



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102014007337-0 A2

(22) Data do Depósito: 27/03/2014

(43) Data da Publicação: 08/12/2015

(RPI 2344)



* B R 1 0 2 0 1 4 0 0 7 3 3 7 A

(54) **Título:** SÍNTESE DO PEPTÍDEO ACWAHXKTTKS, PEPTÍDEO ACWAHXKTTKS E SEU USO

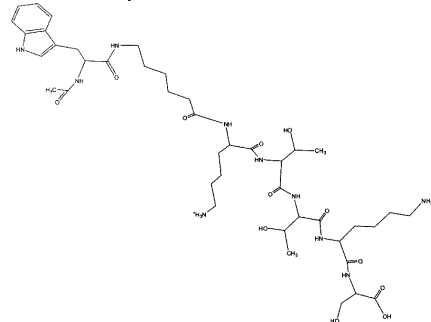
(51) **Int. Cl.:** C07K 1/107; C07K 7/06; A61K 8/64; A61K 8/06; A61Q 19/08

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** ARIANE MIGLIATO MARTINELLI, DANILA APARECIDA SCATOLIN GUGLIELMI, LEILA APARECIDA CHIAVACCI, EDUARDO MAFFUD CILLI, MARCOS ANTONIO CORRÊA

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** Resumo SÍNTESE DO PEPTÍDEO AcWahxKTTKS, PEPTÍDEO AcWahxKTTKS E SEU USO A presente invenção apresenta a síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, onde foi adicionada à sequência mãe (KTTKS) uma molécula de ácido capríco, que é um ácido graxo insaturado composto por 6 átomos de carbono, encontrado naturalmente nas gorduras e óleos minerais, para conferir um grau de lipofilicidade ao peptídeo e favorecer na permeabilidade do mesmo na pele. Adicionou-se também o triptofano, que é um aminoácido aromático essencial para a nutrição humana, visando proporcionar fluorescência ao peptídeo e assim quantificá-lo na pele através de um método mais eficiente e sensível. O triptofano foi acetilado para diminuir a interação do peptídeo com a água, a fim de ajudar na penetração do peptídeo na pele. O peptídeo AcWahxKTTKS estimula a síntese de colágeno nos fibroblastos, reduzindo ou eliminando, desta forma, as rugas e linhas de expressão na pele.



**“SÍNTESE DO PEPTÍDEO AcWahxKTTKS, PEPTÍDEO AcWahxKTTKS E
SEU USO”**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Apresente invenção se insere no campo de
5 aplicação da Química, Farmácia, Biotecnologia e, mais
especificamente, na área de composições para aplicações
farmacêuticas e cosméticas, uma vez que se refere à síntese
do peptídeo AcWahxKTTKS e uso do mesmo para
antienvelhecimento, tratamento de rugas e linhas de
10 expressões faciais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] A pele é o órgão que mais reflete as
mudanças inevitáveis que ocorrem no processo de
envelhecimento do corpo. Estas mudanças refletem de forma
15 bastante impactante sobre a vida social dos seres humanos,
especialmente os fatores ligados à autoestima e a qualidade
de vida. Com o passar do tempo ocorre na pele o
envelhecimento geneticamente programado, denominado de
envelhecimento cronológico. Além disso, a pele está em
20 contato direto com o meio ambiente e, portanto, é submetida
ao envelhecimento através da ação de diversos fatores
ambientais. A radiação ultravioleta (UV) do sol é o
principal fator ambiental responsável pelo envelhecimento
da pele, chamado de fotoenvelhecimento. O
25 fotoenvelhecimento, bem como o envelhecimento cronológico,
é um processo cumulativo. Durante a última década, houve um
progresso na compreensão dos mecanismos celulares e
moleculares relacionado ao envelhecimento cronológico e
fotoenvelhecimento, proporcionando oportunidades para o
30 desenvolvimento de novas terapias antienvelhecimento.

[003] A possibilidade de minimizar os efeitos do envelhecimento na pele representa um extenso campo para pesquisa e apresenta um grande potencial para inovações no setor cosmético. Nos últimos anos, este setor tem
5 apresentado ao mercado numerosos produtos e compostos ativos com o intuito de proporcionar ao consumidor resultados eficazes no tratamento do envelhecimento da pele.

[004] Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas
10 para identificar e isolar peptídeos que desempenham funções na pele. A maioria dos peptídeos bioativos são fragmentos isolados de peptídeos precursores maiores. Estes peptídeos demonstram importante papel em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo ações como estimulação e regulação
15 da cicatrização de feridas, efeito antimicrobiano e anti-inflamatório. Além disso, tais peptídeos também são indicados para serem utilizados em preparações cosméticas, principalmente para tratamento do envelhecimento cutâneo.

[005] Os peptídeos geralmente apresentam
20 características físico-químicas que tornam seu uso inadequado, como a susceptibilidade à degradação proteolítica (por metabolismo hepático de primeira passagem), sensibilidade à condição de pH extremo (estômago) e risco de induzir uma resposta imune. A
25 aplicação tópica oferece aparetemente uma proteção aos problemas acima, sendo uma rota mais direta para o local de ação, e a liberação suficiente do composto na área-alvo. Além disso, maior biodisponibilidade poderia ser alcançada devido à redução de metabolismo. No entanto, existem várias
30 questões a considerar no uso de peptídeos como compostos

ativos em formulações tópicas, em particular a sua taxa de penetração passiva e potencial através da pele. O principal obstáculo que os peptídeos enfrentam na liberação transcutânea é a anatomia da pele, sendo o estrato córneo uma barreira lipídica para a absorção de ativos na pele.

[006] Os peptídeos geralmente são macromoléculas, isto é, possuem altas massas moleculares e apresentam cargas em pH fisiológico, o que os tornam hidrofílicos, contribuindo assim para sua pobre penetração passiva. Os avanços da biotecnologia permitem modificações na estrutura dos peptídeos a fim de melhorar características indesejadas que impedem sua eficácia.

[007] 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 às suas características físico-químicas, sua penetração na pele não 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.

[008] Foram sintetizadas 12 sequências diferentes, baseadas na sequência básica KTTKS, e seus efeitos na síntese de colágeno em várias células mesenquimais foram estudados por ensaio de cultura *in vitro*, e observou-se que a sequência básica é a sequência mínima necessária para estimulação da produção de colágeno e fibronectina em células mesenquimais. Assim, quando foi retirado ou substituído algum aminoácido desta sequência básica, sua

atividade foi perdida ou muito diminuída.

[009] Na tentativa de promover um aumento da penetração do peptídeo KTTKS na pele, pesquisadores fizeram modificações na sua sequência peptídica, tais como a
5 ligação de um ácido palmítico ao KTTKS (Palmitoil-KTTKS) e a ligação de um ácido ascórbico ao KTTKS (penta peptídeo ascorbil estabilizado). Mas nenhum dado foi relacionado à penetração destes derivados na pele. Este fato pode ser devido à baixa concentração de uso, tornando-se difícil
10 obter um método adequado para a quantificação do peptídeo.

[010] Com base nestes estudos, as modificações na sequência peptídica KTTKS para diminuir a sua hidrofília e a utilização de sistemas de liberação que promovam a penetração do peptídeo na pele representa uma alternativa
15 viável para o tratamento tópico do envelhecimento cutâneo.

Matriz extracelular

[011] Os tecidos são constituídos por células e macromoléculas localizadas no espaço extracelular, que formam uma intrincada rede constituindo a matriz
20 extracelular (MEC). Essa MEC é composta por várias proteínas e polissacarídeos que são secretados localmente e reunidos em uma rede organizada e em estreita associação com a superfície das células que os produzem.

[012] Em nossos corpos, a forma mais abundante de
25 MEC é encontrada em tecido conectivo volumoso como os ossos, 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
30 células que fazem contato, influenciando o desenvolvimento,

a migração, a proliferação, a forma e a função.

[013] 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 elastina, fibronectina, laminina e 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 a resistência à fibronectina, importante na adesão da célula do tecido conectivo com a matriz, e a laminina atua como um organizador primário da estrutura das camadas.

[014] A quantidade de tecidos da pele diminui com o envelhecimento, diminuindo aproximadamente 7% do valor original. Um parâmetro importante a respeito é a perda de colágeno, pela diminuição da síntese, e/ou pelo aumento da degradação ou ambos.

Envelhecimento cutâneo

[015] O envelhecimento é um processo biológico complexo, contínuo, que se caracteriza por alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo, levando à senescência e morte celular programada (apoptose). Existem evidências de que é influenciado pelo dano causado ao DNA

por agressões internas e externas.

[016] O envelhecimento da pele pode ser classificado em envelhecimento intrínseco e extrínseco. O envelhecimento intrínseco, ou cronológico, é devido às senescências geneticamente controladas, e também devido às espécies reativas de oxigênio formadas intracelularmente como consequência do próprio metabolismo celular. Neste processo o envelhecimento é inevitável e aparentemente não está susceptível às alterações comportamentais do indivíduo. Já o envelhecimento extrínseco é influenciado por fatores originados externamente, sendo um processo cumulativo de degeneração induzida por anos de exposição a cofatores ambientais, como o fumo e o sol.

[017] As alterações observadas na epiderme são principalmente o retardamento da divisão celular, gerando o afinamento da epiderme e da derme; a desorganização da camada córnea, que leva a uma desidratação superficial; a formação de rugas com o espessamento da pele e frouxidão tegumentar; o aparecimento de manchas, causado por alterações na síntese de melanina; a debilitação das defesas da pele devido à rarefação das células de Langerhans; e, em alguns casos, a multiplicação celular anárquica, levando ao aparecimento de tumores.

[018] O envelhecimento cutâneo causa a degradação e diminuição da síntese de fibras colágenas e elásticas da matriz extracelular na derme. Isto pode ser devido à diminuição da proliferação e da atividade dos fibroblastos lá contidos. Estas mudanças celulares causam alterações quali-quantitativas das fibras colágenas e elásticas na derme, com isso, há perda da capacidade de retração e do

poder tensor da pele. A exposição repetida ao sol causa dano dérmico acumulativo que resulta nas rugas características da pele fotoenvelhecida. Clinicamente a pele com envelhecimento intrínseco apresenta-se pálida e com rugas finas, diminuição da elasticidade, maior fragilidade epidérmica, ressecamento e diminuição da capacidade de cicatrização de feridas. A pele com envelhecimento extrínseco apresenta enrugamento grosseiro com perda da elasticidade, alterações na textura e pigmentação, ceratoses actínicas, telangiectasias e aspecto amarelado.

[019] O processo de diminuição da síntese de colágeno e aumento da sua degradação causado pela radiação UV, produz microcicatrizes, que ao longo da vida tornam-se macroferidas visíveis na pele, como as rugas. De fato, a produção de colágeno volta completamente ao normal dentro de dois dias após a suspensão da exposição solar. Para evitar esse processo de depleção celular, a pele possui seu próprio mecanismo de defesa tais como: enzimas, vitaminas e agentes quelantes de íons metálicos. Entretanto, a capacidade protetora desse mecanismo diminui com o envelhecimento, assim compostos exógenos são sugeridos como compostos antioxidantes, promotores da síntese de colágeno, entre outros.

25 **Peptídeo KTTKS**

[020] O peptídeo KTTKS é um subfragmento do propeptídeo de colágeno tipo I, composto por uma sequência de cinco resíduos de aminoácidos, que são: lisina - treonina - treonina - lisina - serina. Ele é capaz de induzir a síntese de colágeno (tipo I e III) e

fibronectinana pele e atuar no tratamento do envelhecimento cutâneo e cicatrização de feridas.

[021] O peptídeo KTTKS é considerado um "peptídeo sinalizador", pois tem a capacidade de aumentar a remodelação dérmica pelo desencadeamento de processos celulares, tais como a ativação do fator de crescimento transformante (TGF- β). Com isso o TGF- β liga-se aos seus receptores presentes nos fibroblastos e assim a expressão do gene do procolágeno α 1 (I) é aumentada. Devido à estimulação da expressão do gene do procolágeno α 1 (I) há um aumento na produção de matriz extracelular na derme. Inibidores da atividade da colagenase também são estimulados pelo peptídeo KTTKS, assim menos fibras colágenas e elásticas são degradadas na matriz extracelular.

[022] O efeito estimulador do peptídeo KTTKS em colágeno (tipos I e III) refere-se principalmente à via biossintética, em vez das vias de degradação e exportação. Recentemente, um estudo mostrou que o peptídeo KTTKS promoveu a síntese de colágeno tipo I pela manutenção da estabilidade do mRNA em um processo associado com a autorregulação da expressão do fator de crescimento transformante (TGF- β). Apesar de tal conhecimento, o mecanismo de ação do peptídeo KTTKS ainda não foi completamente estabelecido.

[023] O peptídeo KTTKS age em camadas profundas da pele, na derme, com isso o peptídeo tem que atravessar o estrato córneo e a epiderme para atingir estas camadas, tornando sua penetração na pele essencial para sua atividade. Uma estratégia para melhorar a penetração

através da pele é usar compostos promotores de penetração coadministrados. Um estudo sugere o uso de substâncias lipofílicas, como os ácidos graxos, com o objetivo de potencializar a penetração por meio 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.

Via cutânea

10 [024] A pele é o maior órgão do corpo, altamente complexa, responsável por 15% do peso total do corpo adulto. Possui uma estrutura elaborada, associando tecidos de diversas origens (epitelial, conjuntivo, vascular, muscular e nervoso) que exercem funções vitais. Estes
15 tecidos são organizados em três camadas: a epiderme (e seus apêndices, folículos e glândulas sudoríparas pilosebáceas); a derme, separada da epiderme pela junção dérmico-epidérmica; e a hipoderme. A epiderme é um epitélio estratificado que se renova continuamente. Composta por
20 diversos tipos celulares, principalmente (90-95%) por queratinócitos, que são células epiteliais, também estão presentes as células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel. As células epidérmicas são dispostas em camadas contínuas, que compreende (de baixo para cima): a camada
25 basal, a camada espinhosa, a camada granular e a córnea. A derme é um suporte, compressível e elástico do tecido conjuntivo protegendo a epiderme, seus anexos e plexos vasculares e nervosos estão passando por ela. Composta por células e moléculas fibrosas, ela sofre uma contínua
30 transformação, regulada por mecanismos que controlam a

síntese e degradação de seus componentes protéicos. A derme é dividida em derme superficial ou papilar e derme reticular ou profunda, contém várias células (fibroblastos, dendrócitos dérmicos, mastócitos), vasos e terminações nervosas. Ela é feita de fibras de colágeno dispostas em feixes soltos e de finas fibras elásticas que se estendem perpendicularmente à junção dérmico-epidérmica. A derme (profunda) reticular é composta por feixes de colágenos mais grossos, tendendo a ficar paralela à superfície da pele e contém também a parte profunda de anexos cutâneos, plexos vasculares e nervosos.

[025] A administração de compostos ativos na pele, seja para um tratamento local (tópico) ou sistêmico (transdérmico), baseia-se na difusão do fármaco através das diversas camadas da epiderme. A camada mais superficial deste tecido, o estrato córneo, mantém o conteúdo de água no organismo mesmo em condições climáticas variáveis, bem como limita a absorção de substâncias tóxicas do ambiente. Sendo assim, o estrato córneo apresenta excelentes propriedades de barreira para a penetração de ativos na pele, o que limita a liberação de um grande número de substâncias por esta via. A maioria dos compostos ativos liberados pelos sistemas transdérmicos convencionais são moléculas pequenas, potentes e relativamente lipofílicas. A administração cutânea de ativos polares e que apresentam carga é particularmente difícil, devido à lipofilicidade intrínseca do estrato córneo.

[026] Apesar da grande utilização e vantagens que a via oral oferece, vários compostos ativos, como os peptídeos, quando administrados por esta via podem ser

inativados por enzimas proteolíticas (metabolismo hepático de primeira passagem), sensibilizados pelo pH do estômago e risco de induzir uma resposta imune. Assim, nos últimos anos tem ocorrido um grande interesse no desenvolvimento de produtos para administração cutânea. Para isso, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de conhecer os mecanismos de permeabilidade cutânea das substâncias ativas.

[027] Os promotores de penetração são compostos químicos que, sozinhos, são farmacologicamente inativos, mas podem interagir com os constituintes do estrato córneo, assim reduzindo a resistência da difusão do fármaco na pele. Um promotor de penetração também pode aumentar a atividade termodinâmica do ativo, assim resultando no fluxo do ativo aumentado. São exemplos, dimetil-sufóxido (DMSO), ureia, solventes orgânicos (ex. etanol), ácidos oléico, ácido caprónico, ésteres graxos (miristato de isopropila, palmitato de isopropila) e tensoativos. A penetração de compostos ativos através da pele depende também das propriedades físico-química de suas moléculas, das formulações, bem como da função barreira da pele no transporte.

[028] A eficácia do Ac-WAhx-KTTKS depende da habilidade do peptídeo penetrar no estrato córneo, permear na epiderme viável, sem significativa interação com os queratinócitos e enzimas proteolíticas, e assim alcançar e atravessar a membrana basal para ser capaz de induzir o seu efeito nas células da derme. No entanto, o estrato córneo é considerado a maior barreira para a penetração do peptídeo.

[029] Deste modo, entender como estes mecanismos

ocorrem é importante para o desenvolvimento de sistemas mais eficientes e inovadores. Principalmente no caso dos peptídeos, onde existem poucos estudos relacionados à sua eficiente penetração na pele.

5 **Sistemas líquido cristalinos e liberação controlada de ativos**

[030] Os sistemas líquidos cristalinos são caracterizados por apresentarem um grau de ordem 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.

[031] Os sistemas líquidos cristalinos podem ser considerados micelas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas. A mesofase líquido cristalina pode ser alcançada pelo aumento da temperatura (termotrópicos) ou pela adição de um solvente (liotrópicos). A classe termotrópica dos sistemas líquidos cristalinos são formadas pela influência da temperatura do sistema, no qual a substância é submetida, ou seja, para a molécula se organizar é necessário uma quantidade de energia disponível proveniente da temperatura, sendo, portanto pouco estáveis.

[032] A classe liotrópica é formada pela associação de uma ou mais substâncias anfifílicas (tensoativos) e um solvente, geralmente a água. A formação destas estruturas leva em consideração a natureza

hidrofílica e lipofílica do tensoativo, ou seja, depende do seu valor de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico), presença de sais, óleos e cotensoativos, assim como a temperatura, estrutura do tensoativo e a proporção dos
5 componentes do sistema. São sistemas termodinamicamente estáveis e podem ser armazenados por longos períodos de tempo sem separação de fase.

[033] Diferentes estruturas líquido cristalinas podem ser formadas, como lamelares, hexagonais ou cúbicas.
10 A fase lamelar é formada por bicamadas paralelas e planas de tensoativos separadas por camadas de solvente, estas estruturas demonstram apresentar maior similaridade com a membrana lipídica intercelular da pele, portanto, são recomendadas principalmente para o desenvolvimento de
15 produtos para administração dérmica. Já na fase hexagonal, os agregados de tensoativos são formados pelo arranjo de cilindros longos, originando estruturas bidimensionais. Na fase hexagonal, chamada de fase hexagonal direta, as moléculas do tensoativo se agrupam em micelas cilíndricas
20 circulares, com água preenchendo o volume entre os cilindros, enquanto que na fase hexagonal reversa os cilindros contêm canais de água circundados pelas cabeças polares do tensoativo e a porção oleosa localizada ao redor dos cilindros. A fase cúbica, as moléculas estão arranjadas
25 numa estrutura tridimensional, a qual consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidos por bicamadas lipídicas ou de tensoativo.

[034] A liberação de compostos ativos na derme e transderme pode ser influenciada pelo tipo de fase formada
30 no sistema líquido cristalino. A fase cúbica pode aumentar

significativamente a retenção de ativos na camada superior da pele (estrato córneo), enquanto que a fase hexagonal pode favorecer a penetração em camadas mais profundas da pele (epiderme e derme) assim como a absorção percutânea.

5 [035] Os sistemas líquidos cristalinos transportadores de compostos ativos são promissores sistemas de liberação controlada de ativos. Tendo como objetivo obter sistemas carregados de ativo, propriedades de liberação, estabilidade do produto final e baixa
10 toxicidade. Outra propriedade de grande importância e destaque dos cristais líquidos é promover o aumento da retenção de água no estrato córneo, proporcionando aumento na hidratação cutânea. Os cristais líquidos podem fisiologicamente integrar a barreira lipídica da pele,
15 ajudando a reforçar a sua integridade, evitando a perda de água e reduzindo os danos de fatores ambientais.

[036] Os sistemas líquido cristalinos liotrópicos apresentam boa penetração devido à baixa tensão interfacial decorrente da interface óleo/água e podem facilitar a
20 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.

[037] Nas últimas décadas, extensas pesquisas com
25 sistemas líquido cristalinos têm sido feitas através do desenvolvimento de diagramas de fases. O diagrama de fases descreve as condições em que os componentes devem ser combinados para formar um sistema específico. Dependendo da razão entre os componentes (tensoativo/fase aquosa/fase
30 oleosa) diferentes arranjos líquido cristalinos podem ser

formados.

[038] As principais técnicas utilizadas para a caracterização das fases líquido cristalinas são a microscopia de luz polarizada (MLP), o espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) e a reologia, onde estudam-se as propriedades físico-químicas internas dos sistemas.

ESTADO DA TÉCNICA

[039] O pedido de patente KR101224519 descreve uma composição cosmética contendo colágeno fermentado com micélio de *Phellinuslinteus* que é fornecida para tratar vários fenômenos de envelhecimento e para maximizar os efeitos de anti-enrugamento, clareamento, e hidratantes. Esse documento em nada se assemelha com a presente invenção, porque apesar de descrever composições com as mesmas finalidades estas não descrevem uma composição contendo o peptídeo AcWahxKTTKS.

[040] O pedido de patente KR20070100329 descreve uma AIMP1 (ARS - proteína multi- funcional de interação 1) ou um fragmento da mesma que é fornecido para ser efetivamente utilizado para estimular a síntese de colágeno e/ou expressar KGF em um sujeito com necessidade do mesmo, tratamento de envelhecimento da pele no sujeito, pele flácida e/ou enrugada, efeitos cutâneos adversos da menopausa. Esse documento em nada se assemelha com a presente invenção, porque não descreve uma composição de sistema líquido cristalino contendo o peptídeo AcWahxKTTKS e, portanto, o mecanismo para estimulação da síntese de colágeno é diferente.

[041] O pedido de patente KR20050010093 refere-se a uma composição cosmética antirrugas contendo o extrato de

raiz de Cúrcuma e curcumina como um ingrediente principal de raiz Cúrcuma. A composição inibe fortemente as atividades da elastase e colagenase e, portanto, promove a síntese de colágeno. Esse documento em nada se assemelha
5 com a presente invenção, porque não descreve uma composição de sistema líquido cristalino contendo o peptídeo AcWahxKTTKS.

[042] O pedido de patente KR20040074795 refere-se a uma composição cosmética incluindo carcinina
10 (descarbóxicarnosina2HCl) tendo efeitos sintéticos e antioxidantes de colágeno. Ele aumenta a síntese de colágeno e tem efeito antioxidante e, portanto, tem excelente nível de segurança para a pele e excelente estabilidade material em composições cosméticas, evitando a
15 formação de rugas no corpo. Esse documento em nada se assemelha com a presente invenção, porque não descreve uma composição de sistema líquido cristalino contendo o peptídeo AcWahxKTTKS.

[043] O pedido de patente JP2003277399 refere-se a
20 um peptídeo que é prontamente absorvido através da pele e apresenta efeito de alívio de rugas melhorado em organismo vivo e um método para produzir o mesmo. Esse documento em nada se assemelha com a presente invenção, porque não descreve uma composição de sistema líquido cristalino
25 contendo o peptídeo AcWahxKTTKS.

Objetivo e Vantagens da Invenção

[044] O objetivo da presente invenção é sintetizar um análogo do peptídeo KTTKS, denominado de AcWAHxKTTKS e desenvolver sistemas líquido cristalinos que facilitem sua
30 penetração na pele para uso em formulações cosméticas

antienvhecimento, antirugas e anti linhas de expressão facial.

[045] O peptídeo AcWahxKTTKS estimula a síntese de colágeno nos fibroblastos, reduzindo ou eliminando, desta forma, as rugas e linhas de expressão na pele. Os atuais agentes antienvhecimento que atuam na síntese do colágeno e que estão disponíveis no mercado apresentam alta irritabilidade e efeitos teratogênicos. Esta invenção visa sintetizar um peptídeo modificado que não possua os efeitos nocivos acima citados e que possua atividade de favorecimento da síntese do colágeno além de fácil penetração na pele.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[046] A presente invenção está relacionada com a melhoria das propriedades físico-químicas do peptídeo KTTKS para potencial penetração na pele. Para isso, foi realizada 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, 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. 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), a fim de ajudar na penetração do AcWahxKTTKS na pele. A Figura 1 mostra estrutura molecular do peptídeo análogo AcWAhxKTTKS.

5 BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[047] A Figura 1 mostra estrutura molecular do peptídeo análogo AcWAhxKTTKS.

[048] A figura 2 mostra esquematicamente o protocolo de síntese utilizado na obtenção do peptídeo.

10 [049] A figura 3 representa graficamente o perfil cromatográfico do peptídeo bruto, contendo impurezas referentes ao processo de síntese.

[050] A figura 4 representa graficamente o perfil cromatográfico do peptídeo puro.

15 [051] A figura 5 representa graficamente o espectro obtido por espectrometria de massas.

[052] A figura 6 representa graficamente a curva dose-resposta para o tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de peptídeo.

20 [053] A figura 7 representa graficamente a curva dose-resposta para o tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de peptídeo.

[054] A figura 8 representa graficamente a curva analítica padrão do colágeno tipo I humano, equação da reta (y) e coeficiente de correlação (R^2).

25 [055] A figura 9 representa graficamente a 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
30 independentes (Média \pm erro padrão).

[056] A figura 10 representa graficamente a 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).

[057] A figura 11 representa graficamente o diagrama de fases ternário contendo éter oleílico de polioxietileno (tensoativo), miristato de isopropila (fase oleosa) e água ultrapura (fase aquosa). As áreas delimitadas representam: fase solução isotrópica (FSI), fase sistema líquido cristalino lamelar anisotrópica (FSLCLA), fase sistema líquido cristalino hexagonal anisotrópica (FSLCHA), fase sistema opaco (FSO), fase sistema emulsionado homogêneo (FSEH) e separação de fases (SF). Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.

[058] A figura 12 mostra as fotomicrografias de microscopia de luz polarizada (MLP) da formulação F2 (10% miristato de isopropila, 70% éter oleílico de polioxietileno e 20% água), sendo F2P contendo peptídeo.

[059] A figura 13 mostra as fotomicrografias de MLP da formulação F7 (10% miristato de isopropila, 50% éter oleílico de polioxietileno e 40% água), sendo F7P contendo peptídeo.

[060] A figura 14 mostra as fotomicrografias de MLP da formulação EM (emulsão O/A), sendo EMP contendo peptídeo.

[061] A figura 15 representa graficamente os espectros de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) das formulações F2, F7 e EM, sendo que a formulação com a

letra P contém o peptídeo.

[062] A figura 16 representa graficamente as curvas de fluxo das formulações F2, F7 e EM, sendo que a formulação com a letra P contém o peptídeo.

5 [063] A figura 17 representa graficamente a curva analítica do peptídeo em solução receptora, equação da reta (y) e coeficiente de correlação (R^2).

[064] A figura 18 representa graficamente a curva analítica do peptídeo em acetonitrila/água (1:1), equação da reta (y) e coeficiente de correlação (R^2).

10 [065] A figura 19 representa graficamente o cromatograma da solução receptora (tampão fosfato pH 7,4). Condições cromatográficas: fases móvel constituídas por solvente A (0,045% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q) e solvente B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetoneitrila), produzindo um gradiente de 10 - 25% de solvente B em 15 minutos de corrida, coluna C18 (0,46 cm - 25 cm, 5 μ m, KROMASIL 300-5C18), fluxo 1 mL/minuto, injeção 50 μ L, detector de fluorescência, detecção à 280 nm em 350 nm e temperatura do forno de 25 °C.

[066] A figura 20 representa graficamente o cromatograma do peptídeo em solução receptora (tampão fosfato pH 7,4). Condições cromatográficas: fases móvel constituídas por solvente A (0,045% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q) e solvente B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetoneitrila), produzindo um gradiente de 10 - 25% de solvente B em 15 minutos de corrida, coluna C18 (0,46 cm - 25 cm, 5 μ m, KROMASIL 300-5C18), fluxo 1 mL/minuto, injeção 50 μ L, detector de fluorescência, detecção à 280 nm em 350 nm e temperatura do

forno de 25 °C.

[067] A figura 21 representa graficamente o perfil de liberação das formulações F2, F7 e EM contendo peptídeo.

[068] A figura 22 representa graficamente os modelos de cinética de liberação das formulações F2 e F7 contendo peptídeo.

[069] A figura 23 representa graficamente o modelo de cinética de liberação da formulação EM contendo peptídeo.

[070] A figura 24 representa graficamente a retenção cutânea do peptídeo nas formulações F2, F7 e EM no estrato córneo e epiderme/derme ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) após 12 horas de ensaio.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Síntese do peptídeo

[071] O peptídeo utilizado neste trabalho foi obtido manualmente pelo método da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS).

[072] 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 é realizada adicionando-se um aminoácido de cada vez por meio de um processo cíclico.

[073] O peptídeo AcWAhxKTTKS foi sintetizado manualmente 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).

[074] 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. 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. Desta forma, 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 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.

[075] A Figura 2 mostra esquematicamente o protocolo de síntese utilizado na obtenção do peptídeo.

30 [076] O perfil cromatográfico do peptídeo bruto,

contendo impurezas referentes ao processo de síntese, pode ser observado na Figura 3.

Purificação

[077] 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 4.

Caracterização por Espectrometria de Massas

[078] O espectro obtido está apresentado na Figura 5, onde 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 1.

Tabela 1. Resultado da síntese.

Peptídeo	Pureza (%) ^a	Tempo de retenção (min)	Massa Molecular (MM) - (g/mol)	
			MM _{Observada}	MM _{Calculada}
AcWAhxKTTKS	> 97,5	10,4	906	905

^a Pureza do material determinado por HPLC.

Avaliação do potencial citotóxico do peptídeo

[079] A avaliação do potencial citotóxico do peptídeo foi realizada através do método de MTT, que tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem o sal MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), através da enzima

desidrogenase presente na mitocôndria, formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. Sendo assim, através da quantificação dos cristais violetas pela espectroscopia de absorção UV-Visível (leitor de ELISA) é possível quantificar a porcentagem de células vivas.

[080] O potencial citotóxico do peptídeo foi avaliado usando as linhagens celulares HepG2, que é uma linhagem de células do hepatoma humano, escolhida por ser um modelo muito utilizado de estudo de células metabolizadoras, permitindo a avaliação da toxicidade do metabólito formado, a partir do produto em estudo, e HaCat, que é uma linhagem de queratinócitos, foi escolhida por se tratar de estudo com ativo para uso tópico, portanto, será aplicado na pele, que tem, na epiderme, como principal tipo celular, o queratinócito.

[081] Foi calculado também o IC_{50} para as diferentes linhagens, isto é, a concentração de peptídeo onde há 50% de viabilidade celular, através da equação da reta da curva analítica. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e as concentrações foram testadas em triplicatas.

[082] Nas Figuras 6 e 7 estão apresentados os resultados obtidos para a linhagem HepG2 e HaCat, respectivamente. Foram construídas duas curvas dose versus resposta, uma para cada linhagem celular, sendo então possível utilizar a equação da reta, gerada por regressão linear, para ser determinada a concentração do peptídeo que é necessária para causar a letalidade de 50% das células (IC_{50}).

[083] A tabela 2 apresenta os valores de IC_{50}

calculados a partir da equação da reta.

Tabela 2. *Valores de IC₅₀ (μmol/L) para as células HepG2 e HaCat tratadas com o peptídeo.*

	1	2	3	Média	Desvio padrão
HepG2	510,96	566,08	497,96	525 ^a	36,16524
HaCat	600,5	567,61	631,8	599,97 ^a	32,09828

^a ANOVA p<0,05, seguido do teste de Tukey

5 [084] Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de IC₅₀ das linhagens celulares.

[085] A concentração do peptídeo para incorporação nas formulações será definida baseada nos valores de IC₅₀ e nos resultados da biossíntese de colágeno, obtendo elevado nível de segurança para aplicação tópica e comprovada efetividade.

10

Biossíntese de colágeno

[086] O ensaio de biossíntese de colágeno *in vitro* do peptídeo em fibroblastos foi realizado através do método Picrosirius-polarização.

15

[087] Inicialmente foi preparada uma curva analítica com varias concentrações de colágeno padrão tipo I humano para posterior comparação com o colágeno produzido no ensaio.

20

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

[089] Os resultados da quantificação da biossíntese de colágeno produzido nas culturas de fibroblasto humano de derme (HDFa) foram obtidos na forma

25

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, apresentada na Figura 8.

5 [090] Na tabela 3 estão listadas as concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 24 de tratamento.

10 **Tabela 3. Concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 24 horas de tratamento.**

Tratamentos	Colágeno ($\mu\text{g/mL}$)	Diferença controle ($\mu\text{g/mL}$) ¹	Colágeno (%) ²
Controle	23,62 \pm 4,5	----	----
5 $\mu\text{mol/L}$	37,17 \pm 2,1	13,55	58
20 $\mu\text{mol/L}$	42,51 \pm 3,6	18,89	80
50 $\mu\text{mol/L}$	41,41 \pm 3,3	17,79	76
100 $\mu\text{mol/L}$	40,96 \pm 3,1	17,34	74
200 $\mu\text{mol/L}$	43,82 \pm 2,6	20,20	86
400 $\mu\text{mol/L}$	42,38 \pm 3,1	18,76	80

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

15 ² Porcentagem de colágeno produzido em relação ao grupo controle

[091] Na Figura 9, 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 cultura.

[092] Após 24 horas foi possível observar alterações significativas na síntese de colágeno nos grupos controle e tratados com várias concentrações do peptídeo. Observa-se também que apartir da concentração de 20 $\mu\text{mol/L}$,

houve um patamar na concentração de colágeno produzido, ou seja, mesmo com o aumento da concentração de peptídeo, não houve aumento significativo na produção de colágeno, mantendo-se na média de 80% de colágeno produzido em relação ao controle.

[093] Na tabela 4 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 horas de tratamento.

10 ***Tabela 4. Concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 48 de tratamento.***

Tratamentos	Colágeno (µg/mL)	Diferença controle (µg/mL) ¹	Colágeno (%) ²
Controle	61,15 ±1,0	----	----
5 µmol/L	95,04 ±8,6	33,89	56
20 µmol/L	97,34 ±8,8	36,19	60
50 µmol/L	97,61 ±2,1	36,46	60
100 µmol/L	99,67 ±8,3	38,52	63
200 µmol/L	101,74 ±7,7	40,59	67
400 µmol/L	109,84 ±3,7	48,69	80

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

15 ² Porcentagem de colágeno produzido em relação ao grupo controle

[094] Na Figura 10, 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 cultura.

[095] Após 48 horas foi possível observar alterações significativas na síntese de colágeno nos grupos

controle e tratados com várias concentrações do peptídeo. A mesma região de patamar foi observada no tratamento de 48 horas, mantendo-se em 60% a mais a produção de colágeno em relação ao controle, exceto para a concentração de 400 $\mu\text{mol/L}$, que produziu 80% a mais de colágeno em relação ao controle.

[096] 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.

10 Desenvolvimento dos sistemas coloidais

[097] O modo mais usual de descrever esses sistemas é através do diagrama de fases ternário, onde fase aquosa, fase oleosa e tensoativo são representadas nos vértices do triângulo em qual cada ponta indica 100% do componente da formulação e o interior do triângulo representa a distribuição isotermal de regiões estruturadas. O diagrama foi construído com os seguintes componentes: éter oleílico de polioxietileno (tensoativo); miristato de isopropila (fase oleosa); Água Ultrapura (fase aquosa). As formulações foram preparadas a frio, misturando primeiramente o tensoativo com a fase oleosa e, por último a fase aquosa.

[098] Uma emulsão foi preparada para estudo comparativo nos ensaios de liberação do peptídeo das formulações, permeação e retenção cutânea, com os sistemas líquido cristalinos escolhidos. Segue na tabela 5 a composição da emulsão.

Tabela 5. Composição da emulsão.

INCI name	%p/p
Olivato de cetearil, olivato de sorbitano	6,00

Manteiga de Karité	2,00
Fenoxietanol, Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno, Butilparabeno, Isobutilparabeno	0,80
Acriloildimetiltaurato de amônio/ VP Copolímero	0,10
Tetrasodium EDTA	0,10
Propileneglicol	1,00
Ciclometicona	0,50
Aqua	q.s.p. 100

[099] Foram preparadas trinta e seis formulações através da construção do diagrama de fases ternário e, após 24 horas de repouso, classificou-as visualmente quanto as suas aparências e consistências.

[100] A Figura 11 apresenta a construção do diagrama de fase contendo éter oleílico de polioxietileno / miristato de isopropila / água ultrapura a $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Neste diagrama foram indentificadas seis fases (regiões): fase solução isotrópica (FSI), fase sistema líquido cristalino lamelar anisotrópica (FSLCLA), fase sistema líquido cristalino hexagonal anisotrópica (FSLCHA), fase sistema opaco (FSO), fase sistema emulsionado homogêneo (FSEH) e separação de fases (SF). As formulações escolhidas para a caracterização estão identificadas no diagrama.

[101] A região de FSI foi obtida com baixas concentrações de água (10 a 20%), intermediárias de óleo (20 a 50%), altas e intermediárias de tensoativo (70 a 40%, respectivamente). O uso do éter oleílico de polioxietileno em altas concentrações (entre 80 e 70%) e em baixas concentrações de água (10 a 20%) permitiu a formação de uma

maior região de FSLCLA, característica provavelmente relacionada com a concentração micelar crítica (CMC) do tensoativo atingida nessas concentrações. Conforme a concentração de água aumentou entre os sistemas, foi possível sugerir que a parte apolar da molécula do tensoativo se protegeu desse aumento de água se agrupando primeiramente em agregados micelares, que por sua vez se organizaram sob a forma de bicamadas na interface água/óleo separando ambas as fases, característica do arranjo líquido cristalino de fase lamelar. Ainda com o aumento da água foi possível observar que esses agregados se organizavam em estruturas cilíndricas bidimensionais, como a de um hexágono, caracterizando assim a fase hexagonal (FSLCHA). Essa mudança de fase provocou alterações relacionadas à anisotropia com a visualização de "estrias", mudanças na distância entre os objetos espalhadores e também alterações relacionadas à viscosidade desses sistemas, características posteriormente confirmadas através da microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) e das medidas reológicas, respectivamente. Também foi possível observar uma pequena região de sistemas opacos de alta viscosidade (FSO), a qual ocorreu em concentrações acima de 40% de água, característica provavelmente relacionada com a formação de possíveis ligações de hidrogênio, do oxigênio presente na molécula do tensoativo com água em excesso, dificultando sua mobilidade em direção

à superfície das gotas de óleo, proporcionando sistemas menos transparentes. Já a formação de sistemas emulsionados homogêneos (FSEH) foi obtida em concentrações intermediárias de fase oleosa (40 a 60%). A separação de 5 fases (SF) ocorreu em altas concentrações de fase oleosa ou aquosa e em baixa concentração de tensoativo.

[102] As formulações escolhidas para estudo estão nas regiões de sistema líquido cristalino anisotrópico lamelar e hexagonal.

10 **Caracterização físico-química dos sistemas coloidais**

[103] As formulações selecionadas foram caracterizadas por determinação do pH, microscopia de luz polarizada (MLP), espalhamento de raio-X a baixo ângulo (SAXS) e reologia. Foram analisadas formulações com e sem 15 peptídeo.

[104] Para caracterização dos sistemas foram selecionadas as formulações indicadas na Figura 11, cujas concentrações dos componentes estão apresentadas na tabela 6. A emulsão preparada foi utilizada para comparação com os 20 SLC nos ensaios. As formulações contendo peptídeo tiveram seu nome acrescido da letra P.

Tabela 6. Composição (%) dos sistemas líquido cristalinos para caracterização.

Formulação	Fase oleosa	Tensoativo	Fase aquosa
F2	10	70	20
F7	10	50	40

Determinação do pH

[105] Foi observado que as formulações apresentaram pH dentro da faixa de pH da pele, numa faixa de 4,98 a 6,35, quando o peptídeo foi incorporado não houve
5 variação do pH das formulações.

Microscopia de luz polarizada (MLP)

[106] A MLP é um método importante na determinação estrutural de sistemas líquido cristalinos, mas não pode ser considerada uma técnica conclusiva. Portanto, a
10 continuidade dos estudos de caracterização das formulações foi realizada com a técnica de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).

[107] A Figura 12 apresenta as fotomicrografias da formulação F2 correspondentes ao comportamento estrutural dos sistemas sem e com o peptídeo. A formulação F2
15 apresentou áreas anisotrópicas, evidenciando a presença de estruturas semelhantes a "cruzes de malta", as quais são características de fase lamelar. Aparentemente a incorporação do peptídeo não promoveu alterações
20 significativas na estrutura do sistema.

[108] A Figura 13 apresenta as fotomicrografias da formulação F7 correspondentes ao comportamento estrutural dos sistemas sem e com o peptídeo. A formulação F7
25 apresentou áreas anisotrópicas, evidenciando a presença de estruturas semelhantes a "estrias", as quais são características de fase hexagonal. Aparentemente a

incorporação do peptídeo não promoveu alterações significativas na estrutura do sistema.

[109] A Figura 14 apresenta as fotomicrografias da formulação EM, sem e com o peptídeo. Na formulação EM não foi observado áreas anisotrópicas, evidenciado por um "campo escuro", o mesmo ocorreu com a formulação com o peptídeo. As moléculas de tensoativo das emulsões simples se organizam em forma de micelas, não podendo ser observadas por MLP.

10 [110] De acordo com os resultados acima, observou-se diferentes estruturas que podem ser formadas com a modificação da composição dos sistemas, por exemplo, quanto maior a quantidade de água do sistema, mais estruturado o sistema tende a ficar. 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. A organização interna da fase hexagonal pode estar relacionada com o arranjo ocorrido entre os três componentes constituintes das formulações, principalmente entre a água e o tensoativo. Com o aumento da quantidade da

15

20

25

água e conseqüente diminuição do tensoativo, a disposição do tensoativo no sistema pode se rearranjar para outras formas. Quando as forças de solvatação no lado da água são maiores que aquelas no lado do óleo, o filme de tensoativo se curva em direção à fase óleo, assumindo uma configuração positiva assim, promovendo organizações mais rígidas e mais complexas, típicas de fase hexagonal.

Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

[111] A Figura 15 apresenta os espectros de SAXS composto pela intensidade de espalhamento, $I(q)$, em função do vetor de espalhamento (q), das formulações F2, F7 e EM sem e com peptídeo. As distâncias de correlação determinadas pelo ensaio de SAXS estão apresentadas na tabela 7.

15 **Tabela 7.** As distâncias de correlação determinadas pelo ensaio de SAXS das formulações F2, F7 e EM, sendo que a amostra com a letra **P** contém peptídeo.

Formulação	d	Fase
F2	2: 3	Lamelar
F2P	2: 3	
F7	1,70: 2: 2,5: 3	Hexagonal
F7P	1,73: 2: 2,6: 3	
EM	----	----
EMP	----	

[112] Nota-se a presença de picos estreitos e definidos para as formulações F2 e F7 com e sem o peptídeo, indicando um maior nível de organização estrutural destes

sistemas. Através do valor da posição do vetor de espalhamento (q_{max}) da formulação F2, foi possível o emprego da relação $d = 2\pi/q_{max}$. Assim, determinou-se a distância entre os objetos espalhadores através da razão 1:2:3:4:5, o que equivale a um arranjo líquido cristalino de periodicidade de fase lamelar. Para a formulação F7 foi observado uma menor distância entre os objetos espalhadores, portanto, arranjos mais organizados foram obtidos. O emprego da relação $d = 2\pi/q_{max}$ determinou a distância entre os objetos espalhadores através da razão $\sqrt{1}:\sqrt{3}:\sqrt{4}$, revelando uma periodicidade em um arranjo líquido cristalino de fase hexagonal. Porém, sugere-se ainda a presença de uma mistura de fase hexagonal com lamelar, como observado nos valores de d obtidos pela curva de SAXS na tabela 7. No espectro da formulação EM não foi visualizado picos e sim apenas um máximo de intensidade num valor $q \neq 0$, seguido de uma longa cauda, característica do perfil de espalhamento de arranjos menos organizados, como sistemas micelares. Os resultados de SAXS corroboram com os resultados de MLP, onde observamos na formulação F2 "cruzes de malta", caracterizando fase lamelar, na formulação F7 "estrias", caracterizando fase hexagonal e na formulação EM "campo escuro". As distâncias de correlação calculadas através do SAXS confirmaram a estruturação observada nas fotomicrografias da MLP e para as formulações com o peptídeo incorporado observamos que todas apresentaram praticamente sobreposição das curvas, assim sugerindo que a incorporação do peptídeo não alterou a estrutura do sistema.

[113] A caracterização reológica dos sistemas selecionados 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.

[114] Na Figura 16 estão apresentadas as curvas de fluxo das formulações F2, F7 e EM sem e com peptídeo.

[115] Os reogramas apresentados na figura 28 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 F2, F7 e EM.

[116] Todas as formulações apresentam perfil da curva característico de um fluido plástico, onde é necessária uma tensão inicial para o fluido escoar na direção do fluxo, diminuindo a sua resistência interna e a viscosidade, em função da taxa de cisalhamento. Esta característica é desejável a produtos de aplicação tópica, em que após o cisalhamento a resistência inicial para a formulação fluir diminui, refletindo a facilidade de aplicação.

[117] As formulações apresentam tixotropia, isto é, grande habilidade de voltar à estrutura inicial após a perturbação do sistema, devido à área de histerese entre a curva ascendente e descendente, ou seja, após ter sofrido o cisalhamento crescente ($0-100 \text{ s}^{-1}$), com a redução gradual deste cisalhamento até que cessasse, não foi observada uma recuperação total da estrutura. Foi observada diferença estatisticamente significativa nos valores de área de

histerese das formulações, o mesmo não ocorreu entre a formulação e a formulação incorporada de peptídeo, conforme apresentado na tabela 8.

Tabela 8. Área de histerese das formulações F2, F7 e EM, sendo que a formulação com a letra **P** contém o peptídeo.

	1	2	3	Média	Desvio Padrão
F2	7622	6674	4258	6184,667 ^a	1734,563
F2P	5247	5167	3352	4588,667 ^a	1071,731
F7	1183	1012	959	1051,333 ^b	117,0655
F7P	879	942	865	895,3333 ^b	41,01626
EM	2244	2200	2103	2182,333 ^c	72,14107
EMP	2783	2772	2764	2773 ^c	9,539392

ANOVA $p < 0,05$ seguida do teste de Tukey.

[118] Através das curvas de fluxo, foi possível avaliar o melhor modelo reológico que descreve o comportamento dos fluidos analisados. As formulações são melhores descritas pela equação de Herschel-Bulkley, que tem a seguinte equação:

$$\tau = \tau_0 + K\gamma^n$$

[119] Os valores correspondentes as variáveis presentes na equação de Herschel-Bulkley para as formulações, estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Média dos parâmetros que descrevem as formulações F2, F7 e EM, de acordo com o modelo reológico de Herschel-Bulkley.

	τ_0	K	n
F2	57,91	7,63	0,5098

F2P	81,78	7,41	0,4222
F7	70,23	16,45	0,9426
F7P	125,03	15,79	0,9043
EM	7,63	12,42	0,4191
EMP	3,12	12,64	0,3807

[120] Os valores de K e n obtidos caracterizam o índice de consistência e o índice de comportamento de fluxo, respectivamente. O índice de consistência indica o grau de resistência do fluido diante do escoamento, ou seja, quanto maior o valor de K , mais viscoso será o fluido. O índice de comportamento de fluxo quando apresentar valor menor que 1, determina que o fluido é do tipo não-Newtoniano, pseudoplástico, como já foi observado nas curvas de fluxo.

10 **Liberção do peptídeo, permeação e retenção cutânea in vitro**

[121] Após a avaliação da citotoxicidade e biosíntese de colágeno do peptídeo, foi determinada a concentração ideal, assim 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, garantindo assim que o composto ativo fique retido na concentração e local desejado.

[122] Foram avaliadas três formulações diferentes (F2, F7 e EM) contendo de 200 a 290 mol/L do peptídeo. Tal procedimento foi adotado para que fosse possível avaliar se a formulação tem influência no perfil de liberação, permeação e retenção cutânea e, sobretudo, para que a

partir da concentração de liberação, permeação e retenção cutânea fosse possível avaliar a efetividade e segurança destas formulações, no que diz respeito aos ensaios de biossíntese de colágeno e avaliação da citotoxicidade do peptídeo.

[123] Para a quantificação do peptídeo liberado da formulação, que permeou e ficou retido na epiderme e derme foi utilizada a CLAE. Para isso, foram utilizadas as curvas analíticas construídas com concentrações do peptídeo usando como solventes, o tampão fosfato (pH 7,4) e a uma solução de acetonitrila/água (1:1), mostradas nas Figuras 17 e 18. Na avaliação da liberação do peptídeo e da permeação cutânea, o tampão fosfato (pH 7,4) foi usado como solução receptora e, na avaliação da retenção do peptídeo no estrato córneo e na epiderme/derme, a solução de acetonitrila/água (1:1) foi utilizada para a extração do ativo da membrana biológica.

[124] As condições "sink" foram garantidas, uma vez que a solubilidade do peptídeo em solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) é de 4,553 mol/L.

Análise de interferentes

[125] Foi injetada em CLAE a solução receptora e o peptídeo, em uma concentração conhecida, dissolvido em solução receptora para verificação da sua influência nos ensaios de liberação e permeação. Os resultados obtidos estão nas Figuras 19 e 20.

[126] Verifica-se nas Figuras 19 e 20, que a solução receptora não influencia a análise, pois não foi observado pico no mesmo tempo de retenção do peptídeo.

Avaliação da cinética de liberação do peptídeo *in vitro*

[127] 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.

[128] 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 concentrações obtidas foram aplicadas na Equação:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c$$

Onde: $Q_{\text{real}, t}$ = 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).

[129] Através destes valores, foram elaboradas as tabelas 10, 11 e 12, para cada formulação. O coeficiente de variação (CV) foi calculado através da equação:

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

Onde: DP é o desvio padrão

M é a média das seis replicatas

Tabela 10. Liberação do peptídeo da formulação F2.

Tempo (h)	Q_{real} ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
0,5	0,26	0,81	7,6

1	0,42	1,29	5,5
2	0,73	2,21	6,2
4	1,13	3,45	4,5
6	1,75	5,35	4,2
8	2,43	7,42	4,7
10	3,29	10,05	3,6
12	4,43	13,52	4,5

Tabela 11. Liberação do peptídeo da formulação F7.

Tempo (h)	Qreal ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
0,5	0,15	0,45	7,9
1	0,37	1,10	3,6
2	0,69	2,03	3,1
4	1,10	3,26	3,3
6	1,57	4,62	8,2
8	2,04	6,02	3,2
10	2,51	7,40	6,9
12	2,90	8,56	5,4

Tabela 12. Liberação do peptídeo da formulação EM.

Tempo (h)	Qreal ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	%	CV (%)
0,5	1,61	4,75	5,4
1	1,66	4,89	8,9
2	2,65	7,81	6,9
4	4,09	12,06	6,6
6	5,03	14,83	6,9
8	4,93	14,55	4,8
10	5,43	16,03	5,5
12	6,09	18,00	8,6

[130] Observa-se que o CV do ensaio de liberação do peptídeo está dentro dos limites especificados pelo SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products*, 2006), ou seja, menores que 10%.

5 [131] Após 12 horas de avaliação, foi verificada maior porcentagem de liberação do peptídeo na formulação EM (18%). Nesta formulação o ativo está solubilizado na fase aquosa da emulsão e, esta não possui estruturas muito ordenadas, assim a difusão do peptídeo é favorecida, uma
10 vez que as barreiras para a difusão do ativo são menores. As formulações F2 e F7 liberaram de forma controlada o peptídeo dos sistemas, sendo que uma menor porcentagem liberada após 12 horas é observada para a formulação F7, em comparação com a F2. Isto ocorre provavelmente em função do
15 arranjo estrutural existente neste sistema (fase hexagonal). A mobilidade das moléculas do ativo é diminuída devido à presença de barreiras físicas existentes em razão da formação dos cilindros de tensoativo da fase líquido cristalina. Já na formulação F2, a liberação do ativo foi
20 um pouco maior devido à presença de lamelas de tensoativo, que proporcionam uma melhor mobilidade do ativo, pois são estruturas menos rígidas. Nas formulações F2 e F7, o ativo pode estar presente na interface tensoativo-água ou ainda interagindo com a fase aquosa localizada no exterior dos
25 cilindros, fase hexagonal, e entre as lamelas, fase lamelar. A Figura 21 apresenta o perfil de liberação do peptídeo nas formulações.

[132] Sugere-se que a liberação do peptídeo contido nas formulações foi influenciada pelo arranjo
30 estrutural presente nos SLC, e não pela viscosidade dos

sistemas. Pois não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de viscosidade dos sistemas, como mostrado nas medidas reológicas em Caracterização dos Sistemas Coloidais.

5 [133] As formulações são capazes de liberar o peptídeo nelas contidos, assim permitindo que o mesmo tenha contato com a pele para estar liberado para a penetração cutânea. Uma vez disponível para penetração na superfície da pele, a penetração e permeação do ativo irão depender da
10 capacidade destes em atravessar a camada córnea, e de características como lipofilicidade e tamanho da molécula.

[134] Foi avaliado também, o modelo de cinética de liberação do peptídeo nas formulações. Para isto, foram aplicados três modelos matemáticos para interpretação da
15 cinética de liberação: zero ordem, primeira ordem e modelo de Higuchi. Os modelos cinéticos foram avaliados através da linearização dos dados da liberação de acordo com o tempo e porcentagem do ativo liberado. O modelo de zero ordem representa a relação entre a quantidade real de peptídeo
20 liberado ($\mu\text{mol/L}$) em função do tempo; o modelo de primeira ordem representa o logaritmo da porcentagem de peptídeo liberado em função do tempo; o modelo de Higuchi representa a quantidade real de peptídeo liberado ($\mu\text{mol/L}$) em função da raiz quadrada do tempo. Para a escolha do modelo mais
25 adequado foi utilizado o coeficiente de correlação (R^2), que se aproxima da perfeita linearidade. Na tabela 13 estão apresentados os R^2 da linearização das curvas dos perfis de liberação do peptídeo nas formulações.

Tabela 13. Coeficiente de correlação (R^2) das formulações F2, F7 e EM dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi.

Formulação	Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi
F2	0,9769	0,9419	0,9068
F7	0,9968	0,8312	0,9829
EM	0,9076	0,8244	0,9671

[135] Para as formulações F2 e F7, o modelo matemático que melhor se aplicou foi o de zero ordem e para a formulação EM, foi o modelo de Higuchi. A Figura 22 apresenta o gráfico de cinética de liberação das formulações F2 e F7 e a Figura 23 apresenta o gráfico de cinética de liberação da formulação EM.

10 [136] 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
15 quantidade de ativo por unidade de tempo, o que é ideal para alcançar ação farmacológica prolongada. 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 e hexagonal que controlam a
20 liberação do ativo.

[137] O modelo de Higuchi descreve a liberação do ativo por um processo de difusão de substâncias contidas nos sistemas matriciais. Este modelo foi o qual melhor se ajustou a formulação EM.

[138] Através da análise dos resultados obtidos, é possível dizer que o perfil reológico de formulação EM pode ter interferido de maneira significativa no perfil de liberação do peptídeo da formulação, devido a sua alta viscosidade conferida pelo polímero sintético (acriloldimetiltaurato de amônio / VP copolímero) contido na fase aquosa da formulação, cujo lugar o ativo está solubilizado.

Avaliação da permeação cutânea in vitro do peptídeo

AcWAh_xKTTKS contido nas formulações

[139] 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.

[140] Na avaliação da permeação cutânea do peptídeo AcWAh_xKTTKS contido nas formulações F2, F7 e EM, não foi possível quantificar o peptídeo permeado. Isto ocorreu porque a quantidade de peptídeo que permeou foi muito pequena ou inexistente. Assim, a quantificação não foi possível devido à quantidade de peptídeo permeado estar abaixo do limite de quantificação e detecção.

Avaliação da retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo AcWAh_xKTTKS contido nas formulações

[141] A tabela 14 apresenta os resultados de retenção do peptídeo no estrato córneo e na epiderme/derme empregando as formulações F2, F7 e EM após 12 horas de experimento.

Tabela 14. Retenção cutânea do peptídeo nas formulações após 12 horas de experimento ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$).

Formulação	F2	F7	EM
Estrato córneo ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	1,96 ($\pm 24,9$)	1,08 ($\pm 18,5$)	5,65 ($\pm 17,6$)
Epiderme/Derme ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)	3,43 ($\pm 19,3$)	1,04 ($\pm 2,1$)	0

[142] Os valores representam as médias e os coeficientes de variação referentes a cinco determinações.

[143] A Figura 24 demonstra os valores obtidos no ensaio de retenção cutânea das formulações, no estrato 5 córneo e epiderme mais derme.

[144] Na retenção cutânea o coeficiente de variação (CV) ficou entre 2 e 25%. Segundo o (SCCP/0970, 2006), os resultados de absorção cutânea devem ser reprodutíveis, utilizando-se um mínimo de seis amostras e o 10 CV deve ser inferior a 30%. O CV no ensaio de retenção é maior do que no ensaio de liberação porque e as espessuras da camada córnea, epiderme e derme são variáveis, promovendo assim, variações na permeabilidade cutânea.

[145] A Figura 24 mostra que as formulações F2 e 15 F7 apresentaram uma retenção média na epiderme/derme de 3,43 e 1,04 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ do peptídeo, sendo equivalente a 10% e 3% do peptídeo incorporado nas formulações, respectivamente. Portanto, a concentração de peptídeo da formulação F2, que atingiu as camadas mais profundas da 20 pele, foi superior. A formulação EM não apresentou retenção na epiderme/derme do peptídeo.

[146] O perfil de retenção no estrato córneo também pode ser observado na Figura 24, e verifica-se que a formulação EM ficou 100% retida nesta camada (5,65 25 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Nas formulações F2 e F7, observa-se uma retenção

no estrato córneo maior para a formulação F7, quando comparada com a retenção na epiderme/derme.

[147] Os resultados obtidos com as formulações F2 e F7 são satisfatórios, pois podemos dizer que 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 deve ter ação.

[148] Com base nestes resultados, podemos dizer que se 100% do peptídeo tivesse ficado retido na derme nas formulações F2 e F7, possivelmente teríamos uma produção de colágeno de 70% para a formulação F2 e 21% para a formulação F7 em 24 horas de ensaio.

Conclusões

[149] As técnicas de caracterização estrutural revelaram a formação do peptídeo análogo AcWAhxKTTKS. Os resultados revelaram ainda que este peptídeo foi capaz de promover um aumento de cerca de 80% na produção de colágeno em células de fibroblastos presentes na derme humana.

[150] Foi possível obter sistemas líquido cristalinos lamelares e hexagonais contendo o peptídeo AcWAhxKTTKS que atuaram como sistemas de liberação controlada do mesmo.

[151] As formulações líquido cristalinas avaliadas favoreceram a penetração do peptídeo AcWAhxKTTKS até o local alvo (derme) em quantidade suficiente para promover um aumento na biossíntese de colágeno.

REIVINDICAÇÕES

1. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender as seguintes etapas:

- acoplamento;
- 5 - desproteção;
- lavagem.

2. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de utilizar a estratégia Fmoc para a proteção do grupo α -amino.

10 3. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de utilizar a resina Fmoc-Ser(tBu)-Wang, com um grau de substituição de 0,64 mmol/g.

15 4. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato da etapa de acoplamento compreender: ativadores N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/ N-hidroxibenzotriazol (HOBt) para ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido acoplante durante duas horas de agitação utilizando como
20 solvente 50% de dimetilformamida (DMF) em diclorometano (DCM).

25 5. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADA** pelo fato de os Fmoc-aminoácidos e os ativadores serem utilizados com um excesso de duas vezes em relação à quantidade de sítios ativos livres iniciais na resina.

30 6. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADA** pelo fato de o valor do excesso ser calculado utilizando-se a escala de síntese de 0,2 mmol.

7. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de a etapa de desproteção do grupo amino ser realizada por meio da reação com uma solução de piperidina 20% em dimetilformamida (DMF) durante 1 hora e 20 minutos.

8. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **CARACTERIZADA** pelo fato de as etapas de acoplamento e desproteção serem realizadas por passos cíclicos intercalados por lavagens para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos.

9. Síntese do peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **CARACTERIZADA** pelo fato de ao final da síntese o triptofano ser acetilado com anidrido acético por 30 minutos, sob agitação.

10. Peptídeo AcWahxKTTKS **CARACTERIZADO** pelo fato de ser sintetizado pelo método da síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9.

11. Peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender modificações na sequência peptídica KTTKS.

12. Peptídeo AcWahxKTTKS, de acordo com as reivindicações 10 ou 11, **CARACTERIZADO** pelo fato de as modificações compreenderem a adição de uma molécula de ácido aminocapróico e de um resíduo de tripfano.

13. Uso do peptídeo AcWahxKTTKS, como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de ser no preparo de composições cosméticas ou dermofarmacêuticas contendo o mesmo para

antienvelhecimento, tratamento de rugas e linhas de expressões faciais.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de as composições compreenderem sistemas líquido cristalinos.

15. Uso, de acordo com as reivindicações 13 ou 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de os sistemas líquido cristalinos serem compostos por tensoativo, fase oleosa e fase aquosa.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de o tensoativo ser o éter oleílico de polioxietileno.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de a fase oleosa ser o miristato de isopropila.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 15, **CARACTERIZADO** pelo fato de a fase aquosa ser água ultrapura.

19. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 18, **CARACTERIZADO** pelo fato das formulações de sistema líquido cristalino estarem nas regiões anisotrópico lamelar e hexagonal.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato das formulações de sistema líquido cristalino da região anisotrópico lamelar serem compostas por 10% de fase oleosa, 70% de tensoativo e 20% de fase aquosa.

21. Uso, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato das formulações de sistema líquido cristalino da região hexagonal serem compostas por 10% de fase oleosa, 50% de tensoativo e 40% de fase aquosa.

22. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 a 21, **CARACTERIZADO** pelo fato das formulações compreenderem de 200 a 290 $\mu\text{mol/L}$ do peptídeo.

23. Uso, de acordo com qualquer uma das
5 reivindicações 13 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de as formulações compreenderem sistemas de liberação controlada.

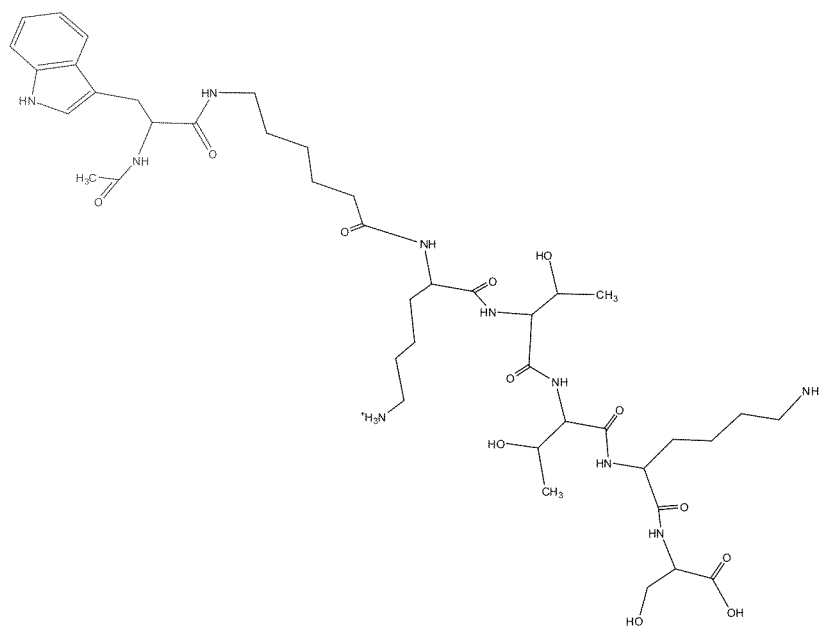


Figura 1

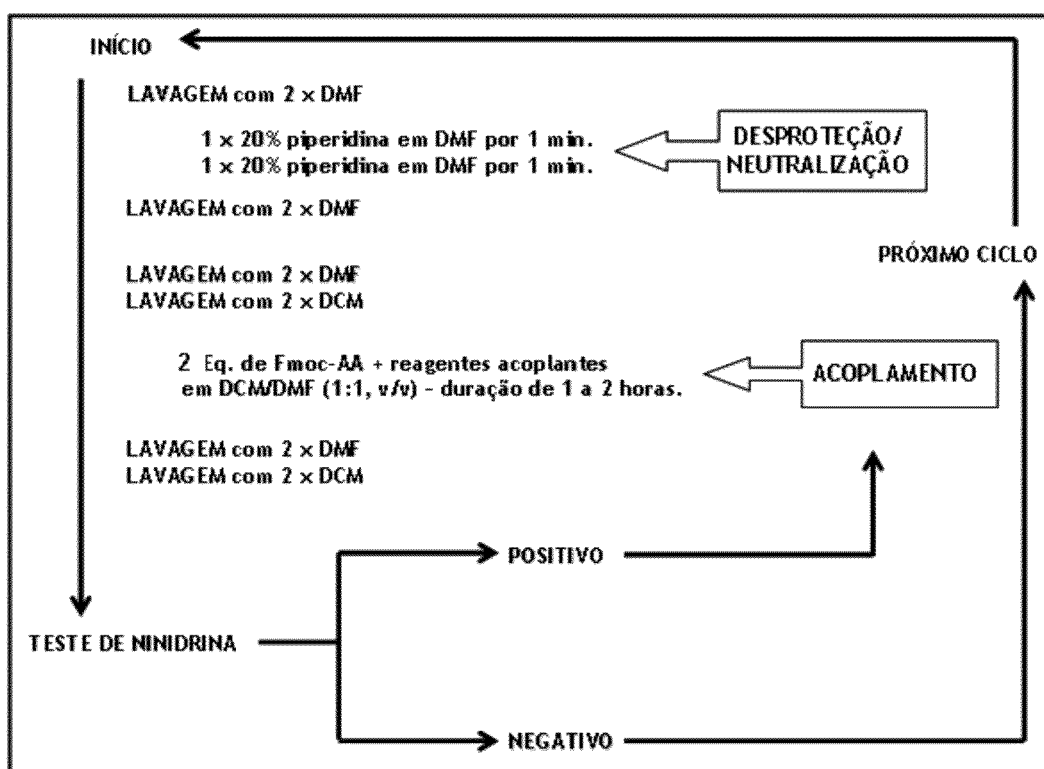


Figura 2

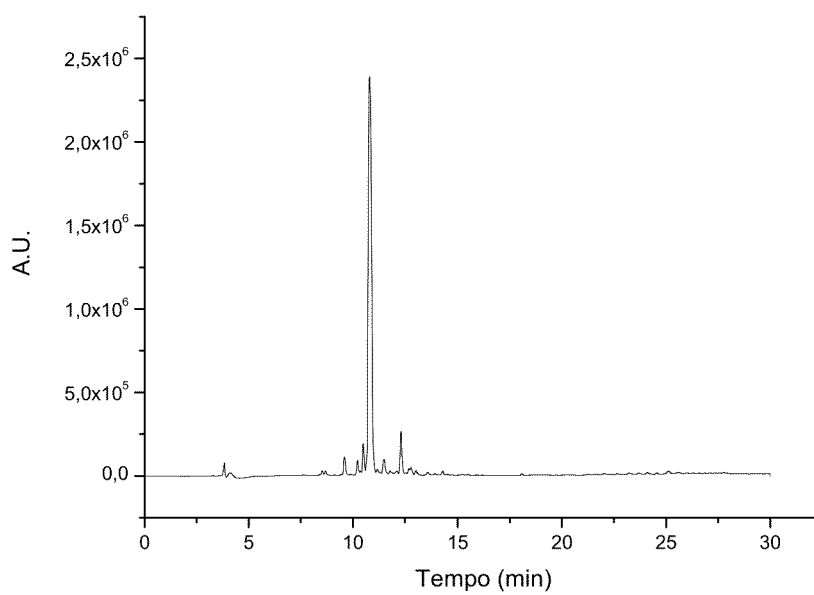


Figura 3

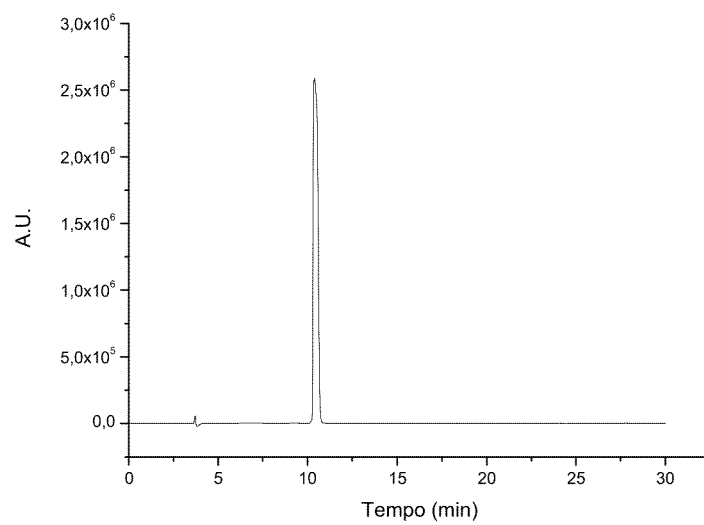


Figura 4

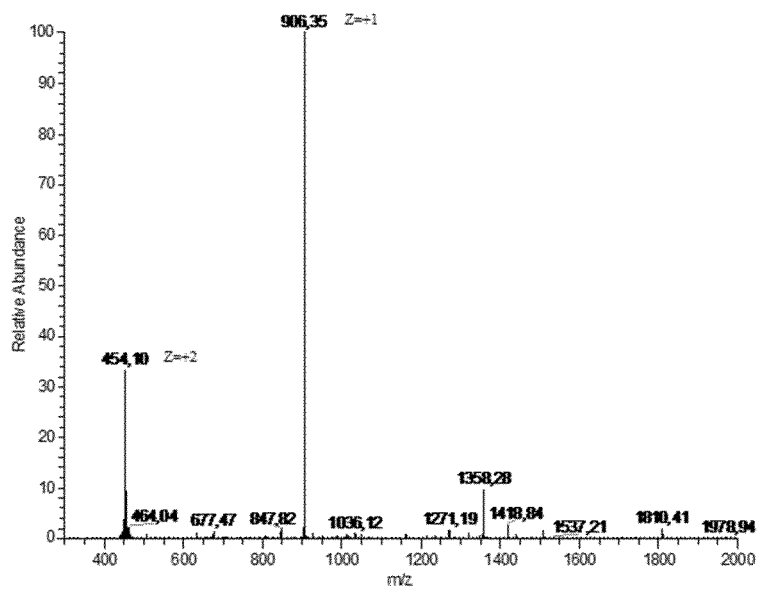


Figura 5

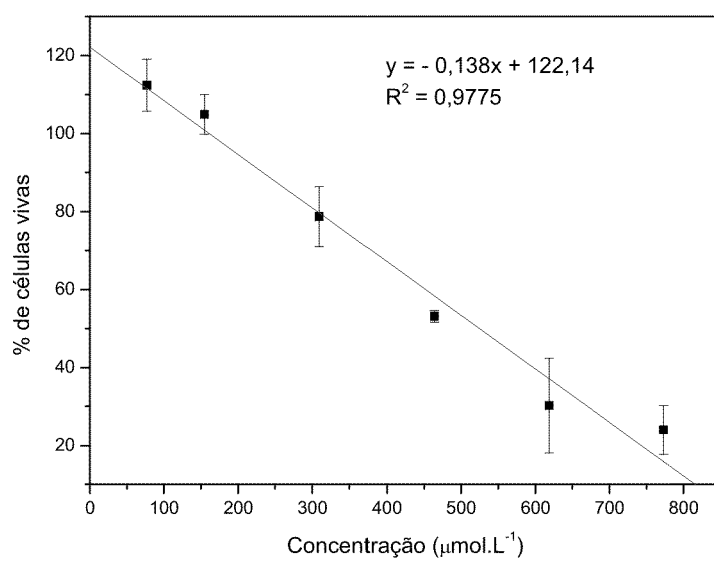


Figura 6

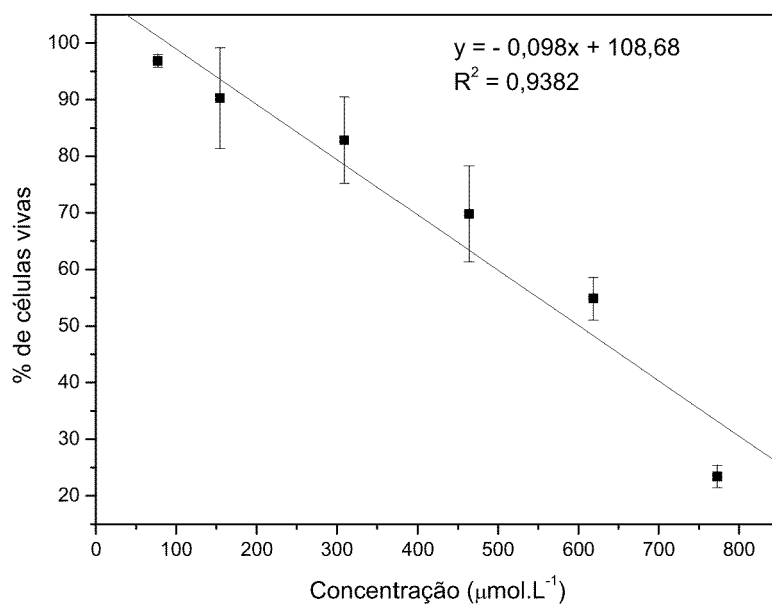


Figura 7

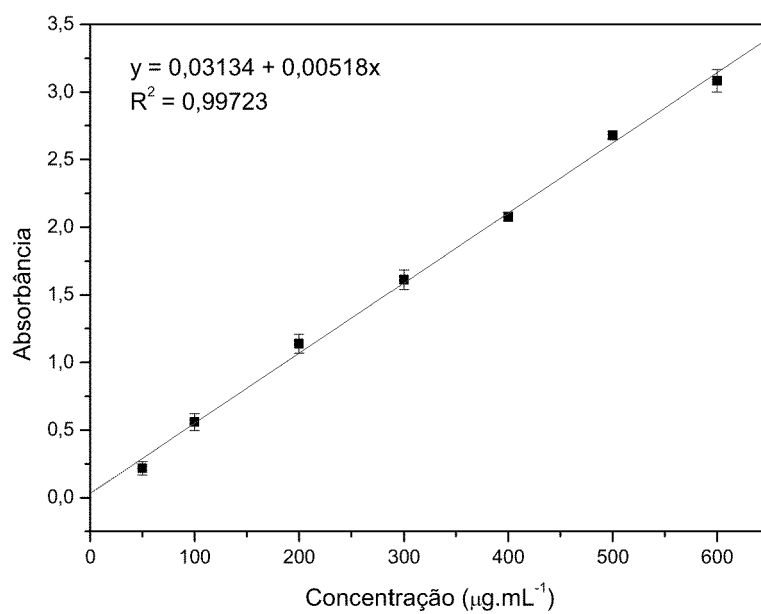


Figura 8

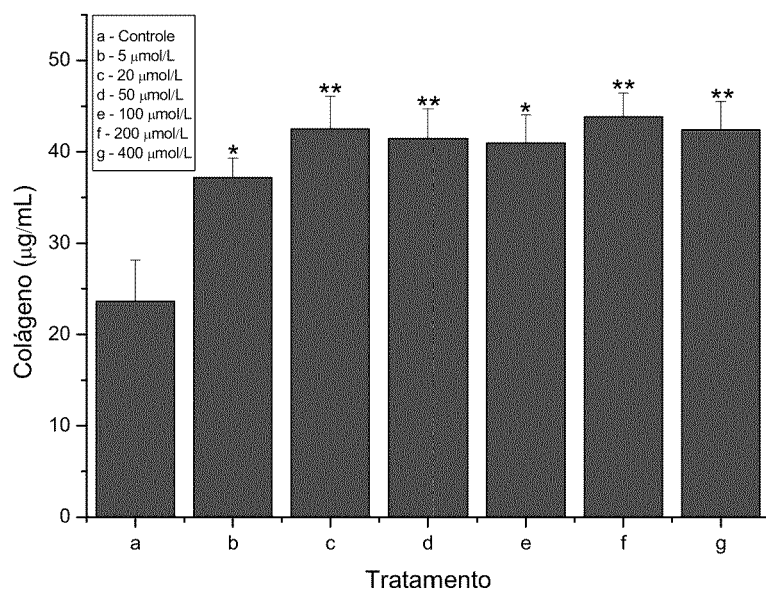


Figura 9

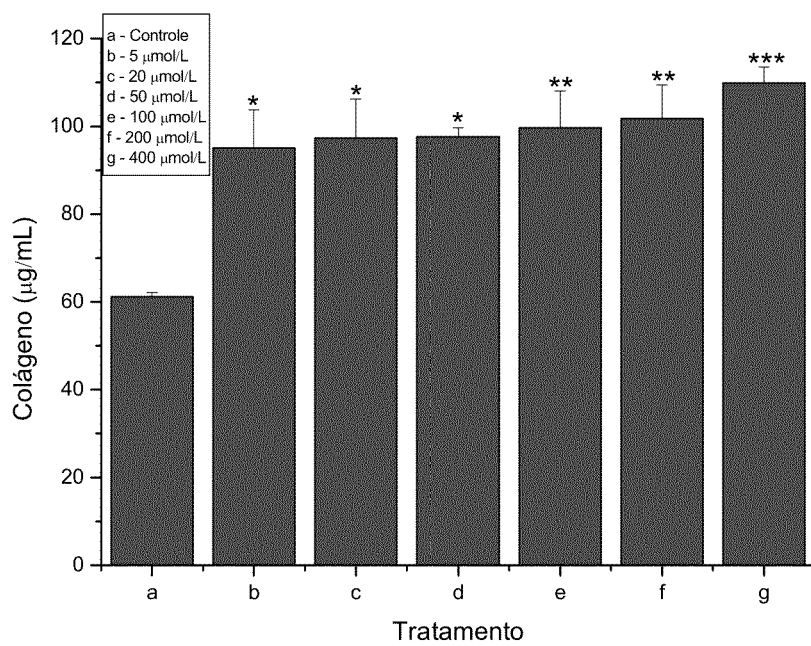


Figura 10

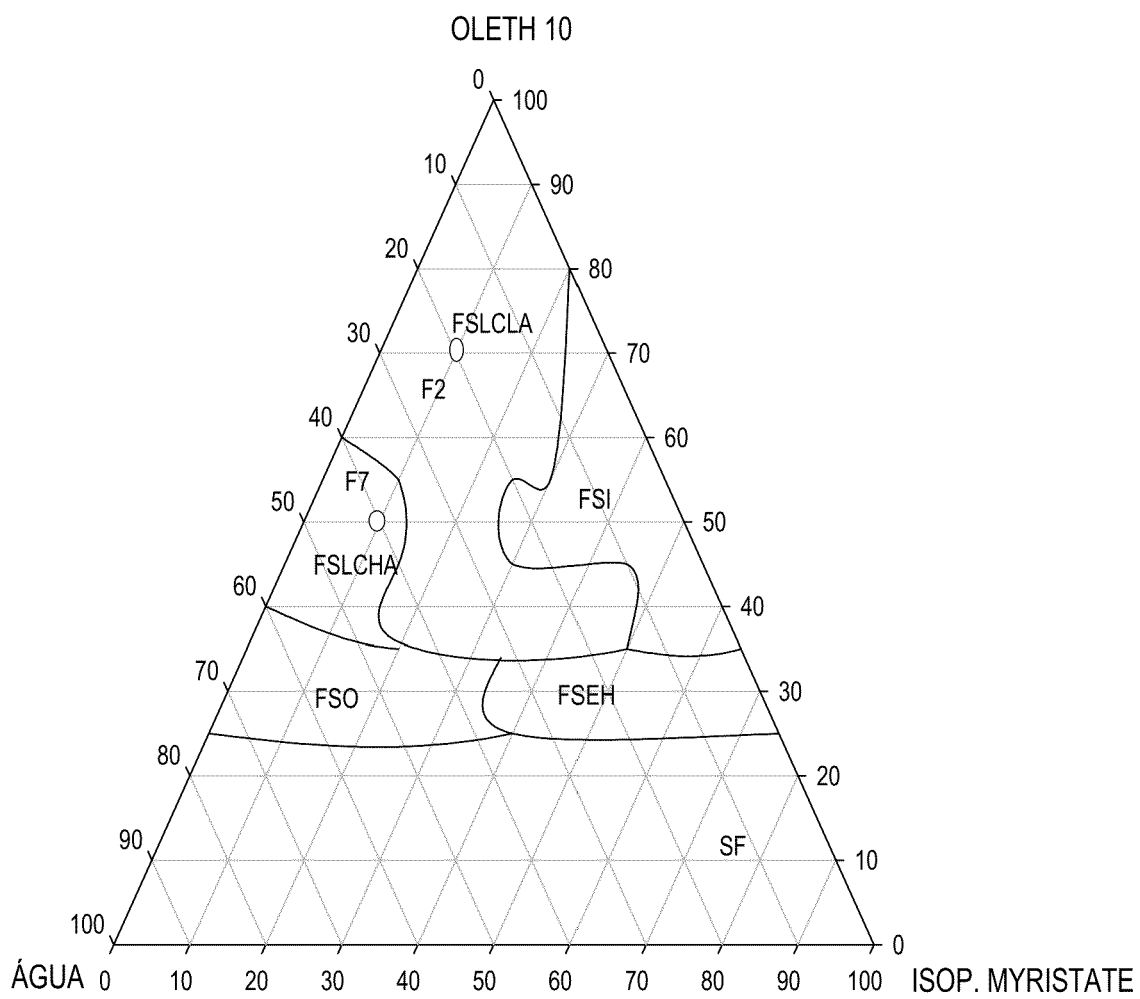


Figura 11

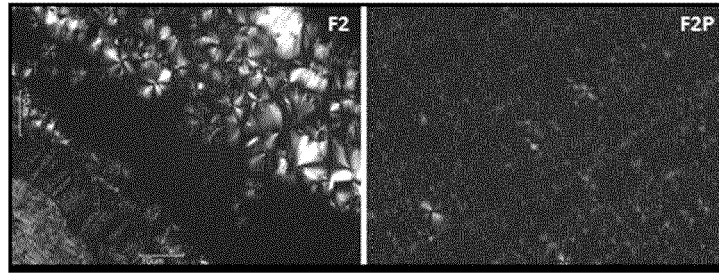


Figura 12

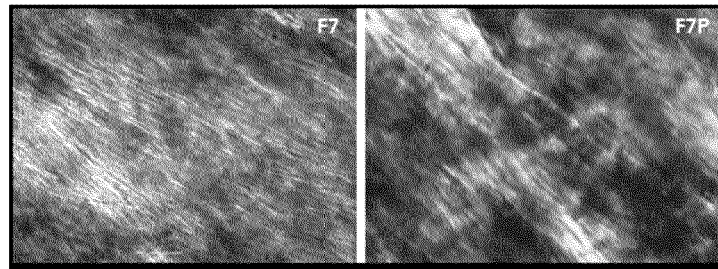


Figura 13

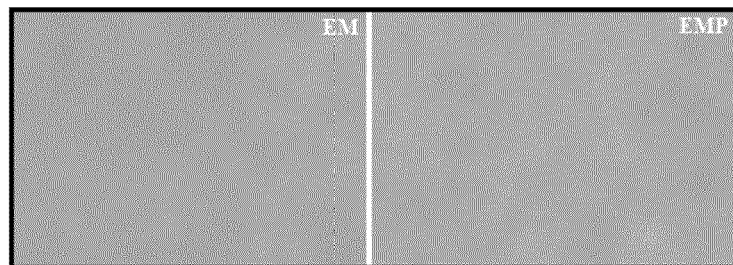


Figura 14

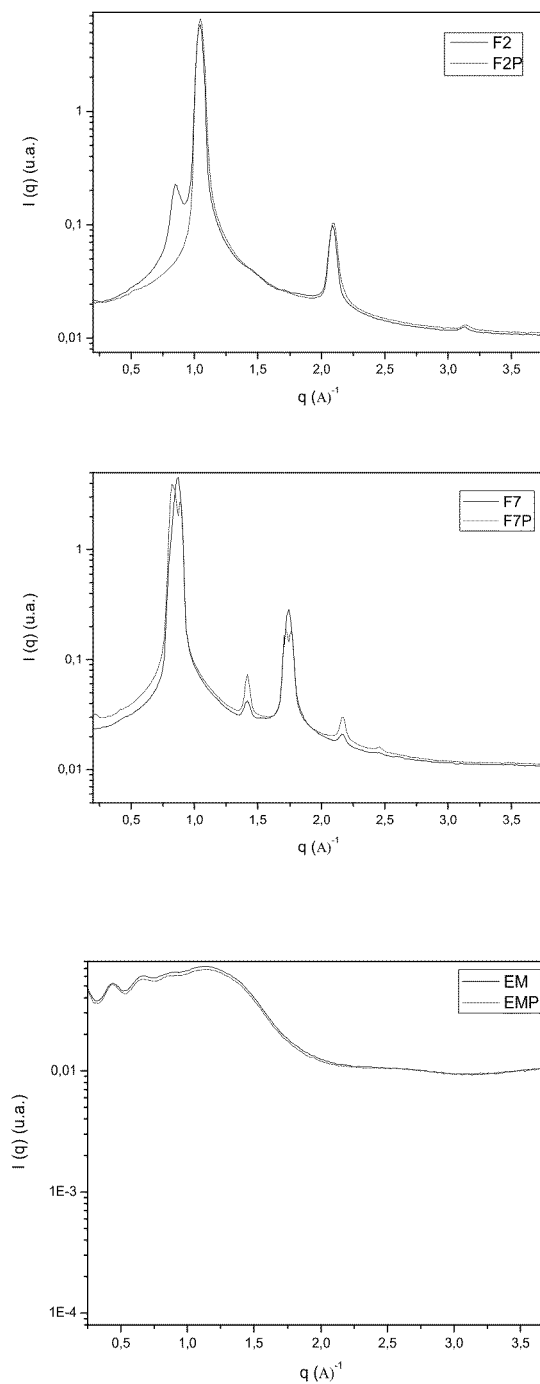


Figura 15

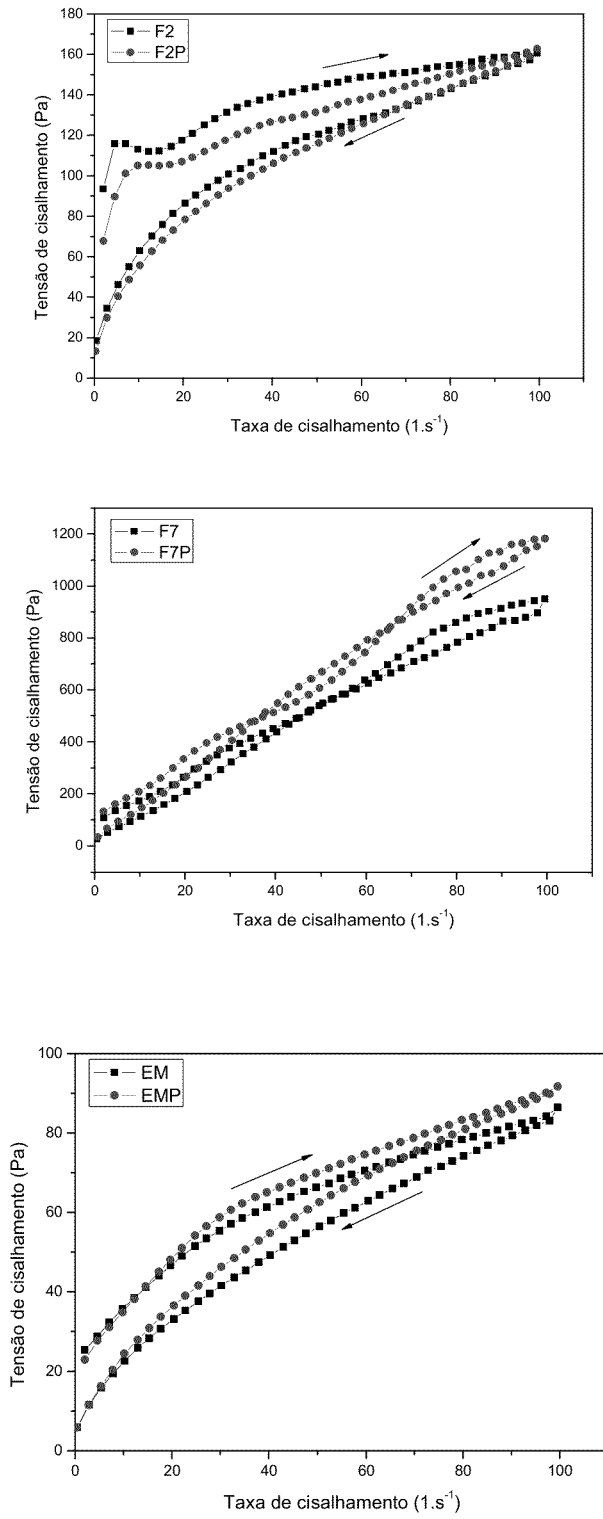


Figura 16

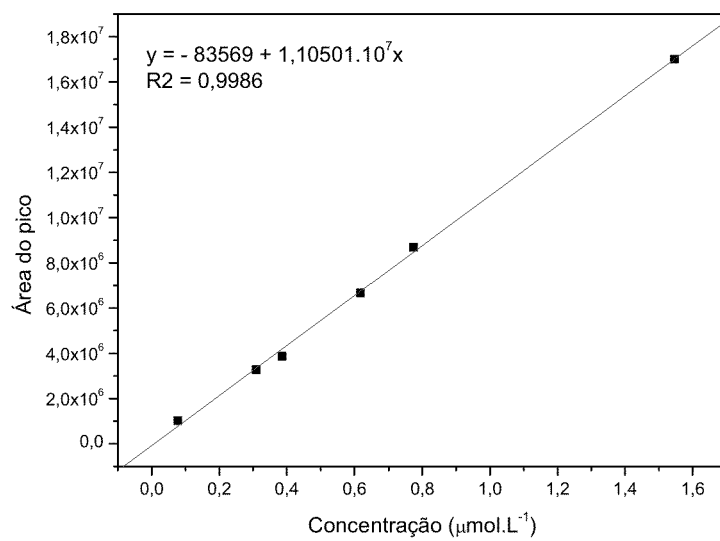


Figura 17

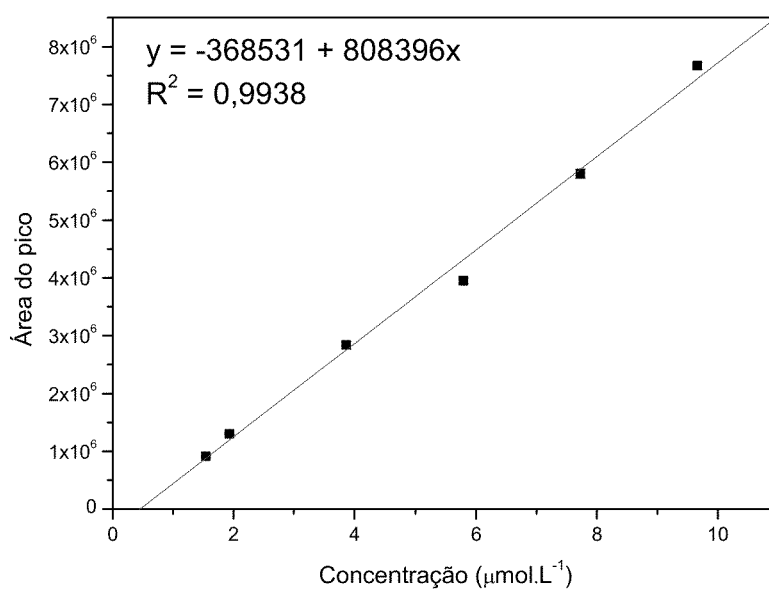


Figura 18

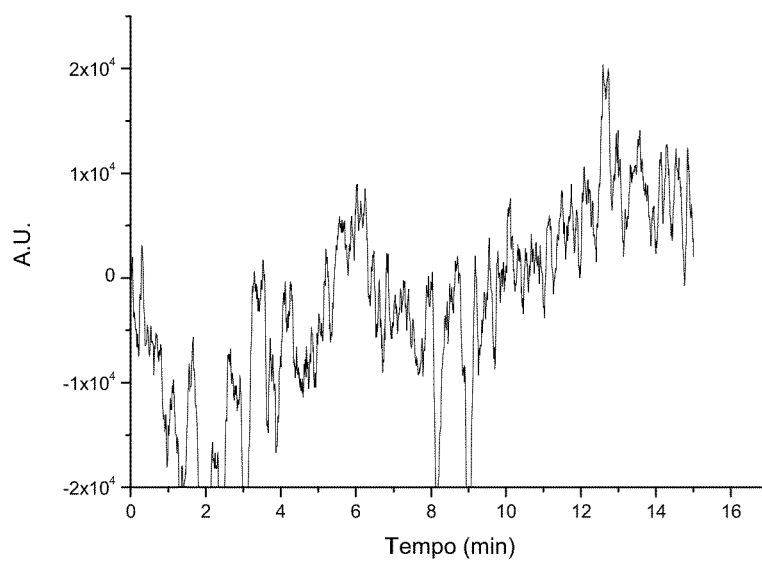


Figura 19

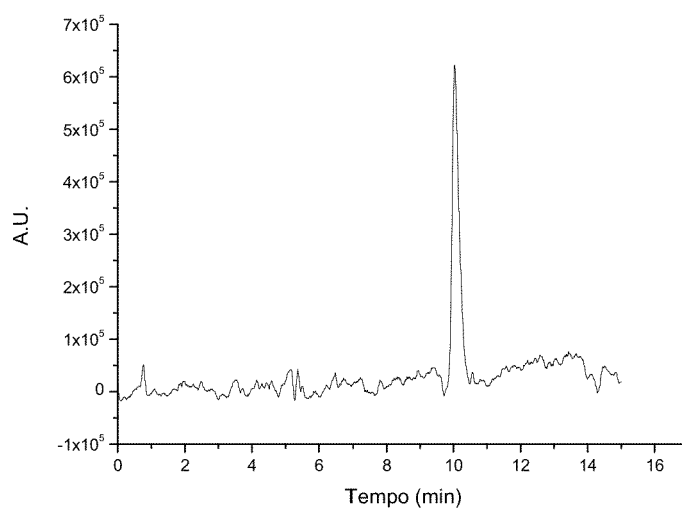


Figura 20

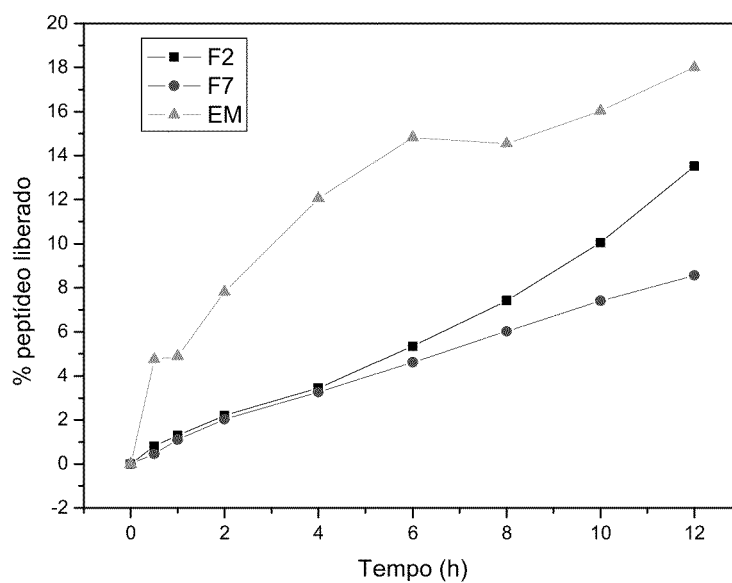


Figura 21

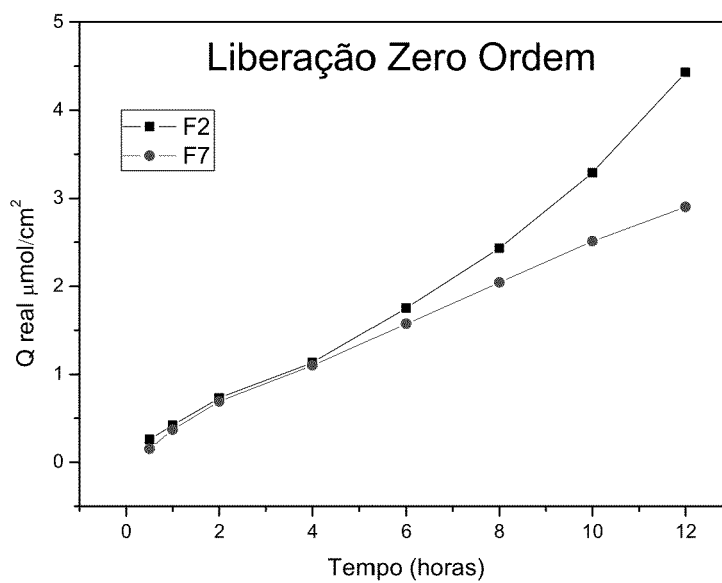


Figura 22

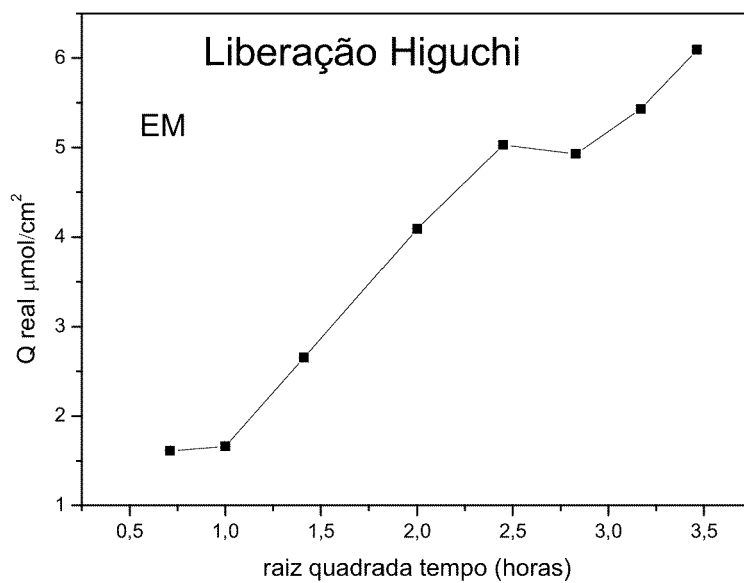


Figura 23

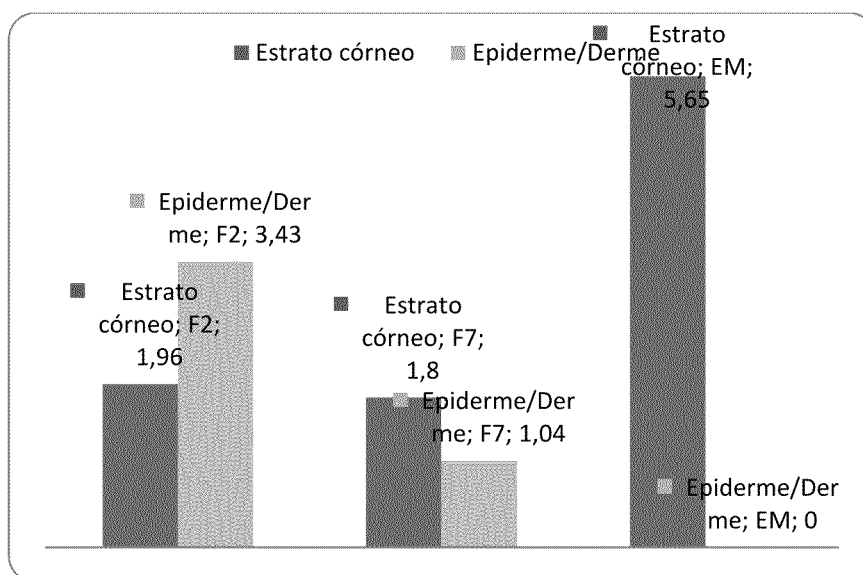


Figura 24

Resumo

“SÍNTESE DO PEPTÍDEO AcWahxKTTKS, PEPTÍDEO AcWahxKTTKS E SEU USO”

A presente invenção apresenta a síntese do peptídeo
5 AcWahxKTTKS, onde foi adicionada à “sequência mãe” (KTTKS)
uma molécula de ácido capróico, que é um ácido graxo
insaturado composto por 6 átomos de carbono, encontrado
naturalmente nas gorduras e óleos minerais, para conferir
um grau de lipofilicidade ao peptídeo e favorecer na
10 permeabilidade do mesmo na pele. Adicionou-se também o
triptofano, que é um aminoácido aromático essencial para a
nutrição humana, visando proporcionar fluorescência ao
peptídeo e assim quantificá-lo na pele através de um método
mais eficiente e sensível. O triptofano foi acetilado para
15 diminuir a interação do peptídeo com a água, a fim de
ajudar na penetração do peptídeo na pele. O peptídeo
AcWahxKTTKS estimula a síntese de colágeno nos
fibroblastos, reduzindo ou eliminando, desta forma, as
rugas e linhas de expressão na pele.