



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS LÍQUIDO CRISTALINOS
LAMELARES CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
AC-WAHX-KTTKS PARA O TRATAMENTO DO
ENVELHECIMENTO CUTÂNEO**

ARIANE MIGLIATO MARTINELLI

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Aparecida Chiavacci

Araraquara

2015

Ariane Migliato Martinelli

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M385d Martinelli, Ariane Migliato
Desenvolvimento de sistemas líquido cristalinos lamelares contendo diferentes concentrações de Ac-Wahx-KTTKS para o tratamento do envelhecimento cutâneo / Ariane Migliato Martinelli — Araraquara, 2015
93 f.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Leila Aparecida Chiavacci
1. Ac-Wahx-KTTKS. 2. Envelhecimento cutâneo. 3. Liberação prolongada. 4. Sistemas líquido cristalinos lamelares I. Chiavacci, Leila Aparecida, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Ariane Migliato Martinelli

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha **avó Irce**, uma estrelinha que agora brilha lá no céu,
que sempre me apoiou e esteve presente em minha vida oferecendo
muito amor, carinho e ternura.

Aos meus pais, **Luiz e Marli**, por todo apoio, carinho e amor que sempre me deram, por
confiarem e acreditarem no meu potencial.

A minha irmã **Amanda** e ao meu namorado **Felipe** pelo amor e confiança depositados
em mim.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas”

Mário Quintana

Ariane Migliato Martinelli

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me guiar sempre no Seu caminho, por nunca me desamparar, pelo amor que Ele derrama sobre meu coração, porque sem Ele eu nada sou.

A minha família, em especial aos meus pais, **Luiz e Marli**, a minha irmã **Amanda**, e meu avô **Raimundo** pelo amor incondicional, incentivo e força em todos os momentos.

Ao meu namorado **Felipe**, por todo amor, carinho e paciência, e por estar sempre ao meu lado me incentivando.

Agradeço a minha orientadora professora **Dra. Leila Aparecida Chiavacci** pelo apoio, paciência, amizade e por todo conhecimento adquirido durante a realização deste trabalho.

Agradeço ao professor **Dr. Eduardo Maffud Cilli**, por toda ajuda na síntese e quantificação do peptídeo, e seus alunos **Estéban, Matheus e Natan**.

Agradeço a professora **Dra. Maria Virgínia Scarpa**, por ter cedido um espaço em seu laboratório de Controle de Qualidade por permitir a utilização do Microette.

Agradeço também a professora **Dra. Alexandra Ivo de Medeiros** e a sua aluna **Amanda** por terem me ajudado no cultivo das células e no ensaio de Biossíntese de colágeno.

Ao Instituto de Química da UNESP/Araraquara, em especial ao professor **Dr. Celso V. Santilli**, pela disponibilização de seu laboratório para a realização das medidas reológicas.

A **Dra. Thalita P. Formariz**, e a **Dra. Bruna Chiari Andréo** por colaborarem para o enriquecimento deste trabalho participando da banca de qualificação.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (**LNLS - Campinas**), onde foram realizados os ensaios de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

Às amigas que fiz durante a realização deste trabalho e que se tornaram pessoas muito especiais, **Elô, João, Mariana, Marina, Mariluci, Matheus, Nathália, Neima**.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela ajuda financeira com a bolsa de mestrado e a reserva técnica.

E a todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta dissertação, **meu agradecimento**.

Ariane Migliato Martinelli

RESUMO

Durante a última década, houve grande interesse em sistemas líquido cristalinos liotrópicos como sistemas de liberação de agentes biologicamente ativos, pela indústria cosmética, química e farmacêutica. Uma das razões é que os sistemas líquido liotrópicos existem em muitas partes do corpo humano, como cérebro, músculo, retina e muitos outros, e a sua estrutura especial desempenha um importante papel nos movimentos vitais. O envelhecimento da pele é o resultado de processos intrínsecos e/ou extrínsecos. As alterações cutâneas resultantes destes processos incluem a discromia, a aspereza, as rugas finas e persistentes seguidas por rugas mais profundas. Entre vários subfragmentos do pró-peptídeo de colágeno, o KTTKS foi encontrado para ser a sequência mínima necessária para estimular a produção de colágeno em 80% e de fibronectina em uma variedade de células mesenquimais. Devido à estimulação da síntese de colágeno, o KTTKS tem atraído grande atenção como um ingrediente cosmético para fornecer efeitos anti-envelhecimento. Pensando em todas estas questões, este trabalho de mestrado teve como proposta o preparo de sistemas líquido cristalinos lamelares contendo diferentes concentrações do peptídeo Ac-Wahx-KTTKS, que tem propriedades físico-químicas que melhorarão sua permeação através da pele. O peptídeo Ac-WAhx-KTTKS foi obtido com um grau de pureza acima de 99,97%. A microscopia de luz polarizada e o espalhamento de raios X a baixo ângulo permitiram avaliar que após a incorporação do peptídeo não houve mudança de fases dos sistemas, permanecendo na fase lamelar. A reologia mostrou que mesmo após a incorporação do peptídeo, os sistemas continuaram a apresentar tixotropia (com exceção das formulações F1, F1A e F1B), comportamento não-Newtoniano e perfil pseudoplástico. O teste de biossíntese de colágeno *in vitro* mostrou que o peptídeo é eficaz no tratamento do envelhecimento cutâneo, aumentando em até 80% a produção de colágeno pelos fibroblastos. Os testes de liberação *in vitro* do Ac-Wahx-KTTKS nas formulações mostraram que os sistemas lamelares testados são capazes de prolongar a liberação do ativo e o modelo matemático que melhor se aplicou foi o de zero ordem. Na permeação, os resultados obtidos com a formulação F3B na retenção cutânea se mostraram mais interessantes, pois verificou-se uma maior retenção do peptídeo nas camadas mais profundas da pele. Os resultados obtidos demonstram, portanto, que o peptídeo é uma opção promissora para a amenização do processo de envelhecimento cutâneo.

Ariane Migliato Martinelli

Palavras-chave: Ac-Wahx-KTTKS, envelhecimento cutâneo, liberação prolongada, sistemas líquido cristalinos lamelares.

ABSTRACT

During the last decade there has been great interest in lyotropic liquid crystalline systems, being used to the release systems of biologically active agents, the cosmetic, chemical and pharmaceutical industries. One reason for this is that the lyotropic liquid systems exist in many parts of the body such as brain, muscle, retina and many others and their special structure plays an important role in vital movements. Skin aging is a result of intrinsic and/or extrinsic processes. The skin changes resulting from these processes include dyschromia, roughness, fine and persistent wrinkles followed by deeper wrinkles. Among several peptide subfragments of the KTTKS was found to be the minimum sequence necessary to stimulate collagen production by 80% and fibronectin in a variety of mesenchymal cells. Due to the stimulation of collagen synthesis, the KTTKS has attracted great attention as a cosmetic ingredient to provide anti-aging effects. Thinking about all these issues, this master's work aimed to the preparation of lamellar liquid crystalline systems containing different concentrations of Ac-Wahx-KTTKS peptide which has physico-chemical properties that will improve its permeation through the skin. Ac-WAhx-KTTKS peptide was obtained in a purity above 99.97%. The polarized light microscopy and X-ray scattering the low angle allowed to assess that after the incorporation of the peptide did not change phases of the systems, remaining in the lamellar phase. The rheology showed that even after the incorporation of the peptide, the systems continued to show thixotropic (with the exception of formulations F1, F1A and F1B), non-Newtoniano behavior and shear thinning profile. The biosynthesis of collagen *in vitro* test showed that the peptide is effective in the treatment of skin aging, increasing to 80% in collagen production by fibroblasts. The *in vitro* tests to the assessment of the release of Ac-Wahx-KTTKS in the formulations showed that the tested lamellar systems are able to prolong the release of the active and the mathematical model that best applied was zero order. In the permeation results obtained with the formulation in the skin retention F3B proved most interesting, since there was a greater retention of the peptide in the deeper layers of the skin. Therefore, these results demonstrate that the peptide is a promising option for alleviation of skin aging.

Ariane Migliato Martinelli

Keywords: Ac-Wah_x-KTTKS, skin aging, extended-release, lamellar liquid crystalline systems

Ariane Migliato Martinelli

Lista de Abreviaturas

CV: coeficiente de variação

DMSO: dimetil-sufóxido

DP: desvio padrão

HDFa: Human Dermal Fibroblasts adults

MEC: matriz extracelular

MLP: microscopia de luz polarizada

MMPs: metaloproteinases da matriz

RL: radicais livres

SAXS: espalhamento de raios-X a baixo ângulo

SLC: sistemas líquido cristalinos

UV: ultravioleta

Ariane Migliato Martinelli

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da pele.....	9
Figura 2. Modelo da hélice tripla de colágeno.....	12
Figura 3. Representação das principais fases líquido cristalinas liotrópicas.....	19
Figura 4. Estrutura molecular do ácido aminocapróico.....	24
Figura 5. Estrutura molecular do triptofano.....	24
Figura 6. Estrutura molecular do peptídeo análogo Ac-Wahx-KTTKS.....	25
Figura 7. Diagrama de fases do PPG-5-Ceteth 20/ Ácido Oleico/ Água.....	30
Figura 8. Diagrama de fases do Oleth 10/ Ácido Oleico/ Água.....	31
Figura 9. Protocolo geral de sínteses.....	35
Figura 10. Célula de Franz.....	42
Figura 11. Perfil Cromatográfico do peptídeo bruto.....	47
Figura 12. Perfil Cromatográfico do peptídeo puro.....	48
Figura 13. Espectro de massas do peptídeo puro.....	48
Figura 14. Fotomicrografias das formulações contendo e não contendo peptídeo.....	52
Figura 15. Curvas de SAXS das formulações F1 e F2 contendo e não contendo peptídeo.....	55
Figura 16. Curvas de SAXS das formulações F3 e F4 contendo e não contendo peptídeo.....	56
Figura 17. Curva de fluxo das formulações não contendo peptídeo.....	58
Figura 18. Curva de fluxo das formulações F1 e F2 contendo peptídeo.....	59
Figura 19. Curva de fluxo das formulações F3 e F4 contendo peptídeo.....	60
Figura 20. Curva analítica padrão do colágeno tipo I humano, equação da reta (y) e coeficiente de correlação (R^2).....	62
Figura 21. Representação da concentração de colágeno total produzido pelos HDFa dos grupos controle e tratados com peptídeo após 24 horas de cultura.....	64
Figura 22. Representação da concentração de colágeno total produzido pelos HDFa dos grupos controle e tratados com peptídeo após 48 horas de cultura.....	68

Ariane Migliato Martinelli

Figura 23. Cromatograma da solução receptora (tampão fosfato pH 7,4).....	68
Figura 24. Cromatograma do peptídeo em solução receptora (tampão fosfato pH 7,4).....	68
Figura 25. Perfil de liberação do peptídeo.....	74
Figura 26. Modelo de cinética de liberação da formulação F1A	76
Figura 27. Modelo de cinética de liberação da formulação F1B	76
Figura 28. Modelo de cinética de liberação da formulação F2A	77
Figura 29. Modelo de cinética de liberação da formulação F2B	77
Figura 30. Modelo de cinética de liberação da formulação F3A	78
Figura 31. Modelo de cinética de liberação da formulação F3B	78
Figura 32. Modelo de cinética de liberação da formulação F4A	79
Figura 33. Modelo de cinética de liberação da formulação F4B	79
Figura 34. Retenção cutânea do peptídeo no estrato córneo e epiderme/derme após 12 horas de ensaio.....	82

Lista de Tabelas

Tabela 1. Formulações contendo PPG-5-Ceteth– 20 como tensoativo e as respectivas porcentagens de cada componente	32
Tabela 2. Formulações contendo Oleth 10 como tensoativo e as respectivas porcentagens de cada componente	32
Tabela 3. Concentração do peptídeo presentes nas formulações.....	32
Tabela 4. Condições cromatográficas empregadas na purificação do peptídeo sintetizado.....	36
Tabela 5. Resultado da síntese.....	48
Tabela 6. pH das Formulações.....	50
Tabela 7. Concentrações totais de colágeno produzido após 24 de tratamento.....	63
Tabela 8. Concentrações totais de colágeno produzido após 48 de tratamento.....	65
Tabela 9. Liberação do peptídeo da formulação F1A.....	70
Tabela 10. Liberação do peptídeo da formulação F1B.....	70
Tabela 11. Liberação do peptídeo da formulação F2A.....	71
Tabela 12. Liberação do peptídeo da formulação F2B.....	71
Tabela 13. Liberação do peptídeo da formulação F3A.....	72
Tabela 14. Liberação do peptídeo da formulação F3B.....	72
Tabela 15. Liberação do peptídeo da formulação F4A.....	73
Tabela 16. Liberação do peptídeo da formulação F4B.....	73
Tabela 17. Coeficiente de correlação (R^2) das formulações dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi.....	75
Tabela 18. Retenção no estrato córneo e epiderme/derme do peptídeo nas formulações após 12 horas de experimento.....	81

SUMÁRIO

Introdução	3
Revisão Bibliográfica	7
A pele como via de administração	8
Matriz extracelular	10
Colágeno	11
Envelhecimento cutâneo	13
Ativos antienvelhecimento presentes no mercado	13
Peptídeo KTTKS	17
Sistemas líquido cristalinos e liberação controlada de ativos	19
Objetivos	22
Justificativa	24
Material e Métodos	27
Material e reagentes	28
Métodos	29
1. Obtenção dos sistemas líquido cristalinos	29
2. Síntese do peptídeo	33
3. Biossíntese de colágeno	37
4. Caracterização físico-química dos sistemas líquido cristalinos	39
4.1 Determinação do pH	39
4.2 Microscopia de luz polarizada (MLP)	40
4.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	40
4.4 Reologia	40
5. Liberação do peptídeo <i>in vitro</i>	41
5.1 Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações	41
5.2 Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i> do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações	44
5.3 Avaliação da retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações	45
Resultados e Discussão	46
1. Síntese do peptídeo	47

Ariane Migliato Martinelli

2. Caracterização físico-química dos sistemas líquido cristalinos	49
2.1 Determinação do pH	49
2.2 Microscopia de luz polarizada (MLP)	51
2.3 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)	53
2.4 Reologia	57
3. Biossíntese de Colágeno	61
4. Liberação do peptídeo in vitro	67
4.1 Análise de interferentes	67
4.2 Avaliação da cinética de liberação do peptídeo in vitro	69
4.3 Avaliação da permeação in vitro do peptídeo Ac-Wahx-KTTKS contido nas formulações	80
4.4 Avaliação da retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo Ac-Wahx-KTTKS contido nas formulações	81
Conclusões	84
Referências	87

Introdução

Ariane Migliato Martinelli

A busca constante da manutenção de uma aparência jovem e saudável tem favorecido cada vez mais o crescimento da indústria cosmética, pois ao lado de uma vida equilibrada e com bons hábitos alimentares, os cosméticos têm participado como grandes aliados para prevenir, retardar e tratar o envelhecimento cutâneo precoce ou o fotoenvelhecimento (MAIA CAMPOS e SILVA, 2002).

O processo de envelhecimento ocorre tanto por causas genéticas, quanto por influências ambientais, como a luz solar, o fumo, a alimentação e as doenças dermatológicas (MARZULLI e MAIBACH, 1996).

A pele envelhecida tem como características a formação de rugas finas, diminuição da renovação celular na epiderme, com afinamento desta camada, decréscimo de tecido elástico e perda de colágeno na derme, o que reduz a elasticidade, a tonicidade e permite a formação de rugas e, no caso de fotoenvelhecimento, ocorre hiperqueratinização, crescimento freqüente de células pré-cancerosas, produção de tecido elástico anormal e perda pronunciada dos feixes de colágeno (PINNEL, 2003).

Embora com um estilo de vida saudável, a pele sofre com as agressões ambientais, como o sol e a poluição, além do envelhecimento cronológico (intrínseco). Dessa forma, as pessoas estão buscando métodos não invasivos para melhorar a aparência da pele, e o setor de cosméticos tem apresentado ao mercado numerosos produtos e compostos ativos com o intuito de proporcionar ao consumidor resultados eficazes no tratamento do envelhecimento da pele (BERMANN, 2007, DRAELOS, 2007, ABU SAMAH e HEARD, 2011).

Atualmente, dentre as substâncias mais utilizadas, podem ser citadas os retinóides, o ácido glicólico, o ácido ascórbico e os peptídeos. Os retinóides melhoram as rugas finas e grossas, a aspereza e a alteração de pigmentação. O ácido glicólico acelera o processo de esfoliação e renovação celular da pele enfraquecendo a coesão

Ariane Migliato Martinelli

intercelular da camada córnea. Porém é mais eficaz para a redução das alterações da pigmentação do que para a redução de rugas finas. O ácido ascórbico atua como um antioxidante e também estimula a produção de colágenos tipos I e III (KRAELING et al., 1997). Já os peptídeos utilizados em produtos tópicos antienvelhecimento têm múltiplas aplicações e podem ser classificados em 4 grupos com base em seus mecanismos de ação (CAMPOS et al., 1999): peptídeos transportadores, peptídeos sinais, peptídeos enzima-inibidores e peptídeos inibidores de neurotransmissores, porém há falta de dados para comprovar a eficácia dos mesmos.

As proteínas e peptídeos estão sendo amplamente utilizados em produtos cosméticos, com destaque para o acetil hexapeptídeo-3 e a injeção intradérmica da toxina botulínica tipo A. Porém seu uso tem sido limitado em função de sua alta neurotoxicidade (PUIG, 2004).

Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de identificar e isolar peptídeos que desempenham funções na pele. A maioria dos peptídeos bioativos são fragmentos isolados de peptídeos precursores maiores (LINTNER e PESCHARD, 2000, GOROUHI e MAIBACH, 2009). Estes peptídeos demonstram importante papel em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo ações como estimulação e regulação da cicatrização de feridas, efeito antimicrobiano e anti-inflamatório (LINTNER e PESCHARD, 2000). Além disso, tais peptídeos também são indicados para serem utilizados em preparações cosméticas, principalmente para tratamento do envelhecimento cutâneo (LUPO e COLE, 2007, NAMJOSHI et al., 2008, GOROUHI e MAIBACH, 2009, REDDY et al., 2012).

O KTTKS é um peptídeo estimulador da síntese de colágeno (tipos I e III) na pele, muito usado em formulações cosméticas no tratamento do envelhecimento cutâneo, mas devido as suas características físico-químicas, sua penetração na pele não

Ariane Migliato Martinelli

é eficiente. Na tentativa de melhorar a penetração do KTTKS na pele para atingir a derme e exercer seu efeito estimulador da síntese de colágeno, modificações em sua sequência peptídica foram realizadas para melhorar suas características físico-químicas e, conseqüentemente, sua disponibilidade (ABU SAMAH e HEARD, 2011).

Na tentativa de promover um aumento da penetração cutânea do peptídeo KTTKS na pele, pesquisadores fizeram modificações na sua sequência peptídica, tais como a ligação de um ácido palmítico ao KTTKS (Palmitoil-KTTKS) e a ligação de um ácido ascórbico ao KTTKS (pentapeptídeoascorbil estabilizado). Mas nenhum dado foi divulgado em relação à penetração destes derivados na pele (ABU SAMAH e HEARD, 2011).

Os peptídeos geralmente são macromoléculas, isto é, possuem altas massas moleculares e apresentam-se ionizados em pH fisiológico, o que os tornam hidrofílicos, contribuindo assim para sua dificuldade de penetração (LUPO e COLE, 2007, ABU SAMAH e HEARD, 2011).

Os sistemas líquido cristalinos liotrópicos (SLC) apresentam boa capacidade de penetração devido à baixa tensão interfacial decorrente da interface óleo/água e podem facilitar a difusão progressiva de substâncias biologicamente ativas na pele ou circulação sistêmica, como os aminoácidos e peptídeos, que têm dificuldade de penetrar na pele por serem macromoléculas (FRIBERG, 1990, LAWRENCE e REES, 2000).

Os SLC são caracterizados por apresentarem um grau de organização molecular intermediário, característicos de sólidos e líquidos. Possuem ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como a dos sólidos e, mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como a dos líquidos, ou seja, esta mesofase possui propriedades mecânicas típicas do estado líquido e certa ordem molecular, constituindo assim uma fase fluida e ordenada (HYDE, 2001, BECHTOLD, 2005).

Ariane Migliato Martinelli

Revisão Bibliográfica

A pele como via de administração

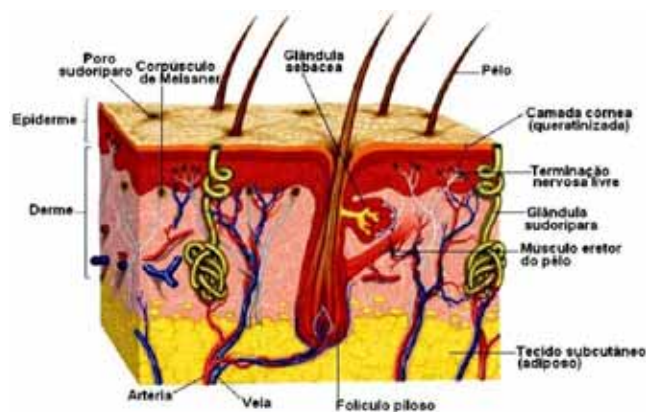
A pele é o maior órgão do corpo, altamente complexa, responsável por 15% do peso corporal. Um dos seus papéis é evitar a invasão do organismo, agindo como um barreira defensiva às ameaças do ambiente externo. A pele possui mecanismos de defesa que lhe conferem barreiras imunológica, física, metabólica e UV-protetora, a fim de inibir ataques de microrganismos, de produtos químicos e radiação UV. Por outro lado, a pele pode ser usada como uma porta de entrada de substâncias terapêuticas, tais como drogas e vacinas, se os mecanismos que conferem as propriedades de barreira são entendidos e explorados (ROBERTS et al., 2008).

A pele é composta de duas camadas principais (Figura 1) tais como a epiderme e a derme, e o tecido subcutâneo. A derme contém uma variedade de tipos celulares, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos incorporado em uma rede densa de tecido conjuntivo (fibras de colágeno). A epiderme, localizada acima da derme e separada pela membrana basal, é composta principalmente de camadas de queratinócitos estratificados, em que as células do estrato córneo, os corneócitos, são banhados por um envelope rico em proteínas com um envelope lipídico exterior, rodeado por uma matriz de lipídio extracelular (MONTEIRO-RIVIERI, 2011). Os queratinócitos sofrem um processo de queratinização, em que a célula diferencia-se e move-se para cima a partir da camada basal até o estrato córneo, onde as células se tornam anucleadas e achatadas e são eventualmente descartadas. Intercaladas entre os queratinócitos na epiderme, há células com funções de produção de melanina (melanócitos), percepção sensorial (células de Merkel) e funções imunológicas (Langerhans e outras células). Em adição aos componentes celulares estruturais, há os

Ariane Migliato Martinelli

apêndices, como as unidades pilossebáceas (folículos pilosos associados a glândulas sebáceas), glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas (BOUWSTRA et al., 2002).

Figura 1. Estrutura da pele (BOUWSTRA et al., 2002)



A penetração através da pele de substâncias como peptídeos, torna-se difícil diante de algumas características físico-químicas, como hidrofília e alta massa molecular. Por isso, o uso de promotores de penetração pode melhorar o transporte de alguns ativos através da pele (YAMAMOTO et al., 2003).

Os promotores de penetração são compostos químicos que, sozinhos são farmacologicamente inativos, mas podem interagir com os constituintes do estrato córneo, reduzindo a resistência da difusão do fármaco na pele. Um promotor de penetração também pode aumentar a atividade termodinâmica do fármaco, resultando assim no fluxo do fármaco aumentado. São exemplos, dimetil-sufóxido (DMSO), uréia, solventes orgânicos, ácidos oléicos, ácidos capróicos, ésteres graxos e tensoativos (SUHONEN e BOUWSTRA, 1999).

Matriz extracelular

A matriz extracelular (MEC) é definida como a organização de diversas proteínas estruturais e polissacarídeos nos tecidos conjuntivos que preenchem os espaços extracelulares. As células depositam no meio extracelular componentes como o colágeno, a fibronectina, a laminina, os proteoglicanos e o ácido hialurônico produzidos, principalmente, pelos fibroblastos e distribuídos em uma rede organizada em íntima associação com a superfície da célula que a produziu (CARLSON e LONGAKER, 2004, ALBERTS et al., 2004).

A MEC é formada pelas duas principais classes de macromoléculas da lamina basal: (1) as cadeias de polissacarídeos de glicosaminoglicanos, as quais estão, normalmente, covalentemente ligadas a proteínas na forma de proteoglicanos, e (2) as proteínas fibrosas como a elastina, a fibronectina, a laminina e o colágeno. As moléculas de proteoglicanos formam uma substância semelhante a um gel, altamente hidratada, na qual estão dispersas as fibras protéicas. O gel de polissacarídeos resiste a forças de compressão na MEC ao mesmo tempo em que permite a rápida difusão dos nutrientes, metabólitos e hormônios entre o sangue e as células dos tecidos. As fibras colágenas fortalecem e auxiliam a organizar a MEC. As fibras de elastina, semelhantes à borracha, fornecem à resistência; já a fibronectina é importante na adesão da célula do tecido conectivo com a matriz e, a laminina, atua como um organizador primário da estrutura das camadas (ALBERTS et al., 2004).

No corpo humano, a forma mais abundante de MEC é encontrada no tecido conjuntivo denso como o ósseo, o tendão e a camada dérmica da pele. As células do tecido conectivo estão embebidas em uma MEC complexa que não somente serve para a sustentação passiva, mas também desempenha um papel ativo na regulação do comportamento das células que fazem contato, influenciando o desenvolvimento, a

Ariane Migliato Martinelli

migração, a proliferação, a forma e a função destas células (ALBERTS et al., 2004, CARLSON e LONGAKER, 2004).

Os fibroblastos da derme, que são componentes essenciais da pele, interagem mecânica e quimicamente com a MEC, sintetizando as fibrilas de colágeno e depositando-as na orientação correta e, também, se comunicando entre si e com outros tipos celulares. Os fibroblastos dérmicos representam uma população heterogênea de células definidas de acordo com a sua localização no interior da derme. Duas subpopulações de fibroblastos estão localizadas em duas camadas distintas da derme: a derme papilar e a derme reticular (CHUNG et al., 2001). Uma terceira subpopulação de fibroblastos está localizada em torno dos folículos pilosos. Fibroblastos “maduros” com uma menor capacidade de transformação podem, por exemplo, existir lado a lado com fibroblastos “imatuross” (frequentemente denominados células mesenquimais) que podem desenvolver uma variedade de tipos celulares (ALBERTS et al., 2004).

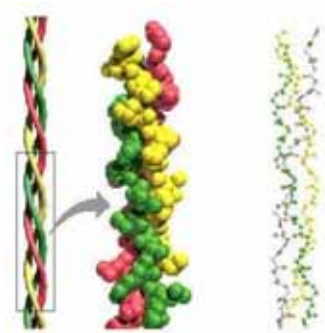
Colágeno

As proteínas de colágeno são o componente mais abundante da MEC, sintetizadas pelos fibroblastos no tecido conjuntivo. O colágeno é encontrado na córnea, na cartilagem, na parte orgânica do osso, nos tecidos fibrosos como tendões, ligamentos e na pele. Existem vários tipos de colágeno, sendo que o tipo I é o mais abundante, representando cerca de 80%, formando a rede reticular na região profunda da derme e, em segundo lugar, o colágeno tipo III, que representa 15% do colágeno da derme, localizado na membrana basal, servindo para fixar a epiderme à derme (CHUNG, et al., 2001).

Ariane Migliato Martinelli

O colágeno é a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos. Cada molécula de colágeno é um bastão pequeno e rígido formado pelo entrelaçamento em tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas chamadas cadeias alfa (Figura 2). Essa estrutura protéica justifica as propriedades físicas e biológicas dos colágenos: rigidez, solidez e estabilidade (PROCKOP et al., 1979).

Figura 2. Modelo da hélice tríplice do colágeno. Os três filamentos são mostrados em cores diferentes (PROCKOP et al., 1979).



No envelhecimento cutâneo verifica-se degradação de colágeno, causando a perda da elasticidade e a formação de rugas na pele. Essa degradação pode ser acelerada por fatores ambientais, como a radiação ultravioleta (UV), que aumenta o nível de expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs) em células presentes na MEC. As MMPs são responsáveis pela destruição do colágeno, levando ao fotoenvelhecimento e às rugas (NAGASE, 1997).

Além disso, a degradação da MEC por MMPs pode estar relacionada com o câncer de pele, aterosclerose e o infarto do miocárdio. Desta forma, a regulação da

síntese de colágeno e dos níveis de expressão de MMPs é um passo importante para evitar o fotoenvelhecimento bem como doenças relacionadas (RABE et al., 2006).

Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento da pele é produto de dois processos: o envelhecimento intrínseco, ou cronológico, que é principalmente devido à fatores genéticos; e o envelhecimento extrínseco, devido às agressões ambientais, como a exposição ao sol (fotoenvelhecimento) e o cigarro. As alterações cutâneas resultantes destes processos incluem discromias, aspereza, rugas finas e persistentes seguidas por rugas mais profundas. Estruturalmente, isto é explicado por atrofia dérmica e epidérmica, diminuição do colágeno, perda de gordura subcutânea, perda de elasticidade inerente, e a melanogênese irregular (GLOGAU, 1997).

Com o envelhecimento cronológico cutâneo, ocorre modificação do material genético por meio de enzimas, alterações protéicas e a proliferação celular decresce. Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de radicais livres (RL) aceleram esse fenômeno de envelhecimento. A formação de RL conduz ao estresse oxidativo, originando alterações em proteínas extracelulares e a modificações celulares. O maior dano causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica encontrada na membrana celular que, em último caso, leva a morte celular (HIRATA, 2004, PERES, 2011).

Ativos antienvelhecimento presentes no mercado

A fim de prevenir o envelhecimento cutâneo, produtos tópicos antienvelhecimento têm sido bastante procurados por pessoas que buscam métodos não

Ariane Migliato Martinelli

invasivos para melhorar a aparência da pele. Entre eles estão os retinóides, o ácido glicólico, o ácido ascórbico, os polifenóis do chá verde e os peptídeos (THOMAS et al., 2013).

O retinol (Vitamina A) e seus derivados, coletivamente chamados de retinóides desempenham um papel importante na regulação de várias funções fisiológicas, incluindo o sistema imune, a formação óssea, a morte celular programada, a hematopoese e a visão (BOEHM, 1995).

Os retinóides atuam por ligação a receptores nucleares específicos e, comprovadamente, influenciam vários processos celulares, tais como o reparo do DNA, a expressão de genes, o estímulo ao crescimento e diferenciação de queratinócitos, melanócitos e fibroblastos, assim como produção da matriz extracelular pelos fibroblastos (GRIFFITHS et al., 1993, VARANI et al., 1998, STRATIGOS e KATSAMBA, 2005).

Assim, o ácido retinóico é bastante utilizado para o tratamento dermatológico, pois há evidências de que este ameniza os danos causados pelo fotoenvelhecimento, dando à pele uma aparência mais jovem (GRIFFITHS et al., 1993, VARANI et al., 1998, STRATIGOS e KATSAMBA, 2005). Além disso, os retinóides também melhoram o aspecto de hiperpigmentação pós-inflamatória, promovendo o clareamento principalmente nas peles mais escuras. As formulações mais comumente usadas são à base de tretinoína de 0,025% a 0,1%. Os efeitos colaterais mais apreciáveis são eritema e descamação, tanto mais intensos quanto maior a concentração do retinóide (STEINER, 2007).

Uma revisão, incluindo 12 estudos duplo-cegos, controlados e randomizados (ECR) comparando tretinoína creme com placebo mostrou que o derivado de ácido retinóico

em concentrações acima de 0,02% melhorou as rugas finas e grossas, aspereza, sardas, e pigmentação (SAMUEL et al., 2005).

O ácido glicólico é usado, nos produtos cosméticos, em concentrações menores que 10%. Em concentrações acima de 20% e até 70%, é utilizado como agente para a realização de *peelings* superficiais (KRAELING e BRONAUGS, 1997).

Além disso, o ácido glicólico tem boa permeação em diferentes camadas da pele (KRAELING e BRONAUGS, 1997) e age como um solvente para a matriz intercorneócita reduzindo a excessiva queratinização. A utilização deste ativo para a realização de *peelings* leva ao afinamento do estrato córneo, útil na renovação da epiderme e redução visível das linhas faciais (CHANG e CHANG, 2003).

É também um agente clareador hidrofílico, que aumenta a hidratação (CHANG, CHANG, 2003) e a elasticidade da pele. Essa ação se deve, provavelmente, à estimulação direta na produção de colágeno, elastina e mucopolissacarídeos nas camadas profundas da pele (DITRE et al., 1996).

O ácido ascórbico, necessário na síntese do colágeno, atua como cofator nas reações de hidroxilação de prolina e lisina, sendo que vários autores têm demonstrado que os fibroblastos, quando em franco envelhecimento e submetidos a um tratamento *in vitro* com o ácido ascórbico, são capazes de aumentar a síntese de colágeno (NUSGENS et al., 2001, LUPO, 2001, SHAPIRO e SALIOU, 2001).

Estudo realizado em voluntários com a vitamina C tópica a 5%, comparada com placebo, por seis meses, demonstrou melhora clínica, histológica e ultraestrutural, e na derme, aumento da expressão do RNAm para colágenos I e III, das enzimas relacionadas à síntese de colágeno e dos inibidores teciduais da metaloproteinase (NUSGENS et al., 2001, HUMBERT et al., 2003).

Ariane Migliato Martinelli

Além da função antioxidante e do seu papel na formação do colágeno, outro benefício atribuído ao ácido ascórbico é a redução da produção de pigmentos melânicos, via inibição da enzima tirosinase. Esta enzima é a principal reguladora das reações de formação desses pigmentos (IOZUMI et al., 1993).

O chá verde, obtido da planta *Camellia sinensis*, e os seus derivados, comumente chamados de polifenóis, reduzem a penetração da radiação UVB, evitando os seus efeitos sobre as células. Além disso, tem propriedades antioxidante, antiinflamatória e anticarcinogênica demonstradas em estudos *in vitro* e em animais (VAYALIL et al., 2004). Em um estudo na pele humana, Lupo (2001) demonstrou que uma solução composta por frações do chá verde, em concentrações de 1% a 10%, preveniu o eritema induzido pela radiação UV e, no exame microscópico da pele, reduziu o número de células queimadas pelo sol e o dano às células de Langerhans.

Já os peptídeos usados como produtos tópicos antienvhecimento tem múltiplas aplicações. Gorouhi e Maibach (2009) os classificaram em quatro grupos diferentes, baseados em seus mecanismos de ação:

1. Peptídeos carreadores
2. Peptídeos sinais
3. Peptídeos enzimo – inibidores
4. Peptídeos neurotransmissores – inibidores.

Os peptídeos carreadores são cadeias curtas de aminoácidos com uma carga positiva, que atravessam a membrana da célula, permitindo assim, a administração transmembranar de moléculas bioativas. A aplicação mais comum tem sido a absorção de elementos, como o cobre pelas células, necessários para a

cicatrização da pele e processos enzimáticos, facilitada por peptídeos (GOROUHI e MAIBACH, 2009).

Os peptídeos sinais estimulam a produção da matriz extracelular e a síntese de colágeno e elastina. O palmitoil – KTTKS, um peptídeo sinal, bastante reportado na literatura, é um subfragmento do procolágeno tipo I, que aumenta a produção de colágenos tipo I e III por estimular os fibroblastos, e também estimula a produção de elastina e fibronectina (NASROLLAHI et al., 2012).

Outro tipo de peptídeo é o enzimo – inibidor. O tyr - tyr - arg -ala - asp - asp -ala inibe a proteinase procolágeno C, cuja função é clivar uma porção do procolágeno tipo I, reduzindo a destruição do procolágeno (NJIEHA et al., 1982).

Por fim, os peptídeos neurotransmissores inibidores, que agem como o Botox®, inibindo a liberação da acetilcolina na junção neuromuscular. Como consequência, paralisam os músculos, suavizam a pele e previnem rugas (GLOGAU et al., 2012).

Peptídeo KTTKS

O KTTKS, um pentapeptídeo (Lys-Thr-Thr-Lys-Ser), é um subfragmento de colágeno tipo I, e tem sido conhecido por estimular a síntese de matriz extracelular em fibroblastos subconfluentes (KATAYAMA et al., 1993).

O KTTKS (resíduos 212-216 de colágeno tipo I) é a sequência mínima necessária para estimular a produção de colágeno em 80% e de fibronectina numa variedade de células mesenquimais (KATAYAMA et al., 1993). Devido a este efeito de estimulação da síntese de colágeno, o KTTKS tem atraído grande atenção como um ativo cosmético para fornecer efeitos anti-rugas e anti-envelhecimento (TSAI et al., 2007, ABU SAMAH e HEARD, 2011).

Ariane Migliato Martinelli

Os peptídeos são geralmente conhecidos por serem fracamente transportados através das membranas biológicas. O transporte deficiente de peptídeos muitas vezes origina - se da falta de estabilidade devido à degradação enzimática ou química, bem como de sua hidrofilicidade (ALTENBACH et al., 2006). Na verdade, os peptídeos são rapidamente degradados pelo metabolismo enzimático na camada dérmica da pele (ALTENBACH, 2006, ABU SAMAH e HEARD, 2011). Endopeptidases, tais como várias desaminases e esterases, e exopeptidases, como as aminopeptidases, encontram-se no estrato córneo da epiderme e na derme.

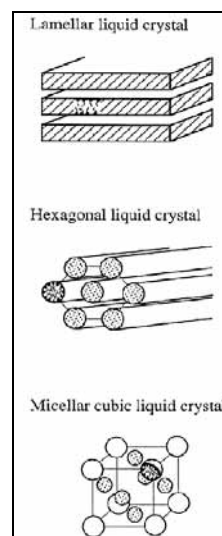
O KTTKS possui massa molecular elevada e é altamente hidrofílico, assim é provável que esta sequência não consiga permear através da pele. Além disso, o alvo do KTTKS é a derme, o que implica na superação das barreiras adicionais, como estrato córneo e o restante da epiderme (NAMJOSHI et al., 2008, ABU SAMAH e HEARD, 2011).

Uma estratégia para melhorar a liberação tópica é usar produtos químicos promotores de penetração co-administrados. Um estudo sugere o uso de ácidos graxos como potencializadores de penetração através de vários mecanismos possíveis: desorganizar a estrutura de lipídeos no estrato córneo para aumentar a “fluidez”; aumentar o particionamento de pele/veículo de um permeante; aumentar o transporte de solvente para dentro ou através da pele (AUNGST et al., 1990). Outro estudo adicionou um grupo lipofílico, o ácido palmítico (ácido graxo com 16 átomos de carbono) ao peptídeo KTTKS como uma tentativa de melhorar a sua liberação através da epiderme (ROBINSON et al., 2005).

Sistemas líquido cristalinos e liberação prolongada de substâncias biologicamente ativas

Os cristais líquidos são sistemas que se posicionam entre sólidos e líquidos, com parcial ordem/desordem das espécies atômicas, devido às suas características físicas; por isso, são chamados de mesofases (HYDE, 2001). Podem ser consideradas estruturas ordenadas, caracterizadas por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. Conforme se altera a concentração de seus componentes, diferentes formas líquido cristalinas são formadas, como as lamelares, as hexagonais e as cúbicas (Figura 3). Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos (HYDE, 2001).

Figura 3. Representação das principais fases líquido-cristalinas liotrópicas (SINGH, 2000).



Os sistemas líquidos liotrópicos existem em muitas partes do corpo humano, como cérebro, músculo, retina e muitas outras. A sua estrutura especial desempenha um importante papel nos movimentos vitais (ZHENG et al., 2011).

Ariane Migliato Martinelli

A fase lamelar é formada por camadas paralelas e planares de bicamadas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede unidimensional. Na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bidimensionais. Nos sistemas de fase cúbica, as moléculas estão arranjadas numa estrutura tridimensional, a qual consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidos por bicamadas lipídicas ou de tensoativo (URBAN, 2004, FORMARIZ et al., 2005).

Os sistemas líquido cristalinos possuem microestruturas altamente organizadas e alta viscosidade, por este motivo, vários autores relatam que estes apresentam baixas velocidades de liberação de fármacos (MULLER et al., 1994).

Para entender a formação destas estruturas, deve-se levar em consideração a composição do sistema, presença de sais, óleos e co-tensoativos, temperatura e estrutura do tensoativo. Para formação de lamelas, os tensoativos normalmente têm a forma cilíndrica, e para formação da fase hexagonal e micelar, ele ocupa a área de um cone (SINGH, 2000).

Uma propriedade de grande importância dos cristais líquidos é promover o aumento da retenção de água no estrato córneo, gerando um aumento na hidratação cutânea. Os cristais líquidos podem fisiologicamente integrar-se à barreira lipídica da pele, ajudando a reforçar a sua integridade, evitando a perda de água e reduzindo os danos de fatores ambientais (IWAI, 1998).

O comportamento líquido cristalino pode ser estudado pela microscopia de luz polarizada. Este método é o mais adequado para a identificação primária de mesomorfismo e as texturas observadas podem ser comparadas a texturas tabuladas. A fase cúbica é identificada como um campo preto, a fase hexagonal como estrias e a fase lamelar como cruzeiros de malta (VICENTINI et al., 2008).

Ariane Migliato Martinelli

A metodologia que melhor caracteriza os cristais líquidos é o SAXS. A posição relativa dos picos de SAXS no vetor de espalhamento (q) é usada para determinar a estrutura da fase cristalina (WANG e ZHOU, 2009).

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo sintetizar um análogo do peptídeo KTTKS, denominado de Ac-WAhx-KTTKS, e incorporá-lo, em diferentes concentrações, em sistemas líquido cristalinos lamelares de diferentes diagramas de fases, afim de comparar se a concentração de água e de Ac-Wahx-KTTKS, bem como a mudança de tensoativo nas formulações influenciam na liberação e permeação do peptídeo na pele.

Para alcançar tais objetivos, as seguintes ações foram tomadas:

- Produção do Ac-WAhx-KTTKS;
- Avaliação da biossíntese de colágeno *in vitro* em HDFa;
- Preparo dos sistemas líquido cristalinos lamelares por meio do diagrama de fases ternário;
- Caracterização físico-química dos sistemas de interesse (determinação do pH, microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo e reologia),
- Determinação do perfil de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro* do Ac-WAhx-KTTKS, contido nos sistemas líquido cristalinos lamelares.

Justificativa

Com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas do peptídeo KTTKS para permitir sua penetração na pele, foram realizadas modificações na sequência peptídica KTTKS. Essas modificações consistem na adição de uma molécula de ácido aminocapróico, que é um derivado e análogo do aminoácido lisina (Figura 4), à sequência peptídica para conferir um grau de lipofilicidade ao peptídeo e favorecer a permeabilidade do mesmo através da pele. Além disso, foi adicionado à este peptídeo um resíduo de tripfano, que é um aminoácido aromático e apolar essencial para a nutrição humana, representado pela letra “W” na sequência peptídica e com sua extremidade amina acetilada (Figura 5). Este aminoácido foi acoplado para proporcionar fluorescência ao peptídeo e assim, quantificá-lo por meio de um método mais eficiente e sensível, a detecção por fluorescência. A reação de acetilação foi realizada para diminuir a polaridade do peptídeo (a carga positiva N-terminal é neutralizada), afim de ajudar na penetração do Ac-Wahx-KTTKS na pele.

Figura 4. Estrutura molecular do ácido aminocapróico (Wikipedia, 2013)

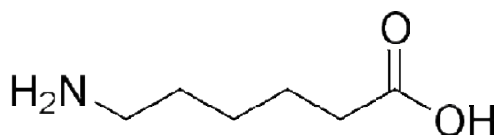
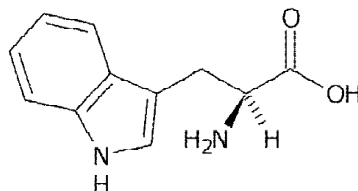
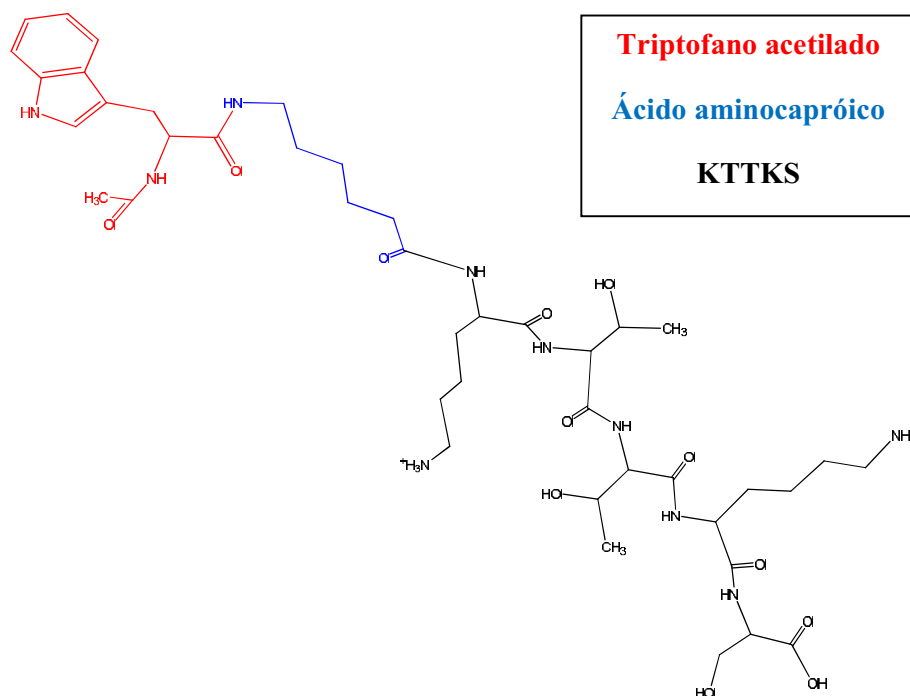


Figura 5. Estrutura molecular do Triptofano (Wikipedia, 2014)



A Figura 6 mostra a estrutura molecular do peptídeo análogo Ac-WAhx-KTTKS.

Figura 6. Estrutura molecular do peptídeo análogo Ac-WAhx-KTTKS (Pedido de patente BR10201400733).



Os peptídeos são macromoléculas suscetíveis à degradação por enzimas. Desta forma, sua meia vida torna-se curta. Por isso, a utilização de sistemas líquido cristalinos para a liberação prolongada do peptídeo Ac –Wahx-KTTKS torna-se importante, pois melhora a solubilidade, a estabilidade do ativo, protegendo-o da degradação de enzimas na pele, aumentando a sua disponibilidade e a meia vida e, prolongando sua ação (Pedido de patente BR10201400733).

Além disto, os sistemas líquidos cristalinos vêm recebendo considerável atenção devido ao seu excelente potencial como sistemas de liberação de diversos fármacos e biomoléculas. Além de aumentarem a solubilidade dos fármacos, funcionam como sistema reservatório o qual proporciona melhor atividade terapêutica e por tempo prolongado (Pedido de patente BR10201400733).

Ariane Migliato Martinelli

_____ *Material e Métodos*

Material e reagentes

Ácido Cítrico - Synth[®]

Ácido Oléico - Croda[®]

Colágeno humano tipo I – Sigma Aldrich[®]

Direct Red 80 – Sigma Aldrich[®]

Etanol - Qhemis[®]

Fibroblasto humano de derme linhagem adulta– Invitrogen[®]

Gentamicina – Gibco[®]

Hidróxido de Sódio – Qhemis[®]

Meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) – Gibco[®]

Membranas de celulose para tubos de diálise de 76 mm – Sigma Aldrich[®]

Oleth 10 - Croda[®]

Orelhas de Porco – Frigorífico Olhos D'água

PPG -5-Ceteth – 20 – Croda[®]

Soro fetal bovino (SFB) – Gibco[®]

Tampão fosfato pH 7,4 (solução receptora)

Tripsina 0,25% EDTA – Gibco[®]

Equipamentos

Balança Analítica – Merse[®]

Centrífuga – Fanem[®]

Estufa – Nova Ética[®]

Incubadora de CO₂ TE-399 Tecnal[®]

Lâmina e lamínula – Knittel Glaser[®]

Ariane Migliato Martinelli

Microette – Hanson Research[®]

Microscópio de luz polarizada Olympus BX41 com Câmara acoplada QColor3

Olympus America INC[®]

Pistilo e almofariz

Reômetro - Carri Med AR2000 EX[®]

Métodos

1 Obtenção dos sistemas líquidos cristalinos

Os sistemas líquido cristalinos foram preparados baseados nos diagramas de fases já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (RISSI et al., 2014) As formulações contêm PPG-5-Ceteth-20; Oleth 10; água e porcentagem fixa de ácido oléico. Os diagramas utilizados estão representados pelas Figuras 7 e 8.

Ariane Migliato Martinelli

Figura 7. Diagrama de fases (PPG - 5 - Ceteth - 20/ Ácido Oleico/ Água). (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SEVI) Sistema Emulsionado de Viscosidade Intermediária e (SF) Separação de Fases (RISSI et al., 2014).

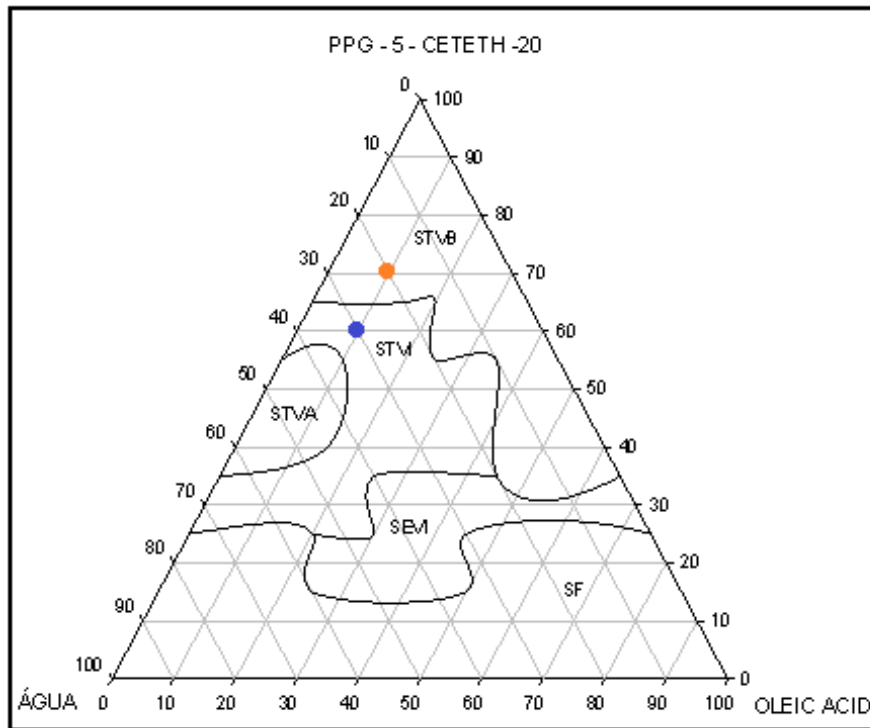
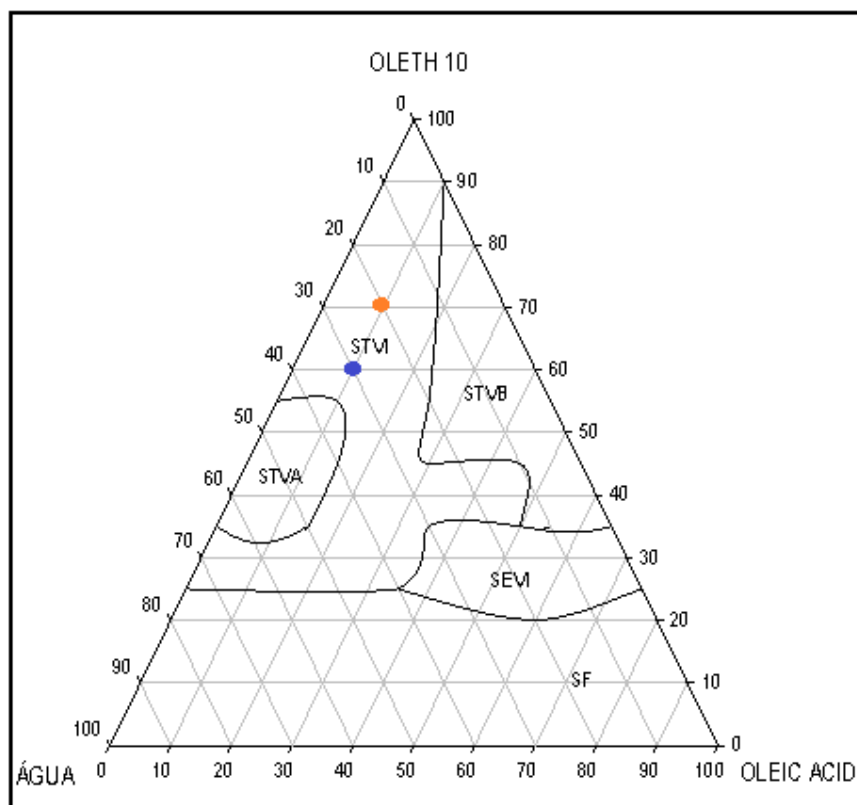


Figura 8. Diagrama de fases (Oleth 10/Ácido Oleico/Água). (STVB) Sistema Transparente de Viscosidade Baixa; (STVI) Sistema Transparente de Viscosidade Intermediária; (STVA) Sistema Transparente de Viscosidade Alta; (SEVI) Sistema Emulsionado de Viscosidade Intermediária e (SF) Separação de Fases (RISSI et al., 2014).



As Tabelas 1 e 2 apresentam as formulações escolhidas através dos diagramas e as respectivas porcentagens de cada componente.

Ariane Migliato Martinelli

Tabela 1. Formulações contendo PPG -5-Ceteth – 20 como tensoativo e as respectivas porcentagens de cada componente (RISSI et al., 2014).

	F1	F2
%PPG -5-Ceteth – 20	70	60
% Ácido Oleico	10	10
% Água	20	30

Tabela 2. Formulações contendo Oleth 10 como tensoativo e as respectivas porcentagens de cada componente (RISSI et al., 2014).

	F3	F4
%Oleth 10	70	60
% Ácido Oleico	10	10
% Água	20	30

Em todas as formulações F1, F2, F3 e F4, foram incorporadas duas concentrações diferentes do peptídeo Ac- Wahx- KTTKS, nomeadas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Concentração do peptídeo presentes nas formulações (Fonte: AUTORA).

Concentração de Ac-Wahx-KTTKS	
A	300 µM/L
B	400 µM/L

Essas concentrações de peptídeo incorporadas nos sistemas foram escolhidas de acordo com o ensaio de citotoxicidade e da biossíntese de colágeno realizadas em um estudo anterior (Pedido de patente BR10201400733).

As formulações foram preparadas a frio, misturando-se primeiramente o tensoativo com a fase oleosa e, por último, a fase aquosa.

2 Síntese do peptídeo

O peptídeo foi obtido manualmente pelo método da SPFS (Síntese Peptídica em Fase Sólida) (FIELDS e NOBLE, 1990). A síntese de peptídeos em fase sólida consiste em utilizar uma matriz polimérica inerte e insolúvel (resina) para o crescimento da cadeia peptídica. Esta síntese foi realizada adicionando-se um aminoácido de cada vez por meio de um processo cíclico.

O peptídeo Ac-WAhx-KTTKS, foi sintetizado utilizando a estratégia Fmoc para a proteção do grupo α -amino, e a resina Fmoc-Ser(tBu)-Wang, com um grau de substituição de 0,64 mmol/g. A escala de síntese foi de 0,2 mmol (quantidade de grupos funcionais iniciais) (Pedido de patente BR10201400733).

O protocolo de síntese consistiu de passos cíclicos de desproteção e acoplamento, intercalados por lavagens para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos. Na etapa de acoplamento foram utilizados os ativadores N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/ N-hidroxibenzotriazol (HOBt) para ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido acoplante durante duas horas de agitação utilizando como solvente 50% de dimetilformamida (DMF) em diclorometano (DCM).

Os Fmoc-aminoácidos e os ativadores foram utilizados com um excesso de duas vezes em relação à quantidade de sítios ativos livres iniciais na resina. Este valor foi calculado utilizando-se a escala de síntese de 0,2 mmol.

Ariane Migliato Martinelli

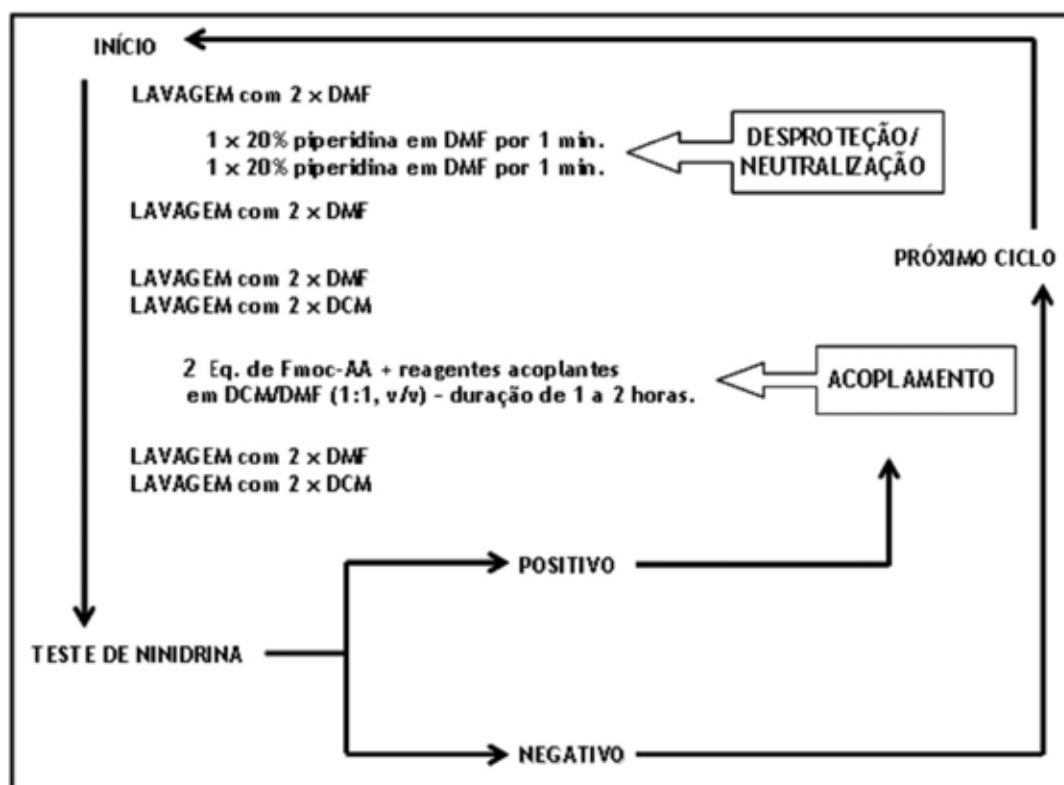
A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada por meio da reação com uma solução de piperidina 20% em DMF durante 1 e 20 minutos. Entre cada passo de reação foram efetuadas lavagens com os solventes orgânicos, DCM e DMF para solvatação da resina e eliminação do excesso de reagentes.

Depois de cada acoplamento e desproteção foi realizado o teste de ninidrina, reagente que reage com os grupos aminos livres originando um composto de cor azulada em altas temperaturas. Por outro lado, na etapa de desproteção, retirada do grupo Fmoc, o resultado positivo era obtido, indicando a presença de grupos amino livres. Ao contrário, na etapa de acoplamento do aminoácido, uma solução de cor amarela (resultado negativo), era a encontrada, mostrando que todos os grupos amino tinham reagido. Ao final da síntese o triptofano foi acetilado com anidrido acético por 30 minutos, sob agitação.

A Figura 9 mostra esquematicamente o protocolo de síntese utilizado na obtenção do peptídeo.

Ariane Migliato Martinelli

Figura 9. Protocolo geral de síntese (Fonte: Pedido de patente BR10201400733).



Após o término da síntese, o peptídeo foi submetido a uma etapa de clivagem, a fim de retirar o peptídeo da resina e os grupos protetores das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Esta etapa foi realizada com uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA) (85%)/ tioanisol (5%)/ fenol (5%)/ água (5%)/ EDT (etanoditiol) (2,5%) e TIS (tri-isopropilsilano) (1%) na proporção de 1 g de resina para cada 10mL de solução, em frasco de acetilação, a temperatura ambiente sob agitação constante por 2 horas. Ao fim, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado e centrifugado, para separá-lo dos subprodutos da clivagem. Para completa eliminação dos subprodutos esta etapa foi repetida três vezes. Posteriormente, o peptídeo foi extraído da resina com uma solução aquosa contendo 0,045% de TFA. O sobrenadante contendo o peptídeo foi liofilizado e identificado como peptídeo bruto. Uma alíquota do peptídeo bruto foi

Ariane Migliato Martinelli

analisada por CLAE analítico em um cromatógrafo Shimadzu, com coluna C₁₈ KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm, para obtenção do perfil cromatográfico do mesmo.

2.1 Purificação do peptídeo

A purificação do peptídeo bruto foi realizada por CLAE semipreparativa utilizando um cromatógrafo Beckman, com coluna C₁₈ PHENOMENEX de dimensão 2,1 x 25 cm. Durante a purificação foram recolhidos tubos de 3 mL e o grau de pureza foi determinado por CLAE analítico. Os tubos puros foram juntados e liofilizados obtendo-se as frações puras. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições cromatográficas empregadas na purificação do peptídeo sintetizado (Fonte: AUTORA).

Modo	Semi-preparativo	Analítico
Solventes	A: 0,045% TFA em H ₂ O	A: 0,045% TFA em H ₂ O
	B: 0,036% TFA em ACN	B: 0,036% TFA em ACN
Gradiente	5-35% de solvente B em 90 min	5-95% de solvente B em 30 min
Fluxo	5 mL/min	1 mL/min
Comprimento de onda	220 nm	220 nm

a. Caracterização por Espectrometria de Massas

O espectro de massas do peptídeo puro foi obtido em um espectrômetro de massas LCQ FLEET Thermo Scientific, com injeção direta, em modo de detecção

Ariane Migliato Martinelli

positiva.

A técnica baseia-se em uma câmara injetora que ioniza positivamente a amostra por um método chamado *eletrospray*, um quadrupolo simples e um detector, todos dentro de um sistema a vácuo.

O espectro de massas obtido mostra a razão MM/z , e permite calcular as massas moleculares obtidas experimentalmente por meio da equação 1:

$$MM_{pept} = (MM_z + z \cdot MM_{H^+})/z \quad \text{Equação 1}$$

Onde: MM_{pept} é a massa molecular do peptídeo analisado

MM_z é a massa molecular quando o peptídeo está com carga z

z é a quantidade de cargas que contém o peptídeo

MM_{H^+} é a massa molecular do hidrogênio protonado, de valor 1,008 g/mol.

3 Biossíntese de Colágeno

O ensaio de biossíntese de colágeno *in vitro* do peptídeo em fibroblastos foi realizado através do método Picrosirius-polarização, que tem como princípio as moléculas de colágeno, ricas em aminoácidos básicos, reagirem com o corante aniônico Picrosirius red. Sendo assim, através da quantificação do precipitado vermelho pela espectroscopia de absorção UV-Visível (leitor de ELISA) é possível quantificar a concentração de colágeno formado (BORGES et al., 2007, COLEMAN, 2011, FAUCZ, 2011).

Ariane Migliato Martinelli

Primeiramente foi preparada uma curva analítica com várias concentrações de colágeno padrão tipo I humano para comparação com o colágeno produzido pelos fibroblastos no ensaio. Adicionou-se 200 µL da solução de corante vermelho Sirius e 100 µL de solução de colágeno tipo I em cada poço. Agitou-se a placa em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, aspirou-se a solução a vácuo, e o precipitado foi lavado 3 vezes com 200 µL de ácido acético 0,05M. Ressuspendeu-se o precipitado com 200 µL de NaOH por 30 minutos sob agitação. Fez-se a leitura da absorbância da placa no comprimento de onda de 535 nm.

O ensaio foi realizado em linhagem celular primária de fibroblastos de derme humano, que possuem a capacidade de sintetizar fibras colágenas. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e antibiótico (gentamicina). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. As células com confluência de 90% foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos, neutralizada a tripsina com DMEM com soro e, então, semeadas em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 24 horas para a completa adesão das células às placas. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL de controle negativo (DMEM sem soro) e diferentes concentrações do peptídeo (diluídos em DMEM sem soro), durante 24 horas.

Após o tratamento, o material foi fixado com 200 µL de solução de Bouin durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes com água destilada e secas em temperatura ambiente por 2 horas, em seguida foi adicionado em cada poço 200 µL do corante vermelho Sirius (0,1% em solução aquosa de ácido prícrico saturada). A microplaca contendo as células foi submetida à agitação lenta por 1 hora, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, até a observação da presença do precipitado vermelho das fibras colágenas. Em seguida, o sobrenadante foi

Ariane Migliato Martinelli

removido por aspiração à vácuo e os poços foram lavados com 200 µL de ácido clorídrico 0,01 M para remoção do excesso de corante e, posteriormente, foi adicionado 150 µL de hidróxido de sódio 0,01 M em cada poço, deixado por 1 hora sob agitação, para solubilização das fibras colágenas e assim, feita a leitura espectrofotométrica da absorbância no leitor de placas (iMark Microplate Absorbance Reader, modelo 168-1135, Bio-Rad, USA), em comprimento de onda de 540 nm. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e as concentrações foram testadas em triplicatas.

A porcentagem de colágeno produzido foi calculada usando a equação da reta da curva analítica do colágeno padrão tipo I humano.

4 Caracterização físico-química dos sistemas líquidos cristalinos

As formulações selecionadas foram caracterizadas por determinação potenciométrica (pH), microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) e reologia. Foram analisadas formulações com e sem o peptídeo.

4.1 Determinação potenciométrica (pH)

As medidas potenciométricas (pH) foram determinadas nas formulações contendo e não contendo o peptídeo. As formulações foram diluídas em água ultra-purificada em concentração de 10% e, em seguida, foram realizadas as medidas, em triplicata e temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ariane Migliato Martinelli

4.2 Microscopia de luz polarizada (MLP)

As formulações foram analisadas pelo microscópio de luz polarizada (Leica Leitz DM RXE) com capturador de imagens (Moticam 2000), colocando-se uma pequena alíquota da amostra em uma lâmina, cobrindo-a com a lamínula. Foram utilizados lentes de aumento de 5, 10 e 20 vezes, dependendo da amostra.

4.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As estruturas líquido cristalinas foram avaliadas por medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (*small angle X-ray scattering* – SAXS). A coleta de dados foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncroton (LNLS – Campinas), na linha de luz Síncroton para SAXS, equipada com um monocromador ($\lambda = 1.608^{\text{ao}}$) Si (1 1 1) assimetricamente cortado e dobrado, que produz um feixe de luz focado horizontalmente. Um detector de raios-X em posição vertical e um analisador multicanal foram utilizados para capturar a intensidade das medidas de SAXS, $I(q)$, em função do módulo do vetor de espalhamento q , $q = (4\pi/\lambda) \sin(\varepsilon/2)$, sendo ε o ângulo de espalhamento. A dispersão dos raios produzida por fendas foi subtraída da intensidade de espalhamento total. Ambas as intensidades foram descritas em unidades relativas, mas, para uma comparação quantitativa, elas foram normalizadas para as mesmas condições experimentais.

4.4 Reologia

As formulações contendo e não contendo o peptídeo foram caracterizadas reologicamente através do ensaio de fluxo. Os ensaios foram realizados no reômetro

Ariane Migliato Martinelli

(Carri Med[®] AR2000 EX), utilizando o sensor do tipo placa (SST ST 40mm), com taxa de cisalhamento de 0 a 100 s⁻¹ (40 pontos) por um período de 120 segundos para curva ascendente e 120 segundos para curva descendente, na temperatura de 25 °C ±0,2 °C, em triplicata e os dados foram analisados pelo software Rheology Advantage Data Analysis.

5 Liberação do peptídeo, permeação e retenção cutânea *in vitro*

Após a biossíntese de colágeno *in vitro*, fez-se a incorporação do peptídeo nas formulações para realizar os ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea, de modo a avaliar o perfil de liberação da formulação, se há permeação para a corrente sanguínea e qual a concentração que ficaria retida na pele.

5.1 Avaliação da cinética de liberação *in vitro* do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações

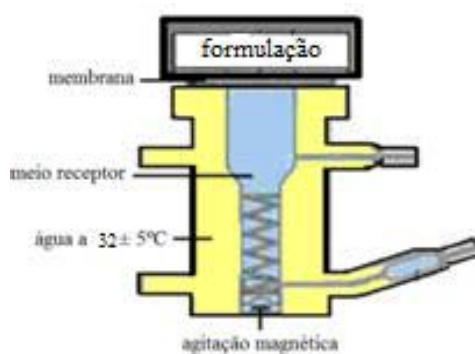
As formulações F1, F2, F3 e F4, contendo 300 µmol/L e 400 µmol/L do peptídeo, foram escolhidas para a avaliação do perfil de liberação *in vitro* do peptídeo. As formulações foram avaliadas visando comparar o perfil de liberação do Ac-WAhx-KTTKS nas formulações contendo concentrações diferentes do peptídeo, de água e tensoativos.

A avaliação da liberação do peptídeo foi efetuada de acordo com a metodologia descrita por (DEVELOPMENT, 2004, OECD, 2004, MARQUELE et al., 2006, BRASIL, 2003).

Ariane Migliato Martinelli

Os ensaios de liberação foram realizados utilizando célula de Franz modificada (Figura 10), do equipamento de permeação Microette (Hanson Research), em seis réplicas para cada formulação.

Figura 10. Célula de Franz modificada (CHIARI, 2011)



O ensaio foi realizado sob condições “*sink*”, utilizando-se um volume de solução receptora suficiente para que a concentração do peptídeo não ultrapassasse mais que 10 – 15% de sua solubilidade máxima e garantir assim que a velocidade de dissolução não seja diminuída por causa da aproximação com a concentração de saturação (DEVELOPMENT, 2004, OECD, 2004, MARQUELE et al., 2006, BRASIL, 2003).

O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi completado com 7,0 ml de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). A formulação foi colocada no anel dosador, sobre a membrana sintética de acetato de celulose 0,45 μm , com a massa média de 300 mg em uma área de exposição de 1,77 cm^2 . A solução receptora foi continuamente agitada a 300 rpm com a utilização da agitação magnética presente nas células de Franz, e mantida a $32 \pm 5^\circ\text{C}$ por meio de um banho-maria circulante nas células encamisadas. Amostras de 2 mL foram coletadas automaticamente nos tempos 1, 2, 4, 8 e 12 horas

Ariane Migliato Martinelli

para avaliar a liberação. Descartou-se um volume de 0,8 mL antes de cada coleta e o volume coletado foi repostado imediatamente com solução receptora. As amostras coletadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: programa Gradiente, 10 a 25% em 15 minutos; fase móvel: solvente A (0,045% de ácido trifluorocético em água) e solvente B (0,036% de ácido trifluorocético em acetonitrila); fluxo 1 mL/minuto; volume de injeção 50 µL; coluna C18 (Kromasil, 25 x 0,46 cm, 5 µm); temperatura do forno 35 °C; detector de fluorescência; comprimento de onda 280 nm.

Os cálculos que determinam a quantidade real liberada (Q real) seguem a Equação 2:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \text{ (UEDA et al., 2009)} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: Q real, t = quantidade real permeada referente ao tempo t;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t;

V_r = volume da solução receptora (7 mL);

C_c = concentração da amostragem anterior;

V_c = volume amostrado (coletado + limpeza).

Para compreender a cinética de liberação do peptídeo, três modelos matemáticos foram aplicados aos resultados obtidos: zero ordem, (Q_{real} em µg/cm² em função do tempo), primeira ordem (logaritmo da porcentagem de peptídeo em função do tempo) e Higuchi (Q_{real} em µg/cm² em função da raiz quadrada do tempo).

O modelo matemático de zero ordem pode ser usado para descrever a liberação modificada de fármacos de várias formas farmacêuticas, como sistemas transdérmicos,

Ariane Migliato Martinelli

formas revestidas, sistemas osmóticos, entre outros. As formas farmacêuticas que seguem essa cinética liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, o que é ideal para atingir ação farmacológica prolongada (COSTA e LOBO, 2000). A cinética de zero ordem indica que a taxa de liberação é independente do tempo, ou seja, neste caso pode ser atribuída ao comportamento dinâmico de inchaço da fase lamelar que prolonga a liberação do fármaco (FARKAS et al., 2000).

5.2 Avaliação da permeação cutânea *in vitro* do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações

Este ensaio foi desenvolvido da mesma maneira como descrito no ensaio de avaliação da cinética de liberação *in vitro* do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações, entretanto, foi utilizado membrana biológica. As amostras foram coletadas nos tempos 1, 2, 4, 8 e 12 horas. A membrana biológica escolhida foi pele dissecada da orelha de porco, sem o tecido subcutâneo presente abaixo da derme. Antes de iniciar o experimento as peles foram dermatomizadas para a obtenção de uma espessura da pele que equivale à epiderme e derme (500 µm) utilizando um dermatômetro (Nouvag TCM300). Para cada formulação foram utilizadas 6 células de difusão no estudo.

Ariane Migliato Martinelli

5.3 Avaliação da retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo

Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações

As peles utilizadas no estudo de permeação cutânea foram retiradas das células de difusão de Franz após o término do experimento. O excesso da formulação foi removido com o auxílio de papel absorvente, sendo mantidas em vidro de relógio.

A membrana foi primeiramente submetida à remoção do estrato córneo pela técnica de *tape stripping*. Dessa forma, 16 pedaços de fita adesiva (3M) foram colados e removidos da área de difusão da pele, sendo o primeiro pedaço de fita adesiva descartado. As fitas adesivas foram mergulhadas em 4 mL de acetonitrila/água (1:1) para a extração do ativo. Esta suspensão foi submetida à sonicação por 15 minutos e agitação em vórtex por 1 minuto. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e quantificado por CLAE.

Após a retirada do estrato córneo, as peles foram recortadas adequadamente em concordância com a área de exposição (1,77 cm²) e em contato com a formulação. Assim, foi verificada a retenção da epiderme/derme, picotando-se o restante da membrana com uma tesoura. Os fragmentos obtidos foram mergulhados em 4 mL de acetonitrila/água (1:1). A suspensão resultante foi levada ao homogeneizador tipo Turrax[®] por 1 minuto, em seguida à sonicação em ultrassom para o rompimento das células por 15 minutos e à centrifuga por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana de 0,45 µm e quantificado por CLAE.

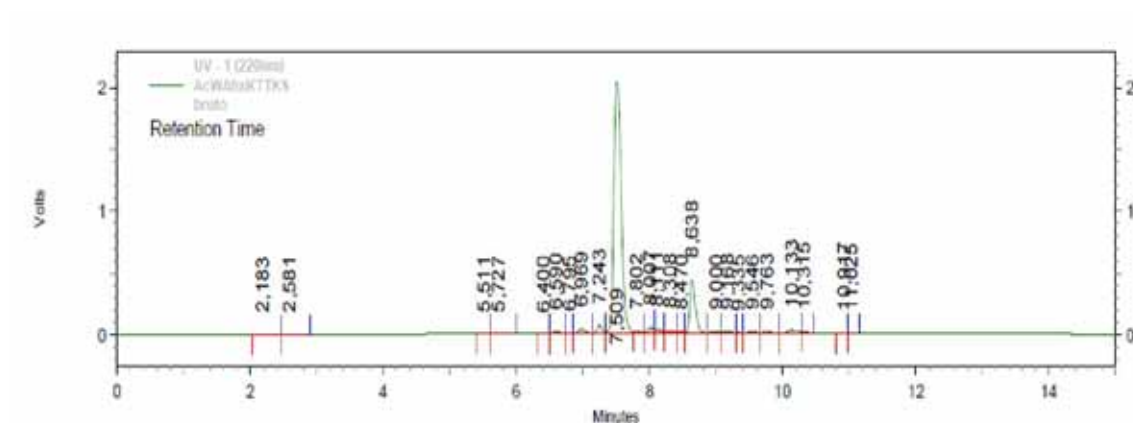
Ariane Migliato Martinelli

--- *Resultados e Discussão*

1 Síntese do peptídeo

A Figura 11 apresenta o perfil cromatográfico do peptídeo bruto, contendo impurezas referentes ao processo de síntese.

Figura 11. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto (Fonte: AUTORA).

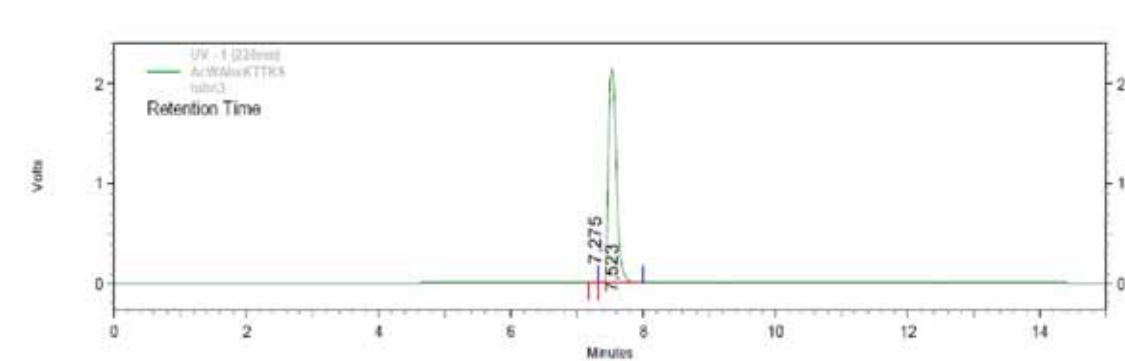


No perfil cromatográfico do peptídeo bruto, pode-se observar um pico maior e bem definido e vários picos pequenos. O pico maior representa o peptídeo de interesse e os picos pequenos representam as impurezas referentes ao processo de síntese.

A purificação do peptídeo foi realizada por CLAE semipreparativa. Durante a purificação foram recolhidos tubos contendo o peptídeo e o grau de pureza foi determinado por CLAE analítico. Os tubos puros foram juntados e liofilizados obtendo-se as frações puras.

O perfil cromatográfico do peptídeo puro (fração com maior grau de pureza) pode ser observado na Figura 12.

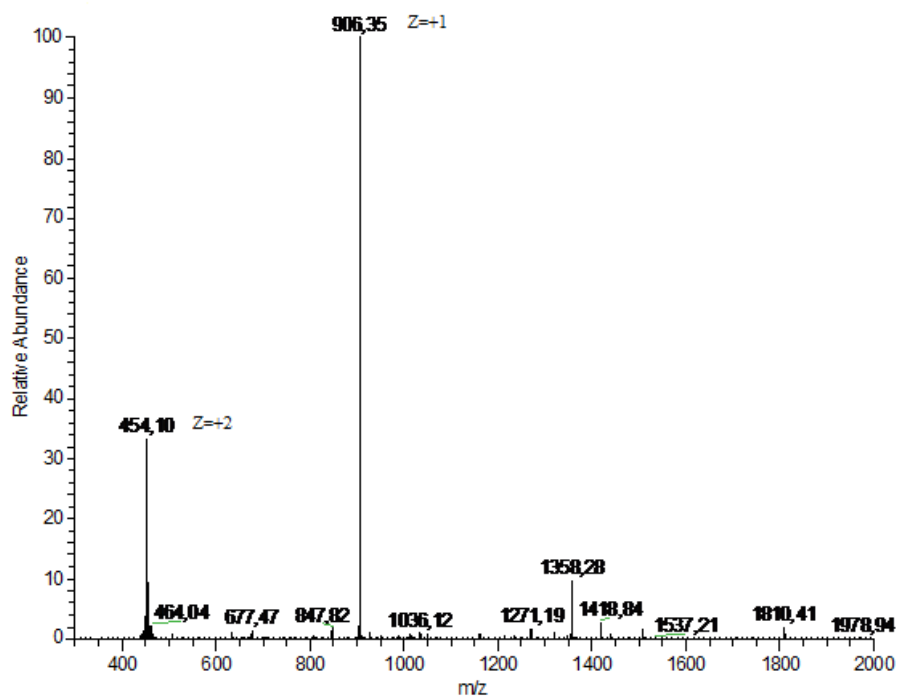
Figura 12. Perfil cromatográfico do peptídeo puro (Fonte: AUTORA).



No perfil cromatográfico do peptídeo puro, pode-se observar a presença de um único pico bem definido. O Ac-Wahx-KTTKS foi obtido com um grau de pureza maior que 99,9%.

O peptídeo foi analisado também por espectrometria de massas. O espectro obtido está apresentado na Figura 13

Figura 13. Espectro de massas do peptídeo puro (Fonte: AUTORA).



Ariane Migliato Martinelli

Para o cálculo das massas moleculares obtidas experimentalmente foi utilizada a equação 1, descrita nos métodos em Caracterização por Espectrometria de Massas. Onde:

$$MM_{pept} = (905 + 1 \cdot 1) / 1 = \mathbf{906 \text{ g/mol}} \text{ (pico 1)}$$

$$MM_{pept} = (905 + 2 \cdot 1) / 2 = \mathbf{454 \text{ g/mol}} \text{ (pico 2)}$$

A massa molecular do peptídeo observada no espectro é 906 para $z = 1$ (905 - massa molecular calculada + 1 próton H^+) e 454 para $z = 2$ (905 - massa molecular calculada + 2 prótons H^+). O valor teórico e o obtido no espectro de massas, a pureza do material e o tempo de retenção estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultado da síntese (Fonte: AUTORA).

Peptídeo	Pureza (%) ^a	Tempo de retenção (min)	Massa Molecular (MM) – (g/mol)	
			MM _{Observada}	MM _{Calculada}
Ac-WAhx-KTTKS	> 99,97	7,523	906	905

^a Pureza do material determinado por HPLC.

2 Caracterização físico-química dos sistemas líquido cristalinos

2.1 Determinação potenciométrica

A pele apresenta pH levemente ácido (5,5 – 6,5), que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície. Além disso, as secreções cutâneas apresentam capacidade tamponante, importante, pois o pH da pele pode ser alterado em

Ariane Migliato Martinelli

consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, expondo a pele a uma série de agente agressores. A Tabela 6 apresenta os valores do pH das formulações contendo e não contendo o peptídeo:

Tabela 6. pH das Formulações (Fonte: AUTORA).

	Média	DP**	CV***
pH*			
F1	6,52	0,029	0,802
F1A	5,57	0,057	0,531
F1B	5,55	0,045	0,842
F2	5,53	0,044	0,796
F2A	5,51	0,028	0,582
F2B	5,59	0,046	0,675
F3	6,56	0,052	0,748
F3A	6,05	0,043	0,418
F3B	6,08	0,048	0,723
F4	6,52	0,056	0,747
F4A	6,04	0,034	0,930
F4B	6,06	0,029	0,474

*Média de três amostras

**Desvio padrão.

***Coeficiente de variação

Observou-se que as formulações apresentaram pH dentro do pH encontrado na pele, numa faixa de 5,5 a 6,5, e quando o peptídeo foi incorporado não houve variação do pH das formulações.

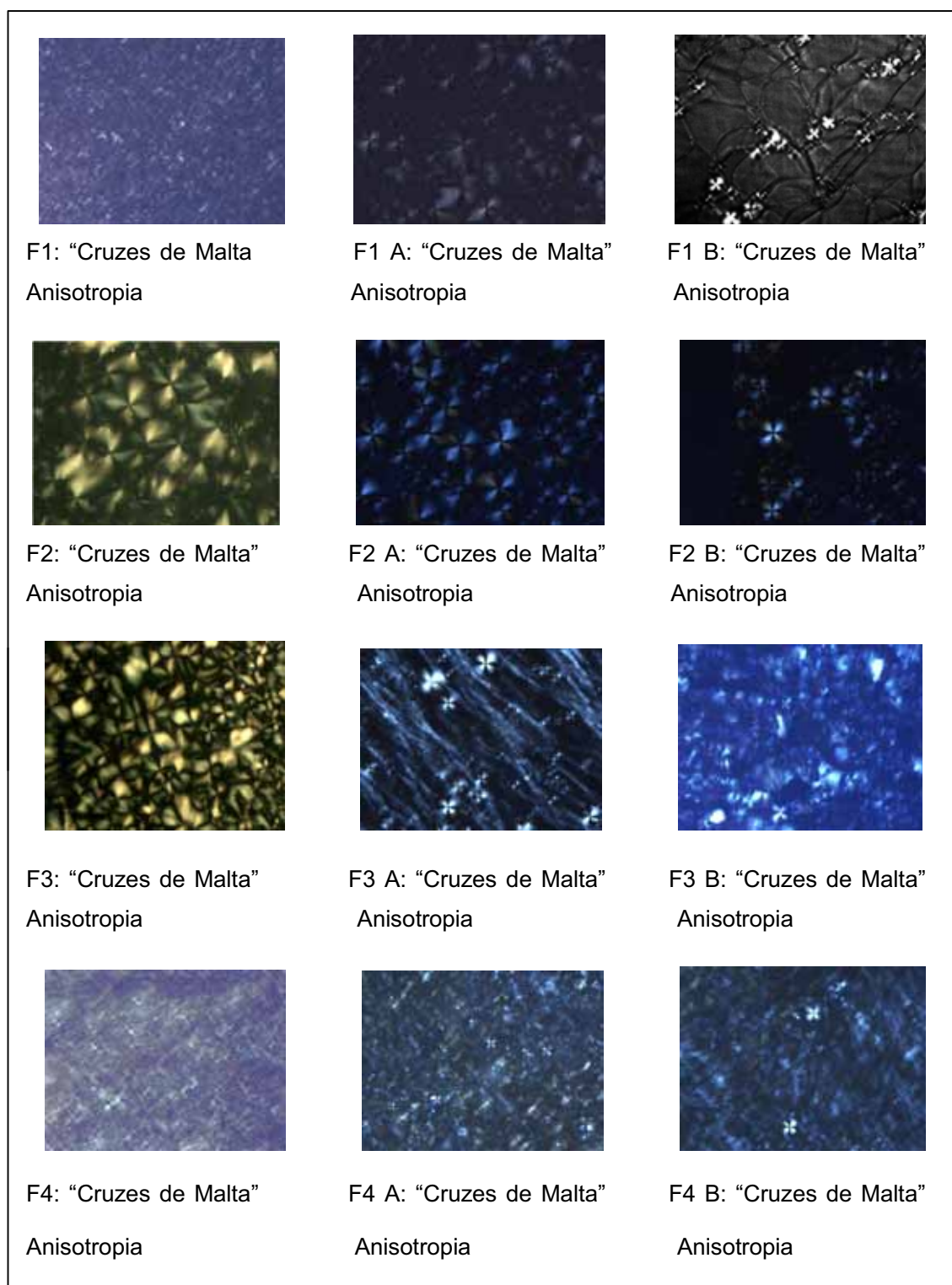
Ariane Migliato Martinelli

2.2 Microscopia de luz polarizada (MLP)

A MLP é um método importante na determinação estrutural de sistemas líquido cristalinos, mas não é considerada uma técnica conclusiva. Por isso, foi utilizada a técnica de espalhamento de raios – X a baixo ângulo (SAXS) para complementar esse estudo de caracterização.

A Figura 14 apresenta as fotomicrografias das formulações contendo e não contendo o peptídeo. Todas elas apresentaram áreas anisotrópicas, evidenciando a presença de estruturas semelhantes a “cruzes de malta”, características da fase lamelar.

Figura 14. Fotomicrografias das formulações contendo e não contendo o peptídeo
(Fonte: AUTORA).



Sob um plano de luz polarizada, um material pode ser considerado anisotrópico ou isotrópico. A amostra é anisotrópica quando é capaz de desviar o plano de luz incidente, como é o caso das fases hexagonal e lamelar, ou isotrópica, quando não desvia a luz, como é o caso da fase cúbica (MULLER-GOYMANN, 2004).

A fase lamelar, ao se formar, assume um estado intumescido pelo fato da água ser adsorvida entre as camadas de tensoativo, formando o domínio hidrofílico do sistema líquido cristalino. A água situada entre as lamelas possui características de água ligada, devido às fortes interações entre suas moléculas e os grupos polares dos tensoativos, isto não permite a perda por evaporação, necessitando de maior energia que a disponível à temperatura da superfície cutânea para evaporar (ANDRADE et al., 2007, CHORILLI et al., 2009).

2.3 Espalhamento de Raios – X a Baixo Ângulo (SAXS)

As curvas de SAXS para sistemas líquido cristalinos exibem picos, e a posição relativa dos picos no vetor de espalhamento (q) é o que determina o tipo de arranjo que os átomos formam na matriz. (WANG e ZHOU, 2009, CHORILLI et al., 2011). Para calcular a correlação da distância entre os objetos espalhadores usa-se a seguinte equação:

$$d = 2\pi/q_{\max}$$

Onde: d é a distância de correlação entre os objetos espalhadores e

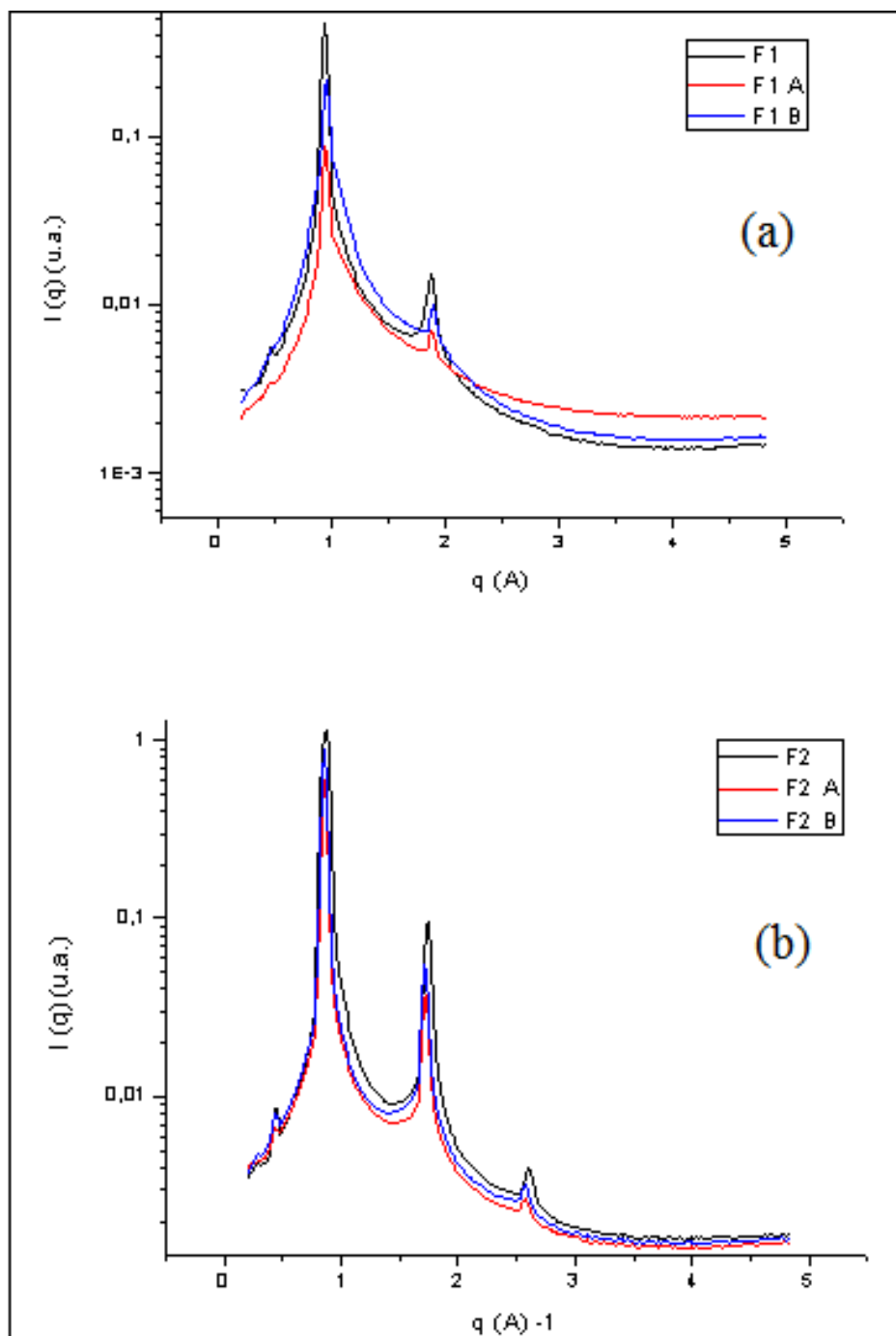
$q_{\max}$ é o vetor de espalhamento de maior intensidade

A distância d calculada para cada pico deve seguir a relação 1:2:3:4:5 para a fase lamelar (NEGRINI e MEZZENGA, 2011).

Ariane Migliato Martinelli

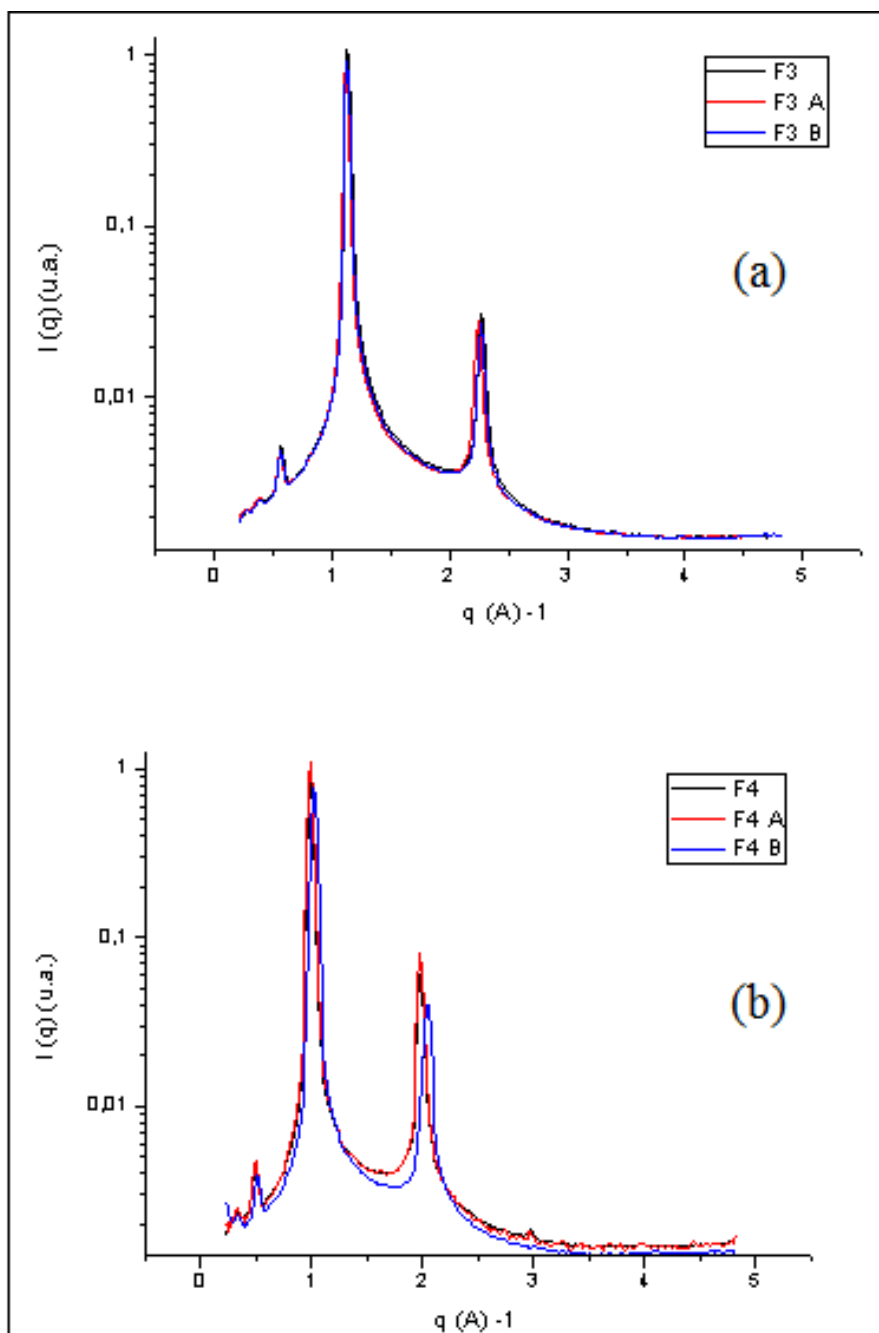
A Figura 15 apresenta as curvas de SAXS para as amostras F1 (a) e F2 (b) contendo e não contendo o peptídeo.

Figura 15. Curvas de SAXS das formulações F1 (a) e F2 (b) contendo e não contendo o peptídeo (Fonte: AUTORA).



A Figura 16 apresenta as curvas de SAXS para as amostras F3 (a) e F4 (b) contendo e não contendo o peptídeo.

Figura 16. Curvas de SAXS das formulações F3 (a) e F4 (b) contendo e não contendo o peptídeo (Fonte: AUTORA).



Nota-se a presença de picos estreitos e definidos para todas as formulações com e sem o peptídeo, indicando um elevado nível de organização estrutural destes sistemas.

Nas formulações F1, F1A e F1B (Figura 15 (a)) observou-se a presença de dois picos, cuja distância de correlação (d) é 1:2, característico da fase lamelar.

Nas formulações F2, F2A e F2B (Figura 15 (b)) observou-se a presença de três picos cuja distância de correlação (d) é 1:2:3, característico da fase lamelar.

Nas formulações F3, F3A e F3B (Figura 16 (a)) assim como nas formulações F4, F4 A e F4 B (Figura 16 (b)), observou-se a presença de dois picos, cuja distância de correlação (d) é 1:2, característico da fase lamelar.

As distâncias de correlação calculadas através do SAXS confirmaram a estruturação observada nas fotomicrografias da MLP e para as formulações com o peptídeo incorporado observa-se que todas apresentaram praticamente sobreposição das curvas, assim sugerindo que a incorporação do peptídeo não alterou a estrutura do sistema.

2.4 Reologia

A caracterização reológica dos sistemas teve como objetivo avaliar as características estruturais das formulações, determinando se a formulação tem comportamento Newtoniano ou não– Newtoniano, se o fluido é plástico, pseudoplástico ou dilatante, se apresenta tixotropia e se possui comportamento viscoelástico.

Na Figura 17 estão apresentadas as curvas de fluxo das formulações F1, F2, F3 e F4.

Nas Figuras 18 e 19 estão apresentadas as curvas de fluxo das formulações F1A, F1B, F2A, F2B e F3A, F3B, F4, F4A e F4B, respectivamente.

Ariane Migliato Martinelli

Figura 17. Curvas de fluxo das formulações não contendo o peptídeo (Fonte: AUTORA).

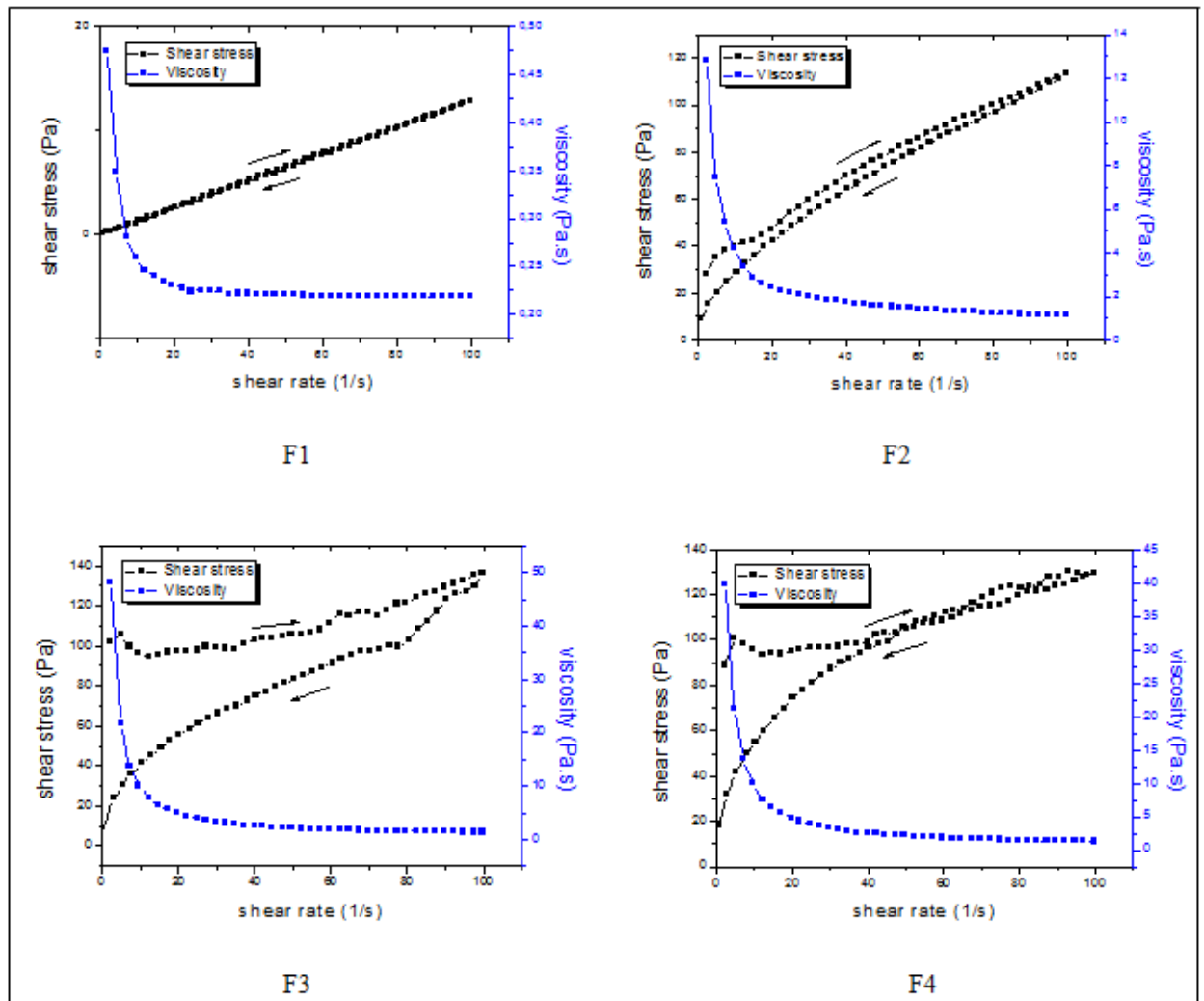


Figura 18. Curvas de fluxo das formulações F1 e F2 contendo o peptídeo

(Fonte: AUTORA).

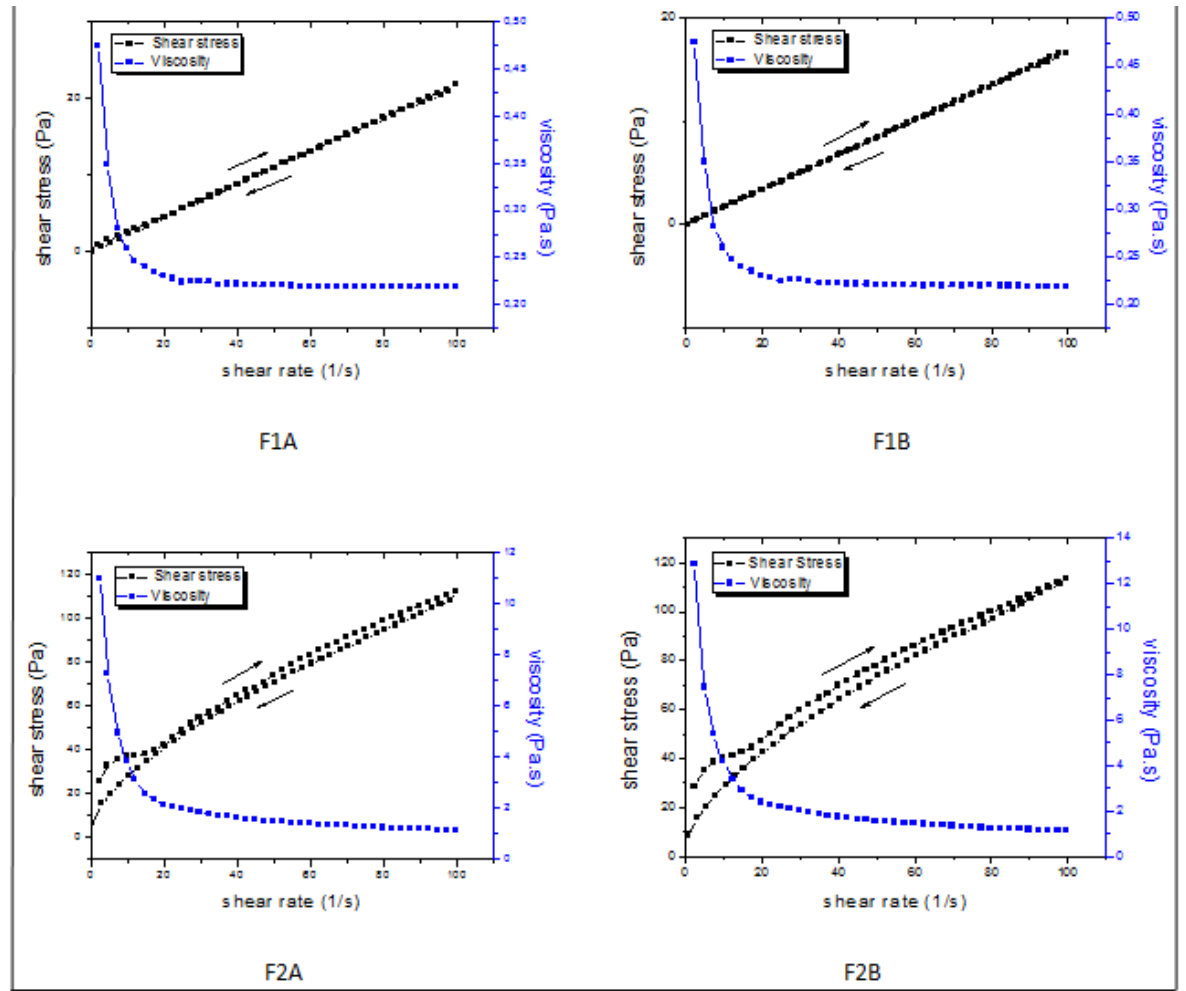
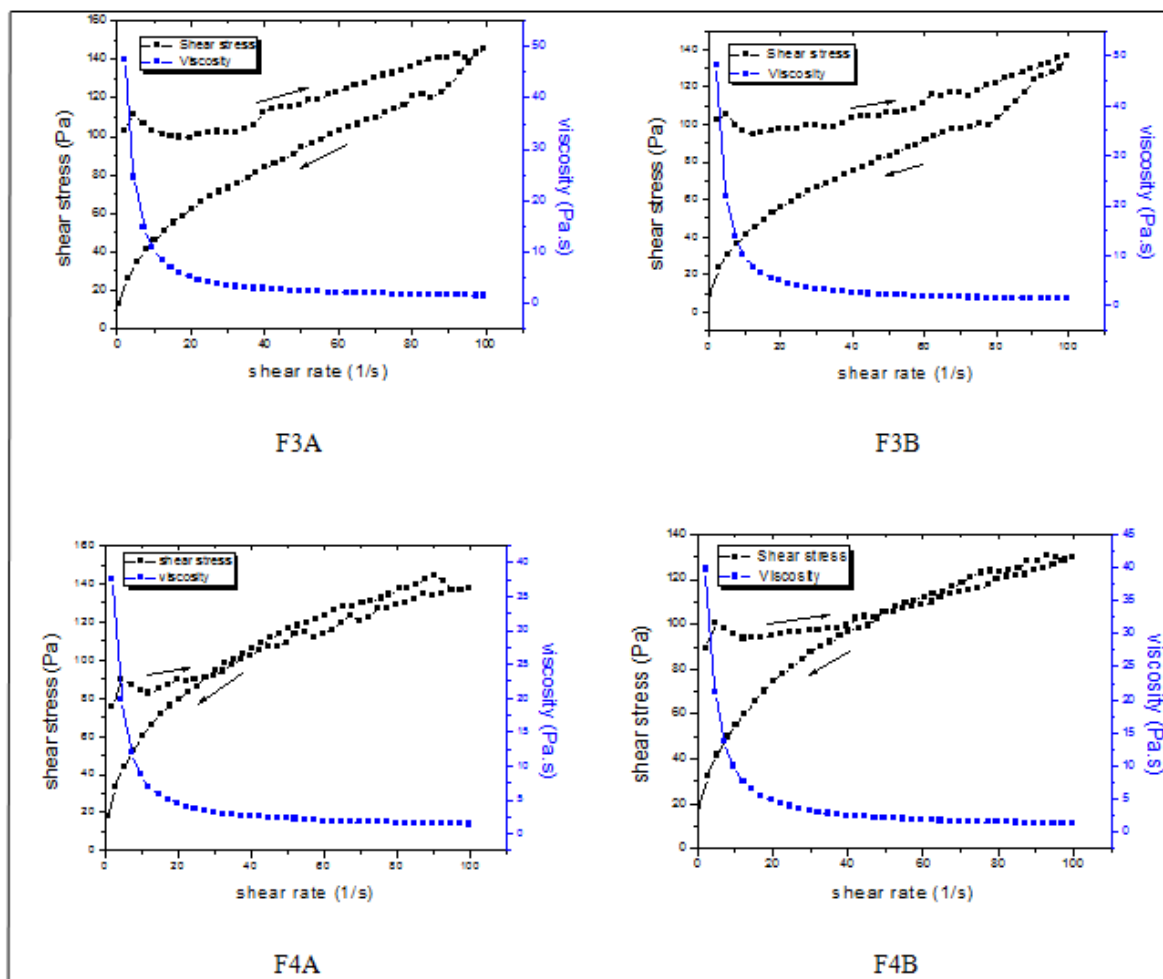


Figura 19. Curvas de fluxo das formulações F3 e F4 contendo o peptídeo

(Fonte: AUTORA).



Os reogramas apresentados nas Figuras 17, 18 e 19 demonstram que não existe relação linear entre os valores de tensões de cisalhamento e das taxas de cisalhamento, explicando o comportamento não-Newtoniano das formulações.

As formulações apresentam perfil característico de um fluido pseudoplástico, em que as partículas escoam na direção do fluxo diminuindo sua resistência interna e a viscosidade, em função da taxa de cisalhamento.

Ariane Migliato Martinelli

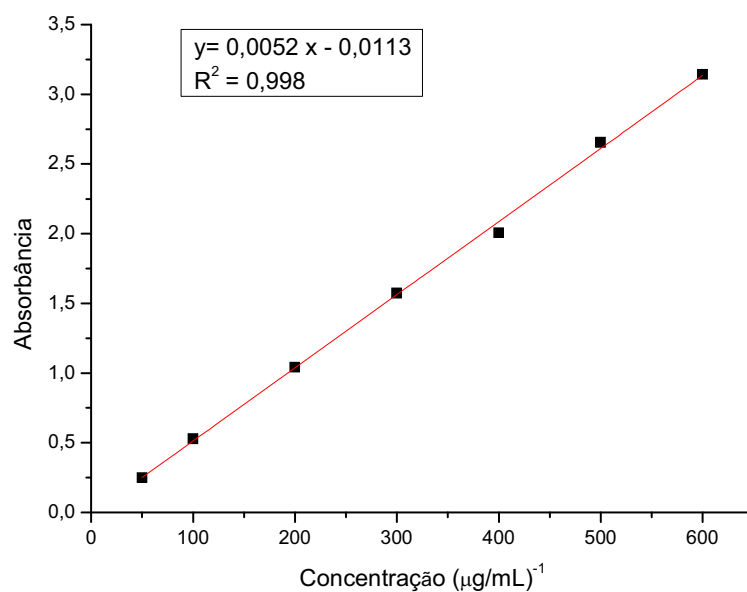
As formulações F2 (F2, F2A e F2B), F3 (F3, F3A e F3B) e F4 (F4, F4A e F4B) apresentam tixotropia, ou seja, grande habilidade de voltar à viscosidade inicial após a perturbação dos sistemas, devido à área de histerese entre a curva ascendente e descendente, o que é desejável para formulações tópicas.

A formulação F1 (F1, F1A e F1B) não apresentou área de histerese, o que demonstra ausência de tixotropia. Isso pode ser explicado pela presença do PPG -5-Ceteth – 20, um tensoativo não iônico solúvel em água.

3 Biossíntese de colágeno

Os resultados da quantificação da biossíntese de colágeno produzido nas culturas de HDFa foram obtidos na forma de densidade óptica (D.O.) e a quantidade total de colágeno foi calculada a partir da equação da reta obtida de concentrações conhecidas e padronizadas de colágeno tipo I humano (Sigma[®]), apresentada na Figura 20.

Figura 20. Curva analítica padrão do colágeno tipo I humano, equação da reta (y) e coeficiente de correlação (R^2) (Fonte: AUTORA).



Na Tabela 7 estão listadas as concentrações totais de colágeno produzido pelos fibroblastos após o tratamento com as diferentes concentrações de peptídeo e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 24 de tratamento.

Tabela 7. Concentrações totais de colágeno produzido após 24 horas de tratamento (Fonte: AUTORA).

Tratamentos	Colágeno ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença controle ($\mu\text{g/mL}$) ¹	Colágeno (%) ²
Controle	19,54 $\pm$ 4,1	----	----
10 $\mu\text{mol/L}$	29,7 $\pm$ 3,1	10,16	52
30 $\mu\text{mol/L}$	30,87 $\pm$ 2,6	11,33	58
75 $\mu\text{mol/L}$	31,45 $\pm$ 2,8	11,91	61
150 $\mu\text{mol/L}$	32,43 $\pm$ 2,6	12,89	66
300 $\mu\text{mol/L}$	33,99 $\pm$ 3,3	14,45	74
400 $\mu\text{mol/L}$	35,17 $\pm$ 2,8	15,63	80

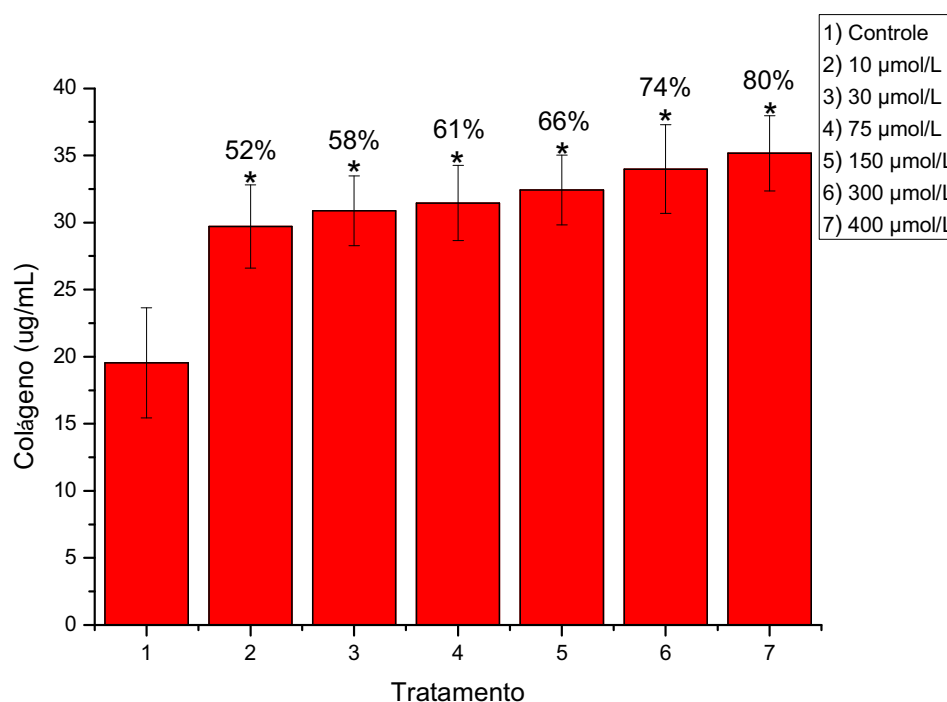
¹ Colágeno produzido com os tratamentos menos o colágeno produzido do grupo controle

² Porcentagem de colágeno produzido em relação ao grupo controle

Na Figura 21, estão apresentados os resultados obtidos após 24 horas. Foi construído um gráfico contendo a concentração de colágeno total produzido pelos HDFa dos grupos controle e tratados com várias concentrações do peptídeo após 24 horas de tratamento de cultura.

Após 24 horas foi possível observar alterações significativas ($p < 0,05$) na síntese de colágeno nos grupos controle e tratados com várias concentrações do peptídeo. Observa-se também que a porcentagem de colágeno produzido foi aumentando conforme aumentava-se a concentração de peptídeo nos tratamentos, atingindo um máximo de 80% com 400 $\mu\text{mol/L}$.

Figura 21. Representação da concentração de colágeno total produzido pelos HDFa dos grupos controle e tratados com peptídeo após 24 horas de cultura. Dados referem-se a média de três experimentos independentes (Média $\pm$ erro padrão). *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA $p < 0,05$ seguida do teste de Dunnett's) (Fonte: AUTORA).



Na Tabela 8 estão listadas as concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 48 de tratamento.

Tabela 8. Concentrações totais de colágeno produzido após 48 horas de tratamento (Fonte: AUTORA).

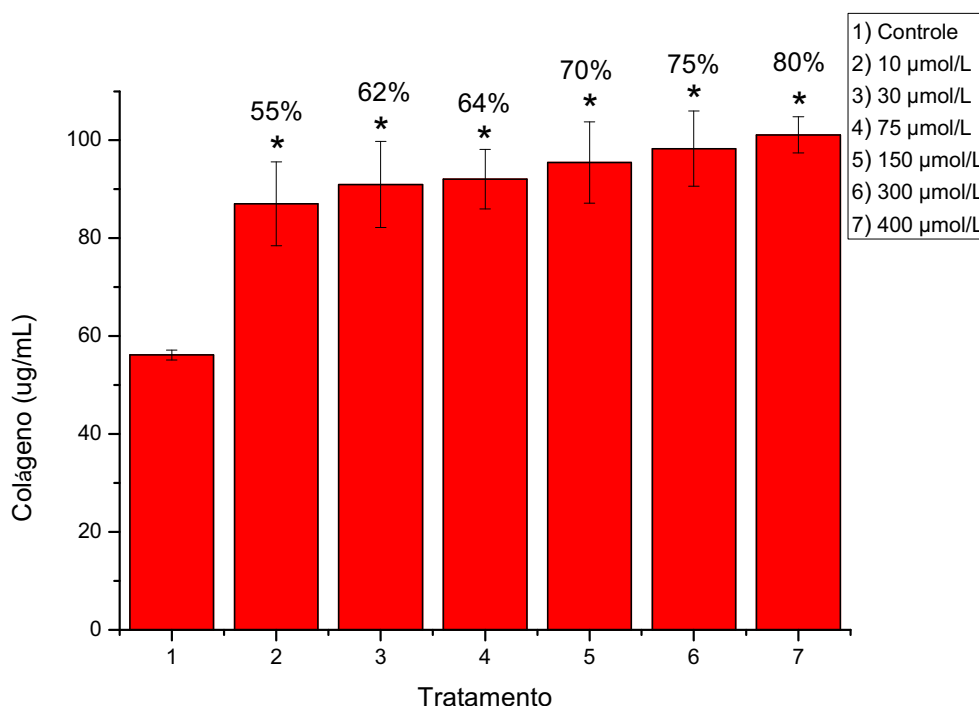
Tratamentos	Colágeno ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença controle ($\mu\text{g/mL}$) ¹	Colágeno (%) ²
Controle	56,15 $\pm$ 1,0	----	----
10 $\mu\text{mol/L}$	87,03 $\pm$ 8,6	30,88	55
30 $\mu\text{mol/L}$	90,96 $\pm$ 8,8	34,81	62
75 $\mu\text{mol/L}$	92,08 $\pm$ 6,1	35,93	64
150 $\mu\text{mol/L}$	95,45 $\pm$ 8,3	39,3	70
300 $\mu\text{mol/L}$	98,26 $\pm$ 7,7	42,11	75
400 $\mu\text{mol/L}$	101,07 $\pm$ 3,7	44,92	80

¹ Colágeno produzido com os tratamentos menos o colágeno produzido do grupo controle

² Porcentagem de colágeno produzido em relação ao grupo controle

Na Figura 22, estão apresentados os resultados obtidos após 48 horas. Foi construído um gráfico contendo a concentração de colágeno total produzido pelos HDFa dos grupos controle e tratados com várias concentrações do peptídeo após 48 horas de tratamento de cultura.

Figura 22. Representação da concentração de colágeno total produzido pelos HDFa dos grupos controle e tratados com peptídeo após 48 horas de cultura. Dados referem-se a média de três experimentos independentes (Média $\pm$ erro padrão). *Diferenças estatísticas (Teste de Variância de ANOVA $p < 0,05$ seguida do teste de unnett's) (Fonte: AUTORA).



Após 48 horas foi possível observar alterações significativas ($p < 0,05$) na síntese de colágeno nos grupos controle e tratados com várias concentrações do peptídeo. A porcentagem de colágeno produzido foi aumentando conforme aumentava-se a concentração de peptídeo nos tratamentos, sendo que a concentração de 400 $\mu\text{mol/L}$ produziu 80% a mais de colágeno em relação ao controle.

Foi observado um aumento na síntese de colágeno no ensaio de 48 horas para o grupo controle e tratado com o peptídeo em relação ao ensaio de 24 horas.

Ariane Migliato Martinelli

Um estudo realizado pelo pedido de patente BR10201400733, o qual avaliou o potencial citotóxico do peptídeo Ac- Wahx-KTTKS utilizando as linhagens celulares HepG2 e HaCat, concluiu que em concentrações menores que 600 $\mu\text{mol/L}$ (IC_{50}), o peptídeo oferece segurança para a aplicação tópica.

4 Liberação do peptídeo, permeação e retenção cutânea *in vitro*

Foram avaliadas quatro formulações (F1, F2, F3 e F4) contendo 300,00 $\mu\text{mol/L}$ e 400,00 $\mu\text{mol/L}$ do peptídeo. Tal procedimento foi adotado para que fosse possível avaliar se as formulações contendo diferentes tensoativos e concentrações de peptídeo e água têm influência no perfil de liberação, permeação e retenção cutânea.

As condições “*sink*” foram garantidas, uma vez que a solubilidade do peptídeo em solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) é de 4,564 mol/L.

4.1 Análise de interferentes

Foi injetada em CLAE, nas condições já validadas (Pedido de patente BR10201400733), a solução receptora e uma concentração conhecida do peptídeo, dissolvido em solução receptora para verificação da sua influência nos ensaios de liberação. Os resultados obtidos estão descritos nas Figuras 23 e 24.

Ariane Migliato Martinelli

Figura 23. Cromatograma da solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) (As condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 5.1 contido nos Materiais e Métodos) (Fonte: AUTORA).

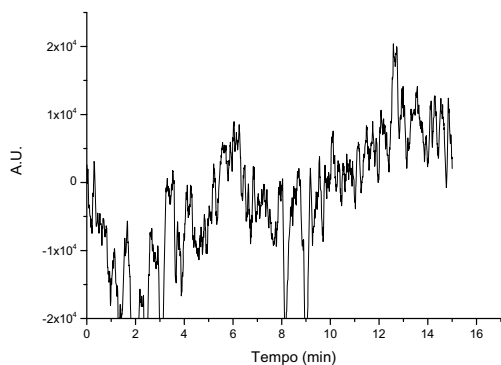
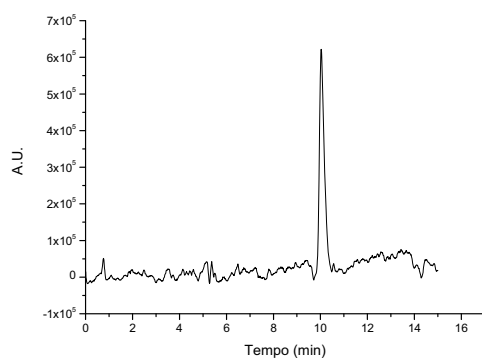


Figura 24. Cromatograma do peptídeo em solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) (As condições cromatográficas utilizadas estão descritas no item 5.1 contido nos Materiais e Métodos) (Fonte: AUTORA).



Verifica-se nas Figuras 23 e 24, que a solução receptora não influencia a análise, pois não foi observado pico no mesmo tempo de retenção do peptídeo.

Ariane Migliato Martinelli

4.2 Avaliação da cinética de liberação do peptídeo *in vitro*

O ensaio de liberação foi realizado para verificar se a formulação é capaz de liberar o peptídeo e verificar a quantidade liberada em um intervalo específico de tempo, de modo a caracterizar o sistema quanto ao seu modelo cinético de liberação.

A solução receptora foi coletada das células de Franz nos tempos determinados e, em seguida, quantificadas por CLAE. A partir dos resultados, a concentração de peptídeo foi calculada através da equação da reta obtida da curva analítica do peptídeo em solução receptora. Assim, as áreas obtidas foram aplicadas na equação 3:

$$y = 1,76718 \cdot 10^6 + 2,51339 \cdot 10^7 x$$

Equação 3

$$R^2 = 0,9942$$

Através destes valores, foram elaboradas as tabelas de 9 - 16, para cada formulação. O coeficiente de variação (CV) foi calculado através da equação 4.

$$CV = \frac{DP}{M} \times 100$$

Equação 4

Onde: *DP* é o desvio padrão

M é a média das seis replicatas

Observa-se que o CV do teste de liberação está dentro dos limites das especificações, ou seja, menores que 10%. É importante ressaltar que a % liberada em cada tempo foi parecida para as formulações com diferentes concentrações de peptídeo, demonstrando a capacidade do sistema em prolongar a liberação do Ac-Wahx-KTTKS independentemente da sua concentração.

Ariane Migliato Martinelli

Tabela 9. Liberação do peptídeo da formulação F1A (Fonte: AUTORA).

Tempo (h)	Média Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
1	19,34	1,14	3,09
2	20,46	2,39	3,44
4	77,17	4,55	2,02
8	149,50	8,82	0,84
12	237,84	14,03	0,92

Tabela 10. Liberação do peptídeo da formulação F1B (Fonte: AUTORA).

Tempo (h)	Média Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
1	15,52	0,92	1,47
2	37,31	2,20	4,49
4	74,09	4,37	2,54
8	153,25	9,04	1,17
12	244,90	14,45	0,88

Tabela 11. Liberação do peptídeo da formulação F2A (Fonte: AUTORA).

Tempo (h)	Média Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
1	24,18	1,43	5,88
2	42,10	2,48	4,49
4	87,31	5,15	2,02
8	158,62	9,36	1,26
12	243,86	14,37	0,68

Tabela 12. Liberação do peptídeo da formulação F2B (Fonte: AUTORA).

Tempo (h)	Média Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
1	25,38	1,49	6,15
2	46,10	2,71	2,06
4	90,64	5,33	0,95
8	163,13	9,60	1,41
12	243,52	14,36	0,89

Tabela 13. Liberação do peptídeo da formulação F3A (Fonte: AUTORA).

Tempo (h)	Média Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
1	25,13	1,48	5,81
2	59,05	3,48	2,51
4	100,50	5,93	1,40
8	161,49	9,53	1,29
12	242,19	14,29	0,44

Tabela 14. Liberação do peptídeo da formulação F3B (Fonte: AUTORA).

Tempo (h)	Média Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
1	24,54	1,33	4,21
2	43,42	2,56	3,06
4	96,02	5,67	1,13
8	184,73	10,9	1,38
12	252,04	14,87	1,30

Tabela 15. Liberação do peptídeo da formulação F4A (Fonte: AUTORA).

Tempo (h)	Média Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
1	24,11	1,42	4,76
2	63,99	3,78	1,52
4	111,28	6,57	1,52
8	158,12	9,33	1,49
12	238,85	14,09	0,69

Tabela 16. Liberação do peptídeo da formulação F4B (Fonte: AUTORA).

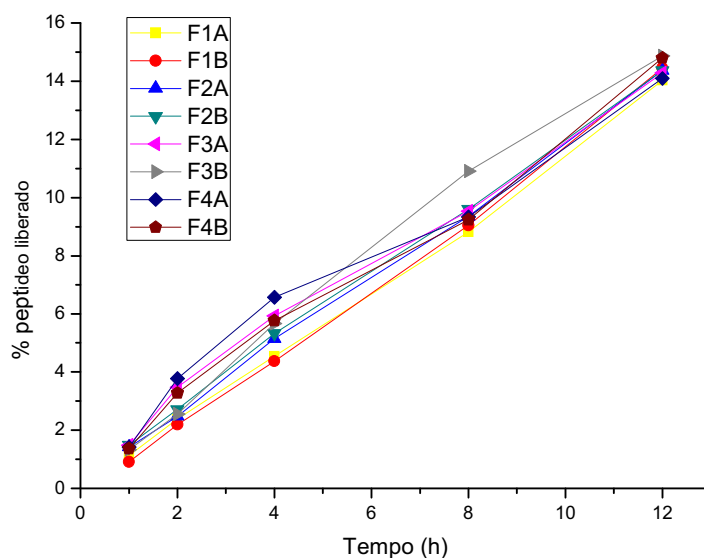
Tempo (h)	Média Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
1	23,20	1,37	7,77
2	55,54	3,28	5,78
4	97,73	5,77	6,29
8	156,65	9,24	2,70
12	250,93	14,80	1,85

A Figura 25 apresenta o perfil de liberação do peptídeo. Todas as formulações liberaram de forma prolongada o peptídeo dos sistemas, sendo que as formulações contendo 400 $\mu\text{mol}/\text{L}$ de peptídeo (B) liberaram uma porcentagem ligeiramente maior de peptídeo (F3B apresentou a maior liberação, com 14,87%) quando comparada com as formulações contendo 300 $\mu\text{mol}/\text{L}$ (A), (F1A apresentou a menor liberação, com

Ariane Migliato Martinelli

14,03%), após 12 horas. Além disso, pode – se dizer que diferentes concentrações de água e a mudança do tensoativo no sistema não influenciaram na porcentagem de liberação de ativo.

Figura 25. Perfil de liberação do peptídeo (Fonte: AUTORA).



As formulações são capazes de liberar o peptídeo nelas contidos, permitindo que o mesmo tenha contato com a pele para que em seguida ocorra a penetração cutânea. Uma vez disponível para penetração na superfície da pele, a penetração e permeação do ativo irão depender da capacidade destes em atravessar a camada córnea, e de características físico químicas do ativo, como lipofilicidade e tamanho da molécula (Nesseem, 2001).

Além disto, para compreender a cinética de liberação do ativo, três modelos matemáticos foram aplicados aos resultados obtidos: zero ordem, (Q_{real} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em

função do tempo), primeira ordem (logaritmo da porcentagem de fármaco em função do tempo) e Higuchi (Qreal em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em função da raiz quadrada do tempo). A Tabela 17 traz o coeficiente de correlação (R^2) calculado pelo ajuste de cada modelo matemático às curvas experimentais para as formulações avaliadas com diferentes concentrações de peptídeo.

Tabela 17. Coeficiente de correlação (R^2) das formulações dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi (Fonte: AUTORA).

Formulação	Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi
F1A	0,9982	0,9076	0,9694
F1B	0,9985	0,8937	0,9685
F2A	0,9995	0,9294	0,977
F2B	0,9992	0,9072	0,9819
F3A	0,9921	0,8552	0,986
F3B	0,994	0,8807	0,9913
F4A	0,9749	0,8637	0,9734
F4B	0,9908	0,8636	0,9742

Para todas as formulações, o modelo matemático que melhor se aplicou foi o de zero ordem. As figuras 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 e 33 apresentam respectivamente o gráfico de cinética de liberação das formulações F1A, F1B, F2A, F2B, F3A, F3B, F4A, F4B.

Ariane Migliato Martinelli

Figura 26. Modelo de cinética de liberação da formulação F1A (Fonte: AUTORA).

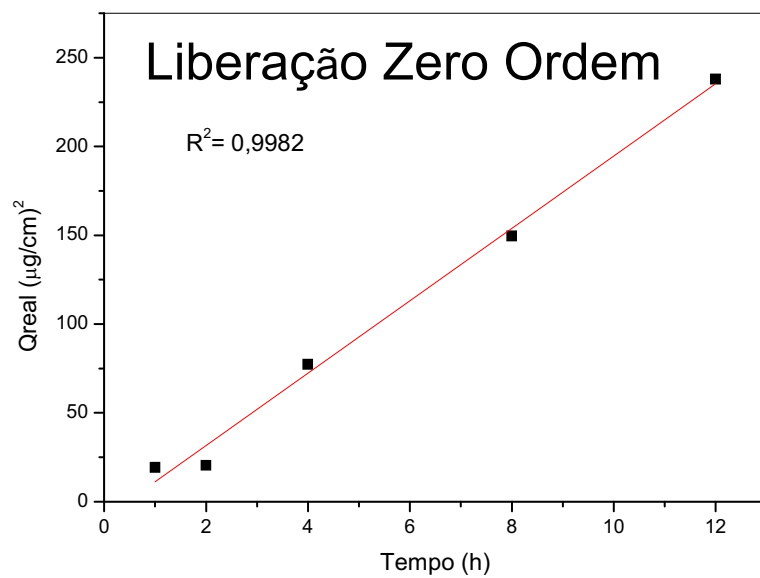


Figura 27. Modelo de cinética de liberação da formulação F1B (Fonte: AUTORA).

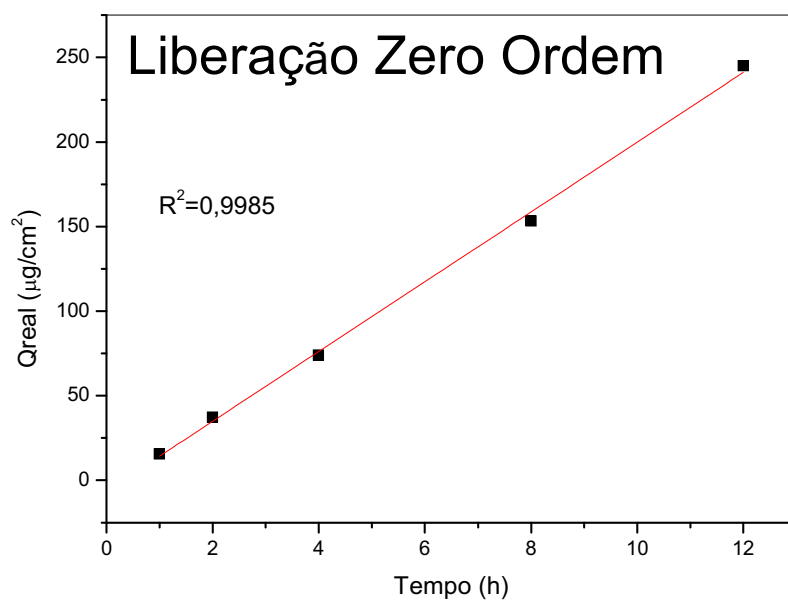


Figura 28. Modelo de cinética de liberação da formulação F2A (Fonte: AUTORA).

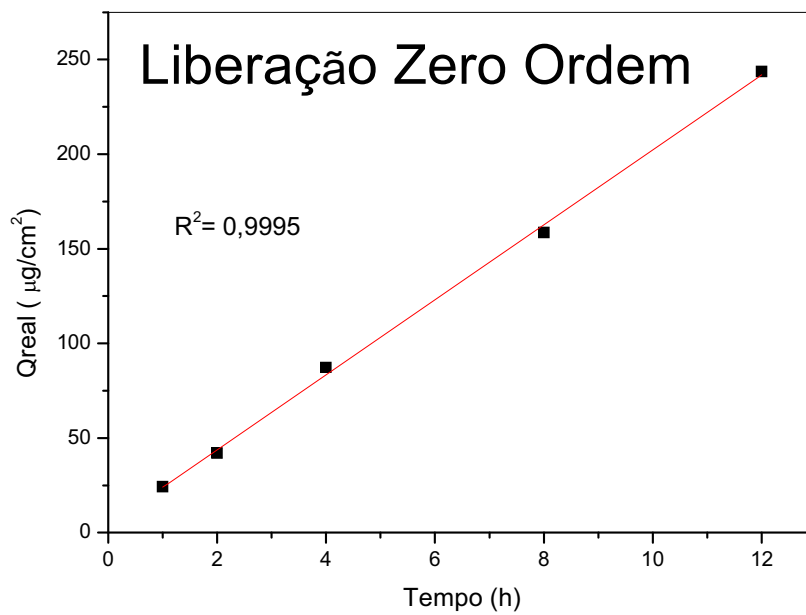


Figura 29. Modelo de cinética de liberação da formulação F2B (Fonte: AUTORA).

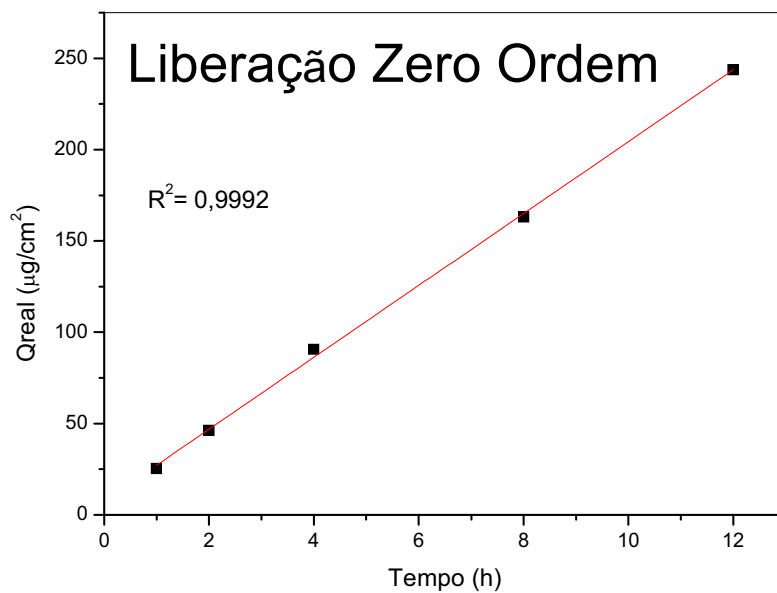


Figura 30. Modelo de cinética de liberação da formulação F3A (Fonte: AUTORA).

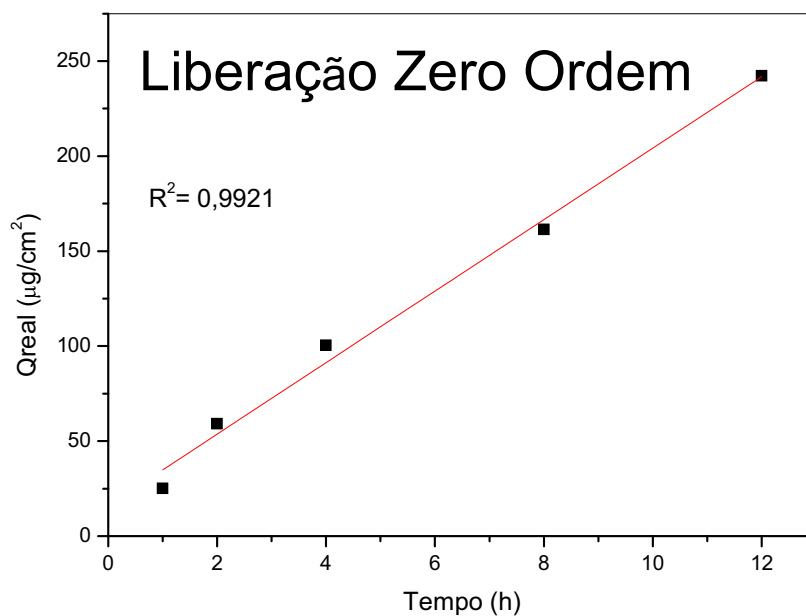


Figura 31. Modelo de cinética de liberação da formulação F3B (Fonte: AUTORA).

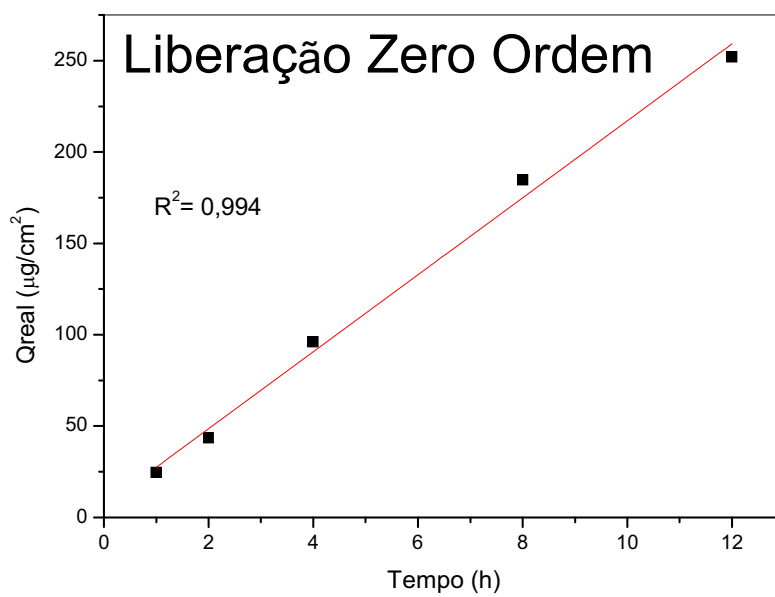


Figura 32. Modelo de cinética de liberação da formulação F4A (Fonte: AUTORA).

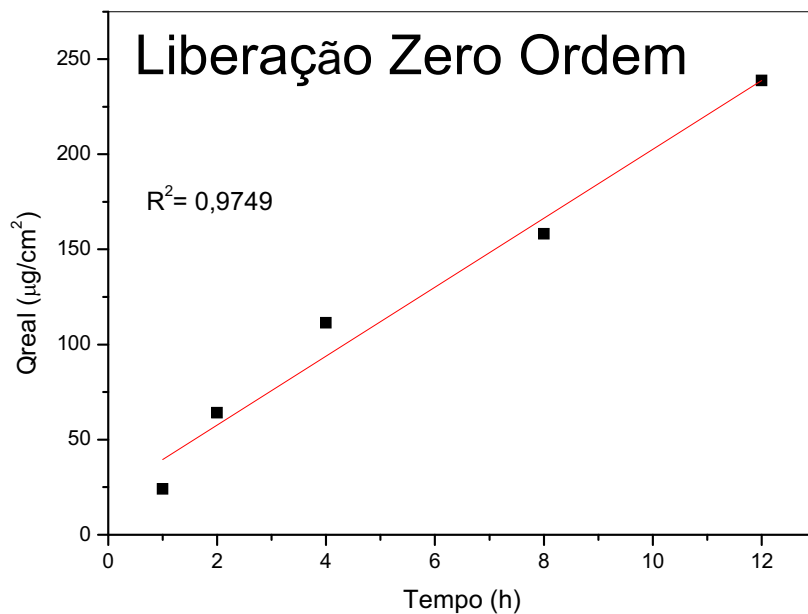
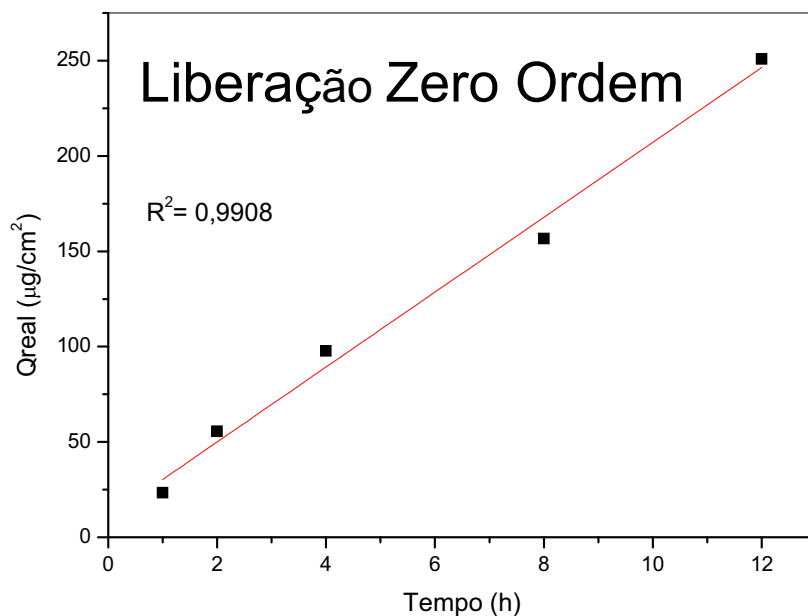


Figura 33. Modelo de cinética de liberação da formulação F4B (Fonte: AUTORA).



O modelo de zero ordem pode ser usado para descrever a liberação modificada de ativos de várias formas farmacêuticas, como sistemas osmóticos, formas revestidas, sistemas transdérmicos, entre outros. As formas farmacêuticas que seguem esta cinética liberam a mesma quantidade de ativo por unidade de tempo, o que é ideal para alcançar ação farmacológica prolongada (COSTA e SOUSA LOBO, 2001). Esta cinética indica que a taxa de liberação é independente do tempo, ou seja, neste caso pode ser atribuída ao comportamento dinâmico da fase lamelar que prolonga a liberação do ativo (FARKAS et al., 2000).

4.3 Avaliação da permeação *in vitro* do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações

Da mesma forma como foi feito na avaliação da cinética de liberação do peptídeo das formulações, na avaliação da permeação cutânea do peptídeo, a solução receptora foi coletada e quantificada por CLAE.

Na avaliação da permeação cutânea do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações F1A, F1B, F2A, F2B, F3A, F3B, F4A e F4B não foi possível quantificar o peptídeo permeado. Isto ocorreu porque a quantidade de peptídeo que permeou foi muito pequena ou inexistente, estando abaixo do limite de quantificação e detecção.

Como o local de ação do Ac-WAhx-KTTKS são os fibroblastos presentes na derme, a permeação do peptídeo não era, de fato, desejada, e confirma a classificação das formulações como cosméticos.

4.4 Avaliação da retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo

Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações

A Tabela 18 apresenta os resultados de retenção do peptídeo no estrato córneo e na epiderme/derme empregando as formulações F1A, F1B, F2A, F2B, F3A, F3B, F4A e F4B após 12 horas de experimento.

Tabela 18. Retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo nas formulações após 12 horas de experimento ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Fonte: AUTORA).

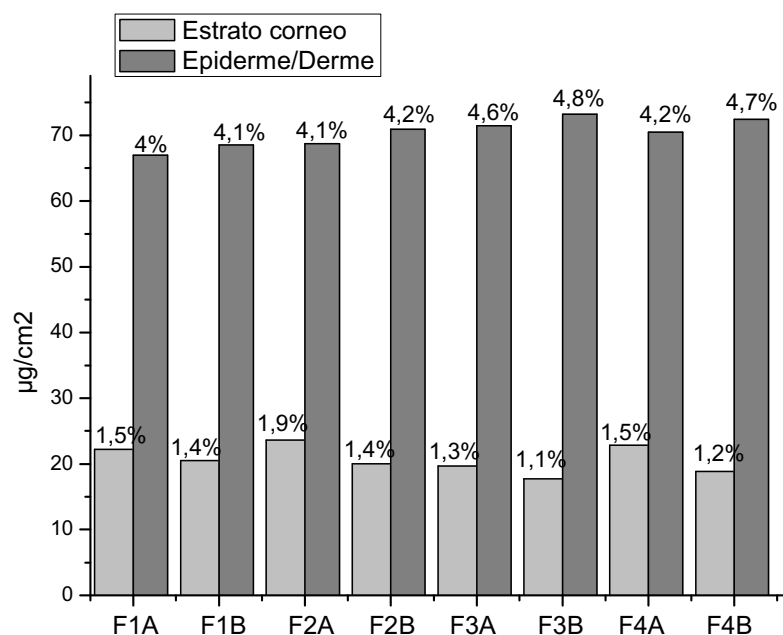
<i>Formulação</i>	<i>Estrato córneo ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>	<i>Epiderme/Derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)</i>
<i>F1A</i>	22,21 ($\pm 14,7$)	67,97 ($\pm 16,8$)
<i>F1B</i>	20,49 ($\pm 14,8$)	68,54 ($\pm 15,2$)
<i>F2A</i>	29,27 ($\pm 10,9$)	68,71 ($\pm 16,8$)
<i>F2B</i>	23,65 ($\pm 13,2$)	70,89 ($\pm 15,6$)
<i>F3A</i>	19,67 ($\pm 10,6$)	71,45 ($\pm 16,6$)
<i>F3B</i>	17,76 ($\pm 13,6$)	73,19 ($\pm 16,7$)
<i>F4A</i>	22,86 ($\pm 10,3$)	70,50 ($\pm 15,7$)
<i>F4B</i>	18,83 ($\pm 13,1$)	72,39 ($\pm 15,3$)

Os valores representam as médias e os coeficientes de variação referentes a seis determinações.

A Figura 34 demonstra os valores obtidos no ensaio de retenção cutânea das formulações, no estrato córneo e epiderme mais derme.

Ariane Migliato Martinelli

Figura 34. Retenção cutânea do peptídeo no estrato córneo e epiderme/derme ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) após 12 horas de ensaio (Fonte: AUTORA).



Na retenção cutânea o coeficiente de variação (CV) ficou entre 10 e 16%. Segundo o (SCCP/0970, 2006), os resultados de absorção cutânea devem ser reprodutíveis, utilizando-se um mínimo de seis amostras e o CV deve ser inferior a 30%. O CV no ensaio de retenção é maior do que no ensaio de liberação porque as espessuras da camada córnea, epiderme e derme são variáveis, promovendo assim, variações na permeabilidade cutânea.

A Figura 34 mostra que as formulações apresentaram uma retenção média do peptídeo na epiderme/derme entre $67,97 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para F1A e $73,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para F3B, sendo equivalente a 4% e 4,8% do peptídeo incorporado nas formulações, respectivamente. Portanto, a porcentagem de Ac-Wahx-KTTKS que penetrou na pele e atingiu as camadas mais profundas foi maior para as formulações que apresentaram maiores porcentagens de liberação do peptídeo.

Além disso, as formulações contendo maior concentração de Ac-Wahx-KTTKS (400 $\mu\text{mol/L}$) apresentaram taxas de retenção na epiderme/derme ligeiramente maiores. Então, pode-se dizer que a concentração de peptídeo incorporado nas formulações foi importante para modular a quantidade (em $\mu\text{g/cm}^2$) retida na epiderme/derme, onde deverá estimular a síntese de colágeno.

O perfil de retenção no estrato córneo também pode ser observado na Figura 33, e verifica-se que a formulação F2A apresentou uma maior retenção (29,27 $\mu\text{g/cm}^2$), equivalente a 1,92% do peptídeo incorporado, e a formulação F3B uma menor retenção nesta camada (17 $\mu\text{g/cm}^2$), equivalente a 1,11%.

Os resultados obtidos com todas as formulações são satisfatórios, pois não houve permeação do peptídeo, sendo uma característica desejada para um produto cosmético. Além disso, o peptídeo foi capaz de permanecer retido na epiderme/derme, sendo na derme, o local onde tem ação.

Com base nestes resultados, pode-se dizer que a formulação F3B foi mais eficiente quando se diz respeito à penetração do Ac-Wahx-KTTKS na pele em relação as demais formulações, com uma porcentagem maior de peptídeo retido na epiderme/derme e uma porcentagem menor retida no estrato córneo.

Conclusões

Ariane Migliato Martinelli

Neste trabalho preparou-se os sistemas líquido cristalinos lamelares e realizou-se a síntese e purificação do peptídeo Ac – WAhx- KTTKS, com um grau de pureza acima de 99,97%;

A avaliação físico química das formulações contendo e não contendo o peptídeo (microscopia de luz polarizada e espalhamento de raios X a baixo ângulo) permitiram avaliar que após a incorporação do peptídeo não houve mudança de fases dos sistemas, permanecendo na fase lamelar.

Além disso, a caracterização reológica avaliou as características estruturais das formulações, e mostrou que mesmo após a incorporação do peptídeo, os sistemas continuaram a apresentar tixotropia, (com exceção da formulação F1 que não apresentou tixotropia mesmo sem o peptídeo), comportamento não-Newtoniano e perfil pseudoplástico.

Os resultados obtidos pelo teste de biossíntese de colágeno *in vitro* mostraram que o peptídeo é eficaz no tratamento do envelhecimento cutâneo, aumentando em até 80% a produção de colágeno pelos fibroblastos.

Os testes de liberação *in vitro* do Ac-Wahx-KTTKS nas formulações mostraram que os sistemas lamelares testados são capazes de prolongar a liberação do ativo, com um máximo liberado de 14,87% para a formulação F3B e um mínimo de 14,03% para a formulação F1A, após 12 horas. Além disso, o modelo matemático que melhor se aplicou às formulações foi o zero ordem, demonstrando que as formulações liberam a mesma quantidade de peptídeo por unidade de tempo.

Os resultados obtidos com a formulação F3B na retenção cutânea se mostraram mais interessantes, pois verificou-se uma maior retenção do peptídeo nas camadas mais profundas da pele (epiderme + derme), sendo a derme o local de ação.

Ariane Migliato Martinelli

Considerando as conclusões acima descritas, pode-se dizer que foi possível obter com sucesso sistemas líquido cristalinos lamelares contendo o peptídeo Ac-Wahx-KTTKS. Os resultados revelaram que a composição das fases lamelares (tipo de tensoativo e teor de água) não teve influência significativa nos perfis de liberação e permeação do peptídeo. Entretanto, a concentração de Ac-Wahx-KTTKS incorporado nas formulações foi importante para modular a quantidade (em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) retida na epiderme/derme, onde deverá estimular a síntese de colágeno.

É interessante a continuidade deste projeto com a realização de estudos farmacológicos *in vivo* através da avaliação da toxicidade e estudos clínicos, com a finalidade de comprovar a segurança e eficácia do peptídeo.

Ariane Migliato Martinelli

Referências

Bibliográficas

ABU SAMAH, N. H.; HEARD, C. M. Topically applied KTTKS: a review.
International Journal of Cosmetic Science, v.33, p.483-90, 2011.

Ariane Migliato Martinelli

ÁCIDO AMINOCAPROICO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2013. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=%C3%81cido_aminocaproico&oldid=35058185>. Acesso em: 10 fev. 2015.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. *Biology Molecular of the Cell*, 4 rd ed. New York: Garland Publishing, 2004.

ALTENBACH, M.; SCHNYDER, N.; ZIMMERMANN, C.; IMANIDIS, G. Cutaneous metabolism of a dipeptide influences the iontophoretic flux of a concomitant uncharged permeant *Int. J. Pharm.* v. 307, p. 308, 2006.

ANDRADE, F. F., SANTOS, O. D. H., OLIVEIRA, W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Influence of PEG-12 Dimethicone addition on stability and formation of emulsions containing liquid crystal. *International Journal of Cosmetic Science*, v.29, p.211-218, 2007.

ANVISA (2003) Resolução-RE N.899, 29 de maio de 2003., Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: jan. 2015.

BECHTOLD, I. H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v.27, p.333-342, 2005.

BERMANN, P. E. Aging Skin: Causes, Treatments, and Prevention. *Nursing Clinics of North America*, v. 42, p.485-500, 2007.

BOEHM, M.F., ZHANG, L., ZHI, L., MCCLURG, M.R., BERGER, E., WAGONER, M. Design and synthesis of potent retinoid X receptor selective ligands that induce apoptosis in leukemia cells. *J Med Chem*, v.38, p.3146-55, 1995.

BORGES, L. F., GUTIERREZ, P. S., COSISKI MARANA, H. R. & TABOGA, S. R. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detectin in vesical prolapse lesions. *Micron*, v.38, n.6, p.580-3, 2007.

CAMPOS, P.M.B.G.M.; RICCI, G.; SEMPRINI, M.; LOPES, R.A. Histopathological, morphometric, and stereologic studies of dermocosmetic skin formulations containing vitamin A and/or glycolic acid. *J. Cosmet. Sci.*, v.50, p.159-170, 1999.

CARLSON, M. A.; LONGAKER, M. T. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Repair and Regeneration*, v.12, n.2, p. 134-47, 2004.

CHANG, M.; CHANG, C. Simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v.33, p.617-626, 2003.

CHIARI, B. G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** 2011. 137 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2011.

CHORILLI, M., PRESTES, P. S., RIGON, R. B., LEONARDI, G. R., CHIAVACCI, L. A., SARMENTO, V. H. V., OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V. Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.85, p.182-188, 2011.

Ariane Migliato Martinelli

- CHORILLI, M., PRESTES, P. S., RIGON, R. B., LEONARDI, G. R., CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. *Química Nova*, v.32, p.1036-1040, 2009.
- CHUNG, J. H., SEO, J. Y., CHOI, H. R., LEE, M. K., YOUN, C. S., RHIE, G.-E., CHO, K. H., KIM, K. H., PARK, K. C.; EUN, H. C. Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged Human skin in vivo. v.117, p.1218-1224, 2001.
- COLEMAN, R. Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochemica*, v.113, n.3, p. 231-3, 2011.
- COSTA, P.; SOUSA LOBO, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.13, p.123-133, 2001.
- DEVELOPMENT, O.-O. F. E. C. A. Guidance document for the conduct of skin absorption studies. n.28. Paris, 2004.
- DITRE, C.M.; GRIFFIN, T.D.; MURPHY, G.F. Effects of alpha hydroxy acids on photoaged skin: a pilot clinical, histological and ultrastructural study. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.34, p.187-195, 1996.
- DRAELOS, Z. D. The latest cosmeceutical approaches for anti-aging. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v.6, p.2-6, 2007.
- FARKAS, E., ZELKÓ, R., NÉMETH, Z., PÁLINKÁS, J., MARTON, S.; RÁCZ, I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. *International Journal of Pharmaceutics*, v.193, p.239-245, 2000.
- FAUCZ, L. R. L. Avaliação dos efeitos proliferativos e de síntese induzidos pela luz intensa pulsada em fibroblastos e células endoteliais humanas. In: *Faculdade de Medicina*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- FIELDS, G. B.; NOBLE, R. L. Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *International Journal of Peptide and Protein Research*, v. 35, p. 161-214, 1990.
- FORMARIZ, T. P., URBAN, M. C. C., SILVA JÚNIOR, A. A. D., GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. D. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.301-313, 2005.
- FRIBERG, S. E. Applications of amphiphilic association structures. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.32, p.100-2, 1990.
- GLOGAU, R.G., Physiologic and structural changes associated with aging skin. *Dermatol Clin*, v. 15, p. 555–559, 1997.
- GOROUHI, F.; MAIBACH, H. I. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International Journal of Cosmetic Science*, v.31, p.327-345, 2009.
- GRIFFITHS, C.E.M.; RUSSMAN, N.A.; MAJMUDAR, G. Restoration of collagen formation in photodamaged human skin by tretinoin (retinoic acid). *N Engl J Med*, v.329, p.530-5, 1993.

- HIRATA, L., SATO, M.; SANTOS, C. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta Farm. Bonaerense*, v.23, n.3, p.418-24, 2004.
- HUMBERT, P.G.; HAFTEK, M.; CREID, P. Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double blind study vs placebo. *Exp Dermatol*, v.12, p.237-44, 2003.
- HYDE, S. T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. cap. 16, p.229 – 232, 2001
- IOZUMI, K. Role of tyrosinase as the determinant of pigmentation in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v. 100, n. 6, p. 806-11, 1993.
- IWAI, H., FUKASAWA, J.; SUZUKI, T. A liquid crystal application in skin care cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, v.20, p.87-102, 1998.
- KATAYAMA, K., ARMENDARIZ-BORUNDA, J., RAGHOW, R., KANG, A. H. & SEYER, J. M. A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production. *Journal of Biological Chemistry*, v.268, p.9941-9944, 1993.
- KRAELING, M.E.K.; BRONAUGH, R.L. In vitro percutaneous absorption of alpha hydroxy acids in human skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, v.48, p.187-197, 1997.
- LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.45, p. 89-120, 2000.
- LUPO, M. F. Antioxidants and vitamins in cosmetics. *Clin. Dermatol.*, New York, v. 19, p.467-473, 2001.
- LUPO, M. P.; COLE, A. L. Cosmeceutical peptides. *Dermatologic Therapy*, v.20, p.343-349, 2007.
- MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; SILVA, G. M. Estratégias de formulação de shampoos. *Cosmetics & Toiletries* (Edição em Português), São Paulo, v. 12, p.44-48, mai-jun. 2000.
- MARQUELE, F. D., OLIVEIRA, A. R. M., BONATO, P. S., LARA, M. G.; FONSECA, M. J. V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.41, p. 461-468, 2006.
- MARZULLI, F., MAIBACH, H. Dermatoxicology. 5ª edição, Washington DC: Taylor and Francis, v.11, n.12, p.285-286, 1996.
- MONTEIRO – RIVIERE, N.A. Structure and function of skin, in: MONTEIRO – RIVIERE, N.A. (Ed.), *Toxicology of the Skin, Informa Healthcare USA, Inc.*, New York, p. 1–18, 2010.
- MULLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.58, p.120-9, 2004.

NAMJOSHI, S., CACCETTA, R.; BENSON, H. A. E. Skin peptides: Biological activity and therapeutic opportunities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.97, p.2524-2542, 2008.

NAGASE, H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases, *H Biol. Chem*, v.378, p.151-160, 1997.

NASROLLAHI, S.A, FOULADDEL, S., TAGHIBIGLOU, C. A peptide carrier for the delivery of elastin into fibroblast cells. *Int J Dermatol*, v.51, p.923–9, 2012.

NESSEEM, D. I. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.26, p.387-399, 2001.

NJIEHA, F.K., MORIKAWA, T., TUDERMAN, L. Partial purifications of a procollagen C-proteinase. Inhibition by synthetic peptides and sequential cleavage of type I procollagen. *Biochemistry*, v.21, p.757–764, 1982.

NUSGENS, B.V. et al.. Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis *J Invest. Dermatol*, Malden, v. 116, n. 6, p. 853-859, 2001.

OECD Guidance document for the conduct of skin absorption studies. *ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT*, n.28, 2004.

PINNEL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. *J Am. Acad. Dermatol*. St Louis, v.1, p.1-19, 2003.

PROCKOP, D.J., KIVIRIKKO, K.I., TUDERMAN, L. GUZMAN, N.A. The biosynthesis of collagen and its disorders. *New Engl J Med*, v.301, p.1323, 1979.

PUIG, A. Hexapeptídeo: nova alternativa ao combate às rugas. *Cosmetic & Toiletries* (edição em português), v.16, p.48-50, 2004.

RABE, J.H.; MAMELAK, A.J.; MCELGUNN, P.J.; MORISON, W.L.; SAUDER, D.N.J. Photoaging: mechanisms and repair *J. Am. Acad. Dermatol*, v.55, n1, p.1-19, 2006.

REDDY, B. Y., JOW, T.; HANTASH, B. M. Bioactive oligopeptides in dermatology: Part II. *Experimental Dermatology*, v.21, p.569-575, 2012.

RISSI, N. C.; GUGLIELMI, D. A. S.; CORRÊA, M.; CHIAVACCI, L. A. Relationship between composition and organizational levels of nanostructured systems formed by Oleth 10 and PPG-5-Ceteth-20 for potential drug delivery. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 50, p. 653-661, 2014.

ROBERTS, M.S.; WALTERS, K.A. Human skin morphology and dermal absorption, in: ROBERTS, M.S.; WALTERS, K.A. (Eds.), *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*, Informa Healthcare, New York, p. 1–15, 2008.

ROBINSON, L. R., FITZGERALD, N. C., DOUGHTY, D. G., DAWES, N. C., BERGE, C. A.; BISSETT, D. L. Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement

Ariane Migliato Martinelli

- in photoaged human facial skin¹. *International Journal of Cosmetic Science*, v.27, p.155-160, 2005.
- SAMUEL, M.; BROOKE, R.; HOLLIS, S. Interventions for photodamaged skin [review]. *Cochrane Database Syst Rev*, v.55, n.1, janeiro/2005.
- SCCP/0970 SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS - Basic Criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetics ingredients, 2006.
- SHAPIRO, S.S.; SALIOU, C. Role of vitamins in skin care, *Nutrition*, New York, v. 17, n. 10, p. 839-844, 2001.
- SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. *Physics Reports-Review Section of Physics Letters*, v.324, p. 2-4, 2000.
- STRATIGOS, A.J.; KATSAMBAS, A.D. The role of topical retinoids in the treatment of photoaging. *Drugs*, v.65, p. 1061-72, 2005.
- SUHONEN, T. M., BOUWSTRA, J. A.; URTTI, A. Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *Journal of Controlled Release*, v.59, p.149-61, 1999.
- THOMAS, J. R.; DIXON, T. K.; BHATTACHARYYA, T. K. Effects of topicals on the aging skin process. *Facial Plast Surg Clin N Am.*, v.21, n.1, p.55-60, 2013.
- TSAI, W.-C., HSU, C.-C., CHUNG, C.-Y., LIN, M.-S., LI, S.-L. & PANG, J.-H. S. The pentapeptide KTTKS promoting the expressions of type I collagen and transforming growth factor- β of tendon cells. *Journal of Orthopaedic Research*, v.25, p.1629-1634, 2007.
- TRIPTOFANO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2014. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Tript%C3%B3fano&oldid=39251145>>.
- Acesso em: 10 fev. 2015.
- UEDA, C., SHAH, V., DERDZINSKI, K., EWING, G., FLYNN, G., MAIBACH, H., MARQUES, M., RYTTING, H., SHAW, S., THAKKER, K.; YACOBI, A. Topical and Transdermal Drug Products. In: *Farmacopeial Forum* 3 ed. USP, 2009.
- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO. MARTINELLI, A.M.; SCATOLIN, D.A.; CHIVACCI, L.A.; CILLI, E.M. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, peptídeo AcWahxKTTS e seu uso. BR10201400733, 27/03/2014.
- URBAN, M. C. C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona.** Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- VAYALIL, P.K.; MITTAL, A.; HARA, Y. Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J Invest Dermatol* v.122, p.1480-7, 2004.

Ariane Migliato Martinelli

VARANI, J., FISHER, G.J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Molecular mechanisms of intrinsic skin aging and retinoid-induced repair and reversal. *J Invest Dermatol Symp Proc*, v.3, p. 57-60, 1998.

VICENTINI, F.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W.; GEORGETTI, S.; BENTLEY, M.; FONSECA, M. Quercetin in Lyotropic Liquid Crystalline Formulations: Physical, Chemical and Functional Stability. *AAPS PharmSciTech*, v.9, p.591-596, 2008.

WANG, Z.; ZHOU, W. Lamellar Liquid Crystals of Brij 97 Aqueous Solutions Containing Different Additives. *Journal of Solution Chemistry*, v.38, p. 159, 2009.

YAMAMOTO, A.; SETOH, K.; MURAKAMI, M.; SHIRONOSHITA, M.; KOBAYASHI, T.; FUJIMOTO, K.; OKADA, N.; FUJITA, T.; MURANISHI, S. Enhanced transdermal delivery of phenylalanyl-glycine by chemical modification with various fatty acids. *International Journal of Pharmaceutics*, v.250, p.119-28, 2003.

ZHENG, M.; WANG, Z.; LIU, F.; MI, Q.; WU, J. Study on the microstructure and rheological property of fish oil lyotropic liquid crystal. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 385, p. 47– 54, 2011.