al., 2006b).



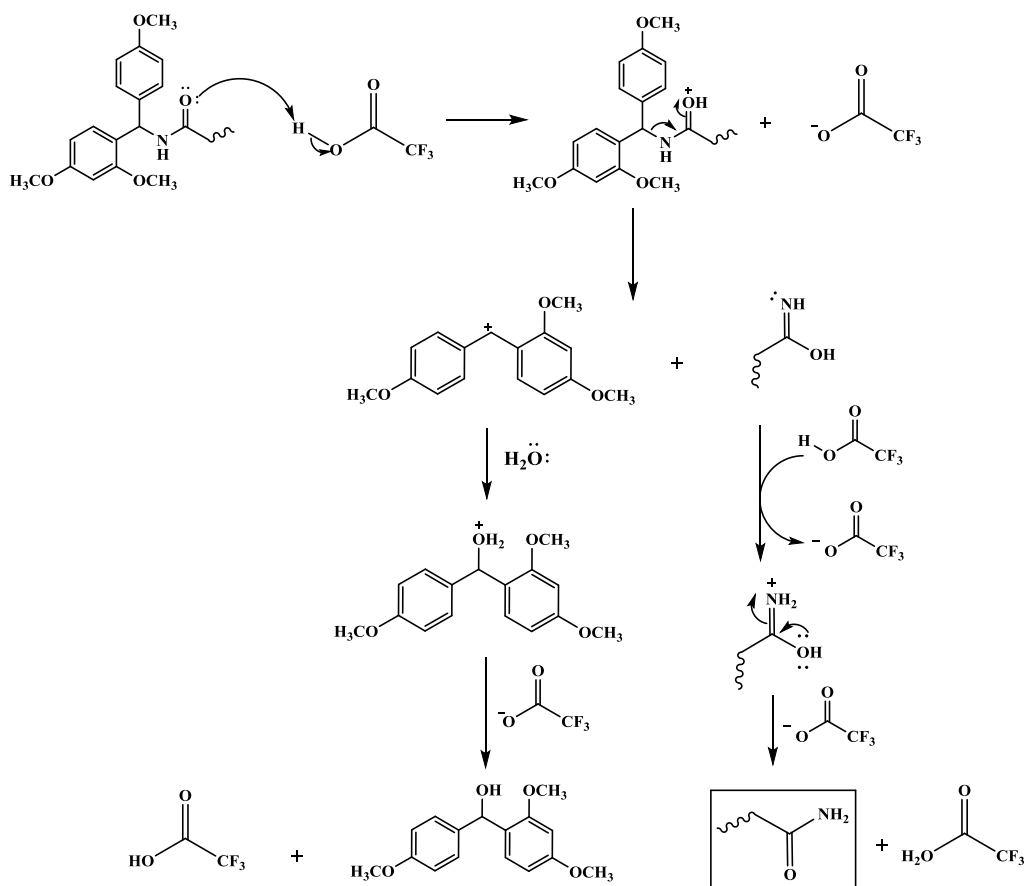
**Figura 17** - Mecanismo do teste de Kaiser para o monitoramento das etapas de acoplamento e desproteção. Adaptada de (VERLY, 2010).

### 1.7.6 Clivagem

A última etapa da síntese em fase sólida de peptídeos consiste na liberação da cadeia peptídica do suporte polimérico (Figura 18), bem como da remoção dos grupos protetores das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Para tal, é de amplo emprego coquetéis ácidos, utilizando-se ácido trifluoroacético e capturadores de carbocátions (água, triálquilsilanos, etanoditiol e tiofenol). A escolha do coquetel, envolvendo a proporção adequada do ácido e



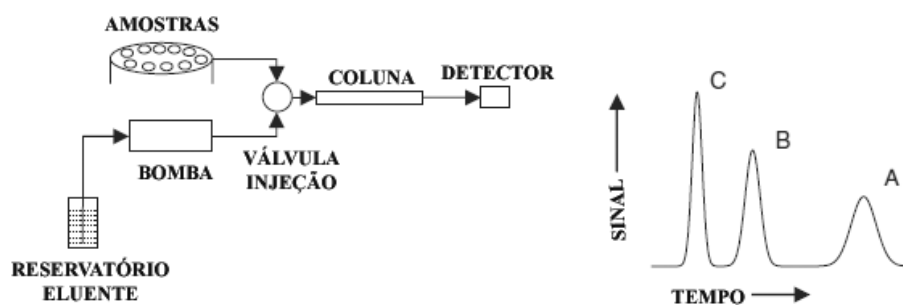
dos capturadores, deve ser feita com base na estabilidade da sequência peptídica e da resina utilizada, assim como no tempo de clivagem. De forma geral, o ideal para a clivagem de peptídeos carboxilados (ou seja, fixados à resina por uma ligação éster) é se utilizarem proporções de TFA de 50-100%, por 30-120 minutos de reação. Já os peptídeos amidados demandam tempos reacionais que podem variar de 100-150 minutos, em proporções de 10-95 % de TFA (JENSEN; SHELTON; PEDERSEN, 2013).



**Figura 18** - Mecanismo de clivagem de um peptídeo amidado na porção C-terminal. Adaptada de (GUSMÃO, 2014).

## 1.8 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência constitui uma técnica automatizada de separação de analitos mediante a interação diferencial com a fase estacionária (coluna) e a fase móvel (eluente), com posterior detecção e plotagem dos sinais *versus* o tempo. Tal técnica analítica permite a purificação, caracterização e quantificação de uma extensa quantidade de analitos devido à versatilidade na composição da fase estacionária e do eluente, além dos diversos tipos de detecção (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010). A Figura 19 ilustra os componentes desse processo de separação.



**Figura 19** - Esquemática do processo cromatográfico. Adaptada de (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

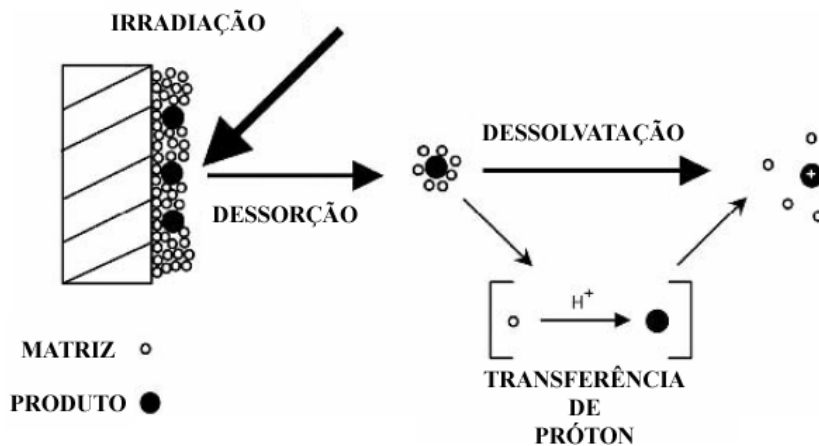
Alguns tipos de separação incluem fase reversa (coluna apolar e eluente composto por mistura de água e solvente orgânico), fase normal (coluna polar e eluente composto por mistura de solventes menos polares), fase reversa não aquosa (coluna apolar e eluente composto por mistura de solventes orgânicos), interação hidrofílica (coluna polar e eluente composto por mistura de água e solvente orgânico), troca iônica (coluna contendo grupos carregados e eluente composto por solução tampão) e exclusão de tamanho (coluna inerte e eluente composto por solução aquosa ou solvente orgânico). Os tipos de detecção abrangem a ultravioleta-visível, fluorescência, eletroquímica, radioatividade, condutividade, quimioluminescência, quiralidade, índice de refração, espalhamento de luz, espectro de massas e infravermelho (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

### **1.9 Espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (*MALDI-ToF*)**

A espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (*MALDI*) é uma técnica analítica que consiste em duas etapas, na primeira etapa o analito é dissolvido em uma matriz (moléculas orgânicas pequenas) que absorve fortemente a radiação no comprimento de onda do laser aplicado. A mistura composta pelo analito e pela matriz é seca resultando em uma solução sólida de cristais da matriz dopados com o analito, que sob vácuo sofre ablação mediante a incidência de pulsos de radiação por um curto tempo (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

A irradiação pelo laser induz aquecimento dos cristais pelo acúmulo de energia na fase condensada através da excitação das moléculas da matriz, esse rápido aquecimento leva à sublimação localizada dos cristais da matriz, ablação de uma porção da superfície cristalina e expansão da matriz para a fase gasosa, arrastando o analito para a fase em expansão. O mecanismo de ionização mais aceito envolve transferência de próton no estado sólido antes da dessorção ou transferência no estado gasoso a partir das moléculas da matriz fotoionizadas.

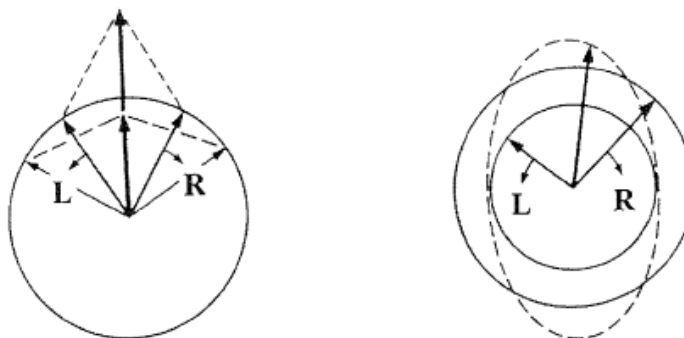
Os íons na fase gasosa são então acelerados pelo campo eletrostático em direção ao analisador por tempo de voo (HOFFMANN; STROOBANT, 2007). A Figura 20 esquematiza o processo da análise por *MALDI*.



**Figura 20** - Esquematização das etapas da análise por espectrometria de massas *MALDI*. Adaptada de (HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

### 1.10 Espectroscopia de dicroísmo circular

A luz linearmente polarizada pode ser decomposta em dois componentes circularmente polarizados à esquerda (L) e à direita (R) de igual magnitude. Quando a luz linearmente polarizada incide em uma amostra que contém cromóforos assimétricos, pode haver absorção diferencial dos componentes circularmente polarizados pela amostra e a resultante é uma elipse, de modo que a luz se torna elipticamente polarizada (Figura 21).



**Figura 21** - À esquerda, luz planarmente polarizada composta pela sobreposição dos componentes circularmente polarizados à esquerda (L) e à direita (R) opostos e de igual magnitude. À direita, luz elipticamente polarizada, resultante da sobreposição dos componentes circularmente polarizados à esquerda (L) e à direita (R) opostos e de diferentes magnitudes. Extraída de (KELLY; JESS; PRICE, 2005). Com permissão para reprodução (Anexo D).

O espectropolarímetro mede, portanto, a diferença na absorbância dos componentes circularmente polarizados à esquerda e à direita. Essa diferença é expressa em termos da

elipticidade molar em função do comprimento de onda, de forma que a concentração precisa do analito deve ser conhecida. A elipticidade molar pode ser determinada através das Equações 1.1 e 1.2.

$$[\theta]_{molar,\lambda} = \frac{100x\theta_\lambda}{Mxd} \quad \text{Equação 1.1}$$

$[\theta]_{molar,\lambda}$  = elipticidade molar no comprimento de onda  $\lambda$

$\theta_\lambda$  = elipticidade observada em graus no comprimento de onda  $\lambda$

M = concentração molar do analito

d = caminho óptico (cm)

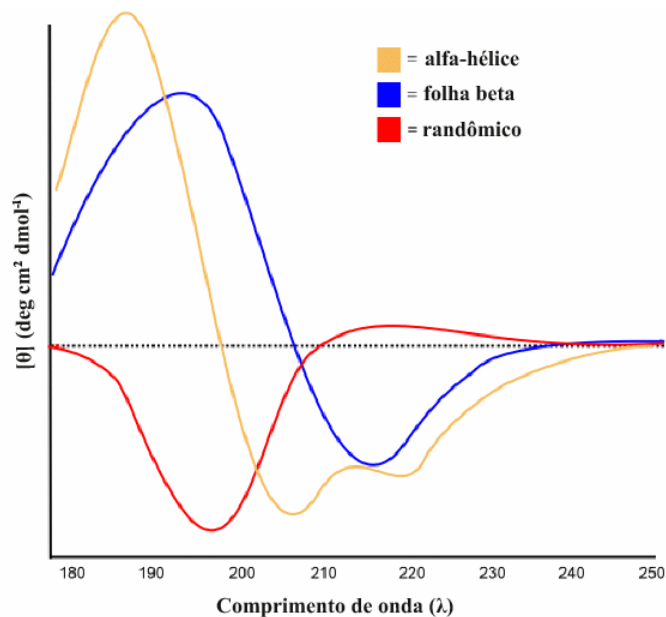
$$\theta_\lambda = 32,98 \Delta A \quad \text{Equação 1.2}$$

$\theta_\lambda$  = elipticidade observada em graus no comprimento de onda  $\lambda$

$$\Delta A = A_L - A_R$$

Em que,  $A_L$  é a absorvância do componente circularmente polarizado à esquerda e  $A_R$  é a absorvância do componente circularmente polarizado à direita.

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica muito relevante na determinação das preferências conformacionais de peptídeos e proteínas, que são moléculas opticamente ativas. As transições eletrônicas na ligação peptídica ocorrem na região do UV distante (185-260 nm) e são amplamente usadas em análises de dicroísmo circular para indicar qualitativa e quantitativamente as preferências conformacionais adotadas pelo peptídeo ou proteína. As transições compreendem  $n \rightarrow \pi^*$  em 220 nm e  $\pi \rightarrow \pi^*$  em 190 nm. Assim, os espectros apresentam elipticidades características dos motivos estruturais, tal que moléculas que apresentam motivos alfa-helicoidais demonstram um padrão espectral marcado por um máximo de absorção em 192 nm e dois mínimos em 209 e 222 nm. Já estruturas em conformações beta são marcadamente observadas com elipticidades positiva em 196 nm e negativa em 218 nm. Conformações randômicas correspondem a espectros com um máximo em 212 nm e um mínimo em 198 nm. A Figura 22 esquematiza os padrões característicos descritos.



**Figura 22** - Representação dos espectros de dicroísmo circular associados às estruturas alfa-helicoidal, folha beta e randômica. Adaptada de < <https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/> Acesso em 08 de agosto de 2021.

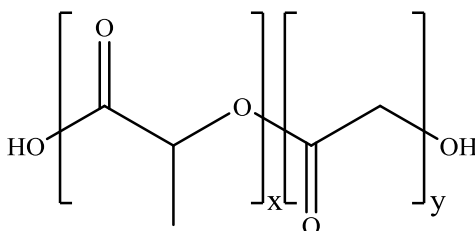
### 1.11 Sistemas de liberação controlada e prolongada

O tratamento de doenças do segmento posterior do olho como edema macular, uveíte e retinopatia diabética proliferativa é desafiador, uma vez que as características anatômicas e fisiológicas do olho muitas vezes oferecem barreira no alcance e manutenção de concentrações terapêuticas dos fármacos. A via tópica não é eficaz na liberação de fármacos na porção posterior devido à drenagem lacrimal, à baixa permeabilidade do epitélio córneo, à absorção sistêmica e à barreira hematorretiniana. As vias de administração mais eficientes são a intravítrea e a periocular, sendo a intravítrea a mais amplamente utilizada (THRIMAWITHANA et al., 2011).

A injeção intravítrea consiste na administração direta de solução, partícula, suspensão ou implante no vítreo e permite o alcance de altas concentrações do fármaco na retina, minimizando eventos adversos sistêmicos. Porém, dependendo da natureza do fármaco a meia-vida pode durar de dias a semanas, o que demanda injeções intravítreas frequentes que podem resultar em descolamento da retina, aumento da pressão ocular e infecções, diminuindo a adesão pelo paciente a esse tipo de farmacoterapia (AGARWAL; RUPENTHAL, 2013; SHORT, 2008).

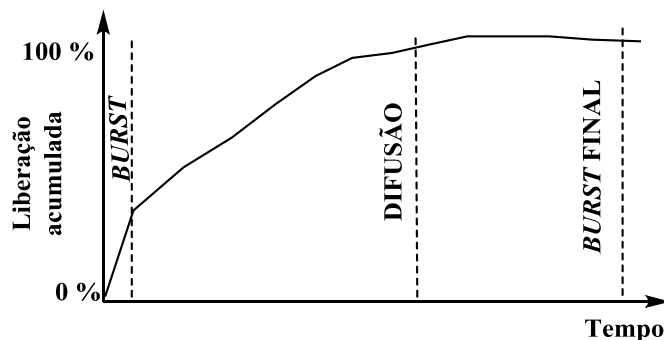
Com o intuito de superar as limitações da terapia intravítrea, sistemas de liberação têm sido formulados para proporcionar a liberação controlada e prolongada dos fármacos na porção posterior do olho. Assim, os sistemas à base do polímero de poli(ácido lático-co-ácido

glicólico) - PLGA se destacam pela biodegradabilidade e biocompatibilidade, a exemplo dos implantes Ozurdex<sup>®</sup> e Porsudex<sup>®</sup> que liberam a dexametasona, um anti-inflamatório esteroidal usado no tratamento de edema macular e uveíte (ATTAR et al., 2011; CASTRO-NAVARRO et al., 2019; ELIAZ; KOST, 1999). A Figura 23 mostra a estrutura do copolímero PLGA.



**Figura 23** - Estrutura do copolímero PLGA.

A liberação do fármaco a partir do implante de PLGA decorre pela difusão através dos poros e pela desintegração da matriz polimérica, sendo que, quanto mais solúvel no meio circundante maior a velocidade de desintegração. Em geral, o processo ocorre em três etapas. A primeira é marcada por um *burst* de liberação, em que uma grande quantidade de fármaco é liberada a partir da superfície do implante em um curto espaço de tempo. Em seguida ocorre um decaimento na concentração de fármaco que é liberado pela difusão através dos poros da matriz; nesta etapa ocorre a degradação hidrolítica que aumenta a porosidade do implante, favorecendo a liberação por difusão. Na terceira etapa ocorre o *burst* final mediante a biodegradação polimérica com intensa perda de massa (GOPFERICK, 1997; JI et al., 2016). Uma representação ilustrativa é feita na Figura 24.



**Figura 24** - Gráfico representativo das etapas de liberação de fármacos a partir de implantes de PLGA, em termos do percentual de liberação acumulada em função do tempo. Adaptado de (LEE et al., 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Sintetizar o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>, analisar suas preferências conformacionais, atividade antiangiogênica e de citotoxicidade, bem como a viabilidade de liberação a partir de implantes. A estrutura do peptídeo está apresentada na Figura 25.

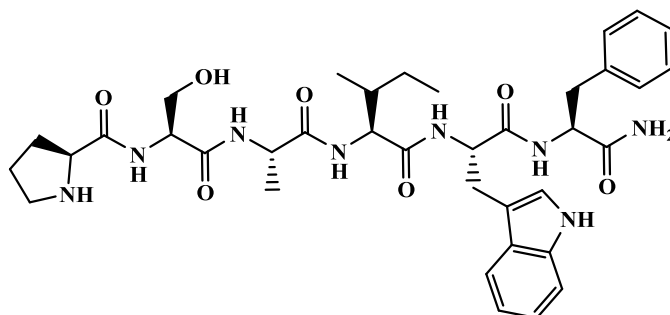


Figura 25 - Estrutura primária do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>.

### 2.2 Objetivos específicos

Obter o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> por abordagem Fmoc de síntese em fase sólida, purificar por CLAE-UV e caracterizar por CLAE-UV e espectrometria de massas MALDI-ToF. Avaliar as preferências conformacionais por espectroscopia de dicroísmo circular em meio aquoso e meios miméticos de membrana. Delinear os perfis de atividade antiangiogênica em modelo *CAM* e citotoxicidade em células do epitélio pigmentar da retina. Investigar o potencial de liberação controlada e prolongada do peptídeo a partir de implantes de PLGA.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais

A seringa foi fornecida pela Advantis<sup>®</sup>. Os derivados de aminoácidos e o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) foram obtidos da Iris Biotech GmbH<sup>®</sup>. A resina *Rink Amide* 0,74 mmol.g<sup>-1</sup>, a *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), a 4-metilpiperidina, o cianeto de potássio, o fenol, a ninhidrina, o triisopropilsilano (TIS), o 2,2,2-trifluoroetanol (TFE), o etanol para análise (P.A.) e o ácido trifluoroacético (TFA) grau analítico e CLAE foram adquiridos da Merck<sup>®</sup>. A acetonitrila grau CLAE foi comprada da J.T.Baker<sup>®</sup>. O éter diisopropílico e o clorofórmio foram fornecidos pela Vetec<sup>®</sup> e pela Química Moderna<sup>®</sup>, respectivamente. A piridina e os solventes P.A., *N,N*-dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM) e isopropanol (IPA) foram adquiridos da Synth<sup>®</sup>. Quando não especificado, considerar o uso de insumos P.A. A *n*-docecilfosfocolina (DPC) e os fosfolídeos 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoglicerol (POPG) foram obtidos da Avanti Polar Lipids<sup>®</sup>.

#### 3.2 Síntese em fase sólida do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>

A massa molar do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>, 718,84 g.mol<sup>-1</sup>, foi calculada por meio do servidor *pepcalc.com* (Disponível em: <<https://pepcalc.com/>>. Acesso em: 20 set. 2019.) e a síntese empregando-se a resina *Rink Amide*, grau de substituição 0,74 mmol.g<sup>-1</sup>, foi projetada para a obtenção final de 198,01 mg de peptídeo. Foram pesados 372,25 mg da resina e transferidos para uma seringa de 10 mL provida de um filtro de polipropileno.

O peptídeo foi sintetizado de acordo com metodologia descrita por Chan & White (CHAN, WENG; WHITE, PETER, 2000). A resina foi submetida à expansão com cerca de 5 mL de DCM sob agitação por 1 hora à rotação de 200 rpm. Após a expansão, procedeu-se a desproteção da resina em condição básica, empregando-se cerca de 5 mL da solução 20% (v/v) de 4-metilpiperidina em DMF destilada. O sistema foi mantido sob agitação por aproximadamente 10 minutos, a solução foi descartada e o procedimento foi repetido mais uma vez.

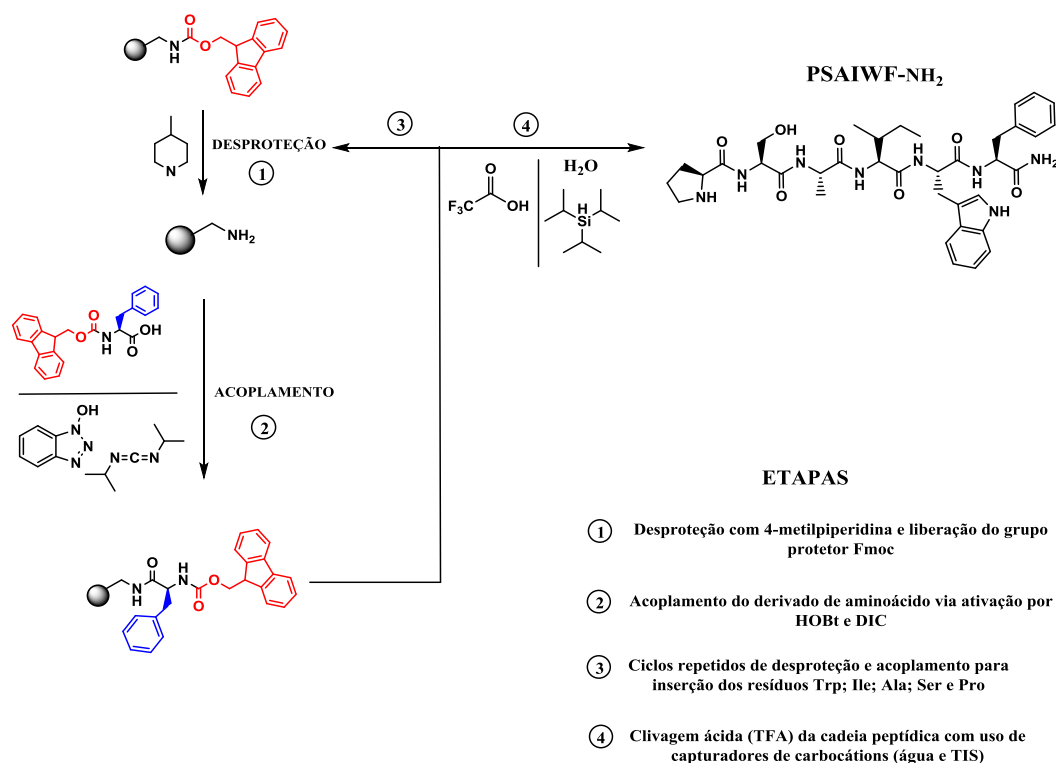
Terminados os ciclos de desproteção, a resina foi lavada por três ciclos alternados com DMF e IPA, e duas vezes com DCM. Em seguida foi realizado o teste de Kaiser para se monitorar a efetividade da desproteção. Sendo assim, foram retirados alguns grãos da resina e transferidos para tubo de ensaio, foram adicionadas em sequência uma gota da solução 0,02 mmol.L<sup>-1</sup> de cianeto de potássio em piridina, duas gotas da solução 80% (v/v) de fenol em etanol e uma gota da solução 5% (p/v) de ninhidrina em etanol, em seguida o tubo foi



colocado em chapa de aquecimento a cerca de 100 °C por cinco minutos. Os grãos foram examinados quanto à coloração com auxílio de uma lente de aumento.

Após a desproteção da resina, seguiu-se o acoplamento do primeiro resíduo de aminoácido - fenilalanina. Para tal, foram pesados o derivado de aminoácido, Fmoc-L-Phe-OH, e os ativadores, HOBt e DIC, todos em excesso de quatro equivalentes molares. Os componentes da reação de ativação foram solubilizados em 1,5 mL de DMF e 1,5 mL de DCM, a solução foi succionada e mantida em agitação por três horas.

Decorrido o tempo de acoplamento, a solução foi descartada e a peptidil-resina foi lavada por três ciclos alternados com DMF e IPA, e duas vezes com DCM. Subsequentemente procedeu-se ao teste de Kaiser para monitoramento da efetividade da reação de acoplamento. Tendo sido confirmado o acoplamento do resíduo de fenilalanina, seguiu-se à desproteção do grupo  $\alpha$ -amino do resíduo empregando-se condição básica. As inserções dos demais resíduos de aminoácidos ocorreram em repetidas etapas de acoplamento e desproteção nas mesmas condições descritas. A figura 26 esquematiza as etapas da síntese do peptídeo.



**Figura 26** - Esquematização das etapas da síntese em fase sólida do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>.

Após o acoplamento do último resíduo de aminoácido - prolina, procedeu-se à sua desproteção para que se fizesse então a clivagem do peptídeo da resina. A peptidil-resina foi

seca sob fluxo de nitrogênio após a desproteção e submetida à clivagem com 7,5 mL de solução dos quais 95% de TFA, 2,5% de TIS e 2,5% de água ultra pura (Millipore Merck®). O sistema ficou sob agitação por cerca de três horas e posteriormente a solução foi transferida para tubo para centrifugação de 50 mL (Falcon®) e foi mantida sob fluxo de nitrogênio até redução significativa do volume. Para a precipitação do peptídeo, foram adicionados aproximadamente 5 mL de éter diisopropílico, seguido de centrifugação a 6000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e seguiu-se à adição de éter diisopropílico e centrifugação por mais duas vezes. Em seguida o peptídeo precipitado foi seco sob fluxo de nitrogênio e liofilizado (HOWL, 2005; CHAN & WHITE, 2000; AMBLARD et al., 2006; B, FIELDS, 1997; COIN; BEYERMANN; BIENERT, 2007).

### **3.3 Purificação do peptídeo por cromatografia líquida de alta eficiência e caracterização por espectrometria de massas *MALDI-ToF***

A amostra bruta liofilizada foi submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se o cromatógrafo Varian Pro Star®, com detector ultravioleta no comprimento de onda de 214 nm, fase móvel composta por água ultrapura acidificada a 0,1% (v/v) com TFA grau CLAE e acetonitrila grau CLAE acidificada a 0,08% (v/v) com TFA grau CLAE. O perfil analítico exploratório foi traçado inicialmente e o método de purificação otimizado e escalonado para a purificação. (AGUILAR, 2004).

Para a análise exploratória foi preparada uma solução com concentração aproximada de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> da amostra bruta, a partir da solubilização de aproximadamente 1,0 mg em 1,0 mL de solução contendo 20% (v/v) de acetonitrila grau CLAE acidificada. Foram injetados 100 µL desta solução que foi submetida à eluição em coluna analítica (150x4,6 mm; 5 µm; PHENOMENEX®) com fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, gradiente de fase móvel de 20% (v/v) de acetonitrila (0,08% (v/v) TFA) até 100% de acetonitrila (0,08% (v/v) TFA) em 60 minutos. As condições estão sumariadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Condições cromatográficas da análise exploratória da amostra bruta.

Coluna analítica 150x4,6 mm; 5 µm; PHENOMENEX®

Volume de injeção: 100 µL

Comprimento de onda de detecção: 214 nm

Fluxo: 1 mL.min<sup>-1</sup>

Fase móvel: A - Água 0,1% (v/v) TFA

B - Acetonitrila 0,08% (v/v) TFA

| Tempo (min) | % A | % B |
|-------------|-----|-----|
| 0           | 80  | 20  |
| 60          | 0   | 100 |

Após a obtenção do perfil analítico exploratório foram feitas modificações das condições cromatográficas em termos de gradiente, tempo de análise e volume de amostra injetada para a otimização do método de purificação, passando-se a utilizar coluna semipreparativa (250x10 mm; 5 µm; PHENOMENEX®). Esses ensaios foram realizados para amostra a 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> em solução 20% acetonitrila grau CLAE acidificada, injetando-se 1,0 mL de amostra por análise de 27 minutos com fluxo de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>. A Tabela 2 contém as condições de purificação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>.

**Tabela 2** - Condições cromatográficas de purificação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>.

Coluna semipreparativa 250x10 mm; 5 µm; PHENOMENEX®

Volume de injeção: 1000 µL

Comprimento de onda de detecção: 214 nm

Fluxo: 1,5 mL.min<sup>-1</sup>

Fase móvel: A - Água 0,1% (v/v) TFA

B - Acetonitrila 0,08% (v/v) TFA

| Tempo (min) | % A | % B |
|-------------|-----|-----|
| 0           | 80  | 20  |
| 23          | 25  | 75  |
| 25          | 0   | 100 |
| 27          | 80  | 20  |

Após a purificação, o peptídeo foi caracterizado por espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz - tempo de voo (*MALDI-ToF - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of flight*). A análise foi feita no Laboratório

Multiusuário de Proteômica (LMProt) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em espectrômetro Bruker Daltonics® Ultraflex *Extreme* III acoplado ao *software Flex Control 3.0* e em matriz ácido 2,5-dihidroxibenzoico. O peptídeo também foi caracterizado por CLAE após a purificação mediante à eluição de solução 200 µg.mL<sup>-1</sup> em coluna analítica (150x4,6 mm; 5 µm; Agilent®) com gradiente de 20% (v/v) de acetonitrila (0,08% (v/v) TFA) até 100% de acetonitrila (0,08% (v/v) TFA) em 27 minutos com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. A Tabela 3 contém as condições cromatográficas de caracterização do peptídeo.

**Tabela 3 - Condições cromatográficas de caracterização do peptídeo.**

Coluna analítica 150x4,6 mm; 5 µm; Agilent®

Volume de injeção: 20 µL

Comprimento de onda de detecção: 214 nm

Fluxo: 0,6 mL.min<sup>-1</sup>

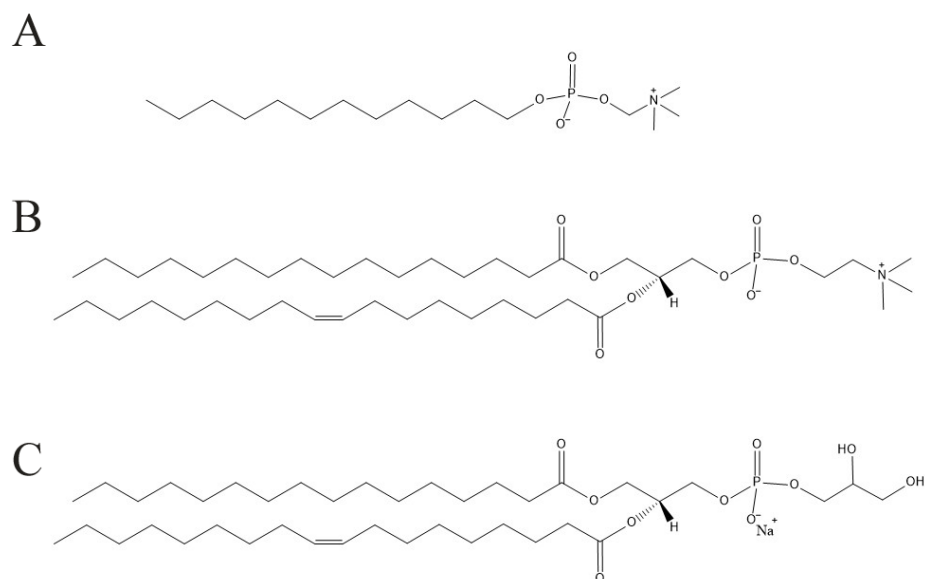
Fase móvel: A - Água 0,1% (v/v) TFA

B - Acetonitrila 0,08% (v/v) TFA

| Tempo (min) | % A | % B |
|-------------|-----|-----|
| 0           | 80  | 20  |
| 10          | 80  | 20  |
| 23          | 20  | 80  |
| 25          | 0   | 100 |
| 27          | 0   | 100 |
| 29          | 80  | 20  |

### 3.4 Espectroscopia de dicroísmo circular

Para se avaliar o tipo de estrutura secundária possivelmente adotada pelo peptídeo em diferentes meios, procedeu-se às análises por espectroscopia de dicroísmo circular em TFE e nas presenças de micelas de DPC e de vesículas de POPC e POPG. As estruturas do detergente e dos lipídeos são apresentadas na Figura 27. Os experimentos foram realizados no espectropolarímetro Jasco J-815® do Departamento de Química da UFMG.



**Figura 27** - Estruturas do detergente e lipídeos usados nas análises de dicroísmo circular. (A) n-dodecilsfosfocolina (DPC), (B) 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e (C) 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfo-glicerol (POPG).

Foram analisadas soluções peptídicas a  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Tendo em vista a baixa solubilidade do peptídeo em água ultrapura, foi necessária a acidificação com 0,15% (v/v) de TFA nas análises empregando-se TFE e na presença de micelas de DPC, condição que proporcionou solubilização adequada do peptídeo.

Foi preparada uma solução estoque  $25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de DPC em água ultrapura acidificada a 0,15% (v/v) com TFA, para tal, pesou-se 44,15 mg de DPC, solubilizando-se em 5 mL de água acidificada. Esta solução foi utilizada nas diluições para as concentrações, 1,0; 10; 15 e 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . As concentrações empregadas de TFE acidificado em água também acidulada a 0,15% (v/v) foram 0; 10; 30; 40; 50; 60 e 80% (v/v).

Para a obtenção das vesículas unilamelares grandes (*Large Unilamellar Vesicles - LUVs*) foram preparados 10 mL de uma solução  $3,0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de vesícula de POPC e POPG, na proporção 3:1. Assim, foram pesados 17,10 e 5,78 mg de POPC e POPG, respectivamente, e solubilizados separadamente com aproximadamente 1mL de clorofórmio. As soluções foram transferidas para um balão de fundo redondo e o sistema foi submetido à rotaevaporação até formação de um filme homogêneo. Em seguida o filme foi ressuspenso em 10 mL de água ultrapura, transferido para um tubo de centrifugação e a solução foi submetida a cinco ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho de água a cerca de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Subsequentemente, a solução foi extrusada para a padronização do tamanho das *LUVs*, pela passagem de 0,7 em 0,7 mL da solução por 11 vezes em um mini-extrusor contendo uma membrana de policarbonato de 100 nm (Avanti<sup>®</sup>, Polar

Lipids Inc., AL, EUA). As diluições foram feitas para a obtenção das soluções de *LUVs* nas concentrações, 0,5; 1,0; 1,5 mmol.L<sup>-1</sup>.

Foram pesados 1,07 mg de peptídeo os quais foram solubilizados em 10,7 mL de água acidificada a 0,15% com TFA, resultando em solução do peptídeo a 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. A solução foi dividida entre microtubos para centrifugação transferindo-se 300 µL para cada um (0,03 mg de peptídeo). As soluções contidas em cada microtubo foram liofilizadas e os liófilos foram utilizados nas análises. As análises foram feitas a 25 °C, em cubeta de quartzo com caminho óptico de 0,1 mm, na faixa de 190 a 260 nm, em 8 varreduras por análise, resolução de 0,2 nm e velocidade de 100 nm.min<sup>-1</sup>. Os espectros adquiridos foram subtraídos dos respectivos espectros das soluções brancas (ou seja, soluções equivalentes, porém sem peptídeos) e processados com a suíte de *softwares* Spectra Manager<sup>®</sup> (Jasco). Os espectros processados foram submetidos a análises de deconvolução pelo *software* CD Pro<sup>®</sup> para se estimar os percentuais expressos de motivos de estrutura secundária (SREERAMA; WOODY, 2000; SREERAMA; WOODY, 2004).

### **3.5 Desenvolvimento de sistemas poliméricos de liberação do peptídeo e quantificação por CLAE**

#### **3.5.1 Desenvolvimento dos implantes poliméricos de PLGA contendo o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>**

Para a obtenção dos implantes do copolímero de poli ácido láctico e ácido glicólico (PLGA) (50:50) contendo o PSAIWF-NH<sub>2</sub> foram preparadas soluções separadas do peptídeo e do polímero. Foram pesados 29,93 mg de peptídeo os quais foram solubilizados em 8,75 mL de solução 80% (v/v) acetonitrila. Do copolímero foram pesados 92,10 mg, que foram solubilizados em 3,75 mL de solução 80% (v/v) acetonitrila. As soluções foram misturadas e liofilizadas por 24 horas.

A fim de se avaliar a estabilidade do peptídeo frente ao aquecimento, este foi aquecido em aproximadamente 100 °C e logo em seguida foi submetido à análise por espectrometria de massas *MALDI-ToF* realizada no Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, em espectrômetro Bruker Daltonics<sup>®</sup> Ultraflex *Extreme* III acoplado ao *software* *Flex Control 3.0* e em matriz ácido 2,5-diidroxibenzoico. O liófilo foi moldado a quente em chapa de politetrafluoretileno à temperatura de aproximadamente 100 °C, resultando em cinco implantes. Os implantes foram colocados individualmente em frascos de penicilina com 2,0 mL de solução tampão

fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 7,4 e incubados a 37 °C e 40 rotações por minuto (rpm). As alíquotas de solução tampão foram coletadas em um período de 39 dias e analisadas por CLAE para quantificação do peptídeo liberado do implante (FIALHO et al., 2006; FIALHO; BEHAR-COHEN; SILVA-CUNHA, 2008; RESENDE et al., 2016).

### 3.5.2 Delineamento experimental

As soluções para a construção da curva analítica foram obtidas mediante o preparo de três soluções estoques de aproximadamente 600  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do PSAIWF-NH<sub>2</sub> puro a partir da pesagem em triplicata de 6,0 mg de peptídeo que foram solubilizados em 10,0 mL de solução 20% (v/v) acetonitrila. Com as diluições das soluções estoque em tampão fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) 20  $\text{mmol.L}^{-1}$  pH 7,4, foram preparadas as soluções do peptídeo nas seguintes concentrações 2,5; 5,0; 10; 20; 40; 60 e 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Essas soluções foram filtradas em filtro de fibra de vidro 0,45  $\mu\text{m}$  e injetadas no sistema cromatográfico. Nas Tabelas 4,5 e 6 estão as diluições que se procederam para a obtenção das soluções em concentrações aproximadas às supracitadas.

**Tabela 4** - Diluições da solução estoque 0,60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

| Concentração objetivada    | Volume de solução estoque 0,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (mL) | Volume de solução tampão fosfato 20 $\text{mmol.L}^{-1}$ (mL) | Concentração final ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  | 0,04                                                      | 9,96                                                          | 2,50                                         |
| 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  | 0,08                                                      | 9,92                                                          | 4,95                                         |
| 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,17                                                      | 9,83                                                          | 9,95                                         |
| 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,33                                                      | 9,67                                                          | 19,67                                        |
| 40,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,67                                                      | 9,33                                                          | 39,93                                        |
| 60,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 1,00                                                      | 9,00                                                          | 59,60                                        |
| 80,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 1,33                                                      | 8,67                                                          | 79,27                                        |

**Tabela 5** - Diluições da solução estoque 0,59  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

| Concentração objetivada    | Volume de solução estoque 0,59 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (mL) | Volume de solução tampão fosfato 20 $\text{mmol.L}^{-1}$ (mL) | Concentração final ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  | 0,04                                                      | 9,96                                                          | 2,45                                         |
| 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  | 0,08                                                      | 9,92                                                          | 4,90                                         |
| 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,17                                                      | 9,83                                                          | 9,85                                         |
| 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,33                                                      | 9,67                                                          | 19,47                                        |
| 40,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,67                                                      | 9,33                                                          | 39,53                                        |
| 60,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 1,00                                                      | 9,00                                                          | 59,00                                        |
| 80,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 1,33                                                      | 8,67                                                          | 78,47                                        |

**Tabela 6 - Diluições da solução estoque 0,59  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .**

| Concentração objetivada    | Volume de solução estoque 0,59 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (mL) | Volume de solução tampão fosfato 20 $\text{mmol.L}^{-1}$ (mL) | Concentração final ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  | 0,04                                                      | 9,96                                                          | 2,49                                         |
| 5,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$  | 0,08                                                      | 9,92                                                          | 4,94                                         |
| 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,17                                                      | 9,83                                                          | 9,94                                         |
| 20,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,33                                                      | 9,67                                                          | 19,63                                        |
| 40,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 0,67                                                      | 9,33                                                          | 39,86                                        |
| 60,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 1,00                                                      | 9,00                                                          | 59,500                                       |
| 80,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ | 1,33                                                      | 8,67                                                          | 79,13                                        |

As soluções depois de filtradas foram injetadas (20  $\mu\text{L}$ ) no sistema cromatográfico da menor para a maior concentração com injeção de solução 20% (v/v) acetonitrila acidificada (solução branca) entre cada corrida. As análises foram feitas no cromatógrafo Shimadzu<sup>®</sup> LC20AD (L201046), em coluna analítica (150x4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Agilent<sup>®</sup>), fase móvel composta por água ultrapura acidificada a 0,1% (v/v) com TFA grau CLAE (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) e acetonitrila grau CLAE (Merck<sup>®</sup>) acidificada a 0,08% (v/v) com TFA grau CLAE, com fluxo de 0,6  $\text{mL.min}^{-1}$  e detecção nos comprimentos de onda de 214 e 280 nm. Na Tabela 7 estão as condições cromatográficas das análises bem como o método de eluição.

**Tabela 7 - Condições cromatográficas de análise das soluções da curva analítica.**Coluna analítica 150x4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ; Agilent<sup>®</sup>Volume de injeção: 20  $\mu\text{L}$ 

Comprimento de onda de detecção: 214 nm; 280 nm

Fluxo: 0,6  $\text{mL.min}^{-1}$ 

Fase móvel: A - Água 0,1% (v/v) TFA

B - Acetonitrila 0,08% (v/v) TFA

| Tempo (min) | % A | % B |
|-------------|-----|-----|
| 0           | 80  | 20  |
| 10          | 80  | 20  |
| 23          | 20  | 80  |
| 25          | 0   | 100 |
| 27          | 0   | 100 |
| 29          | 80  | 20  |



As alíquotas de liberação dos implantes foram analisadas na ordem cronológica de coleta (24; 48; 72; 96; 168; 240; 408; 576 e 936 horas) nas mesmas condições cromatográficas descritas acima. A plotagem da curva analítica se deu por meio da proposição do modelo de regressão linear e avaliação estatística.

### 3.5.3 *Proposição do modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários*

As áreas integradas pelo *software* LC Solutions® referentes aos sinais do peptídeo foram plotadas pelas respectivas concentrações, resultando em uma curva descrita por uma equação polinomial de duas variáveis (área - y e concentração - x) e dois coeficientes (linear e angular). Esse conjunto de dados foi submetido ao teste dos resíduos padronizados de Jackknife para detecção de pontos *outliers* e o modelo sem esses pontos foi submetido à análise de variância (ANOVA), ao teste de normalidade dos resíduos de Ryan-Joiner, teste de homoscedasticidade de Brown e Forsythe e teste de independência dos resíduos de Durbin-Watson para que se obtivesse um modelo estatisticamente significativo, sem falta de ajuste e com os dados bem ajustados (DANZER; CURRIE, 1998; DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

#### 3.5.3.1 *Teste dos resíduos padronizados de Jackknife - detecção de outliers*

A detecção de *outliers* pelo teste de Jackknife requer a determinação dos resíduos padronizados de Jackknife -  $J_{ei}$ , de modo que os resíduos seguem a distribuição  $t$  com  $n-p-1$  graus de liberdade, sendo que valores acima do valor de  $t$  crítico para 95% de confiança são considerados *outliers* (MEIER; ZÜND, 2005; DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; A.BELSLEY; KUH; E. WELSCH, 2004). Os resíduos padronizados de Jackknife podem ser calculados conforme as Equações 3.1 a 3.6.

$$J_{ei} = r_i \sqrt{\frac{n-p-1}{n-p-r_i^2}} \quad \text{Equação 3.1}$$

$J_{ei}$  = resíduo padronizado de Jackknife

$n$  = número de observações

$p$  = número de parâmetros

$$r_i = \frac{e_i}{S_{e_i}} \quad \text{Equação 3.2}$$

$r_i$  = resíduo padronizado

$e_i = y_i - \hat{y}_i$  (resíduo)

$y_i$  = resposta medida

$\hat{y}_i$  = resposta prevista

$S_{e_i}$  = erro padrão residual

$$S_{e_i} = s_{res} \sqrt{1 - h_i} \quad \text{Equação 3.3}$$

$s_{res}$  = desvio padrão residual

$h_i$  = ponto de alavanca (*leverage*)

$$s_{res} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Equação 3.4}$$

$$h_i = \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{S_{xx}} \quad \text{Equação 3.5}$$

$x_i$  = concentração i

$\bar{x}$  = concentração média

$S_{xx}$  = soma quadrática de  $(x_i - \bar{x})$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \text{Equação 3.6}$$

### 3.5.3.2 *Análise de Variância (ANOVA) e limites de detecção e quantificação*

Aplicando o método da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários (*Ordinary Least Squares Method - OLSM*), o modelo polinomial de primeira ordem sem os *outliers* foi proposto e submetido à ANOVA para determinação da significância da regressão linear, falta de ajuste e os coeficientes de determinação -  $R^2$  e correlação -  $r$  (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; R. DRAPER; SMITH, 1998; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Equações matriciais foram usadas para se obter os coeficientes angular ( $b_1$ ) e

linear ( $b_0$ ) bem como os valores de  $y$  previstos conforme descritas abaixo:

$$b_0, b_1 = \text{inverso}(X'X) * X'y \quad \text{Equação 3.7}$$

$b_0$  = coeficiente linear

$b_1$  = coeficiente angular

$X$  = matriz  $X$

$X'$  = matriz  $X$  transposta

$y$  = respostas medidas

**Matriz  $X$**

$$\begin{bmatrix} 1 & x_1 \\ 1 & x_2 \\ 1 & x_3 \\ 1 & . \\ 1 & . \\ 1 & . \\ 1 & . \\ 1 & x_n \end{bmatrix}$$

**Matriz  $X$  transposta ( $X'$ )**

$$\begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ x_1 & x_2 & x_3 & . & . & . & . & x_n \end{bmatrix}$$

$$\hat{y}_i = X * b_0, b_1 \quad \text{Equação 3.8}$$

$\hat{y}_i$  = respostas previstas

A partir dos valores das respostas obtidas e das respostas previstas, puderam ser estimadas as médias quadráticas da regressão, dos resíduos, da falta de ajuste e do erro puro, calculadas através da razão das respectivas somas quadráticas pelos graus de liberdade. As equações que descrevem tais parâmetros estão na Tabela 8. O coeficiente de correlação -  $r$  foi determinado através das Equação 3.9.

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n\sum x^2 - (\sum x)^2][n\sum y^2 - (\sum y)^2]}}$$

**Equação 3.9**

$r$  = coeficiente de correlação

$x$  = concentração

$y$  = resposta medida

$n$  = número de observações

**Tabela 8** - Equações para estimativa das somas quadráticas, graus de liberdade e médias quadráticas da regressão, dos resíduos, da falta de ajuste e do erro puro.

|                                 | Soma quadrática                                              | Graus de liberdade | Média Quadrática          |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------|
| Regressão                       | $SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$       | $GL_R = p-1$       | $MQ_R = SQ_R/p-1$         |
| Resíduos                        | $SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$        | $GL_r = n-p$       | $MQ_r = SQ_r/n-p$         |
| Falta de Ajuste                 | $SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$ | $GL_{faj} = m-p$   | $MQ_{faj} = SQ_{faj}/m-p$ |
| Erro Puro                       | $SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$     | $GL_{ep} = n-m$    | $MQ_{ep} = SQ_{ep}/n-m$   |
| Total                           | $SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$          | $GL_T = n-1$       | $MQ_T = SQ_T/n-1$         |
| % variância explicada ( $R^2$ ) | $SQ_R/SQ_T$                                                  | -                  | -                         |

$n$  = número de observações

$m$  = níveis

$p$  = parâmetros

$\hat{y}_i$  = resposta prevista

$y_{ij}$  = resposta observada

$\bar{y}_i$  = resposta média de cada nível

$\bar{y}$  = resposta média global

Por meio do teste estatístico  $F$ , a significância estatística da regressão linear e a falta de ajuste foram avaliadas. A hipótese nula de que o modelo não é estatisticamente significativo, ou seja, que não existe relação entre  $x$  e  $y$  foi confrontada com a hipótese alternativa de que o modelo é estatisticamente significativo, de modo que a hipótese nula é rejeitada se o valor de  $F$  calculado for maior que o valor de  $F$  crítico a 95% de confiança. O valor de  $F$  foi calculado pela razão da média quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos (Equação 3.10) e o valor de  $F$  crítico foi calculado através do software Excel<sup>®</sup> usando a função  $INVF$  com nível de significância de 95% e os respectivos graus de liberdade da regressão e dos resíduos.

$$F_{\text{significância}} = \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad \text{Equação 3.10}$$

$$F_{\text{crítico}} = \text{invf}(0,05; p - 1; n - p)$$

A premissa de que o modelo não tem falta de ajuste compõe a hipótese nula e é aceita se o valor de  $F$  calculado for menor que o valor de  $F$  crítico. O valor de  $F$  foi calculado pela razão da média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro (Equação 3.11) e o valor comparado com o valor de  $F$  crítico obtido a partir da função  $INVF$  com nível de significância de 95% e os respectivos graus de liberdade da falta de ajuste e do erro puro.

$$F_{\text{falta de ajuste}} = \frac{MQ_{faj}}{MQ_{ep}} \quad \text{Equação 3.11}$$

$$F_{\text{crítico}} = \text{invf}(0,05; m - p; n - m)$$

Os intervalos de confiança dos coeficientes angular e linear foram determinados a partir das Equações 3.12 a 3.16. Os coeficientes são considerados estatisticamente significativos a 95% de confiança se os intervalos de confiança não contiverem o zero.

$$I.C. (b_1) = \pm t_v * s(b_1) \quad \text{Equação 3.12}$$

$$I.C. (b_0) = \pm t_v * s(b_0) \quad \text{Equação 3.13}$$

$I.C.$  = Intervalo de confiança

$t_v = \text{invt}(0,05; \text{número de graus de liberdade dos resíduos})$

$$s(b_1) = \sqrt{\frac{MQ_r}{S_{xx}}} \quad \text{Equação 3.14}$$

$s(b_1)$  = desvio padrão do coeficiente angular

$MQ_r$  = média quadrática dos resíduos

$S_{xx}$  = soma quadrática de  $(x_i - \bar{x})$

$$s(b_0) = s_r \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{nS_{xx}}} \quad \text{Equação 3.15}$$

$s(b_0)$  = desvio padrão do coeficiente linear

$x_i$  = concentração i

$S_{xx}$  = soma quadrática de  $(x_i - \bar{x})$

$$s_r = \sqrt{MQ_r} \quad \text{Equação 3.16}$$

$s_r$  = desvio padrão experimental

$MQ_r$  = média quadrática dos resíduos (variância experimental)

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir das Equações 3.17 e 3.18 (BRASIL, 2017).

$$LD = 3 x \frac{S}{R} \quad \text{Equação 3.17}$$

$LD$  = Limite de detecção

$S$  = Altura do sinal do peptídeo na menor concentração

$R$  = Altura do sinal do ruído (linha de base)

$$LQ = 10 x \frac{S}{R} \quad \text{Equação 3.18}$$

$LQ$  = Limite de quantificação

### 3.5.3.3 Teste da normalidade dos resíduos de Ryan-Joiner

Para verificar se os resíduos seguem a distribuição normal foi aplicado o teste de normalidade de Ryan-Joiner. Neste teste a hipótese nula de que os resíduos seguem a distribuição normal é aceita se o coeficiente de correlação ( $R_{eq}$ ) for maior que o coeficiente de correlação crítico  $R_{crítico}$  para 95% de confiança (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; RYAN; JOINER, 1976). O coeficiente de correlação bem como o coeficiente de correlação crítico foram calculados pelas Equações 3.19 a 3.24.

$$R_{eq} = \frac{S_{eq}}{\sqrt{S_{ee} \times S_{qq}}} \quad \text{Equação 3.19}$$

$R_{eq}$  = Coeficiente de correlação

$$S_{eq} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})(q_i - \bar{q}) \quad \text{Equação 3.20}$$

$e_i$  = resíduos ordenados

$\bar{e}$  = média dos resíduos

$q_i$  = percentis da normal

$\bar{q}$  = média dos percentis da normal

$$q_i = \Phi \left\{ \frac{(i-3/8)}{(n+1/4)} \right\} \quad i = 1, \dots, n \quad \text{Equação 3.21}$$

$\Phi$  = inverso da função de distribuição normal padrão

$$S_{ee} = \sum_{i=1}^n (e_i - \bar{e})^2 \quad \text{Equação 3.22}$$

$$S_{qq} = \sum_{i=1}^n (q_i - \bar{q})^2 \quad \text{Equação 3.23}$$

$$R_{crít(n)} \approx 1,0063 - \frac{0,1288}{\sqrt{n}} - \frac{0,6618}{n} + \frac{1,3505}{n^2} \quad \text{para } \alpha = 0,05$$

Equação 3.24

### 3.5.3.4 Teste de homoscedasticidade de Brown e Forsythe

O teste de homoscedasticidade de Levene adaptado por Brown e Forsythe avalia a aceitabilidade da hipótese nula de que a variância residual é constante, ou seja, os resíduos não diferem entre si. Neste teste os resíduos são divididos em dois grupos de tamanho  $n_1$  e  $n_2$ , as medianas para os grupos são calculadas ( $\tilde{e}_1, \tilde{e}_2$ ) e a partir disso é determinado o parâmetro estatístico  $t$  de Levene ( $t_L$ ) por meio das Equações 3.25 a 3.28. Se o valor de  $t_L$  não exceder o valor de  $t(1-\alpha/2)$  para  $n_1+n_2-2$  graus de liberdade e 97,5% de confiança, a hipótese nula é aceita e os resíduos são homoscedásticos (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; BROWN; FORSYTHE, 1974).

$$t_L = \frac{\bar{d}_1 - \bar{d}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) s_p^2}} \quad \text{Equação 3.25}$$

$t_L$  = estatística t de Levene

$n_1$  = número de observações do grupo 1 de resíduos

$n_2$  = número de observações do grupo 2 de resíduos

$$\bar{d}_k = \sum |\tilde{e}_k - e_{kj}| / n_k \quad \text{Equação 3.26}$$

$\bar{d}_k$  = média dos módulos das diferenças entre o j-ésimo resíduo e a mediana de cada grupo

$\tilde{e}_k$  = mediana de cada grupo

$e_{kj}$  = resíduo de cada grupo

$n_k$  = número de observações em cada grupo

$$s_p^2 = \frac{(SQD_1 + SQD_2)}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{Equação 3.27}$$

$s_p^2$  = variância combinada

$$SQD_k = \sum_{j=1}^{n_k} (\tilde{e}_k - e_{kj})^2 \quad \text{Equação 3.28}$$

$SQD_k$  = soma dos quadrados dos desvios entre cada j-ésimo resíduo e sua mediana



### 3.5.3.5 Teste de independência dos resíduos de Durbin-Watson

No teste de independência dos resíduos, a hipótese nula de que os resíduos não têm autocorrelação é confrontada contra a hipótese alternativa de que os resíduos não são independentes. O parâmetro estatístico  $d$  de Durbin-Watson é que determina a aceitação da hipótese nula e é comparado com os limites inferior ( $d_L$ ) e superior ( $d_U$ ) estabelecidos. Se o valor de  $d$  for menor que  $d_L$ , os resíduos estão autocorrelacionados; estando entre os limites inferior e superior, o teste é inconclusivo e se for maior que  $d_U$ , os resíduos são independentes e a hipótese nula é aceita ao nível de confiança estabelecido (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005; DURBIN; WATSON, 1951). A estatística  $d$  e os valores de  $d_L$  e  $d_U$  foram calculados de acordo com as Equações 3.29 a 3.31.

$$d = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad \text{Equação 3.29}$$

$d$  = parâmetro estatístico de Durbin-Watson

$e_i$  = resíduo  $i$

$e_{i-1}$  = resíduo  $i-1$

$$d_L \approx 1,9693 - \frac{2,8607}{\sqrt{n}} - \frac{3,4148}{n} + \frac{16,6400}{n^2} \quad \text{para } \alpha = 0,05$$

Equação 3.30

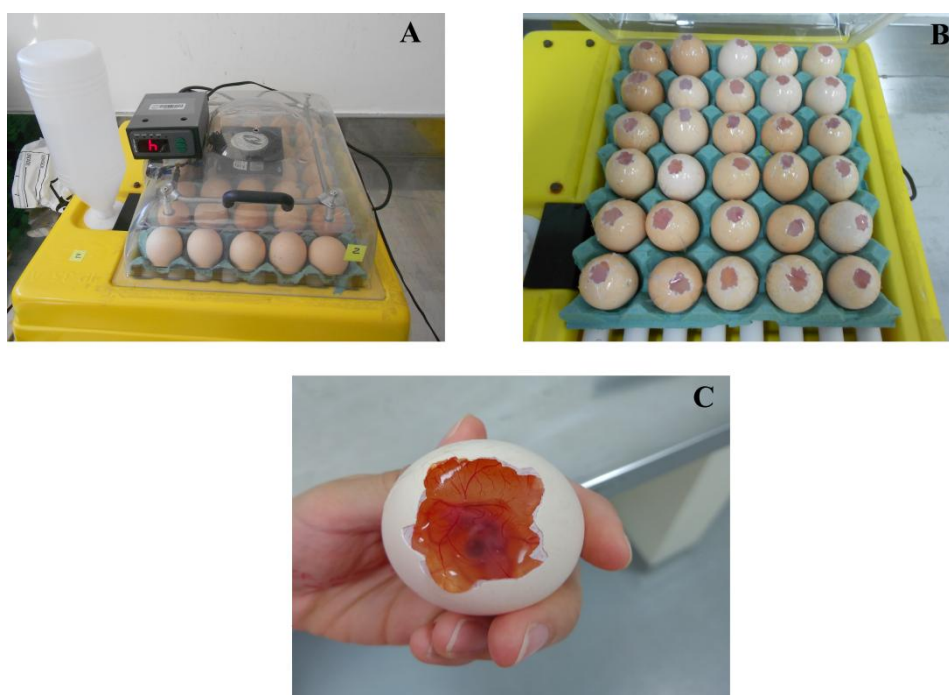
$$d_U \approx 1,9832 - \frac{3,0547}{\sqrt{n}} + \frac{1,3862}{n} + \frac{16,3662}{n^2} \quad \text{para } \alpha = 0,05$$

Equação 3.31

## 3.6 Avaliação da atividade antiangiogênica do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> em modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha

O ensaio em membrana corioalantoica de embrião de galinha (*Chick Embryo Chorioallantoic Membrane - CAM*) para avaliar a atividade antiangiogênica do peptídeo

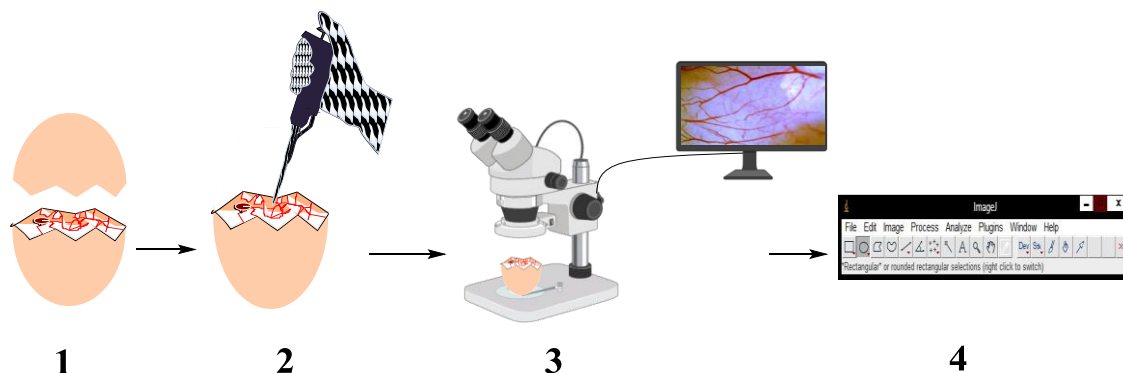
PSAIWF-NH<sub>2</sub> foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os ovos embrionados (*Gallus domesticus*) com 3 dias foram submetidos à exposição da membrana corioalantoica por pequena abertura feita na parte superior de cada ovo, tendo sido a abertura protegida com fita adesiva transparente, evitando contato externo. Os ovos foram alocados em incubadoras e mantidos a aproximadamente 37 °C e umidade em cerca de 60%. Na Figura 28 estão demonstradas a alocação dos ovos na incubadora e a exposição da membrana corioalantoica de um dos embriões utilizados.



**Figura 28** - Fotografias dos ovos usados no ensaio CAM. (A) Ovos embrionados dispostos na incubadora, (B) Ovos embrionados com membranas corioalantoicas expostas e (C) Membrana corioalantoica, evidenciando-se os vasos sanguíneos.

Dois dias após a incubação (5º dia de desenvolvimento embrionário), os ovos foram divididos em cinco grupos, controle positivo - solução 250 µg.mL<sup>-1</sup> de bevacizumabe (Avastin<sup>®</sup>), controle negativo - solução tampão fosfato (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/HP0<sub>4</sub><sup>2-</sup>) 20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,4 e soluções do peptídeo nas concentrações de 2,5, 5,0 e 25,0 µg.mL<sup>-1</sup>. Foram instilados na superfície da membrana corioalantoica dos embriões 50 µL de solução, de acordo com a divisão dos grupos. As aplicações foram repetidas no sexto dia de desenvolvimento embrionário e no sétimo dia as membranas corioalantoicas foram fotografadas por uma câmera (Motic<sup>®</sup>) acoplada a um estereomicroscópio (Motic<sup>®</sup>) e as imagens foram obtidas

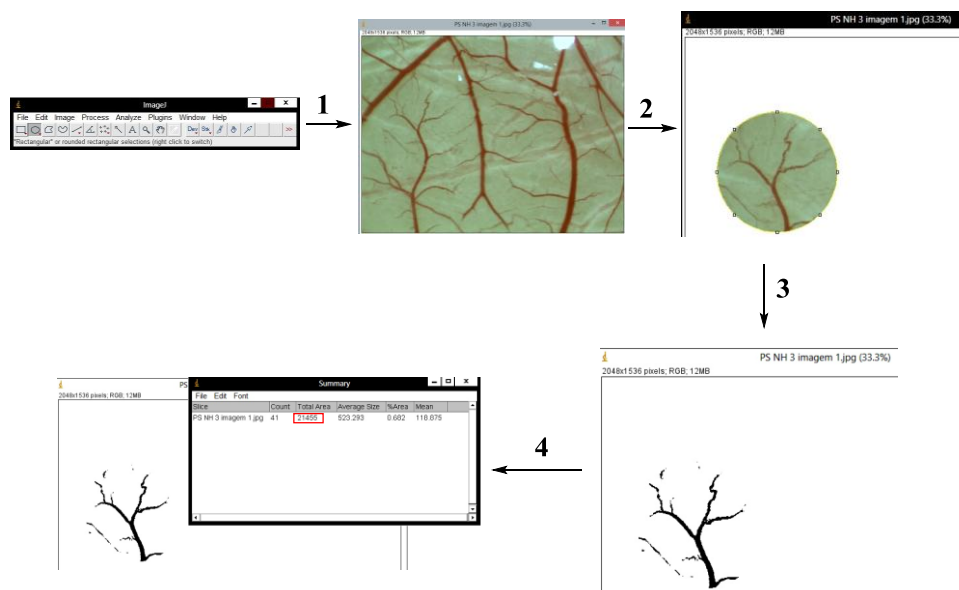
através do *software* Motic Image Plus 2.0 (KUE et al., 2015; RIBATTI, 2016). Após as membranas terem sido fotografadas os embriões foram eutanasiados com solução de formaldeído 1 % (v/v). A Figura 29 esquematiza os procedimentos do ensaio *CAM*.



- 1 - Exposição da membrana corioalantoica
- 2 - Instilação das amostras (50  $\mu$ L) na membrana corioalantoica
- 3 - Obtenção das imagens das membranas corioalantoicas
- 4 - Mensuração da área vascular em *pixels* através do *software* ImageJ 2.0

**Figura 29** - Esquemática das etapas envolvidas no ensaio *CAM*. (1) exposição da membrana corioalantoica, (2) instilação da solução na membrana corioalantoica, (3) obtenção das imagens das membranas corioalantoicas e (4) mensuração da área vascular pelo *software* ImageJ.

As imagens obtidas foram tratadas no *software* ImageJ 2.0 selecionando-se uma área de vasos periféricos, a qual foi delimitada por círculo de tamanho padronizado. O fundo da imagem foi colocado em cor branca e os vasos sanguíneos contrastados em cor preta. Através da função “*Threshold Color*” foram feitos ajustes finos para atenuar áreas enegrecidas que não correspondiam aos vasos sanguíneos, deixando em evidência a rede vascular periférica. Feitos os ajustes, foram obtidas as áreas dos vasos sanguíneos em *pixels* de cada imagem através da função “*Analyze Particles*” e as mesmas foram usadas para estimar os percentuais vasculares em cada grupo analisado, fixando a média de densidade vascular do controle negativo em 100%. As comparações entre os grupos foram feitas usando o teste estatístico t duplo pareado ( $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo). A Figura 30 esquematiza as etapas descritas.



- 1 - Imagem aberta no software ImageJ 2.0
- 2 - Delimitação da área a ser mensurada
- 3 - Alteração da escala de cor, vasos sanguíneos contrastados em cor preta - Função "Threshold Color"
- 4 - Obtenção da área vascular em *pixels* - Função "Analyze Particles"

**Figura 30** - Esquematisação da análise das imagens obtidas no ensaio CAM no *software* ImageJ 2.0. (1) abertura da imagem no *software* ImageJ 2.0, (2) delimitação da área a ser mensurada, (3) alteração da escala de cor evidenciando os vasos sanguíneos e (4) obtenção da área vascular em *pixels*.

### 3.7 Avaliação da citotoxicidade do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> em célula do epitélio pigmentar da retina ARPE-19

O efeito tóxico do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> foi determinado pelo ensaio com brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5,-difeniltetrazolil (MTT) em células do epitélio pigmentar da retina (linhagem celular ARPE-19). As células ARPE-19 foram cultivadas em meio *DMEM-F12* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12*) suplementado com 10% de soro fetal bovino e contendo 1,0% de antibióticos PSA (penicilina, estreptomicina e anfotericina B). O meio foi trocado a cada dois dias e as células incubadas a 37 °C em atmosfera úmida a 5% CO<sub>2</sub>.

O ensaio *in vitro* foi realizado por Brenda e Sílvia, no laboratório de cultura celular da Fundação Ezequiel Dias. As células foram inoculadas em três placas de 96 poços (cada uma para os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas) e incubadas a 37 °C por 24 horas. As células foram então tratadas com o peptídeo nas concentrações de 2,5, 5, 10, 15 e 25 µg.mL<sup>-1</sup> em triplicata. O meio de cultura (controle de vida) e a solução de peróxido de hidrogênio

(controle de morte) foram também aplicados. As células foram então incubadas em atmosfera úmida a 5 % CO<sub>2</sub> e a 37 °C. Após 24; 48 e 72 horas, o meio foi trocado por 100 µL de solução 5 mg.mL<sup>-1</sup> de MTT. Duas horas depois, os cristais de formazan precipitados foram solubilizados pela adição de 55 µL de 10% dodecilsulfato de sódio (SDS)- HCl.

Após 18 horas, a densidade ótica foi medida e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT a 540 nm usando um leitor de microplaca (ELX800 - BIO-TEK®). A viabilidade celular foi expressa como percentual da viabilidade do controle de vida. Comparações entre os grupos foram analisadas usando a ANOVA seguida do teste de Bonferroni, sendo que  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (DUNN et al., 1996; BOULTON; DAYHAW-BARKER, 2001; SKEHAN et al., 1990).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Obtenção do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> e caracterização

A síntese em fase sólida decorreu com efetividade nos acoplamentos de todos os resíduos que compõem o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>. Apesar do alto caráter hidrofóbico do peptídeo em virtude da composição de resíduos aromáticos e de cadeia lateral alquílica alifática, não se observaram impedimentos aos acoplamentos, que poderiam ser advindos de processos de agregação. Em geral, resinas com maior grau de substituição não são adequadas para a síntese de moléculas hidrofóbicas, pois resultam em um carregamento maior em quantidade de matéria (número de mols) por grama de resina, podendo levar à agregação pela maior proximidade das cadeias (MARCHETTO; ETCHEGARAY JR; R. NAKAIE, 1992; PUGH; YORK; STEWART, 1992). Neste caso, porém, a agregação por proximidade estaria atenuada por se tratar da síntese de um peptídeo de cadeia pequena. A Tabela 9 resume as condições de acoplamento de cada resíduo, bem como apresenta os resultados dos testes de Kaiser das etapas de desproteção e acoplamento.

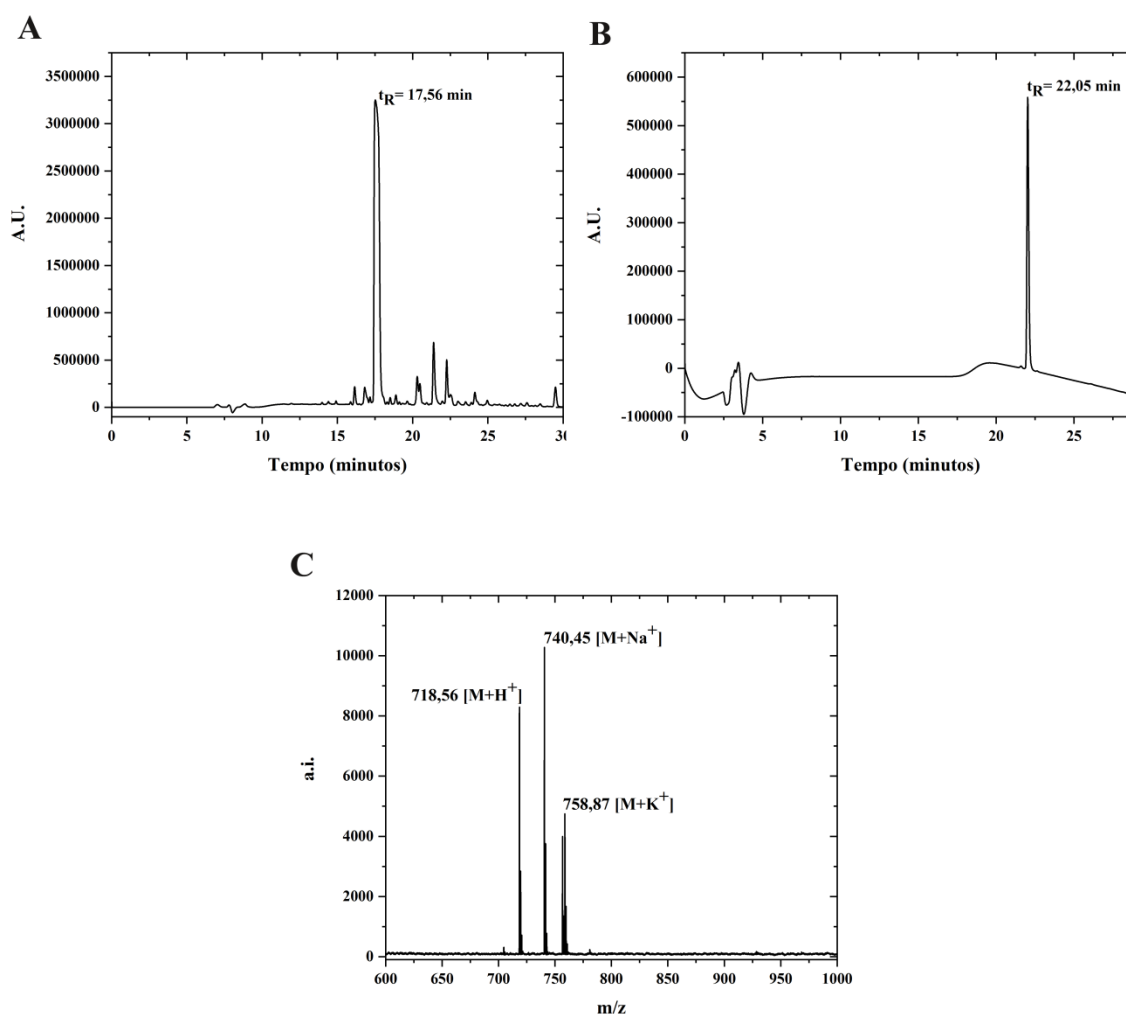
**Tabela 9** - Relação das massas pesadas dos derivados de aminoácidos (d.a.) e HOBt, volumes de DIC, DMF e DCM, tempo de cada acoplamento e resultados dos testes de Kaiser da síntese do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>.

| Derivado de aminoácido (d.a.) | Massa d.a. (mg) (4 Eq) | HOBt (mg) (4 Eq) | DIC (μL) (4Eq) | DMF (mL) | DCM (mL) | Tempo Acopl. (h) | Teste de Kaiser Acopl. | Teste de Kaiser Despr. |
|-------------------------------|------------------------|------------------|----------------|----------|----------|------------------|------------------------|------------------------|
| Fmoc-L-Phe-OH                 | 429,60                 | 167,62           | 168            | 1,5      | 1,5      | 3                | -                      | +                      |
| Fmoc-L-Trp(Boc)-OH            | 574,20                 | 167,31           | 168            | 1,5      | 1,5      | 3                | -                      | +                      |
| Fmoc-L-Ile-OH                 | 386,20                 | 166,99           | 168            | 1,5      | 1,5      | 2,5              | -                      | +                      |
| Fmoc-L-Ala-OH                 | 338,94                 | 167,16           | 168            | 1,5      | 1,5      | 3                | -                      | +                      |
| Fmoc-L-Cys(Trt)-OH            | 428,80                 | 167,77           | 168            | 1,5      | 1,5      | 3                | -                      | +                      |
| Fmoc-L-Pro-OH                 | 367,28                 | 166,77           | 168            | 1,5      | 1,5      | 3                | -                      | +                      |

(-): Teste de Kaiser negativo - acoplamento efetivo

(+): Teste de Kaiser positivo - desproteção efetiva

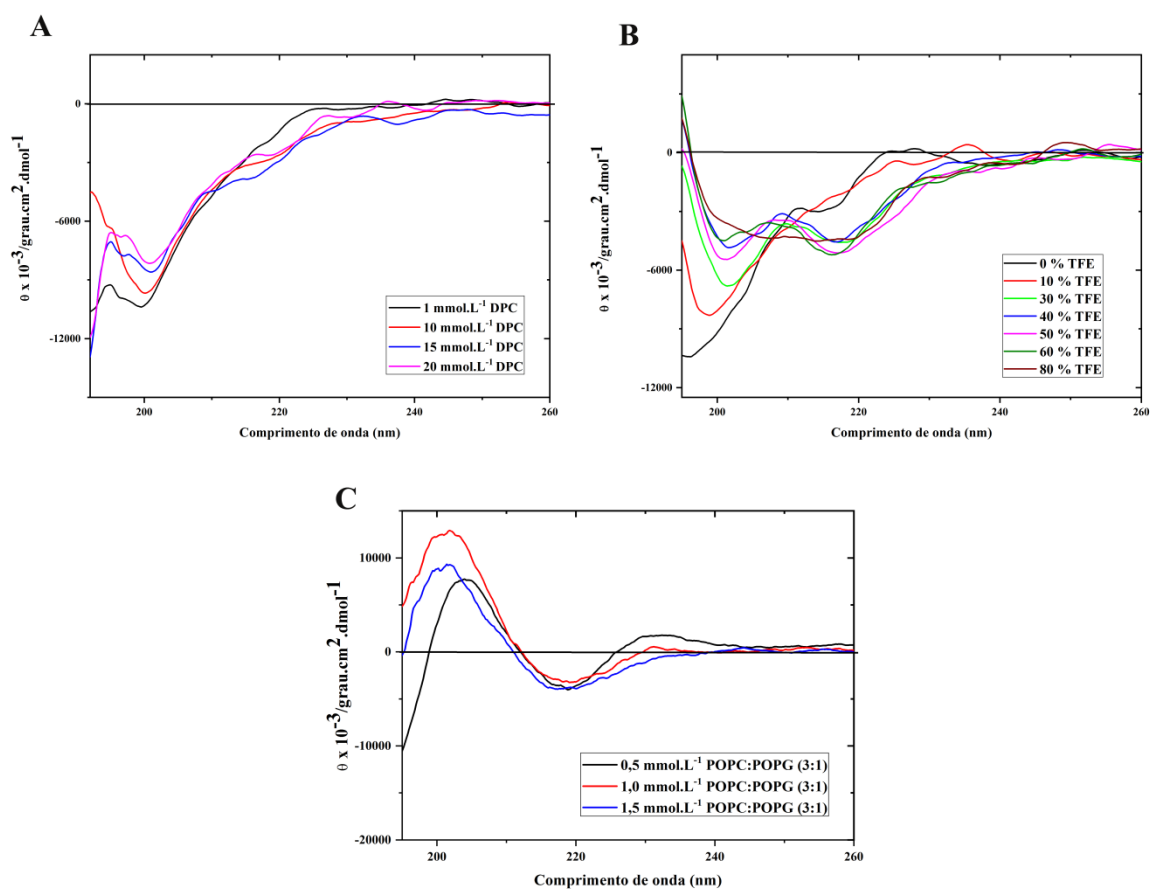
O rendimento bruto foi de 66,43% (131,54 mg) e o rendimento global foi de 53,22% (105,37 mg). O perfil de purificação evidencia que o peptídeo é detectado em 17,56 minutos (Figura 31 A) e a caracterização cromatográfica pós purificação indica um tempo de retenção de 22,05 minutos e pureza de 98,7% (Figura 31 B). O espectro de massas confirma a obtenção do peptídeo, observando-se três sinais intensos com razões massa/carga ( $m/z$ ) de 718,56; 740,45 e 758,87 que correspondem ao peptídeo protonado e aos adutos de sódio e potássio, respectivamente (Figura 31 C).



**Figura 31** - (A) Perfil cromatográfico de purificação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> evidenciando tempo de retenção de 17,56 minutos, (B) Perfil cromatográfico pós purificação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> evidenciando tempo de retenção de 20,05 minutos e (C) Espectro de massas do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> evidenciando os sinais de razão massa/carga 718,56, 740,45 e 758,87 correspondentes ao peptídeo protonado e aos adutos de sódio e potássio.

## 4.2 Espectroscopia de dicroísmo circular

A fim de se obterem informações sobre preferências conformacionais do peptídeo em diferentes meios, realizaram-se estudos de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) em meio aquoso e na presença de meios miméticos de membranas. Os espectros de CD do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> obtidos na região do ultravioleta distante (190-260 nm) em TFE, DPC e LUVs de POPC/POPG estão mostrados na Figura 32.



**Figura 32** - Espectros de dicroísmo circular do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> a 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. (A) na presença de micelas de DPC (faixa de concentração de detergente de 1 a 20 mmol.L<sup>-1</sup>), (B) em soluções TFE:H<sub>2</sub>O na faixa de concentração de 0 a 80% (v/v) de cossolvente e (C) na presença de LUVs de POPC:POPG (3:1 mol:mol) (faixa de concentração lipídica de 0,5 a 1,5 mmol.L<sup>-1</sup>).

Em nenhum dos meios investigados, observou-se perfil espectral típico de estrutura  $\alpha$ -helicoidal, que é caracterizado por máximo em ~190 nm e mínimos em ~208 e 220 nm. Foram caracterizados baixos percentuais (em torno de 4%) de estrutura  $\alpha$ -helicoidal pelos dados de deconvolução usando o *software* CDPPro (SREERAMA; WOODY, 2000; SREERAMA; WOODY, 2004), porém percentuais desta magnitude podem ser considerados



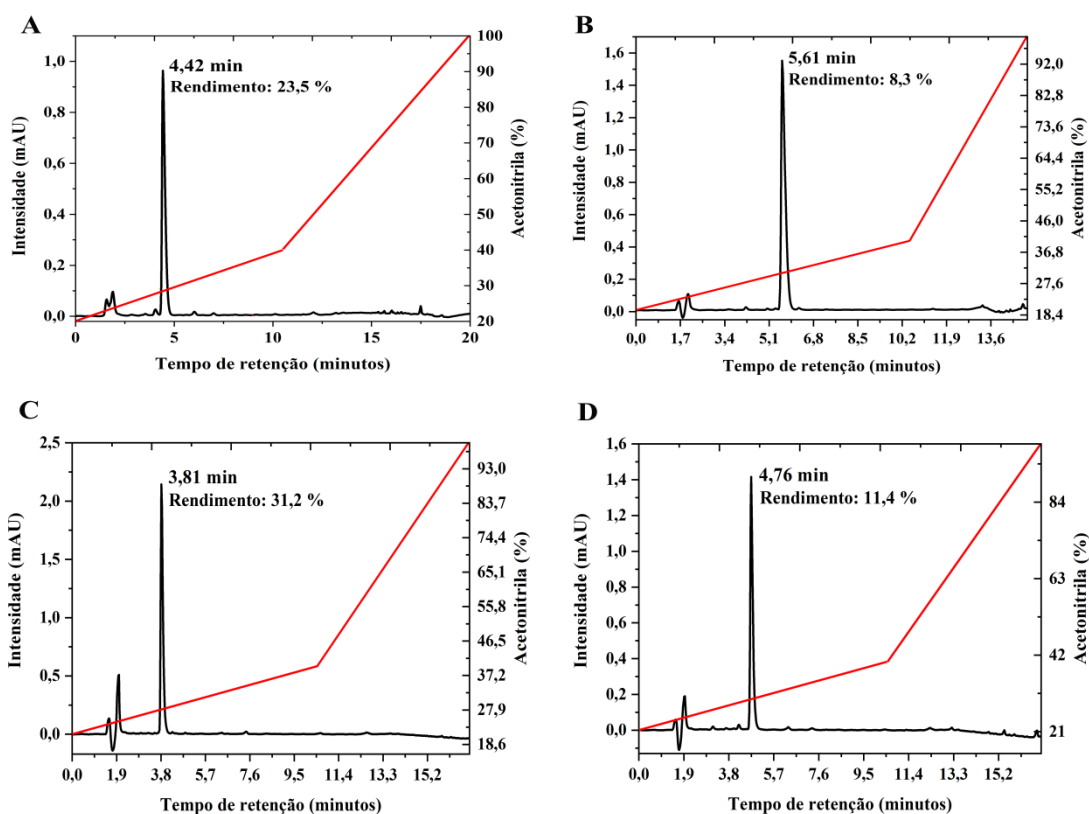
irrelevantes e, aliando-se aos perfis observados pela análise visual, indicam a inexistência deste tipo de motivo de estrutura secundária. Os espectros do peptídeo em soluções de TFE:H<sub>2</sub>O e na presença de micelas de DPC apresentam mínimos intensos em cerca de 200 nm, sendo estes perfis consistentes com peptídeos que não adotam conformação preferencial. Por outro lado, na presença de *LUVs* de POPC:POPG (3:1) são observados em todos os espectros um máximo em cerca de 200 nm e um mínimo em cerca de 220 nm, um padrão característico de estrutura secundária  $\beta$ , o que é corroborado pelo significativo percentual, da ordem maior que 76% (78,56; 77,50 e 76,13% para as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5 mmol.L<sup>-1</sup>, respectivamente) de estrutura secundária  $\beta$ , por análises de deconvolução com o programa (GOODMAN; NAIDER; RUPP, 1971; MATTICE, 1974). Este dado sugere que o peptídeo interage com a membrana aniônica e adota esta conformação bem definida. Alternativamente, a presença de vesículas carregadas negativamente poderia ainda induzir algum tipo de agregação, que leva a este tipo de conformação  $\beta$ .

Tendo em vista que o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> é um análogo carboxiamidado do peptídeo PCAIWF-OH descrito por Michaloski e colaboradores (MICHALOSKI et al., 2016), possivelmente o mecanismo de ação está relacionado à interação com os receptores *VEGFR* e inibição da cascata sinalizadora angiogênica. Sendo assim, o peptídeo teria como alvo molecular um receptor de membrana tirosina-quinase específico, diferenciando-se de muitos peptídeos antimicrobianos que têm por alvo molecular a membrana celular e assim demonstram significativa estruturação em contato com meios biomiméticos como as *LUVs*. Em contrapartida, por se tratar de um alvo molecular proteico de membrana, pode-se inferir que o contato direto do peptídeo com a membrana deve ocorrer e influir na ligação com o receptor, podendo justificar a  $\beta$  estruturação em *LUVs*.

### 4.3 Atividade antiangiogênica

Os peptídeos PCAIWF-OH e PSAIWF-OH, identificados por Michaloski e colaboradores, demonstraram por ensaios *in vitro* atividade *pan* inibitória dos receptores *VEGRs* envolvidos no mecanismo angiogênico (MICHALOSKI et al., 2016). Considerando a possibilidade de serem obtidos os análogos carboxiamidados dos peptídeos supracitados por abordagem Fmoc de síntese em fase sólida, foi realizado um estudo comparativo por CORDEIRO, 2018 que sintetizou em suporte polimérico os quatro peptídeos, PCAIWF-OH, PSAIWF-OH, PCAIWF-NH<sub>2</sub> e PSAIWF-NH<sub>2</sub> (CORDEIRO, 2018).

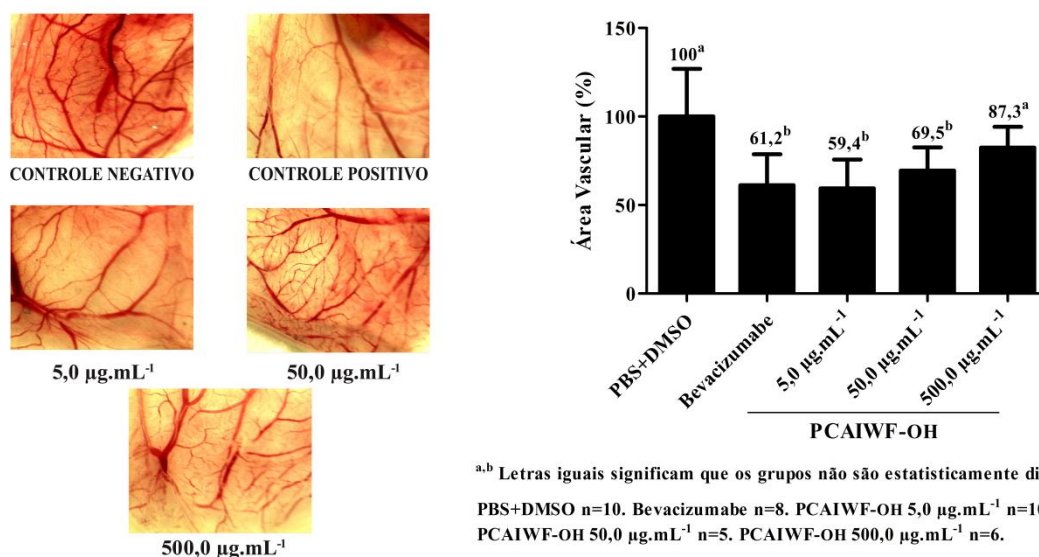
Os peptídeos carboxilados na porção *C*-terminal foram obtidos pelo método do anidrido simétrico em resina *Wang*, enquanto os análogos carboxiamidados foram obtidos pelo método convencional da estratégia Fmoc de síntese em fase sólida em resina *Rink Amide*. Em termos gerais, CORDEIRO (CORDEIRO, 2018) evidenciou que os peptídeos carboxiamidados são obtidos com maiores rendimentos, e isso ocorre devido à maior estabilidade da ligação amídica em comparação com a ligação éster frente a reações de adição nucleofílica que poderiam resultar em clivagem. Além disso, o baixo rendimento de formação do anidrido simétrico em solução, que constitui a primeira etapa na síntese dos peptídeos carboxilados na porção *C*-terminal também influenciou para os menores rendimentos globais (Figura 33).



**Figura 33** - Perfis cromatográficos CLAE-UV pós purificação e rendimentos dos peptídeos PCAIWF-NH<sub>2</sub>, PCAIWF-OH, PSAIWF-NH<sub>2</sub> e PSAIWF-OH. (A) Perfil cromatográfico do peptídeo PCAIWF-NH<sub>2</sub> evidenciando-se a detecção em 4,42 minutos e rendimento de 23,5%. (B) Perfil cromatográfico do peptídeo PCAIWF-OH evidenciando-se a detecção em 5,61 minutos e rendimento de 8,3%. (C) Perfil cromatográfico do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> evidenciando a detecção em 3,81 minutos e rendimento de 31,2%. (D) Perfil cromatográfico do peptídeo PSAIWF-OH evidenciando a detecção em 4,76 minutos e rendimento de 11,4%. Resultados obtidos por (CORDEIRO, 2018).

Com o objetivo de avaliar comparativamente os perfis de atividade antiangiogênica dos quatro peptídeos e identificar aquele(s) com o melhor perfil de inibição da vasculogênese,

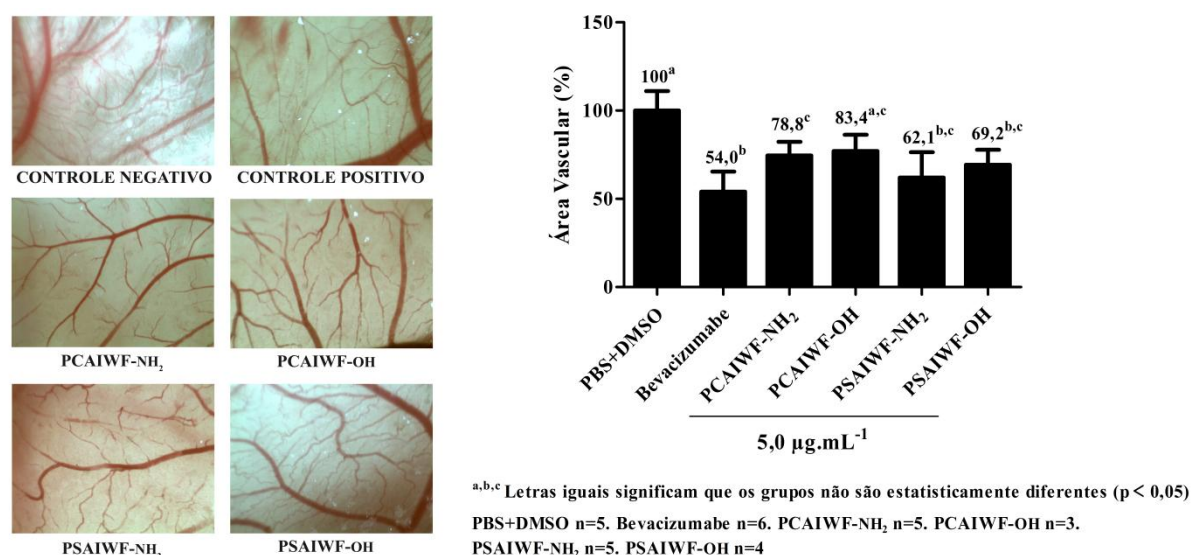
foram realizados por CORDEIRO, 2018 ensaios em membrana corioalantoica de embriões de galinha (*CAM*) com os peptídeos. Todos os ensaios foram realizados com as amostras solubilizadas em tampão fosfato pH 7,4 e comparadas com o controle positivo, solução de bevacizumabe a 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Esse controle é um anticorpo monoclonal humanizado IgG1 de 148 kDa amplamente utilizado em terapia *off-label* de doenças oculares devido à sua capacidade de inibição direta de fatores de crescimento endotelial vascular, especialmente o VEGF-A. O bevacizumabe é comumente administrado por injeção intravítrea na dose de 1,25 mg em 0,05 mL com intervalo de 4 a 6 semanas (FERRARA et al., 2004; WELLS et al., 2015; WU et al., 2008). O primeiro ensaio foi feito com o peptídeo PCAIWF-OH nas concentrações de 5,0, 50,0 e 500,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dentre as concentrações testadas a concentração de 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  demonstrou o maior percentual de redução dos vasos sanguíneos (40,6%) e não apresentou diferenças estatisticamente significativas com o controle positivo que reduziu o percentual de vasos em 38,8% (CORDEIRO, 2018). Na Figura 34 estão as imagens estereomicroscópicas das membranas corioalantoicas dos grupos avaliados e dos controles, bem como a relação percentual dos vasos sanguíneos para cada grupo.



**Figura 34** - À esquerda, imagens estereomicroscópicas das membranas corioalantoicas dos controles e do peptídeo PCAIWF-OH nas concentrações de 5,0, 50,0 e 500,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . À direita, percentual de área vascular. Controle negativo fixado em 100%. Percentual de inibição causado pelo controle positivo (bevacizumabe a 250,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e pelo peptídeo nas concentrações supracitadas ( $p < 0,05$ ). Resultados obtidos por CORDEIRO, 2018.

Tendo sido constatado que o melhor perfil de inibição angiogênica foi alcançado com o peptídeo PCAIWF-OH na concentração de 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foram então avaliados

comparativamente os quatro peptídeos nesta concentração em ensaio *CAM* realizado por CORDEIRO, 2018. Neste ensaio o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> demonstrou a maior redução percentual de vasos periféricos (37,9%) na concentração de 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> e não apresentou diferença estatisticamente significativa com o controle positivo (solução de bevacizumabe a 250,0 µg.mL<sup>-1</sup>) a 95% de confiança (Figura 35).

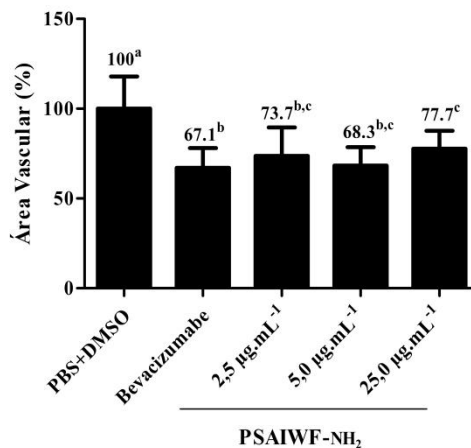
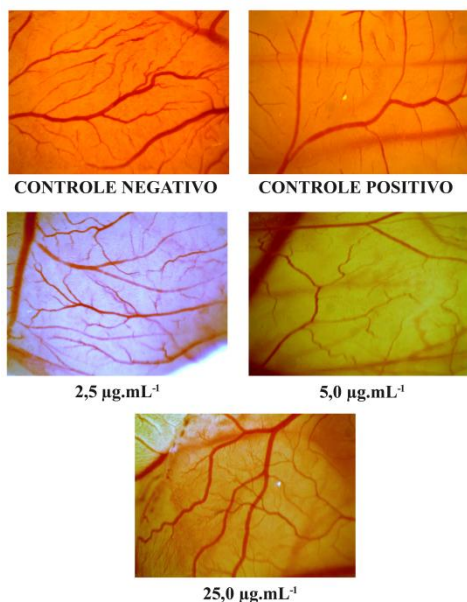


**Figura 35** - À esquerda, imagens estereoscópicas das membranas corioalantoicas dos controles e dos peptídeos na concentração de 5,0 µg.mL<sup>-1</sup>. À direita, percentual de área vascular. Controle negativo fixado em 100%. Percentual de inibição causado pelo controle positivo (bevacizumabe a 250,0 µg.mL<sup>-1</sup>) e pelos peptídeos na concentração de 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$ ). Resultados obtidos por CORDEIRO, 2018.

O alto nível de inibição alcançado por esse peptídeo carboxiamidado faz com que ele se destaque em relação aos demais. A obtenção por protocolos de síntese em fase sólida ortogonais que possibilitam a clivagem ácida seletiva da cadeia peptídica, bem como a estabilidade da ligação amídica frente às condições de síntese, em geral resultam em maior rendimento, configurando-se uma estratégia relativamente mais eficiente, simples e barata. Sendo assim, procedeu-se neste trabalho à avaliação da atividade antiangiogênica do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> em modelo *CAM* nas concentrações de 2,5, 5,0 e 25,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

A Figura 36 mostra os resultados do ensaio *CAM* do peptídeo nas concentrações de 2,5, 5,0 e 25,0 µg.mL<sup>-1</sup>. O grupo tratado com bevacizumabe a 250,0 µg.mL<sup>-1</sup> apresentou redução vascular de 32,9%, enquanto o peptídeo nas concentrações supracitadas demonstrou redução nos vasos sanguíneos periféricos das membranas de 26,3%, 31,7% e 22,3%, respectivamente. A maior inibição de vasos sanguíneos foi observada para o peptídeo na concentração de 5,0 µg.mL<sup>-1</sup>, o que pode indicar uma relação não linear de resposta dose-

dependente para o tratamento com PSAIWF-NH<sub>2</sub>. No entanto, diferenças estatísticas significativas não foram observadas entre o grupo controle positivo e o peptídeo nas concentrações de 2,5 e 5,0 µg.mL<sup>-1</sup>.



<sup>a,b,c</sup> Letras iguais significam que os grupos não são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ )

PBS+DMSO n=11. Bevacizumabe n=14. PSAIWF-NH<sub>2</sub> 2,5 µg.mL<sup>-1</sup> n=11.

PSAIWF-NH<sub>2</sub> 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> n=11. PSAIWF-NH<sub>2</sub> 25,0 µg.mL<sup>-1</sup> n=9.

**Figura 36** - Imagens estereomicroscópicas das membranas corioalantoicas aplicadas com os controles e o PSAIWF-NH<sub>2</sub> nas concentrações de 2,5; 5,0 e 25,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

O nível de inibição vasculogênica promovido pelo PSAIWF-NH<sub>2</sub> na concentração de 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> é muito similar ao do fármaco comercial. Desta forma, por se tratar de um peptídeo relativamente pequeno, é de fácil obtenção por síntese química com custo consideravelmente menor associado, além de ser mais estável termicamente o que viabiliza a incorporação em sistemas de liberação por moldagem a quente. Esses fatores associados ao peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> demonstram que é um candidato promissor para o desenvolvimento de novos fármacos antiangiogênicos.

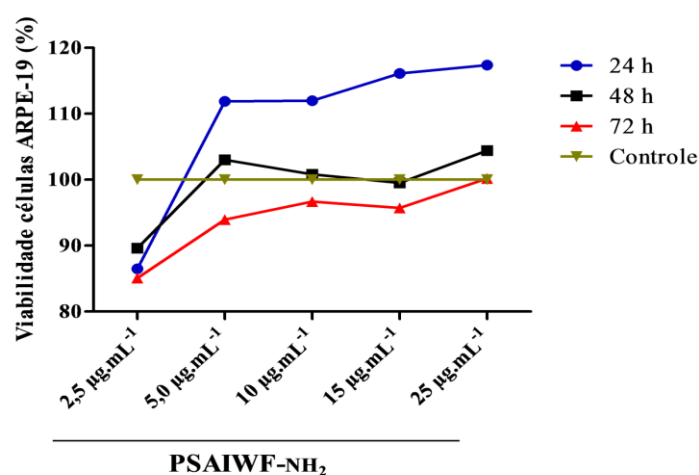
Um aspecto interessante é a ausência do resíduo de cisteína na sequência peptídica, visto que peptídeos contendo cisteína são propensos à dimerização, o que pode se configurar um problema no desenvolvimento de formulações farmacêuticas (VERLY et al., 2017). Considerando a estabilidade biofarmacêutica, os peptídeos e proteínas contendo cisteína ou metionina podem potencialmente sofrer reação de oxidação sob várias condições, a partir da produção, formulação e estocagem. O controle rigoroso das condições de temperatura, concentração salina, presença de catalisador, pH e tensão de oxigênio é importante para evitar a oxidação dessas moléculas, o que poderia resultar em dimerização, consequentemente, alterando as propriedades estruturais e atividades farmacológicas (MANNING; PATEL;

BORCHARDT, 1989; ZAPADKA et al., 2017). Assim, peptídeos que possuem o resíduo de serina ao invés do resíduo de cisteína geralmente apresentam melhor estabilidade biofarmacêutica.

#### **4.4 Toxicidade *in vitro***

A toxicidade do peptídeo foi avaliada usando células ARPE-19, que desempenham papel importante na manutenção da barreira hematorretiniana, transporte de íons, nutrientes, fluidos e metabólitos, liberação de fatores de crescimento e também contribuem para o metabolismo das células fotorreceptoras (BOULTON; DAYHAW-BARKER, 2001). Assim, o ensaio foi baseado na conversão metabólica do MTT a formazan pelas células ARPE-19, de modo que a absorbância em 540 nm é relativa à viabilidade celular. O grupo controle (DMEM/F-12) foi fixado em 100% de viabilidade celular.

O perfil de viabilidade celular das células do epitélio pigmentar da retina frente ao PSAIWF-NH<sub>2</sub> na faixa de 2,5 a 25,0 µg.mL<sup>-1</sup>, no período de 24 a 72 horas está mostrado na Figura 37. Os percentuais de viabilidade se mantiveram acima de 85% em todas as concentrações, nas condições testadas. Em particular, as células frente ao peptídeo na concentração de 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> demonstraram viabilidade maior que 100% durante as primeiras 48 horas, com diminuição para 93% em 72 horas, ou seja, não foi observada citotoxicidade significativa na concentração ótima de atividade antiangiogênica do peptídeo.



|                         | 24 h        | 48 h       | 72 h        |
|-------------------------|-------------|------------|-------------|
| 2,5 µg.mL <sup>-1</sup> | *86,495880  | 89,621060  | *85,081210  |
| 5,0 µg.mL <sup>-1</sup> | 111,899700  | 103,032200 | 93,960530   |
| 10 µg.mL <sup>-1</sup>  | 111,988500  | 100,815300 | 96,685930   |
| 15 µg.mL <sup>-1</sup>  | *116,114000 | 99,520600  | 95,732040   |
| 25 µg.mL <sup>-1</sup>  | *117,370900 | 104,400100 | *100,196200 |
| Controle                | 100,000000  | 100,000000 | *100,000000 |

\*Grupos são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ )

**Figura 37** - Viabilidade de células ARPE-19 após incubação por 24, 48 e 72 horas com o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> nas concentrações de 2,5, 5,0, 10, 15 e 25 µg.mL<sup>-1</sup>.

Assim, não se constatou efeito citotóxico do PSAIWF-NH<sub>2</sub> nas células do epitélio pigmentar da retina nas condições empregadas. O que se observou foi a manutenção da viabilidade celular a níveis acima do controle de vida, o que pode ser devido à possível atividade estimulante do crescimento das células ARPE-19. Desta forma, o peptídeo, além de mostrar efeito antiangiogênico, não demonstrou potencial tóxico ao epitélio retinal, viabilizando potencialmente o uso para tratamento de doenças oculares.

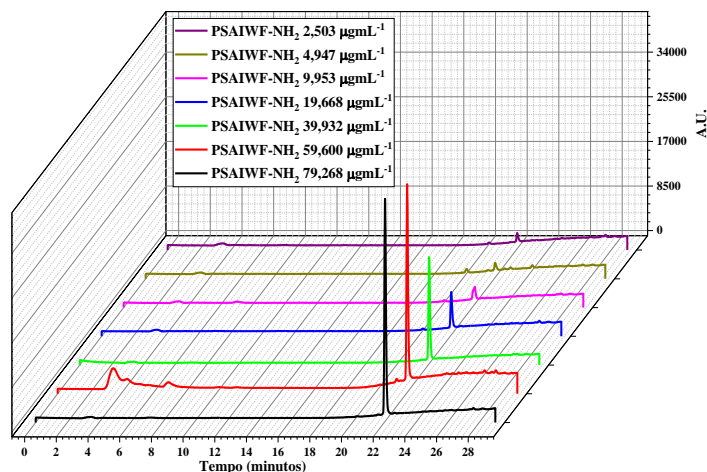
#### 4.5 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-UV para quantificação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>

##### 4.5.1 Proposição do modelo linear pelo método dos mínimos quadrados ordinários

A fim de se quantificar o peptídeo, o método cromatográfico por CLAE-UV descrito na seção 3.5.2 foi aplicado nas análises das soluções do peptídeo puro na faixa de 2,49 a 78,96 µg.mL<sup>-1</sup>, compreendendo 7 níveis de concentração. Na Figura 38 estão esquematizados, em



sequência, os cromatogramas sobrepostos da unicata de cada concentração, evidenciando que o peptídeo é detectado em 22,05 minutos a 280 nm, com aumento da intensidade da resposta à medida que a concentração aumenta.

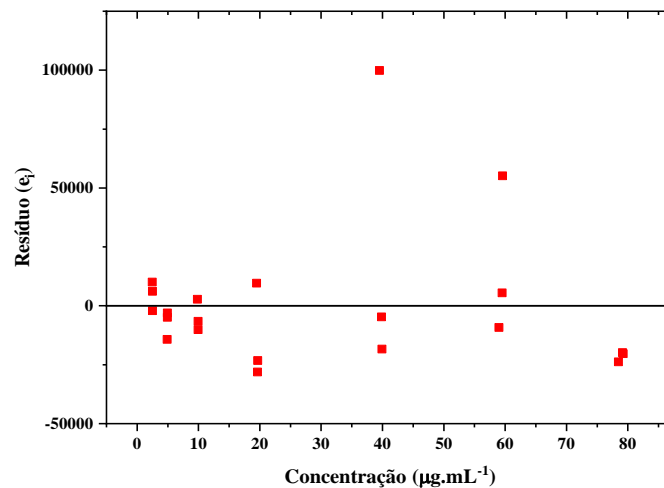


**Figura 38** - Cromatogramas sobrepostos referentes às soluções do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> nas concentrações de 2,503, 4,947, 9,953, 19,668, 39,932, 59,600 e 79,268 µg.mL<sup>-1</sup>.

A partir das plotagens dos gráficos foram obtidas as áreas sob a curva que foram plotadas pelas respectivas concentrações, resultando na curva analítica que está mostrada no Apêndice A. Os valores relativamente baixos dos coeficientes de determinação - 0,9384 ( $R^2$ ) e correlação - 0,9687 ( $r$ ) demonstram baixo percentual de explicação da variação das respostas e insatisfatório ajuste dos dados à curva. Sendo assim, a aplicação do teste de detecção de *outliers* a esse conjunto de dados se fez necessária para que se obtivesse uma nova curva analítica com parâmetros  $R^2$  e  $r$  mais satisfatórios, o que, juntamente com os testes estatísticos de significância da regressão e desvio da linearidade, corroborariam a premissa de melhor ajuste dos dados ao modelo linear (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 2001; DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

Por meio das equações matriciais descritas na seção 3.5.3.2, foram obtidos os valores de  $y$  previstos ( $\hat{y}$ ) e dos resíduos ( $e_i$ ), com esses dados foi plotado o gráfico “concentração *versus* resíduo” que mostra distribuição aleatória dos resíduos, indicando que os resíduos são homoscedásticos (Figura 39).





**Figura 39** - Gráfico concentração versus resíduo.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para determinação da significância estatística do modelo linear por meio dos testes  $F$ . O teste  $F$  de significância da regressão indicou que a regressão linear é estatisticamente significativa, visto que o valor de  $F$  calculado que é a razão das médias quadráticas da regressão ( $MQ_R$ ) e dos resíduos ( $MQ_r$ ) é de 289,23 e é maior que o valor de  $F$  crítico de 4,38, rejeitando-se assim a hipótese nula de que a regressão não é estatisticamente significativa a 95% de confiança. O modelo não apresentou falta de ajuste, uma vez que o valor de  $F$  calculado que é a razão das médias quadráticas da falta de ajuste ( $MQ_{faj}$ ) e do erro puro ( $MQ_{ep}$ ) é de 1,23 e é menor que o valor de  $F$  crítico de 2,96, indicando aceitação da hipótese nula de que o modelo proposto não tem falta de ajuste a 95% de confiança. Na Tabela 10 estão descritos os parâmetros calculados na ANOVA (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001b; MILLER; MILLER, 2010).

**Tabela 10** - Parâmetros da ANOVA do modelo de regressão linear inicial -  $SQ_R$ ,  $SQ_r$ ,  $SQ_{faj}$ ,  $SQ_{ep}$ ,  $SQ_T$ ,  $GL_R$ ,  $GL_r$ ,  $GL_{faj}$ ,  $GL_{ep}$ ,  $GL_T$ ,  $MQ_R$ ,  $MQ_r$ ,  $MQ_{faj}$ ,  $MQ_{ep}$ ,  $MQ_T$ ,  $R_2$  e valores de  $F$  calculado e crítico.

| Fonte de Variação                      | Soma quadrática       | Graus de liberdade                                           | Média Quadrática      |
|----------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Regressão                              | $2,56 \times 10^{11}$ | 1                                                            | $2,56 \times 10^{11}$ |
| Resíduos                               | $1,68 \times 10^{10}$ | 19                                                           | $8,85 \times 10^8$    |
| Falta de Ajuste                        | $5,09 \times 10^9$    | 5                                                            | $1,02 \times 10^9$    |
| Erro Puro                              | $1,16 \times 10^{10}$ | 14                                                           | $8,30 \times 10^8$    |
| Total                                  | $2,73 \times 10^{11}$ | 20                                                           | $1,36 \times 10^{10}$ |
| % variância explicada ( $R^2$ )        | 0,9384                | -                                                            | -                     |
| Teste $F$ - Significância da Regressão |                       | $F$ calculado<br>$2,89 \times 10^2$<br>$F$ crítico *<br>4,38 |                       |
| Teste $F$ - Falta de ajuste            |                       | $F$ calculado<br>1,23<br>$F$ crítico *<br>2,96               |                       |

\*  $\alpha = 0,05$

#### 4.5.2 Detecção de outliers - teste dos resíduos padronizados de Jackknife

Os resíduos de Jackknife -  $J_{ei}$  que permitem estimar a variância dos resíduos foram determinados para os pontos da curva analítica inicial. Foram considerados como *outliers* aqueles pontos que apresentaram valores de  $|J_{ei}|$  maiores que o valor de  $t$  crítico com  $n-p-1$  graus de liberdade a 95% de confiança. Os pontos referentes às concentrações de 19,63, 39,53 e 59,60 e  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentaram valores de  $J_{ei}$  maiores do que o valor de  $t$  crítico de 2,10 e foram considerados *outliers*. Na Tabela 11 está a relação dos valores de  $J_{ei}$  e os respectivos pontos da curva analítica inicial.

**Tabela 11** - Resíduos padronizados de Jackknife dos respectivos pontos da curva analítica inicial.

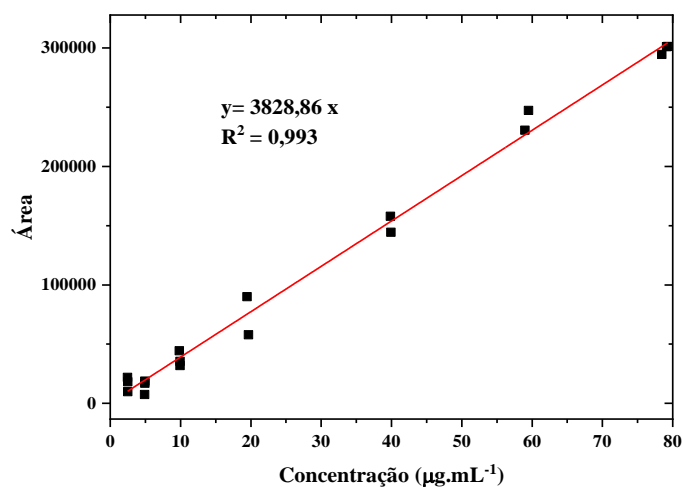
| Resíduo padronizado de Jackknife ( $J_{ei}$ ) | Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | Área    |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------|---------|
| 0,211                                         | 2,50                                   | 18111   |
| 0,35                                          | 2,48                                   | 21904   |
| -0,074                                        | 2,50                                   | 9840    |
| -0,17                                         | 4,95                                   | 16957   |
| -0,50                                         | 4,90                                   | 7394    |
| -0,11                                         | 4,94                                   | 18760   |
| -0,35                                         | 9,95                                   | 31867   |
| 0,095                                         | 9,85                                   | 44416   |
| -0,22                                         | 9,94                                   | 35354   |
| -0,80                                         | 19,67                                  | 57910   |
| 0,32                                          | 19,47                                  | 90010   |
| -2,29*                                        | 19,63*                                 | 52944*  |
| -0,63                                         | 39,93                                  | 144463  |
| 5,48*                                         | 39,53*                                 | 261067* |
| -0,16                                         | 39,86                                  | 157924  |
| 2,13*                                         | 59,60*                                 | 297314* |
| -0,32                                         | 59,00                                  | 230562  |
| 2,07                                          | 59,50                                  | 247233  |
| -0,75                                         | 79,27                                  | 301154  |
| -0,88                                         | 78,47                                  | 294435  |
| -0,74                                         | 79,13                                  | 301048  |

$t = 2,10$  ( $\alpha = 0,05$ )

\* = Pontos *outliers*

#### 4.5.3 Curva analítica sem outliers - ANOVA e testes residuais

Após a detecção dos pontos *outliers* pelo teste dos resíduos padronizados de Jackknife, foram eliminados os pontos referentes às concentrações de 19,63, 39,53 e 59,60 e  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e uma nova curva analítica foi plotada a partir desse novo conjunto de dados. A curva analítica sem os pontos *outliers* está mostrada na Figura 40. Os intervalos de confiança dos coeficientes angular ( $b_1$ ) e linear ( $b_0$ ) correspondem a  $3828,86 \pm 170,84$  e  $786,85 \pm 6981,71$ , respectivamente. O coeficiente linear não foi estatisticamente significativo a 95% de confiança e foi retirado do modelo. A função que descreve a reta é  $y = 3828,86x$ , em que  $y$  corresponde à área sob a curva e  $x$  à concentração em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os coeficientes de determinação e correlação corresponderam a 0,993 e 0,997, respectivamente, atendendo aos critérios de linearidade estabelecidos na RDC nº 66/2017 (BRASIL 2017), visto que ambos estão acima de 0,990, o que indica bom ajuste dos dados na faixa de 2,49 a 78,96  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ao modelo linear (Figura 40).



**Figura 40** - Curva analítica sem os pontos outliers, em 7 níveis de concentração do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> na faixa de 2,49 a 78,96 µg.mL<sup>-1</sup>.

Com o intuito de se determinar a significância estatística da regressão linear sem os pontos *outliers* procedeu-se com a ANOVA empregando-se o teste *F*. Sendo assim, a regressão linear foi estatisticamente significativa a 95% de confiança conforme a análise de variância que consta na Tabela 12, em que *F* calculado para significância da regressão foi igual a  $2,26 \times 10^3$  e o valor de *F* crítico igual a 4,49. O modelo não demonstrou falta de ajuste a 95% de confiança visto que o valor de *F* calculado foi igual a 1,04 e o valor de *F* crítico igual a 3,21. Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir da razão sinal-ruído das replicatas do menor nível de concentração (2,49 µg.mL<sup>-1</sup>) conforme as equações descritas na seção 3.5.3.2, e corresponderam a 0,27 e 0,89 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

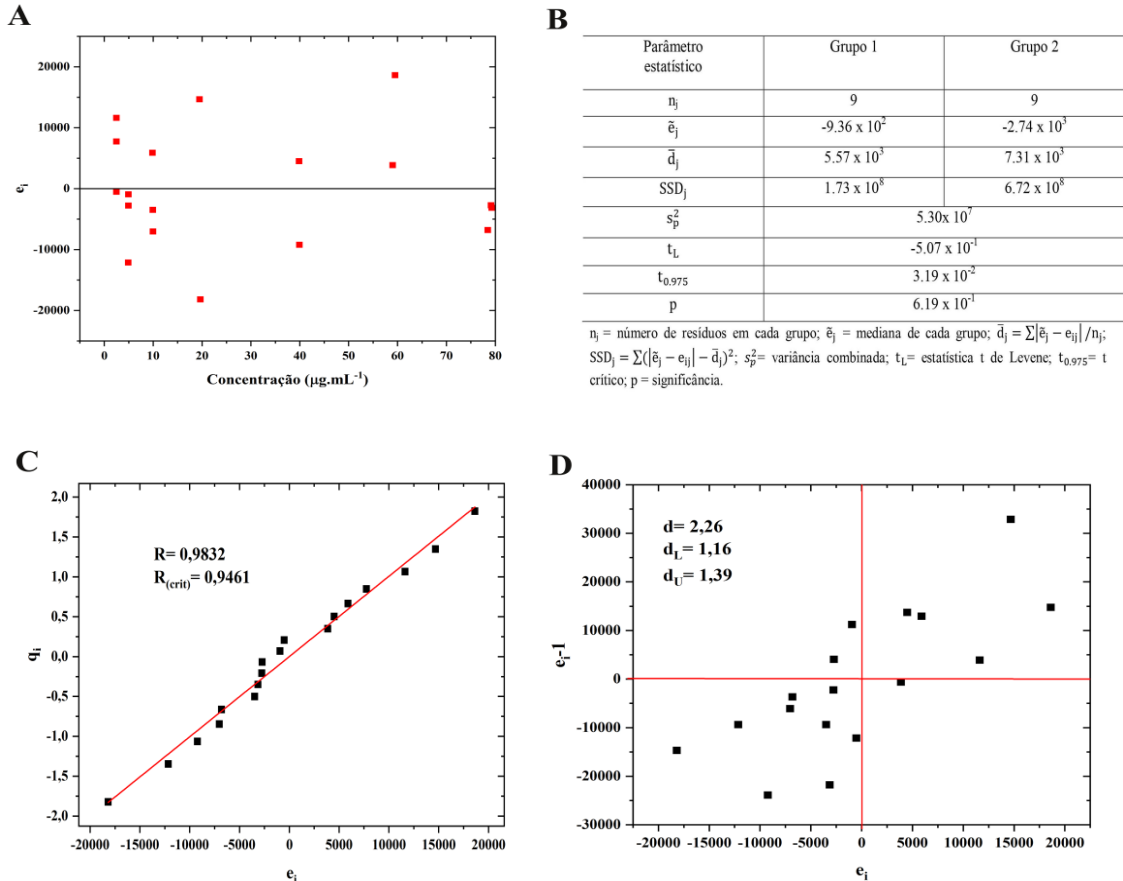
**Tabela 12** - Parâmetros da ANOVA do modelo de regressão linear inicial -  $SQ_R$ ,  $SQ_r$ ,  $SQ_{faj}$ ,  $SQ_{ep}$ ,  $SQ_T$ ,  $GL_R$ ,  $GL_r$ ,  $GL_{faj}$ ,  $GL_{ep}$ ,  $GL_T$ ,  $MQ_R$ ,  $MQ_r$ ,  $MQ_{faj}$ ,  $MQ_{ep}$ ,  $MQ_T$ ,  $R_2$  e valores de  $F$  calculado e crítico.

| Fonte de Variação                      | Soma quadrática                                              | Graus de liberdade | Média Quadrática      |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Regressão                              | $2,15 \times 10^{11}$                                        | 1                  | $2,20 \times 10^{11}$ |
| Resíduos                               | $1,52 \times 10^{10}$                                        | 16                 | $9,50 \times 10^7$    |
| Falta de Ajuste                        | $6,09 \times 10^9$                                           | 5                  | $1,20 \times 10^8$    |
| Erro Puro                              | $1,28 \times 10^{10}$                                        | 11                 | $1,20 \times 10^8$    |
| Total                                  | $2,17 \times 10^{11}$                                        | 17                 | $1,30 \times 10^{10}$ |
| % variância explicada ( $R^2$ )        | 0,9929                                                       | -                  | -                     |
| Teste $F$ - Significância da Regressão | $F$ calculado<br>$2,26 \times 10^3$<br>$F$ crítico *<br>4,49 |                    |                       |
| Teste $F$ - Falta de ajuste            | $F$ calculado<br>1,04<br>$F$ crítico *<br>3,21               |                    |                       |

\*  $\alpha = 0,05$

A avaliação qualitativa da homoscedasticidade residual através da análise visual do gráfico que relaciona os resíduos ( $e_i$ ) com as respectivas concentrações demonstra uma distribuição aleatória dos resíduos, indicando um padrão homoscedástico (Figura 41 A). A análise visual foi atestada pelo teste de Brown-Forsythe em que a estatística de Levene  $t_L$  obtida foi de  $-5,07 \times 10^{-1}$ , valor menor que o valor de  $t$  crítico, que foi de  $3,19 \times 10^{-2}$  ( $p$ -valor igual a  $6,19 \times 10^{-1}$ ), o que demonstra aceitação da premissa da hipótese nula de que a variância residual é constante a 97,5% de confiança (Figura 41 B). Os resíduos seguem a distribuição normal, o coeficiente de correlação do teste de Ryan-Joiner foi de 0,9832, com valor crítico de 0,9461, indicando que não há desvio significativo da normalidade a 95% de confiança (Figura 41 C). Não foi observada autocorrelação entre os resíduos, a plotagem

mostra um padrão randômico de distribuição (Figura 41 D) e a estatística  $d$  do teste de Durbin-Watson foi de 2,26 que é maior que o limite superior de 1,39, indicando aceitação da premissa da hipótese nula de que os resíduos são independentes (BROWN; FORSYTHE, 1974; DURBIN; WATSON, 1951; RYAN; JOINER, 1976b).



**Figura 41** - (A) Gráfico da distribuição dos resíduos em função das concentrações - indicação qualitativa da homoscedasticidade residual. (B) Tabela com os parâmetros estatísticos do teste de Brown-Forsythe, a estatística  $t_L$  é o principal parâmetro que determina a homoscedasticidade residual, devendo ser menor que o valor de  $t$  crítico a 97,5% de confiança. (C) Gráfico da distribuição dos resíduos ordenados em função dos valores normais esperados, o coeficiente de correlação de Ryan-Joiner ( $R$ ) deve ser maior que o valor de  $R_{crítico}$  a 95% de confiança para indicar normalidade dos resíduos. (D) Gráfico de Durbin-Watson da autocorrelação residual. A distribuição aleatória é indicativo qualitativo de que os resíduos são independentes. A estatística  $d$  define a 95% de confiança se os resíduos estão autocorrelacionados.

#### 4.6 Liberação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> a partir de implantes de PLGA

O PLGA é um copolímero muito promissor para formular sistemas de liberação de fármacos por se tratar de um poliéster alifático que é biodegradável e biocompatível. O polímero pode sofrer degradação no corpo humano por hidrólise não enzimática ou

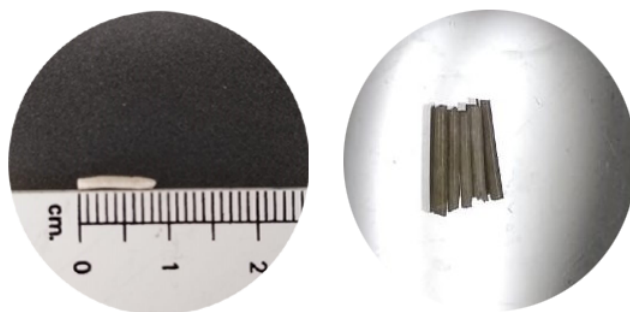
enzimática para produzir os monômeros ácido lático e ácido glicólico que são metabolizados a CO<sub>2</sub> e água. Os implantes de PLGA são avaliados para a administração intraocular de moléculas bioativas por possibilitarem a liberação prolongada e controlada no segmento posterior do olho, a exemplo de um sistema implantário de liberação à base de PLGA se tem o Ozurdex<sup>®</sup> que libera de forma prolongada a dexametasona na porção posterior do olho e é usado no tratamento de edema macular e uveíte (ANDERSON; SHIVE, 2012; FIALHO et al., 2003; SURESH et al., 2014).

A moldagem a quente é um método eficiente e relativamente simples que pode ser aplicável para a obtenção de implantes de PLGA contendo moléculas termoestáveis. Isso é possível devido à termoplasticidade do copolímero que possui temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) em torno de 50 °C, ou seja, abaixo dessa temperatura o polímero está na forma cristalina rígida e pouco maleável e acima desta temperatura pode ser manipulado com mais maleabilidade, o que possibilita a moldagem (AGARWAL; RUPENTHAL, 2013; PRIVALKO; LIPATOV, 1974; QIAN et al., 2019; WISCHKE; SCHWENDEMAN, 2008). Assim, com o objetivo de se formular um sistema de liberação controlada e prolongada com o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>, o PLGA demonstra propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade e termoplasticidade que são atrativas para esse fim.

A aplicação da moldagem à quente resultou na obtenção de cinco implantes de PLGA contendo o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> na proporção de 75,47:24,53 (PLGA:peptídeo) e com cerca de 7 mm de comprimento cada. As massas obtidas de cada implante corresponderam a 14,76 mg - Implante 1; 13,27 mg - Implante 2; 11,95 mg - Implante 3; 13,89 mg - Implante 4 e 15,33 mg - Implante 5. Tendo em vista a distribuição proporcional, as massas de peptídeo em cada implante corresponderam a 3,62 mg - Implante 1; 3,25 mg - Implante 2; 2,93 mg - Implante 3; 3,41 mg - Implante 4 e 3,76 mg - Implante 5. A Tabela 13 resume a relação da massa total e massa relativa de peptídeo em cada implante. A Figura 42 apresenta os implantes obtidos.

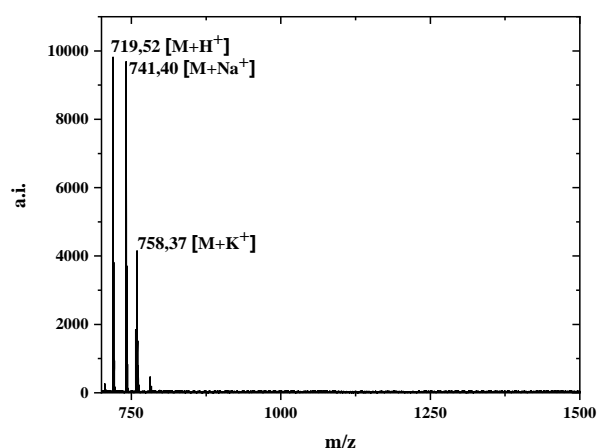
**Tabela 13** - Relação da massa total e de peptídeo (mg) dos implantes.

| Implante | Massa total (mg) | Massa de peptídeo (mg) |
|----------|------------------|------------------------|
| 1        | 14,76            | 3,62                   |
| 2        | 13,27            | 3,25                   |
| 3        | 11,95            | 2,93                   |
| 4        | 13,89            | 3,41                   |
| 5        | 15,33            | 3,76                   |



**Figura 42** - Implantes obtidos de PLGA contendo o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>.

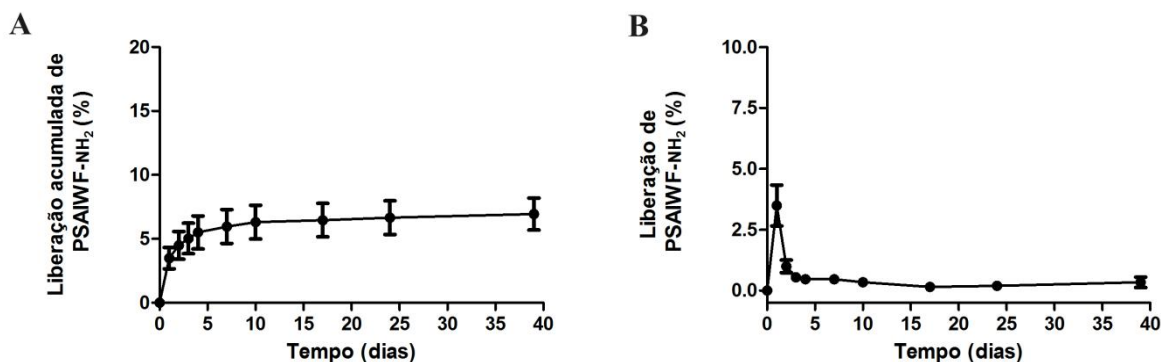
Como os implantes foram obtidos por moldagem a quente da mistura liofilizada de PLGA e peptídeo em chapa de Teflon<sup>®</sup> à temperatura de aproximadamente 100 °C, a fim de se avaliar a estabilidade do peptídeo frente ao aquecimento, este foi aquecido em aproximadamente 100 °C e logo em seguida foi submetido à análise por espectrometria de massas *MALDI-ToF*. O espectro de massas obtido após o aquecimento está mostrado na Figura 43 e evidencia os sinais de razão massa/carga referentes ao peptídeo protonado (719,52) e aos adutos de sódio e potássio (741,40 e 758,37, respectivamente), indicando que o peptídeo se mostra estável sob aquecimento.



**Figura 43** - Espectro de massas do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> após aquecimento a cerca de 100 °C.

Os perfis de liberação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> a partir dos cinco implantes de PLGA em tampão fosfato 20 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,4 estão expressos percentualmente em relação às massas contidas nos implantes na Figura 44. A,B.





**Figura 44** - Perfis de liberação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> a partir de implantes de PLGA. (A) Perfil percentual de liberação acumulada do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> a partir de implantes de PLGA por 39 dias e (B) Perfil percentual de liberação do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> a partir de implantes de PLGA por 39 dias.

Os perfis de liberação do peptídeo demonstram um relativo *burst* inicial de liberação nos primeiros três dias, com percentual acumulado de 5,03%. Esse comportamento é bem observado em sistemas de liberação formulados com copolímeros de PLGA e se deve à rápida desorção do peptídeo da superfície do implante para o meio tamponado. Em contrapartida, ocorre um decaimento na liberação a partir do terceiro dia para níveis em torno de 0,4%, que se mantém com discretos incrementos ao longo dos 36 dias (LEE et al., 2010; SUNDSTROM; SIM; ANTONETTI, 2014b).

O processo de liberação do peptídeo é bifásico, caracterizado pela liberação de alta concentração relativa do peptídeo em pouco tempo, seguido pela liberação prolongada de baixas concentrações durante 9 semanas. Tendo em vista que a velocidade de difusão da substância bioativa através dos poros formados pela desintegração polimérica depende da sua polaridade e solubilidade no meio, a liberação mais lenta se deve, portanto, à alta hidrofobicidade do peptídeo, o que implica em maior interação com a matriz polimérica, retardando a difusão para o meio (BOIMVASER et al., 2016).

As concentrações do peptídeo se mantiveram na faixa de 58,33 a 6,07  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  durante os 39 dias, compatíveis com as concentrações testadas nos ensaios *CAM* e que demonstraram potencial de inibição angiogênica. Assim, os sistemas matriciais de PLGA e PSAIWF-NH<sub>2</sub> se mostram promissores na liberação controlada e sustentada do peptídeo em concentrações com potencial terapêutico para tratar doenças oculares decorrentes de mecanismos angiogênicos.

Neste trabalho, portanto, se evidencia o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub>, um análogo carboxiamidado do peptídeo PSAIWF-OH descrito por Michaloski e colaboradores, que foi obtido compativamente em maior rendimento via síntese em fase sólida por CORDEIRO, 2018. A maior eficiência sintética na obtenção do análogo amidado está associada à maior

estabilidade da ligação amídica formada entre o resíduo de fenilalanina e a resina *Rink Amide*, frente às condições ortogonais de síntese, ou seja, clivagem básica do grupo protetor Fmoc durante a formação da cadeia peptídica e ao final, clivagem ácida para liberação do peptídeo. Em suma, os análogos carboxiamidados e em especial o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> são obtidos por abordagem sintética relativamente mais eficiente, simples e barata, principalmente quando comparado com as abordagens de obtenção de macromoléculas biológicas como proteínas recombinantes.

O perfil potencial de inibição angiogênica do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> foi evidenciado por CORDEIRO, 2018 e neste trabalho, destacando-se o maior percentual de redução dos vasos sanguíneos (37,9%) quando comparado com os demais peptídeos avaliados em modelo *CAM*. Em complementação, foi observado que na concentração de 5,0 µg.mL<sup>-1</sup> o peptídeo mostrou a maior redução percentual de área vascular (31,7%). Em todos os ensaios *CAM*, os perfis foram comparáveis com aqueles do bevacizumabe a 250,0 µg.mL<sup>-1</sup>. Esses resultados indicam forte potencial de inibição da angiogênese no modelo *CAM* por uma molécula significativamente menor do que o anticorpo monoclonal.

Com a demonstração do potencial antiangiogênico do peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> através dos ensaios *CAM*, foram delineados os perfis de liberação do peptídeo a partir de implantes de PLGA que demonstraram um pico de liberação nos primeiros dois dias com um decaimento sustentado até 39 dias. As concentrações liberadas foram compatíveis com as concentrações do peptídeo testadas nos ensaios *CAM* e que mostraram inibição da vasculogênese. Além disso, quando testado em células do epitélio pigmentar da retina (ARPE-19), o peptídeo não demonstrou potencial citotóxico na faixa de concentração testada. Em conclusão, o PSAIWF-NH<sub>2</sub> se mostra de fácil obtenção sintética, estável quimicamente, inibidor da angiogênese em modelo *CAM*, de baixa toxicidade em células ARPE-19 e é liberado a partir de implantes de PLGA em concentrações capazes de reduzir a neovascularização. Esses resultados se mostram promissores para o desenvolvimento de novos fármacos antiangiogênicos menores e sistemas que os possam liberar de forma controlada e prolongada.

## 5. CONCLUSÃO

A prospecção de novas moléculas antiangiogênicas e o desenvolvimento de sistemas que propiciem a liberação controlada e prolongada no segmento posterior do olho são necessários, tendo em vista os desafios associados às barreiras anatômicas e fisiológicas ao alcance e manutenção de doses terapêuticas nos sítios alvos do olho. Neste contexto, o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> evidenciado neste trabalho demonstra interessante perfil de inibição angiogênica em modelo *CAM*, principalmente na concentração de 5,0 µg.mL<sup>-1</sup>.

Por se tratar de um peptídeo carboxiamidado, é mais estável e pode ser obtido por vias metodológicas eficientes de síntese em fase sólida que resultam em rendimento satisfatório. Este trabalho também demonstrou a viabilidade de implantes formulados com o peptídeo PSAIWF-NH<sub>2</sub> e o copolímero de PLGA em liberar de forma prolongada o peptídeo por um período de 39 dias com manutenção da liberação em concentrações associadas à atividade antiangiogênica. Portanto, os resultados apresentados neste trabalho corroboram o potencial do PSAIWF-NH<sub>2</sub> e dos sistemas matriciais de liberação com PLGA no desenvolvimento de novos fármacos antiangiogênicos e dispositivos de liberação controlada e prolongada que podem vir a ser usados no tratamento de doenças oculares.

## REFERÊNCIAS

- A.BELSLEY, D.; KUH, E.; E. WELSCH, R. **Regression Diagnostics: Identifying Influential Data and Sources of Collinearity**. [s.l.] Wiley, 2004.
- ADAMS, R. H.; ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 6, p. 464–478, 2007.
- AGARWAL, P.; RUPENTHAL, I. D. Injectable implants for the sustained release of protein and peptide drugs. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 7–8, p. 337–349, 2013.
- AGUILAR, M. HPLC of Peptides and Proteins Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 251, 2004.
- AMBLARD, M. et al. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, 2006a.
- AMBLARD, M. et al. Methods and Protocols of Modern Solid Phase Peptide Synthesis. v. 33, 2006b.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. AMC Technical Briefs 3 - Is my calibration linear? **Royal Society of Chemistry**, n. 24, p. 2–4, 2001.
- ANDERSON, J. M.; SHIVE, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 72–82, 2012.
- ATTAR, M. et al. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of a Sustained-Release Dexamethasone Intravitreal Implant. **Investigative ophthalmology & visual science**, p. 80–86, 2011.
- B, FIELDS, G. **Solid-Phase Peptide Synthesis**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 1997.
- BAGLEY, D. M.; WATERS, D.; KONG, B. M. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the draize rabbit eye irritation test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 12, p. 1155–1160, 1994.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001a.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. [s.l: s.n.].
- BOIMVASER, S. et al. In vitro bulk/surface erosion pattern of PLGA implant in physiological conditions: a study based on auxiliary microsphere systems. **Polymer Bulletin**, v. 73, n. 1, p. 209–227, 2016.
- BOULTON, M.; DAYHAW-BARKER, P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. **Eye**, v. 15, p. 384–389, 2001.

- BOYLE, J. et al. Experiences of patients undergoing anti-VEGF treatment for neovascular age-related macular degeneration: A systematic review. **Psychology, Health & Medicine**, v. 20, n. 3, p. 296–310, 2014.
- BRASIL. **Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências.** Brasília, DF. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, 2017.
- BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, n. 346, p. 364–367, 1974.
- CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 298–307, 2011.
- CASTRO-NAVARRO, V. et al. Intravitreal dexamethasone implant Ozurdex ® in naïve and refractory patients with different subtypes of diabetic macular edema. **BMC Ophthalmology**, v. 9, p. 1–8, 2019.
- CHAN, WENG, C.; WHITE, PETER, D. **Fmoc solid phase peptide synthesis - A practical approach.** New York: Oxford University Press, 2000.
- CHEN, L. et al. Utilisation of Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model Platform for Imaging-Navigated Biomedical Research. **Cells**, v. 10, n. 2, 2021.
- CHEUNG, N.; MITCHELL, P.; WONG, T. Y. Diabetic retinopathy. **The Lancet**, v. 376, n. 9735, p. 124–136, 2010.
- CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry.** 2. ed. New York: Oxford University Press, 2012.
- COIN, I.; BEYERMANN, M.; BIENERT, M. Solid-phase peptide synthesis: From standard procedures to the synthesis of difficult sequences. **Nature Protocols**, v. 2, n. 12, p. 3247–3256, 2007.
- CORDEIRO, L. P. B. **Sínteses em fase sólida e avaliação das atividades antiangiogênicas dos peptídeos PCAIWF-OH, PCAIWF-NH<sub>2</sub>, PSAIWF-OH e PSAIWF-NH<sub>2</sub>.** Monografia de conclusão de curso – Curso de Farmácia. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.
- DA SILVA, R. et al. Implants as drug delivery devices for the treatment of eye diseases. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 585–595, 2010.
- DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guideline for calibration in analytical chemistry— Part 1. Fundamentals and single component calibration. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993–1014, 1998.
- DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least

squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, 2005.

DEDANIA, V. S.; BAKRI, S. J. Diabetic Retinopathy Update Novel Pharmacotherapies in Diabetic Retinopathy. **Middle East African Journal of Ophthalmology**, v. 22, n. 2, 2015.

DUNN, K. C. et al. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. **Experimental Eye Research**, v. 62, n. 2, p. 155–170, 1996.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression. II. **Biometrika**, v. 38, n. 1–2, p. 159–178, 1951.

ELIAZ, R. E.; KOST, J. Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. **Journal of Biomedical Materials Research**, n. July, 1999.

FERRARA, N. et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 391–400, 2004.

FIALHO, S. L. et al. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, n. 6, p. 891–896, 2003.

FIALHO, S. L. et al. Safety and pharmacokinetics of an intravitreal biodegradable implant of dexamethasone acetate in rabbit eyes. **Current Eye Research**, v. 31, n. 6, p. 525–534, 2006.

FIALHO, S. L.; BEHAR-COHEN, F.; SILVA-CUNHA, A. Dexamethasone-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) intravitreal implants: A pilot study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 637–646, 2008.

GARDNER, T. W. Diabetic Retinopathy. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 1227–1239, 2012.

GOODMAN, M.; NAIDER, F.; RUPP, R. Conformations of alanine oligopeptides in solution. **Bioorganic Chemistry**, v. 328, p. 310–328, 1971.

GOPFERICK, A. Polymer Bulk Erosion. **Macromolecules**, v. 9297, n. 96, p. 2598–2604, 1997.

GUIMARÃES, C. F. R. C. **Síntese de peptídeos: cinética de dimerização via formação de ligação de dissulfeto, obtenção e estudos biofísicos de glicotriazol-peptídeos**. Tese (Doutorado) - Curso de Química. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

GUSMÃO, K. A. G. **Sequenciamento, síntese, atividade biológica e estudos estruturais por RMN de peptídeos isolados da secreção cutânea do anuro *Leptodactylus labyrinthicus***. Tese (Relatório do Exame de Qualificação) - Curso de Química. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**.

3. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2007.

**IDF DIABETES ATLAS**, 2019. Disponível em: <<https://www.idf.org/>>

INNOVAGEN. **PepCalc.com - Peptide property calculator**. Disponível em: <<https://pepcalc.com/>>. Acesso em: 20 set. 2019.

JENSEN, K. J.; SHELTON, P. T.; PEDERSEN, S. L. **Peptide Synthesis and Applications**. 2. ed. New York: Human Press Totowa, New Jersey, 2013.

JI, Y. et al. Drug Release Kinetics and Mechanism from PLGA Formulations. **AIChE Journal**, v. 62, n. 11, p. 4055–4065, 2016.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

KOROBELNIK, J. et al. Intravitreal Aflibercept for Diabetic Macular Edema. **Ophthalmology**, n. September, p. 1–8, 2014.

KUE, C. S. et al. Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. **Experimental Animals**, v. 64, n. October 2014, p. 129–138, 2015.

LEE, S. S. et al. Biodegradable implants for sustained drug release in the eye. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 10, p. 2043–2053, 2010.

LI, F. Controlled Release of Bevacizumab Through Nanospheres for Extended Treatment of Age-Related Macular Degeneration. **The Open Ophthalmology Journal**, v. 6, n. 1, p. 54–58, 2012.

LUNA, O. F. et al. Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 12, 2016.

MALHOTRA, A. et al. Ocular Anatomy and Cross-Sectional Imaging of the Eye. **YSULT**, v. 32, n. 1, p. 2–13, 2011.

MANNING, M. C.; PATEL, K.; BORCHARDT, R. T. **Stability of Protein Pharmaceuticals** **Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, 1989.

MARCHETTO, R.; ETCHEGARAY JR, A.; R. NAKAIE, C. Kinetics of Synthesis and Swelling Studies of Highly Substituted Benzhydrylamine-Resins: Implications for Peptide Synthesis and Perspectives for Use as Anion Exchanger Resin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 3, p. 8, 1992.

MARQUARDT, M.; EIFLER-LIMA, V. L. A síntese orgânica em fase sólida e seus suportes poliméricos mais empregados. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 846–855, 2001.

MATTICE, W. L. The Effect of Temperature and Salt Concentration on the Circular

Dichroism Exhibited by Unionized Derivatives of L-Alanine in Aqueous Solution. **Biopolymers**, v. 13, p. 169–183, 1974.

MEIER, P. C.; ZÜND, R. E. Statistical methods in analytical chemistry. **Statistical Methods in Analytical Chemistry**, p. 1–424, 2005.

MERRIFIELD, R. B. Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin. **Biochemistry**, v. 3, n. 9, p. 1385–1390, 1964.

MICHALOSKI, J. S. et al. Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. **SCIENCE ADVANCES**, v. 1, 2016.

MILLER, N. J.; MILLER, C. J. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. sixth ed. [s.l.] Pearson, 2010.

MOHAMED, Q.; GILLIES, M. C.; WONG, T. Y. CLINICIAN ' S CORNER Management of Diabetic Retinopathy. **Jama**, v. 298, n. 8, 2009.

MOREIRA, I. S.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Vascular Endothelial Growth Factor ( VEGF ) Inhibition - A Critical Review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, p. 223–245, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 6. ed. New York: Macmillan Higher Education, 2013.

OSAADON, P. et al. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. **Eye**, v. 28, n. 5, p. 510–520, 2014.

PRIVALKO, V. P.; LIPATOV, Y. S. Glass Transition and Chain Flexibility of Linear Polymers. **Journal of Macromolecular Science, Part B**, v. 9, n. 3, p. 551–564, 1974.

PUGH, K. C.; YORK, E. J.; STEWART, J. M. Effects of resin swelling and substitution on solid phase synthesis. **International Journal of Peptide and Protein Research**, p. 208–213, 1992.

QIAN, Z. et al. Glass Transition Phenomenon for Conjugated Polymers. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 220, n. 11, p. 1–30, 2019.

R. DRAPER, N.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. [s.l.] Wiley, 1998.

RAJENDRAM, R. et al. A 2-Year Prospective Randomized Controlled Trial of Intravitreal Bevacizumab or Laser Therapy (BOLT) in the Management of Diabetic Macular Edema. **Archives of Ophthalmology**, v. 130, n. 8, p. 972–979, 2015.

RESENDE, A. F. C. et al. PLGA Implants containing vancomycin and dexamethasone: Development, characterization and bactericidal effects. **Pharmazie**, v. 71, n. 8, p. 439–446, 2016.



RIBATTI, D. Mechanisms of Development The chick embryo chorioallantoic membrane ( CAM ). A multifaceted experimental model. **MOD**, v. 141, p. 70–77, 2016.

RYAN, T. A.; JOINER, B. L. Normal Probability Plots and Tests for Normality. **Test**, v. 10, p. 1668–1675, 1976a.

RYAN, T. A.; JOINER, B. L. Normal Probability Plots and Tests for Normality. **The Pennsylvania State University, State College**, p. p15, 1976b.

SCOTT, I. U.; STOCKDALE, C. R.; SUN, J. K. Expanded 2-Year Follow-up of Ranibizumab Plus Prompt or Deferred Laser or Triamcinolone Plus Prompt Laser for Diabetic Macular Edema. **OPHTHA**, v. 118, n. 4, p. 609–614, 2010.

SHAIK, F. et al. Structural basis for vascular endothelial growth factor receptor activation and implications for disease therapy. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1–25, 2020.

SHIKARI, H.; SILVA, P. S.; SUN, J. K. Complications of Intravitreal Injections in Patients with Diabetes. **Seminars in ophthalmology**, v. 29, n. Semin. Ophthalmol., p. 276–289, 2014.

SHORT, B. G. Safety Evaluation of Ocular Drug Delivery Formulations: Techniques and Practical Considerations. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 49–62, 2008.

SIMÓ, R. et al. Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. **Current diabetes reviews**, v. 2, n. 1, p. 71–98, 2006.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 1990.

SNYDER, R. L.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, W. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

SOLOMON, S. D. et al. Diabetic retinopathy: A position statement by the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 40, n. 3, p. 412–418, 2017.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 2000.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. **Methods in Enzymology**, v. 383, p. 318–351, 2004.

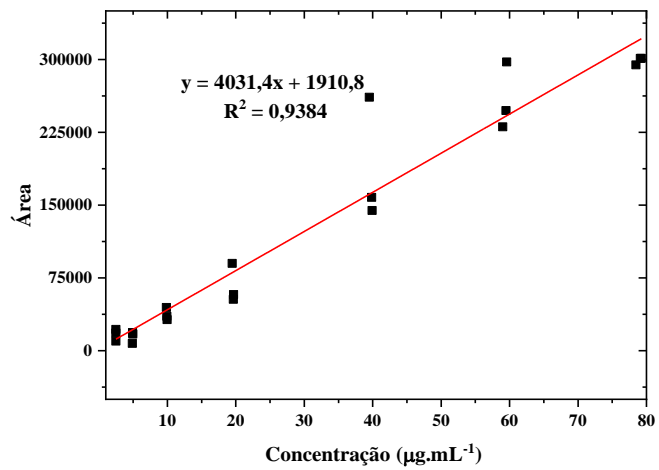
SUNDSTROM, J. M.; SIM, R.; ANTONETTI, D. A. Ocular Anti-VEGF Therapy for Diabetic Retinopathy: The Role of VEGF in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. **Diabetes Care**, v. 37, n. August 2013, p. 893–899, 2014a.

SUNDSTROM, J. M.; SIM, R.; ANTONETTI, D. A. Ocular Anti-VEGF Therapy for Diabetic Retinopathy: The Role of VEGF in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. v. 37, n. August 2013, p. 893–899, 2014b.

- SURESH, P. K. et al. Ocular implants as drug delivery device in ophthalmic therapeutics: An overview. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 7, n. 6, p. 665–676, 2014.
- THRIMAWITHANA, T. R. et al. Drug delivery to the posterior segment of the eye. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 5–6, p. 270–277, 2011.
- VERLY, R. M. **Peptídeos Antimicrobianos: Síntese, Ensaios Biológicos, Estudos Termodinâmicos e Análise Estrutural por RMN em Meios Biomiméticos**. Tese (Doutorado) - Curso de Química. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.
- VERLY, R. M. et al. Structure and membrane interactions of the homodimeric antibiotic peptide homotarsinin. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40854, 19 jan. 2017.
- VIOLA, R. et al. **Puri<sup>®</sup> cation and characterisation of a novel starch synthase selective for uridine 5'  $\alpha$ -diphosphate glucose from the red alga *Gracilaria tenuistipitata***. [s.l: s.n.]. v. 185
- WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. May, p. 1087–1093, 2018.
- WELLS, J. A. et al. Aflibercept, bevacizumab, or ranibizumab for diabetic macular edema. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1193–1203, 2015.
- WILLOUGHBY, C. E. et al. Anatomy and physiology of the human eye: Effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function - a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 2–11, 2010.
- WISCHKE, C.; SCHWENDEMAN, S. P. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 298–327, 2008.
- WONG, T. Y. et al. Diabetic retinopathy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.
- WU, L. et al. Twelve-month safety of intravitreal injections of bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>): Results of the pan-american collaborative retina study group (PACORES). **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 246, n. 1, p. 81–87, 2008.
- ZAPADKA, K. L. et al. Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. **Interface Focus**, v. 7, n. 6, 2017.
- ZHANG, M.; ZHAO, J.; ZHENG, J. Soft Matter link between antimicrobial and amyloid peptides. **Soft Matter**, v. 10, p. 7425–7451, 2014.

## APÊNDICE A

Curva analítica com os pontos *outliers*



## ANEXO A

### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 16, 2021

---

---

This Agreement between Lídia Pereira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|                              |                                                              |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| License Number               | 5130801272065                                                |
| License date                 | Aug 16, 2021                                                 |
| Licensed Content Publisher   | Elsevier                                                     |
| Licensed Content Publication | Seminars in Ultrasound, CT, and MRI                          |
| Licensed Content Title       | Ocular Anatomy and Cross-Sectional Imaging of the Eye        |
| Licensed Content Author      | Ajay Malhotra, Frank J. Minja, Alison Crum, Delilah Burrowes |
| Licensed Content Date        | Feb 1, 2011                                                  |
| Licensed Content Volume      | 32                                                           |
| Licensed Content Issue       | 1                                                            |
| Licensed Content Pages       | 12                                                           |
| Start Page                   | 2                                                            |
| End Page                     | 13                                                           |

|                                              |                                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Type of Use                                  | reuse in a thesis/dissertation                                                                                                                            |
| Portion                                      | figures/tables/illustrations                                                                                                                              |
| Number of figures/tables/illustrations       | 1                                                                                                                                                         |
| Format                                       | both print and electronic                                                                                                                                 |
| Are you the author of this Elsevier article? | No                                                                                                                                                        |
| Will you be translating?                     | Yes, including English rights                                                                                                                             |
| Number of languages                          | 1                                                                                                                                                         |
| Title                                        | Master's student                                                                                                                                          |
| Institution name                             | Universidade Federal de Minas Gerais                                                                                                                      |
| Expected presentation date                   | Sep 2021                                                                                                                                                  |
| Portions                                     | Figure 1                                                                                                                                                  |
| Specific Languages                           | Portuguese                                                                                                                                                |
| Requestor Location                           | Lidia Pereira<br>Av. Pres. Antônio Carlos 6627 Pampulha<br>Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901<br>Brazil<br>Attn: Universidade Federal de Minas Gerais |
| Publisher Tax ID                             | GB 494 6272 12                                                                                                                                            |
| Total                                        | 0.00 USD                                                                                                                                                  |

## ANEXO B

### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 16, 2021

---

---

This Agreement between Lídia Pereira ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

|                                        |                                           |
|----------------------------------------|-------------------------------------------|
| License Number                         | 5130820279978                             |
| License date                           | Aug 16, 2021                              |
| Licensed Content Publisher             | Springer Nature                           |
| Licensed Content Publication           | Nature Reviews Disease Primers            |
| Licensed Content Title                 | Diabetic retinopathy                      |
| Licensed Content Author                | Tien Y. Wong et al                        |
| Licensed Content Date                  | Mar 17, 2016                              |
| Type of Use                            | Thesis/Dissertation                       |
| Requestor type                         | academic/university or research institute |
| Format                                 | print and electronic                      |
| Portion                                | figures/tables/illustrations              |
| Number of figures/tables/illustrations | 1                                         |

|                                        |                                                                                                                                                               |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| High-res required                      | no                                                                                                                                                            |
| Will you be translating?               | no                                                                                                                                                            |
| Circulation/distribution               | 30 - 99                                                                                                                                                       |
| Author of this Springer Nature content | no                                                                                                                                                            |
| Title                                  | Master's student                                                                                                                                              |
| Institution name                       | Universidade Federal de Minas Gerais                                                                                                                          |
| Expected presentation date             | Sep 2021                                                                                                                                                      |
| Portions                               | Figure 4                                                                                                                                                      |
| Requestor Location                     | Lidia Pereira<br>Av. Pres. Antônio Carlos 6627 Pampulha<br><br>Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901<br>Brazil<br>Attn: Universidade Federal de Minas Gerais |
| Total                                  | 0.00 USD                                                                                                                                                      |
| Terms and Conditions                   |                                                                                                                                                               |

**Springer Nature Customer Service Centre GmbH  
Terms and Conditions**

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

**1. Grant of License**

**1. 1.** The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order

## Order Confirmation

Thank you, your order has been placed. An email confirmation has been sent to you. Your order license details and printable licenses will be available within 24 hours. Please access Manage Account for final order details.

This is not an invoice. Please go to manage account to access your order history and invoices.

### CUSTOMER INFORMATION

Payment by invoice: You can cancel your order until the invoice is generated by contacting customer service.

#### Billing Address

Miss Lídia Pereira  
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha  
Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901  
Brazil

+55 (31)997333782  
lidiabarbosa0601@hotmail.com

#### PO Number (optional)

N/A

#### Customer Location

Miss Lídia Pereira  
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627, Pampulha  
Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901  
Brazil

#### Payment options

Invoice

### PENDING ORDER CONFIRMATION

Confirmation Number: Pending

Order Date: 17-Aug-2021

#### 1. Soft matter

0.00 USD

Article: Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides.

|                  |                                    |           |                            |
|------------------|------------------------------------|-----------|----------------------------|
| Order License ID | Pending                            | Publisher | ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY |
| ISSN             | 1744-683X                          | Portion   | Image/photo illustration   |
| Type of Use      | Republish in a thesis/dissertation |           |                            |

#### LICENSED CONTENT



|                   |                                                                                                    |                  |                            |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|
| Publication Title | Soft matter                                                                                        | Rightsholder     | Royal Society of Chemistry |
| Article Title     | Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. | Publication Type | Journal                    |
| Author/Editor     | Royal Society of Chemistry (Great Britain)                                                         | Start Page       | 7425                       |
| Date              | 06/01/2005                                                                                         | End Page         | 7451                       |
| Language          | English                                                                                            | Issue            | 38                         |
| Country           | United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland                                               | Volume           | 10                         |

## REQUEST DETAILS

|                                           |                          |                             |                                        |
|-------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|
| Portion Type                              | Image/photo/illustration | Distribution                | Worldwide                              |
| Number of images / photos / illustrations | 1                        | Translation                 | Original language plus one translation |
| Format (select all that apply)            | Print, Electronic        | Copies for the disabled?    | No                                     |
| Who will republish the content?           | Academic institution     | Minor editing privileges?   | No                                     |
| Duration of Use                           | Life of current edition  | Incidental promotional use? | No                                     |
| Lifetime Unit Quantity                    | Up to 499                | Currency                    | USD                                    |
| Rights Requested                          | Main product             |                             |                                        |

## NEW WORK DETAILS

|                 |                          |                            |                                      |
|-----------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| Title           | Msc Student              | Institution name           | Universidade Federal de Minas Gerais |
| Instructor name | Jarbas Magalhães Resende | Expected presentation date | 2021-09-20                           |

## ADDITIONAL DETAILS

|                        |     |                                                               |                                      |
|------------------------|-----|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Order reference number | N/A | The requesting person / organization to appear on the license | Universidade Federal de Minas Gerais |
|------------------------|-----|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------|

## REUSE CONTENT DETAILS

|                                                           |                                        |                                                  |                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title, description or numeric reference of the portion(s) | Fig.1                                  | Title of the article/chapter the portion is from | Molecular understanding of a potential functional link between antimicrobial and amyloid peptides. |
| Editor of portion(s)                                      | Zhang, Mingzhen; Zhao, Jun; Zheng, Jie | Author of portion(s)                             | Zhang, Mingzhen; Zhao, Jun; Zheng, Jie                                                             |
| Volume of serial or monograph                             | 10                                     |                                                  |                                                                                                    |

## ANEXO D

### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 08, 2021

---

---

This Agreement between Lúdia Pereira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

|                              |                                                               |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| License Number               | 5124260880515                                                 |
| License date                 | Aug 08, 2021                                                  |
| Licensed Content Publisher   | Elsevier                                                      |
| Licensed Content Publication | Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics |
| Licensed Content Title       | How to study proteins by circular dichroism                   |
| Licensed Content Author      | Sharon M. Kelly, Thomas J. Jess, Nicholas C. Price            |
| Licensed Content Date        | Aug 10, 2005                                                  |
| Licensed Content Volume      | 1751                                                          |
| Licensed Content Issue       | 2                                                             |
| Licensed Content Pages       | 21                                                            |
| Start Page                   | 119                                                           |
| End Page                     | 139                                                           |

|                                              |                                                                                                                                                           |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Type of Use                                  | reuse in a thesis/dissertation                                                                                                                            |
| Portion                                      | figures/tables/illustrations                                                                                                                              |
| Number of figures/tables/illustrations       | 1                                                                                                                                                         |
| Format                                       | both print and electronic                                                                                                                                 |
| Are you the author of this Elsevier article? | No                                                                                                                                                        |
| Will you be translating?                     | No                                                                                                                                                        |
| Title                                        | Master's student                                                                                                                                          |
| Institution name                             | Universidade Federal de Minas Gerais                                                                                                                      |
| Expected presentation date                   | Sep 2021                                                                                                                                                  |
| Portions                                     | Fig.1                                                                                                                                                     |
| Requestor Location                           | Lídia Pereira<br>Av. Pres. Antônio Carlos 6627 Pampulha<br>Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901<br>Brazil<br>Attn: Universidade Federal de Minas Gerais |
| Publisher Tax ID                             | GB 494 6272 12                                                                                                                                            |
| Total                                        | 0.00 USD                                                                                                                                                  |
| Terms and Conditions                         |                                                                                                                                                           |

## INTRODUCTION