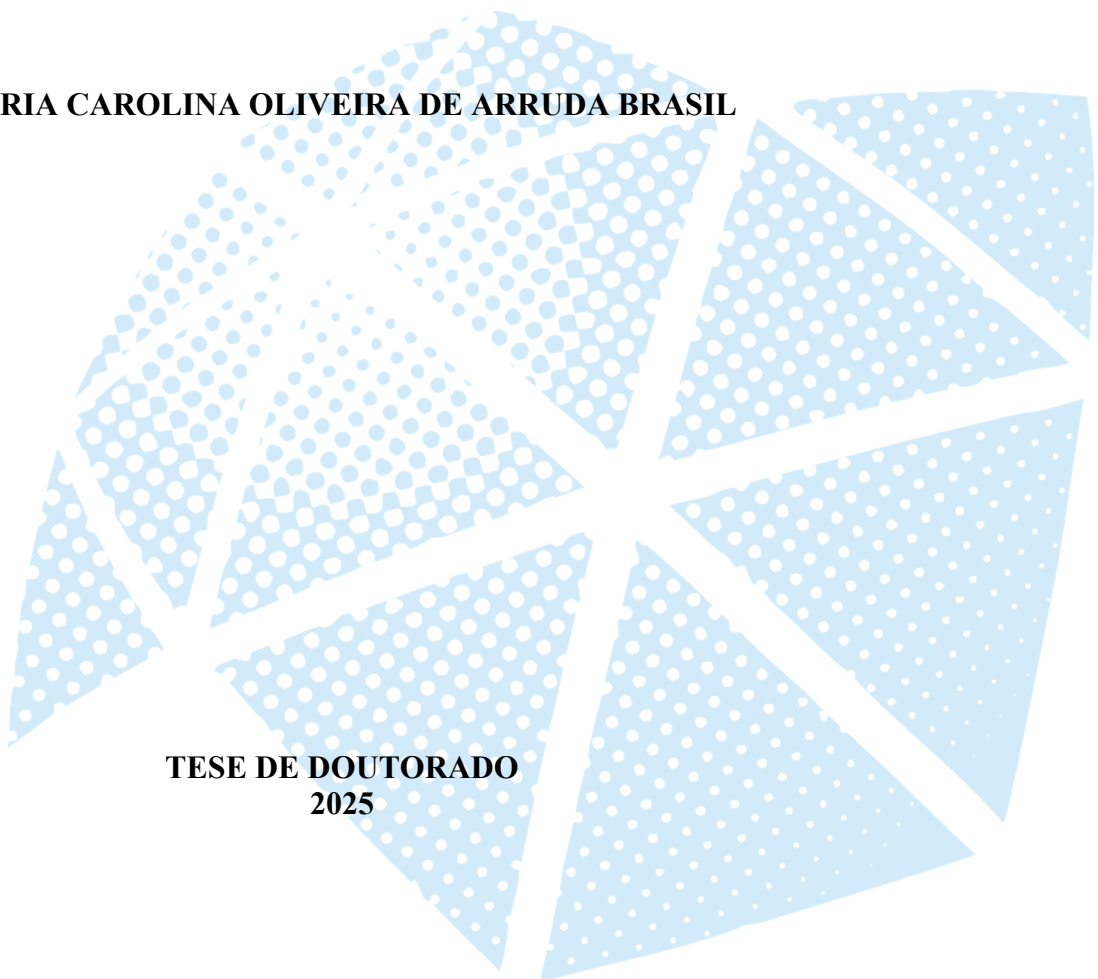


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA -UNESP
Instituto De Química De Araraquara

**USO DA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA NA OBTENÇÃO DE NOVOS
COMPOSTOS COM APLICAÇÃO COSMÉTICA**

MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL

TESE DE DOUTORADO
2025



MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL

**“USO DA SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA NA OBTENÇÃO DE
NOVOS COMPOSTOS COM APLICAÇÃO COSMÉTICA”**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara
2025

B823u Brasil, Maria Carolina Oliveira de Arruda
Uso da síntese de peptídeos em fase sólida na obtenção de novos
compostos com aplicação cosmética / Maria Carolina Oliveira de
Arruda Brasil. -- Araraquara, 2025
131 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara
Orientador: Eduardo Maffud Cilli

1. Peptídeos. 2. Cosméticos. 3. Química verde. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Os peptídeos são moléculas que apresentam um amplo espectro de ação. Devido a essa característica e à possibilidade de editar suas sequências para aprimorar a atividade frente a alvos específicos, eles têm despertado crescente interesse nas indústrias farmacêutica e cosmética. Este trabalho teve como objetivo desenvolver novos peptídeos com ação cosmética voltada para a redução da produção de sebo e do aparecimento de rugas, além de empregar estratégias de química verde em sua obtenção, visando minimizar o uso de solventes nocivos ao meio ambiente e reduzir a geração de poluentes durante o processo de produção.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Peptides are molecules with a broad spectrum of biological activity. Their modifiable sequences allow for targeted enhancements, making them increasingly appealing to both the pharmaceutical and cosmetic industries. This study aimed to develop novel peptides with cosmetic potential, specifically targeting the reduction of sebum production and wrinkle formation. Additionally, green chemistry strategies were employed to minimize the use of environmentally harmful solvents and reduce pollutant generation throughout the synthesis process.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Uso da síntese de peptídeos em fase sólida na obtenção de novos compostos com aplicação cosmética"

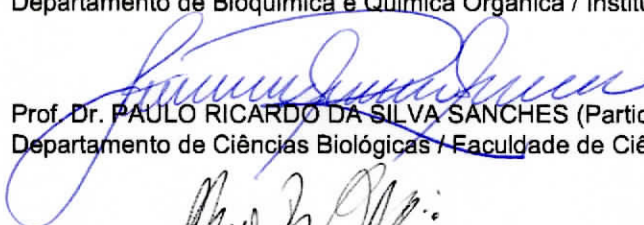
AUTORA: MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA BRASIL

ORIENTADOR: EDUARDO MAFFUD CILLI

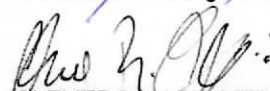
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. PAULO RICARDO DA SILVA SANCHES (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



R&D Manager CLEVERSON ROGERIO PRINCIVAL (Participação Presencial)
Síntese Orgânica / Chemyunion Ltda - Sorocaba

Dr. JAFF RIBEIRO DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Bromatológicas / Faculdade de Farmácia - UFBA - Salvador



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Presencial)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 04 de julho de 2025

DADOS CURRICULARES

Nome

Maria Carolina Oliveira de Arruda Brasil

Nome em citações bibliográficas

BRASIL, M. C. O. A.; ARRUDA BRASIL, M.C.O.; BRASIL, MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA.

Endereço profissional

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química,
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica
Rua Professor Francisco Degni, 55
Jardim Quitandinha, Araraquara, São Paulo

Endereço eletrônico

mcoabrasil@gmail.com

mcoa.brasil@unesp.br

Formação Acadêmica/Titulação

2021- Atual

Doutoranda em Biotecnologia

Instituto de Química/ UNESP – Araraquara, São Paulo, Brasil

Título: Uso da síntese de peptídeos em fase sólida na obtenção de novos compostos com aplicação cosmética.

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

Bolsista: MAI/DAI Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq

2019 - 2021

Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química/ UNESP – Araraquara, São Paulo, Brasil

Título: Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-Bth TX-I)₂K com peptídeo antimicrobiano ou com peptídeos de penetração celular.

Orientador: Eduardo Maffud Cilli

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES

2013 - 2017

Graduação em Biotecnologia

Universidade Federal de Uberlândia, UFU

Título: Atividade antimicrobiana do extrato metanólico total e frações de *Calliandra dysantha Benth.*

Orientador: Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

Formação Complementar

2023 - 2023

Treinamento Operacional do FP-8250, com o conteúdo: apresentação funcional do Espectrofluorímetro e suas características, inicialização e modo de operação do equipamento. Treinamento Operacional do Software Spectra Manager 2.5 com o conteúdo: Parametrização e realização de leitura e processamento dos resultados, com duração de (Carga horária: 4 horas).

JASCO

2022 - 2022

Curso de curta duração em Comunicação e Escrita Científica (Carga horária: 4 h 30 min).

American Chemical Society

2022 - 2022

Curso de curta duração Waters Fall Back to Basics (Carga horária: 4 horas).

Waters Corporation

2022 - 2022

Curso de curta duração em Princípios de espectrometria de massas aplicada ao sequenciamento de peptídeos (Carga horária: 4 horas).

Embrapa Gado e Leite.

2020 - 2020

Curso de curta duração em Biossegurança em laboratórios: diagnóstico Sars-Cov2 (Carga horária: 1 hora).

Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas, UFU, Brasil

2018 - 2018

Curso de curta duração em Ciência de animais de laboratório (Carga horária: 8 horas).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

2013 - 2013

Curso de curta duração em Nivelamento de matemática para alunos ingressantes na Universidade (Carga horária: 8 horas).

Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas, UFU, Brasil

2013 – 2013

Curso de curta duração em Nivelamento de química para alunos ingressantes na Universidade (Carga horária: 8 horas).

Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas, UFU, Brasil

Atuação Profissional

Instituto Vitanova

2024 – Atual

Vínculo: Analista de Desenvolvimento Pleno.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP

2021 – 2024

Vínculo: Aluna, bolsista. Enquadramento funcional: Doutoranda

Especificação: Bolsa MAI/DAI CNPq

2019 – 2021

Vínculo: Aluna, bolsista. Enquadramento funcional: Mestranda

Especificação: Bolsa CAPES

Laboratório de Síntese e Estudos de Biomoléculas – LASEBio

2018 – 2019

Vínculo: Aluna, bolsista. Enquadramento funcional: Apoio Técnico

Especificação: Bolsa CNPq

Instituto de Química de Araraquara – IQ - UNESP

2017 – 2017

Vínculo: Estágio.

Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Brasil

2016 – 2017

Vínculo: Aluna, bolsista. Enquadramento funcional: Iniciação científica

Especificação: Bolsa PBIC/FPEMIG.

2015 – 2016

Vínculo: Representante acadêmico. Enquadramento funcional: Coordenadoria de Comunicação.

2015 – 2015

Vínculo: Monitora. Enquadramento funcional: Monitora da disciplina de Físico-química.

2014 – 2015

Vínculo: Representante acadêmico. Enquadramento funcional: Coordenadoria de Comunicação.

Projetos de Pesquisa

2021 - Atual

Uso da síntese de peptídeos em fase sólida na obtenção de novos compostos com aplicação cosmética.

2019 - Atual

Potencial antimicrobiano do peptídeo desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³(p-Bth TX-I)₂K com peptídeo antimicrobiano ou com peptídeos de penetração celular.

2017 - 2017

Atividade antimicrobiana do extrato metanólico total e frações de *Calliandra dysantha Benth.*

2015 - 2016

Avaliação da qualidade microbiológica de carne bovina in natura e produtos cárneos comercializada em açougues de Patos de Minas – MG.

Prêmios e Títulos

2021

Menção honrosa ao trabalho “Effects of the cowpea Gln-Asp-Phe peptide daily administration in rats fed a saturated high-fat diet”, First Canadian Peptide and Protein Community Virtual Symposium.

2020

Planejamento e Sínteses dos Peptídeos Indolicidina e Análogos, V Congresso de Ensino Pesquisa e Extensão – V CONEPE

2020

Síntese e Avaliação Microbiológica do peptídeo Indolicidina e Análogos, XIX Curso de Inverno em Bioquímica e Biologia Molecular.

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

- DE SOUZA, J.V.M.; COSTA, N.C.S.; BRASIL, M.C.O.A.; DOS ANJOS, L.R.; DE MENEZES, R.P.B.; ZAMPIERI, E.H.; DE LIMA, J.S.; VELASQUEZ, A.M.A.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; GRAMINHA, M. A. S.; GONZALEZ, E. R. P.; CILLI, E. M. Guanidines Conjugated with Cell-Penetrating Peptides: A New Approach for the Development of Antileishmanial Molecules. **Molecules**, v. 30, p. 264, 2025
- ROCHA, KAIO CÉSAR ANTUNES; BRASIL, MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA; CILLI, EDUARDO MAFFUD; SALAY, LUIZ CARLOS. Molecular Interactions of the Antimicrobial Peptide Trirpticin with Mixed Nanoaggregates: A Fluorescence Spectroscopy Study. **Protein And Peptide Letters**, v. 32, p. 1, 2025.

- METZ, GERMÁN ERNESTO; AZCURRA, MIRIAM BEATRIZ; DE SOUZA, GUILHERME SASTRE; DE ARRUDA BRASIL, MARIA CAROLINA OLIVEIRA; CILLI, EDUARDO MAFFUD; LORENZÓN, ESTEBAN NICOLÁS. Inactivation of Equine Arteritis Virus by Indolicidin Peptide. **International Journal Of Peptide Research And Therapeutics**, v. 31, p. 1-5, 2025.
- KATEKAWA, E.; ARRUDA BRASIL, M. C. O.; PRINCIVAL, C. R.; PADOVANI, G.; ESTEVES-PEDRO, N. M.; MUSSI, L.; CAMARGO JUNIOR, F. B.; MAGALHÃES, W. V.; GUIDO, R. V. C.; CILLI, E. M. Effect of Tripeptide-85 (EVF) on Sebogenesis. **Clin Exp Dermatol**, v. 9, p. 223, 2024.
- DIAS, LUANA MENDONÇA; CILLI, EDUARDO MAFFUD; MEDEIROS, KARINE SOUSA; BRASIL, MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA; MARIN, LINA MARIA; SIQUEIRA, WALTER L.; PAVARINA, ANA CLAUDIA. Antibiofilm Activity and Biocompatibility of Temporin-SHa: A Promising Antimicrobial Peptide for Control of Fluconazole-Resistant Candida albicans. **Microorganisms**, v. 12, p. 99, 2024.
- COSTA, NATALIA C. S.; DOS ANJOS, LUANA RIBEIRO; DE SOUZA, JOÃO VICTOR MARCELINO; BRASIL, MARIA CAROLINA OLIVEIRA DE ARRUDA; MOREIRA, VITOR PARTITE; GRAMINHA, MARCIA A. S.; LUBEC, GERT; GONZALEZ, EDUARDO RENE P.; CILLI, EDUARDO MAFFUD. Development of New Leishmanicidal Compounds via Bioconjugation of Antimicrobial Peptides and Antileishmanial Guanidines. **ACS Omega**, v. 2023, p. 1, 2023.
- ASSANE, INÁCIO MATEUS; SANTOS-FILHO, NORIVAL ALVES; DE SOUSA, ELIELMA LIMA; DE ARRUDA BRASIL, MARIA CAROLINA OLIVEIRA; CILLI, EDUARDO MAFFUD; PILARSKI, FABIANA. Cytotoxicity and antimicrobial activity of synthetic peptides alone or in combination with conventional antimicrobials against fish pathogenic bacteria. **Journal Of Applied Microbiology**, p. jam.15080, 2021.

Trabalhos publicados em anais de eventos

- BRASIL, M. C. O. A.; PRINCIVAL, C. R.; KUCHENBECKER, V.; KATEKAWA, E.; MAGALHÃES, W. V.; CILLI, E. M. Use Of Green Solid Phase Peptide Synthesis to Obtain Tripeptide-85. In: **37th European Peptide Symposium and 14th International**

Peptide Symposium, Florence, 2024. *Journal of Peptide Science*, 2024: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/psc.3642>.

- KUCHENBECKER, V.; PRICIVAL, C. R.; BRASIL, M. C. O. A.; CILLI, E. M.; PADOVANI, L. M.; CAMARGO JUNIOR, F. B.; GUIDO, R. V. C.; MAGALHÃES, W. V.; KATEKAWA, E. Desing and Green Synthesis of a Novel Tripeptide for Sebum control In vitro and clinical Studies. In: **47^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, 2024.
- ARRUDA BRASIL, M. C. O.; ASSEF, S. M.; GUIMARÃES, J. P. N., PRINCIVAL, C. R.; KUCHENBECKER, V.; KATEKAWA, E.; MAGALHÃES, W. V.; CILLI, E. M. Testing green solvents for solid-phase peptide synthesis. In: **53rd Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, Águas de Lindóia, 2024.
- SOUZA, J. V. M.; NOGUEIRA, J. P. G.; COELHO, N. C. S.; ANJOS, L. R. D.; BRASIL, M. C. O.; GONZALES, E. R. P.; GRAMINHA, M. A. S.; CILLI, E. M. Bioconjugation of cell penetrating peptide and guanidine as anti-leishmanial compounds. In: **53rd Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, Águas de Lindóia, 2024.
- SANTORO, G.A., COELHO, N.C.S., ANJOS, L.R.D., BRASIL, M.C.O.A., BRANDÃO, S.T.R., NUNES, L.O.C., GONZALES, E.R.P., GRAMINHA, M.A.S., CILLI, E.M. Bioconjugation strategies of guanidinic compounds with temporin peptides as a new tool for developing leishmanicidal drugs. In: **53rd Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, Águas de Lindóia, 2024.
- NUNES, L. O. C., NAVEGANTE, G., ARRUDA BRASIL, M. C. O., VALENTE, V., CILLI, E. M., SANTOS-FILHO, N. A. Targeted antitumor therapy using peptide bioconjugation. In: **47th Annual Meeting of the Brazilian Biophysical Society**, Campinas 2023.
- MENDONÇA, M. M., ANTUNES, S., BRASIL, M. C. O. A., PEDRINO, G., CASTRO, C., MENANI, J. V., COLOMBARI, D., CILLI, E. M., XAVIER, C.H., COLOMBARI, E., Cardiovascular Effects Of Central Injection Of A Formulation Containing The Angiotensinergic Dipeptide Asp-Arg In Hypertensive Rats. In: **XXXVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Armação de Búzios, 2023.
- NUNES, L. O. C., NAVEGANTE, G., ARRUDA BRASIL, M. C. O., VALENTE, V., CILLI, E. M., SANTOS-FILHO, N. A. Synthesis and characterization of aptamer peptides

as targeting strategy for Molecules with antitumor activity. In: **52nd Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, Águas de Lindóia, 2023.

- BRASIL, M. C. O. A.; PRINCIVAL, C. R.; KATEKAWA, E.; MAGALHÃES, W. V.; GUIDO, E. V. C.; CILLI, E. M. Effect of a peptide compound on lipogenesis in human sebocytes. In: **52nd Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, Águas de Lindóia, 2023.

- NUNES, L. O. C., NAVEGANTE, G., ARRUDA BRASIL, M. C. O., VALENTE, V., CILLI, E. M., SANTOS-FILHO, N. A. Synthesis and characterization of peptide bioconjugates with antitumor activities. In: **5nd Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 46th Congress of the Brazilian Biophysucal Society / LAFEBs (SBBf)**, Águas de Lindóia, 2022.

- BRASIL, M. C. O. A.; RODRIGUES, V. S.; OLIVEIRA, W. C.; ASSANE, I. M.; SANCHES, P. R. S.; PILARSKI, F.; SANTOS-FILHO, N. A.; CAMARGO, I. L. B. C.; DUQUE, C.; CILLI, E. M. Antimicrobial potential of the desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K peptide conjugated with Hy-a1 peptide or Cell Penetrating Peptides. In: **45^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Maceió, 2022.

- BRASIL, M. C. O. A.; RODRIGUES, V. S.; OLIVEIRA, W. C.; SANCHES, P. R. S.; SANTOS-FILHO, N. A.; DUQUE, C.; CILLI, E. M. Antibacterial activity of desCys¹¹/Lys¹²/Lys¹³-(p-BthTX-I)₂K sequence conjugated to cell-penetrating peptides. In: **First Canadian Peptide and Protein Community Virtual Symposium**, 2021.

- SILVA, M. B. C.; SILVA, J. R.; BRASIL, M. C. O. A.; PHILADELPHO, B. O.; SOUZA, V. C.; SANTOS, J. E. M.; LEÃO, R. M.; COUTO, R. D.; AZEREDO, F. J.; CASTILHO, M. S.; FERREIRA, E. S.; CILLI, E. M. Effects Of The Cowpea Gln-Asp-Phe Peptide Daily Administration in Rats Fed A Saturated High-Fat Diet. In: **First Canadian Peptide and Protein Community Virtual Symposium**, 2021.

- SOUSA, G. S.; PEREIRA, M. R.; BRASIL, M. C. O. A.; CILLI, E. M.; LORENZON, E. N. Síntese e avaliação microbiológica do peptídeo indolicidina e análogos. In: **XIX Curso de Inverno em Bioquímica e Biologia Molecular**, 2020.

- SOUSA, G. S.; PEREIRA, M. R.; BRASIL, M. C. O. A.; CILLI, E. M.; LORENZON, E. N. Planejamento e síntese dos peptídeos Indolicidina e análogos. In: **Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão - CONEPE**, 2020.

- SOUSA, H. A.; SILVA, V. N. M.; BRASIL, M. C. O. A.; LIMA, C. F.; FREITAS, G. R. O. Atividade antimicrobiana do extrato metanólico total de *Senna rugosa*. In: **IV Simpósio de Microbiologia da UFMG**, 2017.
- BRASIL, M. C. O. A.; LIMA, C. F.; MOREIRA, G. M.; RESENDE, D. S.; FREITAS, G. R. O. Evaluation of hygienic-sanitary conditions and microbiological quality of sausage sold in butcher shops in Patos de Minas, MG, Brazil. In: **29º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2017.
- MOREIRA, G. M.; LIMA, C. F.; BRASIL, M. C. O. A.; RESENDE, D. S.; FREITAS, G. R. O. Evaluation of hygienic-sanitary conditions and microbiological conditions of beef sold in butcher shops in Patos de Minas, MG, Brazil. In: **29º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2017.
- MOREIRA, G. M.; BRASIL, M. C. O. A.; LIMA, C. F.; FREITAS, G. R. O. Avaliação das condições microbiológicas de carne bovina moída comercializada em açougues de Patos de Minas - MG. In: **29º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2016.

Depósito de Patentes

- CILLI, E. M.; GONZALEZ, E. R. P.; GRAMINHA, M. A. S.; BRASIL, M. C. O. A.; COELHO, N. C.; MOREIRA, V. P.; DE SOUZA, J. V. M.; DOS ANJOS, L. R. Bioconjugação de guanidinas N,N,N-trissubstituídas com peptídeos antimicrobianos e uso de bioconjugados. ID: BR1020220228558
- NUNES, L. O. C.; SANTOS FILHO, N. A.; BRASIL, M. C. O. A.; NAVEGANTE, G.; VALENTE, V.; CILLI, E. M. Processo para obtenção de bioconjugados peptídicos, bioconjugados peptídicos e sua utilização como antitumorais. ID: BR10202302689

Aulas Ministradas

- Ministrou a aula intitulada "Introdução à síntese de peptídeos" para alunos da disciplina "FUNDBBAF1 - Fundamentos em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia", para o curso de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2023.
- Estágio Docência na disciplina **Bioquímica Geral e Experimental I**, vinculada ao departamento de Bioquímica e Química Orgânica do Câmpus de Araraquara, sob supervisão da professor Dr. Eduardo Maffud Cilli, 2022.

Participação de Bancas Avaliadoras

- Membro da banca avaliadora do Trabalho de Conclusão de Curso da aluna Allison Elizabeth Pinas Onofre intitulado “Síntese e Caracterização da Atividade Antifúngica e Toxicidade de Peptídeos Análogos a Melitina” apresentado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp, 2023.
- Avaliadora de trabalhos apresentados no XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp FCF/Araraquara, realizado nos dias 27 a 28 de setembro de 2023.
- Avaliadora de trabalhos apresentados no XXXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp IQ/Araraquara, realizado nos dias 27 a 28 de setembro de 2023.
- Avaliadora de trabalhos apresentados no XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp IQ/Araraquara, realizado nos dias 28 a 29 de outubro de 2021.

Organização de eventos

- Auxiliar “II Curso de Inverno em Biociências e Biotecnologia” Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Câmpus de Araraquara- UNESP, 2024.
- Semana de Recepção dos Ingressantes – “Semana da Calourada”, Universidade Federal de Uberlândia – Câmpus Patos de Minas, MG, 2014.

“Dedico este trabalho a Deus, família e amigos por fazerem os meus dias mais felizes.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado força nos momentos difíceis, discernimento nos momentos de confusão e por ter guiado todos os meus passos até aqui.

Aos meus pais Maria Lúcia e Floriano por todo amor incondicional, e por terem dado força para seguir com o meu sonho de ser uma pesquisadora a vocês eu dedico todo este trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli por ter me dado a chance de integrar ao seu grupo de pesquisa desde o meu estágio na faculdade. Pelo incentivo de não desistir e continuar o Doutorado, pelas broncas necessárias que só me fizeram crescer como pessoa e pesquisadora, pelos conselhos dados e por todo ensinamento passado.

Aos meus irmãos Floriano e Pedro que sempre me deram força e alívio nos momentos de turbulência.

As minhas cunhadas Nicole e Regiane por todos os momentos de descontração.

A minha prima/irmã Adélia que sempre me escutou e me ofereceu alívio nos momentos de turbulência.

A minha tia Maria José que iniciou os meus primeiros passos nos estudos me alfabetizando. Ela sempre torceu por mim e ficou feliz por todas as minhas conquistas mesmo não estando mais aqui conosco tenho a plena certeza de que se estivesse, ela estaria feliz.

Aos The primos por sempre torcerem por mim.

A todos os meus colegas de Laboratório, Sarah, Leticia, Ariani, Lara, Stéfano, Jael, João Victor, Gabriel Santoro, João Pedro, Gabriel, Louise, por compartilharem o seu companheirismo, fazendo com que o trabalho fosse mais fácil e divertido.

Aos meus amigos Caio, Mariana, Luiza, Jaff, Julia, Paulo, Dennis e Norival por sua amizade e por todo o apoio.

A empresa Chemyunion pela parceria neste trabalho e aos que me ajudaram Cleverson, Edson e Wagner.

Aos meus colegas de trabalho Samora, Gustavo, Isadora, Danielle, Jhonatan, Bianca e José Matheus.

A Unesp e ao Instituto de Química por fornecerem toda a estrutura necessária e pelo aprendizado.

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

A CNPq pela bolsa concedida, processo nº 140816/2021-6.

“Tudo o que acontece no universo tem uma razão de ser; um objetivo. Nós como seres humanos, temos uma só lição na vida: seguir em frente e ter a certeza que apesar de as vezes estar no escuro, o sol vai voltar a brilhar.”

-Santa Dulce dos Pobres

RESUMO

A indústria cosmética tem apresentado um crescimento expressivo na busca por moléculas mais eficientes aliadas a processos mais sustentáveis. Diante desse cenário, é notável o aumento do uso de peptídeos, uma vez que podem ser modulados a um alvo específico e possuem uma alta eficácia a concentrações mais baixas, para tratamentos dermocosméticos. Os peptídeos, em sua grande maioria, são produzidos pela síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) tradicional, que utiliza solventes e reagentes controversos, como dimetilformamida (DMF) e piperidina, que podem ser nocivos e tóxicos ao ser humano e ao meio ambiente. Em luz disso, o objetivo dessa tese foi desenvolver novos peptídeos para aplicação cosmética, como o Tripeptídeo-85 (EVF) e o Tetrapeptídeo-111 (PWKW), utilizando processos sintéticos mais sustentáveis. Observamos que os processos sintéticos mais sustentáveis mostraram rendimentos e purezas semelhantes aos protocolos tradicionais. Para tanto, avaliamos bases e solventes alternativos, sendo que para as bases os derivados de amino-álcoois, como monoetanolamina (MEA) e 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), mostraram-se eficientes no processo remoção do grupo (Fmoc), indicando uma alternativa mais segura e sustentável do que a controversa piperidina. Já em relação ao uso de solventes sustentáveis, o 2-MeTHF e a mistura de IPA/DMSO (4:6) se mostraram mais robustos para síntese do EVF e do PWKW, respectivamente. O solvente etanol/DMSO também foi testado com resultado positivo para o PWKW. Posteriormente, os peptídeos foram avaliados em testes *in-vitro* e em testes clínicos, sendo que o EVF apresentou eficácia na redução da produção de sebo e de poros na pele e o PWKW “Botox-like” apresentou eficácia na redução da contração muscular, levando a redução das rugas e linhas de expressão na pele, em baixas concentrações de uso, desta forma, apresentando-se como um potente ativo anti-idade. Os resultados obtidos demonstram que para a síntese dos peptídeos a utilização de novos protocolos utilizando de solventes verdes não prejudicou a sua obtenção. Nos ensaios biológicos ambos os peptídeos demonstraram que tem potencial de inibição para os seus alvos tornando-se assim potenciais ativos para cosméticos.

Palavras-chave: Peptídeos; cosméticos, química verde.

ABSTRACT

The cosmetics industry has experienced significant growth driven by the pursuit of more efficient molecules combined with environmentally sustainable processes. Within this context, peptides have gained prominence due to their ability to be tailored to specific targets and their high efficacy at low concentrations in dermocosmetic applications. Most peptides are produced via traditional solid-phase peptide synthesis (SPPS), which involves controversial reagents and solvents such as dimethylformamide (DMF) and piperidine—substances known for their potential toxicity to humans and the environment. Accordingly, this thesis aimed to develop novel peptides for cosmetic applications, specifically Tripeptide-85 (EVF) and Tetrapeptide-111 (PWKW), using more sustainable synthetic protocols. These alternative methods yielded results comparable in purity and yield to those obtained through conventional synthesis. To achieve this, we investigated the use of alternative bases and solvents. Amino alcohol derivatives—such as monoethanolamine (MEA) and 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP)—proved effective for Fmoc group removal, offering a safer and more environmentally friendly substitute for piperidine. In terms of solvents, 2-MeTHF and an IPA/DMSO mixture (4:6) demonstrated robustness for the synthesis of EVF and PWKW, respectively. Ethanol/DMSO also showed positive outcomes for PWKW. These peptides were subsequently subjected to in vitro and clinical evaluations. EVF showed efficacy in reducing sebum production and pore size, while PWKW—a "Botox-like" peptide—effectively reduced muscle contraction, leading to a visible reduction in wrinkles and expression lines, even at low concentrations. These findings reinforce the viability of greener peptide synthesis protocols and confirm the biological activity of both peptides, highlighting their potential as innovative cosmetic active ingredients.

Keywords: Peptides, cosmetics, green chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da pele humana.....	31
Figura 2: Principais problemas de pele.	33
Figura 3: Esquematização do folículo piloso e glândulas sebáceas.	34
Figura 4: Ativação neuromuscular sequencial e seu papel no desenvolvimento de rugas. Liberação de acetilcolina desencadeando a contração muscular (A); mediação da contração muscular por cálcio levando a deformação da pele (B); contrações musculares persistentes (C); formação de rugas estáticas com o relaxamento do musculo e reabsorção de cálcio no retículo sarcoplasmático (D).....	38
Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina botulínica.	39
Figura 6: Tripeptídeo-85 (representado pelas esferas amarelas) posicionado no sítio ativo do receptor de melanocortina 5 (estrutura vermelha).	42
Figura 7: Ciclo de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.	44
Figura 8: Mecanismo de formação de ligação peptídica a partir de uma reação mediada por carbodiimida.	53
Figura 9: Reação de remoção do Fmoc.	64
Figura 10: Bases utilizadas na desproteção do Fmoc.....	65
Figura 11: Esquema da SPFS padrão. Solvatação da resina em DMF, desproteção usando 20% 4-metilpiperidina em DMF, acoplamento com a mistura acoplante HOBt/DIC a temperatura ambiente.	71
Figura 12: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo padrão. Solvatação em DMF, desproteção usando 20% 4-metilpiperidina em DMF, acoplamento com a mistura acoplante HOBt/DIC a temperatura ambiente.	72
Figura 13: Esquema de SPFSV-AMP 50°C parcialmente verde. Solvatação da resina em DMF, desproteção usando 25% AMP em DMF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.....	73
Figura 14: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-AMP 50°C. Solvatação da resina em DMF, desproteção usando 25% AMP em DMF, acoplamento com mistura acoplante Oxima Pure/ DIC à 50°C.	74
Figura 15: Esquema de SPFSPV-AME 50°C. Solvatação da resina em DMF, desproteção usando 25% AME em DMF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC a 50°C.....	75

Figura 16: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-AME. Solvatação em DMF, desproteção usando 25% AME em DMF, acoplamento com mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	75
Figura 17: Esquema de SPFSPV-2-MeTHF/morfolina. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em DMF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à temperatura ambiente.	76
Figura 18: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSPV-2-MeTHF/morfolina. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em DMF, acoplamento com mistura acoplante Oxima Pure/DIC.	77
Figura 19: Esquema de SPFSPV-2-MeTHF/AMP 50°C. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 25% AMP em DMF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	78
Figura 20: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSPV-2-MeTHF/AMP 50°C. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 25% AMP/DMF, acoplamento com mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.	78
Figura 21: Esquema de SPFSV-2-MeTHF. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC. ...	79
Figura 22: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-2-MeTHF. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção com morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura Oxima Pure/ DIC a temperatura ambiente.	80
Figura 23: Esquema de SPFSV-2-MeTHF 50°C. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC a temperatura de 50°C.	81
Figura 24: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-2-MeTHF 50°C. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.	81
Figura 25: Esquema de SPFSV-2-MeTHF/AMP 50°C. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 25% AMP em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	82
Figura 26: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-2-MeTHF/AMP. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 25% AMP em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.	83

Figura 27: Esquema de SPFSV-Cyr/DEC 50°C. Solvatação da resina em Cyr/DEC (3:7), desproteção usando 50% morfolina em Cyr/DEC (3:7), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	85
Figura 28: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF sintetizado pelo protocolo de SPFSV com Cyr/DEC (3:7). Solvatação da resina com Cyr/DEC (3:7), desproteção usando 50% morfolina em Cyr/DEC (3:7), acoplamento com a mistura acoplante Oxuma Pure/DIC à 50°C.	85
Figura 29: Esquema de SPFS-DEC 50°C. Solvatação da resina em DEC, desproteção usando 50% morfolina em DEC, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	86
Figura 30: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV com DEC 50°C. Solvatação em DEC, desproteção usando 50% morfolina em DEC, acoplamento com mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.	87
Figura 31: Esquema de SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina em IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	88
Figura 32: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.	89
Figura 33: Esquema de SPFSV-IPA/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina em IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AMP em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	90
Figura 34: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV IPA/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.	90
Figura 35: Esquema de SPFSV-IPA/DMSO/AME 50°C. Solvatação da resina em IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AME em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	91
Figura 36: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV IPA/DMSO/AME. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AME em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.	92
Figura 37: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo SPFS padrão. Solvatação em DMF, desproteção usando 20% 4-metilpiperidina em DMF, acoplamento com a mistura acoplante HOBt/DIC à temperatura ambiente.	94

Figura 38: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-2-MeTHF. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.....	95
Figura 39: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.....	96
Figura 40: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-IPA/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AMP em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.....	97
Figura 41: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-IPA/DMSO/AME. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AME em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.....	98
Figura 42: Esquema de SPFSV-Etanol/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina em Etanol/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em Etanol/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.	99
Figura 43: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo SPFSV-Etanol/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina com Etanol/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em Etanol/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.....	100
Figura 44: Esquema de SPFS Etanol/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina em Etanol/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AMP em Etanol/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC a temperatura de 50°C.	101
Figura 45: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV Etanol/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina com Etanol/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AMP em Etanol/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC a 50°C.....	101
Figura 46: Efeito do peptídeo PWKW nos níveis intracelulares de cálcio após a indução com ionomicina 10 µM. Gráfico de barras representando os níveis intracelulares de cálcio, relativos à viabilidade celular (MTT). (**p<0,01 em relação ao grupo controle; *p<0,05 em relação ao grupo ionomicina 10 µM.	105

Figura 47: Variação do índice sebumétrico (%) para o placebo, ativo do mercado, EVF e Pal-EVF por período (T0-T2 h / T0-T4 h). *p < 0,05 e *** p < 0,001 em relação ao tempo inicial (T0).....	107
Figura 48: Variação do índice sebumétrico (%) para o placebo, ativo do mercado Sepicontrol, EVF e Pal-EVF por período (D0-D14 / D0-D28). *p < 0,05 e *** p < 0,001 em relação ao tempo inicial (D0).....	108
Figura 49: Redução da área de poros após 14 (D14) e 28 dias (D28) de tratamento comparado ao dia inicial (D0).	109
Figura 50: Avaliação do peptídeo EVF na redução de poros antes do tratamento (D0), após 14 dias (D14) e 28 dias (D28).	110
Figura 51: Registros fotográficos e dados quantitativos evidenciando o efeito sob a redução e controle de oleosidade na pele dos voluntários antes (D) e depois (D14) do tratamento com a) placebo, b) Sepicontrol a 4% e c) EVF a 1%.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de periculosidade de solventes comumente utilizados na SPFS. Os códigos representam a designação na comunicação de perigos químicos.	45
Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos solventes utilizados na SPFS e dos solventes verdes propostos como alternativa.	47
Tabela 3: Solventes verdes e suas características verdes.	48
Tabela 4: Capacidade de solvatação dos solventes em diferentes tipos de resina.	50
Tabela 5: Alternativas verdes para a remoção do Fmoc.	52
Tabela 6: Avaliação do tempo de desproteção das diferentes soluções de desproteção.	66
Tabela 7: Comparativo de pKa e custo das bases testadas.	68
Tabela 8: Classificação de segurança das bases analisadas.	69
Tabela 9: Diferentes protocolos de síntese utilizados na obtenção do peptídeo EVF. Em vermelho o protocolo tradicional, em amarelo o parcialmente verde e em verde, totalmente verde.	70
Tabela 10: Comparativo dos resultados obtidos para a síntese do peptídeo EVF.	72
Tabela 11: Diferentes protocolos de síntese utilizados na obtenção do peptídeo PWKW.	93
Tabela 12: Comparativo dos resultados obtidos para a síntese do peptídeo PWKW.	94
Tabela 13: Quantidade de reagentes utilizados nas soluções de clivagem para 100 mg de peptidil-resina.	103
Tabela 14: Massa obtida e grau de pureza do peptídeo EVF após clivagem.	103
Tabela 15: Massa obtida e grau de pureza do peptídeo PWKW.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-MeTHF	2-metiltetrahidrofurano
AME	2-aminoetanol
AMP	2-amino-2-metil-1-propanol
Boc/Bzl	terc-butiloxycarbonil/benzil
Ca	Cálcio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cyr	Cyreno
DBF	dibenzofulveno
DBU	1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno
DCC	N,N-diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano
DEAPA	3-(dietilamino)propilamina
DEC	Dietilcarbonato
DIC	N,N-diisopropilcarbodimida
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECHA	Agência Européia de Produtos Químicos
EtOAc	Acetato de Etila
EtOH	Etanol
Fmoc	Fluorenilmetiloxycarbonila
Fmoc/tBu	9-fluorenilmetiloxycarbonil/terc-butil
GPCRs	Receptores com 7 domínios associados a proteína GS
HF	Ácido Fluorídrico
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HskMC	Células Humanas Musculares Esqueléticas
IPA	Isopropanol
MCR1	Receptor de melacortina 1
MCR5	Receptor de melacortina 5
MCRs	Receptores de Melacortina
MEC	Matriz Extracelular
MeOH	Metanol

Na	Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NMP	N-metilpirrolidona
PCP	Fenilciclohexilpiperidina
REACH	Registro, Avaliação, Autorização e Registro de Produtos Químicos
SNAP-2	Proteína associada ao sinaptossomo
SNARE	Receptor de proteína de ligação ao fator sensível à N-etilnaleimida solúvel.
SPFS	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida
SPFSV	Síntese de Peptídeos em Fase Sólida Verde
TBA	terc-butilamina
tBU	terc-Butila
TFA	ácido trifluoracético
TIS	triisopropilsilano
TMG	tetrametilguanidina
UV	Luz ultravioleta
VAMP	Proteína associada a vesícula

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	30
1.1	COSMÉTICOS DURANTE A HISTÓRIA	30
1.2	FISIOLOGIA DA PELE	30
1.3	PROBLEMAS DE PELE	32
1.3.1	<i>Sebogênese</i>	33
1.3.2	<i>Envelhecimento da pele</i>	36
1.4	PEPTÍDEOS COSMÉTICOS	39
1.4.1	<i>Peptídeos Inibidores da Produção de Sebo</i>	41
1.4.2	<i>Peptídeos Botox-like</i>	42
1.4.3	<i>Síntese de Peptídeos em Fase Sólida Verde</i>	43
2	OBJETIVOS	55
2.1	OBJETIVO GERAL	55
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1	AVALIAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA RESINA	56
3.2	SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA	57
3.3	CLIVAGEM DOS PEPTÍDEOS	58
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS	58
3.5	EFICÁCIA <i>IN VITRO</i> DO PEPTÍDEO PWKW	59
3.5.1	<i>Avaliação do peptídeo PWKW na Liberação de Cálcio em Células Humanas Musculares Esqueléticas (HskMC)</i>	59
3.6	AVALIAÇÃO CLÍNICA E EXPERIMENTAL DO PEPTÍDEO EVF E PAL-EVF	60
3.6.1	<i>Análise de Sebo Facial</i>	61
3.7	REDUÇÃO DO TAMANHO DE POROS	61
3.8	AVALIAÇÃO DE REDUÇÃO E CONTROLE DE OLEOSIDADE	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	AVALIAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA RESINA	63
4.2	SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA	69
4.2.1	<i>Alternativas de protocolos de síntese para o peptídeo EVF</i>	70
4.2.1.1	<i>Protocolo padrão de síntese do peptídeo EVF – SPFS padrão</i>	71

4.2.1.2 Protocolo utilizando como solvente o DMF e AMP como base de desproteção – SPFSV-AMP 50°C.....	73
4.2.1.3 Protocolo utilizando como solvente o DMF e AME base de desproteção – SPFSV-AME 50°C.....	74
4.2.1.4 Protocolo de síntese parcial verde utilizando DMF e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF – SPFSV-2-MeTHF/morfolina.....	76
4.2.1.5 Protocolo de síntese parcial verde utilizando DMF e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF – SPFSV-2-MeTHF/AMP 50°C.....	77
4.2.1.6 Protocolo de síntese verde utilizando 2-MeTHF e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF – SPFSV-2-MeTHF.....	79
4.2.1.7 Protocolo de síntese verde utilizando 2-MeTHF e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF a uma temperatura de 50°C – SPFSV 2-MeTHF 50°C.....	80
4.2.1.8 Protocolo de síntese verde utilizando 2-MeTHF e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF à 50°C – SPFSV 2-MeTHF/AMP 50°C.....	82
4.2.1.9 Protocolo de síntese verde utilizando Cyr/DEC e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento Cyr/DEC à 50°C – SPFSV-Cyr/DEC 50°C.....	83
4.2.1.10 Protocolo de síntese verde utilizando DEC e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento DEC à 50°C – SPFSV-DEC 50°C.....	86
4.2.1.11 Protocolo de síntese verde utilizando IPA/DMSO e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) à 50°C – SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C.....	87
4.2.1.12 Protocolo de síntese verde utilizando IPA/DMSO (4:6) e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) à 50°C – SPFSV IPA/DMSO/AMP 50°C.....	89
4.2.1.13 Protocolo de síntese verde utilizando IPA/DMSO (4:6) e MEA na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) à 50°C – SPFSV IPA/DMSO/AME 50°C.....	91
4.2.2 Alternativas de protocolos de síntese para o peptídeo PWKW.....	92

4.2.2.1	Protocolo padrão de síntese do peptídeo PWKW – SPFS padrão.....	93
4.2.2.2	Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando 2-MeTHF e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF a uma temperatura de 50°C – SPFSV-2-MeTHF 50°C.	95
4.2.2.3	Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando IPA/DMSO (4:6) e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) à 50°C – SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C.....	96
4.2.2.4	Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando IPA/DMSO (4:6) e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) a uma temperatura de 50°C – SPFSV IPA/DMSO/AMP 50°C.	97
4.2.2.5	Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando IPA/DMSO (4:6) e MEA na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) a uma temperatura de 50°C – SPFSV IPA/DMSO/AME 50°C.....	98
4.2.2.6	Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando Etanol/DMSO (4:6) e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento Etanol/DMSO à 50°C – SPFSV-morfolina-Etanol/DMSO 50°C.	99
4.2.2.7	Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando Etanol/DMSO (4:6) e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento Etanol/DMSO (4:6) a uma temperatura de 50°C – SPFSV-Etanol/DMSO/AMP 50°C.....	
100		
4.3	TESTE DE CLIVAGEM	102
4.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS	104
4.4.1	<i>Eficácia in vitro do peptídeo PWKW</i>	104
4.4.2	<i>Ensaio clínico para o peptídeo EVF</i>	106
4.4.2.1	Estudo preliminar de redução de sebo.....	106
4.4.2.2	Avaliação da redução de tamanho de poros	108
4.4.2.3	Redução e controle de oleosidade	110
5	CONCLUSÃO	113
	ANEXO I	114
	REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 COSMÉTICOS DURANTE A HISTÓRIA

A utilização de cosméticos esteve sempre presente na história da humanidade, representando um papel importante na vida dos seres humanos. Esses foram utilizados em tratamentos de saúde em geral, em práticas religiosas, para aumentar as chances de sucesso social, no amor e na guerra, sempre visando o aumento da autoestima (Diana Draelos, 2000; GonzáLez-Minero; Bravo-Díaz, 2018; McMullen; Dell'acqua, 2023). Com o desenvolvimento da humanidade, os cosméticos também evoluíram em eficácia, segurança e qualidade (Singh *et al.*, 2022). Entende-se que, por definição, os cosméticos são aplicados externamente em mucosas da cavidade oral, corpo humano e dentes, com a finalidade de proteção, limpeza, perfumação, correção de odores e alteração da aparência (Zhang and Falla, 2009).

A utilização de cosméticos nas últimas décadas se tornou um fenômeno em massa, graças as influências das redes sociais, cinema e televisão. No entanto, estes produtos não têm só a intenção de manter uma aparência mais bonita, como também serem saudáveis e seguros (GonzáLez-Minero *et al.*, 2020). A indústria cosmética no ano de 2023 representou uma indústria econômica ativa, com taxa de crescimento de aproximadamente 8%. Esse valor se deve ao aumento do uso de cosméticos mundialmente, devido as suas propriedades higiênicas, corretivas e decorativas, se tornando essencial na rotina diária, principalmente de mulheres (Aguilar-Toalá *et al.*, 2019; L'orÉAl, 2023; L'orÉAl, 2024). O crescimento do mercado cosmético tem feito com que a demanda pelo desenvolvimento de novas formulações cosméticas aumente, surgindo novos produtos à base de proteínas, peptídeos, antioxidantes e fatores de crescimento (Ngoc *et al.*, 2023).

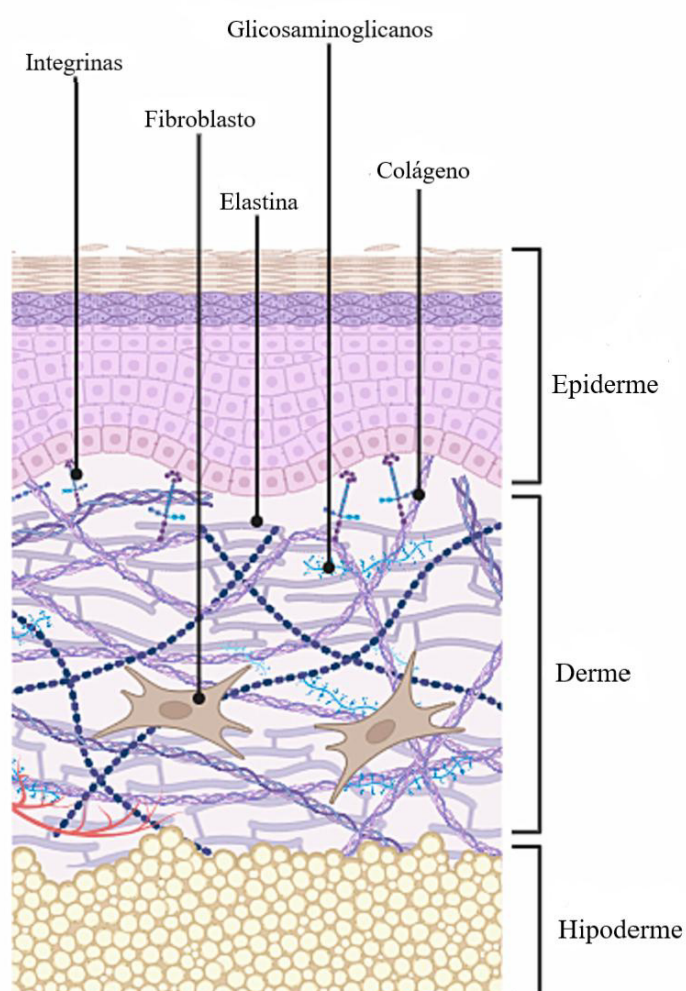
1.2 FISILOGIA DA PELE

A pele possui diversas funções fisiológicas importantes para o organismo humano (Wang, L. *et al.*, 2024), e com uma área superficial de cerca de 1 a 2 m², ela é o maior órgão do corpo humano (Ledwoń *et al.*, 2021). Além de influenciar na homeostase do corpo humano ela também influencia nas relações interpessoais, na imagem corporal e no estado psicológico das pessoas (Wang, L. *et al.*, 2024). A sua principal função é revestir o corpo, desempenhando conjuntamente outras funções, como a elasticidade, participando da síntese de vitamina D, e proteção à fatores externos, uma vez que os protege da umidade, bactérias, produtos químicos,

calor e frio. Ela também possui a função de transmitir fenômenos sensoriais que ocorrem no ambiente humano. Sendo assim, a pele é um elemento básico do corpo humano, o qual, determina grande parte de sua saúde (Mcknight *et al.*, 2022; Rostkowska *et al.*, 2023).

A pele é constituída de três camadas sendo elas a epiderme, derme e hipoderme (Figura 1), dentre as quais são encontrados apêndices (glândulas sebáceas e sudoríparas, folículo piloso, unhas), bem como nervos e vasos sanguíneos (Zhang; Falla, 2009; Rostkowska *et al.*, 2023). A separação das camadas de epiderme e derme é feita por uma membrana basal que é rica em proteínas da matriz extracelular (MEC), a qual incluem colágeno, proteoglicanos, sulfato de heparina, elastina, epiligrina, nidogênio, laminina e fibronectina (Zhang; Falla, 2009).

Figura 1: Estrutura da pele humana.



Adaptado de: Siqueira Andrade *et al.*, 2024.

A epiderme é a camada externa da pele a qual possui a função de ser uma barreira contra riscos ambientais. Ela constituída basicamente de queratinócitos, os quais são responsáveis pela

produção de queratina, uma proteína que fornece integridade estrutural a pele. Além dos queratinócitos, é na epiderme que se é produzida a melanina, responsável pela proteção aos raios UV e pigmentação da pele (Siqueira Andrade *et al.*, 2024).

A derme, camada encontrada abaixo da epiderme, é constituída principalmente de MEC e de fibroblastos. A constituição da MEC é basicamente de fibras de elastina, colágeno e alguns glicosaminoglicanos, como por exemplo o ácido hialurônico. São estas estruturas encontradas na MEC que são responsáveis pela flexibilidade, elasticidade e força da pele. Também são encontrados na derme, nervos, vasos sanguíneos, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, folículos capilares e células imunológicas (Siqueira Andrade *et al.*, 2024).

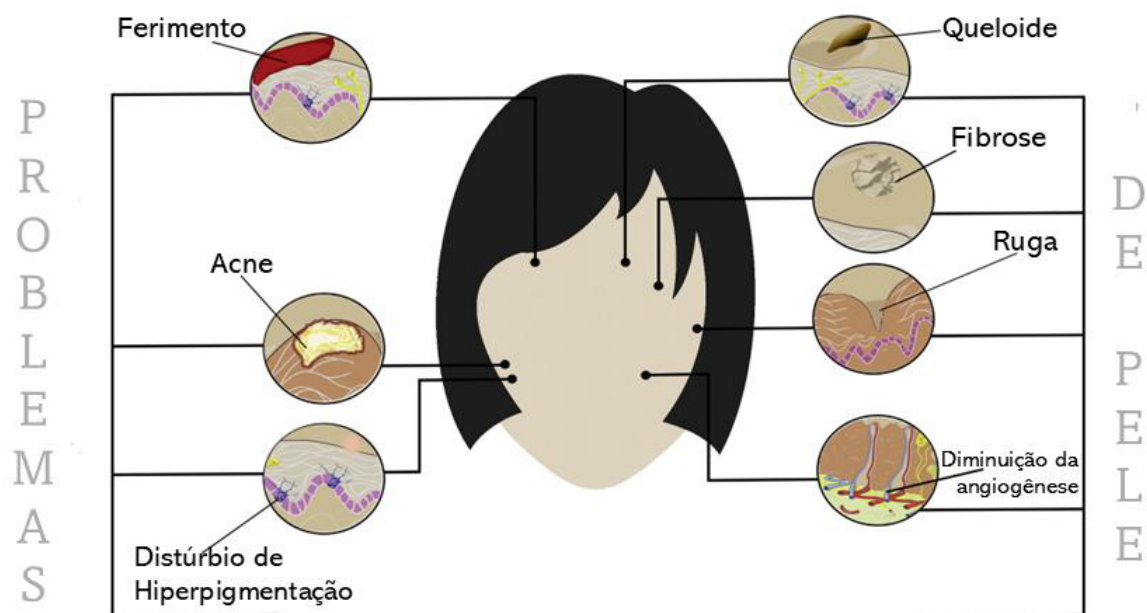
A última camada constituinte da pele humana é a hipoderme ou gordura subcutânea, sendo ela a mais profunda. Ela basicamente é composta pelo tecido conjuntivo e por células de gordura, como os pré-adipócitos e adipócitos. Esta camada não possui a função de proteção primária da pele, como as duas outras camadas citadas anteriormente, mas ela possui funções como armazenamento de gordura, responsável pelo armazenamento de energia do corpo e amortecimento, controlando a temperatura corporal e conectando a derme ao músculo e ao osso (Siqueira Andrade *et al.*, 2024).

Entender sobre a fisiologia e estrutura da pele é importante para o desafio de criar uma pele saudável para pacientes de todas as cores e idades. Sendo que, com o passar do tempo, o que é considerável como beleza da pele acaba desaparecendo, uma vez que o envelhecimento é um estágio natural. No entanto, alguns fatores podem fazer com que esse processo ocorra de uma forma mais rápida como estresse, doenças, cicatrizes e fumo (Draelos, 2011).

1.3 PROBLEMAS DE PELE

Problemas cutâneos estão classificados em 4º lugar entre as principais causas de doenças não fatais. Eles geram altos impactos na qualidade de vida e são considerados como um fardo para o sistema de saúde (Wang, L. *et al.*, 2024). As doenças e os distúrbios da pele têm um complexo conjunto de processos responsáveis pelo seu início, que podem variar entre fatores ambientais e genéticos, sendo cada fator diferente para cada doença (Lee *et al.*, 2024). Dentre os principais problemas de pele encontrados estão a formação de quelóide, ferimentos, fibroses, diminuição da angiogênese, distúrbios de hiperpigmentação, rugas, sebogênese e acne (figura 2) (Alencar-Silva *et al.*, 2018).

Figura 2: Principais problemas de pele.



Adaptado de: Alencar-Silva *et al.*, 2018.

Dentre os principais problemas de pele encontrados, dois foram escolhidos como alvo deste estudo, a hiperprodução de sebo ou sebogênese, e surgimento de rugas na pele.

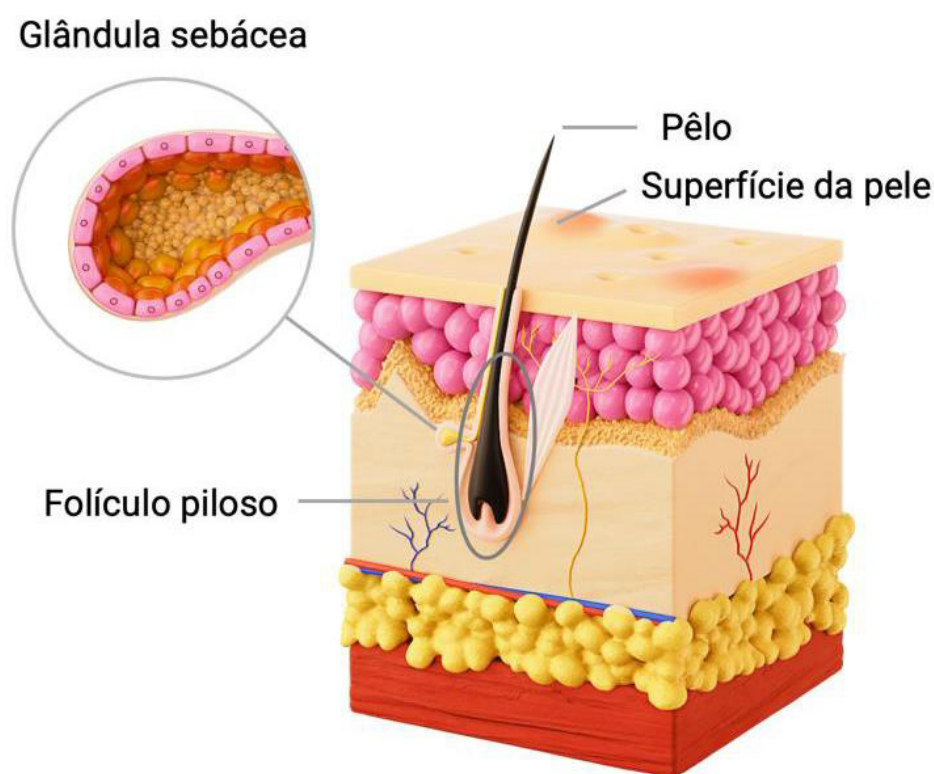
1.3.1 Sebogênese

A oleosidade da pele é uma condição comum que afeta 35% da população mundial entre homens e mulheres, tendo o seu início para muitos, um pouco antes da puberdade. Embora esta condição não cause grandes impactos fisiológicos na pele, a hiperprodução de sebo pode causar desconfortos em pessoas com esta condição (Segot-Chicq *et al.*, 2007; Sakuma and Maibach, 2012). Sendo assim, esta condição pode ser prejudicial às interações sociais e levar a uma autopercepção negativa, baixa autoestima, angústia e depressão (Segot-Chicq *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013). A oleosidade facial da pele causa problemas como poros dilatados, brilho intenso, mas também pode ser fonte de doenças de pele comuns como a dermatite seborreica e a acne vulgar (Rizer, 1999; Wu *et al.*, 2013). Uma pele oleosa geralmente está associada a uma

condição facial caracterizada pela dilatação dos poros, uma sensação de oleosidade e aparência brilhante devido a uma produção excessiva de sebo (Wu *et al.*, 2013).

As glândulas sebáceas são estruturas multilobulares associadas aos folículos pilosos, os quais constituem as unidades pilocefálicas da pele, tendo como a principal função a produção de sebo (figura 3) (TóTh *et al.*, 2011; LováSzi *et al.*, 2017; Szöllősi *et al.*, 2017). O sebo é constituído pelo conteúdo total do citoplasma dos sebócitos, que após uma etapa de maturação e de diferenciação passam a sintetizar e acumular substâncias lipídicas (Fischer *et al.*, 2017). A secreção do sebo ocorre por meio da desintegração das células glandulares na porção superior dos folículos pilosos, que então é distribuída na pele (Shi *et al.*, 2015). Em condições fisiológicas normais estes contribuem nos processos inflamatórios, possuem atividade antimicrobiana inata, atuam na integridade da pele e transportam compostos antioxidantes para a superfície da pele (Eisinger *et al.*, 2011).

Figura 3: Esquematização do folículo piloso e glândulas sebáceas.



Fonte: Chemyunion.

Alterações fisiológicas das glândulas sebáceas podem causar processos patológicos como a seborreia, o qual consiste na produção excessiva de sebo devido a hiperatividade das

glândulas sebáceas. Isto também afeta a composição do sebo e demonstra que ele pode ser um marcador de doenças e que apresenta um papel significativo em sua patogênese (Lovászi *et al.*, 2017; Cong *et al.*, 2019; Kirsten *et al.*, 2021). O excesso de sua produção pode favorecer o desenvolvimento de outras doenças como a acne, rosácea, psoríase, dermatite atópica, além de favorecer a formação de biofilme, interromper a função da barreira folicular, induzir a comedogênese e promover a inflamação subsequente (Valente Duarte De Sousa, 2014; Lovászi *et al.*, 2017; Cong *et al.*, 2019).

Alguns tratamentos para a produção excessiva de sebo podem ser encontrados, dentre eles a utilização de cosméticos contendo ácido salicílico e ácido glicólico, que tem como objetivo a descamação suave, e queratinócitos esfoliantes. Outro tratamento utilizado é a espirolactona e os contraceptivos orais que atuam na inibição dos sebócitos. Porém o tratamento mais utilizado é a isotretinoína que atua na diminuição do tamanho e na secreção das glândulas sebáceas, além de causar a apoptose dos sebócitos e de ter ação anti-inflamatória (Hong *et al.*, 2020). Porém, a utilização da isotretinoína pode causar muitos efeitos colaterais, sendo os mais comuns: mucosas secas, pele seca, sangramento nasal e secura ocular (Brzezinski *et al.*, 2017; Rho; Gil, 2021). Dentre os efeitos mais graves apresentados, temos a idealização suicida, pancreatites, hepatites, cataratas e distúrbios menstruais, entre outros (Brzezinski *et al.*, 2017). Desta forma, a busca de novos compostos que atuem nesta condição, reduzindo os efeitos colaterais e aumentando o efeito desejado, é necessária.

Os receptores de melancortina (MCRs) pertencem à família dos receptores com sete domínios membranares associados às proteínas Gs (GPCRs) (Hruby *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2020; Ji *et al.*, 2022). Estes receptores podem ter funções no organismo devido ao papel fundamental em vários processos, os quais incluem homeostase energética, pigmentação da pele, hemodinâmica, secreção exócrina, função sexual e imunomodulação (Rodrigues *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2020). Dentre os cinco receptores encontrados, dois deles podem atuar em sebócitos humanos, o receptor de melancortina-1 (MCR1) e o receptor de melancortina-5 (MCR5). O primeiro desempenha um papel importante na regulamentação da pigmentação da pele e do cabelo, além de atuar na homeostase da pele; já o segundo tem sido associado à diferenciação de sebócitos e a produção de sebo (Zhang *et al.*, 2011; Valente Duarte De Sousa, 2014).

O receptor MCR5 é encontrado de forma abundante em músculos esqueléticos e nos tecidos da pele, particularmente nas glândulas sebáceas (Xu *et al.*, 2020). O primeiro estudo que demonstrou que o MCR5 está ligado a sebogênese foi apresentado por (Chen *et al.*, 1997), que utilizou o fenótipo de camundongo deficiente em MCR5. A deficiência deste receptor levou a redução da produção da secreção de lipídeos sebáceos, como os ésteres de esterol, o que

acabou resultando em graves defeitos de termorregulação e repulsão de água (Zhang *et al.*, 2011). A sua inibição pode ser um alvo para a redução sebogênica.

1.3.2 Envelhecimento da pele

À medida que o tempo passa, algumas mudanças podem ser observadas na pele, elas podem ser influenciadas por fatores intrínsecos e extrínsecos. O envelhecimento da pele é o sinal de mudança mais visível, incluindo o surgimento de manchas, ressecamento, flacidez da pele, perda de gordura e o aparecimento de rugas; todos estes fatores contribuem para que a pele perca a sua suavidade natural (Shanbhag *et al.*). Dentre estes fatores, dois são reconhecidos por conta de sua característica mais proeminentes, sendo eles, a flacidez e as rugas faciais (Imokawa; Ishida, 2015).

O envelhecimento da pele possui mecanismos relativamente complexos, sendo divididos em intrínsecos e extrínsecos. O envelhecimento intrínseco pode ocorrer por conta de mudanças no metabolismo celular, processos metabólicos e hormônios, o que resulta na diminuição do conteúdo de colágeno, elastina, fibroblastos, ácido hialurônico e outras substâncias (Zhao *et al.*, 2021). Já o envelhecimento extrínseco é provocado por uma sequência de fatores externos ao corpo humano como dieta, poluição, tabagismo, consumo de álcool, exposição a luz ultravioleta (UV), movimentos musculares repetitivos, entre outros (Veiga *et al.*, 2023).

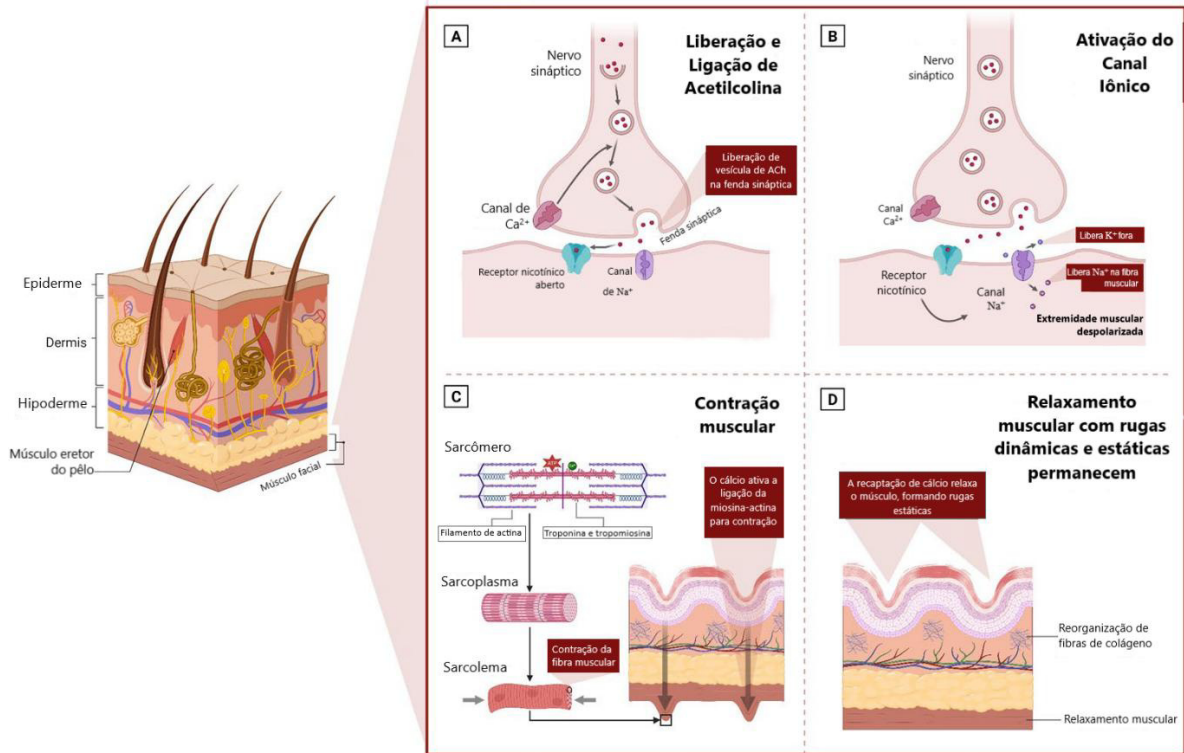
De acordo com o seu surgimento, as rugas podem ser divididas em quatro tipos sendo o primeiro os rírides enrugados atróficos, que são linhas finas quase paralelas umas as outras. Este tipo de ruga pode ser encontrado em diferentes partes do corpo e do rosto, mas a sua tendência de surgimento se dá quando a pele é esticada transversalmente. Este tipo de ruga está relacionado a perda de colágeno (elasticidade). O segundo tipo de ruga encontrada são os vincos elásticos permanentes, eles são constituídos por vincos na pele que com o passar do tempo e exposição ao sol, se tornam permanentes. Eles são encontrados de forma mais proeminentes em regiões como a base do pescoço, bochechas e lábio superior. O terceiro tipo são as linhas de expressão dinâmicas, que são rugas causadas por conta dos movimentos faciais. O seu surgimento pode ser causado por conta dos movimentos involuntários dos músculos. Neste caso o formato da ruga é perpendicular ao longo do eixo do músculo. O quarto tipo de ruga são as dobras gravitacionais, linhas encontradas na pele devido aos efeitos da gravidade e que se tornam mais visíveis à medida que a pele começa a ceder e dobrar. O local onde elas podem ser encontradas está relacionada à espessura da pele (Dragomirescu *et al.*, 2014).

O início do processo de formação de rugas ocorre na junção neuromuscular, onde há a liberação de acetilcolina, a qual é catalisada por um potencial de ação. É a partir deste evento que é desencadeado a abertura de canais de cálcio dependente de voltagem, estimulando a liberação de acetilcolina na fenda sináptica, que é estimulada pelo influxo de cálcio facilitado pela abertura dos canais (Nguyen *et al.*, 2024). Após a liberação da acetilcolina, há uma despolarização na membrana devido à entrada dos íons de sódio (Na^+) na fibra muscular e a saída de íons de potássio (K^+) pela fenda sináptica (Hołyńska-Iwan; Szewczyk-Golec, 2020; Catterall, 2023; Nguyen *et al.*, 2024). A liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático dentro da fibra muscular é aumentada devido a despolarização nos receptores nicotínicos (Rossi *et al.*, 2022). A exposição dos filamentos de actina ocorre devido o deslocamento de tropomiosina, uma vez que o cálcio liberado se liga à troponina (Nguyen *et al.*, 2024).

Uma descrição da contração muscular é realizada pela teoria dos filamentos deslizantes, onde os filamentos de actina e miosina são puxados para dentro pelas cabeças de miosinas energizadas pela hidrólise do trifosfato de adenosina (Squire, 2019). Após este processo as contrações musculares irão puxar as fibras do tecido conjuntivo na pele, formando assim fibras temporárias, que ao longo do tempo serão submetidas a um estresse mecânico, o que leva a uma reorganização das fibras de colágeno (Gillies; Lieber, 2011; Campos *et al.*, 2023). Esse estresse contínuo nas fibras musculares da pele pode fazer que o colágeno seja degradado ou desalinhado, enquanto isso os fibroblastos podem depositar colágeno novo de forma desordenada, aprofundando permanentemente a produção de dobras (Nguyen *et al.*, 2024). Todo este processo de ativação neuromuscular até o surgimento das rugas está exemplificado na figura 4.

O tratamento mais comumente utilizado para a prevenção ou diminuição de rugas é a aplicação de injeções de toxina botulínica (Botox), já que em ensaios clínicos, 100% dos usuários observaram melhorias significativas nas rugas (Nguyen *et al.*, 2024). O Botox é um medicamento que é obtido através da toxina produzida pela bactéria *Clostridium botulinum*. Ele tem sido usado desde a década de 70 no campo da oftalmologia para o tratamento de estrabismo e, nos últimos 20 anos teve a expansão de seu uso para vários campos da saúde, especialmente a dermatologia (Wright *et al.*, 2018; Satriyasa, 2019).

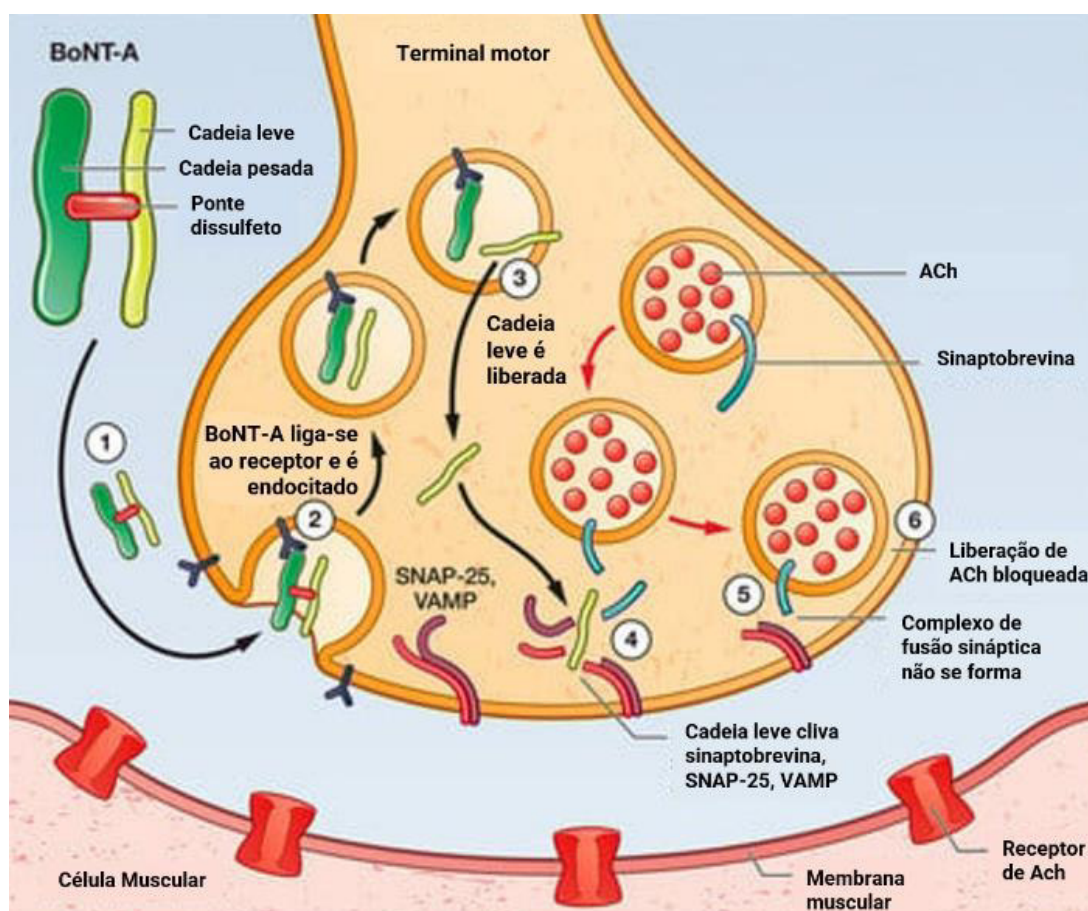
Figura 4: Ativação neuromuscular sequencial e seu papel no desenvolvimento de rugas. Liberação de acetilcolina desencadeando a contração muscular (A); mediação da contração muscular por cálcio levando a deformação da pele (B); contrações musculares persistentes (C); formação de rugas estáticas com o relaxamento do musculo e reabsorção de cálcio no retículo sarcoplasmático (D).



Adaptado de: Nguyen *et al.*, 2024.

Tem-se como meio de ação do Botox, o impedimento da função nervosa parassimpática e motora por meio da diminuição da produção de acetilcolina; além disso ele evita que os anticorpos neutralizantes ajam rapidamente (Nguyen *et al.*, 2024). As toxinas do botox são metaloproteases que clivam especialmente proteínas sinápticas essenciais para a exocitose neuronal regulada, especialmente a VAMP (Proteína de Membrana Associada à Vesícula), e as proteínas de membrana syntaxina e SNAP-25 (Proteína Associada ao Sinaptossomo) (figura 5) (Johnson, 1999; Nguyen *et al.*, 2024). A junção destas proteínas formam um complexo proteico SNARE (receptor de proteína de ligação ao fator sensível à N-etilmaleimida solúvel), que é desestabilizado pela ação da neurotoxina, impedindo a fusão da vesícula com a membrana plasmática e, conseqüentemente, anulando a exocitose desencadeada pelo Ca^{2+} (Chen; Scheller, 2001).

Figura 5: Representação esquemática do mecanismo de ação da toxina botulínica.



Adaptado de: Gazerani, 2022.

Por mais que seja uma das alternativas mais utilizada na prevenção de rugas, a utilização do Botox acarreta diversos efeitos colaterais como inchaço, sangramento, eritema e dores nos locais da injeção. Além disso também pode causar dores de cabeça após a sua injeção, podendo permanecer entre 2 e 4 semanas. Outros efeitos como náusea e mal-estar também podem ser encontrados. Somado a isto, quando o botox é aplicado para tratamento dos chamados “pés de galinha”, esta aplicação pode causar estrabismo (Satriyasa, 2019). Devido a todos estes efeitos colaterais se faz necessário que a indústria cosmética comece a busca por novas moléculas cosméticas inovadoras semelhantes ao botox (Dragomirescu *et al.*, 2014).

1.4 PEPTÍDEOS COSMÉTICOS

Devido ao crescimento da procura de novas moléculas cosméticas, os peptídeos têm se tornado uma alternativa, por conta de suas propriedades bioativas, tamanho da molécula,

capacidade de interagir com células por meio de diversos mecanismos, e sua alta atividade em baixa dosagem (Ferreira *et al.*, 2020; Ledwoń *et al.*, 2021). A comercialização de peptídeos tem aumentado mais do que a comercialização de pequenas moléculas, sendo 10% das vendas farmacêuticas, equivalendo a US\$ 25 bilhões (Lima; Pedriali Moraes, 2018). Somente no mercado norte americano são encontrados cerca de 25 peptídeos diferentes em diversos produtos para o cuidado com a pele. Porém, muitos outros se encontram em fase de desenvolvimento ao redor do mundo, o que não só irá expandir a diversidade de aplicação de peptídeos, mas também aumentará o número de ingredientes peptídicos (Huang *et al.*, 2023).

Os peptídeos são compostos biológicos com importantes funções nos organismos vivos, contendo de 2 a 50 aminoácidos e podendo apresentar alta seletividade, devido as interações específicas com os seus alvos (Negahdaripour *et al.*, 2019; Apostolopoulos *et al.*, 2021; Ngoc *et al.*, 2023). As moléculas peptídicas apresentam algumas vantagens em comparação a moléculas pequenas, sendo as principais vantagens: segurança, alta afinidade com o alvo e baixa toxicidade (Negahdaripour *et al.*, 2019).

Inicialmente, os peptídeos eram obtidos a partir de fontes naturais, como plantas e venenos de animais. No entanto, com o avanço da engenharia de peptídeos, da bioinformática estrutural, das tecnologias de sequenciamento e das avaliações analíticas, abriu-se caminho para o design racional de moléculas, possibilitando a criação de peptídeos de forma mais eficiente e direcionada (Negahdaripour *et al.*, 2019).

Nos cuidados da pele os peptídeos são muito importantes em processos naturais relevantes como a angiogênese, melanogênese, migração celular, proliferação celular, inflamação, síntese e regulação de proteínas (Kluczyk *et al.*, 2021). Por isso, e devido ao amplo potencial de ação, a indústria cosmética recentemente tem incorporado peptídeos em suas formulações, como por exemplo em produtos antirrugas e antienvelhecimento, já que os peptídeos reduzem a quantidade de rugas e tornam a pele mais firme e lisa (Zhou *et al.*, 2011).

Atualmente, existem diversos peptídeos como ingredientes cosméticos, e eles podem exercer diferentes funções biológicas, sendo classificados em quatro categorias diferentes de acordo com o seu mecanismo de ação: peptídeos sinalizadores, carreadores, neurotransmissores e inibidores de enzimas (Ferreira *et al.*, 2020; Ngoc *et al.*, 2023).

Os peptídeos sinalizadores estimulam a produção de proteínas da matriz extracelular (MEC), como o colágeno, elastina, glicosaminoglicano, fibrolectina e proteoglicano. Isso ocorre por meio do estímulo do fibroblasto e pode causar a modulação da melanogênese e a proliferação celular, entre outras funções metabólicas (Lima; Pedriali Moraes, 2018; Ferreira *et al.*, 2020; Ngoc *et al.*, 2023). Outros peptídeos são capazes de estabilizar e transportar

oligoelementos, como o cobre e o manganês, este grupo de peptídeos são chamados de peptídeos carreadores. Estes oligoelementos que são transportados por este grupo de peptídeos são importantes para neutralização de radicais livres e cicatrização de feridas (Lupo; Cole, 2007; Prokopowicz and Rózycki, 2017). Os peptídeos inibidores de neurotransmissores foram desenvolvidos para ter mecanismos semelhantes a toxina botulínica, bloqueando desta maneira a liberação de acetilcolina junção neuromuscular (Husein El Hadmed; Castillo, 2016). Algumas sequências de peptídeos foram desenvolvidas com sequências semelhantes às das proteínas SNAP-25, que podem competir pelos sítios de ligação dos complexos SNARE, o que leva a uma instabilidade estrutural e a inibição de ACh na junção neuromuscular, induzindo assim o relaxamento muscular (Ngoc *et al.*, 2023). Peptídeos inibidores de enzimas são estruturas capazes de inibir direta ou indiretamente esses catalisadores que quebram proteínas e colágenos, interferindo neste processo, como por exemplo, a superóxido dismutase que estimula a hialuronano sintase-2 e outras proteinases (Ngoc *et al.*, 2023; Pinteá *et al.*, 2025). Diversos peptídeos inibidores de enzimas como peptídeos derivados de arroz, oligopeptídeos de soja e peptídeos de fibroína da seda, têm sido usados como ingredientes em produtos de cuidados com a pele (Ngoc *et al.*, 2023; Pinteá *et al.*, 2025).

1.4.1 Peptídeos Inibidores da Produção de Sebo

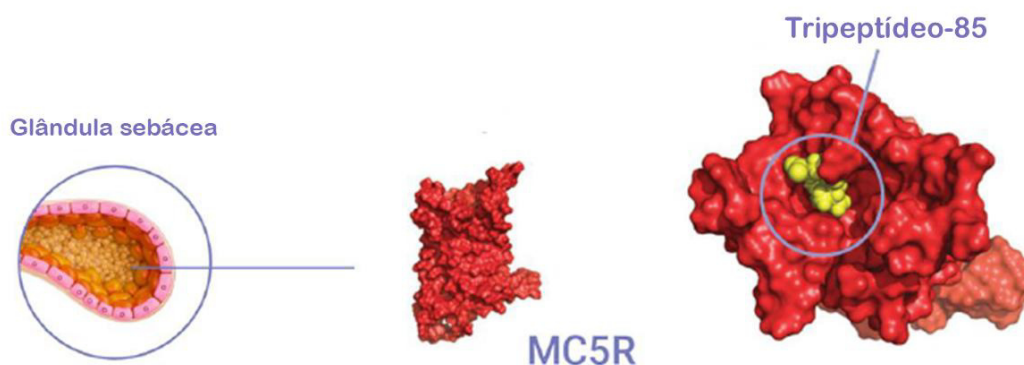
Embora a indústria cosmética venha lançando sempre novos produtos de cuidados faciais para controle de oleosidade, a maioria dos ativos encontrados no mercado com esta finalidade atua por meio da inibição da enzima 5 α -redutase, que converte a testosterona em diidrotestosterona, hormônios andrógenos que regulam a sebogênese (Thody *et al.*, 1976). No entanto, estudos demonstraram que os inibidores da enzima 5 α -redutase podem não diminuir de forma significativa a produção de sebo (Leyden *et al.*, 2004; Seiffert *et al.*, 2007). Por isso os receptores de melacortina tem sido estudados já que estudos indicam que eles tem efeito no controle da produção de sebo (Eisinger *et al.*, 2011).

Dois compostos que atuam nos receptores MCR1 e MCR5 encontram-se com testes de fase dois completos. O 2,3-bis(2-methoxyphenyl)-N-phenyl-1,2,4-thiadiazol-5-imine (JNJ10229570) é um antagonista do MCR5 e diminui o tamanho da glândula sebácea e reduz a produção de lipídeos sebáceos, podendo assim ser utilizado no tratamento da *Acne vulgaris* (Montero-Melendez, Boesen, Jonassen, 2022; Valente Duarte De Sousa, 2019). Outra molécula

que também se encontra em fase de estudo e que atua em ambos os receptores é a PL-9643 que atua na doença do olho seco (Montero-Melendez *et al.*, 2022).

Devido ao potencial de se utilizar inibidores de MCR5 para redução da produção de sebo, (Katekawa, 2018) desenvolveu uma molécula peptídica através de programas de modelagem molecular e que teria a capacidade de inibir a MCR5, o Tripeptídeo-85 de sequência EVF (figura 6), mostrando-se uma promissora molécula para composição de produtos cosméticos para redução da oleosidade da pele.

Figura 6: Tripeptídeo-85 (representado pelas esferas amarelas) posicionado no sítio ativo do receptor de melanocortina 5 (estrutura vermelha).



Fonte: Chemyunion.

Em virtude do seu potencial na redução da produção de sebo (Katekawa, 2018), o peptídeo EVF foi selecionado para estudos clínicos a fim de confirmar o seu potencial na inibição de sebo na pele. A síntese em condições menos agressivas ao meio ambiente também foi avaliada.

1.4.2 Peptídeos Botox-like

Os peptídeos estão à frente quando se fala de cosméticos de efeitos antienvelhecimento não invasivos, principalmente aqueles que inibem a liberação de neurotransmissores, os quais oferecem efeitos semelhantes ao Botox. Essas cadeias peptídicas podem fazer com que haja relaxamento dos músculos faciais sem que haja a necessidade de injeções (Nguyen *et al.*, 2024).

No grupo de moléculas ativas do tipo botox, há dois peptídeos que são considerados principais, o pentapeptídeo-3 (Leuphasyl) e o acetil hexapeptídeo-3 (Agi-reline) (Dragomirescu *et al.*, 2014). O Leuphasyl inibe as sinapses neuromusculares nos músculos mímicos, agindo

como as encefalinas visando a junção neuromuscular e modulando a liberação de acetilcolina (Dragomirescu *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2024), o que resulta no relaxamento muscular e na redução das rugas dinâmicas. Ele atua inibindo o fluxo de cálcio nas terminações nervosas, diminuindo a liberação de acetilcolina e contrações musculares, ou seja, ele tem um mecanismo semelhante ao do botox porém, age por vias metabólicas diferentes (Nguyen *et al.*, 2024).

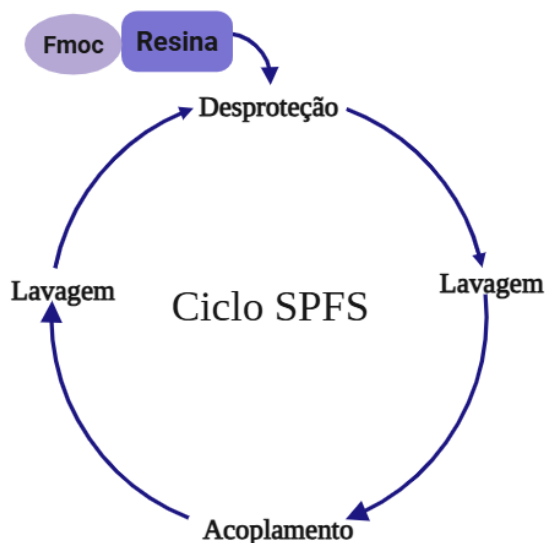
O Agireline é um peptídeo derivado da porção N-terminal da proteína SNAP-2 (fragmento 12-17), o qual exibe uma permeação cutânea significativa. Estudos demonstraram que ele pode dificultar a formação de um complexo de fusão vesicular necessário para conduzir a exocitose dependente de íons de cálcio, inibindo assim a formação do complexo SNARE. Sendo assim, o peptídeo Agireline inibe a contração repetitiva dos músculos intrínsecos da expressão facial e portanto, reduz as linhas faciais hipercinéticas (Kluczyk *et al.*, 2021).

Devido à grande relevância deste tema, uma molécula alternativa as citadas acima e encontradas no mercado foi avaliada. A partir da modelagem molecular realizada pela Chemyunion por meio do pesquisador Edson Katekawa, 4 sequências foram selecionadas inicialmente, sendo o peptídeo que apresentou o melhor desempenho na suavização de rugas foi o escolhido. O tetrapeptídeo sintético PWKW (Tetrapeptideo-111 denominado de “Botox-like”) foi projetado para modular a contração muscular ao interagir com os sítios ativos alfa do receptor nicotínico colinérgico, competindo com o neurotransmissor acetilcolina e atuando como um antagonista para o processo de contração muscular.

1.4.3 Síntese de Peptídeos em Fase Sólida Verde

A grande maioria dos peptídeos hoje comercializados são produzidos por métodos químicos, mais frequentemente por síntese de peptídeos em fase sólida (SPFS) (Lopez *et al.*, 2018). Esta metodologia foi descrita inicialmente por Merrifield em 1963, sendo o método mais utilizado para a síntese de peptídeos, tanto na indústria farmacêutica em larga escala, quanto na pesquisa acadêmica (Merrifield, 1963; Martin *et al.*, 2021). A SPFS tem como princípio a montagem gradual da sequência peptídica utilizando-se de aminoácidos que irão ser ancorados a um suporte sólido, crescendo da porção C-terminal do peptídeo para a N-terminal, por uma série de ciclos de acoplamento, desproteção e lavagem (figura 7) (Martin *et al.*, 2021).

Figura 7: Ciclo de Síntese de Peptídeos em Fase Sólida.



Fonte: Próprio autor.

Embora a SPFS seja efetiva na obtenção dos peptídeos, essa apresenta um desafio do ponto de vista ecológico, já que ela ainda utiliza grandes quantidades de solventes como o diclorometano (DCM), N,N-dimetilformamida (DMF) e N-metilpirrolidona (NMP), produzindo um alto volume de resíduos perigosos (Wegner *et al.*, 2021; Lopez *et al.*, 2022). Estes reagentes comumente utilizados na síntese de peptídeos são considerados como substâncias ambientalmente problemáticas pela Agência Europeia de Produtos Químicos (ECHA) sob o regulamento de Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos (REACH) (Martin *et al.*, 2020).

A utilização destes solventes gera várias preocupações em relação à saúde humana e aos danos ambientais, pois todos são reprotóxicos, além de o DCM ser carcinogênico, fazendo com que a sua utilização não seja recomendada ou ainda esteja em fase de banimento (Europa) (Al Musaimi *et al.*, 2020). Além do DCM, o DMF também é um solvente considerado um grande causador de danos à saúde, uma vez que, em mulheres grávidas, pode causar danos ao feto, tem uma toxicidade aguda, é nocivo em contato com a pele ou se inalado, e pode causar irritação ocular grave (Wegner *et al.*, 2021). Devido a estes motivos, desde dezembro de 2023 o seu uso foi restringido pela União Europeia, fazendo com que as indústrias cumpram limites mais rigorosos em relação à exposição deste solvente, instigando a comunidade científica a encontrar solventes alternativos (Sherwood *et al.*, 2024). Na tabela 1 podemos observar um resumo dos solventes polares apróticos que são utilizados na SPFS.

Tabela 1: Tabela de periculosidade de solventes comumente utilizados na SPFS. Os códigos representam a designação na comunicação de perigos químicos.

Solventes	Declaração de periculosidade
N,N-dimetilformamida (DMF)	H360D Pode causar danos ao feto. H332 Toxicidade aguda H312 Nocivo em contato com a pele ou se inalado
1-metil-2-pirrolidona (NMP)	H360D A toxicidade reprodutiva pode causar danos ao feto H319 Irritação ocular grave H315 Causa irritação na pele H335 Toxicidade para órgãos-alvo específicos – exposição única, pode causar irritação respiratória
Diclorometano (DCM)	H351 Suspeito de causar câncer

Fonte: Wegner *et al.*, 2021.

Os solventes são os principais constituintes da mistura de uma reação, representando 80-90% das massas não aquosas (Ferrazzano *et al.*, 2019). No entanto, os solventes citados anteriormente são classificados como materiais perigosos por vários guias de seleção da química verde. Sendo assim, se faz necessária uma busca por novos solventes, para substituir os que são utilizados no momento na SPFS, e que sejam menos agressivos a saúde humana e ao meio ambiente (Jad, Acosta, Khattab, *et al.*, 2016). Além disso, a pressão para encontrar substâncias menos perigosas e mais “benignas” tem crescido, e isso se dá pelo trabalho do Instituto de Química Verde da ACS, que vem chamando a atenção para a busca de processos mais ecológicos para a síntese de peptídeos (Vivenzio *et al.*, 2023).

Devido à necessidade da diminuição da utilização de solventes considerados perigosos, tanto pela indústria química quanto pela comunidade científica, visando diminuir o impacto dos solventes no meio ambiente, alternativas têm sido avaliadas. As perdas de solventes durante o processo representam uma parcela importante deste problema, e grande parte do consumo de energia do processo se dá pela sua remoção, fazendo com que, o custo geral de fabricação aumente (Wegner *et al.*, 2021).

Por isso, é necessário entender o que é química verde e quais são os seus princípios, visando escolher os solventes adequados ecologicamente e que atendam as necessidades da

SPFS. A definição encontrada para química verde foi dada por Paul Anastas em 1991, e consiste no design de produtos e processos químicos que reduzem ou eliminam o uso e a geração de substâncias perigosas (Kumar *et al.*, 2022). Para delimitar o que se segue, na metodologia de química verde foram apresentados doze princípios, o qual consiste em evitar o desperdício, economia do átomo, sínteses menos perigosas, design de produtos químicos benignos, solventes benignos e auxiliares, projetos de matérias primas renováveis, design para eficiência energética, redução de derivativos, catálises, design para degradação, análise em tempo real para prevenção da poluição e por fim, química inerentemente benigna para prevenção de acidentes (Schaub, 2021).

Levando em conta a busca por uma síntese de peptídeos mais próxima aos princípios apresentados anteriormente, alguns fatores devem ser analisados para que um solvente possa ser escolhido para a SPFS, como dissolver os aminoácidos protegidos com o grupamento fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc) – a metodologia mais usada atualmente, deve ter capacidade de inchar/solvatar o suporte polimérico utilizado, não ter uma alta viscosidade e ser inerte nas condições da síntese. A alta viscosidade dificulta a difusão dos reagentes dentro do suporte polimérico, impedindo-os de atingir os sítios reativos, produzindo assim baixos rendimentos e muitas cadeias peptídicas com deleção de um ou mais aminoácidos (Cilli *et al.*, 1999; Al Musaimi *et al.*, 2020).

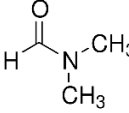
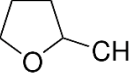
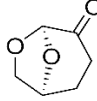
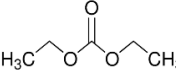
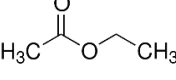
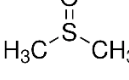
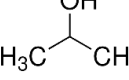
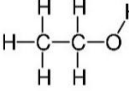
Tendo em vista essa problemática, um exemplo de solvente que vem sendo estudado para a substituição dos solventes tradicionais é o 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), o qual em diversos estudos, demonstrou uma boa capacidade de solvatação nos diferentes tipos de resinas utilizadas na SPFS (Jad, Acosta, Govender, *et al.*, 2016; Jad, Acosta, Khattab, *et al.*, 2016; Al Musaimi *et al.*, 2018; Jad *et al.*, 2019; Wegner *et al.*, 2021). Ele é um solvente considerado ecológico, cujo origem é de recursos renováveis, já que ele é um subproduto do processo de produção do álcool furfurílico a partir do furfural, derivado do bagaço ou de espigas de milho. Ele também pode ser obtido através da via de hidrogenação/desidratação do ácido levulínico, que é derivado da degradação da celulose (Jad *et al.*, 2016). Este solvente demonstra estabilidade em condições ácida e é facilmente degradado mediante exposição solar e ao ar, o que pode ser considerado uma vantagem caso ocorra acidentes, como o derramamento (Al Musaimi *et al.*, 2018).

O solvente Cyrene (Cyr) tem sido apontado em diversos estudos como uma alternativa verde ao DMF e ao NMP, devido às suas propriedades físico-químicas semelhantes. Além disso, é uma substância biorrenovável, biodegradável, não mutagênica e não reprotóxica, o que

o torna uma opção mais segura e sustentável para aplicações químicas (Stini *et al.*, 2022). No entanto, a sua alta viscosidade se torna uma barreira para o seu uso na SPFS.

Diversos estudos têm apresentado não somente estes dois solventes como potenciais para a substituição do DMF na SPFS, como também apresentaram como alternativas promissoras como o dietilcarbonato (DEC), acetato de etila (EtOAc), isopropanol (IPA), dimetilsulfóxido (DMSO) e o etanol (EtOH) (Al Musaimi *et al.*, 2020). Porém para estes serem considerados uma boa alternativa para a SPFS as suas características físicas devem ser avaliadas (tabela 2) bem como as características que os tornam uma alternativa mais verde a SPFS (tabela 3).

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos solventes utilizados na SPFS e dos solventes verdes propostos como alternativa.

Solventes	Estrutura	Peso molecular (g/mol)	Ponto de ebulição (°C)	Densidade (g/mL)	Viscosidade (mPas)
DMF		73,095	153	0,948	0,92
2-MeTHF		86,13	80	0,86	0,576
Cyreno		128,13	227	1,25	10,5
DEC		118,13	128	0,975	0,837
EtOAc		88,106	77,1	0,902	0,45
DMSO		78,13	189	1,1004	2,14
IPA		60,10	82	0,785	2,2
EtOH		46,07	78,3	0,789	1,2

Fonte: Martin *et al.*, 2021; Pacini *et al.*, 2024.

Tabela 3: Solventes verdes e suas características verdes.

Solvente	Características verdes					Outros
	Biodegradável	Não carcinogênico	Não mutagênico	Não irritante da pele ou sensibilizante	Derivado de recursos de biomassa /renováveis	
2-MeTHF						
Cyr						
DEC						
EtOAc						Não fototóxico ou fotoalergênico.
IPA						Não causa efeitos teratogênicos.
DMSO						Não tóxico
EtOH						

Fonte: Al Musaimi *et al.*, 2020; European Chemical Agency, 2025.

No entanto, encontrar um solvente que possui a capacidade de fornecer simultaneamente resultados ótimos durante todas as etapas de síntese é um desafio, que faz com que muitos solventes acabem sendo desconsiderados durante o processo de busca, uma vez que suas características físico-químicas (Tabela 2) podem ser um fator limitante. Por isso, a combinação de solventes para a utilização na SPFS se mostra uma alternativa válida, uma vez que as características físico-químicas das misturas de solventes podem ser mais adequadas e eficientes. Como por exemplo a alta viscosidade de um solvente pode ter efeitos negativos nas taxas de reação e na transferência de massas, portanto o uso de uma mistura de solventes pode diminuir esta desvantagem (Ferrazzano *et al.*, 2019).

Um exemplo de mistura de solventes que vêm sendo estudada na SPFS é a mistura de Cyr e dietilcarbonato (DEC) (3:7), que é utilizada para a solvatação da resina e na etapa de acoplamento dos Fmoc-aminoácidos (Ferrazzano *et al.*, 2019). Outras misturas como DMSO e EtOAc também têm sido estudadas. Esta mistura apresentou uma boa capacidade de solvatação da resina, além de dissolver os Fmoc-aminoácidos e não diminuir a eficiência de desproteção da piperidina, e quando utilizada no protocolo da síntese do peptídeo Bivalirudin o peptídeo obteve uma pureza de 73% (Jadhav *et al.*, 2021).

Outro fator extremamente importante que deve ser analisado é a eficiência destes solventes e misturas em solvatar a resina. Um bom inchamento de resina garante com que as etapas de acoplamento e desproteção ocorram de forma eficiente, uma vez que facilita a ligação dos aminoácidos aos linkers da resina (Al Musaimi *et al.*, 2020). Diversos estudos têm analisado a capacidade de novos solventes verdes de solvatar a resina de poliestireno, a mais usada atualmente na SPFS, e os resultados obtidos nestes estudos podem ser observados na tabela 4 (Al Musaimi *et al.*, 2018; Lopez *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2021). Observando os dados apresentados, poucos solventes possuem boa capacidade de solvatação da resina, porém aqueles que não apresentaram bons resultados ainda podem ser utilizados, porém na forma de misturas, visando o aumento do inchamento da resina.

Tabela 4: Capacidade de solvatação dos solventes em diferentes tipos de resina.

Solvente	Resina de poliestireno (PS)	PS-PEG	ChemMatrix
DMF	Bom	Bom	Bom
2-MeTHF	Bom	Moderado	Bom
Cyreno	Baixo	Moderado	Bom
DEC	Moderado	Moderado	Bom
EtOAc	Moderado	Moderado	Bom
DMSO	Baixo	NA	Bom
IPA	Baixo	Baixo	Baixo
EtOH	Baixo	Moderado	Moderado
Cyreno/DEC (3:7)	Moderado	Moderado	Baixo
DMSO (EtOAc) (1:9)	Bom	NA	NA

Bom (verde) - bom inchaço > 4 mL/g e mais; Moderado (amarelo) - inchaço tolerável de 2 a 4 mL/g; Ruim (vermelho) - inchaço ruim < 2 mL/g; e NA (cinza) - não avaliado.

Fonte: Al Musaimi *et al.*, 2020.

Além da necessidade da mudança dos solventes utilizados nas etapas solvatação e de acoplamento, etapa considerada uma das reações mais exigente no processo da SPFS, também é necessário se atentar a etapa de desproteção do grupamento 9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc) do α -aminoácido, uma vez que ela também é etapa crucial para a síntese da cadeia peptídica. Uma baixa eficiência na etapa de desproteção resultará na diminuição do rendimento e da qualidade do processo, já que pode causar a deleção de aminoácidos, resultando em purificações mais difíceis (Luna *et al.*, 2016; Petropavlovskaya *et al.*, 2024). O grupamento Fmoc é um protetor temporário que é rapidamente removido por tratamentos com uma variedade de aminas primárias ou secundárias. Geralmente, a utilização de um solvente relativamente polar e um excesso de base na solução seriam eficientes para a remoção do Fmoc (Mthembu *et al.*, 2023).

A base de mais comumente utilizada para o processo de remoção do grupamento Fmoc da SPFS é a piperidina. Porém, este reagente é envolvido na fabricação de fenilciclohexilpiperidina (PCP), também conhecida como “pó de anjo”, que é um poderoso alucinógeno (Rodríguez *et al.*, 2020; Martelli *et al.*, 2021). Em países como a Colômbia e o Brasil os derivados de piperidina são rigorosamente controlados e monitorados, aumentando os custos e dificultando a sua aquisição. Além do problema da utilização na fabricação de

narcóticos, a piperidina é muito prejudicial à saúde humana e ao meio ambiente (Rodríguez *et al.*, 2020).

Uma alternativa apresentada para substituir a piperidina e evitar os problemas com a fabricação de entorpecentes é utilizar a 4-metilpiperidina que apresenta eficiência idêntica na remoção do grupamento Fmoc. No entanto, como a piperidina, a 4-metilpiperidina é um reagente altamente tóxico e nocivo ao meio ambiente e a saúde (Rodríguez *et al.*, 2020).

Desde o começo da utilização da metodologia de SPFS Fmoc/tBu diversas bases desprotetoras já foram utilizadas e estudadas dentre elas a piperidina no início dos anos 80, o 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-eno em 1991, a morfolina em 1999, a piperazina em 2000, a 4-metilpiperazine e metilpiperidinas 2006, hidróxido de sódio (NaOH) em 2019, a terc-butilamina (TBA) em 2020, e o tetrametilguanidina (TMG) e 3-(dietilamino)propilamina (DEAPA) em 2021 (Martelli *et al.*, 2021).

A morfolina é uma base considerada verde que vem utilizada até o momento como uma alternativa para a substituição da piperidina e da 4-metilpiperidina. A sua utilização na etapa de remoção do Fmoc é acompanhada de menos reações colaterais. No entanto, a sua utilização requer um tempo de reação mais longo em comparação com outras aminas cíclicas (Mthembu *et al.*, 2023).

Alguns estudos já vêm sendo realizados para a descoberta de novas bases com capacidade de remoção do Fmoc e de sua utilização conjuntamente com os solventes considerados verdes, visando reduzir a utilização de solventes e reagentes que causem danos ao meio ambiente e a saúde humana (Al Musaimi *et al.*, 2020; Wegner *et al.*, 2021). Na tabela 5 podemos observar alternativas parcialmente ou totalmente verdes para a etapa de remoção do Fmoc.

A tabela 5 demonstra que a piperidina preparada em uma solução com 2-MeTHF é uma boa escolha para substituir o DMF nas resinas de poliestireno e chemmatrix. Quando testada a 4-metilpiperidina em soluções como DMSO:EtOAc ou somente no DMSO foi demonstrado que, além de uma opção para substituição o DMF, também foi encontrada uma opção para substituir a piperidina (Al Musaimi *et al.*, 2020). Além da 4-metilpiperidina que é derivada da piperidina, diferentes bases de desproteção também foram testadas, como a morfolina em 2-MeTHF; o 1,8 diazabicyclo [5,4,0] undec-7-eno (DBU) em 2-MeTHF e o NaOH em 2-MeTHF:MeOH utilizando-se como resina a Rink amida em poliestireno. Todas estas soluções se apresentaram como potenciais alternativas mais ecológicas ao uso de piperidina e ao DMF (Přibylka *et al.*, 2019).

Tabela 5: Alternativas verdes para a remoção do Fmoc.

Solvente	Suporte polimérico	
	Poliestireno	ChemMatrix
Piperidina/2-MeTHF	Bom	Bom
Piperidina/Cyreno:DEC (3:7)	Baixo	NA
4-metilpiperidina/EtOAc	Baixo	NA
4-metilpiperidina/2-MeTHF	Baixo	NA
4-metilpiperidina/DMSO	Bom	NA
4-metilpiperidina/DMSO:EtOAc (1:9)	Bom	NA
50% morfolina/2-MeTHF	Bom	NA
0,5% DBU/2-MeTHF	Bom	NA
0,1 M NaOH/2-MeTHF:MeOH (1:1)	Bom	NA

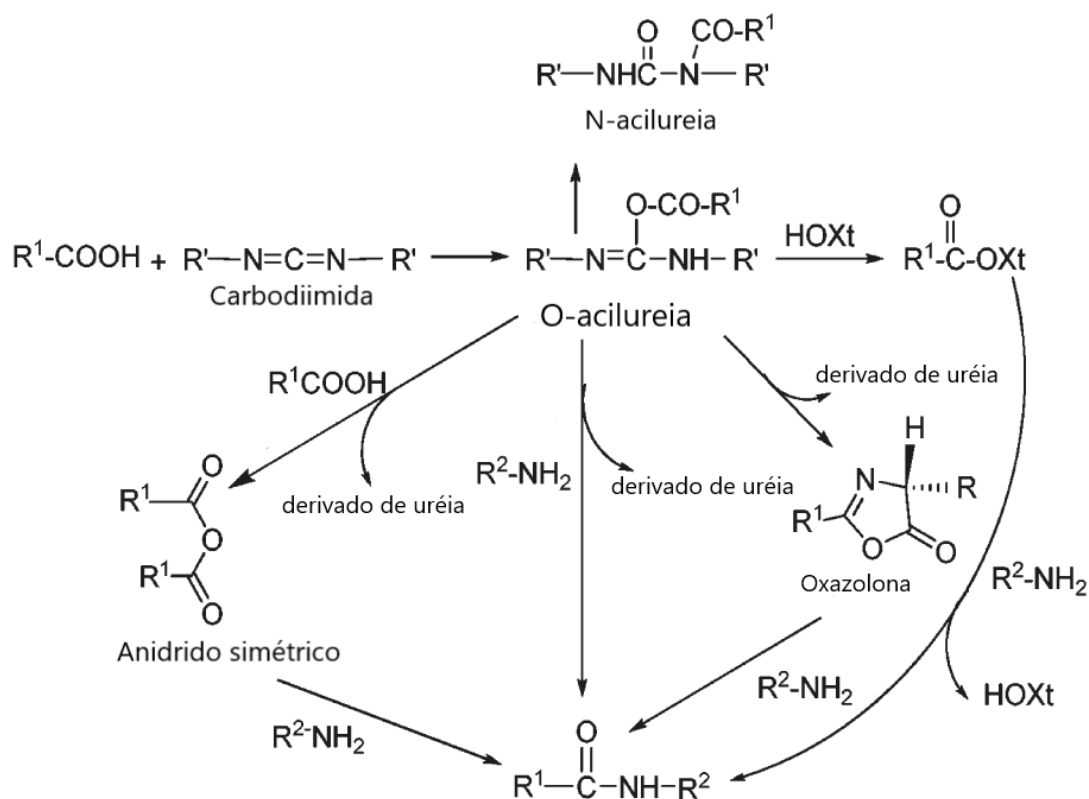
Bom (verde) - remoção completa de Fmoc; Ruim (vermelho) - remoção incompleta de Fmoc; e NP (cinza) - não realizado.

Fonte: Al Musaimi *et al.*, 2020.

Outro fator importante na SPFS é a reação de acoplamento dos aminoácidos, este processo ocorre pela ligação de um grupo amino de um aminoácido ao ácido carboxílico de um outro aminoácido, formando uma ligação amida ou peptídica (Al Musaimi *et al.*, 2020). O processo de combinar dois resíduos de aminoácidos é chamado acoplamento (El-Faham and Albericio, 2011).

Diversos reagentes podem ser utilizados para esta finalidade. As carbodiimidas são os reagentes mais amplamente utilizados, incluindo a N,N-diisopropilcarbodimida (DIC) a mais utilizada na SPFS atualmente. A reação deste reagente com os aminoácidos pode dar origem a diversas reações colaterais indesejáveis. Para que isso seja evitado, a ativação é realizada na presença de reagentes os quais contém N-OH, que produzem ésteres ativos mais adequados (figura 8) (Al Musaimi *et al.*, 2020).

Figura 8: Mecanismo de formação de ligação peptídica a partir de uma reação mediada por carbodiimida.



Adaptado de: El-Faham and Albericio, 2011.

Os aditivos correspondentes aos ésteres ativos, como os derivados de N-hidroxila (HOXt) são menos reativos que a O-acilureia. Porém, ao adicionar estes aditivos a eficiência das reações mediadas por carbodiimidas aumenta. Isso ocorre devido à supressão de formação de N-acilureia e a capacidade do HOXt protonar a O-acilureia, impedindo que ocorra reação intramolecular, diminuindo o grau de racemização da reação (El-Faham; Albericio, 2011).

O aditivo mais amplamente utilizado nas reações de acoplamento de aminoácidos é o 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), o qual provavelmente é o reagente mais comumente utilizado na síntese de peptídeos, sendo este o primeiro a ser desenvolvido na década de 1970. Posteriormente, um aditivo mais potente, o 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) foi desenvolvido (Subirós-Funosas *et al.*, 2009). Diversos outros aditivos de acoplamento com estruturas triazólicas e tetrazólicas também foram avaliados conjuntamente com o DIC para o uso na SPFS utilizando o protocolo Fmoc. Apesar da eficiência no processo de acoplamento estes reagentes apresentam uma desvantagem, eles são altamente explosivos devido ao seu baixo peso molecular e à presença de três ou quatro átomos de nitrogênio consecutivos, fazendo

com que eles fossem recategorizados na categoria de Classe 1 (explosivos), dificultando o transporte destes reagentes (El-Faham; Albericio, 2011; Manne *et al.*, 2022).

Em vista disso, o etil-2-ciano2-(hidroxiimino)-acetato (Oxima) foi desenvolvido como um inibidor racêmico relativamente seguro, o qual é utilizado atualmente na síntese com carbodiimida na obtenção de liraglutida, segmentos de proteína ubiquitina, e cadeias de poliubiquitina (Chen *et al.*, 2022).

Comparando a Oxima com o HOBt, ela exibe uma maior eficiência de acoplamento e menor taxa de racemização durante a síntese, além de menor risco de explosão. Somado a isto, a mistura de acoplamento DIC/Oxima demonstrou ser compatível com a SPFS por micro-ondas reduzindo a racemização em alta temperatura de 70°C a 90°C, sendo eficiente tanto em sínteses automatizadas quanto na manual (Chen *et al.*, 2022).

Tendo em vista a busca por uma síntese de peptídeos que gerem resíduos menos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente, bem como manter a sua eficiência nas etapas de solvatação, acoplamento e desproteção, faz-se necessário novos protocolos que sigam os princípios da química verde.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes solventes verdes para a metodologia de síntese de peptídeos em fase sólida para o EVF e para o PWKW. Bem como avaliar a eficácia *in vitro* do PWKW na inibição da liberação de cálcio nas células, e realizar ensaios clínicos para avaliação do potencial do EVF em sua capacidade de reduzir a produção de sebo na pele.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de desproteção das soluções utilizando como bases desprotetoras a morfolina, imidazol, 2-aminoetanol (MEA) e 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) na remoção do grupamento Fmoc em temperatura ambiente e a 50°C.
- Avaliar a utilização dos solventes 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), cyreno (Cyr), dietilcarbonato (DEC) na síntese dos peptídeos EVF e PWKW.
- Avaliar a utilização das misturas cyreno/dietilcarbonato (3:7), dimetilsulfóxido/acetato de etila (DMSO/EtOAc) (1:9), isopropanol/dimetilsulfóxido (IPA/DMSO) (4:6) e etanol/dimetilsulfóxido (Etanol/DMSO) (4:6) na síntese dos peptídeos EVF e PWKW.
- Sintetizar os peptídeos EVF e o PWKW em temperatura ambiente e em 50°C.
- Avaliar o papel do peptídeo PWKW na liberação de cálcio em células humanas musculares esqueléticas (HskMC).
- Realizar o estudo clínico para avaliação da capacidade de redução da produção de sebo do EVF.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AVALIAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA RESINA

A avaliação de novas soluções de desproteção utilizando solventes e reagentes verdes foi realizada por meio da quantificação dos grupamentos Fmoc ainda existentes na resina Fmoc-Val-Wang após a etapa de desproteção, isto é a quantidade de grupos não desprotegidos da resina. O protocolo de análise utilizado foi o da Novabiochem®, no entanto houve algumas modificações (Novabiochem, 2014). A resina utilizada para esta análise foi a Fmoc-Val-Wang. Resumidamente, a resina foi inicialmente solvatada com os solventes a serem utilizados. O tempo de solvatação para o DMF foi de 1 min e para os demais solventes foi de 2 minutos, sendo este processo repetido por quatro vezes. Depois de solvatada, a resina passou pelo processo de desproteção utilizando diferentes soluções sob agitação em temperatura ambiente e à 50°C. A desproteção foi avaliada em tempos de análise de 5 minutos a 125 minutos. Para cada análise uma alíquota aproximada de 5 µmol de resina era retirada e seca com auxílio de metanol e de vácuo, e transferida para um tubo de centrifugação de 2 mL.

Para remoção global dos grupos Fmoc ainda presentes na resina foi adicionado aos tubos 2 mL de solução de 50% 4-metilpiperidina em DMF, e os mesmos ficaram sob agitação branda por 20 min. Ao fim da agitação, as soluções foram diluídas até completar o volume de 10 mL com acetonitrila, sendo que, 2 mL dessa solução foram retirados e diluídos até completar o volume de 6,25 mL com acetonitrila.

As absorbâncias das soluções resultantes foram medidas em um espectrofotômetro em 290 nm, o teor de Fmoc na resina foi obtido pela equação 1:

$$\frac{mmol}{g} Fmoc = \frac{(A(amostra) - A(branco)) * 12,21}{massa da resina (mg)}$$

As diferentes soluções de desproteções e condições utilizadas estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Diferentes soluções e temperaturas utilizadas para a desproteção do grupo Fmoc da resina Fmoc-Val-Wang.

Solução de desproteção	Temperatura	Solvente de Solvatação
20% 4-metilpiperidina/ DMF	TA -	DMF
50% morfolina/2-MeTHF	TA 50°	2-MeTHF
50% Morfolina/Cyr	TA -	Cyr
50% Morfolina/ Cyr/DEC	TA 50°	Cyr/DEC
50% Morfolina/ DEC	TA 50°	DEC
50% Morfolina/ DMSO/EtOAc	TA 50°	DMSO/EtOAc
50% Morfolina/ IPA/DMSO	TA 50°	IPA/DMSO
30% Imidazol/DMF	TA 50°	DMF
25% AME/DMF	TA 50°	DMF
25% AMP/DMF	TA 50°	DMF
10% AMP/DMF	TA -	DMF
25% AMP/2-MeTHF	TA 50°	2-MeTHF
25% AMP/ Cyr/DEC	TA 50°	Cyr/DEC
25% AMP/IPA/DMSO	TA 50°	IPA/DMSO

*TA = Temperatura Ambiente

3.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Os peptídeos foram sintetizados utilizando a metodologia da síntese em fase sólida (SPFS) (Merrifield, 1963). Esta metodologia consiste no crescimento da cadeia peptídica, aminoácido por aminoácido, a partir da região C-terminal que é ligada a um suporte polimérico inerte as condições de síntese (Hansen and Oddo, 2015). Na síntese dos peptídeos desse projeto foram utilizadas como suporte a resina Wang, já adquiridas com o primeiro aminoácido acoplado.

Para a síntese utilizando o protocolo padrão, os acoplamentos foram realizados mediante a ativação do grupo carboxila dos Fmoc-aminoácidos utilizando N,N'-diisopropilcarbodiimida/N-hidroxibenzotriazolil (DIC/HOBt) durante duas horas com agitação, e como solvente dimetilformamida (DMF). Nessa etapa foi usado excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 2 vezes em relação ao número teórico de sítios reativos existentes na resina. A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada em meio básico com uma solução 20% 4-metilpiperidina em DMF durante 1 e 20 minutos. Entre cada

passo experimental foram efetuadas 6 lavagens com DMF. O sucesso de cada etapa de acoplamento/desproteção foi monitorado mediante o teste da ninidrina (Kaiser *et al.*, 1970b; a), sendo que, no caso de resultado positivo (cor azul), a reação de acoplamento era repetida. No caso de resultado negativo (cor amarela) a Fmoc-peptidil-resina era desprotegida e o Fmoc-aminoácido seguinte era acoplado.

No protocolo da SPFS verde foi utilizado a mistura DIC/Oxima Pure, como agentes acopladores durante uma hora com agitação, utilizando como solventes o 2-MeTHF, Cyr, DEC, Cyr/DEC (3:7), IPA/DMSO e etanol/DMSO. Nessa etapa foi usado excesso de Fmoc-aminoácidos e agentes acoplantes de 2 vezes em relação ao número teórico de sítios reativos existentes na resina. A cada etapa de acoplamento, a solvatação da resina era avaliada. A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada em meio básico com as melhores soluções selecionadas no teste de desproteção. O sucesso de cada etapa de acoplamento/desproteção foi monitorado mediante o teste da ninidrina. As sínteses dos protocolos verdes foram realizadas em temperatura ambiente e sob temperatura de 50°C.

3.3 CLIVAGEM DOS PEPTÍDEOS

Ao fim da síntese, para separar o peptídeo da resina, foi realizada a reação de clivagem da massa total da resina obtida resina obtida, utilizando uma solução composta de supressores de reações colaterais (scavengers) 2,5% água, 2,5% TIS (triisopropilsilano) em 95% de ácido trifluoracético (TFA). A reação foi conduzida sob agitação moderada durante duas horas à temperatura ambiente. Ao término, a solução foi filtrada; água ultrapura foi adicionada e a solução liofilizada.

Para a clivagem do peptídeo EVF e do PWKW um teste foi realizado para diminuir a quantidade de TFA utilizado. Sendo testados quantidades de equivalências diferentes para diminuir o volume final do coquetel de clivagem e usando uma temperatura de 60°C.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos brutos após serem obtidos nas etapas de clivagem foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna XBridge® C 18 (tamanho 4,6 x 150 mm, tamanho da partícula de 5 µm). Os peptídeos foram analisados utilizando um gradiente de 5 a 95% de solvente B (0,036% TFA em acetonitrila solvente B e 0,045% TFA em água ultrapura) em 30 min em um fluxo de 1 mL/min.

As análises dos peptídeos foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo LCQ-fleet, com configuração ESI-IT-MS. Realizou-se a infusão direta das soluções de amostra a uma concentração de aproximadamente 10 ppm em acetonitrila/água contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. A vazão de infusão foi ajustada a 5,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a fonte de eletrospray foi operada em modo positivo, aplicando-se 4,5 kV no capilar de eletrospray.

3.5 EFICÁCIA *IN VITRO* DO PEPTÍDEO PWKW

3.5.1 Avaliação do peptídeo PWKW na Liberação de Cálcio em Células Humanas Musculares Esqueléticas (hSkMC)

Para verificar o efeito do peptídeo PWKW na inibição da contração muscular, foi realizado um estudo sobre o bloqueio do influxo de cálcio em células musculares esqueléticas humanas (hSkMC).

As células hSkMC foram cultivadas até atingir confluência em frascos Falcon® de 75 cm^2 (Corning) e, em seguida, destacadas por incubação com solução de tripsina/EDTA a 0,04% / 0,03% (Promocell) por 5 minutos a 37 °C com 5% de CO_2 . Para inativação da tripsina, utilizou-se o meio D10 (DMEM suplementado com 10% de FBS), sendo a suspensão celular misturada em proporção 1:1 com azul de tripano a 0,4% por 30 segundos.

Após esse período, as células foram centrifugadas e ressuspensas no meio de crescimento para células musculares esqueléticas (SkMCGM), ajustadas para atingir uma densidade de 10^5 células/mL, e semeadas em placas de 96 poços, com 100 μL por poço.

Após a fixação, as células foram divididas nos seguintes grupos experimentais: controle (sem tratamento), tratamento com o peptídeo PWKW com pureza de 97% (Anexo I), nas concentrações de 0,01%, 0,1% e 1%, exposição à ionomicina para induzir liberação de cálcio, e grupo com tratamento + ionomicina.

As células foram tratadas com o peptídeo, na ausência de ionomicina, por 2 horas a 37 °C, 5% de CO_2 . Após esse período, foram retirados 50 μL do meio de cada poço, substituídos por 50 μL do tampão de ensaio de cálcio Fluo-4 Direct™ 2X.

As células permaneceram incubadas com a sonda sensível ao cálcio por 30 minutos a 37 °C com 5% de CO_2 , seguidos por mais 30 minutos à temperatura ambiente sem CO_2 . Em seguida, o tampão de Fluo-4 foi completamente removido dos poços.

Nos grupos controle e tratamento, foram adicionados 50 μL de PBS sem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ por poço. Para os grupos controle + ionomicina e tratamento + ionomicina, adicionou-se PBS sem

Ca²⁺/Mg²⁺ contendo ionomicina (10 µM), com o objetivo de induzir a onda de liberação de cálcio intracelular.

Imediatamente após essa adição, foi registrada a fluorescência (excitação = 485 nm / emissão = 535 nm) emitida pela ligação do cálcio ao Fluo-4.

3.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA E EXPERIMENTAL DO PEPTÍDEO EVF E PAL-EVF

Foi realizado um ensaio clínico randomizado, simples-cego, controlado por placebo. As voluntárias foram selecionadas de acordo com os fatores de inclusão sendo estes, participantes do sexo feminino com idade entre 18 e 50 anos; pele íntegra na região de análise do produto; concordância em realizar medidas de oleosidade para avaliação do índice sebumétrico (média das hemifaces deve ser ≤ 100); concordância em obedecer aos procedimentos do ensaio e comparecer a clínica nos dias determinados; entender, consentir e assinar o termo de consentimento livre esclarecido. Foram considerados como critérios de não inclusão voluntárias que estavam de gestação/lactação ou intenção de engravidar no período do estudo; uso dos seguintes medicamentos de uso tópico ou sistêmico: imunossupressores, anti-histamínicos, anti-inflamatórios não hormonais, e corticoides até 30 dias antes da seleção e considerando-se imunossupressores o intervalo deverá ser de 3 meses antes da solução; antecedentes atópicos ou alérgicos a produtos cosméticos; produtos com ação antienvelhecimento como cosméticos de uso tópico ou suplementos alimentares; patologias e/ou lesões cutâneas ativas na área de avaliação; marcas cutâneas na área experimental que interfiram na avaliação de possíveis reações cutâneas.

O estudo seguiu com quatro grupos de voluntárias do sexo feminino (total = 32 voluntárias), recebendo uma formulação tópica contendo base placebo (8 voluntárias), que consiste no sistema auto emulsionante Uniox C (Álcool Cetearílico [e] Polissorbato 60) 12%, Fenoxietanol 0,5% como conservante, 1,3-propanodiol como solubilizante e água como solvente, ou uma formulação contendo o ativo do mercado Sepicontrol a 4% (8 voluntários), ou uma formulação base contendo peptídeo EVF (com pureza de 99% Anexo I) 0,01% (8 voluntários), ou formulação contendo o peptídeo Pal-EVF 0,01% (8 voluntários). Os voluntários aplicaram na pele do rosto quantidades suficientes de formulação tópica (placebo, EVF ou Pal-EVF 0,01%), espalhando suavemente, duas vezes ao dia (manhã e noite). Neste ensaio clínico, os voluntários foram submetidos a 28 dias de tratamento tópico com formulações de Placebo, peptídeo EVF 0,01%, peptídeo Pal-EVF 0,01% na área facial e os efeitos clínicos

foram determinados pela quantificação dos níveis de sebo. A avaliação dos níveis de sebo nos voluntários de ambos os grupos experimentais foi feita por um técnico e um dermatologista antes de qualquer tratamento (Dia 0), e 14 (Dia 14) e 28 (Dia 28) dias após os tratamentos. Para todas as medições nos dias 0, 14 e 28, os voluntários foram submetidos a um descanso prévio de 20 minutos em sala com umidade e temperatura controladas.

3.6.1 Análise de Sebo Facial

Os níveis de sebo na testa foram determinados com um aparelho fotométrico (Sebumeter® SM 815, Courage+Khazaka, Colônia, Alemanha). O equipamento mede fotometricamente o aumento da transparência de uma tira plástica especial que fica translúcida quando revestida com sebo. A tira de plástico tem aproximadamente 0,1 mm de espessura e 64 mm² de área. A tira é sustentada por um espelho, que a pressiona contra a pele da região a ser avaliada com pressão fixa de 10 N por meio de uma mola. O instrumento contém um dispositivo de cronometragem que permite uma medição de 30 segundos. A transparência da tira é avaliada por uma fotocélula presente no dispositivo onde a tira plástica é inserida e a transmissão luminosa representa a quantidade de sebo por área e os resultados expressos em valores absolutos (µg sebo/cm²). Cada formulação foi aplicada na hemiface direita, portanto, o lado oposto à aplicação é considerado área controle. As medições foram realizadas em triplicado.

Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste t de Student pareado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.7 REDUÇÃO DO TAMANHO DE POROS

Um novo estudo clínico, com número ampliado de voluntárias, foi realizado. Foram selecionadas 20 participantes do sexo feminino, caucasianas, por grupo, com idade entre 19 e 50 anos, pele oleosa e índice sebumétrico superior a 150 µg/cm² na zona T.

Para análise dos poros cutâneos, imagens das regiões do nariz e das bochechas foram capturadas utilizando o equipamento Bio 3D Structured-light Scanner. As imagens foram processadas em software específico, e a região de interesse foi selecionada para avaliação de três parâmetros: área total dos poros, número total de poros e contraste entre pele normal e poros. Esses dados foram obtidos em cada uma das medições.

As medições foram realizadas em três momentos: no dia inicial (D0), após 14 dias (D14) e após 28 dias (D28) da primeira aplicação do produto. A análise estatística dos resultados foi feita por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon pareado.

3.8 AVALIAÇÃO DE REDUÇÃO E CONTROLE DE OLEOSIDADE

A análise de redução e controle da oleosidade da pele foi realizada através dos registros fotográficos dos voluntários tratados com placebo, ativo de mercado a 4% e uma formulação e do peptídeo EVF a uma concentração de 1% na mesma formulação base, bem como análise quantitativa das médias dos índices sebumétricos, obtidas por Sebumeter.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DE DESPROTEÇÃO DA RESINA

Na SPFS as etapas de acoplamento e desproteções devem ser quantitativas para limitar o acúmulo de produtos de reações colaterais durante a síntese (Egelund *et al.*, 2021). Para que a síntese ocorra de uma forma eficiente, a proteção do grupo α -amino é obrigatória para evitar que ocorra a polimerização do aminoácido quando este for ativado. Na síntese de peptídeos em fase sólida, o crescimento da cadeia peptídica é realizado da extremidade C-terminal para a N-terminal, sendo o grupo protetor α -amino removido após cada acoplamento da síntese. No entanto, as condições de desproteção necessitam ser brandas para que não afetem os grupos protetores das cadeias laterais que são geralmente removidos na etapa final do processo sintético (Isidro-Llobet *et al.*, 2009).

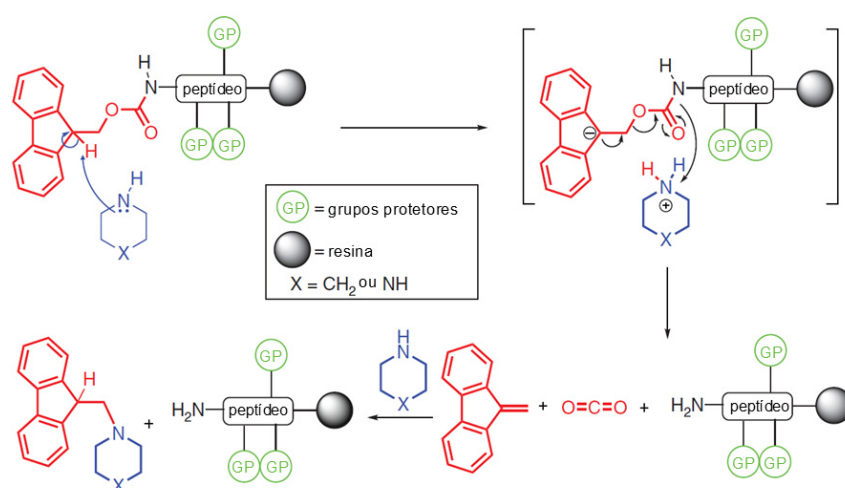
Duas estratégias são empregadas na SPFS. A primeira, Boc/Bzl (terc-butoxicarbonila/benzila), baseia-se na labilidade ácida do grupamento protetor Boc, sendo utilizado ácido trifluoracético (TFA) para sua remoção. A ligação do peptídeo ao suporte polimérico, assim como a remoção dos protetores das cadeias laterais, é realizada com fluoreto de hidrogênio (HF). A segunda estratégia, Fmoc/tBu (9-fluorenilmetiloxycarbonila/terc-butila), fundamenta-se na proteção ortogonal da função α -amino do aminoácido pelo grupo Fmoc, que é lábil em meio básico. A clivagem do peptídeo da resina e a desproteção das cadeias laterais são realizadas com TFA, um ácido mais fraco e de manuseio mais seguro que o HF. Devido à maior facilidade de uso e ao rendimento superior, a SPFS baseada na proteção Fmoc é atualmente a metodologia mais empregada na rotina de síntese de peptídeos. (Amblard *et al.*, 2006).

A reação de remoção do grupamento Fmoc se dá por duas etapas, sendo a primeira a remoção do próton ácido na posição 9 do anel de fluoreno por meio de uma base, sendo de preferência uma amina secundária, seguida de uma β -eliminação que produz como produto intermediário o dibenzofulveno (DBF), o qual é rapidamente capturado pela amina secundária para formação de um aduto estável (figura 8) (Luna *et al.*, 2016). A base mais comumente utilizada na SPFS para remoção do grupamento Fmoc é a piperidina (Personne *et al.*, 2023). No entanto, ela é uma substância controlada pelos órgãos de segurança por conta de sua utilização na produção de narcóticos, além de ser considerada tóxica, já que a sua pontuação na avaliação de solventes verdes de 6,99 em uma escala que vai de 0 a 10 no guia de seleção de reagentes da Glaxo Smith Kline (GSK) (Mthembu *et al.*, 2023; Personne *et al.*, 2023). Outro

problema também encontrado na utilização da piperidina na SPFS é que ela induz a formação de aspartimida em algumas sequências que apresentam o aminoácido ácido aspártico (Personne *et al.*, 2023). Uma alternativa apresentada para contornar o controle da polícia federal foi a adição de um grupamento metil na posição 4 do anel da piperidina, formando a 4-metilpiperidina. Essa apresenta um tempo reacional de remoção do Fmoc semelhante a piperidina e resolve os problemas de importação deste produto, pois não pode ser usado mais na produção de narcóticos (Hachmann; Lebl, 2006).

Destaca-se que a 4-metilpiperidina tem sido empregada como alternativa à piperidina, visando contornar restrições legais relacionadas à sua importação. Contudo, essa substituição não elimina os demais inconvenientes associados ao seu uso, especialmente no que se refere à geração de resíduos tóxicos.

Figura 9: Reação de remoção do Fmoc.

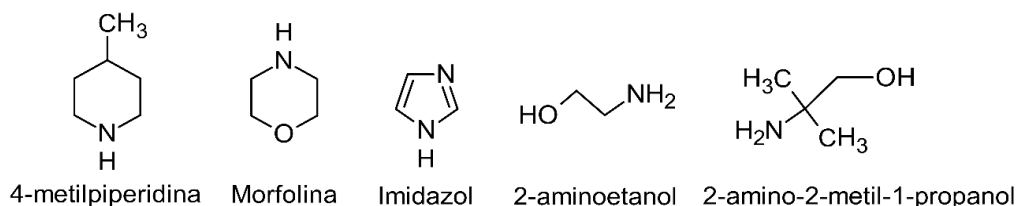


Adaptado de: Li *et al.*, 2020.

Por conta dos riscos à saúde e ao meio ambiente, além da dificuldade de se comprar a piperidina para a sua utilização na SPFS, se faz necessário encontrar novas bases que possam substituí-las. Por isso, estudos vêm sendo realizados sobre a utilização da química verde na SPFS, buscando alternativas de solventes e bases com capacidade de remover o grupamento Fmoc (Jad, Acosta, Khattab, *et al.*, 2016; Přibylka *et al.*, 2019; Přibylka *et al.*, 2021). Neste estudo foram avaliadas novas bases que possam substituir o uso da piperidina na etapa de desproteção do grupamento Fmoc. A análise foi realizada utilizando a morfolina, o imidazol, o 2-aminoetanol (AME) e o 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) (figura 10). As duas últimas

bases são utilizadas como componentes na indústria cosméticas, sendo este o motivo de sua escolha, sendo seguras e propostas pela empresa parceira deste projeto. Estas bases foram escolhidas pois, possuem o grupamento amina, o qual é importante na reação de clivagem do Fmoc ligado a resina.

Figura 10: Bases utilizadas na desproteção do Fmoc.



Fonte: Próprio autor.

Para este estudo, foi escolhida a resina Fmoc-Val-Wang, a qual foi previamente solvatada e avaliada visualmente com diferentes solventes testados: 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), Cyreno (Cyr), carbonato de dietila (DEC), mistura Cyr/DEC (3:7), DMSO/acetato de etila (EtOAc) na proporção 1:9, isopropanol (IPA)/DMSO na proporção 4:6 e dimetilformamida (DMF).

A morfolina é um composto heterocíclico aromático de seis membros, o qual é caracterizado pela presença dos grupos funcionais éter e amina (Figura 10). É uma base moderadamente forte que é amplamente utilizada como intermediário em sínteses multiorgânicas (Tang *et al.*, 2023). Diversos métodos são relatados para a obtenção da morfolina, sendo uma das abordagens a conversão de um álcool 1,2-amino em morfolina (Ortiz *et al.*, 2024). A utilização de morfolina como base na desproteção do Fmoc já tem sido testada como substituta da piridina e, uma solução contendo 50% de morfolina em DMF apresentou um tempo de desproteção total de 10 + 20 minutos (Mthembu *et al.*, 2023). Por isso, ela tem sido uma base promissora na substituição da piperidina ou da 4-metilpiperidina, esta última a base comumente utilizada em nosso grupo como agente desprotetor. Neste trabalho, esta base foi testada em diferentes combinações de solventes verdes em comparação com o DMF.

Dentre os solventes testados, o Cyreno foi o que menos apresentou capacidade de inchamento da resina, isso pode estar relacionado a sua viscosidade, o que também pode ter influenciado no tempo de desproteção da solução morfolina/Cyr que foi de 125 minutos (Tabela 6). A solução contendo 50% morfolina em Cyr se solidificou durante o estudo, demonstrando que a sua utilização é inviável. A morfolina neste solvente apresentou os piores resultados de desproteção nos tempos estudados.

Tabela 6: Avaliação do tempo de desproteção das diferentes soluções de desproteção.

Solventes		Desproteção (%)						
		Tempo (min)						
		5	25	45	65	85	105	125
20% 4-metilpiperidina/ DMF	TA*	100	-	-	-	-	-	-
50% morfolina/2-MeTHF	TA*	63	83	96	100	-	-	-
	50°C	89	100	-	-	-	-	-
50% Morfolina/Cyr	TA*	12	26	40	53	72	85	100
50% Morfolina/ Cyr/DEC (3:7)	TA*	41	71	82	89	94	97	100
	50°C	85	95	97	98	99	100	-
50% Morfolina/ DEC	TA*	57	84	96	100	-	-	-
	50°C	86	97	99	-	-	-	-
50% Morfolina/ DMSO/EtOAc (1:9)	TA*	67	87,2	93,5	96,4	98,7	99,5	100
	50°C	80,7	91,2	95,5	98,5	98,8	99	100
50% Morfolina/ IPA/DMSO (4:6)	TA*	50	82	97	99	100	-	-
	50°C	100	-	-	-	-	-	-
30% Imidazol/DMF	TA*	18	36	52	66	78	90	100
	50°C	21	40	57	72	82	92	100
25% AME/DMF	TA*	79	100	-	-	-	-	-
	50°C	100	-	-	-	-	-	-
25% AMP/DMF	TA*	88	100	-	-	-	-	-
	50°C	91	100	-	-	-	-	-
10% AMP/DMF	TA*	84	97	100	-	-	-	-
25% AMP/2-MeTHF	TA*	26	46	62	75	85	93	100
	50°C	73	90	97	99	100	-	-
25% AMP/ Cyr/DEC (3:7)	TA*	21	39	57	72	83	92	100
	50°C	35	60	74	86	94	97	100
25% AMP/IPA/DMSO	TA*	26	44	58	69	80	90	98
	50°C	91	100	-	-	-	-	-

*TA = Temperatura Ambiente

O uso de 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6) foi a solução mais eficiente na desproteção do grupo Fmoc, sendo que em temperatura ambiente a solução demorou 65 minutos para que a resina tivesse 99% livre do grupamento protetor. Na temperatura de 50°C o tempo diminuiu para 5 minutos (Tabela 6). O uso da alta temperatura na SPFS é uma alternativa bem

estudada, onde já foi demonstrado que a sua variação pode influenciar tanto nas etapas de acoplamento quanto nas etapas de desproteção, fazendo com que elas ocorram de forma mais eficiente e gerando peptídeos com menos contaminantes (Varanda and Miranda, 1997; Ribeiro *et al.*, 2001). A morfolina também apresentou num bom desempenho conjuntamente com 2-MeTHF e DEC, tendo uma desproteção de 100% nos tempos de 25 e 45 minutos respectivamente à 50°C. Em DMSO/EtOAc (1:9), um solvente também descrito na literatura como alternativa ao DMF (Martin *et al.*, 2020; Egelund *et al.*, 2021), o tempo necessário para a desproteção foi muito superior ao DMF, e maior ao encontrado para o 2-MeTHF (Tabela 6).

O imidazol também foi avaliado. Esse possui um anel heterocíclico de cinco membros, contendo dois átomos de nitrogênio, três átomos de carbono e duas ligações duplas (Vázquez-Salazar *et al.*, 2017; Wang, J. *et al.*, 2024). Ele é conhecido por exibir uma gama de aplicações industriais e farmacêuticas, podendo ser encontrado em núcleos de medicamentos e desempenhar um importante papel como ligantes em metaloenzimas. Os sais imidazólicos também podem ser aplicados como solventes quimicamente corretos (Kamijo; Yamamoto, 2007). A solução de 30% de imidazol em DMF foi avaliada quanto a sua capacidade de remover o grupamento Fmoc da resina, porém tanto em temperatura ambiente, quanto a 50°C a presente solução só conseguiu remover 100% dos grupamentos com o tempo de 125 minutos. Sendo assim, por conta do alto tempo de desproteção em DMF, resolvemos não prosseguir o estudo em outros solventes.

Outra base que foi utilizada neste estudo foi o 2-aminoetanol (Figura 10), ele é derivado do dióxido de etileno que reage com amônia para formar mono-, di- e trietanolamina. Esta base é miscível em clorofórmio, álcool, água e tetracloreto de carbono e amplamente utilizada em estudos de captura de carbono. Na SPFS, já foi utilizada como base para a produção da aminometil-resina de poliestireno (AM-PS) (Klaus Weissmehl, 2003; Harris *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2011). O 2-aminoetanol pode ser utilizado como substituto da 4-metilpiperidina, uma vez que apresenta menor nível de toxicidade. A solução de 25% de 2-aminoetanol em DMF foi uma das misturas mais reativas entre as soluções testadas, sendo que, conjuntamente com a solução de 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6) à 50°C, foram as que mais se aproximaram ao uso da 4-metilpiperidina, que tem um tempo total de desproteção de 2 minutos em uma solução de 20% em DMF (Martelli *et al.*, 2021). Esse amino-álcool apresentou um tempo de desproteção total de 25 minutos em DMF à temperatura ambiente, sendo que à 50°C, esse tempo diminuiu para 5 minutos. Porém ao ser testada conjuntamente com o solvente 2-MeTHF, observou-se que os solventes não se misturavam, sendo assim não foi possível realizar esta análise.

Outro amino-álcool testado foi o 2-amino-2-metil-1-propanol, ele também possui uma amina primária e é utilizado pela indústria cosmética como um agente emulsificante para cremes e loções (Figura 10). No entanto, apresenta uma rápida taxa de reação, alta capacidade de absorção e excelente desempenho de regeneração, apesar de seu maior impedimento estérico (Harris *et al.*, 2011; An *et al.*, 2024). Ele foi testado em DMF a uma concentração de 25% e apresentou um tempo de desproteção de 25 minutos. Quando testado conjuntamente com a solução de IPA/DMSO (4:6) a uma proporção de 25%, apresentou um tempo total de desproteção de 25 minutos à 50°C. Porém, quando avaliado conjuntamente com o solvente 2-MeTHF, o tempo total aumentou para 85 minutos à 50°C.

Comparando as quatro novas bases testadas, foi possível observar que somente o 2-aminoetanol e o AMP possuem pKa próximos da 4-metilpiperidina (Tabela 7), 9,5; 9,7 e 11,2; respectivamente. Os maiores valores de pKa podem influenciar a capacidade de clivar o Fmoc do aminoácido. Quanto ao custo, os amino-álcoois e a morfolina apresentam valores três vezes mais baixos do que a 4-metilpiperidina, que no ponto de vista industrial, diminuiria o valor final da produção de peptídeos. Considerando o ponto de vista ecológico, todas as bases testadas apresentam graus de periculosidade (Tabela 8), sendo necessários cuidados tanto em seu manejo quanto em seu descarte.

Tabela 7: Comparativo de pKa e custo das bases testadas.

Bases	pKa	Custo (500 mL) (R\$)
4-metilpiperidina	11,2	1372,00
Morfolina	8,5	373,00
2-aminoetanol	9,5	279,00
AMP	9,7	473,00
Imidazol	6,9	1163,00 (25g)

Fonte: Catálogo sigma

De uma forma geral, a utilização de solventes considerados verdes, aumentou o tempo necessário para a etapa de desproteção, tornando assim a síntese em alguns casos mais demorada. Embora o uso de temperaturas acima da temperatura ambiente e o tempo necessário para a desproteção completa possam ser entendidos como desvantagens, eles estão longe de serem proibitivos em instalações industriais. Na verdade, o descarte de resíduos perigosos de SPFS tradicionais apresenta uma desvantagem significativamente maior quando se considera a produção em larga escala e seu impacto ambiental.

Tabela 8: Classificação de segurança das bases analisadas.

Toxicidade	Bases				
	4-metilpiperidina	Morfolina	Imidazol	AME	AMP
Líquido inflamável	X	X		X	
Corrosivo para a pele	X	X		X	
Irritação da pele					X
Lesões oculares	X		X	X	X
Toxicidade Aguda - Oral	X	X	X	X	X
Toxicidade Aguda - Inalação	X	X		X	
Toxicidade Aguda - Dérmico	X	X		X	
Toxicidade à reprodução		X	X		
Toxicidade sistêmica de órgão-alvo específico (sistema respiratório)	X			X	
Perigoso ao ambiente aquático- Agudo	X			X	X

4.2 SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM FASE SÓLIDA

Após a determinação das condições necessárias para a remoção total do grupamento Fmoc nas soluções testadas, foram realizadas as sínteses do tripeptídeo EVF e do tetrapeptídeo PWKW (Katekawa *et al.*, 2022; Katekawa *et al.*, 2024; Katekawa E., 2024). Estes peptídeos são de interesse da indústria cosmética, sendo escolhidos por este motivo.

As sínteses foram realizadas utilizando o protocolo tradicional, um que denominamos de parcialmente verde e outro totalmente verde. Como método de acoplamento para as sínteses verde foi utilizado a Oxima/DIC. A utilização de Oxima nestes protocolos se deu porque além de ser mais segura do que o HOBt, este último possui propriedades explosivas. Somado a isto, a Oxima é descrita como sendo superior na supressão da racemização/epimerização e apresenta melhoria de eficiência no acoplamento (Wehrstedt *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2023).

4.2.1 Alternativas de protocolos de síntese para o peptídeo EVF

O peptídeo EVF é um peptídeo que vem sendo estudado quanto a sua atividade na diminuição da produção de sebo pelos sebócitos, tendo como um provável mecanismo a por meio da inibição da enzima MCR-5 (Katekawa E., 2024), sendo o escolhido para este estudo.

Os diferentes protocolos de síntese avaliados para o peptídeo EVF podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9: Diferentes protocolos de síntese utilizados na obtenção do peptídeo EVF. Em vermelho o protocolo tradicional, em amarelo o parcialmente verde e em verde, totalmente verde.

Metodologia de Síntese	Solvente	Desproteção	Acoplamento
SPFS padrão	DMF	20% 4-metilpiperidina/ DMF 1 e 20 min	DIC/HOBt - 2 h
SPFSPV-AMP 50°C	DMF	25% AMP/DMF 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSPV-AME 50°C	DMF	25% AME/DMF 1 e 5 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSPV-2-MeTHF/morfolina	2-MeTHF	50% morfolina/DMF 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSPV-2-MeTHF/AMP 50°C	2-MeTHF	25% AMP/DMF 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-2-MeTHF	2-MeTHF	50% morfolina/2-MeTHF 10 e 60 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-2-MeTHF 50°C	2-MeTHF	50% morfolina/2-MeTHF 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-2-MeTHF/AMP 50°C	2-MeTHF	25% AMP/2-MeTHF 10 e 60 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-Cyr/DEC 50°C	Cyr/ DEC (3:7)	50% morfolina/Cyr/ DEC (3:7) 5 e 80 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-DEC 50°C	DEC	50% morfolina/DEC 5 e 40 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C	IPA/ DMSO (4:6)	50% morfolina/IPA /DMSO (4:6) 10 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-IPA/DMSO/AMP 50°C	IPA/ DMSO (4:6)	25% AMP/ IPA/DMSO (4:6) 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-IPA/DMSO/AME 50°C	IPA/ DMSO (4:6)	25% AME/ IPA/DMSO (4:6) 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h

4.2.1.1 Protocolo padrão de síntese do peptídeo EVF – SPFS padrão.

Na síntese utilizando o protocolo padrão de síntese (Figura 11) foi possível observar um rendimento de síntese acima de 100% em termos de massa, obtendo-se 53,7 mg (valor teórico de 51 mg considerando o contra-íon trifluoracetato) de peptídeo bruto (tabela 10). A massa acima do esperado pode ter sido causado pela presença de sal no material obtido. Porém ao analisar o perfil cromatográfico do peptídeo (figura 12) é possível observar que ele possui um contaminante muito próximo ao pico do peptídeo, fazendo com que a purificação seja difícil e diminuindo o rendimento de peptídeo puro obtido. Este contaminante foi identificado como sendo o dipeptídeo VF (dados não apresentados).

Figura 11: Esquema da SPFS padrão. Solvatação da resina em DMF, desproteção usando 20% 4-metilpiperidina em DMF, acoplamento com a mistura acoplante HOBt/DIC a temperatura ambiente.

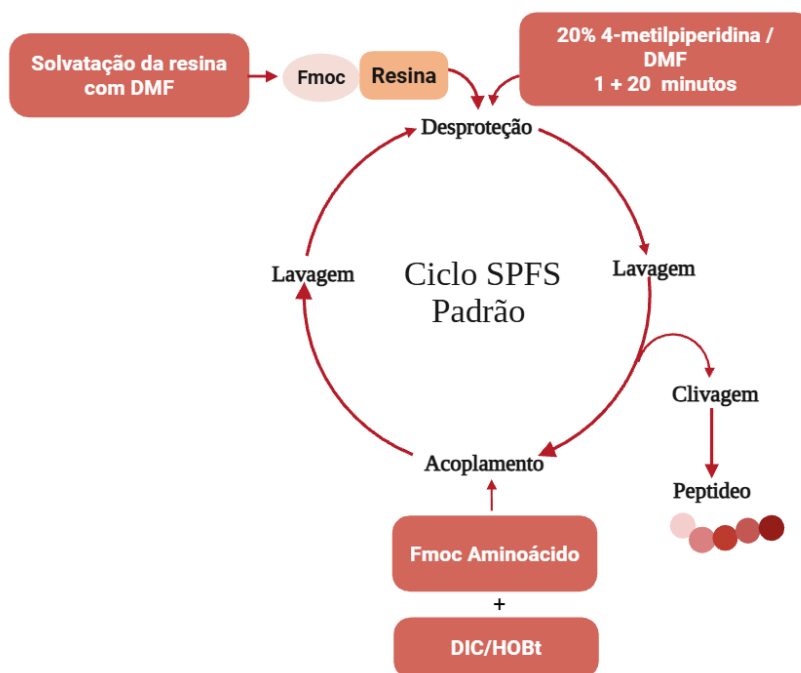


Figura 12: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo padrão. Solvatação em DMF, desproteção usando 20% 4-metilpiperidina em DMF, acoplamento com a mistura acoplante HOBt/DIC a temperatura ambiente.

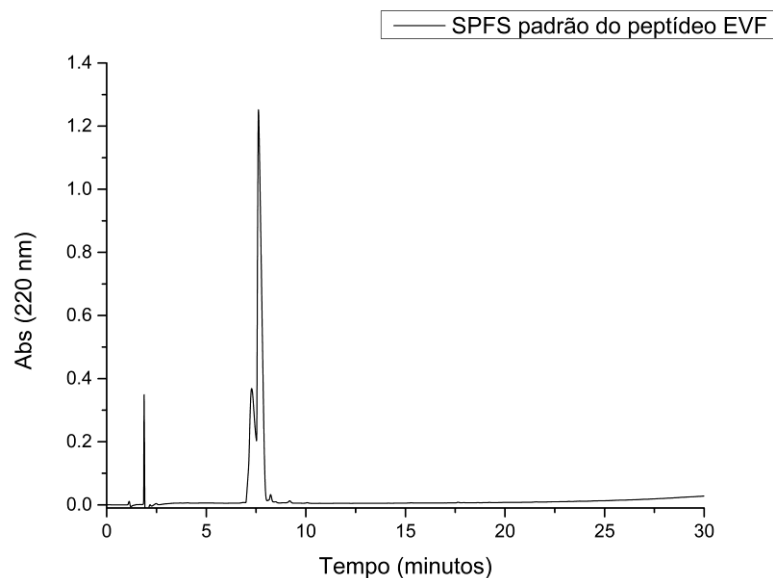


Tabela 10: Comparativo dos resultados obtidos para a síntese do peptídeo EVF.

Protocolo	Rendimento de Síntese (%)	Grau de Pureza (%)	Massa de peptídeo obtida (mg)
SPFS padrão	105	70	53,7
SPFSPV-AMP 50°C	88	84	44,7
SPFSPV-AME 50°C	94	63	47,8
SPFSPV-2-MeTHF/morfolina	91	88	46,4
SPFSPV-2-MeTHF/AMP 50°C	105	66	53,3
SPFSV-2-MeTHF	96	76	48,9
SPFSV-2-MeTHF 50°C	88	84	45,0
SPFSV-2-MeTHF/AMP 50°C	131	78	66,7
SPFSV-Cyr/DEC 50°C	142	59	72,2
SPFSV-DEC 50°C	210	34	107,3
SPFSV-IPA/DMSO /morfolina 50°C	137	53	69,8
SPFSV-IPA/DMSO /AMP 50°C	158	63	80,6
SPFSV-IPA/DMSO /MEA 50°C	79	24	40,3

4.2.1.2 Protocolo utilizando como solvente o DMF e AMP como base de desproteção – SPFSV-AMP 50°C.

No protocolo denominado como parcialmente verde (SPFSV-AMP), a desproteção foi realizada com solução de 25% AMP em DMF e a solvatação e lavagens foi realizada com DMF. A temperatura utilizada foi a de 50°C (figura 13). O rendimento de síntese foi de 88% e a massa de peptídeo bruto obtida foi de 44,7 mg. Ao analisar o perfil cromatográfico do material bruto obtido (figura 14) é possível observar que o tempo de retenção do material principal é semelhante ao observado na síntese com o protocolo padrão, o que comprova a obtenção do material desejado, porém o pico contendo o dipeptídeo VF é menor e o grau de pureza obtido maior, demonstrando que este protocolo de síntese é viável e que o uso do AMP é vantajoso.

Figura 13: Esquema de SPFSV-AMP 50°C parcialmente verde. Solvatação da resina em DMF, desproteção usando 25% AMP em DMF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

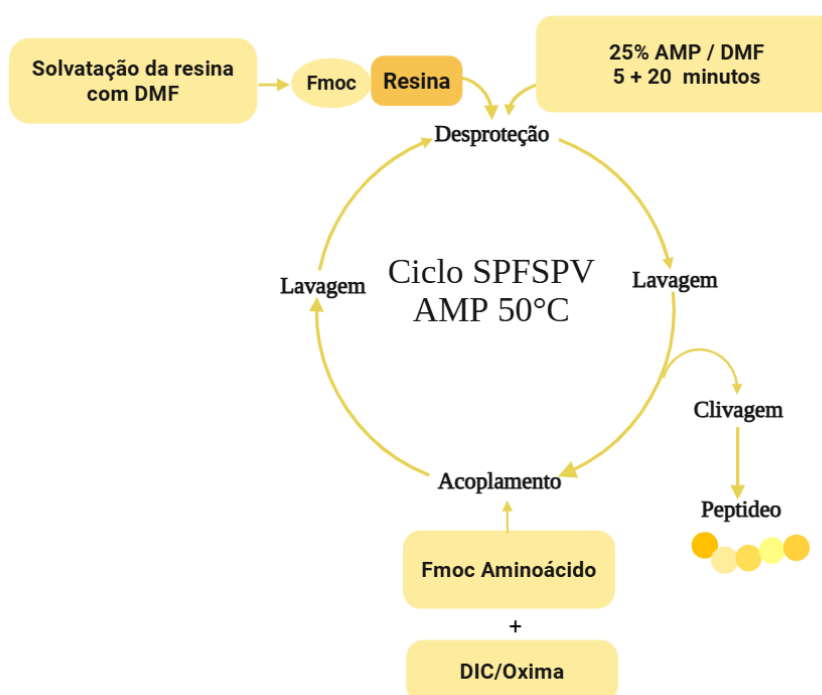
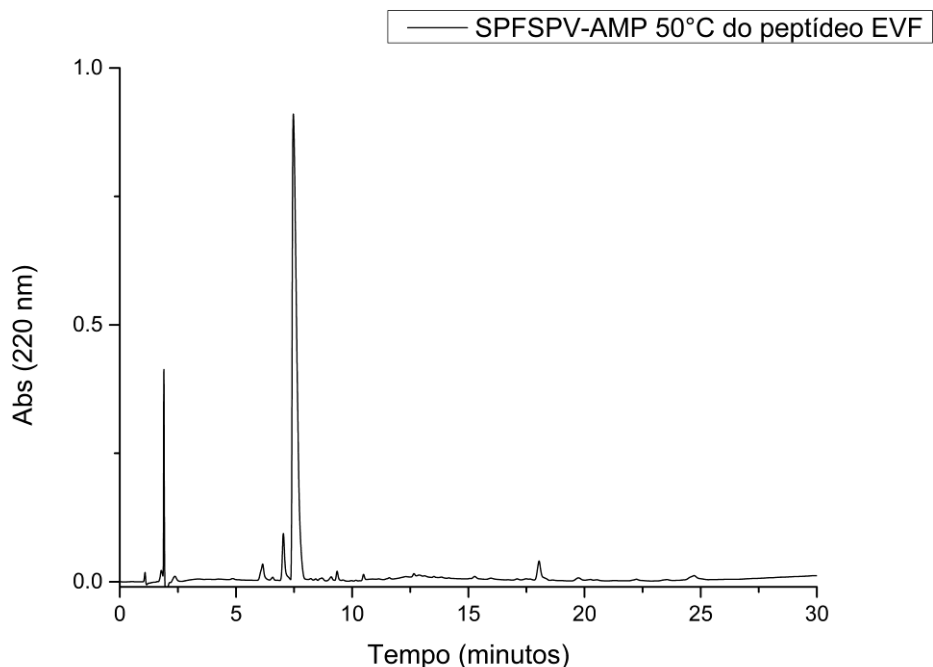


Figura 14: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-AMP 50°C. Solvatação da resina em DMF, desproteção usando 25% AMP em DMF, acoplamento com mistura acoplante Oxima Pure/ DIC à 50°C.



4.2.1.3 Protocolo utilizando como solvente o DMF e AME base de desproteção – SPFSV-AME 50°C.

Na metodologia denominada de SPFSV-AME 50°C, utilizou-se como agente de desproteção a solução de 25% AME em DMF, com a etapa de solvatação da resina em DMF e com todas as etapas de síntese à temperatura de 50°C (figura 15). O rendimento de síntese foi de 94% com uma massa de peptídeo bruto obtida de 47,8 mg. No entanto, o perfil cromatográfico (figura 16) obtido mostra a presença de mais contaminantes que os anteriores.

Figura 15: Esquema de SPFSVPV-AME 50°C. Solvatação da resina em DMF, desproteção usando 25% AME em DMF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC a 50°C.

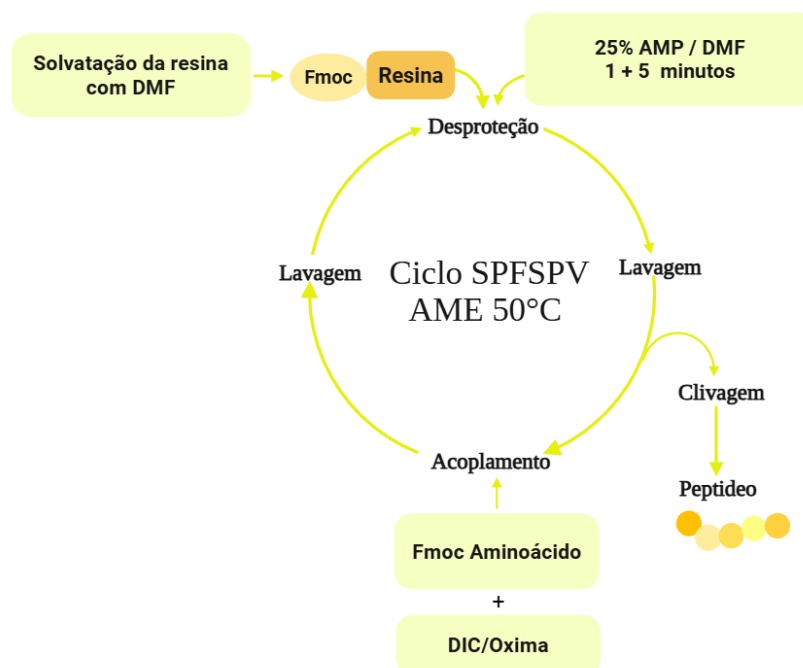
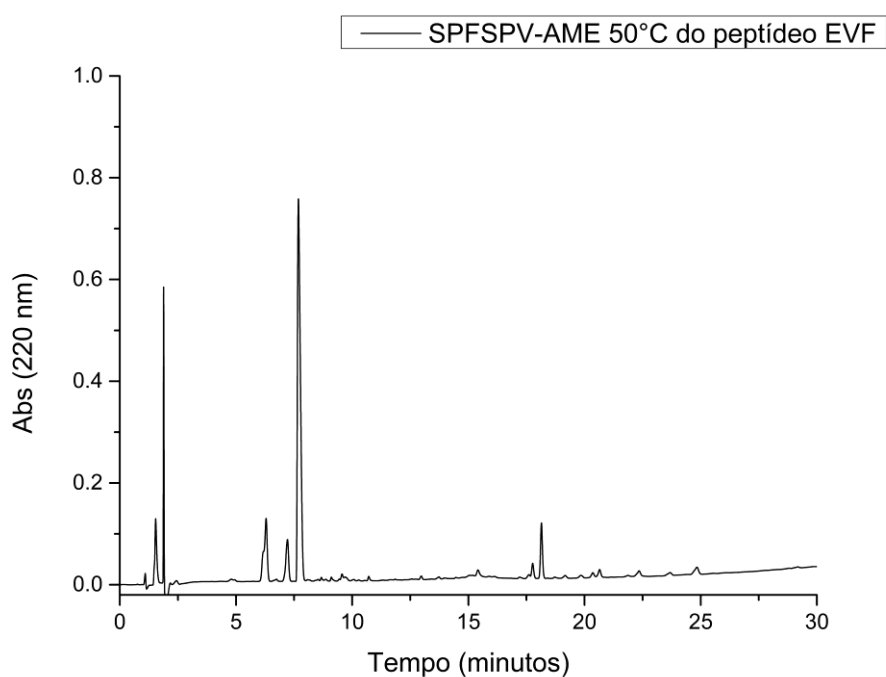


Figura 16: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-AME. Solvatação em DMF, desproteção usando 25% AME em DMF, acoplamento com mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.



4.2.1.4 Protocolo de síntese parcial verde utilizando DMF e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF – SPFSVP-2-MeTHF/morfolina.

No Protocolo que denominamos de SPFSV-2-MeTHF/morfolina foi utilizado como solvente de solvatação o 2-MeTHF e como solução de desproteção 50% morfolina em DMF (figura 17). As reações de síntese e desproteção ocorreram à temperatura ambiente. O rendimento obtido foi de 91%, obtendo-se uma massa de peptídeo bruto de 46,4 mg. O perfil cromatográfico está apresentado na figura 18. O solvente o 2-MeTHF é descrito na literatura como alternativa ao DMF na SPFS (Jad *et al.*, 2016; Al Musaimi *et al.*, 2018), bem como a base morfolina (Mthembu *et al.*, 2023). Estes dados mostram a eficiência destes reagentes. Os resultados obtidos foram semelhantes aos obtidos pelo protocolo SPFSVP-AMP, mostrando a eficácia do uso da base AMP.

Figura 17: Esquema de SPFSVP-2-MeTHF/morfolina. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em DMF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à temperatura ambiente.

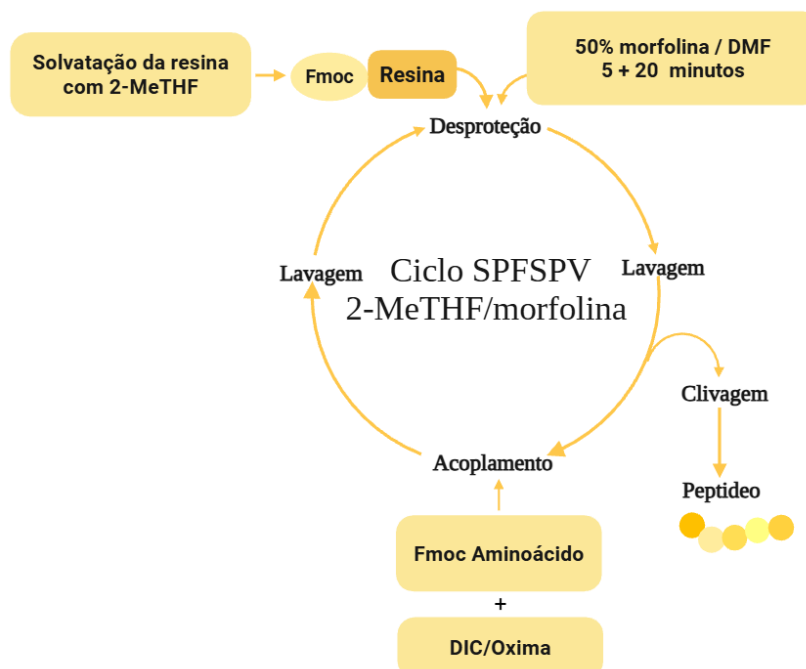
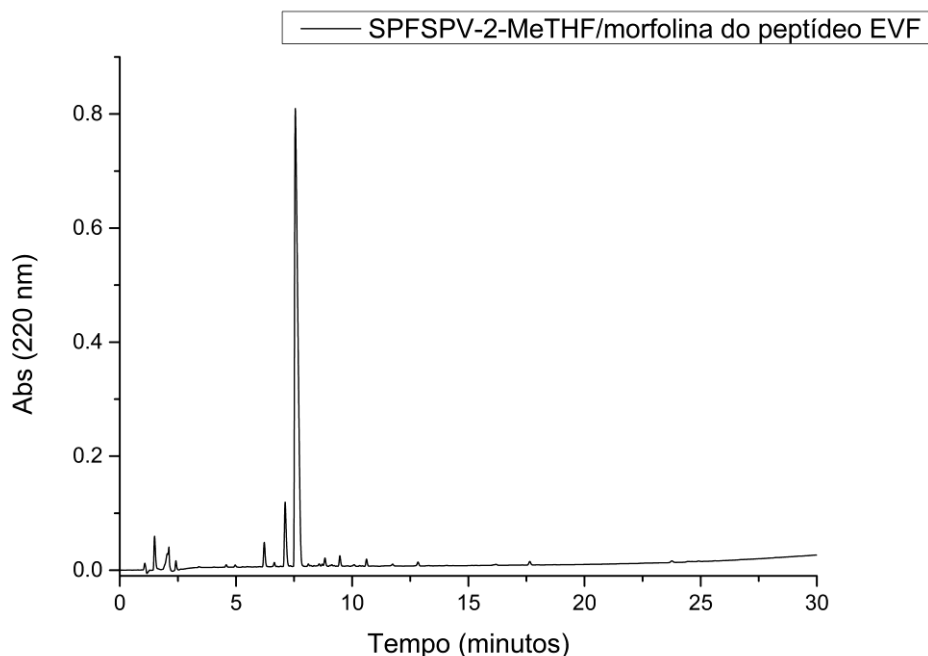


Figura 18: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSPV-2-MeTHF/morfolina. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em DMF, acoplamento com mistura acoplante Oxima Pure/DIC.



4.2.1.5 Protocolo de síntese parcial verde utilizando DMF e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF – SPFSPV-2-MeTHF/AMP 50°C.

Neste protocolo foi utilizado como solvente nas etapas de lavagem e acoplamento o 2-MeTHF e como reagente de desproteção a solução de 25% AMP em DMF (figura 19), as etapas de acoplamento e desproteção foram realizadas à 50°C. Foi obtido uma massa de peptídeo bruto de 53,3 mg e um rendimento de 105%, porém em seu perfil cromatográfico (figura 20) é possível verificar a presença de mais contaminantes.

Figura 19: Esquema de SPFSPV-2-MeTHF/AMP 50°C. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 25% AMP em DMF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

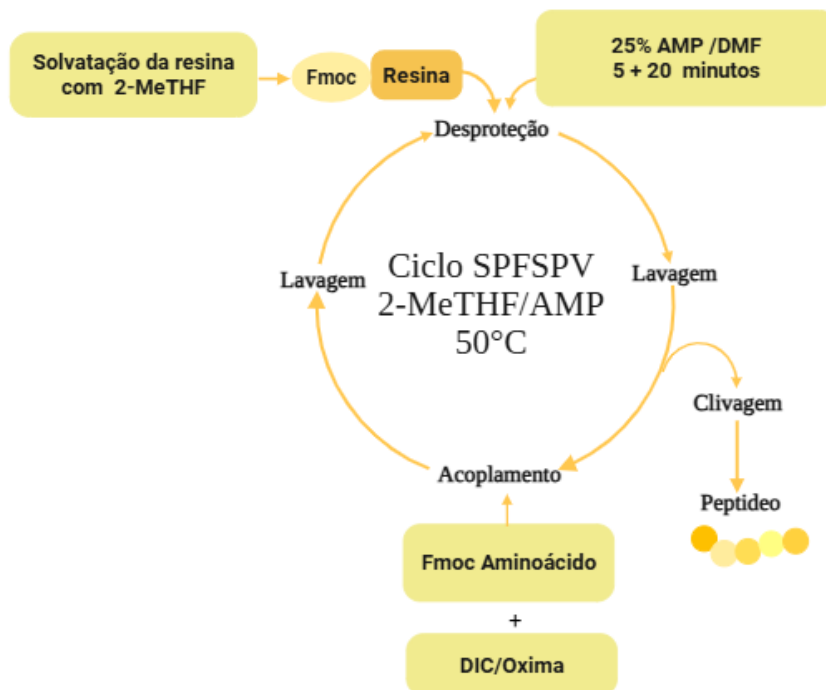
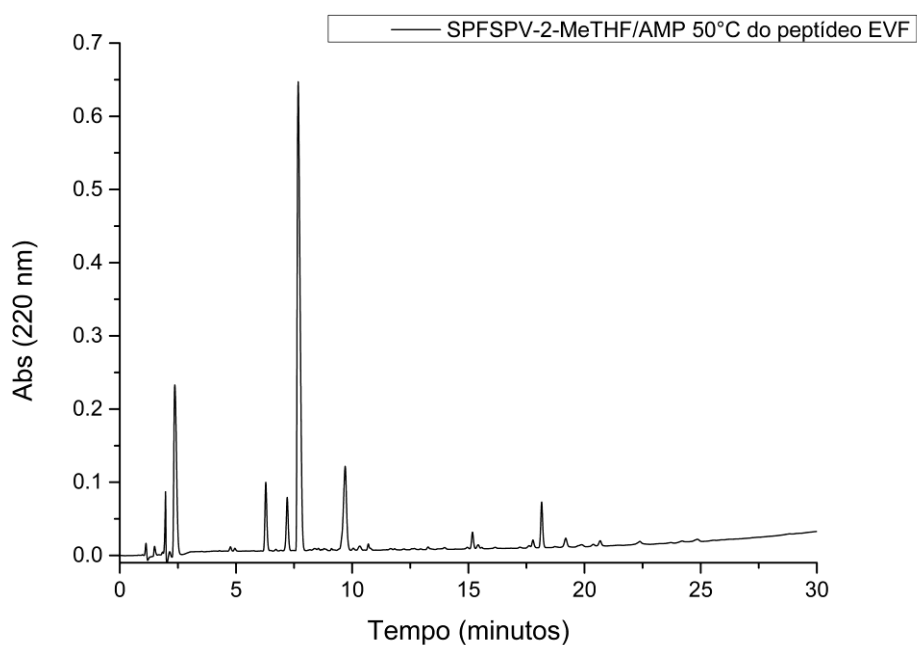


Figura 20: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSPV-2-MeTHF/AMP 50°C. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 25% AMP/DMF, acoplamento com mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.1.6 Protocolo de síntese verde utilizando 2-MeTHF e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF – SPFSV-2-MeTHF.

A síntese do peptídeo EVF pelo protocolo SPFSV-2-MeTHF foi realizada utilizando como solvente de solvatação o 2-MeTHF e como reagente de desproteção 50% morfolina em 2-MeTHF à temperatura ambiente. Devido aos testes anteriores, os quais a desproteção total do grupo Fmoc ocorre somente em 65 minutos, essa foi realizada em duas etapas de 10 e 60 minutos (figura 21). Durante toda a síntese houve um bom inchamento da resina pelo solvente 2-MeTHF e nenhuma dificuldade de acoplamento foi encontrado. Ao analisar o perfil cromatográfico de peptídeo (figura 22) foi possível observar que o peptídeo possui dois picos de contaminantes que podem ser atribuídos ao não acoplamento total do aminoácido ou a algum problema na etapa de desproteção.

Figura 21: Esquema de SPFSV-2-MeTHF. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC.

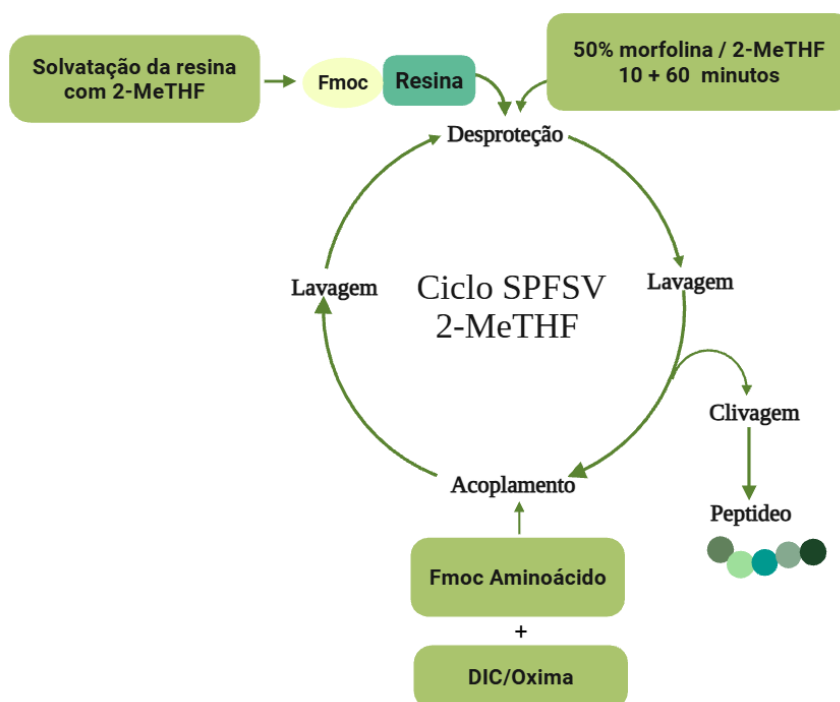
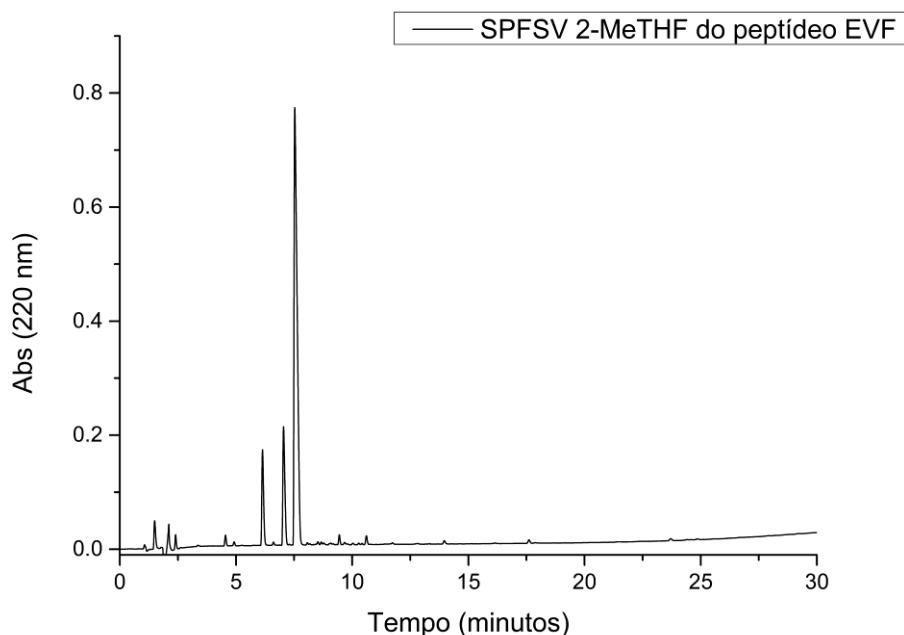


Figura 22: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-2-MeTHF. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção com morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura Oxima Pure/ DIC a temperatura ambiente.



4.2.1.7 Protocolo de síntese verde utilizando 2-MeTHF e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF a uma temperatura de 50°C – SPFSV 2-MeTHF 50°C.

Diante do longo tempo necessário para a desproteção, optou-se por utilizar a temperatura de 50 °C com o objetivo de reduzir o tempo total de síntese. Nessa condição, o grupamento Fmoc foi removido em 25 minutos (Tabela 10). Assim, uma nova síntese foi realizada, na qual tanto as etapas de acoplamento quanto as de desproteção ocorreram a 50 °C (Figura 23). Como resultado, foram obtidos 45 mg de peptídeo bruto, com um rendimento de síntese de 88%. Ao analisar o perfil cromatográfico do material obtido (Figura 24), observou-se uma redução na quantidade de contaminantes, permitindo concluir que a temperatura é um fator relevante nas reações de síntese empregando o protocolo morfolina/2-MeTHF.

Figura 23: Esquema de SPFSV-2-MeTHF 50°C. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC a temperatura de 50°C.

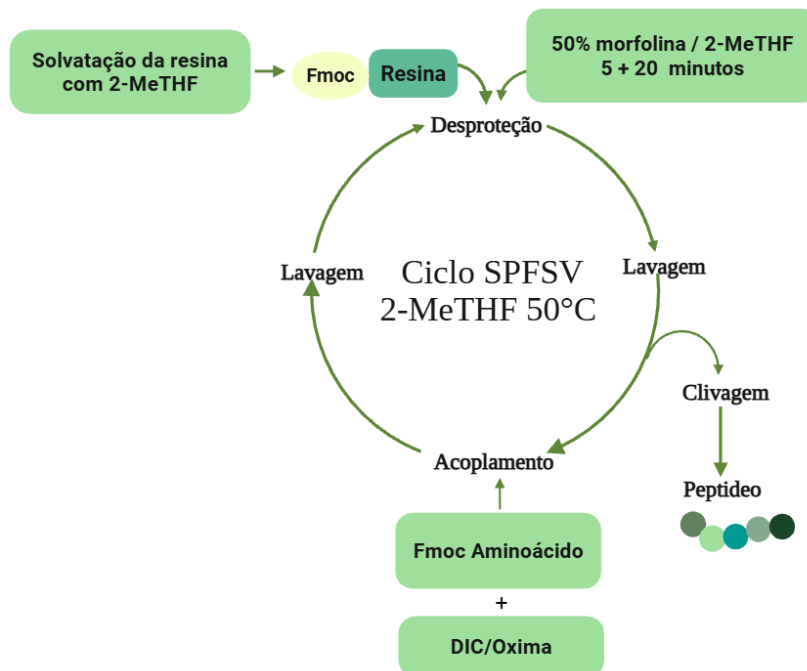
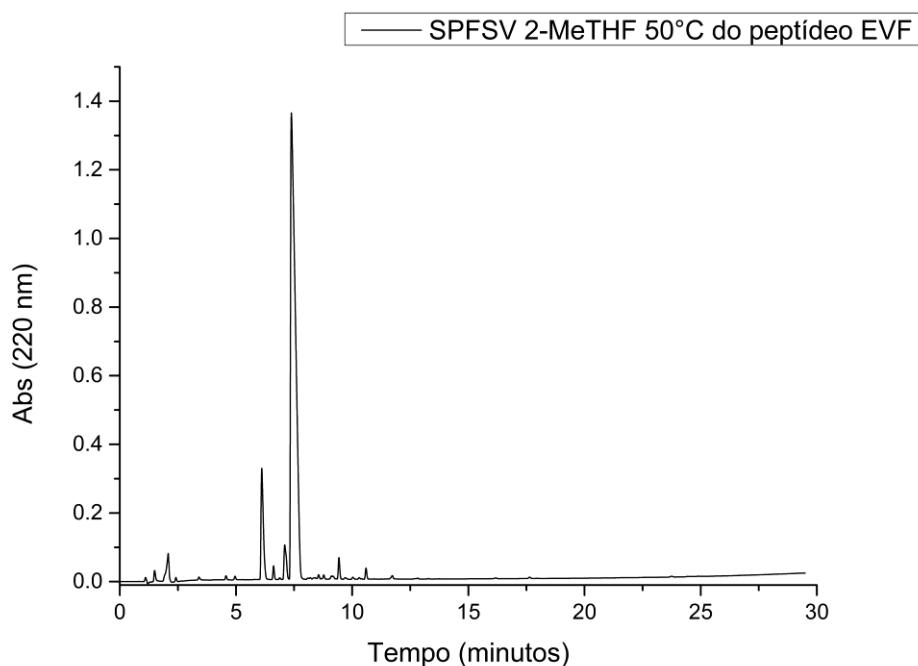


Figura 24: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-2-MeTHF 50°C. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.1.8 Protocolo de síntese verde utilizando 2-MeTHF e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF à 50°C – SPFSV 2-MeTHF/AMP 50°C.

Após os resultados obtidos acima, onde foram utilizados reagentes da química verde (metodologia verde), isto é, o 2-MeTHF como solvente e a morfolina como base de desproteção, foi realizada uma nova síntese substituindo a morfolina pelo AMP como reagente de desproteção. Durante a síntese todas as etapas de acoplamento e desproteção foram realizadas à 50°C e o tempo utilizado para a reação de desproteção foi de 10 e 60 minutos (figura 25). O rendimento de síntese obtido foi de 131% e a massa de peptídeo bruto foi de 66,7 mg; este valor acima de 100% é devido provavelmente a presença de sal. O perfil cromatográfico do peptídeo (figura 18) mostra menor quantidade de picos de contaminantes (figura 26). Estes resultados indicam que o uso da base AMP e do solvente verde 2-MeTHF pode ser uma ótima alternativa para a SPFS.

Figura 25: Esquema de SPFSV-2-MeTHF/AMP 50°C. Solvatação da resina em 2-MeTHF, desproteção usando 25% AMP em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

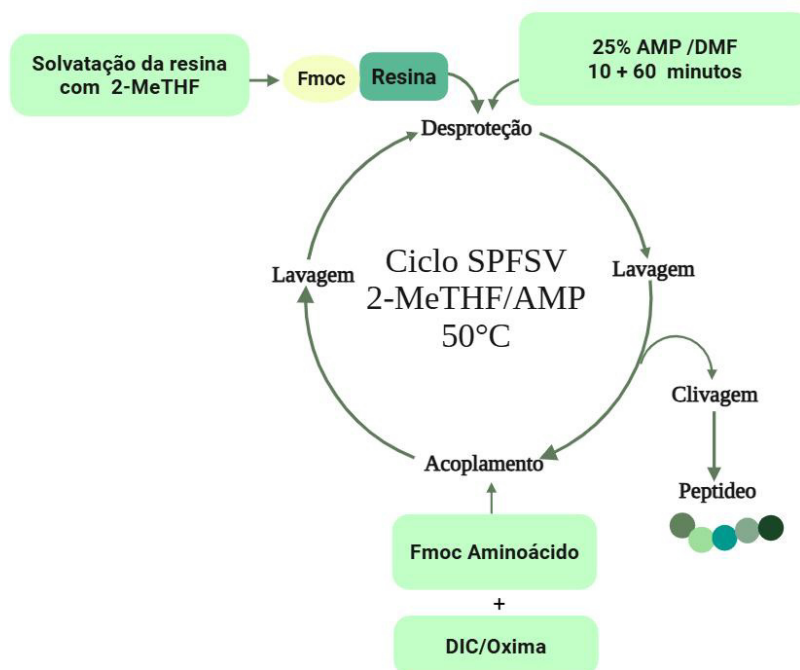
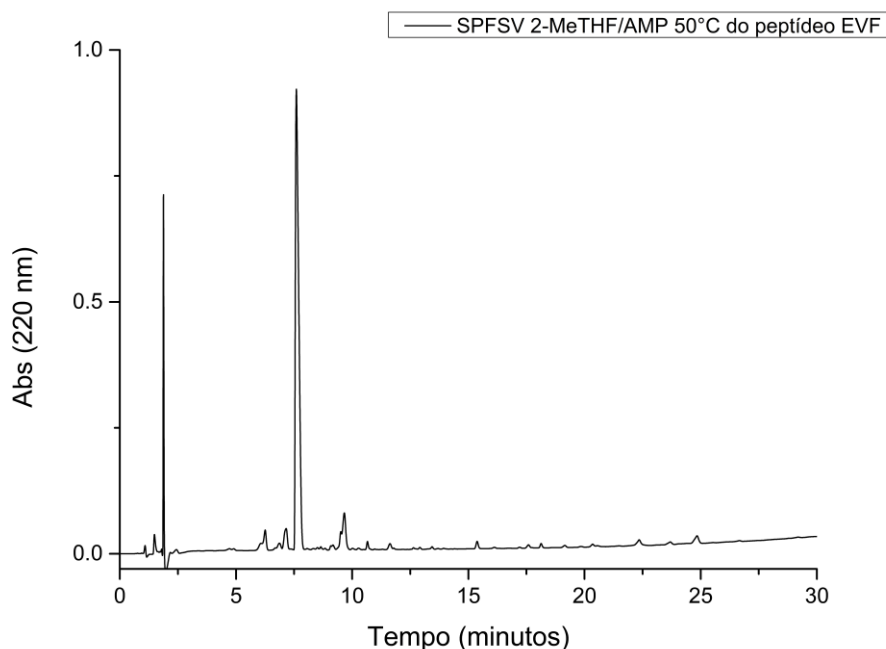


Figura 26: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-2-MeTHF/AMP. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 25% AMP em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



A utilização do 2-MeTHF na SPFS é corroborada pelo bom inchamento da resina de poliestireno e uma boa capacidade de dissolver agentes de acoplamento e Fmoc-aminoácidos (Jad, Acosta, Khattab, *et al.*, 2016). Somado a isto, este solvente é facilmente degradado mediante a exposição solar e ao ar, o que pode ser considerado uma vantagem caso ocorra acidentes, como derramamentos (Al Musaimi *et al.*, 2018). Isso conjuntamente com os resultados apresentados acima demonstram que o 2-MeTHF é um bom candidato na substituição do DMF na SPFS.

4.2.1.9 Protocolo de síntese verde utilizando Cyr/DEC e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento Cyr/DEC à 50°C – SPFSV-Cyr/DEC 50°C.

Outros “solventes verdes” que também são considerados potenciais para a síntese de peptídeos em fase sólida foram testados, como o Cyr e o DEC. Inicialmente ambos foram avaliados visualmente em relação ao seu potencial de solvatação da resina e seu efeito na etapa de desproteção. O Cyr é um solvente que possui alta viscosidade e por isso, sua utilização na

síntese na síntese de peptídeos se dá por meio de misturas. Uma mistura já testada com este solvente é a solução de Cyr e DEC à uma proporção de 3:7, o qual apresentou bons resultados de solvatação e de solubilização dos aminoácidos (Ferrazzano *et al.*, 2019).

Na síntese utilizando a mistura Cyr/DEC (3:7), a solução de desproteção a solução de desproteção utilizada foi 50% morfolina Cyr/DEC (3:7) com tempo de 5 e 80 minutos, sendo que, todas as etapas foram realizadas à 50°C (figura 27). Na etapa de desproteção não foi verificado problemas, porém a dissolução dos aminoácidos neste solvente foi difícil, sendo necessário um maior volume para este fim. Outra dificuldade encontrada durante esta síntese foi no acoplamento dos aminoácidos, sendo que os testes de Kaiser mostraram a presença de aminas livres; por isso foram necessárias etapas de reacoplamento. O rendimento de síntese obtido foi de 142%, porém este valor só foi obtido por conta dos reacoplamentos, o que o torna desvantajoso, pois foi necessário maior quantidade de Fmoc-aminoácidos e reagentes acoplantes para que o acoplamento fosse realizado de forma eficiente. A massa de bruto obtida foi de 72,2 mg. Esta massa é superior ao esperado, 51 mg, para a escala de 0,1 mmol, mostrando a formação de algum composto adicional ou a presença de uma grande quantidade de sal. Ao se analisar o perfil cromatográfico do peptídeo sintetizado (figura 28) é possível observar vários picos de contaminantes, principalmente depois do pico de interesse, demonstrando que alguma reação colateral pode ter ocorrido.

Figura 27: Esquema de SPFSV-Cyr/DEC 50°C. Solvatação da resina em Cyr/DEC (3:7), desproteção usando 50% morfolina em Cyr/DEC (3:7), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

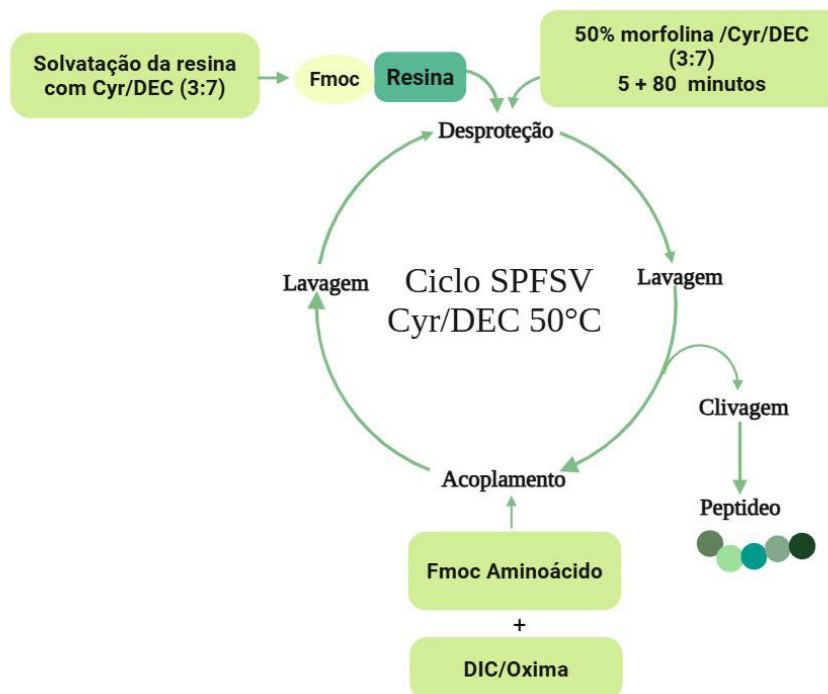
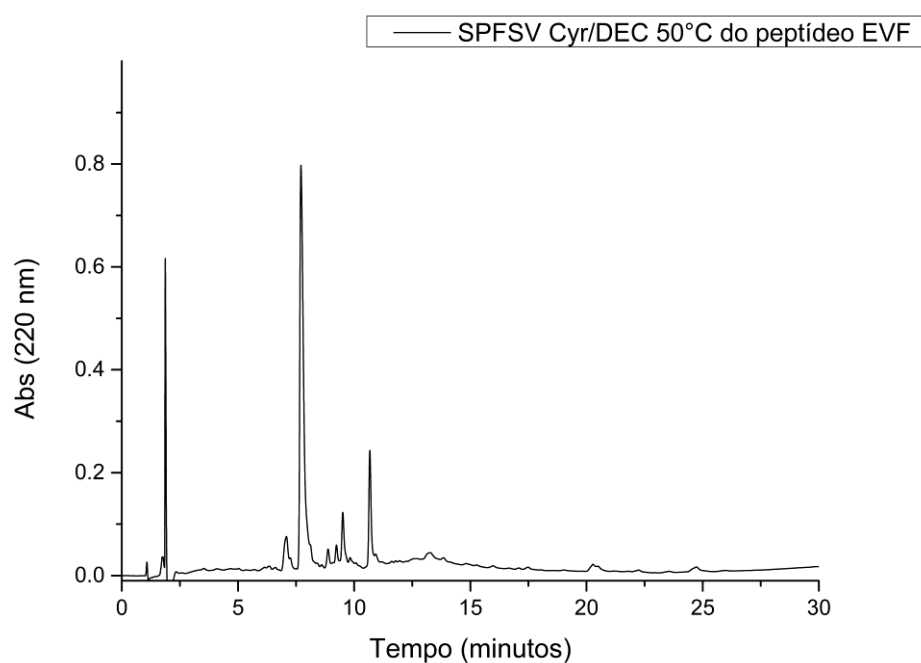


Figura 28: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF sintetizado pelo protocolo de SPFSV com Cyr/DEC (3:7). Solvatação da resina com Cyr/DEC (3:7), desproteção usando 50% morfolina em Cyr/DEC (3:7), acoplamento com a mistura acoplante Oxuma Pure/DIC à 50°C.



4.2.1.10 Protocolo de síntese verde utilizando DEC e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento DEC à 50°C – SPFSV-DEC 50°C.

Devido a boa solvatação da resina com a solução Cyr/DEC (3:7) e sabendo que só cyreno não solvata a resina e apresenta problemas devido à sua viscosidade, foi analisado o potencial uso do solvente DEC puro. Todas as etapas foram realizadas à 50°C e a solução utilizada para de desproteção foi de 50% morfolina em DEC (Figura 29). Foi observado durante as etapas de acoplamento e desproteção a volatilidade do solvente DEC a temperatura de 50°C, além de ser observada a dificuldade de se dissolver os Fmoc-aminoácidos a serem acoplados, o que provavelmente causou dificuldade nas etapas de acoplamento, sendo assim necessário repeti-las. O rendimento de síntese obtido foi de 210% e a massa de peptídeo bruto foi de 107,3 mg, mostrando como no protocolo anterior, a obtenção de algum contaminante retido na resina. Mesmo tendo um rendimento de síntese mais alto do que a do protocolo padrão, o perfil cromatográfico deste peptídeo (figura 30) mostra uma grande quantidade de contaminantes, o que, comparado com o protocolo padrão (figura 11) dificulta a purificação deste peptídeo, diminuindo o rendimento de peptídeo puro a ser obtido.

Figura 29: Esquema de SPFSV-DEC 50°C. Solvatação da resina em DEC, desproteção usando 50% morfolina em DEC, acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

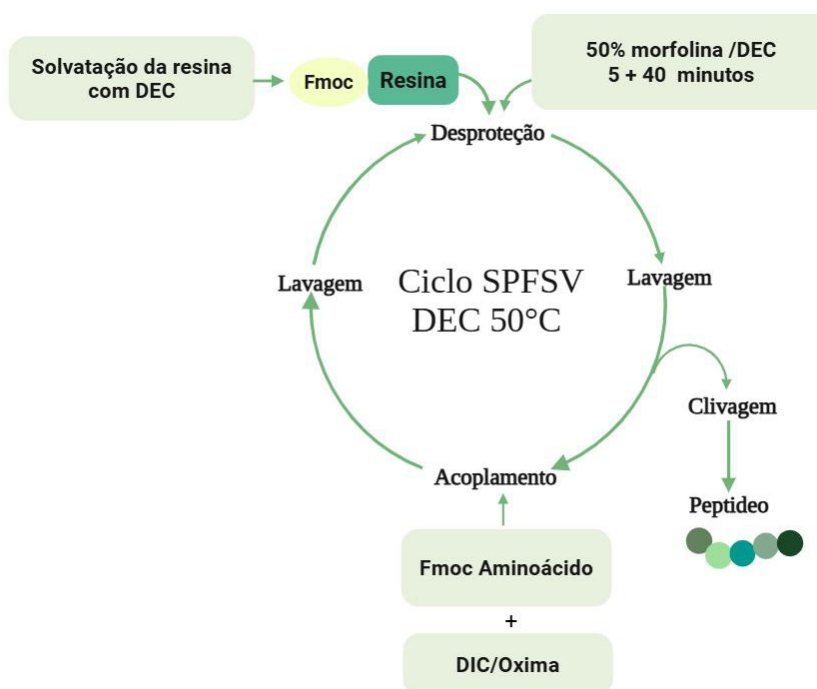
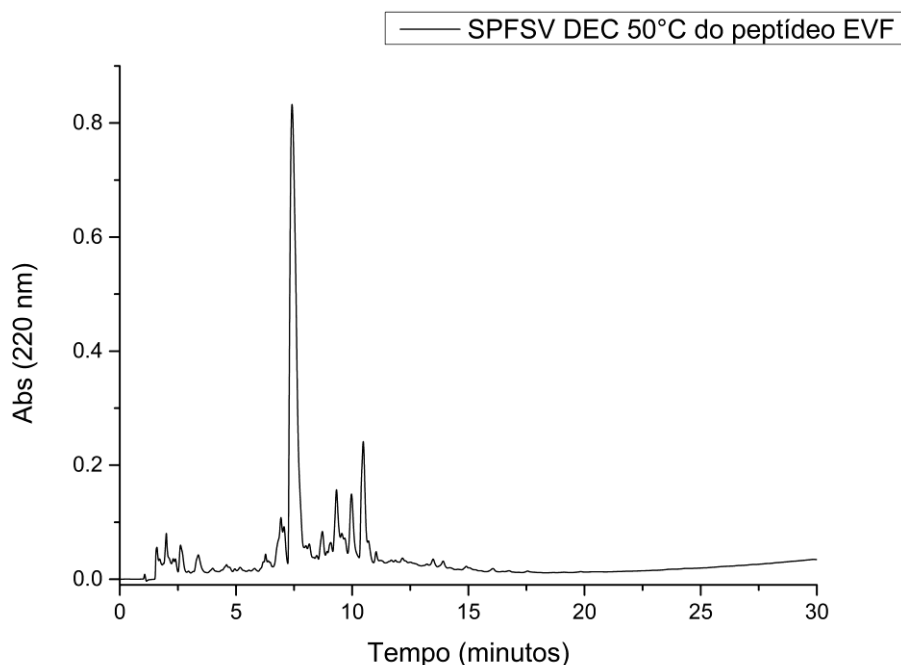


Figura 30: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV com DEC 50°C. Solvatação em DEC, desproteção usando 50% morfolina em DEC, acoplamento com mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.1.11 Protocolo de síntese verde utilizando IPA/DMSO e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) à 50°C – SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C.

Outro protocolo de síntese utilizado foi a síntese com a mistura IPA/DMSO (4:6). O isopropanol (IPA) é um solvente que já vem sendo testado como uma alternativa a utilização de DMF na SPFS. Porém a sua eficiência para a solvatação da resina se demonstrou baixa para a resina de poliestireno, cerca de 2,75 mL/g e a desproteção contendo 20% de piperidina em IPA em um tempo maior do que 30 minutos foi pouco eficiente (Jad *et al.*, 2017). Devido a essa baixa capacidade de solvatação e dificuldade na etapa de desproteção foi realizada uma mistura de IPA com dimetilsulfóxido (DMSO) a uma proporção de 4:6 (Wagh and Pawar, 2020). A síntese do peptídeo EVF foi realizada com duas soluções de desproteção diferentes, sendo a primeira 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6) e a segunda 25% AMP em IPA/DMSO (4:6).

Na síntese com a solução de desproteção de 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6) o tempo de desproteção utilizado para a liberação do grupamento Fmoc foi de 10 minutos (Figura 31). Todas as etapas da síntese ocorreram à 50°C. O rendimento de síntese foi de 137% e a

massa de peptídeo bruto obtida foi de 69,8 mg. Observando o perfil cromatográfico do peptídeo (figura 32) é possível observar um pico de contaminante de uma alta intensidade, a presença deste contaminante pode estar relacionado a dificuldade do acoplamento do ácido glutâmico na molécula, uma vez que foi necessário realizar uma etapa de reacoplamento deste aminoácido.

Figura 31: Esquema de SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina em IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

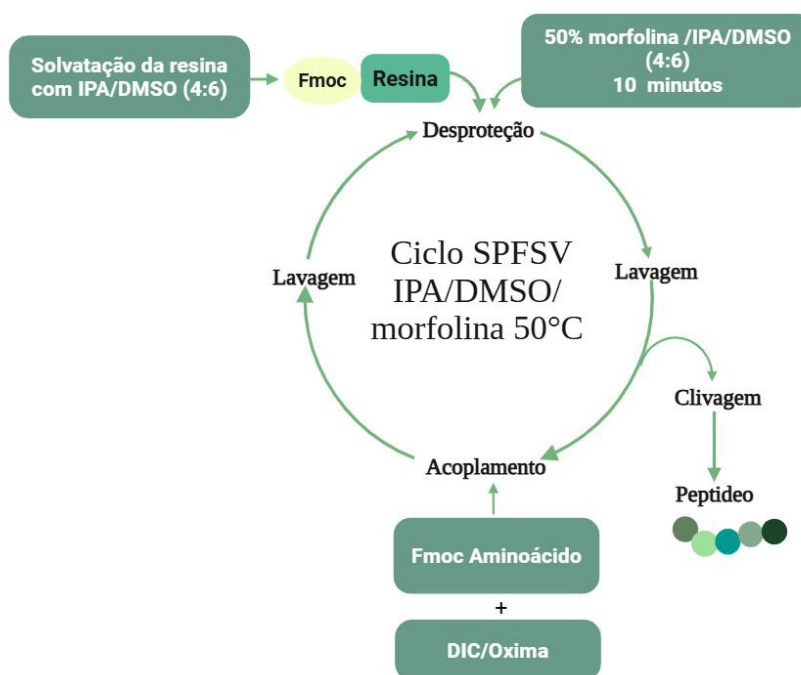
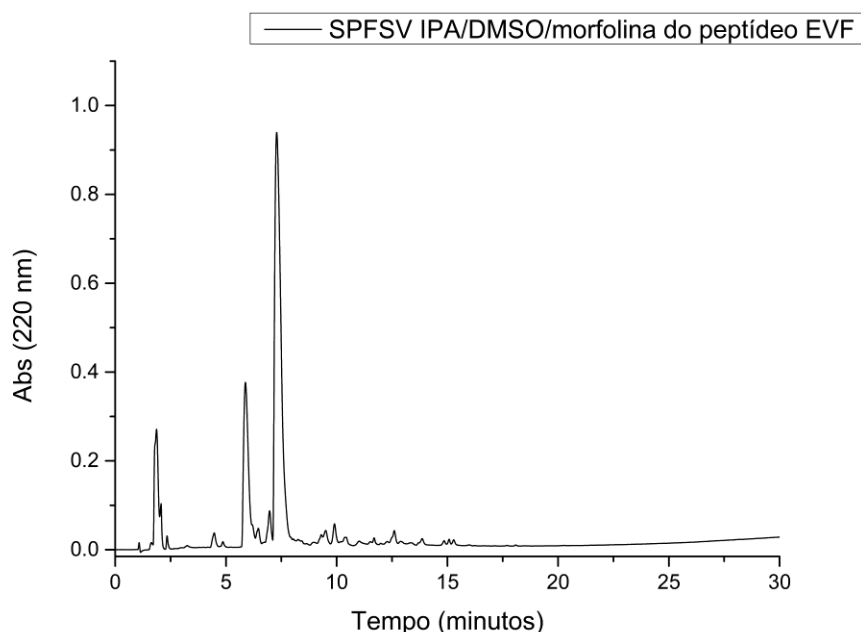


Figura 32: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.1.12 Protocolo de síntese verde utilizando IPA/DMSO (4:6) e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) à 50°C – SPFSV IPA/DMSO/AMP 50°C.

Para a síntese do peptídeo EVF utilizando como solução de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) outro protocolo foi testado, agora utilizando como solução de desproteção 25% AMP em IPA/DMSO (4:6) com 5 e 20 minutos (figura 33). As etapas de acoplamento e desproteção ocorreram à 50°C. O rendimento de síntese obtido foi de 158% e a massa de peptídeo bruto obtida foi de 80,6 mg. Esta maior massa obtida pode ser atribuída a presença de sal no material bruto. Analisando o perfil cromatográfico do peptídeo (figura 34) também é possível observar que há a presença de contaminantes antes do pico do peptídeo, porém em menor intensidade do que o observado na síntese anterior (figura 32), a presença deste pico também pode estar relacionada a necessidade de reacoplamento do ácido glutâmico da sequência.

Figura 33: Esquema de SPFSV-IPA/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina em IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AMP em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

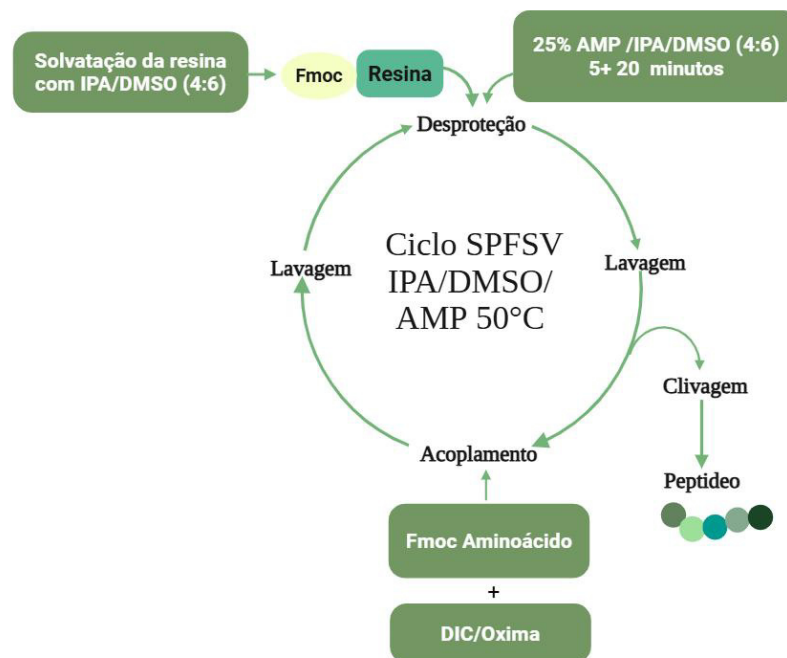
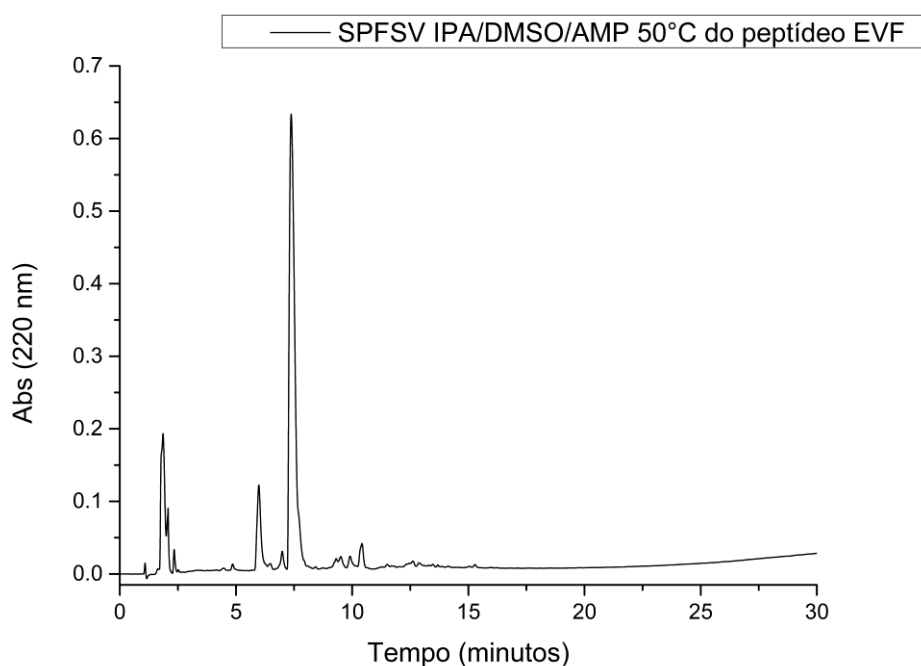


Figura 34: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV IPA/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.1.13 Protocolo de síntese verde utilizando IPA/DMSO (4:6) e MEA na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) à 50°C – SPFSV IPA/DMSO/AME 50°C.

Para análise de um novo protocolo de síntese do peptídeo EVF utilizando como solução de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) outra solução de desproteção foi utilizada agora com 25% MEA em IPA/DMSO (4:6) com 5 e 20 minutos (figura 35). As etapas de acoplamento e desproteção ocorreram à 50°C. O rendimento de síntese obtido foi de 79% e a massa de peptídeo bruto obtida foi de 40,3 mg, o que se assemelha as outras sínteses realizadas. Analisando o perfil cromatográfico do peptídeo (figura 36) também é possível observar que há a presença de contaminantes antes do pico do peptídeo, o que pode estar relacionado com desproteções não eficazes.

Figura 35: Esquema de SPFSV-IPA/DMSO/AME 50°C. Solvatação da resina em IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AME em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

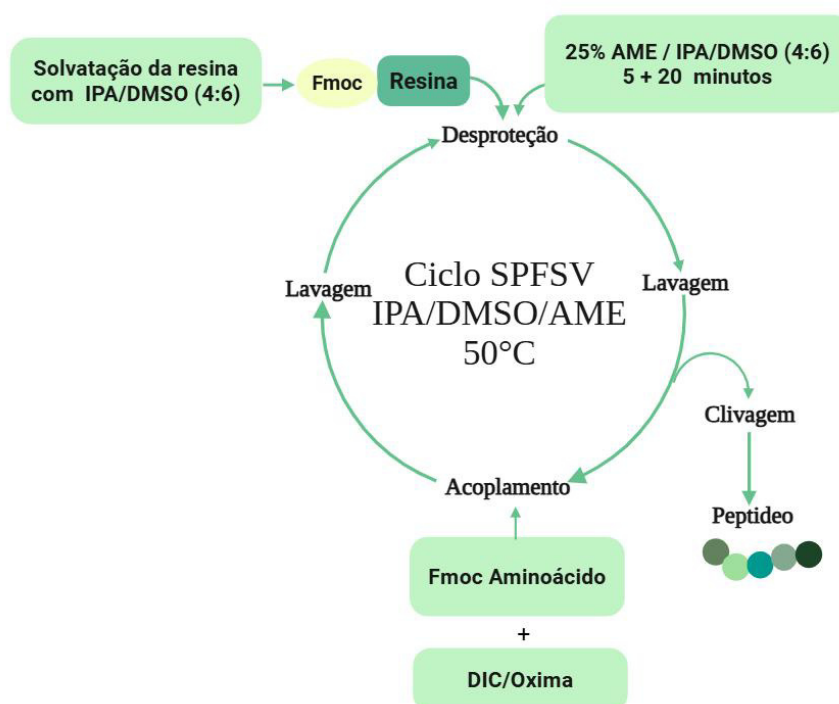
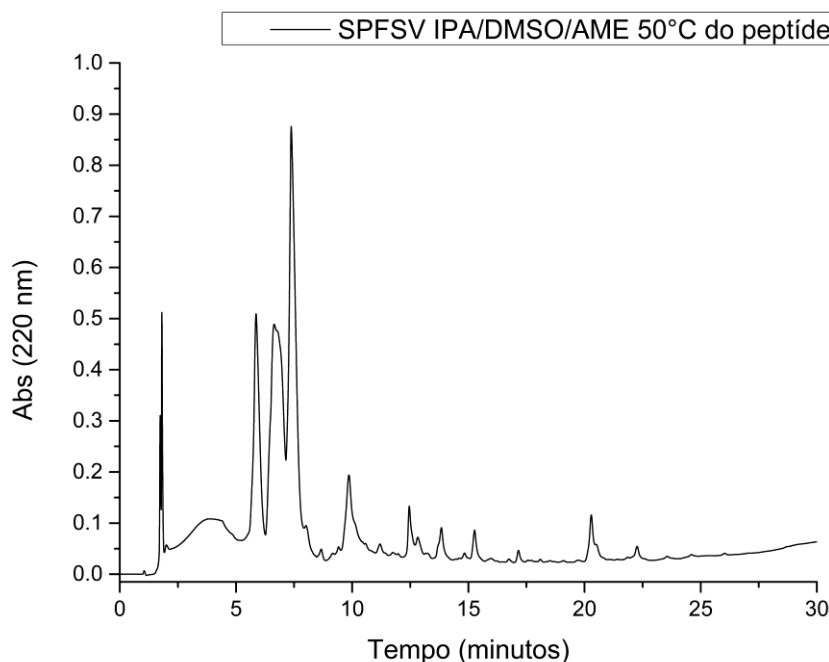


Figura 36: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV IPA/DMSO/AME. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AME em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



Analizando a tabela comparativa dos resultados obtidos nas sínteses do peptídeo EVF em todos os protocolos testados (tabela 10) é possível observar que os protocolos que obtiveram os melhores resultados de síntese e maior grau de pureza foram o SPFSV-AMP 50°C, SPFSV-2-MeTHF/morfolina, SPFSV-2-MeTHF 50°C e SPFSV-2-MeTHF/AMP 50°C. Os protocolos parciais apesar de ainda utilizarem o DMF como solvente, apresentam uma diminuição de seu uso e por isso uma vantagem do ponto de vista ecológico.

O protocolo SPFSV-IPA/DMSO/AMP 50°C apesar de mostrar uma pureza menor, pode ser uma boa alternativa de síntese visto a utilização de solvente e reagentes com baixo teor de toxicidade.

4.2.2 Alternativas de protocolos de síntese para o peptídeo PWKW

O peptídeo PWKW é um tetrapeptídeo sintético que foi projetado para atuar em um mecanismo de ação similar ao da toxina botulínica, que modula a contração muscular resultando na redução significativa das rugas de expressão (dados sigilosos e não divulgados).

Devido ao crescente interesse dos consumidores da indústria cosmética por protocolos que minimizem os impactos ambientais, foram desenvolvidos métodos de síntese verde com base nos resultados previamente obtidos para o peptídeo EVF.

Os diferentes protocolos de síntese avaliados para o peptídeo PWKW podem ser observados na tabela 11, todos realizados à 50°C.

Tabela 11: Diferentes protocolos de síntese utilizados na obtenção do peptídeo PWKW.

Metodologia de Síntese	Lavagens	Desproteção	Acoplamento
SPFS padrão	DMF	20% 4-metilpiperidina/ DMF 1 e 20 min	DIC/HOBt – 2h
SPFSV-2-MeTHF	2-MeTHF	50% morfolina/ 2- MeTHF 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-IPA/DMSO / morfolina 50°C	IPA/ DMSO (4:6)	50% morfolina/IPA /DMSO (4:6) 10 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-IPA/DMSO/ AMP 50°C	IPA/ DMSO (4:6)	25% AMP/ IPA /DMSO (4:6) 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-IPA/DMSO / MEA 50°C	IPA/ DMSO (4:6)	25% MEA/ IPA /DMSO (4:6) 5 e 20 min	DIC/Oxima – 1 h
SPFSV-Etanol/DMSO/ morfolina 50°C	4 x Etanol/ DMSO (4:6)	50% morfolina/Etanol /DMSO (4:6) 10 min	DIC/Oxima– 1 h
SPFSV- Etanol/DMSO/ AMP 50°C	4 x Etanol/ DMSO (4:6)	25% AMP/ Etanol /DMSO (4:6) 5 e 20 min	DIC/Oxima (4:6) – 1 h

4.2.2.1 Protocolo padrão de síntese do peptídeo PWKW – SPFS padrão

Na síntese padrão do peptídeo PWKW utilizou-se o mesmo protocolo do peptídeo EVF (figura 11) com etapas de desproteção com a solução de 4-metilpiperidina em DMF e acoplamento com as soluções acoplantes de HOBt/DIC. O rendimento de síntese foi de 85% (tabela 12) obtendo uma massa de peptídeo bruto de 71,4 mg (teórico de 84 mg, considerando dois grupos trifluoracetato), porém ao analisar o perfil cromatográfico (figura 37) é possível observar que ele possui um contaminante com uma intensidade alta em seu perfil, principalmente após a eluição do material desejado (9,8 min), que poderia estar relacionado ao

linker da resina Wang foi liberado em TFA e que se ligou a molécula através do resíduo de Trp (Giraud *et al.*, 1999).

Figura 37: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo SPFS padrão. Solvatação em DMF, desproteção usando 20% 4-metilpiperidina em DMF, acoplamento com a mistura acoplante HOBt/DIC à temperatura ambiente.

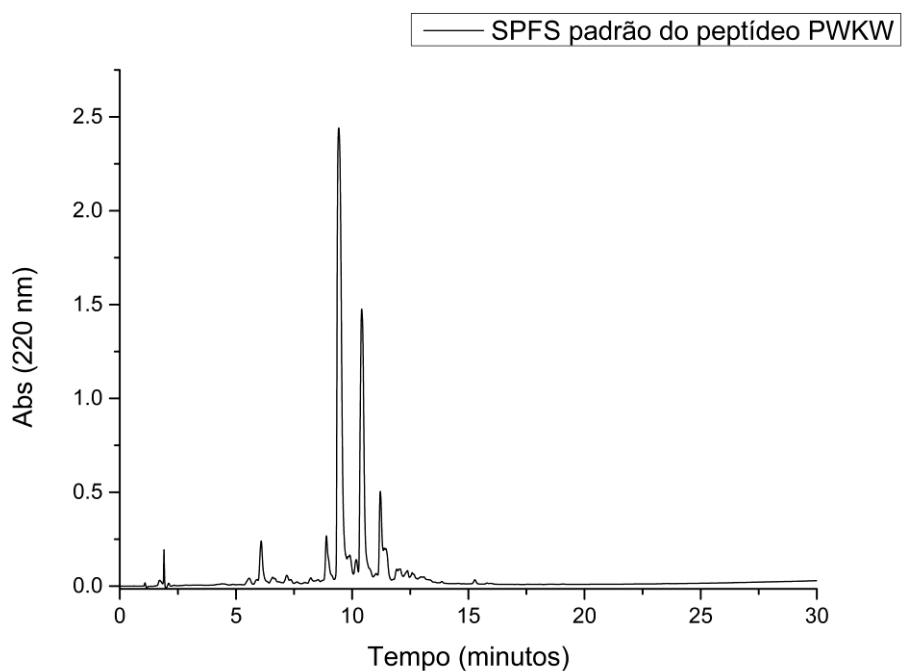


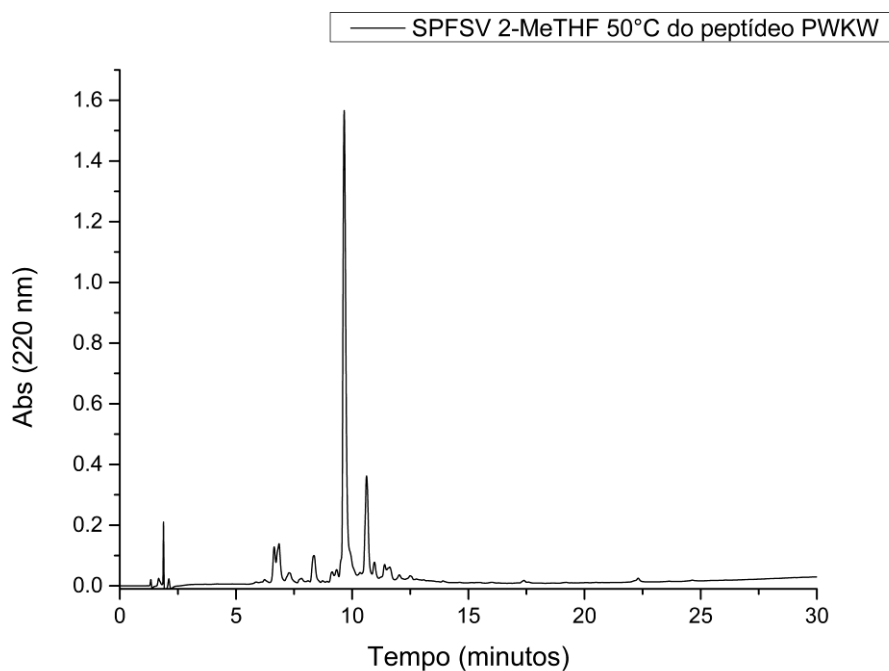
Tabela 12: Comparativo dos resultados obtidos para a síntese do peptídeo PWKW.

Protocolo	Rendimento de Síntese (%)	Grau de Pureza (%)	Massa de peptídeo obtida (mg)
SPFS padrão	85	42	71,4
SPFSV-2-MeTHF 50°C	79	56	66,2
SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C	129	53	108,3
SPFSV-IPA/DMSO/AMP 50°C	67	57	56,6
SPFSV-MEA-IPA/DMSO/AME 50°C	61	62	51,5
SPFSV-Etanol/DMSO/morfolina 50°C	128	61	107,2
SPFSV-Etanol/DMSO/AMP 50°C	72	30	60,3

4.2.2.2 Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando 2-MeTHF e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento 2-MeTHF a uma temperatura de 50°C – SPFSV-2-MeTHF 50°C.

Para o desenvolvimento de um protocolo de química verde para a síntese do peptídeo PWKW foi selecionado os protocolos verdes com os melhores resultados anteriormente obtidos e outros que foram testados para verificar sua viabilidade. O protocolo de SPFSV-2-MeTHF à 50°C (figura 23), onde as etapas de solvatação da resina foram realizadas utilizando como solvente o 2-MeTHF, a solução de desproteção utilizada foi de 50% morfolina em 2-MeTHF no tempo de 5 e 20 minutos, e a mistura acoplante utilizada foi a de Oxima Pure/DIC, foi o primeiro avaliado. O rendimento de síntese foi de 79% e a massa de peptídeo bruto obtida foi de 66,2 mg. Observando o seu perfil cromatográfico (figura 38) é encontrado o mesmo contaminante de alta intensidade após o pico do peptídeo o que pode estar relacionado com a ligação do peptídeo ao linker da resina sendo este um contaminante oriundo da etapa de clivagem e não da etapa de síntese. Esta reação colateral ocorre após a separação do peptídeo da resina, não sendo afetado pela troca de solventes e reagente durante a síntese.

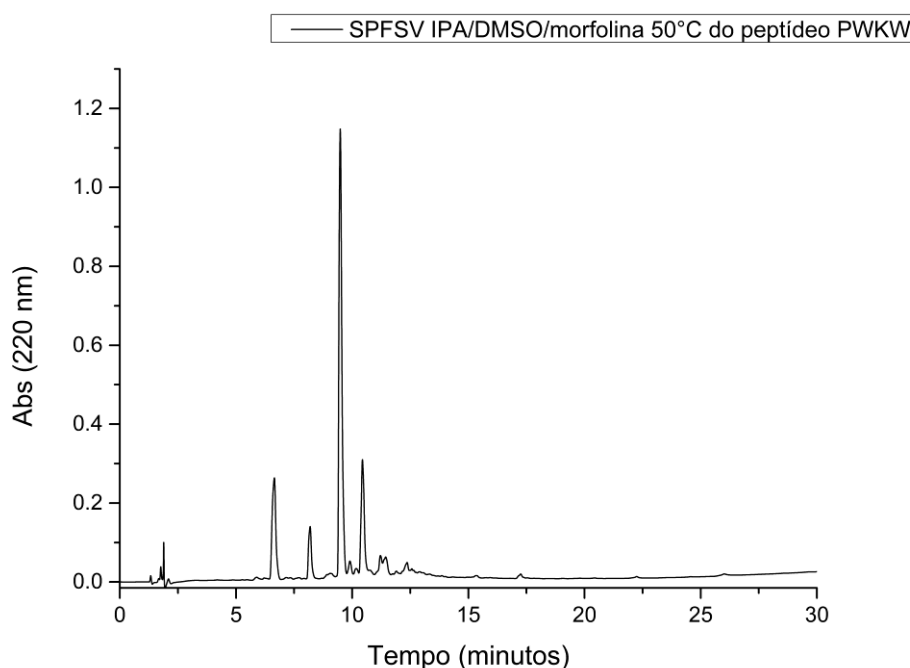
Figura 38: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-2-MeTHF. Solvatação em 2-MeTHF, desproteção usando 50% morfolina em 2-MeTHF, acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.2.3 Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando IPA/DMSO (4:6) e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) à 50°C – SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C.

Outra solução testada para a sua síntese foi a de IPA/DMSO (4:6), que assim como nas análises do peptídeo EVF foi testada com bases de desproteção diferentes, sendo essas a morfolina e o AMP. O primeiro protocolo realizado foi o com solvatação da resina em IPA/DMSO, solução de desproteção 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6) por 10 minutos e a mistura acoplante de Oxima Pure/DIC (figura 31). O rendimento de síntese para esta sequência peptídica foi de 129% e a massa de peptídeo obtida foi de 108,3 mg. A massa maior que a teórica (84 mg) pode ser devido a presença de sal ou reagentes utilizados como supressores de reações colaterais na etapa de clivagem. Analisando o seu perfil cromatográfico (figura 39) é possível observar dois picos de contaminantes antes do material desejado (9,8 min). Estes picos podem ser devido ao não acoplamento de algum aminoácido.

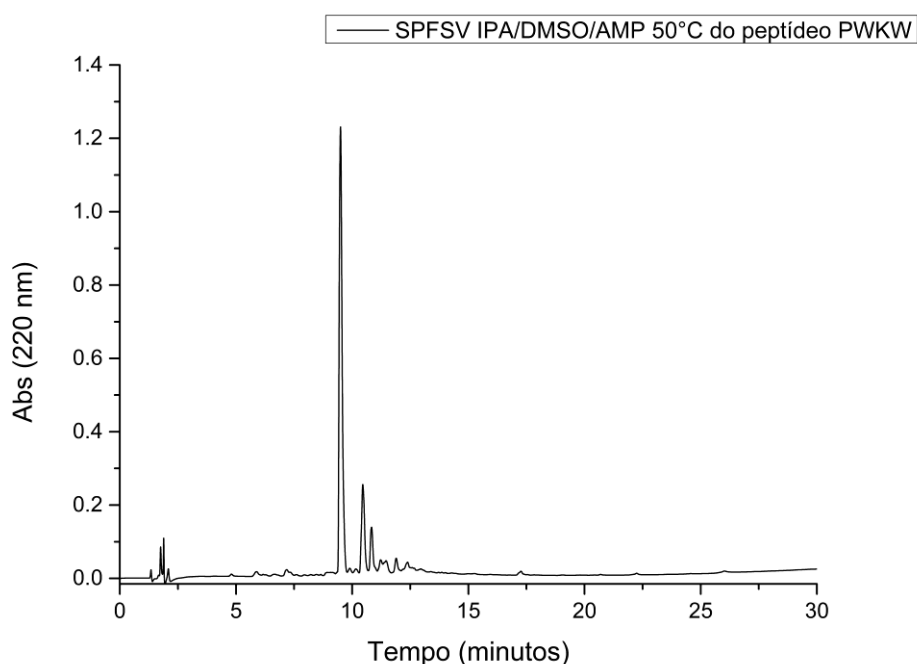
Figura 39: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-IPA/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.2.4 Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando IPA/DMSO (4:6) e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) a uma temperatura de 50°C – SPFSV IPA/DMSO/AMP 50°C.

O outro protocolo testado foi o utilizando a solução de IPA/DMSO (4:6) com solução de desproteção de 25% AMP em IPA/DMSO (4:6) por 5 e 20 minutos, e mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C (figura 33). O rendimento de síntese obtido neste protocolo foi de 67% e a massa de peptídeo bruto obtida foi de 56,6 mg. Analisando o perfil cromatográfico do peptídeo (figura 40) foi possível observar que o peptídeo não apresentou picos de contaminantes anterior ao pico do peptídeo. Este protocolo mostrou um dos melhores perfis cromatográficos.

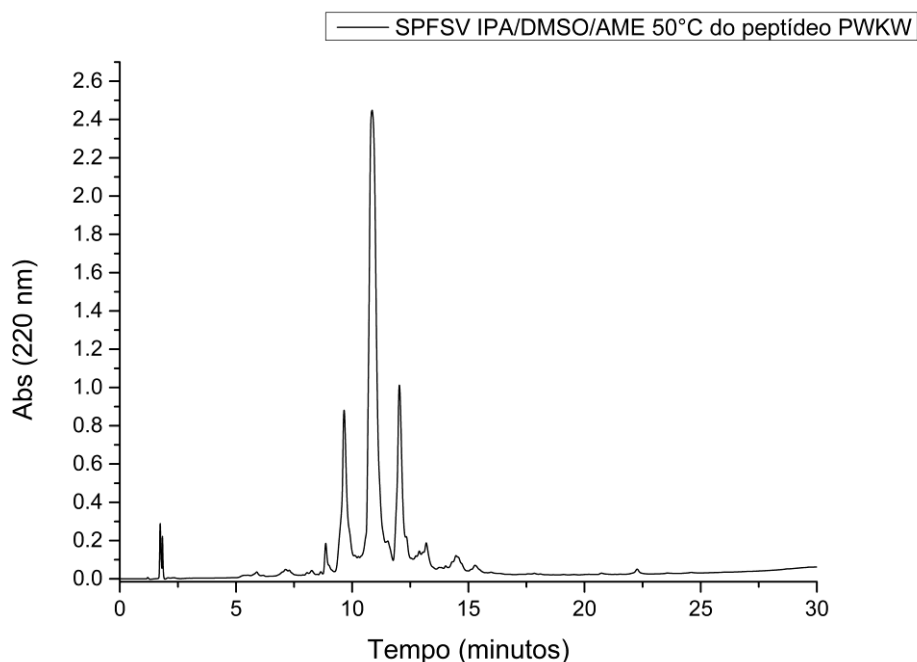
Figura 40: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-IPA/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AMP em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.2.5 Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando IPA/DMSO (4:6) e MEA na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento IPA/DMSO (4:6) a uma temperatura de 50°C – SPFSV IPA/DMSO/AME 50°C.

Também foi testado conjuntamente com a solução de IPA/DMSO (4:6) a solução de desproteção de 25% AME em IPA/DMSO (4:6). O tempo de desproteção utilizado durante a síntese foi de 5 e 20 minutos o mesmo do AMP, a mistura acoplante Oxima Pure/DIC também foi utilizada e as reações ocorreram sob a temperatura de 50°C (figura 35). O rendimento de síntese obtido neste protocolo foi de 61% e a massa de peptídeo bruto obtida foi de 51,5 mg. Analisando o perfil cromatográfico do peptídeo (figura 41) foi possível observar que o peptídeo também não apresentou picos de contaminantes anterior ao pico do peptídeo. Este protocolo mostrou o melhor perfil cromatográfico.

Figura 41: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV-IPA/DMSO/AME. Solvatação da resina com IPA/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AME em IPA/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.2.6 Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando Etanol/DMSO (4:6) e morfolina na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento Etanol/DMSO à 50°C – SPFSV-morfolina-Etanol/DMSO 50°C.

Após os resultados obtidos nas sínteses anteriores com IPA/DMSO (4:6) uma nova solução foi testada, no entanto, substituindo o isopropanol pelo etanol. As bases utilizadas foram as mesmas testadas anteriormente morfolina e AMP, e o tempo de desproteção foram os mesmos das sínteses anteriores (figura 42). Esta tentativa de síntese foi realizada pois, do ponto de vista econômico o etanol é mais barato e mais facilmente obtido, além de ser menos prejudicial ao meio ambiente.

O esquema do protocolo utilizado está apresentado na figura 42. O rendimento de síntese foi de 128% e a massa de peptídeo bruto obtida foi de 107,2 mg. Observando o perfil cromatográfico do peptídeo (figura 43) bruto obtido, podemos observar a presença de um pico de contaminante antes do material desejado, que poderia estar correlacionado com o não acoplamento eficiente de algum aminoácido da sequência. Apesar da presença deste material, o material desejado foi obtido e com grau de pureza superior ao do protocolo padrão.

Figura 42: Esquema de SPFSV-Etanol/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina em Etanol/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em Etanol/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC à 50°C.

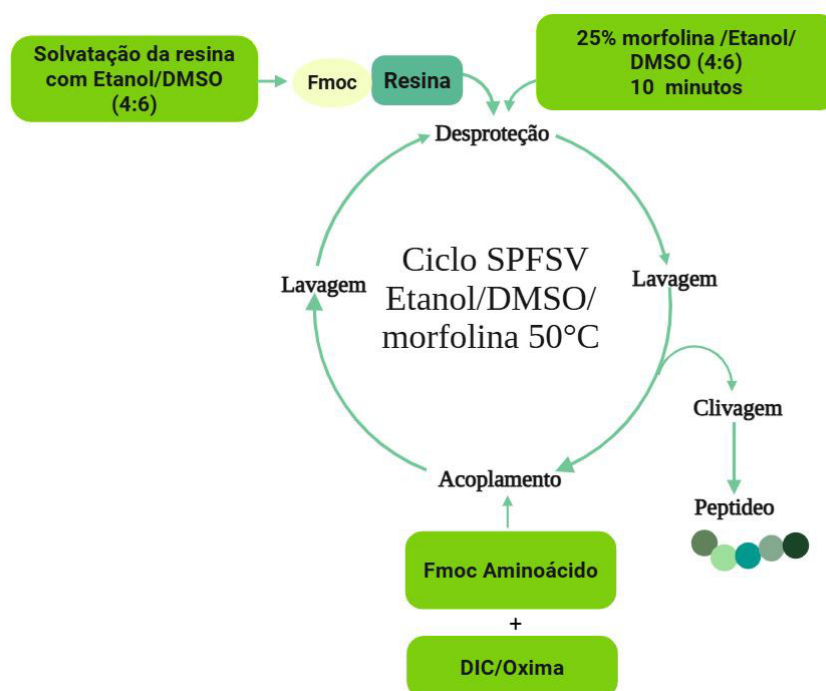
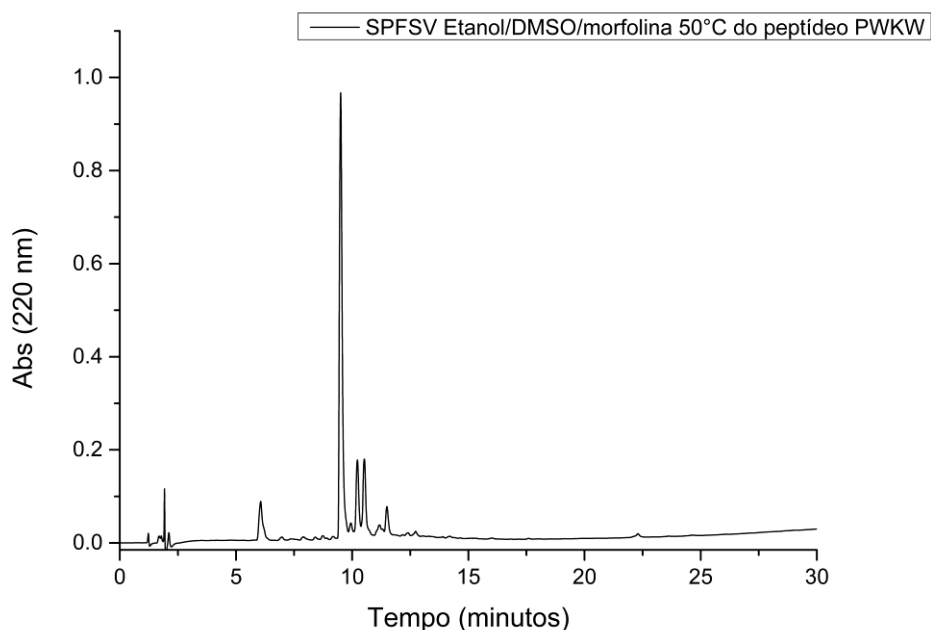


Figura 43: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo SPFSV-Etanol/DMSO/morfolina 50°C. Solvatação da resina com Etanol/DMSO (4:6), desproteção usando 50% morfolina em Etanol/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC à 50°C.



4.2.2.7 Protocolo de síntese verde para o peptídeo PWKW utilizando Etanol/DMSO (4:6) e AMP na etapa de desproteção e como solvente de lavagem e acoplamento Etanol/DMSO (4:6) a uma temperatura de 50°C – SPFSV-Etanol/DMSO/AMP 50°C.

Na síntese utilizando uma solução de desproteção de 25% AMP em Etanol/DMSO, a etapa de desproteção durou 5 e 20 minutos. A solvatação da resina foi realizada com a solução de Etanol/DMSO, e a mistura acoplante utilizada foi Oxima Pure/DIC (figura 44). Para esta síntese, o rendimento obtido foi de 72% e a massa de peptídeo bruto obtida foi de 60,3 mg. Analisando o perfil cromatográfico do peptídeo (figura 45) é possível observar a presença de pico contaminantes, indicando que alguma reação colateral possa ter ocorrido no processo de síntese.

Figura 44: Esquema de SPFS Etanol/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina em Etanol/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AMP em Etanol/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima/DIC a temperatura de 50°C.

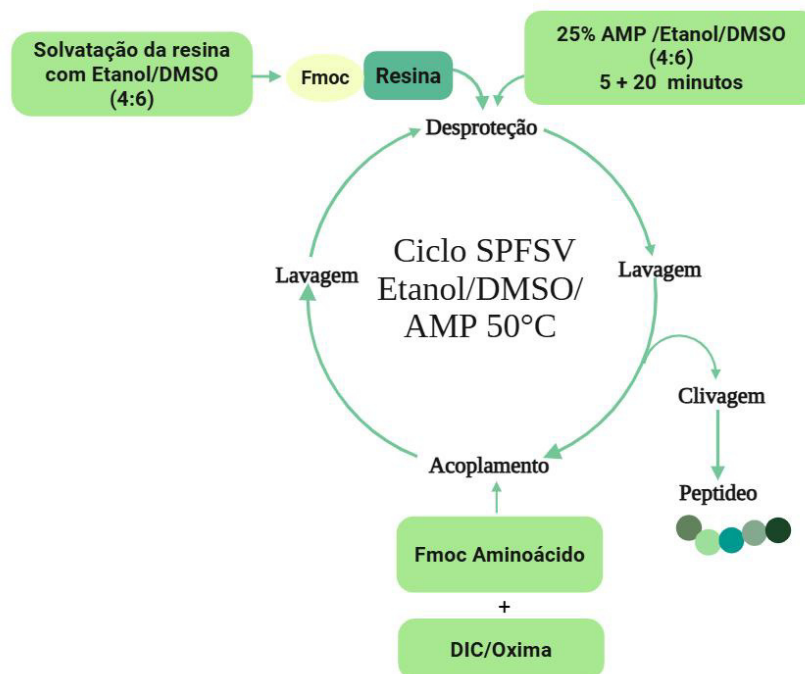
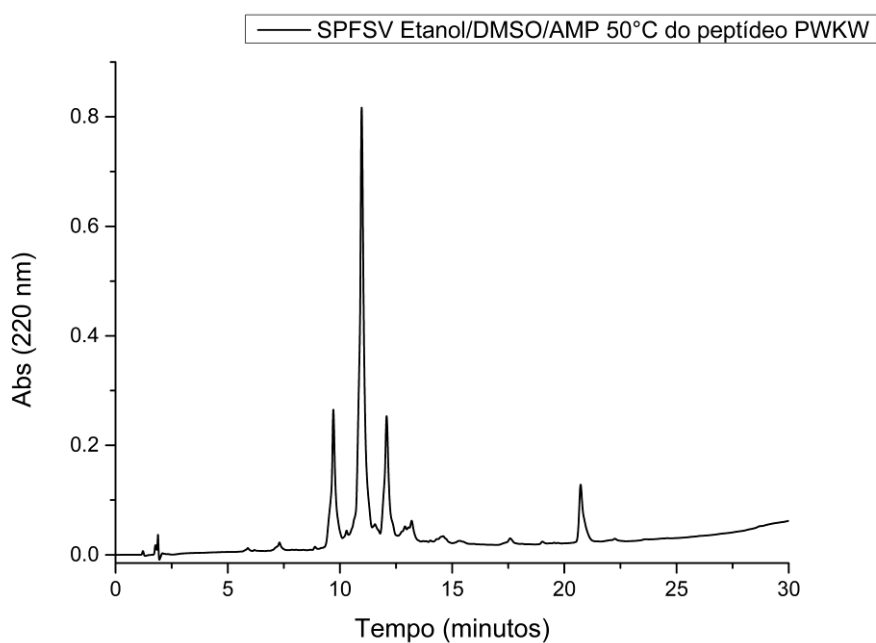


Figura 45: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW bruto sintetizado pelo protocolo de SPFSV Etanol/DMSO/AMP 50°C. Solvatação da resina com Etanol/DMSO (4:6), desproteção usando 25% AMP em Etanol/DMSO (4:6), acoplamento com a mistura acoplante Oxima Pure/DIC a 50°C.



Comparando todos os resultados obtidos nas sínteses para o peptídeo PWKW (tabela 7) é possível observar que melhores protocolos foram o SPFSV-2-MeTHF 50°C e os contendo IPA/DMSO (4:6). A melhor condição foi com esse solvente e com a solução de desproteção contendo MEA. Esse resultado pode estar relacionado ao bom inchamento da resina. Para a síntese utilizando a solução de Etanol/DMSO (4:6) o inchamento da resina não era tão bom quanto dos outros solventes avaliados para este peptídeo, no entanto, também mostrou um rendimento, mostrando boa possibilidade de uso.

4.3 TESTE DE CLIVAGEM

Após o acoplamento de todos os aminoácidos da sequência, o peptídeo precisa ser separado do suporte sólido, etapa essa chamada de clivagem. Usando o protocolo de síntese Fmoc/tBu convencional, a estratégia adotada para a clivagem é a desproteção global total com alto teor de TFA na presença de scavengers (supressores de reações colaterais), que clivam o peptídeo da resina com remoção concomitante dos grupos protetores (Al Musaimi *et al.*, 2020). O TFA é um produto químico extremamente corrosivo e agressivo, podendo causar danos corporais em contato com a pele, deixando queimaduras químicas difíceis de curar, além de poder causar danos quando inalado. Além de corrosivo ele é relativamente caro, tanto para seu descarte quanto para a sua compra, especialmente quando a síntese de peptídeos é realizada em larga escala e requer grandes quantidades (Palladino and Stetsenko, 2012). Sendo o TFA um doador de prótons, ele conjuntamente com os scavengers, se torna essencial para que a reação de clivagem ocorra, não sendo encontrado até o momento um substituto que seja considerado mais ecológico (Al Musaimi *et al.*, 2020).

A falta de substitutos ao TFA, e a tentativa de diminuição dos custos para a produção do peptídeo EVF, levou-nos a avaliar se a redução da quantidade de solução de clivagem afetaria a quantidade de peptídeo e a pureza obtida. Neste estudo foi utilizada a solução de clivagem composta por TFA 95%; 2,5% água e 2,5% TIS (triisopropilsilano). A quantidade de solução utilizada foi determinada proporcionalmente pela massa de resina a ser clivada, sendo estes 10 mL (padrão), 8 mL e 6 mL para cada 1g de resina. A reação ocorreu por duas horas sob agitação. Na menor proporção, 6 mL para 1 g de resina, à temperatura de 50°C também foi avaliada. Ao final da reação, as soluções foram filtradas, adicionado água ultrapura e liofilizadas. As quantidades de reagentes utilizadas estão apresentadas na tabela 13.

Tabela 13: Quantidade de reagentes utilizados nas soluções de clivagem para 100 mg de peptidil-resina.

Equivalência	Solução total preparada (mL)	Reagentes (mL)		
		TFA	Água	TIS
10	1	0,950	0,025	0,025
8	0,8	0,750	0,020	0,020
6	0,6	0,570	0,015	0,015

Ao término da liofilização, as amostras foram pesadas (tabela 14) e uma alíquota foi retirada para ser analisada por CLAE analítico em um gradiente de 5 a 95% de solvente B em 30 minutos. Os resultados obtidos mostraram que a diminuição do volume de solução utilizada não afeta consideravelmente a quantidade e o grau de pureza do peptídeo (tabela 12). No entanto, observando os resultados apresentados na tabela 14 é possível afirmar que, as clivagens com 6 equivalentes foram as mais eficientes, sendo que, a clivagem à 50°C apresentou uma maior massa de peptídeo e um dos maiores grau de pureza. Esta solução mostrou maior pureza e massa compatível com o protocolo padrão, indicando a possibilidade de diminuição do volume de TFA usado.

Tabela 14: Massa obtida e grau de pureza do peptídeo EVF após clivagem.

Equivalência	Massa (mg)	Pureza (%)
10	20,4	75
8	20,3	82
6	19,1	81
6 (50°C)	21,7	80

A mesma análise foi realizada para o peptídeo PWKW, porém todas as clivagens ocorreram em temperatura ambiente devido a presença de Trp que poderia ser degradado a alta temperatura. Todas as reações ocorreram por um período de duas horas sob agitação utilizando 500 mg de peptidil-resina. Ao final do processo, as soluções passaram pelas mesmas etapas de filtração, adição de água ultrapura e liofilização que o peptídeo EVF.

Avaliando os resultados apresentados na tabela 15, podemos observar que a eficiência de clivagem foi diminuindo, já que a massa de peptídeo bruto obtida diminuiu gradativamente com a diminuição do volume da solução de clivagem. Sendo assim a redução do coquetel de

clivagem não é viável para a obtenção do peptídeo PWKW. Porém comparando o grau de pureza das amostras foi possível observar um aumento no grau de pureza do peptídeo clivado com 8 equivalentes em relação ao de 10 equivalentes. Para este peptídeo não foi testado a eficiência de clivagem a temperaturas mais altas pois, foi observado que o aumento da temperatura promove o aumento de impurezas no peptídeo.

O maior teor de clivagem para o peptídeo EVF pode estar relacionado a natureza do aminoácido ligado à resina. Estudos demonstraram que aminoácidos mais hidrofóbicos demoram mais para serem clivados da resina, explicando os nossos resultados (Jubilut *et al.*, 1997; Jubilut *et al.*, 2007).

Tabela 15: Massa obtida e grau de pureza do peptídeo PWKW.

Equivalência	Massa (mg)	Pureza (%)
10	5,9	44
8	3,4	54
6	2,6	42
5	2,9	45

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 Eficácia *in vitro* do peptídeo PWKW

O estudo de eficácia *in vitro* do peptídeo PWKW foi realizada através da avaliação da liberação de cálcio em células humanas musculares esqueléticas (HSkMC) como indicador de contração muscular. Este modelo é utilizado pois, as rugas na pele podem ser causadas por contrações musculares repetidas associadas a fatores genéticos ou ambientais (Pessa *et al.*, 2014).

A ionomicina é um dos ionóforos mais utilizados para validação e calibração da análise de alterações de cálcio.

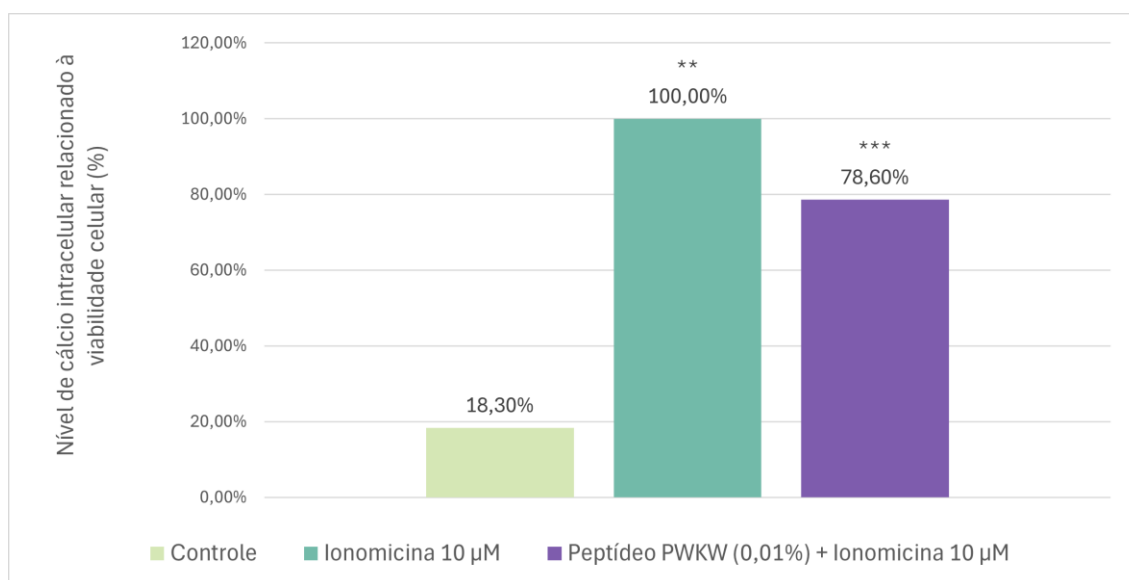
Especificamente, ela possui a capacidade de se ligar a íons de cálcio dentro da célula e permitir a sua liberação no citoplasma. No contexto de estudos com células musculares esqueléticas, ao adicionar a ionomicina às células em cultura, ela se liga aos íons de cálcio presentes no meio extracelular e facilita sua entrada nas células. Isso resulta em um aumento na

concentração de cálcio intracelular, ativando várias proteínas e vias de sinalização envolvidas na contração muscular, o que pode levar à contração das células musculares esqueléticas em cultura.

A exposição das células musculares esqueléticas humanas (HSkMC) à ionomicina em 10 μM resultou em um aumento de 445,6% nos níveis de cálcio intracelular ($p < 0,01$), em comparação com o grupo controle não tratado. Por outro lado, quando as células foram previamente tratadas com o peptídeo PWKW a 0,1% (massa/massa), os resultados indicaram uma diminuição de 21,4% no influxo de cálcio ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado apenas com ionomicina a 10 μM (Figura 46).

Após os resultados promissores obtidos no ensaio *in vitro*, o peptídeo PWKW seguiu para os estudos clínicos.

Figura 46: Efeito do peptídeo PWKW nos níveis intracelulares de cálcio após a indução com ionomicina 10 μM . Gráfico de barras representando os níveis intracelulares de cálcio, relativos à viabilidade celular (MTT). (** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle; * $p < 0,05$ em relação ao grupo ionomicina 10 μM).



4.4.2 Ensaio clínico para o peptídeo EVF.

4.4.2.1 Estudo preliminar de redução de sebo

O peptídeo EVF foi uma molécula desenvolvida por (Katekawa, 2018) por meio de ferramentas computacionais para ação de bloqueio do receptor da MCR5, responsável pelo controle da produção de sebo na pele. Em estudos *in vitro* com sebócitos humanos o peptídeo apresentou em uma concentração de 500 ppm um efeito inibidor significativo de 28% na formação de gotículas lipídicas em células estimuladas para a produção de sebo.

O ensaio clínico visou avaliar a eficácia de um ativo na redução e controle da oleosidade, bem como na diminuição dos poros ao longo de 28 dias. O tratamento consistiu na aplicação de um peptídeo EVF a uma concentração de 1% em uma formulação, comparado a um ativo de mercado aplicado a 4% (concentração recomendada pelo fabricante) na mesma formulação, além de um placebo. A aplicação foi realizada na face duas vezes ao dia (manhã e noite).

Antes de ser realizado um ensaio clínico mais robusto com um maior número de voluntários foi realizado um ensaio preliminar onde foram avaliados o peptídeo EVF e o Pal-EVF, sendo este último o peptídeo acoplado a um palmitoil.

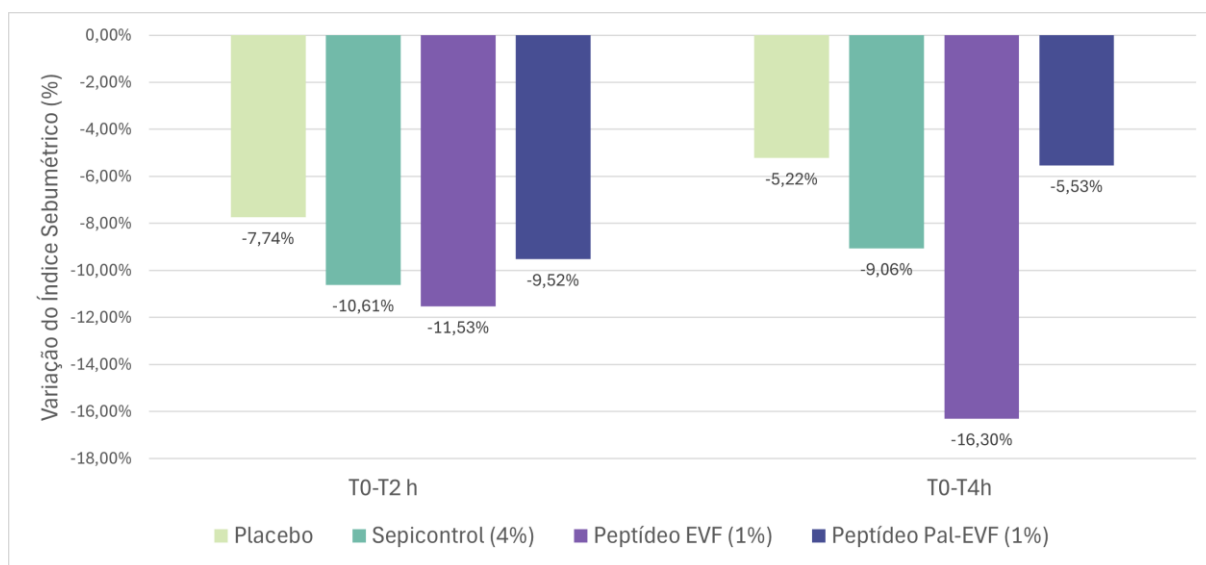
Apesar de apresentar diversos benefícios, os peptídeos em sua grande maioria são substâncias hidrofílicas, característica esta que, pode dificultar sua absorção pela barreira epidérmica. A estratégia de palmitoilação na região N-terminal do peptídeo foi uma modificação de estruturação comum, com o intuito de aumentar a permeabilidade dos peptídeos através da camada da pele (Ledwoń *et al.*, 2021; Veiga *et al.*, 2023). Esta modificação poderia resultar uma maior capacidade de permeação da molécula devido ao aumento da hidrofobicidade, maior estabilidade e uma degradação mais lenta por enzimas (Chng *et al.*, 2024).

O estudo preliminar com estas duas moléculas foram realizadas com 8 voluntários caucasianos por grupo, com idades entre 18 e 50 anos e pele oleosa, com um índice submétrico maior que 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Neste estudo preliminar foi avaliado a produção de sebo na pele algumas horas depois da primeira aplicação (Figura 47). Analisando os resultados é observado que o peptídeo EVF apresentou uma redução de 11,53% na produção de sebo em duas horas após a aplicação, já o Pal-EVF de 9,52%. Após quatro horas a redução foi de 16,30% para o EVF e de 5,53% para o Pal-EVF, respectivamente. O tripeptídeo EVF foi o que apresentou melhor resultado na redução de sebo. Quando comparado com o ativo do existente no mercado para a redução de sebo, tanto

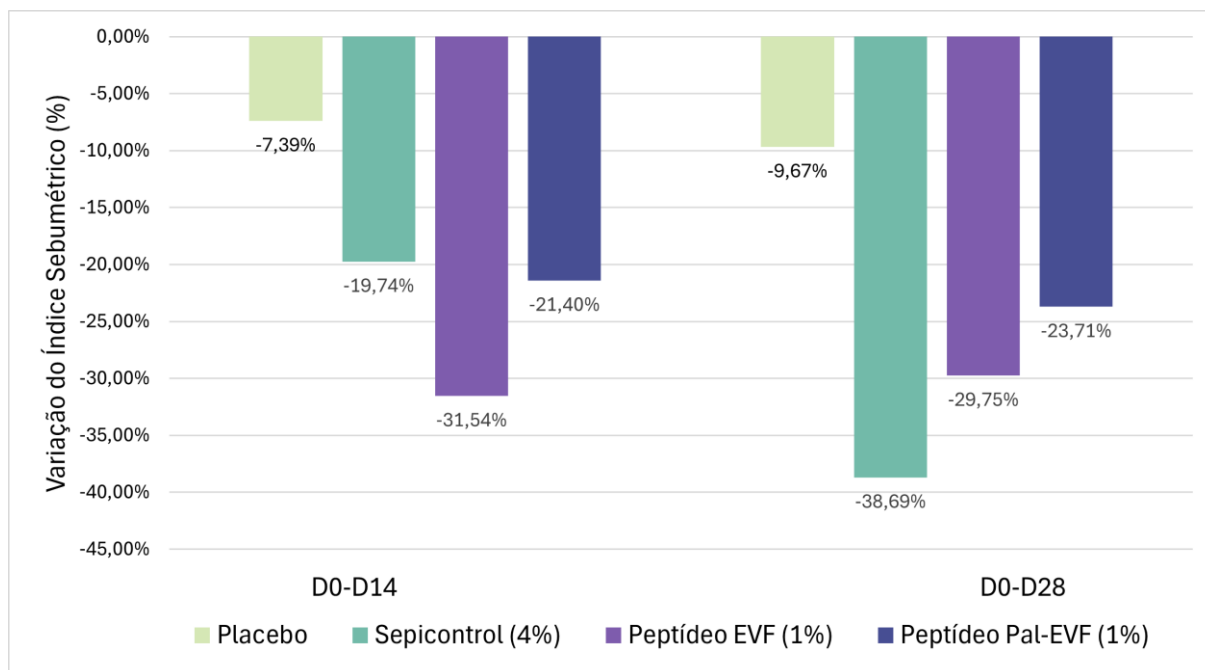
no tempo de duas horas quanto no de quatro horas, o tripeptídeo apresentou uma maior redução na produção de sebo.

Figura 47: Variação do índice sebumétrico (%) para o placebo, ativo do mercado, EVF e Pal-EVF por período (T0-T2 h / T0-T4 h). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial (T0).



Após duas semanas de tratamento (D14), o grupo tratado com o peptídeo EVF apresentou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) de 31,5% de oleosidade da pele, enquanto o Pal-EVF 9,52%, o placebo apresentou uma redução de 7,4% e o ativo do mercado, redução de 19,8% em relação ao dia inicial (D0). Após o período de quatro semanas (D28), performance do EVF manteve-se constante em torno de 30% e o Pal-EVF uma redução para 5,33%, demonstrando que o tripeptídeo promove uma redução significativa ($p > 0,001$) do índice submétrico em relação ao dia inicial (D0). No mesmo período, o grupo tratado com o ativo do mercado apresentou redução de 33%, sem diferença estatística com relação do EVF (Figura 48).

Figura 48: Variação do índice sebumétrico (%) para o placebo, ativo do mercado Sepicontrol, EVF e Pal-EVF por período (D0-D14 / D0-D28). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao tempo inicial (D0).



Analisando os dados obtidos é possível afirmar que a estratégia de adicionar um grupamento palmitoil a molécula peptídica não foi vantajosa, uma vez que os resultados apresentados demonstraram uma piora na inibição da produção de sebo quando comparado com a molécula peptídica sem o palmitoil. Essa diminuição da inibição pode estar relacionada com a dificuldade que o palmitoil pode causar na ligação do peptídeo a MCR5. Quando comparado com outras moléculas peptídicas que utilizaram esta técnica, como exemplo o peptídeo Pal-KTTKS, ele não apresentou permeabilidade completa da pele, porém ele foi encontrado em cada camada da pele (epiderme, estrato córneo e derme), o que não ocorreu com o peptídeo não modificado KTTKS (Ledwoń *et al.*, 2021).

4.4.2.2 Avaliação da redução de tamanho de poros

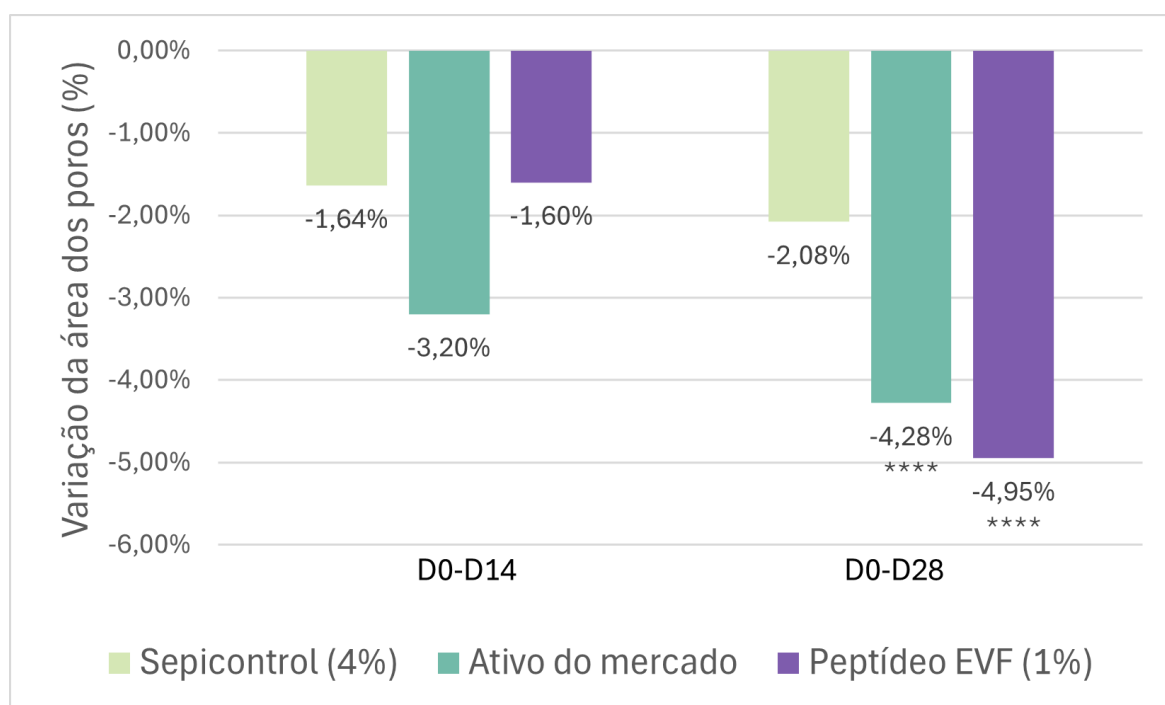
Os poros encontrados na pele são componentes de extrema importância na análise de superfície da pele. Eles são estruturas aberturas expandidas nos folículos capilares na superfície da pele. O seu tamanho pode variar de acordo com fatores externos e internos, como a produção de sebo e o envelhecimento, e muitos destes podem ser encontrados na região do nariz. A

estrutura do poro pode ser alterada de acordo com a mudança da estrutura interna da pele, sendo assim quando a pele tiver alguma alteração, os poros também terão alterações o que pode levar a mudanças em seu tamanho (Kim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2023). Por isso, os dermatologistas e a indústria cosmética estão prestando muita atenção nesta questão, e o desenvolvimento de produtos que reduzam o seu tamanho são avaliados (Kim *et al.*, 2014).

Após os resultados obtidos na análise preliminar, o peptídeo EVF foi selecionado para novos estudos. Devido à sua ação na inibição da produção de sebo, tornou-se necessário realizar uma análise do tamanho dos poros. Para isso, foi conduzido um novo estudo com voluntárias caucasianas, com faixa etária entre 19 e 50 anos, apresentando pele oleosa e índice sebumétrico superior a 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Como pode ser observado na figura 49 após 14 dias de aplicação contendo o peptídeo EVF a redução do tamanho dos poros de 1,6% enquanto o do ativo do mercado reduziu cerca de 3,2%. Porém após 28 dias, o peptídeo promoveu redução dos poros em 5,0% enquanto o ativo do mercado reduziu 4,3%, demonstrando que a eficácia do peptídeo EVF. Avaliando os registros fotográficos do estudo (figura 50) é possível observar que houve a redução do tamanho dos poros na região do nariz das voluntárias durante o período de avaliação de 28, corroborando assim com os resultados apresentados na figura 49.

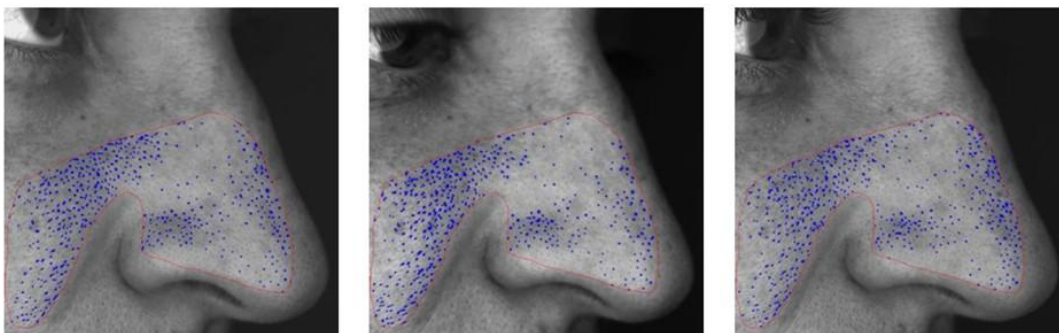
Figura 49: Redução da área de poros após 14 (D14) e 28 dias (D28) de tratamento comparado ao dia inicial (D0).



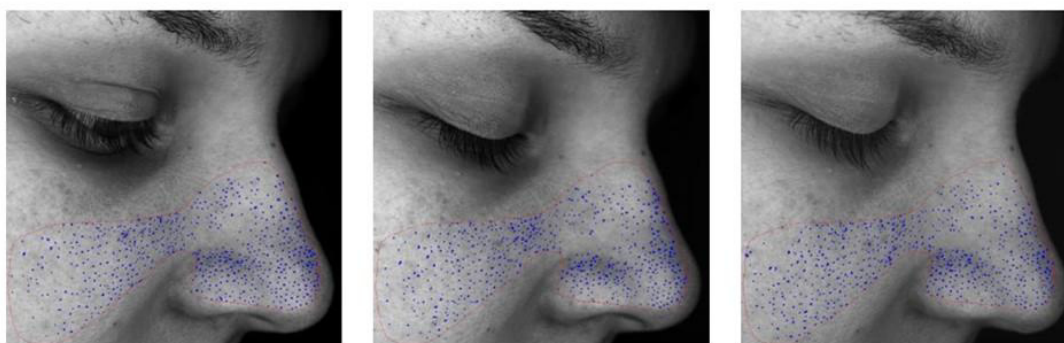
****p<0,0001

Figura 50: Avaliação do peptídeo EVF na redução de poros antes do tratamento (D0), após 14 dias (D14) e 28 dias (D28).

Voluntário 7



Voluntário 11



D0

D14

D21

Os resultados obtidos se demonstraram promissores uma vez que além de reduzir a produção de sebo a aplicação do peptídeo também reduz o tamanho dos poros. A produção de sebo de forma excessiva está correlacionada com o aumento do tamanho de poros (Jo *et al.*, 2007).

4.4.2.3 Redução e controle de oleosidade

Observa-se na figura 51, que o tratamento com a formulação placebo não altera os níveis de brilho na face resultante da produção excessiva de sebo. De forma semelhante, observa-se que a formulação com o ativo do mercado Sepicontrol a 4% não trouxe benefícios perceptíveis relativos ao brilho excessivo na face da voluntária. Já na figura 51c é possível notar redução nítida de brilho excessivo após 14 dias de tratamento com o peptídeo EVF a 1%.

Figura 51: Registros fotográficos e dados quantitativos evidenciando o efeito sob a redução e controle de oleosidade na pele dos voluntários antes (D) e depois (D14) do tratamento com **a)** placebo, **b)** Sepicontrol a 4% e **c)** EVF a 1%.



O tratamento para pele oleosa necessita de mais opções, principalmente que atuem em vias alternativas, em relação às vias tradicionais, como a 5α -redutase. Os altos níveis de testosterona podem estar relacionados ao aumento da atividade das glândulas sebáceas, por conta de sua capacidade de se ligar aos receptores nucleares de andrógenos expressos nos sebócitos (Pochi Pe Fau - Strauss and Strauss; Giltay and Gooren, 2000; Fimmel *et al.*, 2001).

A enzima 5α -redutase é quem converte a testosterona em diidrotestosterona (DHT) que tem como afinidade muito maior pelo receptor andrógeno do que seu precursor (Anderson and Liao, 1968). Por isso, ela é considerada uma estratégia útil para controlar a oleosidade, porém os inibidores da 5α -redutase podem não ser totalmente eficazes para todos os casos de alta atividade das glândulas sebáceas (Leyden *et al.*, 2004).

Até o presente momento, nenhum ensaio clínico foi realizado com inibidores da MCR5 destinado ao uso cosmético como regulador da produção de sebo. Como o peptídeo EVF reduziu a produção de sebo *in vivo* e atua de forma não canônica, acredita-se que uma infinidade de combinações possa ser realizada com outros ingredientes, como por exemplo os inibidores da 5α -redutase que poderiam ter efeitos sinérgicos, podendo assim criar produtos mais potentes para atuação contra a sebogênese.

O peptídeo EVF foi lançado no mercado e está apresentando uma boa aceitação (<https://www.chemyunion.com/peptid4s-control>).

5 CONCLUSÃO

A busca por novos solventes e bases para a síntese de peptídeos em fase sólida verde de peptídeos cosméticos foi realizada.

Por meio deste estudo foi possível identificar potenciais substituintes para as bases utilizadas na desproteção do grupamento Fmoc, como o aminoetanol e o 2-amino-2-metil-1-propanol. A morfolina, já descrita como alternativa à piperidina, também foi avaliada e validada para os peptídeos testados.

Os solventes e as misturas utilizadas neste estudo se mostraram eficientes para a solvatação da resina de poliestireno Wang, com exceção do Cyreno que só demonstrou capacidade de solvatação da resina quando em uma mistura com o DEC. O solvente verde que melhor apresentou resultados foi o 2-MeTHF para o peptídeo EVF, já para o peptídeo PWKW a solução IPA/DMSO (4:6) e etanol/DMSO apresentaram os melhores resultados, com síntese com alto grau de pureza e poucos contaminantes. Estes dados mostram que o solvente a ser utilizado é sequência-dependente. Para entender as reações de síntese que aconteceram e o que seriam os contaminantes encontrados, mais análises serão necessárias.

Quanta a clivagem do peptídeo EVF, a redução do volume da solução de clivagem se mostrou eficiente e sem prejuízos para o rendimento e pureza do peptídeo, mostrando um ganho real, devido ao alto custo do TFA. No entanto, para o peptídeo PWKW a diminuição do volume foi prejudicial, apresentando uma redução na massa material bruto obtido. Estes dados mostram que a clivagem é sequência/dependente.

O Tripeptídeo-85 (EVF) apresentou um potencial redutor da produção de sebo nas análises *in vivo* devido a inibição da enzima MCR5, demonstrando assim que ele é um potencial agente que pode atuar em casos de dermatite seborréica e acne, se tornando um promissor componente de cosméticos.

O peptídeo PWKW apresentou uma atividade potencial com o mesmo mecanismo de ação que a toxina botulínica. Desta forma, este peptídeo é um promissor composto no desenvolvimento de um peptídeo Botox-like.

ANEXO I

Purificação e análise de massas dos peptídeos

As purificações dos peptídeos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa no modo semipreparativo utilizando uma coluna C18 Agilent 10 Prep (250 cm x 30 mm). Durante as purificações foram recolhidas frações de aproximadamente 5 mL, e a pureza dessa determinada por CLAE analítica em uma coluna Ultrasphere Phenomenex C18 (tamanho 4,6 x 250 mm, tamanho da partícula de 5 µm). Os tubos que continham o material puro foram juntados e liofilizados.

As análises dos peptídeos foram realizadas em um espectrômetro de massas Thermo LCQ-fleet, com configuração ESI-IT-MS. Realizou-se a infusão direta das soluções de amostra a uma concentração de aproximadamente 10 ppm em acetonitrila/água contendo 0,1% v/v de ácido fórmico. A vazão de infusão foi ajustada a 5,0 µL/min e a fonte de eletrospray foi operada em modo positivo, aplicando-se 4,5 kV no capilar de eletrospray.

Os gradientes de purificação e os gradientes de análise dos tubos purificados estão apresentados na tabela a seguir:

Tabela Suplementar 1: Condições de purificação dos peptídeos

Peptídeo	Gradiente de purificação	
	CLAE semi-preparativo	CLAE analítico
EVF	10-50% de solvente B em 90 min	10-50% de solvente B em 10 min
PWKW	50-80% solvente B em 90 min	60-95% solvente B em 10 min

Os perfis cromatográficos dos peptídeos puro e o espectro de massas do peptídeo bruto podem ser observados a seguir.

Figura Suplementar 1: Perfil cromatográfico do peptídeo EVF puro 99% de pureza.

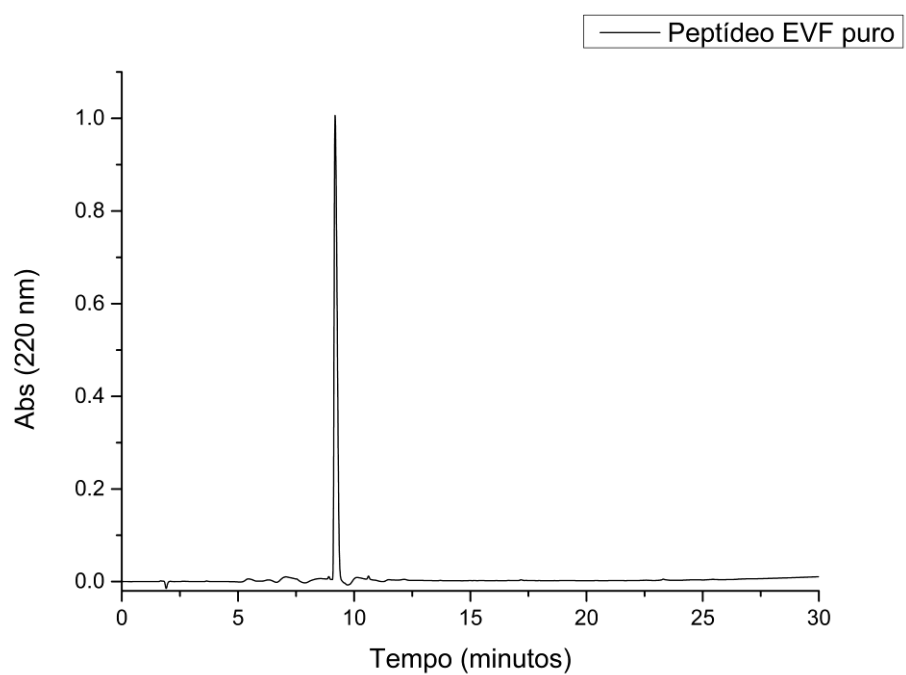


Figura Suplementar 2: Perfil cromatográfico do peptídeo PWKW puro 97% de pureza.

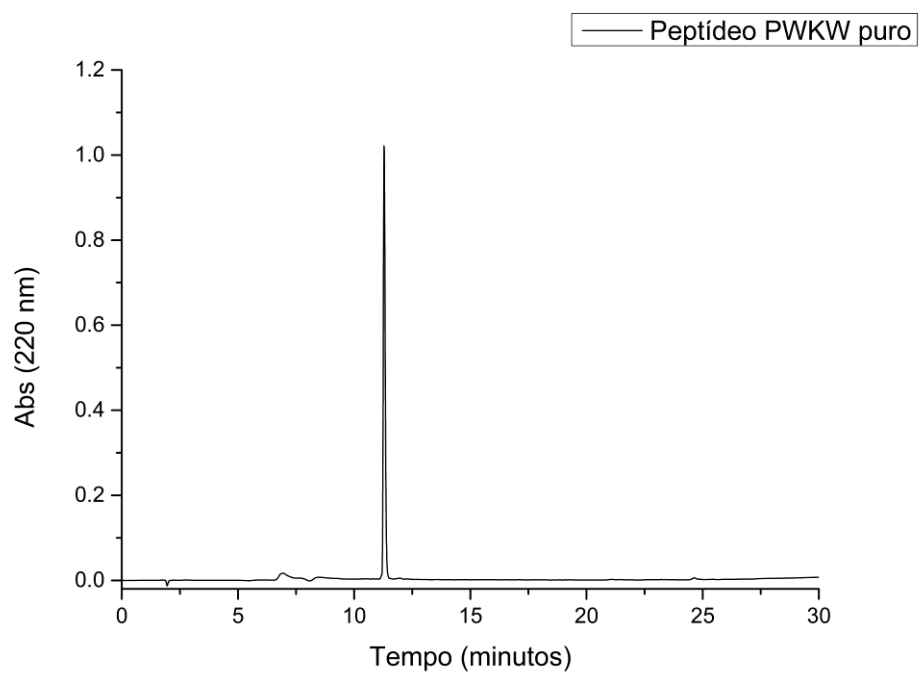


Figura Suplementar 3: Espectro de massas do peptídeo EVF bruto MW = 393,44 g/mol.

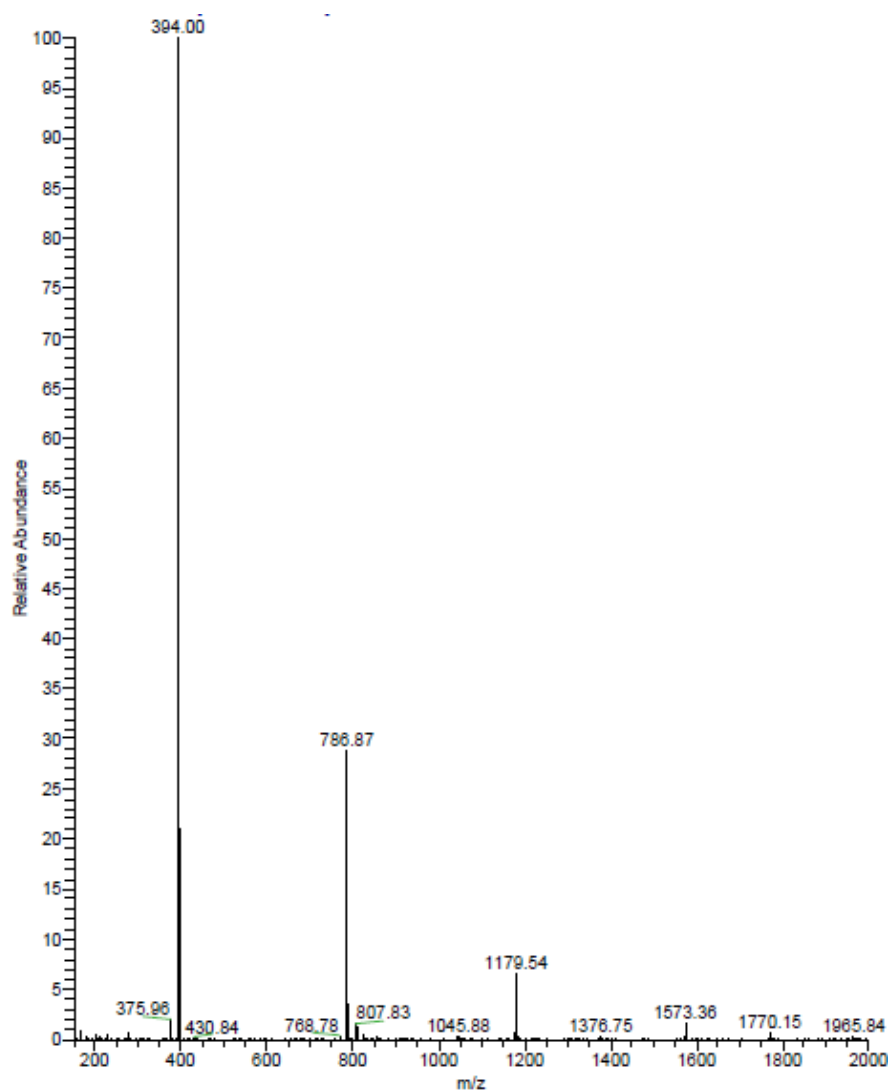
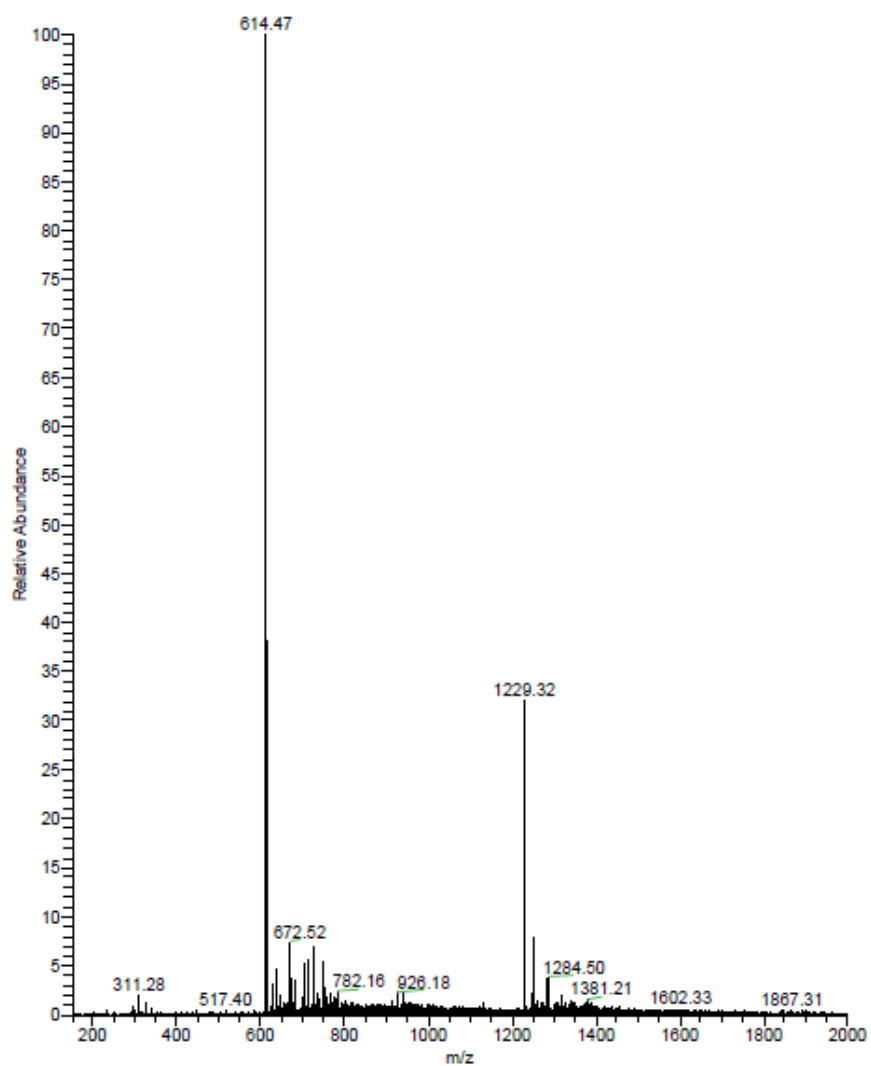


Figura Suplementar 2: Espectro de massas do peptídeo PWKW bruto MW = 615,73 g/mol.



REFERÊNCIAS

AGENCY, E. C. ECHA CHEM: ECHA Chemicals Database. 2025. Available at: <https://echa.europa.eu/pt/home>.

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; HERNÁNDEZ-MENDONZA, A.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CORDOBA, B.; LICEAGA, A. M. Potential role of natural bioactive peptides for development of cosmeceutical skin products. **Peptides**, v. 122, p. 170170, 2019. ISSN 0196-9781. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978119301482>.

AL MUSAIMI, O.; DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. Greening Fmoc/tBu solid-phase peptide synthesis. **Green Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 996-1018, 2020. ISSN 1463-9262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C9GC03982A>.

AL MUSAIMI, O.; JAD, Y. E.; KUMAR, A.; EL-FAHAM, A.; COLLINS, J. M.; BASSO, A.; DE LA TORRE, B.; ALBERICIO, F. Greening the Solid-Phase Peptide Synthesis Process. 2-MeTHF for the Incorporation of the First Amino Acid and Precipitation of Peptides after Global Deprotection. **Organic Process Research & Development**, v. 22, n. 12, p. 1809-1816, 2018. ISSN 1083-6160. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.8b00335>.

ALENCAR-SILVA, T.; BRAGA, M. C.; SANTANA, G. O. S.; SALDANHA-ARAÚJO, F.; POGUE, R.; DIAS, S. C.; FRANCO, O. L.; CARVALHO, J. L. Breaking the frontiers of cosmetology with antimicrobial peptides. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2019-2031, 2018. ISSN 0734-9750. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501830137X>.

AMBLARD, M.; FEHRENTZ, J.-A.; MARTINEZ, J. SUBRA, G. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239-254, 2006. ISSN 1559-0305. Available at: <https://doi.org/10.1385/MB:33:3:239>.

AN, S.; HUANG, X.; LI, N.; LI, Q.; QI, T.; WANG, R.; WANG, L. Preventing crystallization at high concentrated 2-amino-2-methyl-1-propanol for energy-saving CO₂ capture. **Separation and Purification Technology**, v. 330, p. 125484, 2024. ISSN 1383-5866. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586623023924>.

ANDERSON, K. M.; LIAO, S. Selective Retention of Dihydrotestosterone by Prostatic Nuclei. **Nature**, v. 219, n. 5151, p. 277-279, 1968. ISSN 1476-4687. Available at: <https://doi.org/10.1038/219277a0>.

APOSTOLOPOULOS, V.; BOJARSKA, J.; CHAI, T.-T.; ELNAGDY, S.; KACZMAREK, K.; MATSOUKAS, J.; NEW, R.; PARANG, K.; LOPEZ, O. P.; PARHIZ, H.; PEREPA, C. O.; PICKHOLZ, M.; REMKO, M.; SAVIANO, M.; SKWARCZYNSKI, M.; TANG, Y.; WOLF, W. M.; YOSHIYA, T.; ZABROCKI, J.; ZIELENKIEWICZ, P.; ALKHAZINDAR, M.; BARRIGA, V.; KELAIDONIS, K.; SARASIA, E. M.; TOTH, I. **A Global Review on Short Peptides: Frontiers and Perspectives**. *Molecules*. 26 2021.

BRZEZINSKI, P.; BOROWSKA, K.; CHIRIAC, A.; SMIGIELSKI, J. Adverse effects of isotretinoin: A large, retrospective review. **Dermatologic Therapy**, v. 30, n. 4, p. e12483, 2017. ISSN 1396-0296. Available at: <https://doi.org/10.1111/dth.12483>.

CAMPOS, L. D.; SANTOS JUNIOR, V. A.; PIMENTEL, J. D.; CARREGÃ, G. L. F.; CAZARIN, C. B. B. Collagen supplementation in skin and orthopedic diseases: A review of the literature. **Heliyon**, v. 9, n. 4, 2023. ISSN 2405-8440. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14961>.

CATTERALL, W. A. Voltage gated sodium and calcium channels: Discovery, structure, function, and Pharmacology. **Channels**, v. 17, n. 1, p. 2281714, 2023. ISSN 1933-6950. Available at: <https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2281714>.

CHEN, W.; KELLY, M. A.; OPTZ-ARAYA, X.; CONE, R. R. D. Exocrine Gland Dysfunction in MC5-R-Deficient Mice: Evidence for Coordinated Regulation of Exocrine Gland Function by Melanocortin Peptides. **Cell**, v. 91, n. 6, p. 789-798, 1997. ISSN 0092-8674. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80467-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80467-5).

CHEN, X.-T.; WANG, J.-Y.; MA, Y.-N.; DONG, L.-Y.; JIA, S.-X.; YIN, H.; FU, X.-Y.; DU, S.-S.; QI, Y.-K.; WANG, K. DIC/Oxyma-based accelerated synthesis and oxidative folding studies of centipede toxin RhTx. **Journal of Peptide Science**, v. 28, n. 3, p. e3368, 2022. ISSN 1075-2617. Available at: <https://doi.org/10.1002/psc.3368>.

CHEN, Y. A.; SCHELLER, R. H. SNARE-mediated membrane fusion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 98-106, 2001. ISSN 1471-0080. Available at: <https://doi.org/10.1038/35052017>.

CHNG, C.-P.; ZHANG, L.; GUPTA, S.; HUANG, C. Palmitoylation enhances short polar peptide permeation across stratum corneum lipid bilayer: A molecular dynamics study. **Extreme Mechanics Letters**, v. 71, p. 102213. ISSN 2352-4316. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352431624000932>.

CILLI, E. M.; MARCHETTO, R.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R. Correlation between the Mobility of Spin-Labeled Peptide Chains and Resin Solvation: An Approach To Optimize the Synthesis of Aggregating Sequences1. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 25, p. 9118-9123, 1999. ISSN 0022-3263. Available at: <https://doi.org/10.1021/jo991035o>.

CONG, T.-X.; HAO, D.; WEN, X.; LI, X.-H.; HE, G.; JIANG, X. From pathogenesis of acne vulgaris to anti-acne agents. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, n. 5, p. 337-349, 2019/07/01 2019. ISSN 1432-069X. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00403-019-01908-X>.

DIANA DRAELOS, Z. COSMETICS AND SKIN CARE PRODUCTS: A Historical Perspective. **Dermatologic Clinics**, v. 18, n. 4, p. 557-559. ISSN 0733-8635. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863505702060>.

DRAELOS, Z. D. **Cosmetics and Dermatologic Problems and Solutions**. 3rd Edition'. CRC Press: 2011. 292 ISBN 9780429152054.

DRAGOMIRESCU, A. O.; ANDONI, M.; IONESCU, D.; ANDREI, F. **The Efficiency and Safety of Leuphasyl—A Botox-Like Peptide.** *Cosmetics*. 1: 75-81 p. 2014.

EGELUND, P. H. G.; JAFHAV, S.; MARTIN, V.; CASTRO, H. J.; RICHNER, F.; LE QUEMENT, S. T.; DETTNER, F.; LECHNER, C.; SCHOENLEBER, R.; PEDERSEN, D. S. Fmoc-Removal with Pyrrolidine Expands the Available Solvent Space in Green Solid-Phase Peptide Synthesis. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 9, n. 42, p. 14202-14215. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c04770>.

EISINGER, M.; LI, W-H.; ANTHONAVAGE, M.; PAPPAS, A.; ZHANG, L.; ROSSETTI, D.; HUANG, Q.; SEIBERG, M. A melanocortin receptor 1 and 5 antagonist inhibits sebaceous gland differentiation and the production of sebum-specific lipids. *Journal of Dermatological Science*, v. 63, n. 1, p. 23-32. ISSN 0923-1811. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923181111001198>.

EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Peptide Coupling Reagents, More than a Letter Soup. *Chemical Reviews*, v. 111, n. 11, p. 6557-6602. ISSN 0009-2665. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr100048w>.

FERRAZZANO, L.; CORBISIERO, D.; MARTELLI, G.; TOLOMELLI, A.; VIOLA, A.; RICCI, A.; CABRI, W. Green Solvent Mixtures for Solid-Phase Peptide Synthesis: A Dimethylformamide-Free Highly Efficient Synthesis of Pharmaceutical-Grade Peptides. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 7, n. 15, p. 12867-12877. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b01766>.

FERREIRA, M. S.; MAGALHÃES, M. C.; SOUSA-LOBO, J. M. ALMEIDA, I. F. **Trending Anti-Aging Peptides.** *Cosmetics*. 7 2020.

FIMMEL, S.; SABOROWSKI, A.; ORFANOS, A. E.; ZOUBOULIS, C. C. Development of Efficient Transient Transfection Systems for Introducing Antisense Oligonucleotides into Human Epithelial Skin Cells. *Hormone Research*, v. 54, n. 5-6, p. 306-311, 2001. ISSN 0301-0163. Available at: <https://doi.org/10.1159/000053277>.

FISCHER, H.; FUMICZ, J.; ROSSITER, H.; NAPIREI, M.; BUCHBERGER, M.; TSCHACHLER, E.; ECKHART, L. Holocrine Secretion of Sebum Is a Unique DNase2-Dependent Mode of Programmed Cell Death. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 137, n. 3, p. 587-594. ISSN 0022-202X. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X16325349>.

GAZERANI, P. **How Does Botulinum Toxin Inhibit Itch?** *Toxins*. 14 2022.

GILLIES, A. R.; LIEBER, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & Nerve*, v. 44, n. 3, p. 318-331. ISSN 0148-639X. Available at: <https://doi.org/10.1002/mus.22094>.

GILTAY, E. J.; GOOREN, L. J. G. Effects of Sex Steroid Deprivation/Administration on Hair Growth and Skin Sebum Production in Transsexual Males and Females. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 85, n. 8, p. 2913-2921, 2000. ISSN 0021-972X. Available at: <https://doi.org/10.1210/jcem.85.8.6710>.

GIRAUD, M.; CAVELIER, F.; MARTINEZ, J. A side-reaction in the SPPS of Trp-containing peptides. **Journal of Peptide Science**, v. 5, n. 10, p. 457-461. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1387\(199910\)5:10](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1387(199910)5:10).

GONZÁLEZ-MINERO, F. J.; BRAVO-DÍAZ, L. **The Use of Plants in Skin-Care Products, Cosmetics and Fragrances: Past and Present**. *Cosmetics*. 5 2018.

GONZÁLEZ-MINERO, F. J.; BRAVO-DÍAZ, L.; AYALA-GÓMEZ, A. **Rosmarinus officinalis L. (Rosemary): An Ancient Plant with Uses in Personal Healthcare and Cosmetics**. *Cosmetics*. 7 2020.

HACHMANN, J.; LEBL, M. Alternative to Piperidine in Fmoc Solid-Phase Synthesis. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 149-149. Available at: <https://doi.org/10.1021/cc050123l>.

HANSEN, P. R.; ODDO, A. Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis. In: HOUEN, G. (Ed.). **Peptide Antibodies: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2015. p.33-50. ISBN 978-1-4939-2999-3.

HARRIS, P. W. R.; YANG, S. H.; BRIMBLE, M. A. An improved procedure for the preparation of aminomethyl polystyrene resin and its use in solid phase (peptide) synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 45, p. 6024-6026. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403911015206> >.

HONG, J. Y.; PARK, S. J.; SEO, S. J.; PARK, K. Y. Oily sensitive skin: A review of management options. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 1016-1020, 2020. ISSN 1473-2130. Available at: <https://doi.org/10.1111/jocd.13347>.

HOLYŃSKA-IWAN, I.; SZEWCZYK-GOLEC, K. Analysis of changes in sodium and chloride ion transport in the skin. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 18094, 2020. ISSN 2045-2322. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75275-3>.

HRUBY, V. J.; CAI, M.; NYBERG, J.; MUTHU, D. Approaches to the rational design of selective melanocortin receptor antagonists. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 6, n. 5, p. 543-557, 2011. ISSN 1746-0441. Available at: <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.565743>.

HUANG, L. et al. Research Progress in The Application of Bioactive Peptides in Cosmeceutical Products. **Academic Journal of Science and Technology**, v. 7, n. 3, p. 258-263, 10/29 2023. Available at: < <https://doi.org/10.54097/ajst.v7i3.13409> >. Accessed on: 2024/08/13.

HUSEIN EL HADMED, H.; CASTILLO, R. F. Cosmeceuticals: peptides, proteins, and growth factors. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 15, n. 4, p. 514-519, 2016. ISSN 1473-2130. Available at: <https://doi.org/10.1111/jocd.12229>.

IMOKAWA, G.; ISHIDA, K. **Biological Mechanisms Underlying the Ultraviolet Radiation-Induced Formation of Skin Wrinkling and Sagging I: Reduced Skin Elasticity, Highly Associated with Enhanced Dermal Elastase Activity, Triggers Wrinkling and Sagging**. *International Journal of Molecular Sciences*. 16: 7753-7775 p. 2015.

ISIDRO-LLOBET, A.; ÁLVAREZ, M.; ALBERICIO, F. Amino Acid-Protecting Groups. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 6, p. 2455-2504, 2009. ISSN 0009-2665. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr800323s>.

JAD, Y. E.; ACOSTA, G. A.; GOVENDER, T.; KRUGER, H. G.; EL-FAHAM, A.; DE LA TORRE, B.; ALBERICIO, F. Green Solid-Phase Peptide Synthesis 2. 2-Methyltetrahydrofuran and Ethyl Acetate for Solid-Phase Peptide Synthesis under Green Conditions. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 12, p. 6809-6814, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01765>.

JAD, Y. E.; ACOSTA, G. A.; KHATTAB, S. N.; DE LA TORRE, B.; GOVENDER, T.; KRUGER, H. G.; EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. 2-Methyltetrahydrofuran and cyclopentyl methyl ether for green solid-phase peptide synthesis. **Amino Acids**, v. 48, n. 2, p. 419-426, 2016. ISSN 1438-2199. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2095-x>.

JAD, Y. E.; GOVENDER, T.; KRUGER, H. G.; EL-FAHAM, A.; DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. Green Solid-Phase Peptide Synthesis (GSPPS) 3. Green Solvents for Fmoc Removal in Peptide Chemistry. **Organic Process Research & Development**, v. 21, n. 3, p. 365-369, 2017. ISSN 1083-6160. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00439>.

JAD, Y. E.; KUMAR, A.; EL-FAHAM, A.; DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. Green Transformation of Solid-Phase Peptide Synthesis. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 4, p. 3671-3683, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06520>.

JADHAV, S. et al. Replacing DMF in solid-phase peptide synthesis: varying the composition of green binary solvent mixtures as a tool to mitigate common side-reactions. **Green Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 3312-3321, 2021. ISSN 1463-9262. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1039/D1GC00604E> >.

JL, L.-Q.; HONG, Y.; TAO, Y.-X. **Melanocortin-5 Receptor: Pharmacology and Its Regulation of Energy Metabolism**. *International Journal of Molecular Sciences*. 23 2022.

JO, H. Y.; YU, D. S.; OH, C. H. Quantitative research on skin pore widening using a stereoisomeric optical topometer and Sebutape®. **Skin Research and Technology**, v. 13, n. 2, p. 162-168, 2007. ISSN 0909-752X. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2007.00176.x>.

JOHNSON, E. A. Clostridial Toxins as Therapeutic Agents: Benefits of Nature's Most Toxic Proteins. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. Volume 53, 1999, p. 551-575, 1999. ISSN 1545-3251. Available at: < <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.micro.53.1.551> >.

JUBILUT, G. N.; CILLI, E. M.; CURSCA, E.; SILVA, E. H.; OKADA, Y.; NAKAIE, C. R. Comparative Investigation of the Cleavage Step in the Synthesis of Model Peptide Resins: Implications for N^α-9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-Solid Phase Peptide Synthesis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 3, p. 468-470, 2007.

JUBILUT, G. N.; MARCHETTO, CILLI, E. M.; OLIVEIRA, E.; MIRANDA, A.; TOMINAGA, M.; NAKAIEE, C. R. **Comparative time-course study of aminoacyl- and dipeptidyl-resin hydrolysis**. Journal of The Brazilian Chemical Society. 8 1997.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Analytical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 595-598, 1970a. ISSN 0003-2697. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269770901466>.

KAISER, E.; COLESCOTT, R. L.; BOSSINGER, C. D.; COOK, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Biochem.**, v. 34, n. 2, p. 595-8, Apr 1970b. ISSN 0003-2697. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5443684>.

KAMIJO, S.; YAMAMOTO, Y. Recent Progress in the Catalytic Synthesis of Imidazoles. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 2, n. 5, p. 568-578, 2007. ISSN 1861-4728. Available at: <https://doi.org/10.1002/asia.200600418>.

KATEKAWA, E. **Descoberta de ligantes do receptor de melanocortina-5 (MC5R) como candidatos a moduladores da sebogênese: estudos de modelagem por homologia, triagem virtual e ensaio celular**. 2018.

KATEKAWA, E. et al. **Composição, Uso de Composição, Método Cosmético e Método Para Modular a Produção de Sebo**. INTELCTUAL, O. M. D. P. Brasil. BR 10 2020 01853 1 4 2022.

KATEKAWA, E. ROGERIO PRINCIVAL, C.; MUSSI, L.; VIDAL MAGALHÃES, W. **COMPOSTOS, COMPOSIÇÕES COSMÉTICAS, DERMOCOSMÉTICAS, COSMECÊUTICAS OU FARMACÊUTICA PARA O RELAXAMENTO DA MUSCULATURA, INCLUINDO A MUSCULATURA ESQUELÉTICA DA FACE, PARA AÇÃO COSMÉTICA ANTIENVELHECIMENTO, PARA REDUÇÃO E/OU SUAUIZAÇÃO DE LINHAS DE EXPRESSÃO E RUGAS E/OU PARA AÇÃO ANTITRANSPIRANTE, USOS E MÉTODOS**. INTELCTUAL, O. M. D. P. Brasil: GUIMARAES COVRE, Rodolfo. WO 2024/092334 A1 2024.

KATEKAWA E., A. B. M. C. O., PRINCIVAL C. R., PADOVANI G., ESTEVES-PEDRO N. M., MUSSI L., CAMARGO JUNIOR F. B., MAGALHÃES W. V., GUIDO R. V. C., CILLI E. M. **Effect of Tipeptide-85 (EVF) on Sebogenesis**. Clinical and Experimental Dermatology and Therapies. 9: 223 p. 2024.

KIM, H.; KANG, D.; SEONG, D.; SALEAH, S. A.; LUNA, J. A.; KIM, Y.; KIM, H. HAN, S.; JEON, M.; KIM, J. Skin pore imaging using spectral-domain optical coherence tomography: a case report. **Biomedical Engineering Letters**, v. 13, n. 4, p. 729-737, 2023. ISSN 2093-985X. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13534-023-00290-y>.

KIM, S. J.; SHIN, M. K.; BACK, J. H.; KOH, J. S. Pore volume is most highly correlated with the visual assessment of skin pores. **Skin Research and Technology**, v. 20, n. 4, p. 429-434, 2014. ISSN 0909-752X. Available at: <https://doi.org/10.1111/srt.12135>.

KIRSTEN, N.; MOHR, N.; ALHUMAM, A.; AUGUSTI, M. Prevalence and Associated Diseases of Seborrheic Skin in Adults. **Clinical Epidemiology**, v. 13, p. 845-851, 2021. ISSN null. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/CLEP.S323744>.

KLAUS WEISSERMEL, H-J. A., CHARLET R. LINDLEY, STEPHEN HAWKINS. **Industrial Organic Chemistry**. Wiley-VCH, 2003. ISBN 3-527-30578-5

KLUCZYK, A.; LUDWICZAK, J.; MODZEL, M.; KUCZER, M.; CEBRAT, M.; BIERMAT, M.; BACHOR, R. **Chemical and biological properties of anti-wrinkle peptide Argireline**. *Aesth Cosmetol Med* . 10: 125-133 p. 2021.

KUMAR, A.; SHARMA, A.; DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. In situ Fmoc removal – a sustainable solid-phase peptide synthesis approach. **Green Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 4887-4896, 2022. ISSN 1463-9262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/D2GC00963C>.

L'ORÉAL. Cosmetics Market: L'ORÉAL 2023 Annual Report. 2024. Available at: <https://www.loreal-finance.com/en/annual-report-2023/>.

LEDWOŃ, P.; ERRANTE, F.; PAPINI, A. M.; ROVERO, P.; LATAJKA, R. Peptides as Active Ingredients: A Challenge for Cosmeceutical Industry. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 2, p. e2000833, 2021. ISSN 1612-1872. Available at: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000833>.

LEE, H. J.; KIM, D.; CHOI, H. J.; KIM, S.; SHIN, M.; KWAK, S.; LEE, D-K.; KANG, W-H. Potential role of the cell-penetrating peptide-conjugated soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor motif of vesicle-associated membrane protein 2-patterned peptide in novel cosmeceutical skin product development. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 23, n. 2, p. 666-675, 2024. ISSN 1473-2130. Available at: <https://doi.org/10.1111/jocd.15984>.

LEYDEN, J.; BERGFELD, W.; DRAKE, L.; DUNLAP, F.; GOLDMAN, M. P.; GOTTLIEB, A. B.; HEFFERNAN, M. P.; HICKMAN, J. G.; HORDINSKY, M.; JARRETT, M.; KANG, S.; LUCKY, AN.; PECK, G.; PHILLIPS, T.; RAPAPORT, M.; ROBERTS, J.; SAVIN, R.; SAWAYA, M. E.; SHALITA, A.; SHAVIN, J.; SHAW, J. C.; STEIN, L.; STEWART, D.; WASHENIK, K.; WEINSTEIN, G.; WHITING, D.; PAPPAS, F.; SANCHEZ, M.; TERRANELLA, L.; WALDSTREICHER, J. A systemic type i 5 α -reductase inhibitor is ineffective in the treatment of acne vulgaris. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 3, p. 443-447, 2004. ISSN 0190-9622. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962203032985>.

LI, W.; O'BRIEN-SIMPSON, N. M.; HOSSAIN, M. A.; WADE, J. D. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) Group in Chemical Peptide Synthesis – Its Past, Present, and Future. **Australian Journal of Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 271-276, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1071/CH19427>.

LIMA, T. N.; PEDRIALI MORAES, C. A. **Bioactive Peptides: Applications and Relevance for Cosmeceuticals**. *Cosmetics*. 5 2018.

LOPEZ, J.; BECK, J.; BUCHER, C.; BERTHELMANN, A.; MARKOS, S.; EISSLER, S. Missing Link: Enabling Loading of 2-Chlorotriptyl Chloride Resin in N-Butylpyrrolidinone as a Green Solvent. **Organic Process Research & Development**, v. 26, n. 5, p. 1450-1457, 2022. ISSN 1083-6160. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.2c00052>.

LOPEZ, J.; PLETSCHER, S.; AEMISSEGGER, A.; BUCHER, C.; GALLOU, F. N-Butylpyrrolidinone as Alternative Solvent for Solid-Phase Peptide Synthesis. **Organic Process Research & Development**, v. 22, n. 4, p. 494-503, 2018. ISSN 1083-6160. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00389>.

LOVÁSZI, M.; SZEGEDI, A.; ZOUBOULIS, C. C.; TÖRÖCSIK, D. Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids. **Dermato-Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. e1375636, 2017. ISSN null. Available at: <https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1375636>.

LUNA, O. F.; GOMEZ, J.; CÁRDENAS, C.; ALBERICIO, F.; MARSHALL, S. H.; GUZMÁN, F. Deprotection Reagents in Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: Moving Away from Piperidine? **Molecules**. 21 2016.

LUPO, M. P.; COLE, A. L. Cosmeceutical peptides. **Dermatologic Therapy**, v. 20, n. 5, p. 343-349, 2007. ISSN 1396-0296. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2007.00148.x>.

L'ORÉAL. Cosmetics Market: L'ORÉAL 2022 Annual Report. 2023. Available at: <https://www.loreal-finance.com/en/annual-report-2022/beauty-market/#focus-france>.

MANNE, S. R.; SHARMA, A.; SAZONOVAS, A.; EL-FAHAM, A.; DE LA TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. Understanding OxymaPure as a Peptide Coupling Additive: A Guide to New Oxyma Derivatives. **ACS Omega**, v. 7, n. 7, p. 6007-6023, 2022. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06342>.

MARTELLI, G.; CANTELM, P.; PALLADINO, C.; MATTELLONE, A.; CORBISIÉRO, D.; FANTONI, T.; TOLOMELLI, A.; MACIS, M.; RICCI, A.; CABRI, W.; FERRAZZANO, L. Replacing piperidine in solid phase peptide synthesis: effective Fmoc removal by alternative bases. **Green Chemistry**, v. 23, n. 20, p. 8096-8107, 2021. ISSN 1463-9262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/D1GC02634H>.

MARTIN, V.; EGELUND, P. H. G.; JOHANSSON, H.; LE QUEMENT, S. T.; WOJCIK, F.; PEDERSEN, D. S. Greening the synthesis of peptide therapeutics: an industrial perspective. **RSC Advances**, v. 10, n. 69, p. 42457-42492, 2020. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/D0RA07204D>.

MARTIN, V.; JADHAV, S.; EGELUND, P. H. G.; LIFFERT, R.; CASTRO, H. J.; KRÜGER, T.; HASELMANN, K. F.; LE QUEMENT, S. T.; ALBERICIO, F.; DETTNER, F.; LECHNER, C.; SCHÖNLEBER, R.; PEDERSEN, S. Harnessing polarity and viscosity to identify green binary solvent mixtures as viable alternatives to DMF in solid-phase peptide synthesis. **Green Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 3295-3311, 2021. ISSN 1463-9262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/D1GC00603G>.

MCKNIGHT, G.; SHAH, J.; HARGEST, R. Physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 40, n. 1, p. 8-12, 2022. ISSN 0263-9319. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263931921002398>.

MCMULLEN, R. L.; DELL'ACQUA, G. **History of Natural Ingredients in Cosmetics. Cosmetics**. 10 2023.

MERRIFIELD, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-2154, 1963. ISSN 0002-7863. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja00897a025> >.

MONTERO-MELENDEZ, T.; BOESEN, T.; JONASSEN, T. E. N. Translational advances of melanocortin drugs: Integrating biology, chemistry and genetics. **Seminars in Immunology**, v. 59, p. 101603, 2022/01/01/ 2022. ISSN 1044-5323. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532322000203>.

MTHEMBU, S. N.; CHAKRABORTY, A.; SCHÖNLEBER, R.; ALBERICIO, F.; DE LA TORRE, B. G. Morpholine, a strong contender for Fmoc removal in solid-phase peptide synthesis. **Journal of Peptide Science**, v. n/a, n. n/a, p. e3538, 2023. ISSN 1075-2617. Available at: <https://doi.org/10.1002/psc.3538>.

NEGAHDARIPOUR, M.; OWJI, H.; ESLAMI, M.; ZAMANI, M.; VAKILI, B.; SABETIAN, S.; NEZAFAT, N.; GHASEMI, H. Selected application of peptide molecules as pharmaceutical agents and in cosmeceuticals. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 19, n. 12, p. 1275-1287, 2019. ISSN 1471-2598. Available at: <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1652592>.

NGOC, L. T.; MOON, J-Y.; LEE, Y-C. **Insights into Bioactive Peptides in Cosmetics. Cosmetics**. 10 2023.

NGUYEN, T. T. et al. **Sustainable Dynamic Wrinkle Efficacy: Non-Invasive Peptides as the Future of Botox Alternatives. Cosmetics**. 11 2024.

NIELSEN, C. J.; D'ANNA, B.; DYE, C.; GRAUS, M.; KARL, M.; KING, S.; MAGUTO, M. M.; MÜLLER, M.; SCHMIDBAUER, N.; STENSTRØM, Y.; WISTHALER, A.; PEDERSEN, S. Atmospheric chemistry of 2-aminoethanol (MEA). **Energy Procedia**, v. 4, p. 2245-2252, 2011. ISSN 1876-6102. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876610211003109>.

NOVABIOCHEM. **Peptide Synthesis Anniversary: Edition 2015/2015-30 Years of Innovation. Peptide Synthesis Anniversary**. KGAA, M. Darmstadt, Germany: Merck Millipore: 498 p. 2014.

ORTIZ, K. G.; BRUSOE, A. T.; AN, J.; CHONG, A.; WU, L. Green Synthesis of Morpholines via Selective Monoalkylation of Amines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 146, n. 43, p. 29847-29856, 2024. ISSN 0002-7863. Available at: <https://doi.org/10.1021/jacs.4c11708>.

PACINI, L.; MUTHYALA, M.; AGUIAR, L.; ZITTERBART, R.; ROVERO, P.; PAPINI, A. M. Optimization of peptide synthesis time and sustainability using novel eco-friendly binary solvent systems with induction heating on an automated peptide synthesizer. **Journal of**

Peptide Science, v. 30, n. 9, p. e3605, 2024. ISSN 1075-2617. Available at: <https://doi.org/10.1002/psc.3605>.

PALLADINO, P.; STETSENKO, D. A. New TFA-Free Cleavage and Final Deprotection in Fmoc Solid-Phase Peptide Synthesis: Dilute HCl in Fluoro Alcohol. **Organic Letters**, v. 14, n. 24, p. 6346-6349, 2012. ISSN 1523-7060. Available at: <https://doi.org/10.1021/ol303124r>.

PERSONNE, H.; SIRIWARDENA, T. N.; JAVOR, S.; REYMOND, J-L. Dipropylamine for 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) Deprotection with Reduced Aspartimide Formation in Solid-Phase Peptide Synthesis. **ACS Omega**, v. 8, n. 5, p. 5050-5056, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07861>.

PESSA, J. E.; NGUYEN, H.; JOHN, G. B.; SCHERER, P. E. The Anatomical Basis for Wrinkles. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 34, n. 2, p. 227-234, 2014. ISSN 1090-820X. Available at: <https://doi.org/10.1177/1090820X13517896>.

PETROPAVLOVSKAYA, M. V.; PALKEEVA, M. E.; MOLOKOEDOV, A. S.; OVCHINNIKOV, M. V.; SIDOROVA, M. V. Comparative Evaluation of Alternative Deblocking Agents to Piperidine for Solid-Phase Synthesis of Peptides. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 58, n. 3, p. 496-501, 2024. ISSN 1573-9031. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11094-024-03169-z>.

PINTEA, A.; MANEA, A.; PINTEA, C.; VLAD, R-A.; BÎRSAN, M.; ANTONOAEA, P.; RÉDAI, E. M.; CIURBA, A. **Peptides: Emerging Candidates for the Prevention and Treatment of Skin Senescence: A Review**. *Biomolecules*. 15 2025.

POCHI, P. E.; STRAUSS, J. S. Sebaceous gland response in man to the administration of testosterone, delta-4-androstenedione, and dehydroisoandrosterone. **J Invest Dermatol**, v. 52, p. 32-36, 1969.

PROKOPOWICZ, M.; RÓŻYCKI, K. M. Innovation in cosmetics. **World Scientific News**, n. 72, p. 448-456, 2017. ISSN 2392-2192.

PŘIBYLKA, A.; KRCHŇÁK, V.; SCHÜTZNEROVÁ, E. Environmentally friendly SPPS I. Application of NaOH in 2-MeTHF/methanol for Fmoc removal. **Green Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 775-779, 2019. ISSN 1463-9262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/C8GC03778G>.

PŘIBYLKA, A. PASTOREK, M.; GREPL, M.; SCHÜTZNEROVÁ, E. P. The application of anisole in greener solid-phase peptide synthesis protocols – Compatibility with green bases in Fmoc removal and new green binary mixture for coupling. **Tetrahedron**, v. 99, p. 132452, 2021. ISSN 0040-4020. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402021007249>.

RHO, N-K.; GIL, Y-C. Botulinum Neurotoxin Type A in the Treatment of Facial Seborrhea and Acne: Evidence and a Proposed Mechanism. **Toxins**, v. 13 2021.

RIBEIRO, S. C. F.; SCHREIER, S.; NAKAIE, C. R.; CILLI, E. M. Effect of temperature on peptide chain aggregation: an EPR study of model peptidyl-resins. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 19, p. 3243-3246, 2001. ISSN 0040-4039. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901004142>.

RIZER, R. L. Oily skin: claim support strategies. *Cosmetics: controlled efficacy studies and regulation*. Springer, 1999. p.81-91.

RODRIGUES, A. R.; ALMEIDA, H.; GOUVEIA, A. M. α -MSH signalling via melanocortin 5 receptor promotes lipolysis and impairs re-esterification in adipocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1831, n. 7, p. 1267-1275, 2013. ISSN 1388-1981. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198113000930>.

RODRÍGUEZ, V.; PINEDA, H.; ARDILA, N.; INSUASTY, D.; CÁRDENAS, K.; ROMÁN, J.; URREA, M.; RAMÍREZ, D.; FIERRO, R.; RIVERA, Z.; GARCÍA, J. Efficient Fmoc Group Removal Using Diluted 4-Methylpiperidine: An Alternative for a Less-Polluting SPPS-Fmoc/tBu Protocol. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 585-587, 2020. ISSN 1573-3904. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09865-9>.

ROSSI, D.; PIERANTOZZI, E.; AMADSUN, D. O.; BUONOCORE, S.; RUBINO, E. M.; SORRENTINO, V. The Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle Cells: A Labyrinth of Membrane Contact Sites. **Biomolecules**, v. 12, 2022.

ROSTKOWSKA, E.; POLESZAK, E.; WOJCIECHOWSKA, K.; SZEWCYK, K. S. Dermatological Management of Aged Skin. **Cosmetics**, V. 10, 2023.

SAKUMA, T. H.; MAIBACH, H. I. Oily Skin: An Overview. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 25, n. 5, p. 227-235, 2012. ISSN 1660-5527. Available at: <https://doi.org/10.1159/000338978>.

SATRIYASA, B. K. Botulinum toxin (Botox) A for reducing the appearance of facial wrinkles: a literature review of clinical use and pharmacological aspect. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 12, n. null, p. 223-228, 2019. ISSN null. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.2147/CCID.S202919>.

SCHAUB, T. Efficient Industrial Organic Synthesis and the Principles of Green Chemistry. **Chemistry – A European Journal**, v. 27, n. 6, p. 1865-1869, 2021. ISSN 0947-6539. Available at: <https://doi.org/10.1002/chem.202003544>.

SEGOT-CHICQ, E.; COMPAN-ZAOUATI, D.; WOLKENSTEIN, P.; CONSOLI, S.; RODARY, C.; DELVIGNE, V.; GUILLOU, V.; POLI, F. Development and validation of a questionnaire to evaluate how a cosmetic product for oily skin is able to improve well-being in women. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 9, p. 1181-1186, 2007. ISSN 0926-9959. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02193.x>.

SEIFFERT, K.; SELTMANN, H.; FRITSCH, M.; ZOUBOULIS, C. C. Inhibition of 5 α -Reductase Activity in SZ95 Sebocytes and HaCaT Keratinocytes In Vitro. **Horm Metab Res**, v. 39, n. 02, p. 141-148, 2007. ISSN 0018-5043/1439-4286. Available at: <http://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-961814>.

SHANBHAG, S.; NAYAK, A.; NARAYAN, R.; NAYAK, U. Y. Anti-aging and Sunscreens: Paradigm Shift in Cosmetics. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 9, n. 3, p. 348, 2019.

SHERWOOD, J.; ALBERICIO, F.; DE LA TORRE, B. G. N,N-Dimethyl Formamide European Restriction Demands Solvent Substitution in Research and Development. **ChemSusChem**, v. 17, n. 8, p. e202301639, ISSN 1864-5631. Available at: <https://doi.org/10.1002/cssc.202301639>.

SHI, V. Y.; LEO, M.; HASSOUN, L.; CHAHAL, D. S.; MAIBACH, H. I.; SIVAMANI, R. K. Role of sebaceous glands in inflammatory dermatoses. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 5, p. 856-863, 2015. ISSN 0190-9622. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962215020162>.

SINGH, P.; BHAT, S. S.; SINGH, N.; VENKANNA, B. U.; MOHAMED, R.; RAO, R. P. Cell-Based Model Systems for Validation of Various Efficacy-Based Claims for Cosmetic Ingredients. **Cosmetics**, v. 9, n. 5, p. 107, 2022.

SIQUEIRA ANDRADE, S.; FARIA, A. V. S.; SOUSA, A. A.; FERREIRA, R. S.; CAMARGO, N. S.; RODRIGUES, M. C.; LONGO, J. P. F. Hurdles in translating science from lab to market in delivery systems for Cosmetics: An industrial perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 205, p. 115156, 2024. ISSN 0169-409X. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X23004714>.

SQUIRE, J. Special Issue: The Actin-Myosin Interaction in Muscle: Background and Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5715, 2019.

STINI, N. A.; GKIZIS, P. L.; KOKOTOS, C. G. Cyrene: a bio-based novel and sustainable solvent for organic synthesis. **Green Chemistry**, v. 24, n. 17, p. 6435-6449, 2022. ISSN 1463-9262. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/D2GC02332F>.

SUBIRÓS-FUNOSAS, R.; PROHENS, R.; BARBAS, R.; EL-FAHAM, A.; ALBERICIO, F. Oxyma: An Efficient Additive for Peptide Synthesis to Replace the Benzotriazole-Based HOBt and HOAt with a Lower Risk of Explosion^[1]. **Chemistry – A European Journal**, v. 15, n. 37, p. 9394-9403, 2009. ISSN 0947-6539. Available at: <https://doi.org/10.1002/chem.200900614>.

SZÖLLÖSI, A. G.; OLÁH, A.; BÍRÓ, T.; TÓTH, B. I. Recent advances in the endocrinology of the sebaceous gland. **Dermato-Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. e1361576, 2017. ISSN null. Available at: <https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1361576>.

TANG, X.; LEI, L.; LIAO, A.; SUN, W.; ZHANG, J.; WU, J. Morpholine Derivatives in Agrochemical Discovery and Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 36, p. 13197-13208, 2023. ISSN 0021-8561. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c03818>.

THODY, A. J.; COOPER, M. F.; BOWDEN, P. E.; MEDDIS, D.; SHUSTER, S. Effect Of A-Melanocyte-Stimulating Hormone and Testosterone on Cutaneous And Modified Sebaceous Glands In The Rat. **Journal of Endocrinology**, v. 71, n. 3, p. 279-288, 01 Jan. 1976 1976. Available at: https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/71/3/joe_71_3_001.xml.

TÓTH, B. I.; OLÁH, A.; SZÖLLŐSI, CZIFRA, G. BÍRÓ, T. “Sebocytes’ makeup” - Novel mechanisms and concepts in the physiology of the human sebaceous glands. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 461, n. 6, p. 593-606, 2011. ISSN 1432-2013. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0941-6>.

VALENTE DUARTE DE SOUSA, I. C. Novel pharmacological approaches for the treatment of acne vulgaris. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 23, n. 10, p. 1389-1410, 2014. ISSN 1354-3784. Available at: <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.923401>.

VARANDA, L. M.; MIRANDA, M. T. M. Solid-phase peptide synthesis at elevated temperatures: a search for an optimized synthesis condition of unsulfated cholecystokinin-12. **The Journal of Peptide Research**, v. 50, n. 2, p. 102-108, 1997. ISSN 1397-002X. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1997.tb01175.x>.

VEIGA, E.; FERREIRA, L.; CORREIA, M.; PIRES, P. C.; HAMEED, H.; ARAÚJO, A. R. T. S.; CEFALI, L. C.; MAZZOLA, P. G.; HAMISHEHAKAR, H.; VEIGA, F.; PAIVA-SANTOS, A. C. Anti-aging peptides for advanced skincare: Focus on nanodelivery systems. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 89, p. 105087, 2023. ISSN 1773-2247. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773224723009395>.

VIVENZIO, G.; SCALA, M. C.; MARINO, P.; MANFRA, M.; CAMPIGLIA, P.; SALA, M. Dipropylene glycol Dimethylether, New Green Solvent for Solid-Phase Peptide Synthesis: Further Challenges to Improve Sustainability in the Development of Therapeutic Peptides. **Pharmaceutics**. v. 15, n. 6, p. 1773, 2023.

VÁZQUEZ-SALAZAR, A.; TAN, g.; STOCKTON, A.; FANI, R.; BECERRA, A.; LAZCANO, A. Can an Imidazole Be Formed from an Alanine-Serine-Glycine Tripeptide under Possible Prebiotic Conditions? **Origins of Life and Evolution of Biospheres**, v. 47, n. 3, p. 345-354, 2017. ISSN 1573-0875. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11084-016-9525-y>.

WAGH, A. S.; PAWAR, H. S. An Efficient Heterogeneous Acid Catalyst DICAT-1 for One-Pot Conversion of Sucrose into 5-(Hydroxymethyl)furfural. **Energy & Fuels**, v. 34, n. 8, p. 9643-9653, 2020. ISSN 0887-0624. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.0c01374>.

WANG, J.; DING, X.; LAN, Z.; LIU, G.; HOU, S.; HOU, S. Imidazole Compounds: Synthesis, Characterization and Application in Optical Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 897-922, 2024. ISSN 1040-8347. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408347.2021.2023459>.

WANG, L.; LI, J.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; GAO, R. Recombinant human collagen digestates exhibit higher protective effect on UVA-damaged skin fibroblasts than animal-derived collagens. **Journal of Functional Foods**, v. 113, p. 106035, 2024. ISSN 1756-4646. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464624000379>.

WEGNER, K.; BARNES, D.; MANZOR, K.; JARDINE, A.; MORAN, D. Evaluation of greener solvents for solid-phase peptide synthesis. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 14, n. 1, p. 153-164, 2021. ISSN 1751-8253. Available at: <https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1877363>.

WEHRSTEDT, K. D.; WANDREY, P. A.; HEITKAMP, D. Explosive properties of 1-hydroxybenzotriazoles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 126, n. 1, p. 1-7, 2005. ISSN 0304-3894. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389405003080>.

WRIGHT, G.; LAX, A.; MEHTA, S. B. A review of the longevity of effect of botulinum toxin in wrinkle treatments. **British Dental Journal**, v. 224, n. 4, p. 255-260, 2018. ISSN 1476-5373. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.126>.

WU, Y.; NIU, Y.; ZHONG, S.; LIU, H.; ZHEN, Y.; SAINT-LEGER, D.; VERSCHOORE, M. A preliminary investigation of the impact of oily skin on quality of life and concordance of self-perceived skin oiliness and skin surface lipids (sebum). **International Journal of Cosmetic Science**, v. 35, n. 5, p. 442-447, 2013. ISSN 0142-5463. Available at: <https://doi.org/10.1111/ics.12063>.

XU, Y.; GUAN, X.; ZHOU, R.; GONG, R. Melanocortin 5 receptor signaling pathway in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 19, p. 3831-3840, 2020. ISSN 1420-9071. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03511-0>.

YANG, J.; HUANG, H.; ZHAO, J. Active ester-based peptide bond formation and its application in peptide synthesis. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 10, n. 7, p. 1817-1846, 2023. Available at: <http://dx.doi.org/10.1039/D2QO01686A>.

ZHANG, L.; FALLA, T. J. Cosmeceuticals and peptides. **Clinics in Dermatology**, v. 27, n. 5, p. 485-494, 2009. ISSN 0738-081X. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X0900128X>.

ZHANG, L.; LI, W.-H.; ANTHONAVAGE, M.; PAPPAS, A.; ROSSETTI, D.; CAVENDER, D.; SEIBERG, M.; EISINGER, M. Melanocortin-5 receptor and sebogenesis. **European Journal of Pharmacology**, v. 660, n. 1, p. 202-206, 2011. ISSN 0014-2999. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299910012628> >.

ZHAO, X.; ZHANG, X.; LIU, D. Collagen peptides and the related synthetic peptides: A review on improving skin health. **Journal of Functional Foods**, v. 86, p. 104680, 2021. ISSN 1756-4646. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464621003297>.

ZHOU, W.; WANG, P. G.; KRYNITSKY, A. J.; RADER, J. I. Rapid and simultaneous determination of hexapeptides (Ac-EEMQRR-amide and H₂N-EEMQRR-amide) in anti-wrinkle cosmetics by hydrophilic interaction liquid chromatography–solid phase extraction preparation and hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 44, p. 7956-7963, 2011. ISSN 0021-9673. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967311013215>.