

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS LÍQUIDO CRISTALINOS  
CONTENDO AC-WAhx-KTTKS PARA O TRATAMENTO DO  
ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

Danila Aparecida Scatolin Guglielmi

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leila Aparecida Chiavacci

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

ARARAQUARA - SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS LÍQUIDO CRISTALINOS  
CONTENDO AC-WAhx-KTTKS PARA O TRATAMENTO DO  
ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

Danila Aparecida Scatolin Guglielmi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leila Aparecida Chiavacci

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

ARARAQUARA - SP

2013

## **Ficha Catalográfica**

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

Guglielmi, Danila Aparecida Scatolin  
G942d Desenvolvimento de sistemas líquido cristalinos contendo Ac-WAhx-KTTKS para o tratamento do envelhecimento cutâneo / Danila Aparecida Scatolin Guglielmi. – Araraquara, 2013  
129 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Leila Aparecida Chiavacci

1. Sistemas líquido cristalinos. 2. Liberação prolongada. 3. Peptídeo. 4. KTTKS. 5. Biossíntese de colágeno. 6. Permeação e retenção cutânea. I. Chiavacci, Leila Aparecida, orient. II. Título.

**CAPES: 40300005**

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho à Deus,  
que me deu vida, saúde e coragem para caminhar  
a cada dia em busca dos meus objetivos  
e colocou em minha vida pessoas especiais.*

*Dedico também a meu marido, Victor,  
que sempre esteve pronto a me apoiar,  
oferecendo-me carinho, força e consolo.  
Muito obrigado por estar sempre presente!*

*Também aos meus pais, Antonio Carlos e Ivone,  
e meus irmãos, Kenfer e Bianca,  
pelo amor que sentem por mim,  
todo o apoio que me derem e por toda a minha vida.  
Muito obrigada por tudo!*

*“O homem se torna muitas vezes o que ele próprio acredita que é.  
Se insisto em repetir para mim mesmo que não posso fazer uma determinada coisa,  
é possível que acabe me tornando realmente incapaz de fazê-la.  
Ao contrário, se tenho a convicção de que posso fazê-la,  
certamente adquirirei a capacidade de realizá-la,  
mesmo que não a tenha no começo.”*

*Mahatma Gandhi*



---

## *Agradecimientos*

À **Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci** por toda a orientação neste trabalho, pela confiança depositada e pela amizade e carinho.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli** pela co-orientação, prontidão em ajudar e amizade por todo esse tempo.

Ao **Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa** pelos valiosos ensinamentos e disposição em ajudar sempre.

À **Profa Dra. Vera Lucia Borges Isaac** pelo estágio de aperfeiçoamento profissional e pela amizade desde o início.

À **Profa. Dra. Christiane Soares Piena** por ceder seu laboratório para realização dos ensaios em culturas celulares.

À **Profa. Dra. Sandra Helena Puncinelli** por ceder seu laboratório para realização das medidas reológicas.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudos concedida.

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

Aos **professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas**: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, Profa. Dra. Chung Man Chin, Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa, Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista, Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli e Prof. Dr. Marlus Chorilli por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

À **Profa. Dra. Valéria Valente** e **Profa. Dra. Marilisa Guimarães Lara** por colaborarem para o enriquecimento deste trabalho participando das bancas de qualificação e defesa.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: **Claúdia, Fátima, Eduardo, Joyce, Daniela, Marcia, Margarete, Matheus, Queila, Marcos, Nina e Valéria** por estarem sempre prontos a ajudar.

Ao **Esteban Lorenzon e Eduardo Lentilha** pelos auxílios no equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A todos os amigos que conquistei na Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Nathália, Eloísa, Bruno, Maria Gabriela, Juliana Mendes, Juliana Uruguai, João, Mari, Letícia, Bruna Chiari, Ilza, Daniele, Caroline, Ana Carolina, Gisele, Camila, Ana Paula Oliveira, Ana Paula, Camila, Ana Claudia, Bruna, Mirela, Giovana, Renata, Hilris, Cristina Franzini, Paula Martini e Nathália Ferri.

Obrigada a todos!



---

## *Resumo*

A pele é o único órgão que reflete as mudanças inevitáveis que ocorre no processo de envelhecimento do corpo. Sendo causado principalmente pela exposição à radiação ultravioleta e pelo processo cronológico. O envelhecimento da pele é tipicamente caracterizado pela destruição e baixa produção das fibras de colágeno e perda de gordura subcutânea levando a linhas e rugas faciais. O KTTKS é um peptídeo estimulador da síntese de colágeno (tipos I e III) na pele, muito usado em formulações cosméticas no tratamento do envelhecimento cutâneo, mas devido as suas características físico-químicas, sua penetração na pele não é eficiente. Para melhorar a penetração do KTTKS na pele para atingir a derme e exercer seu efeito estimulador da síntese de colágeno, modificações em sua sequência peptídica podem ser realizadas para melhorar suas características físico-químicas e consequentemente sua disponibilidade. Ingredientes funcionais e inovadores sistemas de liberação estão conduzindo uma nova era de desenvolvimento de produtos. Os sistemas líquido cristalinos transportadores de compostos ativos são promissores sistemas de liberação controlada de ativos. Tendo como objetivo obter sistemas carregados de ativo hidrofílico ou lipofílico, propriedades de liberação, estabilidade do produto final e baixa toxicidade. Estes sistemas de liberação têm como objetivos principais modular a liberação do ativo, auxiliar a penetração do mesmo na pele e, administrar um ingrediente ativo a um ou mais camadas de pele, minimizando envolvimento sistêmico. O objetivo deste trabalho foi sintetizar um análogo do KTTKS, denominado de Ac-WAhx-KTTKS, com o propósito de melhorar suas propriedades físico-químicas, para obter resultados favoráveis em relação a penetração do peptídeo na pele e desenvolver sistemas líquido cristalinos para a incorporação deste ativo. Baseado nos ensaios de citotoxicidade e biossíntese de colágeno pode-se determinar a concentração ideal do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS, para incorporação nas formulações e obter sistemas seguros e eficazes. Foi possível obter sistemas líquido cristalinos para a incorporação do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS que atuaram como sistemas de liberação controlada do mesmo. As formulações F2 e F7 possibilitaram a penetração do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS até o local alvo em quantidade suficiente para promover um aumento na biossíntese de colágeno.



---

## *Abstract*

The skin is the only organ that reflects the inevitable changes that occur in the aging process of the body. Being primarily caused by exposure to ultraviolet radiation and the chronological process. Skin aging is typically characterized by low production and destruction of collagen fibers and loss of subcutaneous fat leading to facial lines and wrinkles. The KTTKS is a peptide that stimulates collagen synthesis (type I and type III) in the skin, commonly used in cosmetic formulations for the treatment of aging skin, but due to their chemical-physical characteristics, its penetration into the skin is inefficient. To improve penetration of the skin to KTTKS reach the dermis and exercise their stimulatory effect of collagen synthesis, changes in its peptide sequence can be performed to improve their physicochemical characteristics and consequently its availability. Functional ingredients and innovative delivery systems are leading a new era of product development. The liquid crystalline systems carriers of active compounds are promising active delivery systems. Have an aim get systems loaded with hydrophilic or lipophilic active, release properties, the product stability and low toxicity. These delivery systems have as main objectives modulate the active release, aid the penetration of the skin and even administer an active ingredient one or more layers of skin, minimizing systemic involvement. The aim this study was to synthesize an analog of KTTKS, named Ac-WAhx-KTTKS, in order to improve its physicochemical properties, to obtain favorable results with its permeation into the skin and develop liquid crystalline systems for incorporation this peptide. Based on cytotoxicity and biosynthesis of collagen assays can determine the optimal concentration of the peptide Ac-WAhx-KTTKS for incorporation into formulations and obtain safe and effective systems. It was possible to obtain liquid crystalline systems for the incorporation of the peptide Ac-WAhx-KTTKS who acted as controlled release systems. The formulations F2 and F7 allowed the penetration of the peptide Ac-WAhx-KTTKS to the target site enough quantity to promote an increase in the collagen biosynthesis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo da hélice tríplice do colágeno .....	12
<b>Figura 2.</b> Modelo que descreve os danos causados pela radiação UV no tecido conjuntivo da pele .....	15
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do KTTKS .....	16
<b>Figura 4.</b> Estrutura da pele .....	19
<b>Figura 5.</b> Estrutura da pele e processos da absorção percutânea e liberação transdérmica .....	20
<b>Figura 6.</b> Representação das fases líquido cristalinas liotrópicas .....	24
<b>Figura 7.</b> Estrutura molecular do miristato de isopropila .....	29
<b>Figura 8.</b> Estrutura do ácido aminocapróico .....	33
<b>Figura 9.</b> Estrutura do Triptofano .....	34
<b>Figura 10.</b> Estrutura molecular do peptídeo análogo Ac-WAhx-KTTKS .....	34
<b>Figura 11.</b> Protocolo geral de síntese .....	38
<b>Figura 12.</b> Construção do diagrama de fases ternário .....	45
<b>Figura 13.</b> Célula de Franz modificada (modificado de <a href="http://www.hansonresearch.com">www.hansonresearch.com</a> ) ..	53
<b>Figura 14.</b> Pele da orelha de porco dermatomizada .....	56
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico do peptídeo bruto .....	59
<b>Figura 16.</b> Perfil cromatográfico do peptídeo puro (100% de pureza) .....	60
<b>Figura 17.</b> Espectro de massas do peptídeo puro .....	61
<b>Figura 18.</b> Curva dose-resposta para o tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de peptídeo .....	62

<b>Figura 19.</b> Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de peptídeo .....	62
<b>Figura 20.</b> Curva analítica padrão do colágeno tipo I humano, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) .....	64
<b>Figura 21.</b> Representação da concentração de colágeno total produzido pelos HDFa dos grupos controle e tratados com peptídeo após 24 horas de cultura .....	65
<b>Figura 22.</b> Representação da concentração de colágeno total produzido pelos HDFa dos grupos controle e tratados com peptídeo após 48 horas de cultura .....	66
<b>Figura 23.</b> Diagrama de fases ternário contendo Oleth 10 (tensoativo), Isopropyl Myristate (fase oleosa) e água (fase aquosa) .....	69
<b>Figura 24.</b> Fotomicrografias de MLP da formulação F2 (10% Isopropyl Myristate, 70% Oleth 10 e 20% água), sendo F2P contendo peptídeo .....	73
<b>Figura 25.</b> Fotomicrografias de MLP da formulação F7 (10% Isopropyl Myristate, 50% Oleth 10 e 40% água), sendo F7P contendo peptídeo .....	73
<b>Figura 26.</b> Fotomicrografias de MLP da formulação <b>EM</b> (emulsão O/A), sendo <b>EMP</b> contendo peptídeo .....	74
<b>Figura 27.</b> Espectros de SAXS das formulações <b>F2</b> , <b>F7</b> e <b>EM</b> , sendo que a formulação com a letra <b>P</b> contém o peptídeo .....	76
<b>Figura 28.</b> Curvas de fluxo das formulações F2, F7 e EM, sendo que a formulação com a letra <b>P</b> contém o peptídeo .....	79
<b>Figura 29.</b> Cromatograma da solução do peptídeo (1,5461 $\mu\text{mol/L}$ ) diluído em fase móvel .....	82
<b>Figura 30.</b> Cromatograma da solução placebo da formulação EM .....	83
<b>Figura 31.</b> Cromatograma da solução placebo da formulação F2 .....	83

<b>Figura 32.</b> Curva analítica 1 do peptídeo em fase móvel, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) .....	84
<b>Figura 33.</b> Curva analítica 2 do peptídeo em fase móvel, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) .....	85
<b>Figura 34.</b> Curva analítica 3 do peptídeo em fase móvel, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) .....	85
<b>Figura 35.</b> Média das curvas analíticas do peptídeo em fase móvel, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) .....	86
<b>Figura 36.</b> Curva analítica do peptídeo em solução receptora, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) .....	92
<b>Figura 37.</b> Curva analítica do peptídeo em acetonitrila/água (1:1), equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) .....	92
<b>Figura 38.</b> Cromatograma da solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) .....	94
<b>Figura 39.</b> Cromatograma do peptídeo em solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) .....	94
<b>Figura 40.</b> Perfil de liberação das formulações F2, F7 e EM contendo peptídeo .....	98
<b>Figura 41.</b> Modelos de cinética de liberação das formulações F2 e F7 contendo peptídeo .....	100
<b>Figura 42.</b> Modelo de cinética de liberação da formulação EM contendo peptídeo ..	101
<b>Figura 43.</b> Retenção cutânea do peptídeo nas formulações F2, F7 e EM no estrato córneo e epiderme/derme ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ) após 12 horas de ensaio .....	104

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições cromatográficas empregadas na purificação do peptídeo sintetizado .....	40
<b>Tabela 2.</b> Composição da emulsão .....	46
<b>Tabela 3.</b> Resultado da síntese .....	61
<b>Tabela 4.</b> Valores de IC <sub>50</sub> (μmol/L) para as células HepG2 e HaCat tratadas com o peptídeo .....	63
<b>Tabela 5.</b> Concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 24 de tratamento .....	64
<b>Tabela 6.</b> Concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 48 de tratamento .....	66
<b>Tabela 7.</b> Composição (%) dos sistemas líquido cristalinos para caracterização .....	71
<b>Tabela 8.</b> As distâncias de correlação determinadas pelo ensaio de SAXS das formulações F2, F7 e EM, sendo que a amostra com a letra <b>P</b> contém peptídeo .....	76
<b>Tabela 9.</b> Área de histerese das formulações F2, F7 e EM, sendo que a formulação com a letra <b>P</b> contém o peptídeo .....	80
<b>Tabela 10.</b> Média dos parâmetros que descrevem as formulações F2, F7 e EM, de acordo com o modelo reológico de Herschel-Bulkley .....	81
<b>Tabela 11.</b> Avaliação da repetibilidade do método analítico de quantificação do peptídeo .....	87
<b>Tabela 12.</b> Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do peptídeo .....	88
<b>Tabela 13.</b> Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do peptídeo .....	89

<b>Tabela 14.</b> Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do peptídeo..	90
<b>Tabela 15.</b> Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do peptídeo..	91
<b>Tabela 16.</b> Liberação do peptídeo da formulação F2 .....	96
<b>Tabela 17.</b> Liberação do peptídeo da formulação F7 .....	96
<b>Tabela 18.</b> Liberação do peptídeo da formulação EM .....	97
<b>Tabela 19.</b> Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) das formulações F2, F7 e EM dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi .....	99
<b>Tabela 20.</b> Retenção cutânea do peptídeo nas formulações após 12 horas de experimento ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ) .....	103

## SUMÁRIO

Introdução.....	3
Revisão Bibliográfica.....	8
Matriz extracelular.....	9
Envelhecimento cutâneo.....	11
Peptídeo KTTKS.....	15
Via cutânea.....	17
Sistemas líquido cristalinos e liberação controlada de ativos.....	21
Composição dos sistemas.....	26
Objetivos gerais.....	30
Objetivos específicos.....	30
Material e Métodos.....	34
Material e reagentes.....	35
Métodos.....	36
1. Síntese do peptídeo.....	36
2. Avaliação do potencial citotóxico do peptídeo.....	40
3. Biossíntese de colágeno.....	42
4. Desenvolvimento dos sistemas coloidais.....	43
5. Caracterização físico-química dos sistemas coloidais.....	45
5.1 Determinação do pH.....	46
5.2 Microscopia de luz polarizada (MLP).....	46
5.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).....	46
5.4 Reologia.....	47
6. Validação de metodologia analítica para quantificação do Ac-WAhx-KTTKS.....	47
6.1 Especificidade ou seletividade.....	48
6.2 Linearidade.....	48
6.3 Precisão.....	48
6.4 Exatidão.....	49
6.5 Limite de detecção.....	50
6.6 Limite de quantificação.....	50
6.7 Robustez.....	51
6.8 Curva analítica em solventes diferentes.....	51
7. Liberação do peptídeo, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> .....	51

7.1	Avaliação da cinética de liberação <i>in vitro</i> do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações.....	52
7.2	Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i> do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações.....	54
7.3	Avaliação da retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações.....	55
1.	Síntese do peptídeo.....	58
2.	Avaliação do potencial citotóxico do peptídeo.....	60
3.	Biossíntese de colágeno.....	62
4.	Desenvolvimento dos sistemas coloidais.....	67
5.	Caracterização físico-química dos sistemas coloidais.....	70
5.1	Determinação do pH.....	70
5.2	Microscopia de luz polarizada (MLP).....	71
5.3	Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS).....	74
5.4	Reologia.....	77
6.	Validação de metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	80
6.1	Especificidade e seletividade.....	80
6.2	Linearidade.....	83
6.3	Precisão.....	85
6.4	Limite de detecção.....	87
6.5	Limite de quantificação.....	88
6.6	Exatidão.....	88
6.7	Robustez.....	89
6.8	Curva analítica com solventes diferentes.....	90
7.	Liberação do peptídeo, permeação e retenção cutânea <i>in vitro</i> .....	91
7.1	Análise de interferentes.....	92
7.2	Avaliação da cinética de liberação do peptídeo <i>in vitro</i> .....	94
7.3	Avaliação da permeação cutânea <i>in vitro</i> do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações.....	101
7.4	Avaliação da retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações.....	102
	Conclusões.....	105
	Referências.....	105



---

## *Introdução*

Atualmente os consumidores estão cada vez mais preocupados com a sua saúde, bem-estar e aparência e para isto procuram produtos inovadores que possam fornecer benefícios com mínimos esforços. Seguindo estas propensões, pesquisadores se empenham para desenvolver produtos altamente diferenciados para obter resultados perceptíveis ao consumidor e para aperfeiçoar os atributos sensoriais (Patravale and Mandawgade, 2008). A concepção de novos sistemas que aumenta a eficácia de compostos ativos já existentes é uma das novas tendências observadas em tecnologia farmacêutica e cosmética nos últimos anos (Nesseem, 2001). Neste contexto, os sistemas líquidos cristalinos (SLC) têm despertado grande interesse como sistemas de liberação de compostos ativos. Os SLC podem modificar a velocidade de liberação do composto ativo, oferecer benefícios como o aumento da solubilidade e penetração na pele. Devido à versatilidade estrutural dos SLC, o que corresponde aos domínios hidrofílicos e lipofílicos, permite a incorporação de substâncias ativas, independentemente da sua solubilidade. De fato, os SLC podem promover uma resposta apropriada por um longo período de tempo, melhorar a eficiência e reduzir os efeitos colaterais do composto ativo (Yariv et al., 2010, Chorilli et al., 2011).

A pele é o órgão que mais reflete as mudanças inevitáveis que ocorrem no processo de envelhecimento do corpo. Estas mudanças refletem de forma bastante impactante sobre a vida social dos seres humanos, especialmente os fatores ligados à autoestima e a qualidade de vida. Com o passar do tempo ocorre na pele o envelhecimento geneticamente programado, denominado de envelhecimento cronológico. Além disso, a pele está em contato direto com o meio ambiente e, portanto, é submetida ao envelhecimento através da ação de diversos fatores ambientais (McCullough and Kelly, 2006). A radiação ultravioleta (UV) do sol é o principal fator ambiental responsável pelo envelhecimento da pele, chamado de fotoenvelhecimento. O

fotoenvelhecimento, bem como o envelhecimento cronológico, é um processo cumulativo. Durante a última década, houve um progresso na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares relacionado ao envelhecimento cronológico e fotoenvelhecimento, proporcionando oportunidades para o desenvolvimento de novas terapias anti-envelhecimento (Fisher et al., 2002, Draelos, 2007, Bermann, 2007).

A possibilidade de minimizar os efeitos do envelhecimento na pele representa um extenso campo para pesquisa e apresenta um grande potencial para inovações no setor cosmético. Nos últimos anos, este setor tem apresentado ao mercado numerosos produtos e compostos ativos com o intuito de proporcionar ao consumidor resultados eficazes no tratamento do envelhecimento da pele (Abu Samah and Heard, 2011, Draelos, 2007, Bermann, 2007).

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

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

derme e exercer seu efeito estimulador da síntese de colágeno, modificações em sua sequência peptídica foram realizadas para melhorar suas características físico-químicas e conseqüentemente sua disponibilidade (Abu Samah and Heard, 2011).

Katayama e colaboradores sintetizaram 12 seqüências diferentes baseada na seqüência básica KTTKS e estudaram seus efeitos na síntese de colágeno em várias células mesenquimais por ensaio de cultura *in vitro*, e observaram que a seqüência básica é a seqüência mínima necessária para estimulação da produção de colágeno e fibronectina em células mesenquimais. Assim, quando foi retirado ou substituído algum aminoácido deste seqüência básica, sua atividade foi perdida ou muito diminuída.

Os peptídeos geralmente apresentam características físico-químicas que tornam seu uso inadequado, como a susceptibilidade à degradação proteolítica (por metabolismo hepático de primeira passagem), sensibilidade à condição de pH extremo (estômago) e risco de induzir uma resposta imune. A aplicação tópica oferece aparentemente uma proteção aos problemas acima, sendo uma rota mais direta para o local de ação, e a liberação suficiente do composto na área-alvo. Além disso, maior biodisponibilidade poderia ser alcançada devido à redução de metabolismo. No entanto, existem várias questões a considerar no uso de peptídeos como compostos ativos em formulações tópicas, em particular a sua penetração passiva e potencial de penetração através da pele. O principal obstáculo que os peptídeos enfrentam na liberação transcutânea é a anatomia da pele, sendo o estrato córneo uma barreira lipídica para a absorção de ativos na pele.

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

indesejadas que impedem sua eficácia. (Lupo and Cole, 2007, Abu Samah and Heard, 2011).

Na tentativa de promover um aumento da penetração do peptídeo KTTKS na pele, pesquisadores fizeram modificações na sua sequência peptídica, tais como a ligação de um ácido palmítico ao KTTKS (Palmitoil-KTTKS) e a ligação de um ácido ascórbico ao KTTKS (pentapeptídeo ascorbil estabilizado). Mas nenhum dado foi relacionado à penetração destes derivados na pele (Abu Samah and Heard, 2011, Robinson et al., 2005). Este fato pode ser devido à baixa concentração de uso, tornando-se difícil obter um método adequado para a quantificação do peptídeo (Abu Samah and Heard, 2011).

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



---

## *Revisão Bibliográfica*

## **Matriz extracelular**

Os tecidos são constituídos por células e macromoléculas localizadas no *espaço extracelular*, que formam uma intrincada rede constituindo a matriz extracelular (MEC). Essa MEC é composta por várias proteínas e polissacarídeos que são secretados localmente e reunidos em uma rede organizada e em estreita associação com a superfície das células que os produzem (Carlson and Longaker, 2004, Alberts et al., 2004).

Em nossos corpos, a forma mais abundante de MEC é encontrada em tecido conectivo volumoso como os ossos, o tendão e a camada dérmica da pele. As células do tecido conectivo estão embebidas em uma MEC complexa que não somente serve para a sustentação passiva, mas também desempenha um papel ativo na regulação do comportamento das células que fazem contato, influenciando o desenvolvimento, a migração, a proliferação, a forma e a função (Alberts et al., 2004, Carlson and Longaker, 2004).

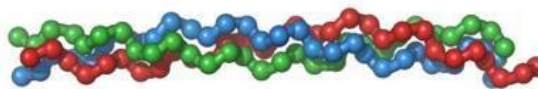
A MEC é formada pelas duas principais classes de macromoléculas da lamina basal: (1) as cadeias de polissacarídeos de glicosaminoglicanos, as quais estão, normalmente, covalentemente ligadas a proteínas na forma de proteoglicanos, e (2) as proteínas fibrosas como, elastina, fibronectina, laminina e colágeno.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

com a matriz e a laminina, atua como um organizador primário da estrutura das camadas (Alberts et al., 2004).

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

Os colágenos são as principais proteínas da MEC. Essas proteínas fibrosas são produzidas e secretadas por fibroblastos do tecido conectivo e por uma variedade de outros tipos celulares. A principal característica de uma molécula de colágeno típica é a estrutura longa e rígida de sua fita tripla helicoidal, na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, denominadas *cadeias  $\alpha$* , são enroladas umas nas outras formando um tipo de corda supertorcida, como mostrado na Figura 1. Os colágenos são ricos em prolina e glicina, importantes na formação da fita tripla helicoidal. Na pele, os colágenos estão localizados na derme, eles respondem por sua maior parte, sendo responsável por 70% do peso e pela maior parte da função da derme. O colágeno tipo I é o mais comum, representando 80% do colágeno presente na derme, formando a rede reticular na região profunda da derme e existe também, o colágeno tipo III, representando 15% do

colágeno da derme, localizado na membrana basal, servindo para fixar a epiderme à derme (Chung et al., 2001).



**Figura 1.** Modelo da hélice tríplice do colágeno. Os três filamentos são mostrados em cores diferentes.

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

## **Envelhecimento cutâneo**

O envelhecimento é um processo biológico complexo, contínuo que se caracteriza por alterações celulares e moleculares, com diminuição progressiva da capacidade de homeostase do organismo, levando à senescência e morte celular programada (apoptose). Nos últimos 40 anos ocorreram muitos progressos na compreensão dos mecanismos do envelhecimento. Existem evidências de que são influenciados pelo dano causado ao DNA por agressões internas e externas (Bagatin, 2009).

O envelhecimento da pele pode ser classificado em envelhecimento intrínseco e extrínseco. O envelhecimento intrínseco, ou cronológico, é devido às senescências geneticamente controladas, e também devido às espécies reativas de oxigênio formadas intracelularmente como consequência do próprio metabolismo celular. Neste processo o envelhecimento é inevitável e aparentemente não está susceptível às alterações comportamentais do indivíduo. Já o envelhecimento extrínseco é influenciado por

fatores originados externamente, sendo um processo cumulativo de degeneração induzida por anos de exposição a cofatores ambientais, como o fumo e o sol.

As alterações observadas na epiderme são principalmente, o retardamento da divisão celular, gerando o afinamento da epiderme e da derme; a desorganização da camada córnea, que leva a uma desidratação superficial; a formação de rugas com o espessamento da pele e frouxidão tegumentar; o aparecimento de manchas, causado por alterações na síntese de melanina; a debilitação das defesas da pele devido à rarefação das células de Langerhans; e, em alguns casos, a multiplicação celular anárquica, levando ao aparecimento de tumores (Gilchrest, 2008).

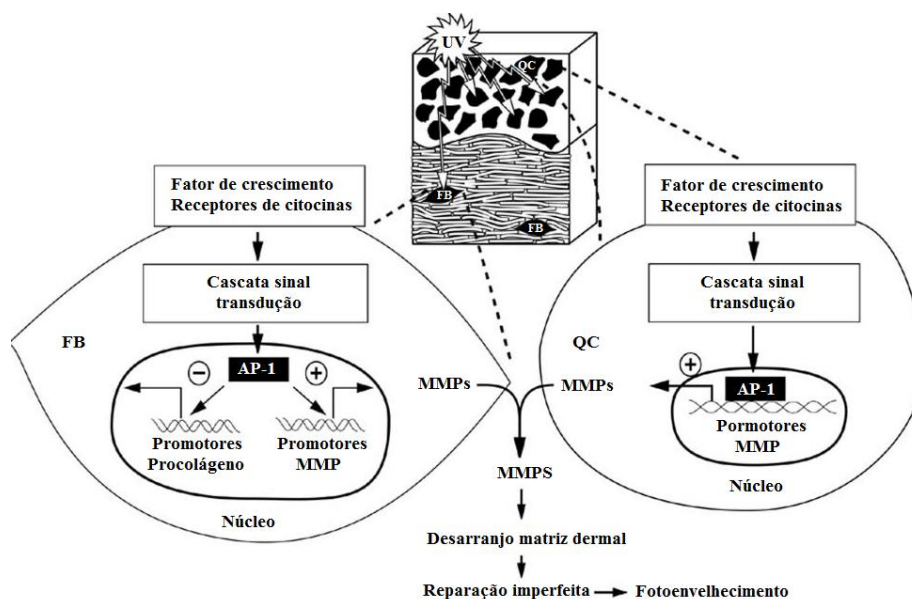
O envelhecimento cutâneo precoce causado pelo sol, conhecido como fotoenvelhecimento, é devido à radiação ultravioleta que este emite. A radiação ultravioleta, além de causar o bronzeamento na pele, pode causar reações patológicas quando a pele é exposta demasiadamente à luz solar (Bermann, 2007, Draelos, 2007).

A radiação solar excessiva pode causar reações inflamatórias; ruptura da membrana lisossomal, com liberação de enzimas destrutivas como as elastases fibroblásticas; e modificações sobre o DNA celular, que pode ter consequências sobre a divisão celular e síntese de proteínas. Todos estes impactos podem acarretar a aceleração do envelhecimento cutâneo (Hernandez and Mercier-Fresnel, 1999). O fotoenvelhecimento acredita-se ser responsável por aproximadamente 80% das alterações da pele atribuídos ao processo de envelhecimento (Bermann, 2007, Draelos, 2007)

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

isso, há perda da capacidade de retração e do poder tensor da pele. A exposição repetida ao sol causa dano dérmico acumulativo que resulta nas rugas características da pele fotoenvelhecida. Clinicamente a pele com envelhecimento intrínseco apresenta-se pálida e com rugas finas, diminuição da elasticidade, maior fragilidade epidérmica, ressecamento e diminuição da capacidade de cicatrização de feridas. A pele com envelhecimento extrínseco apresenta enrugamento grosseiro com perda da elasticidade, alterações na textura e pigmentação, ceratoses actínicas, telangiectasias e aspecto amarelado (Fisher et al., 2002, Hirata et al., 2004).

Os processos moleculares envolvidos no fotoenvelhecimento, derivam da capacidade da radiação UV para deserregular o mecanismo celular que regula as respostas das células à estímulos extracelulares fisiológicos e ambientais. Este processo celular defeituoso que danifica o tecido conjuntivo da pele é iniciado pela geração fotoquímica de radicais livres (Fisher et al., 2002). A figura 2 mostra esquematicamente os danos da radiação UV no tecido conjuntivo da pele.



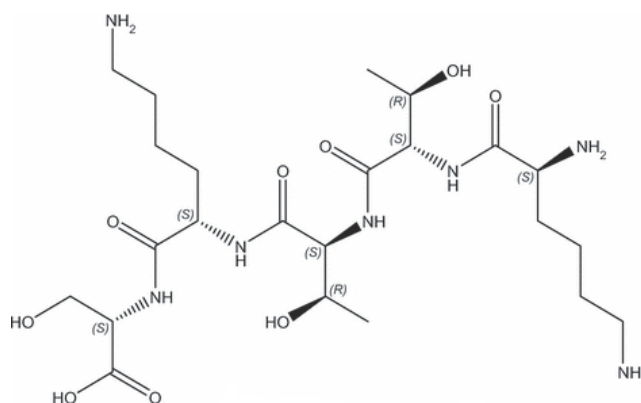
**Figura 2.** Modelo que descreve os danos causados pela radiação UV no tecido conjuntivo da pele. A radiação UV o fator de crescimento e receptores de citocinas na superfície dos queratinócitos (QC) e fibroblastos (FB). Os receptores ativados estimulam a cascata de transdução de sinais que induzem o fator de transcrição (AP-1), o qual estimula os genes de metaloproteinase da matriz (MMP). Nos fibroblastos, o AP-1 inibe também a expressão do gene do procolágeno. As MMPs são secretadas a partir dos fibroblastos e queratinócitos e quebram colágenos e outras proteínas que compõem a matriz extracelular dérmica. A reparação imperfeita do dano dérmico compromete a integridade funcional e estrutural da matriz extracelular. A exposição solar repetida provoca o acúmulo de dano dérmico que, eventualmente, resulta na característica enrugada da pele foto danificada. Adaptado de (Fisher et al., 2002).

O processo de diminuição da síntese de colágeno e aumento da sua degradação causado pela radiação UV, produz microcicatrices, que ao longo da vida tornam-se macroferidas visíveis na pele, como as rugas. De fato, a produção de colágeno volta completamente ao normal dentro de dois dias após a suspensão da exposição solar. Para evitar esse processo de depleção celular, a pele possui seu próprio mecanismo de defesa tais como: enzimas, vitaminas e agentes quelantes de íons metálicos. Entretanto, a capacidade protetora desse mecanismo diminui com o envelhecimento, assim compostos exógenos são sugeridos, como compostos antioxidantes, promotores da síntese de colágeno, entre outros. (Hirata et al., 2004, Bermann, 2007).

## Peptídeo KTTKS

O peptídeo KTTKS é um subfragmento do propeptídeo de colágeno tipo I, composto por uma sequência de cinco resíduos de aminoácidos, que são: lisina – treonina – treonina – lisina – serina (Figura 3). Ele é capaz de induzir a síntese de colágeno (tipo I e III) e fibronectina na pele e atuar no tratamento do envelhecimento cutâneo e cicatrização de feridas. Esta sequência foi descoberta em 1993 por um grupo de pesquisadores da Universidade da Tennessee e foi descrito como a sequência mínima capaz de reter 80% da atividade original do peptídeo que estimula a síntese da matriz extracelular (Katayama et al., 1993, Abu Samah and Heard, 2011, Gorouhi and Maibach, 2009).

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



**Figura 3.** Estrutura molecular do KTTKS. Fonte: (Abu Samah and Heard, 2011)

Segundo Katayama e colaboradores, o efeito estimulador do peptídeo KTTKS em colágeno (tipos I e III) refere-se principalmente à via biossintética, em vez das vias de degradação e exportação. Recentemente, um estudo mostrou que o peptídeo KTTKS promoveu a síntese de colágeno tipo I pela manutenção da estabilidade do mRNA em um processo associado com a autorregulação da expressão do fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ) (Tsai et al., 2007). Apesar de tal conhecimento, o mecanismo de ação do peptídeo KTTKS ainda não foi completamente estabelecido.

Os peptídeos geralmente são macromoléculas (alta massa molecular) e de caráter hidrofílico, contribuindo assim, para a sua pobre penetração passiva na pele. Além disso, os peptídeos são formados por múltiplas ligações amida (que possui um grupo doador e um receptor de ligação de hidrogênio) que podem afetar a sua difusão através da pele (Benson et al., 2003). O peptídeo KTTKS age em camadas profundas da pele, na derme, com isso o peptídeo tem que atravessar o estrato córneo e a epiderme para atingir estas camadas, tornando sua penetração na pele essencial para sua atividade (Namjoshi et al., 2008, Abu Samah and Heard, 2011).

Uma estratégia para melhorar a penetração através da pele é usar compostos promotores de penetração co-administrados. Um estudo sugere o uso de substâncias lipofílicas, como os ácidos graxos, com o objetivo de potencializar a penetração por meio de vários mecanismos possíveis: desorganizar a estrutura de lipídeos no estrato córneo para aumentar a “fluidez”; aumentar o particionamento de pele/veículo de um permeante; aumentar o transporte de solvente para dentro ou através da pele (Aungst et al., 1990).

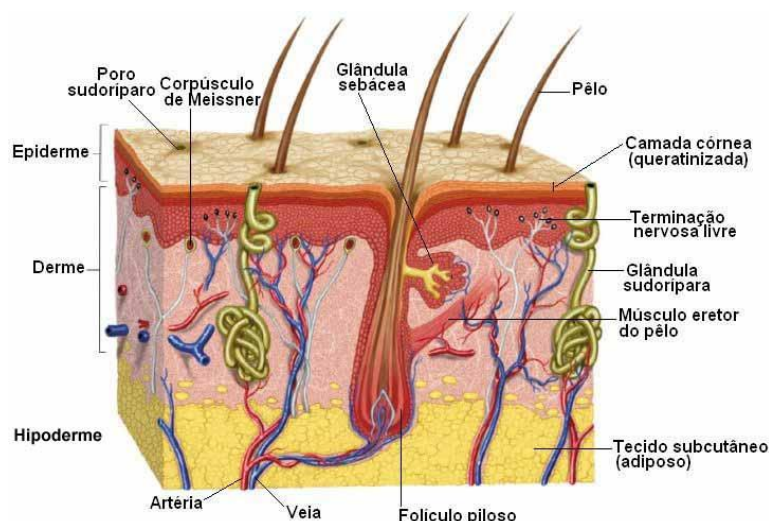
Yamamoto e colaboradores sintetizaram três derivados lipofílicos por modificação química a partir do ácido butírico, ácido capróico e ácido octanóico para estudar o efeito da acilação na estabilidade, permeabilidade e acumulação do dipeptídeo

Phe-Gly na pele. Eles observaram que a estabilidade e permeabilidade do dipeptídeo Phe-Gly foram melhoradas pela modificação com os ácidos graxos e este aumento na permeabilidade poderia ser atribuído pela proteção de dipeptídeo Phe-Gly da degradação enzimática na pele e o aumento da partição do dipeptídeo Phe-Gly no estrato córneo. O C6-PheGly, composto modificado com o ácido capróico foi o derivado que mais permeou em comparação com os outros derivados.

## **Via cutânea**

A pele é o maior órgão do corpo, altamente complexa, responsável por 15% do peso total do corpo adulto. Possui uma estrutura elaborada, associando tecidos de diversas origens (epitelial, conjuntivo, vascular, muscular e nervoso) que exercem funções vitais. Estes tecidos são organizados em três camadas: a epiderme (e seus apêndices, folículos e glândulas sudoríparas pilosebáceas); a derme, separada da epiderme pela junção dérmico-epidérmica; e a hipoderme (Figura 4). A epiderme é um epitélio estratificado que se renova continuamente. Composta por diversos tipos celulares, principalmente (90-95%) por queratinócitos, que são células epiteliais, também estão presentes as células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel. As células epidérmicas são dispostas em camadas contínuas, que compreende (de baixo para cima): a camada basal, a camada espinhosa, a camada granular e a córnea. A derme é um suporte, compressível e elástico do tecido conjuntivo protegendo a epiderme, seus anexos e plexos vasculares e nervosos estão passando por ela. Composta por células e moléculas fibrosas, ela sofre uma contínua transformação, regulada por mecanismos que controlam a síntese e degradação de seus componentes proteicos. A derme é dividida em derme superficial ou papilar e derme reticular ou profunda, contém várias células (fibroblastos, dendrócitos dérmicos, mastócitos), vasos e terminações nervosas. Ela é

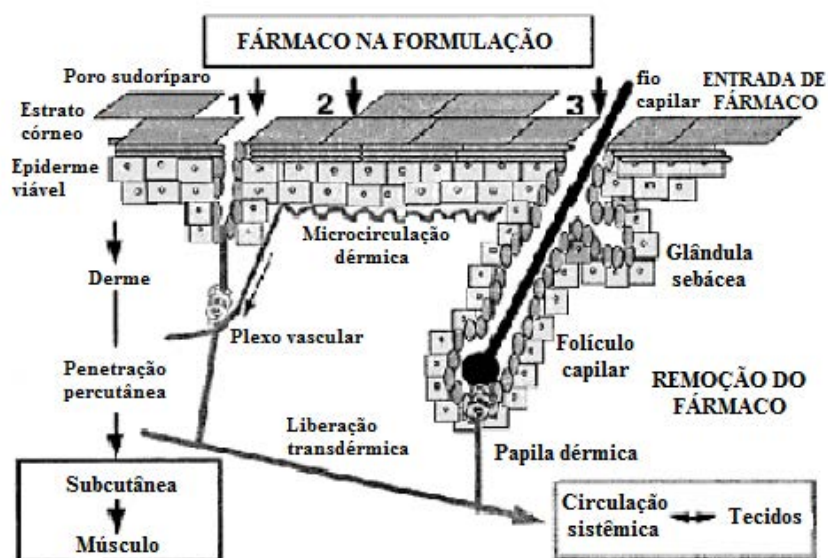
feita de fibras de colágeno dispostas em feixes soltos e de finas fibras elásticas que se estendem perpendicularmente à junção dérmico-epidérmica. A derme (profunda) reticular é composta por feixes de colágenos mais grossos, tendendo a ficar paralela a superfície da pele e, contém também a parte profunda de anexos cutâneos, plexos vasculares e nervosos (Kanitakis, 2002, Walters, 2002)



**Figura 4.** Estrutura da pele.

A administração de compostos ativos na pele, seja para um tratamento local (tópico) ou sistêmico (transdérmico), baseia-se na difusão do fármaco através das diversas camadas da epiderme (Figura 5). A camada mais superficial deste tecido, o estrato córneo, mantém o conteúdo de água no organismo mesmo em condições climáticas variáveis, bem como limita a absorção de substâncias tóxicas do ambiente. Sendo assim, o estrato córneo apresenta excelentes propriedades de barreira para a penetração de ativos na pele, o que limita a liberação de um grande número de substâncias por esta via. A maioria dos compostos ativos liberados pelos sistemas transdérmicos convencionais são moléculas pequenas, potentes e relativamente lipofílicas. A administração cutânea de ativos polares e que apresentam carga é

particularmente difícil, devido à lipofilicidade intrínseca do estrato córneo (Gratieri et al., 2008, Green et al., 1993).



**Figura 5.** Estrutura da pele e processos da absorção percutânea e liberação transdérmica. A absorção pode ocorrer através dos ductos sudoríparos (1); regiões intercelular do estrato córneo (2); e através dos folículos pilosos (3). Adaptado de Walters 2002.

Apesar da grande utilização e vantagens que a via oral oferece, vários compostos ativos, como os peptídeos, quando administrados por esta via podem ser inativados por enzimas proteolíticas (metabolismo hepático de primeira passagem), sensibilizados pelo pH do estômago e risco de induzir uma resposta imune. Assim, nos últimos anos tem ocorrido um grande interesse no desenvolvimento de produtos para administração cutânea. Para isso, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de conhecer os mecanismos de permeabilidade cutânea das substâncias ativas (Lupo and Cole, 2007).

A via cutânea apresenta inúmeras vantagens tanto para a liberação tópica quanto para a penetração cutânea de ativos, oferecendo aparentemente uma rota mais direta ao local de ação, além disso, maior biodisponibilidade pode ser obtida como resultado do

baixo metabolismo. Entretanto, há varias questões a considerar quando se fala de formulação com peptídeos, particularmente sua permeação passiva e potencial penetração através da pele (Abu Samah and Heard, 2011, Lupo and Cole, 2007).

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

Os promotores de penetração são compostos químicos que, sozinhos são farmacologicamente inativos, mas pode interagir com os constituintes do estrato córneo, assim reduzindo a resistência da difusão do fármaco na pele. Um promotor de penetração também pode aumentar a atividade termodinâmica do ativo, assim resultando no fluxo do ativo aumentado (Suhonen et al., 1999). São exemplos, dimetil-sufóxido (DMSO), ureia, solventes orgânicos (ex. etanol), ácidos oléico, ácido capríco, ésteres graxos (miristato de isopropila, palmitato de isopropila) e tensoativos. A penetração de compostos ativos através da pele depende também das propriedades físico-química de suas moléculas, das formulações, bem como da função barreira da pele no transporte (Trommer and Neubert, 2006).

A eficácia do Ac-WAhx-KTTKS depende da habilidade do peptídeo penetrar no estrato córneo, permear na epiderme viável, sem significativa interação com os queratinócitos e enzimas proteolíticas, e assim alcançar e atravessar a membrana basal para ser capaz de induzir o seu efeito nas células da derme. No entanto, o estrato córneo é considerado a maior barreira para a penetração do peptídeo (Abu Samah and Heard, 2011).

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

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

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

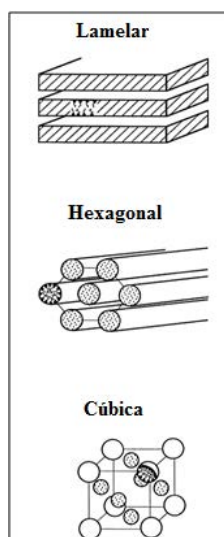
Os sistemas líquido cristalinos podem ser considerados micelas ordenadas com arranjo molecular caracterizado por regiões hidrofóbicas e hidrofílicas alternadas (Friberg, 1990, Lawrence and Rees, 2000). A mesofase líquido cristalina pode ser alcançada pelo aumento da temperatura (termotrópicos) ou pela adição de um solvente (liotrópicos). A classe termotrópica dos sistemas líquido cristalinos são formadas pela influência da temperatura do sistema, no qual a substância é submetida, ou seja, para a molécula se organizar é necessário uma quantidade de energia disponível proveniente da temperatura, sendo, portanto pouco estáveis.

A classe liotrópica é formada pela associação de uma ou mais substâncias anfífilas (tensoativos) e um solvente, geralmente a água. A formação destas estruturas leva em consideração a natureza hidrofílica e lipofílica do tensoativo, ou seja, depende do seu valor de EHL (equilíbrio hidrofílico-lipofílico), presença de sais, óleos e co-tensoativos, assim como a temperatura, estrutura do tensoativo e a proporção dos componentes do sistema (Hyde, 2001, Bechtold, 2005). São sistemas

termodinamicamente estáveis e podem ser armazenados por longos períodos de tempo sem separação de fase (Iwai et al., 1998).

De acordo com Tiddy, os cristais líquidos liotrópicos são considerados como um conjunto ordenado de micelas de grandes dimensões, ocorrendo em altas concentrações de tensoativos e sempre acima da concentração micelar crítica (Tiddy, 1980).

Diferentes estruturas líquido cristalinas podem ser formadas, como lamelares hexagonais ou cúbicas (Figura 6) (Gaisin et al., 2010). A fase lamelar é formada por bicamadas paralelas e planas de tensoativos separadas por camadas de solvente, estas estruturas demonstram apresentar maior similaridade com a membrana lipídica intercelular da pele, portanto, são recomendadas principalmente para o desenvolvimento de produtos para administração dérmica (Prestes et al., 2009). Já na fase hexagonal, os agregados de tensoativos são formados pelo arranjo de cilindros longos, originando estruturas bidimensionais. Na fase hexagonal, chamada de fase hexagonal direta, as moléculas do tensoativo se agrupam em micelas cilíndricas circulares, com água preenchendo o volume entre os cilindros, enquanto que na fase hexagonal reversa os cilindros contêm canais de água circundados pelas cabeças polares do tensoativo e a porção oleosa localizada ao redor dos cilindros. A fase cúbica, as moléculas estão arrançadas numa estrutura tridimensional, a qual consiste de duas redes congruentes de canais de água envolvidos por bicamadas lipídicas ou de tensoativo (de Oliveira et al., 2004).



**Figura 6.** Representação das fases líquido cristalinas liotrópicas. Adaptado de (Singh, 2000).

A liberação de compostos ativos na derme e transderme pode ser influenciada pelo tipo de fase formada no sistema líquido cristalino. A fase cúbica pode aumentar significativamente a retenção de ativos na camada superior da pele (estrato córneo), enquanto que a fase hexagonal pode favorecer a penetração em camadas mais profundas da pele (epiderme e derme) assim como a absorção percutânea (Otto et al., 2009).

Os sistemas líquido cristalinos transportadores de compostos ativos são promissores sistemas de liberação controlada de ativos. Tendo como objetivo obter sistemas carregados de ativo, propriedades de liberação, estabilidade do produto final e baixa toxicidade (Muller-Goymann, 2004).

Nos últimos anos tem havido grande interesse em sistemas líquido cristalinos como sistemas de liberação pela indústria cosmética e química e também na área farmacêutica. As razões para este interesse incluem a extensa semelhança destes sistemas coloidais com substâncias contidas no organismo (Kudla et al., 2010).

As estruturas líquido cristalina de um sistema podem alterar o perfil de liberação de compostos ativos por prevenir a liberação rápida do ativo dissolvido na fase líquido-

crystalina, agindo como uma barreira difusional. Este efeito é devido à estrutura organizada do cristal líquido ao redor das gotículas, que reduz efetivamente o transporte interfacial do ativo dissolvida dentro das gotículas. As substâncias aprisionadas serão liberadas mais lentamente a partir dessa matriz do que a partir de solventes lipofílicos aplicados à superfície da pele, devido à interação entre o cristal líquido e o estrato córneo. Além de afetar a liberação do ativo, a mesofase pode alterar a direção do seu movimento, assim como aumentar sua solubilidade, em função das regiões de diferentes polaridades existentes nesses sistemas (Farkas et al., 2000). A interação ativo-sistema desempenha importante papel no controle da liberação. Entretanto, a razão da liberação de ativos incorporados em sistemas líquido cristalinos dependerá da estrutura da mesofase, assim como das características físico-química do ativo (Gabboun et al., 2001). Outra propriedade de grande importância e destaque dos cristais líquidos é promover o aumento da retenção de água no estrato córneo, proporcionando aumento na hidratação cutânea. Os cristais líquidos podem fisiologicamente integrar a barreira lipídica da pele, ajudando a reforçar a sua integridade, evitando a perda de água e reduzindo os danos de fatores ambientais (Iwai et al., 1998).

Um aumento reversível na permeabilidade do estrato córneo pode ser alcançado sem irritação irreversível da pele através do uso de um tensoativo não-iônico. Tais tensoativos podem ainda, aumentar consideravelmente a solubilidade de compostos ativos que sejam insolúveis ou pouco solúveis em água (Makai et al., 2003). Devido às estruturas organizadas formadas pelos tensoativos, os sistemas líquido cristalinos são capazes de promover a encapsulação de ativos, assim protegendo-os de foto e termo sensibilização, melhorando a estabilidade e a biodisponibilidade e retardando e prolongando a sua liberação (Lopes et al., 2006, Yariv et al., 2010, Farkas et al., 2000, Brinon et al., 1999). Os sistemas líquido cristalinos liotrópicos apresentam boa

penetração devido à baixa tensão interfacial decorrente da interface óleo/água e podem facilitar a difusão progressiva de substâncias biologicamente ativas na pele ou circulação sistêmica, como os aminoácidos e peptídeos, que têm dificuldade de penetrar na pele por serem macromoléculas (Makai et al., 2003, Chuealee et al., 2007, Prestes et al., 2009).

Nas últimas décadas, extensas pesquisas com sistemas líquido cristalinos têm sido feitas através do desenvolvimento de diagramas de fases. O diagrama de fases descreve as condições em que os componentes devem ser combinados para formar um sistema específico. Dependendo da razão entre os componentes (tensoativo/fase aquosa/fase oleosa) diferentes arranjos líquido cristalinos podem ser formados (Alany et al., 2001, Boonme et al., 2006).

As principais técnicas utilizadas para a caracterização das fases líquido cristalinas são, a microscopia de luz polarizada (MLP), o espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) e a reologia, onde estuda-se as propriedades físico-químicas internas dos sistemas. A MLP é o método mais adequado para a identificação primária de mesomorfismo (Gaisin et al., 2010). A fase cúbica é identificada como um campo escuro, a fase hexagonal como estrias e a fase lamelar como cruces de malta (Vicentini et al., 2008). O espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS) é uma técnica usada para confirmação da caracterização feita por MLP, onde a posição relativa dos picos de SAXS no vetor de espalhamento ( $q$ ) é usada para determinar a estrutura da fase cristalina (Wang and Zhou, 2009). Nos ensaios de reologia estuda-se o comportamento dos arranjos das moléculas de tensoativo nos sistemas coloidais (Wang et al., 2006).

## Composição dos sistemas

A escolha dos componentes das formulações é muito importante para o desenvolvimento dos sistemas de liberação de ativos. Essa escolha deve ser criteriosa, pensando na mínima toxicidade, irritabilidade, capacidade de solubilização do ativo a ser incorporado nos sistemas, bem como a capacidade de formar os sistemas desejados (Kreilgaard, 2002).

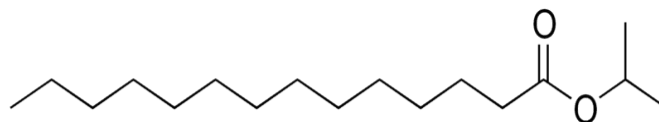
Os agentes tensoativos são fundamentais na estabilização dos sistemas coloidais. São substâncias caracterizadas pela presença de uma região polar e outra apolar em suas estruturas moleculares, as quais são definidas pelo equilíbrio apresentado entre a parte polar e a apolar do tensoativo, denominado Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL). Os valores de EHL inferiores a dez indicam predominância da porção apolar do tensoativo, tornando-se adequadas para o preparo de emulsões A/O, ou seja, emulsões onde a fase externa é composta pelo material graxo e a fase interna pela água. No entanto, valores superiores a dez indicam a prevalência da porção polar, assim o emprego do tensoativo na obtenção de emulsões O/A, ou seja, emulsões onde a fase externa é composta pela água e a fase interna pelo material graxo (Kreilgaard, 2002).

Sistemas de liberação de fármacos estabilizados com tensoativos não iônicos são, geralmente, menos afetados pela presença de aditivos (tampão, eletrólitos e conservantes) e mudanças no pH que os tensoativos iônicos, além de serem mais seguros e menos susceptíveis em causar irritação (Kreilgaard, 2002, Garti et al., 2003). Durante anos, as microemulsões formadas por tensoativos não iônicos de cadeia longa têm sido estudadas como sistemas de liberação de fármacos. No entanto, existem poucos estudos sobre fases líquidas cristalinas para esta aplicação, obtidas por estes tensoativos (Wang et al., 2006).

Dentre os tensoativos, os derivados da classe dos polioxietilenos têm sido muito utilizados. O Polyoxyethylene (10) oleyl ether, cujo INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) é Oleth-10, comercialmente conhecido como Brij O10, Brij 96 e Brij 97, é um tensoativo de cadeia longa, não iônico, que se apresenta como um líquido ligeiramente turvo, incolor, de odor leve e característico, EHL = 12,4, pH (sol. Aquosa 3%, 25 °C) = 5,5 – 7,5, com a seguinte estrutura química:  $C_{18}H_{35}-O-(CH_2CH_2)_x$  H;  $x \approx 10$ , farmacologicamente aceito, e capaz de formar sistemas microestruturados (Wang and Zhou, 2009, Aldrich, 2010).

O Oleth-10 é atualmente utilizado em uma variedade de formulações farmacêuticas, cosméticas e alimentícia. Durante os últimos anos, pesquisas do comportamento de fase de sistemas líquido cristalinos usando tensoativos de cadeia longa têm atraído cada vez mais interesse devido a sua capacidade de formação de diversas estruturas líquido cristalinas (Wang et al., 2006, Wang and Zhou, 2009).

A fase oleosa também é um importante componente, pois influencia na estruturação dos sistemas e na solubilidade do ativo. Estas devem ser compatíveis com o ativo usado, principalmente se este for lipofílico. A maioria dos óleos utilizados nos sistemas estruturados para uso farmacológico são volumosos e semi-polares, ao contrário dos óleos hidrocarbônicos que são comumente utilizados em outras aplicações (Agatonovic-Kustrin et al., 2003, Valenta and Schultz, 2004). Quando estes sistemas são administrados pela via cutânea, os compostos oleosos podem atuar como promotores de permeação, melhorando a penetração de ativo através da pele (Podlogar et al., 2005). Desta forma, os ésteres de ácido graxo, como o Isopropyl myristate, é farmacologicamente aceitável e bastante utilizado na obtenção de sistemas estruturados (Figura 7).



**Figura 7.** Estrutura molecular do Isopropyl myristate.

Wang e colaboradores verificaram que sistemas compostos por Polyoxyethylene (10) oleyl ether /Isopropyl myristate/Água apresentaram diferentes fases líquido cristalinas em função da variação da proporção entre os componentes.

Gabiga e colaboradores estudaram o efeito de promotores de penetração na penetração do isosorbide dinitrate na pele de ratos para um sistema terapêutico transdérmico, e foi observado um aumento do efeito promotor de penetração na pele do Isopropyl myristate na permeação percutânea do isosorbide.

As características físico-químicas, a solubilidade e coeficiente de partição óleo-água, do tensoativo e das fases oleosa e aquosa, assim como as proporções dos componentes, são fatores essenciais na formulação destes sistemas estruturados.

O comportamento de sistemas composto por tensoativo/óleo/água é geralmente representado pela construção de um diagrama de fases ternário, onde descreve as condições em que os componentes devem ser combinados para formar sistemas específicos (Alany et al., 2001).



---

## *Objetivo*

## Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo sintetizar um análogo do peptídeo KTTKS, denominado de Ac-WAhx-KTTKS e desenvolver sistemas líquido cristalinos que facilitem sua penetração na pele.

## Objetivos específicos

- Síntese do Ac-WAhx-KTTKS;
- Avaliação da citotoxicidade e a biossíntese de colágeno *in vitro* em HDFa;
- Desenvolvimento dos sistemas líquido cristalinos por meio do diagrama de fases ternário;
- Caracterização físico-química dos sistemas de interesse (Determinação do pH, Microscopia de Luz Polarizada, Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo e Reologia);
- Validação de metodologia analítica por CLAE para quantificação do peptídeo em estudo;
- Determinação do perfil de liberação *in vitro* do Ac-WAhx-KTTKS;
- Avaliação da permeação e retenção *in vitro* do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações.

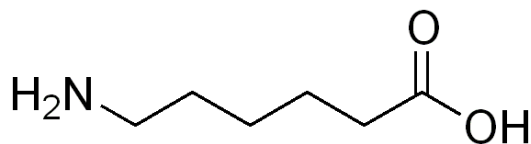


---

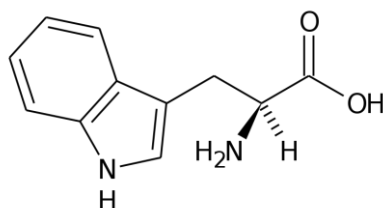
*Justificativa*

O composto ativo a ser sintetizado é um análogo baseado no peptídeo KTTKS. Este peptídeo representa a sequência mínima para obter 80% da atividade estimulante da síntese da matriz extracelular (Katayama et al., 1991). Porém, o peptídeo KTTKS possui baixa permeabilidade cutânea devido a sua hidrofiliabilidade e alta massa molecular, conferida aos peptídeos por serem macromoléculas.

Com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas do peptídeo KTTKS para potencial penetração na pele, foi realizada modificações na sequência peptídica KTTKS. Essas modificações consistem na adição de uma molécula de ácido aminocapróico, que é um derivado e análogo do aminoácido lisina (Figura 8), à sequência peptídica para conferir um grau de lipofiliabilidade ao peptídeo e favorecer a permeabilidade do mesmo através da pele. Além disso, foi adicionado à este peptídeo um resíduo de tripfano, que é um aminoácido aromático e apolar essencial para a nutrição humana, representado pela letra “W” na sequência peptídica e com sua extremidade amina acetilada (Figura 9). Este aminoácido foi acoplado para proporcionar fluorescência ao peptídeo e assim, quantificá-lo por meio de um método mais eficiente e sensível, a detecção por fluorescência. A reação de acetilação foi realizada para diminuir a polaridade do peptídeo (a carga positiva N-terminal é neutralizada), afim de ajudar na penetração do Ac-Wahx-KTTKS na pele.

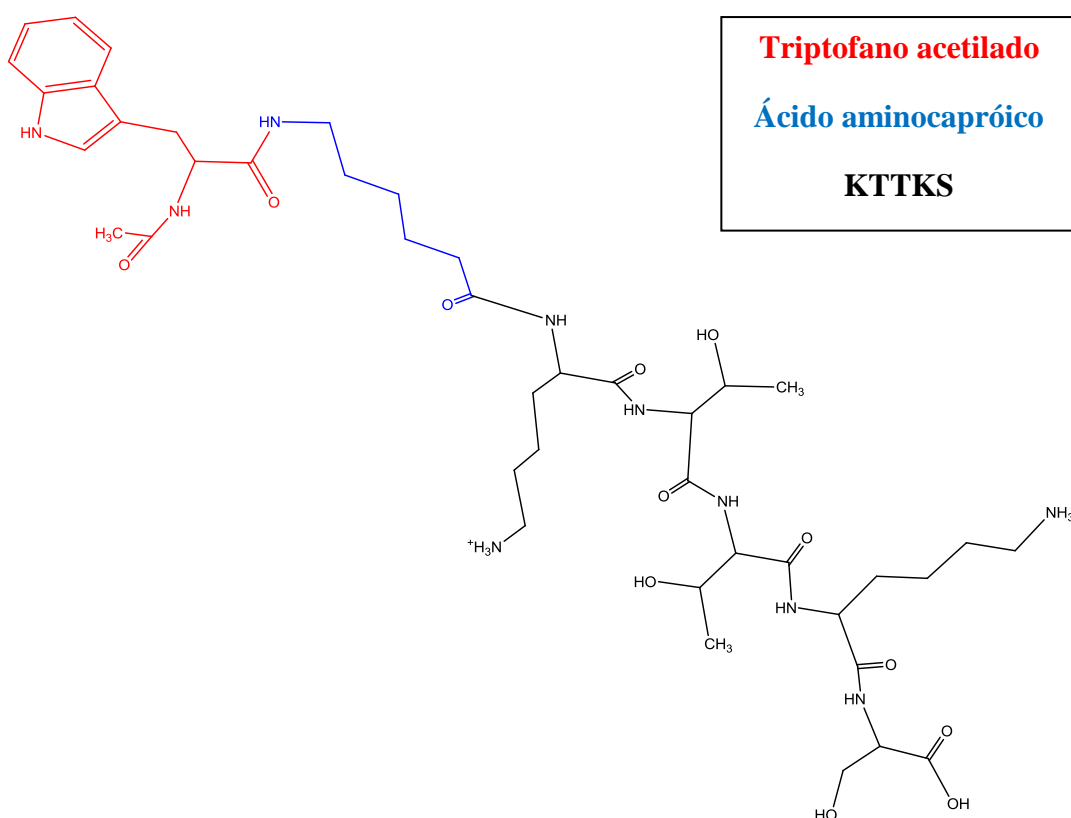


**Figura 8.** Estrutura molecular do ácido aminocapróico.



**Figura 9.** Estrutura molecular do Triptofano.

A figura 10 mostra a estrutura molecular do peptídeo análogo Ac-WAhx-KTTKS que será sintetizado.



**Figura 10.** Estrutura molecular do peptídeo análogo Ac-WAhx-KTTKS. Fonte: Autora deste trabalho.



---

## *Material e Métodos*

## **Material e reagentes**

MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) – Sigma Aldrich

Queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (HaCat)

Células de hepatoma humano (HepG2)

Direct Red 80 – Sigma Aldrich

Fibroblasto humano de derme (HDFa) – Invitrogen;

Colágeno humano tipo I – Sigma Aldrich

Polyoxyethylene (10) oleyl ether – Sigma Aldrich

Isopropyl myristate – Via Farma

Tampão fosfato pH 7,4 (solução receptora)

Membranas de celulose para tubos de diálise de 76 mm – Sigma Aldrich

Orelha de porco – Frigorífico Olhos D'Água

## Métodos

### 1. Síntese do peptídeo

O peptídeo utilizado neste trabalho foi obtido manualmente pelo método da SPFS (Síntese Peptídica em Fase Sólida) (Fields and Noble, 1990).

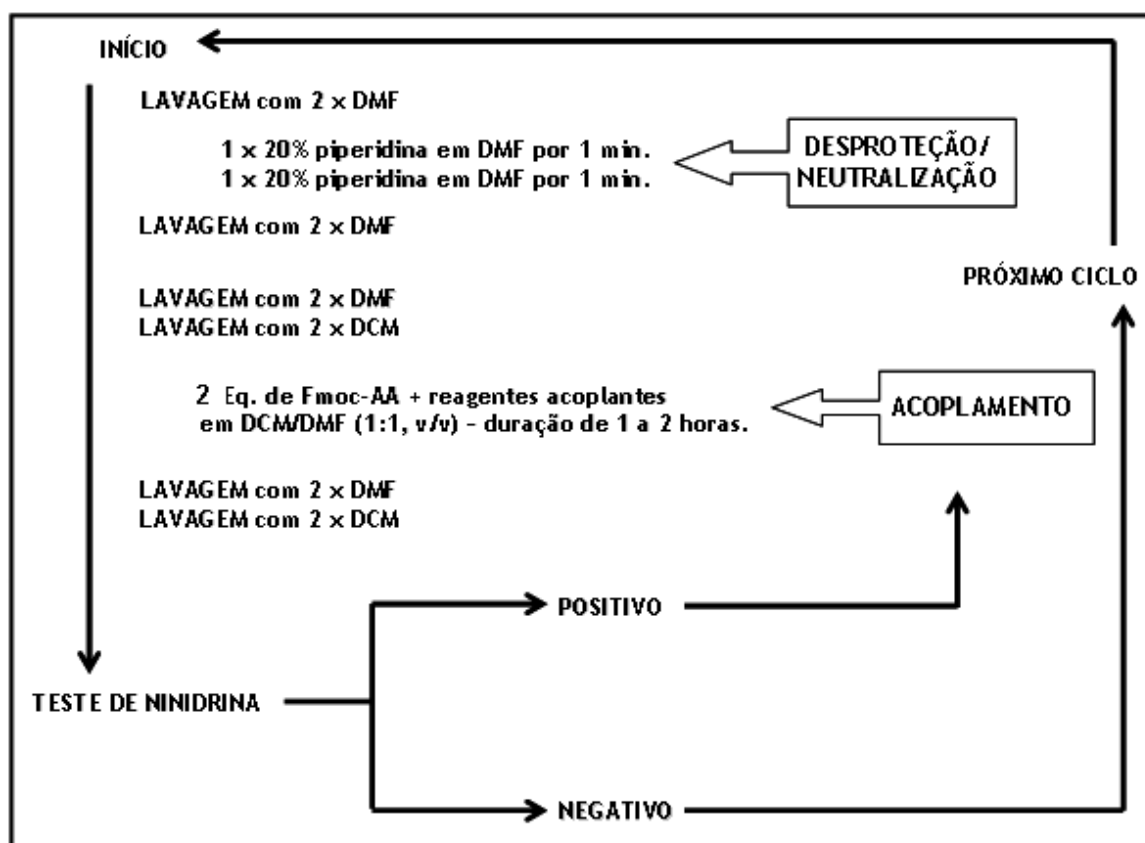
A síntese de peptídeos em fase sólida consiste em utilizar uma matriz polimérica inerte e insolúvel (resina) para o crescimento da cadeia peptídica. Esta síntese é realizada adicionando-se um aminoácido de cada vez por meio de um processo cíclico.

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

O protocolo de síntese consistiu de passos cíclicos de desproteção e acoplamento, intercalados por lavagens para eliminação dos reagentes utilizados e subprodutos obtidos. Na etapa de acoplamento foram utilizados os ativadores N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC)/ N-hidroxibenzotriazol (HOBt) para ativação do grupo carboxila do Fmoc-aminoácido acoplante durante duas horas de agitação utilizando como solvente 50% de dimetilformamida (DMF) em diclorometano (DCM). Os Fmoc-aminoácidos e os ativadores foram utilizados com um excesso de duas vezes em relação à quantidade de sítios ativos livres iniciais na resina. Este valor foi calculado utilizando-se a escala de síntese de 0,2 mmol. A desproteção do grupo amino após acoplamento foi realizada por meio da reação com uma solução de piperidina 20% em DMF durante 1 e 20 minutos. Entre cada passo de reação foram efetuadas lavagens com os solventes orgânicos, DCM e DMF para solvatação da resina e eliminação do excesso de reagentes. Depois de cada acoplamento e desproteção foi realizado o teste de ninidrina,

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

A figura 11 mostra esquematicamente o protocolo de síntese utilizado na obtenção do peptídeo.



**Figura 11.** Protocolo geral de síntese.

Após o término da síntese, o peptídeo foi submetido a uma etapa de clivagem, a fim de retirar o peptídeo da resina e os grupos protetores das cadeias laterais dos

aminoácidos trifuncionais. Esta etapa foi realizada com uma mistura de ácido trifluoroacético (TFA) (85%)/ tioanisol (5%)/ Fenol (5%)/ Água (5%)/ EDT (etanoditiol) (2,5%) e TIS (tri-isopropilsilano) (1%) na proporção de 1 g de resina para cada 10mL de solução, em frasco de acetilação, a temperatura ambiente sob agitação constante por 2 horas. Ao fim, o peptídeo foi precipitado com éter etílico gelado e centrifugado, para separá-lo dos subprodutos da clivagem. Para completa eliminação dos subprodutos esta etapa foi repetida três vezes. Posteriormente, o peptídeo foi extraído da resina com uma solução aquosa contendo 0,045% de TFA. O sobrenadante contendo o peptídeo foi liofilizado e identificado como peptídeo bruto. Uma alíquota do peptídeo bruto foi analisada por CLAE analítico em um cromatógrafo Shimadzu, com coluna C<sub>18</sub> KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm, para obtenção do perfil cromatográfico do mesmo.

### **1.1 Purificação**

A purificação do peptídeo bruto foi realizada por CLAE semipreparativa utilizando um cromatógrafo Beckman, com coluna C<sub>18</sub> PHENOMENEX de dimensão 2,1 x 25 cm. Durante a purificação foram recolhidos tubos de 3 mL e o grau de pureza foi determinado por CLAE analítico. Os tubos puros foram juntados e liofilizados obtendo-se as frações puras. As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na tabela 1.

**Tabela 1.** Condições cromatográficas empregadas na purificação do peptídeo sintetizado.

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

## 1.2 Caracterização por Espectrometria de Massas

O espectro de massas do peptídeo puro foi obtido em um espectrômetro de massas LCQ FLEET Thermo Scientific, com injeção direta, em modo de detecção positiva, localizado no Instituto de Química de Araraquara - UNESP, no Departamento de Química Orgânica.

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

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

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

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

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

$z$  é a quantidade de cargas que contém o peptídeo

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

## 2. Avaliação do potencial citotóxico do peptídeo

A avaliação do potencial citotóxico do peptídeo foi realizada através do método de MTT, que tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzir o sal MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), através da enzima desidrogenase presente na mitocôndria, formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. Sendo assim, através da quantificação dos cristais violetas pela espectroscopia de absorção UV-Visível (leitor de ELISA) é possível quantificar a porcentagem de células vivas.

Os ensaios foram realizados em células de hepatoma humano (HepG2) que possuem a capacidade de metabolização de xenobióticos, e em queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (HaCat). As células foram cultivadas em meio de cultura MEM (*Minimum Essential Media*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos, neutralizada a tripsina com MEM com soro e, então, semeadas em placas de 96 poços. A densidade celular para os ensaios de citotoxicidade foi de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml. As placas foram incubadas por 24 horas para a completa adesão das células às placas. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL de controle positivo (Dimetilsulfóxido - DMSO a 10%), controle negativo (MEM sem soro), e diferentes concentrações do peptídeo (diluídos em MEM sem soro), durante 24 horas. Após o tratamento, o meio de cultura

foi removido, as placas foram lavadas delicadamente com PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e 100 µL de MTT (1mg/ml em PBS) foram adicionados em cada poço. As células na microplaca foram incubadas a 37 °C, 3 a 5 horas, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana. Em seguida, os cristais de formazana foram solubilizados com 100 µL de álcool isopropílico absoluto e assim, feita a leitura espectrofotométrica da absorbância no leitor de placas (Bio-rad Model 550), em comprimento de onda de 595 nm.

A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por (Chiari et al., 2012), e em seguida, foi determinada também a porcentagem de células vivas. Segue na equação 2 o cálculo de porcentagem de células mortas e na equação 3 o cálculo da porcentagem de células vivas.

$$\% \text{ CM} = [(\text{Abs CN} - \text{Abs amost}) / (\text{Abs CN})] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: % CM é a porcentagem de células mortas

Abs CN é a absorbância do controle negativo

Abs amost é a absorbância da amostra

$$\% \text{ CV} = 100 - \% \text{ CM} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: % CV é a porcentagem de células vivas

% CM é a porcentagem de células mortas

Foi calculado também o IC<sub>50</sub> para as diferentes linhagens, isto é, a concentração de peptídeo onde há 50% de viabilidade celular, através da equação da reta da curva analítica. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e as concentrações foram testadas em triplicatas.

### 3. Biossíntese de colágeno

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

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

O ensaio foi realizado em linhagem celular primária de fibroblastos de derme humano, que possuem a capacidade de sintetizar fibras colágenas. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL). As culturas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos, neutralizada a tripsina com DMEM com soro e, então, semeadas em placas de 96 poços. A densidade celular para o ensaio de biossíntese de colágeno foi de  $2,5 \times 10^5$  células/mL. As placas foram

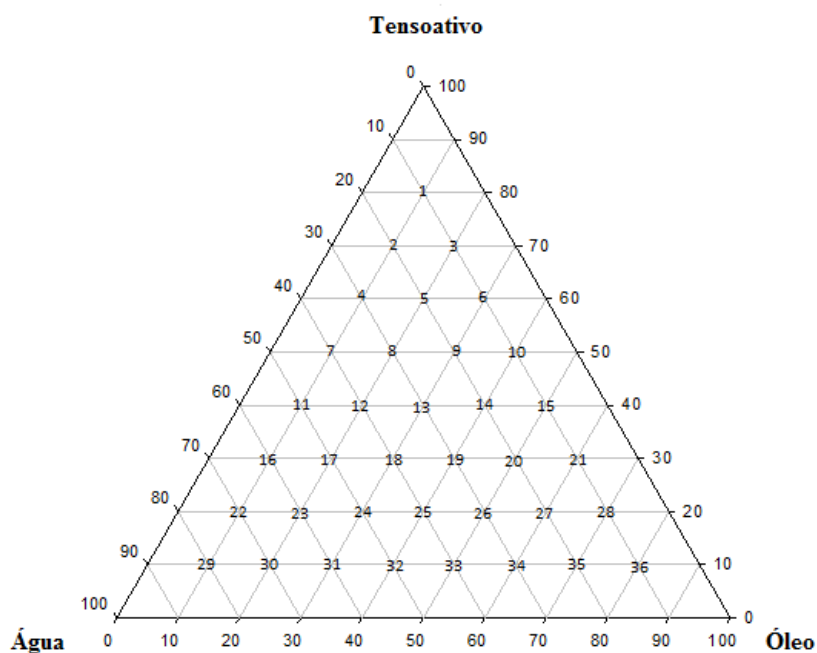
incubadas por 24 horas para a completa adesão das células às placas. Em seguida, as células foram tratadas com 150  $\mu\text{L}$  de controle negativo (DMEM sem soro) e diferentes concentrações do peptídeo (diluídos em DMEM sem soro), durante 24 e 48 horas. Após o tratamento, o material foi fixado com 200  $\mu\text{L}$  de solução de Bouin durante 1 hora em temperatura ambiente. Após a fixação as células foram ser lavadas duas vezes com água destilada e secas em temperatura ambiente por 2 horas, em seguida foi adicionado em cada poço 200  $\mu\text{L}$  do corante Picrosirius red (0,1% em solução aquosa de ácido prícrico saturada). A microplaca contendo as células foi submetida à agitação leve por 1 hora, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, até a observação da presença do precipitado vermelho das fibras colágenas. Em seguida, o sobrenadante foi removido por aspiração a vácuo e os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de ácido clorídrico 0,01 M para remoção do excesso de corante e posteriormente foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de hidróxido de sódio 0,01 M em cada poço, deixado por 1 hora sob agitação, para solubilizados das fibras colágenas e assim, feita a leitura espectrofotométrica da absorbância no leitor de placas (iMark Microplate Absorbance Reader, modelo 168-1135, Bio-Rad, USA), em comprimento de onda de 540 nm. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes e as concentrações foram testadas em triplicatas.

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

#### **4. Desenvolvimento dos sistemas coloidais**

O modo mais usual de descrever esses sistemas é através do diagrama de fases ternário, onde fase aquosa, fase oleosa e tensoativo são representadas nos vértices do triângulo em qual cada ponta indica 100% do componente da formulação e o interior do

triângulo representa a distribuição isotermal de regiões estruturadas, assim 36 formulações com variadas composições são obtidas, conforme figura 12. O diagrama foi construído com os seguintes componentes: Oleth 10 (tensoativo); Isopropyl Myristate (fase oleosa); Água Ultrapura (fase aquosa). As formulações foram preparadas a frio, misturando primeiramente o tensoativo com a fase oleosa e, por último a fase aquosa.



**Figura 12.** Construção do diagrama de fases ternário.

Uma emulsão foi preparada para estudo comparativo nos ensaios de liberação do peptídeo das formulações, permeação e retenção cutânea, com os sistemas líquido cristalinos escolhidos. Segue na tabela 2 a composição da emulsão.

**Tabela 2.** Composição da emulsão.

INCI name	%p/p
Cetearyl Olivatate, Sorbitan Olivatate	6,00
Shea Butter	2,00
Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben	0,80
Ammonium Acryloyldimethyltaurate / VP Copolymer	0,10
Tetrasodium EDTA	0,10
Propylene Glycol	1,00
Ciclometicone	0,50
Aqua	q.s.p. 100

Para preparação da emulsão pesou-se a fase oleosa (Cetearyl Olivatate, Sorbitan Olivatate; Shea Butter) em um béquer de vidro e a fase aquosa (Ammonium Acryloyldimethyltaurate / VP Copolymer; Tetrasodium EDTA; Propylene Glycol; Aqua) em outro béquer de vidro, em seguida levando-os para aquecimento ( $\pm 75$  °C), sob agitação, após atingir a temperatura, verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa, agitou-se até esfriar a temperatura ambiente e finalmente adicionou-se na mistura o Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben e o Ciclometicone.

## 5. Caracterização físico-química dos sistemas coloidais

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

### 5.1 Determinação do pH

As medidas de pH foram determinadas nas formulações contendo e não contendo o peptídeo. O peagômetro digital (Gehaka PG 1800) foi calibrado com soluções padrão (pH 4,0 e pH 7,0). As formulações foram diluídas em água MilliQ em uma concentração de 10% e em seguida foram realizadas as medidas. As medidas foram realizadas em triplicata e temperatura de 25 °C  $\pm$ 0,5 °C.

### 5.2 Microscopia de luz polarizada (MLP)

A determinação do arranjo estrutural dos sistemas foi realizada por MLP. As formulações contendo e não contendo o peptídeo foram analisados pelo microscópio de luz polarizada (Leica Leitz DM RXE) com capturador de imagens (Moticam 2000), colocando-se uma pequena alíquota da amostra em uma lâmina, cobrindo-a com a lamínula. Foram utilizados lentes de aumento de 5, 10 e 20 vezes, dependendo da amostra.

### 5.3 Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

O arranjo estrutural das formulações analisadas por MLP foi determinada também por SAXS, com a finalidade de confirmar as estruturas identificadas. Foram avaliadas formulações contendo e não contendo o peptídeo. A coleta de dados foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas), na linha de luz Síncrotron para SAXS1, equipada com um monocromador ( $\lambda = 1.488 \text{ \AA}$ ), um detector de raios-X em posição vertical e um analisador multicanal para capturar a intensidade das medidas de SAXS,  $I(q)$ , em função do vetor de espalhamento,  $q$ . O espalhamento das micas e do ar foram subtraídos da intensidade de espalhamento total.

Cada espectro foi coletado por 45 segundos. Essa instalação permitiu um vetor de espalhamento,  $q$ , entre aproximadamente 0,1 e 2,3  $\text{\AA}^{-1}$ . Os gráficos foram plotados no software Origin 7.0.

#### 5.4 Reologia

As formulações contendo e não contendo o peptídeo foram caracterizadas reologicamente através do ensaio de fluxo. Os ensaios foram realizados no reômetro (Carri Med AR2000 EX), utilizando o sensor do tipo placa (SST ST 40mm), com taxa de cisalhamento de 0 a 100  $\text{s}^{-1}$  (40 pontos) por um período de 120 segundos para curva ascendente e 120 segundos para curva descendente, na temperatura de 25  $^{\circ}\text{C} \pm 0,2$   $^{\circ}\text{C}$ , em triplicata e os dados foram analisados pelo software Rheology Advantage Data Analysis. Os gráficos foram plotados no software Origin 7.0.

### 6. Validação de metodologia analítica para quantificação do Ac-WAhx-KTTKS

Para quantificação do peptídeo nos testes de liberação, permeação, retenção cutânea *in vitro*, desenvolveu-se uma metodologia analítica usando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O equipamento empregado foi um HPLC da marca SHIMADZU, modelo LC-10AT, acoplado ao detector de fluorescência e com auto-amostrador. As condições experimentais foram: fases móvel constituídas por solvente A (0,045% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q) e solvente B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetonitrila), produzindo um gradiente de 10 – 25% de solvente B em 15 minutos de corrida, coluna C18 (0,46 cm – 25 cm, 5  $\mu\text{m}$ , KROMASIL 300-5C18), fluxo 1 mL/minuto, injeção 50  $\mu\text{L}$ , detecção à 280 nm em 350 nm e temperatura

do forno de 25 °C. A validação da metodologia analítica foi realizada usando os parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, precisão intra-corrída (repetibilidade) e inter-corrída (intermediária), exatidão, limite de detecção e limite de quantificação e robustez. Este método foi validado de acordo com a Resolução-RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

### **6.1 Especificidade ou seletividade**

Este parâmetro foi realizado para avaliar a presença de componentes que podem interferir na quantificação do peptídeo. Foram avaliadas as seguintes amostras: solução do peptídeo (1,5461 µmol/L) diluído em fase móvel e soluções contendo alíquotas das formulações EM, F2 e F7.

### **6.2 Linearidade**

Para avaliação da linearidade foram construídas três curvas analíticas em diferentes dias, usando seis níveis de concentração em cada uma delas. Para isso, foi preparada uma solução mãe do peptídeo na concentração de 773,032 µmol/L, e partir desta solução, foram preparadas seis diluições em fase móvel, 0,0773, 0,3092, 0,3865, 0,6184, 0,7731 e 1,5461 µmol/L, em triplicata. A partir da média dos valores de áreas encontrados e das concentrações testadas para as três curvas, foi construída uma curva total, verificando-se a relação linear.

### **6.3 Precisão**

A precisão intra-corrída ou repetibilidade foi avaliada usando três concentrações diferentes da curva analítica (0,0773, 0,3865 e 1,5461 µmol/L), baixa, média e alta

concentração, contemplando o intervalo linear do método, em triplicata. Este procedimento foi repetido em um curto intervalo de tempo, ou seja, foi realizado durante a manhã e durante a tarde de um mesmo dia, com o mesmo equipamento e operador.

A precisão inter-corrída ou intermediária foi realizada nas mesmas condições que a precisão intra-corrída, porém repetido em dias diferentes.

A precisão do método analítico foi calculada como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação), segundo a equação 4:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

*DPR* é o desvio padrão relativo,

*DP* é o desvio padrão, e,

*CMD* é a concentração média determinada.

#### 6.4 Exatidão

A exatidão foi determinada pela avaliação da recuperação, ou seja, concentrações conhecidas de peptídeo foram utilizadas (0,0773, 0,3865 e 1,5461  $\mu\text{mol/L}$ ), baixa, média e alta concentração, em triplicata, seguindo o intervalo linear do método e por meio da equação da reta obtida no ensaio de linearidade, as concentrações experimentais foram calculadas. Em seguida, avaliou-se a relação entre a concentração experimental observada e a concentração teórica.

O cálculo da exatidão foi feito segundo a equação 5:

$$\text{Exatid o} = \frac{\text{concentra o m dia experimental}}{\text{concentra o te rica}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

### 6.5 Limite de detecção

Este parâmetro foi determinado com base na relação de três vezes o ruído da linha de base, através da equação 6:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

*DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

*IC* é a inclinação da curva de calibração.

### 6.6 Limite de quantificação

Este parâmetro foi determinado com base na relação de dez vezes o ruído da linha de base, através da equação 7:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

*DPa* é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

*IC* é a inclinação da curva de calibração.

### **6.7 Robustez**

A robustez foi determinada através da variação do fabricante de um dos solventes utilizados no método, a acetonitrila. A robustez do método foi verificada em três concentrações, baixa, média e alta, em triplicata, sendo calculado o desvio padrão relativo (DPR) dos valores obtidos, com os descritos na curva analítica.

### **6.8 Curva analítica em solventes diferentes**

Após o método ter sido validado, duas novas curvas analíticas foram construídas usando a solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) e a solução de acetonitrila/água (1:1) como solventes. A validação foi efetuada utilizando a fase móvel como solvente para o peptídeo, entretanto, na avaliação da liberação do peptídeo da formulação, da permeação e retenção cutânea foram utilizados os solventes acima.

## **7. Liberação do peptídeo, permeação e retenção cutânea *in vitro***

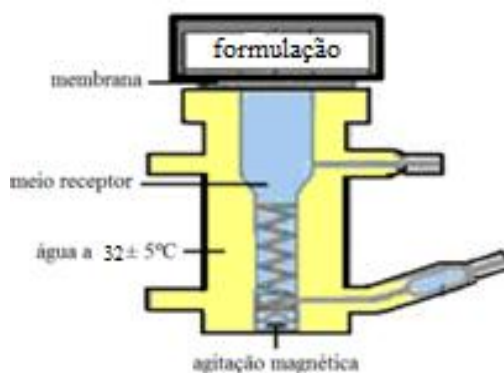
Após a avaliação da citotoxicidade e biosíntese de colágeno do peptídeo, foi determinada a concentração ideal, assim fez-se a incorporação do peptídeo nas formulações para realizar os ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea, de modo a avaliar o perfil de liberação da formulação, se há permeação para a corrente sanguínea e qual a concentração que ficaria retida na pele, garantindo assim que o composto ativo fique retido na concentração e local desejado.

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

As formulações F2, F7 e EM, contendo 220,87  $\mu\text{mol/L}$  do peptídeo, foram escolhidas para a avaliação do perfil de liberação *in vitro* do peptídeo. As três formulações foram avaliadas visando comparar o perfil de liberação de dois sistemas de liberação controlado com uma emulsão simples.

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

Os ensaios de liberação foram realizados utilizando célula de Franz modificada (Figura 13), do equipamento de permeação Microette (Hanson Research), em seis réplicas para cada formulação.



**Figura 13.** Célula de Franz modificada (modificado de [www.hansonresearch.com](http://www.hansonresearch.com)).

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

Amostras de 2 mL foram coletadas automaticamente nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas para avaliar a liberação. Descartou-se um volume de 0,8 mL antes de cada coleta e o volume coletado foi repostado imediatamente com solução receptora. As amostras coletadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) nas seguintes condições: programa Gradiente, 10 a 25% em 15 minutos; fase móvel: solvente A (0,045% de ácido trifluorocético em água) e solvente B (0,036% de ácido trifluorocético em acetonitrila); fluxo 1 mL/minuto; volume de injeção 50 µL; coluna C18 (Kromasil, 25 x 0,46 cm, 5 µm); temperatura do forno 25 °C; detector de fluorescência; comprimento de onda 280 nm.

O ensaio foi realizado sob condições “*sink*”, utilizando-se um volume de solução receptora suficiente para que a concentração do peptídeo não ultrapassasse mais que 10 – 15% de sua solubilidade máxima e garantir assim que a velocidade de dissolução não seja diminuída por causa da aproximação com a concentração de saturação. Os cálculos que determinam a quantidade real liberada (Q real) seguem a Equação 8:

$$Q_{\text{real, t}} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \quad (\text{Ueda et al., 2009}) \quad \text{Equação 8}$$

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

C<sub>t</sub> = concentração obtida referente ao tempo t;

V<sub>r</sub> = volume da solução receptora (7 mL);

C<sub>c</sub> = concentração da amostragem anterior;

V<sub>c</sub> = volume amostrado (coletado + limpeza).

A compreensão de como as moléculas do composto ativo passa pelas membranas sintéticas leva ao entendimento dos fatores que influenciam na liberação do

composto ativo, a partir de sua matriz. Esta compreensão pode ser elucidada por tratamento matemático dos dados obtidos (York and Aulton, 2005). Por sua vez, após seleção de um modelo matemático adequado, é permitida a avaliação dos perfis em relação aos parâmetros derivados dos modelos aplicados. Os exemplos mais comuns encontrados na literatura são: zero ordem, primeira ordem e Higuchi entre outros (Polli et al., 1996, O'Hara et al., 1998).

O modelo cinético de zero ordem baseia-se na liberação lenta do composto ativo a partir de formas farmacêuticas que não se degradam. De maneira ideal, as preparações destinadas a veicular compostos ativos segundo liberação prolongada apresentam um perfil de liberação de ordem zero, verificando-se que a velocidade de difusão do fármaco, do interior para o exterior da matriz, é menor que a respectiva velocidade de dissolução, formando uma solução saturada, que permite a cedência constante do fármaco. Outro modelo proposto baseia-se na equação de Higuchi (1961), frequentemente utilizada para descrever a velocidade de liberação controlada do fármaco a partir de um sistema matricial. Higuchi descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo (Higuchi, 1961, Costa and Sousa Lobo, 2001).

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

Este ensaio foi desenvolvido da mesma maneira como descrito no ensaio de avaliação da cinética de liberação *in vitro* do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações, entretanto, foi utilizada membrana biológica e as amostras foram coletadas nos tempos 1, 2, 4, 8 e 12 horas. A membrana biológica escolhida foi pele dissecada da orelha de porco, sem o tecido subcutâneo e gorduroso presente abaixo da derme. Antes

de iniciar o experimento as peles foram dermatomizadas para a obtenção de uma espessura da pele que equivale à epiderme e derme (500  $\mu\text{m}$ ) utilizando um dermatômetro (Nouvag TCM300) (Figura 14). Para cada formulação foram utilizadas 6 células de difusão no estudo, sendo sempre uma delas usada como controle.



**Figura 14.** Pele da orelha de porco dermatomizada.

### **7.3 Avaliação da retenção no estrato córneo e na epiderme/derme do peptídeo**

#### **Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações**

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

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

Após a retirada do estrato córneo, as peles foram recortadas adequadamente em concordância com a área de exposição (1,77 cm<sup>2</sup>) e em contato com a formulação. Assim, foi verificada a retenção da epiderme/derme, picotando-se o restante da membrana com uma tesoura. Os fragmentos obtidos foram mergulhados em 4 mL de acetonitrila/água (1:1). A suspensão resultante foi levada ao homogeneizador tipo Turrax ® por 1 minuto, em seguida à sonicação em ultrassom para o rompimento das células por 15 minutos e à centrifuga por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e filtrado em membrana de 0,45 µm e quantificado por CLAE.

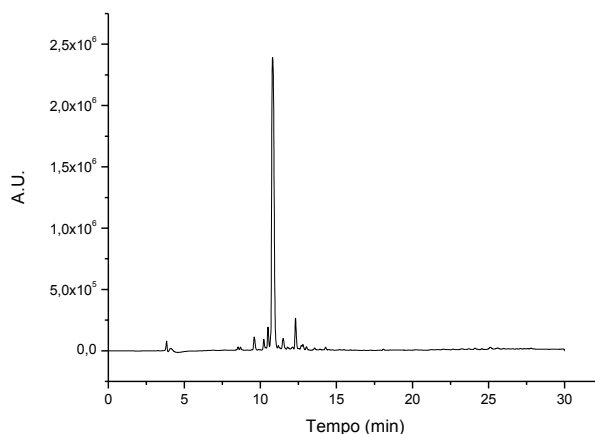


---

## *Resultados e Discussão*

## 1. Síntese do peptídeo

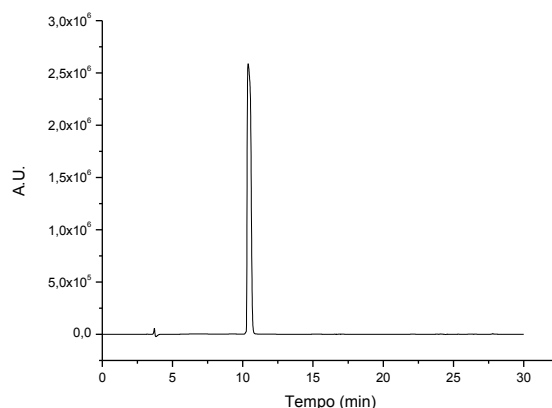
O perfil cromatográfico do peptídeo bruto, contendo impurezas referentes ao processo de síntese, pode ser observado na figura 15.



**Figura 15.** Perfil cromatográfico do peptídeo bruto.

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

O perfil cromatográfico do peptídeo puro (fração com maior grau de pureza) pode ser observado na figura 16.



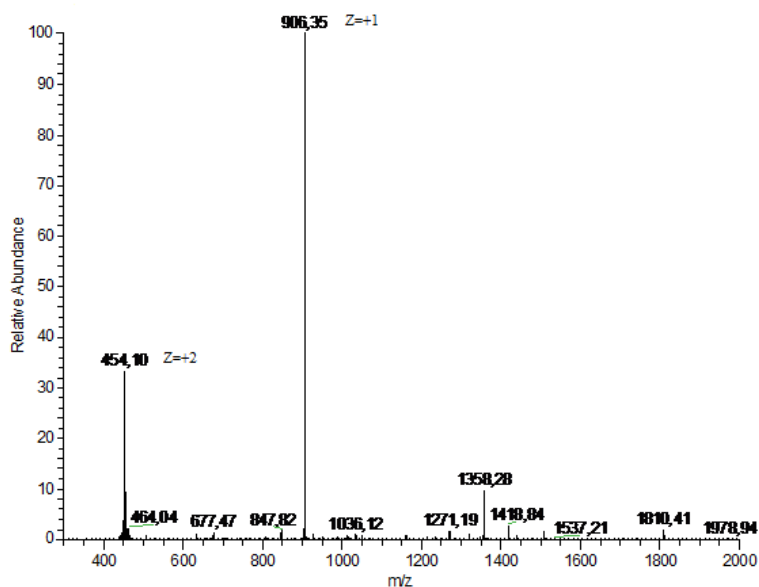
**Figura 16.** Perfil cromatográfico do peptídeo puro (100% de pureza).

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

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

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

O espectro obtido está apresentado na figura 17, onde a massa molecular do peptídeo observada no espectro é 906 para  $z = 1$  (905 - massa molecular calculada + 1 próton  $H^+$ ) e 454 para  $z = 2$  (905 - massa molecular calculada + 2 prótons  $H^+$ ). O valor teórico e o obtido no espectro de massas, a pureza do material e o tempo de retenção estão apresentados na tabela 3.



**Figura 17.** Espectro de massas do peptídeo puro.

**Tabela 3.** Resultado da síntese.

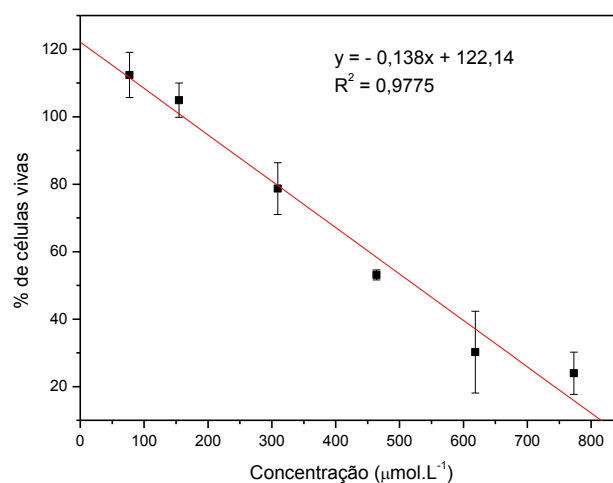
Peptídeo	Pureza (%) <sup>a</sup>	Tempo de retenção (min)	Massa Molecular (MM) – (g/mol)	
			MM <sub>Observada</sub>	MM <sub>Calculada</sub>
Ac-WAhx-KTTKS	> 97,5	10,4	906	905

<sup>a</sup> Pureza do material determinado por HPLC.

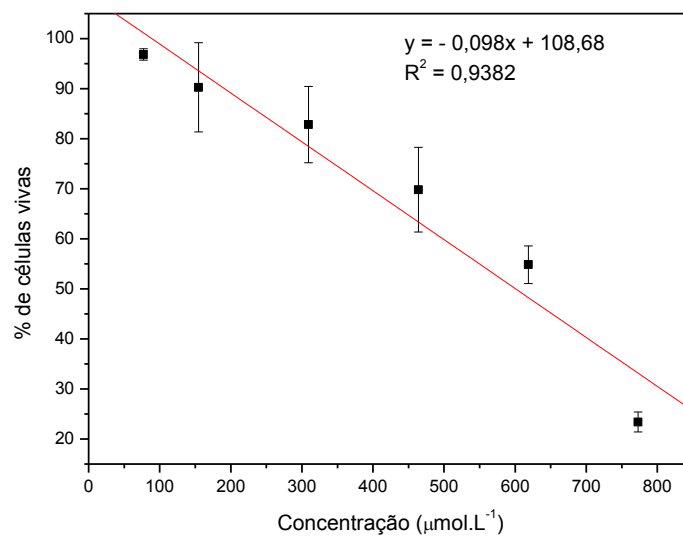
## 2. Avaliação do potencial citotóxico do peptídeo

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

Nas figura 18 e 19, estão apresentados os resultados obtidos para a linhagem HepG2 e HaCat, respectivamente. Foram construídas duas curvas dose *versus* resposta, uma para cada linhagem celular, sendo então possível utilizar a equação da reta, gerada por regressão linear, para ser determinada a concentração do peptídeo que é necessária para causar a letalidade de 50% das células (IC<sub>50</sub>).



**Figura 18.** Curva dose-resposta para o tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de peptídeo.



**Figura 19.** Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de peptídeo.

A tabela 4 apresenta os valores de IC<sub>50</sub> calculados a partir da equação da reta.

**Tabela 4.** Valores de IC<sub>50</sub> (μmol/L) para as células HepG2 e HaCat tratadas com o peptídeo.

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

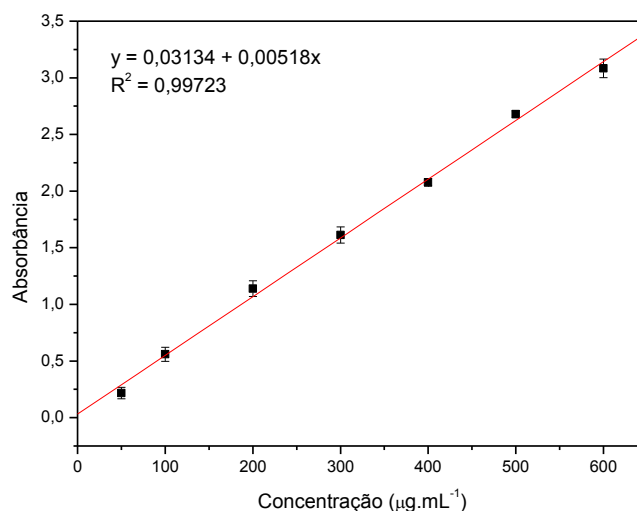
<sup>a</sup> ANOVA p<0,05, seguido do teste de Tukey

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de IC<sub>50</sub> das linhagens celulares.

A concentração do peptídeo para incorporação nas formulações será definida baseada nos valores de IC<sub>50</sub> e nos resultados da biossíntese de colágeno, obtendo elevado nível de segurança para aplicação tópica e comprovada efetividade.

### 3. Biossíntese de colágeno

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



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

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

**Tabela 5.** Concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 24 de tratamento.

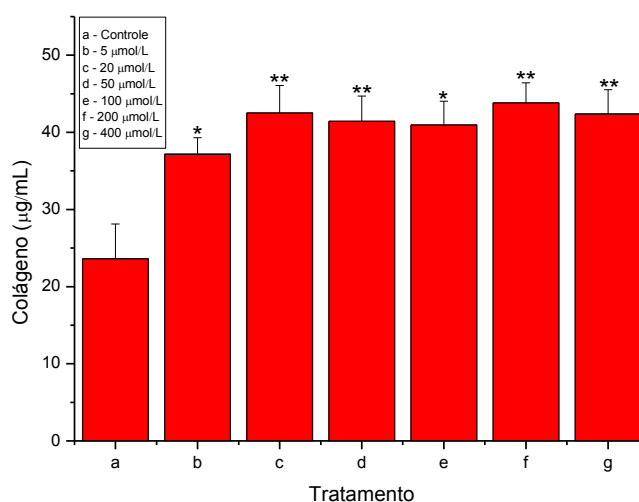
Tratamentos	Colágeno ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diferença controle ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>1</sup>	Colágeno (%) <sup>2</sup>
Controle	23,62 $\pm$ 4,5	----	----
5 $\mu\text{mol/L}$	37,17 $\pm$ 2,1	13,55	58
20 $\mu\text{mol/L}$	42,51 $\pm$ 3,6	18,89	80
50 $\mu\text{mol/L}$	41,41 $\pm$ 3,3	17,79	76
100 $\mu\text{mol/L}$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

<sup>1</sup> Colágeno produzido com os tratamentos menos o colágeno produzido do grupo controle

<sup>2</sup> Porcentagem de colágeno produzido em relação ao grupo controle

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

Após 24 horas foi possível observar alterações significativas na síntese de colágeno nos grupos controle e tratados com várias concentrações do peptídeo. Observa-se também que a partir da concentração de 20  $\mu\text{mol/L}$ , houve um patamar na concentração de colágeno produzido, ou seja, mesmo com o aumento da concentração de peptídeo, não houve aumento significativo na produção de colágeno, mantendo-se na média de 80% de colágeno produzido em relação ao controle.



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

Na tabela 6 estão listadas as concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 48 de tratamento.

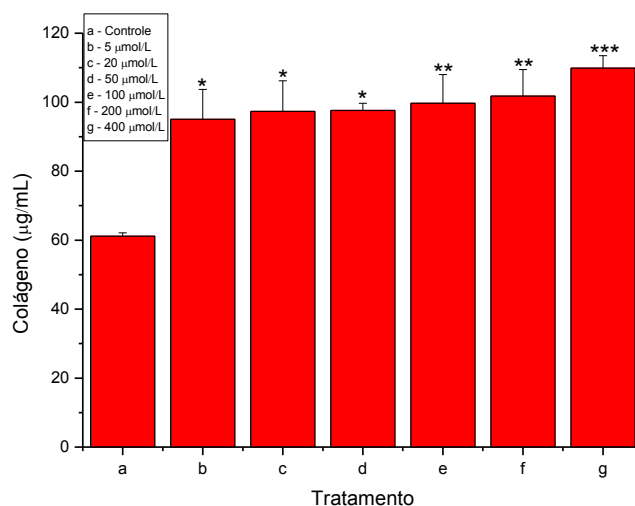
**Tabela 6.** Concentrações totais de colágeno produzido, as concentrações e as porcentagens de colágeno produzido em relação ao grupo controle no intervalo de 48 de tratamento.

Tratamentos	Colágeno ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diferença controle ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>1</sup>	Colágeno (%) <sup>2</sup>
Controle	61,15 $\pm$ 1,0	----	----
5 $\mu\text{mol/L}$	95,04 $\pm$ 8,6	33,89	56
20 $\mu\text{mol/L}$	97,34 $\pm$ 8,8	36,19	60
50 $\mu\text{mol/L}$	97,61 $\pm$ 2,1	36,46	60
100 $\mu\text{mol/L}$	99,67 $\pm$ 8,3	38,52	63
200 $\mu\text{mol/L}$	101,74 $\pm$ 7,7	40,59	67
400 $\mu\text{mol/L}$	109,84 $\pm$ 3,7	48,69	80

<sup>1</sup> Colágeno produzido com os tratamentos menos o colágeno produzido do grupo controle

<sup>2</sup> Porcentagem de colágeno produzido em relação ao grupo controle

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



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

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

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

Peterszegi e colaboradores estudaram o efeito do retinol e oligosacarídeos (RROP-4 e RROP-5) na biossíntese de colágeno em culturas de fibroblastos, usando o método colorimétrico picrosirius red. Os ativos produziram um significativo aumento na síntese de colágeno em 48 horas de tratamento, sendo que o retinol estimulou 107,9%, o RROP-4 137,5% e o RROP-5 140,1% comparado com o controle (Peterszegi et al., 2008).

A vitamina A (retinol) e seus derivados retinóides possuem alta capacidade de sintetizar colágeno na pele, mas por outro lado, são altamente irritantes quando em contato com a pele. Além disso, o uso prolongado dos retinóides está associado a muitos efeitos adversos, como teratogenicidade, uma vez que os retinóides atuam como hormônios e eliciam sua atividade biológica através da ativação de receptores nucleares, que levam a modulação da transcrição gênica (Fisher et al., 2002).

Robinson e colaboradores avaliaram os aspectos toxicológicos do derivado do KTTKS, o Palmitoil-KTTKS, incluindo estudos de irritação oral e ocular, sensibilização cutânea e mutagênicidade e concluiu que este composto é seguro para fins cosméticos até mesmo em uma concentração 30 vezes (250 ppm) mais do que a sua concentração recomendada. Portanto, a aplicação do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS na pele pode ser mais segura do que os retinóides (Robinson et al., 2005).

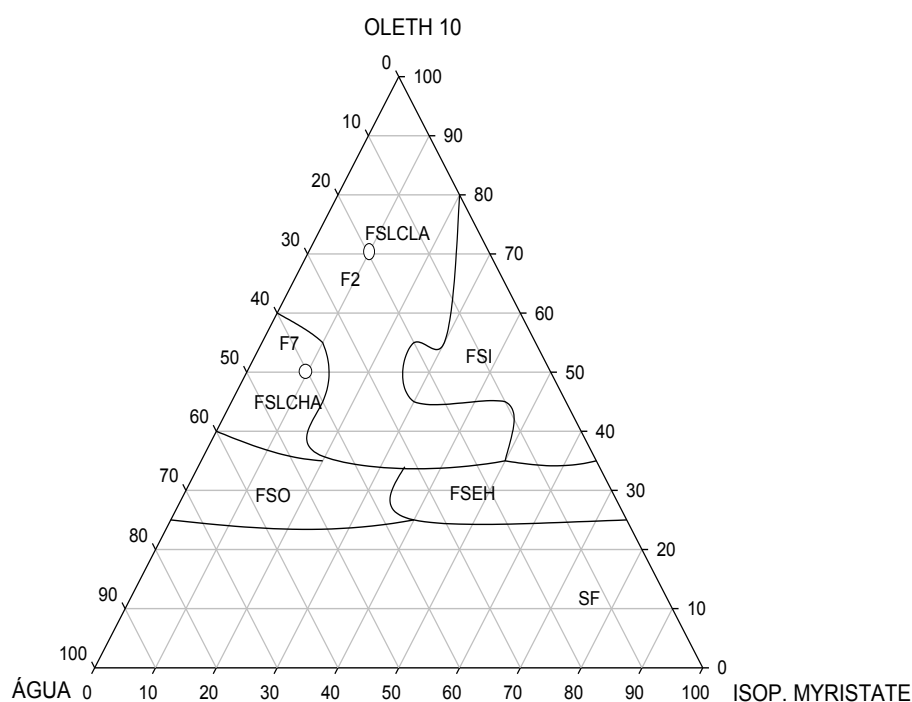
Faucz avaliou o efeito da luz intensa pulsada na síntese de colágeno para o tratamento do envelhecimento cutâneo através do método colorimétrico picrosirius red em cultura *in vitro* de fibroblastos, e os resultados demonstraram aumento significativo na síntese colágeno em 10 e 16 J/cm<sup>2</sup> de intensidade por 24 horas, sendo 64% e 43%, respectivamente, comparado com o controle (Faucz, 2011).

#### 4. Desenvolvimento dos sistemas coloidais

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

A figura 23 apresenta a construção do diagrama de fase contendo Oleth 10/Isopropyl myristate/Água ultrapura à 25 °C ±2 °C. Neste diagrama foram

identificadas seis fases (regiões): fase solução isotrópica (FSI), fase sistema líquido cristalino lamelar anisotrópica (FSLCLA), fase sistema líquido cristalino hexagonal anisotrópica (FSLCHA), fase sistema opaco (FSO), fase sistema emulsionado homogêneo (FSEH) e separação de fases (SF). As formulações escolhidas para a caracterização estão identificadas no diagrama.



**Figura 23.** Diagrama de fases ternário contendo Oleth 10 (tensoativo), Isopropyl Myristate (fase oleosa) e água ultrapura (fase aquosa). As áreas delimitadas representam: fase solução isotrópica (FSI), fase sistema líquido cristalino lamelar anisotrópica (FSLCLA), fase sistema líquido cristalino hexagonal anisotrópica (FSLCHA), fase sistema opaco (FSO), fase sistema emulsionado homogêneo (FSEH) e separação de fases (SF). Os pontos assinalados representam as formulações estudadas.

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

FSLCLA, característica provavelmente relacionada com a CMC do tensoativo atingida nessas concentrações. Conforme a concentração de água aumentou entre os sistemas, foi possível sugerir que a parte apolar da molécula do tensoativo se protegeu desse aumento de água se agrupando primeiramente em agregados micelares, que por sua vez se organizaram sob a forma de bicamadas na interface água/óleo separando ambas as fases, característica do arranjo líquido cristalino de fase lamelar. Ainda com o aumento da água foi possível observar que esses agregados se organizavam em estruturas cilíndricas bidimensionais, como a de um hexágono, caracterizando assim a fase hexagonal (FSLCHA). Essa mudança de fase provocou alterações relacionadas à anisotropia com a visualização de “estrias”, mudanças na distância entre os objetos espalhadores e também alterações relacionadas à viscosidade desses sistemas, características posteriormente confirmadas através da MLP, SAXS e das medidas reológicas, respectivamente. Também foi possível observar uma pequena região de sistemas opacos de alta viscosidade (FSO), a qual ocorreu em concentrações acima de 40% de água, característica provavelmente relacionada com a formação de possíveis ligações de hidrogênio, do oxigênio presente na molécula do tensoativo com água em excesso, dificultando sua mobilidade em direção à superfície das gotas de óleo, proporcionando sistemas menos transparentes (Neto et al., 2009). Já a formação de sistemas emulsionados homogêneos (FSEH) foi obtida em concentrações intermediárias de fase oleosa (40 a 60%). A separação de fases (SF) ocorreu em altas concentrações de fase oleosa ou aquosa e em baixa concentração de tensoativo.

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

## 5. Caracterização físico-química dos sistemas coloidais

Para caracterização dos sistemas foram selecionadas as formulações indicadas na figura 23, cujas concentrações dos componentes estão apresentadas na tabela 7. A emulsão preparada foi utilizada para comparação com os SLC nos ensaios. As formulações contendo peptídeo tiveram seu nome acrescido da letra P.

**Tabela 7.** Composição (%) dos sistemas líquido cristalinos para caracterização.

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

### 5.1 Determinação do pH

O pH exerce uma influência na solubilidade das substâncias, na estabilidade química, na compatibilidade fisiológica com os tecidos orgânicos onde a forma farmacêutica será aplicada de forma a minimizar a irritação e o desconforto na aplicação e finalmente na garantia do efeito terapêutico esperado para o medicamento (Thompson, 2004). A pele apresenta pH levemente ácido (4,6 – 5,8), que contribui para que ocorra proteção bactericida e fungicida em sua superfície. Além disso, as secreções cutâneas apresentam apreciável capacidade tamponante, importante propriedade, uma vez que o pH da pele é freqüentemente alterado em consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, expondo a pele a uma série de agentes agressores, em especial microorganismos (Leonardi et al., 2002). Sugere-se que as formulações de aplicação tópica permaneçam com pH entre 4 – 7.

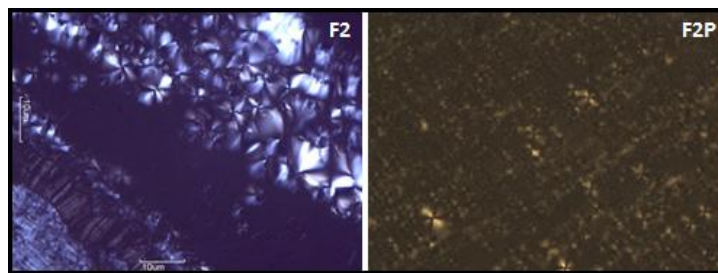
Foi observado que as formulações apresentaram pH dentro da faixa de pH da pele, numa faixa de 4,98 a 6,35, quando o peptídeo foi incorporado não houve variação do pH das formulações.

## **5.2 Microscopia de luz polarizada (MLP)**

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

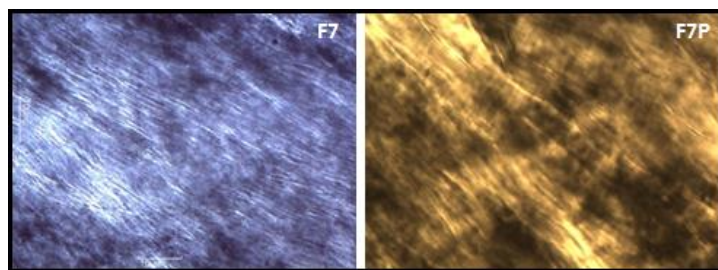
Sob um plano de luz polarizada, um material pode ser considerado anisotrópico ou isotrópico, a amostra é anisotrópica quando é capaz de desviar o plano de luz incidente (birrefringência), como é o caso das fases hexagonal e lamelar, ou isotrópica, quando não desviar a luz, como é o caso da fase cúbica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

A figura 24 apresenta as fotomicrografias da formulação F2 correspondentes ao comportamento estrutural dos sistemas sem e com o peptídeo. A formulação F2 apresentou áreas anisotrópicas, evidenciando a presença de estruturas semelhantes a “cruzes de malta”, as quais são características de fase lamelar. Aparentemente a incorporação do peptídeo não promoveu alterações significativas na estrutura do sistema.



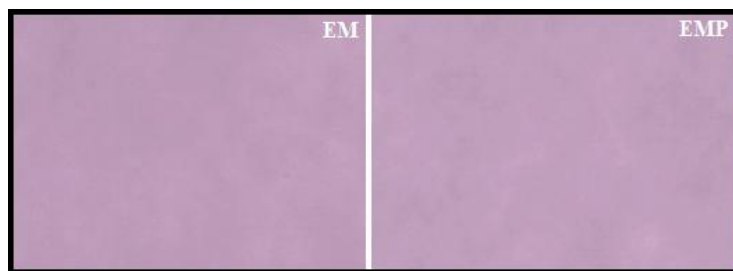
**Figura 24.** Fotomicrografias de MLP da formulação F2 (10% Isopropyl Myristate, 70% Oleth 10 e 20% água), sendo F2P contendo peptídeo.

A figura 25 apresenta as fotomicrografias da formulação F7 correspondentes ao comportamento estrutural dos sistemas sem e com o peptídeo. A formulação F7 apresentou áreas anisotrópicas, evidenciando a presença de estruturas semelhantes a “estrias”, as quais são características de fase hexagonal. Aparentemente a incorporação do peptídeo não promoveu alterações significativas na estrutura do sistema.



**Figura 25.** Fotomicrografias de MLP da formulação F7 (10% Isopropyl Myristate, 50% Oleth 10 e 40% água), sendo F7P contendo peptídeo.

A figura 26 apresenta as fotomicrografias da formulação EM, sem e com o peptídeo. Na formulação EM não foi observado áreas anisotrópicas, evidenciado por um “campo escuro”, o mesmo ocorreu com a formulação com o peptídeo. As moléculas de tensoativo das emulsões simples se organizam em forma de micelas, não podendo ser observadas por MLP.



**Figura 26.** Fotomicrografias de MLP da formulação EM (emulsão O/A), sendo EMP contendo peptídeo.

De acordo com os resultados acima, observou-se diferentes estruturas que podem ser formadas com a modificação da composição dos sistemas, por exemplo, quanto maior a quantidade de água do sistema, mais estruturado o sistema tende a ficar. A fase lamelar, ao se formar, assume um estado intumescido pelo fato da água ser adsorvida entre as camadas de tensoativo, formando o domínio hidrofílico do sistema líquido cristalino. A água situada entre as lamelas possui características de água ligada, devido às fortes interações entre suas moléculas e os grupos polares dos tensoativos, isto não permite a perda por evaporação, necessitando de maior energia que a disponível à temperatura da superfície cutânea para evaporar (Chorilli et al., 2009, Andrade et al., 2007). A organização interna da fase hexagonal pode estar relacionada com o arranjo ocorrido entre os três componentes constituintes das formulações, principalmente entre a água e o tensoativo. Com o aumento da quantidade da água e conseqüente diminuição do tensoativo, a disposição do tensoativo no sistema pode se rearranjar para outras formas. Quando as forças de solvatação no lado da água são maiores que aquelas no lado do óleo, o filme de tensoativo se curva em direção à fase óleo, assumindo uma configuração positiva assim, promovendo organizações mais rígidas e mais complexas, típicas de fase hexagonal (Formariz et al., 2005).

### 5.3 Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS)

O SAXS pode ser empregado para elucidação da estrutura interna de um sistema líquido cristalino, fornecendo informações sobre o arranjo dos objetos espalhadores da amostra. As curvas de SAXS para sistemas líquido cristalinos exibem picos, e a posição relativa desses picos no vetor de espalhamento ( $q$ ) é o que determina o tipo de arranjo que os átomos formam na matriz (Chorilli et al., 2011, Wang and Zhou, 2009). Para calcular a correlação da distância entre os objetos espalhadores usa-se a Equação 9.

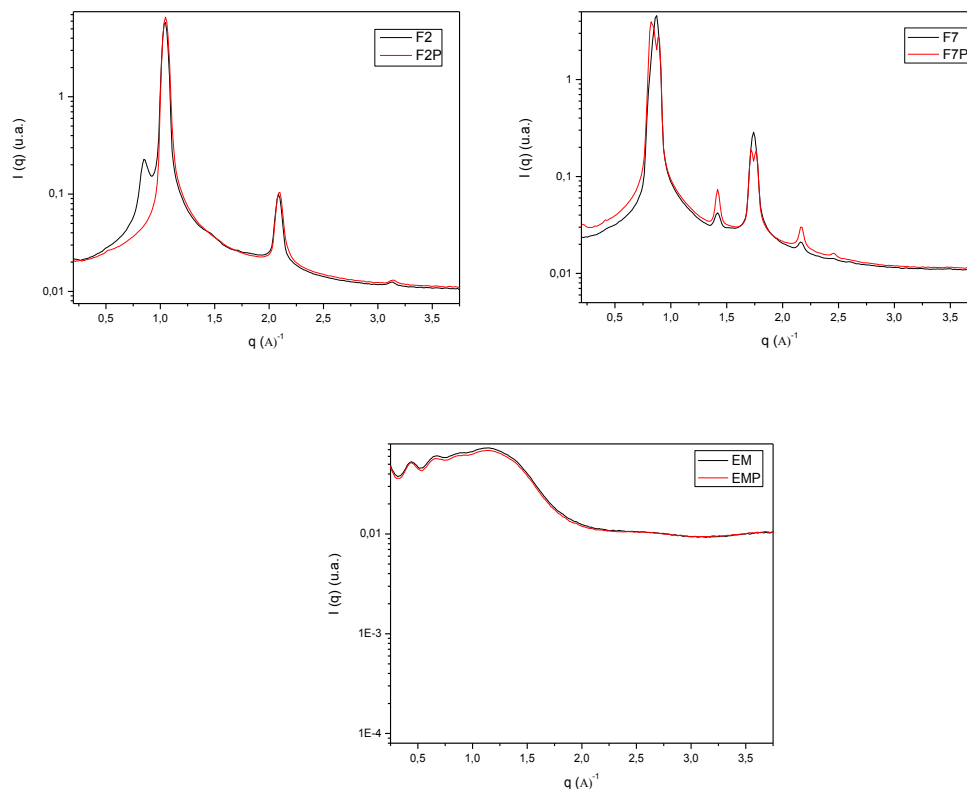
$$d = 2\pi/q_{\max} \quad \text{Equação 9}$$

Onde:  $d$  é a distância dos picos em relação ao primeiro pico

$q_{\max}$  é o valor de  $q$  no pico de refração

A distância  $d$  calculada para cada pico deve seguir a relação  $\sqrt{1} : \sqrt{3} : \sqrt{4}$  para fase hexagonal e 1:2:3:4:5 para fase lamelar (Negrini and Mezzenga, 2011).

A figura 27 apresenta os espectros de SAXS composto pela intensidade de espalhamento,  $I(q)$ , em função do vetor de espalhamento ( $q$ ), das formulações F2, F7 e EM sem e com peptídeo. As distâncias de correlação determinadas pelo ensaio de SAXS estão apresentadas na tabela 8.



**Figura 27.** Espectros de SAXS das formulações F2, F7 e EM, sendo que a formulação com a letra P contém o peptídeo.

**Tabela 8.** As distâncias de correlação determinadas pelo ensaio de SAXS das formulações F2, F7 e EM, sendo que a amostra com a letra **P** contém peptídeo.

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

Nota-se a presença de picos estreitos e definidos para as formulações F2 e F7 com e sem o peptídeo, indicando um maior nível de organização estrutural destes sistemas. Através do valor da posição do vetor de espalhamento ( $q_{max}$ ) da formulação F2, foi possível o emprego da relação  $d = 2\pi/q_{max}$ . Assim, determinou-se a distância entre os objetos espalhadores através da razão 1:2:3:4:5, o que equivale a um arranjo líquido cristalino de periodicidade de fase lamelar. Para a formulação F7 foi observado uma menor distância entre os objetos espalhadores, portanto, arranjos mais organizados foram obtidos. O emprego da relação  $d = 2\pi/q_{max}$  determinou a distância entre os objetos espalhadores através da razão  $\sqrt{1} : \sqrt{3} : \sqrt{4}$ , revelando uma periodicidade em um arranjo líquido cristalino de fase hexagonal. Porém, sugere-se ainda a presença de uma mistura de fase hexagonal com lamelar, como observado nos valores de  $d$  obtidos pela curva de SAXS na tabela 8. No espectro da formulação EM não foi visualizado picos e sim apenas um máximo de intensidade num valor  $q \neq 0$ , seguido de uma longa cauda, característica do perfil de espalhamento de arranjos menos organizados, como sistemas micelares. Os resultados de SAXS corroboram com os resultados de MLP, onde observamos na formulação F2 “cruzes de malta”, caracterizando fase lamelar, na formulação F7 “estrias”, caracterizando fase hexagonal e na formulação EM “campo escuro”. As distâncias de correlação calculadas através do SAXS confirmaram a estruturação observada nas fotomicrografias da MLP e para as formulações com o peptídeo incorporado observamos que todas apresentaram praticamente sobreposição das curvas, assim sugerindo que a incorporação do peptídeo não alterou a estrutura do sistema.

#### **5.4 Reologia**

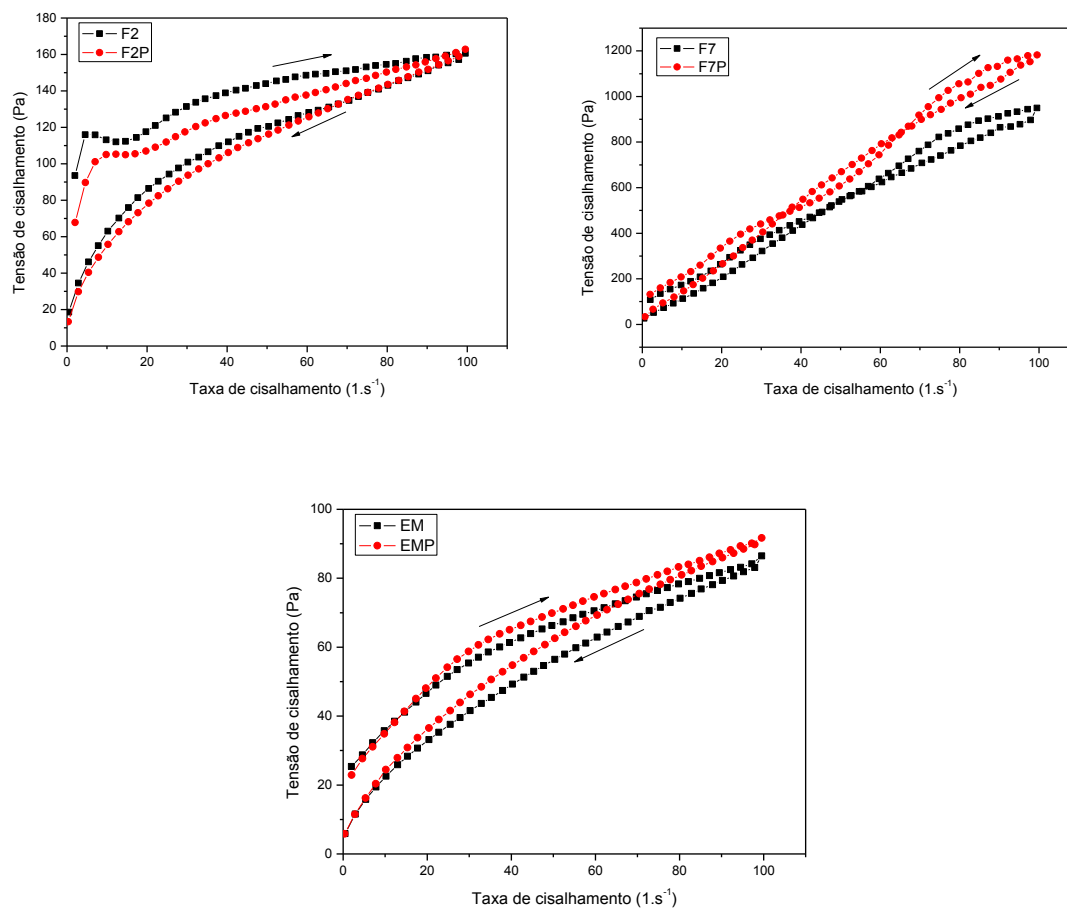
A caracterização reológica dos sistemas selecionados teve como objetivo avaliar as características estruturais das formulações, determinando se a formulação tem comportamento Newtoniano ou não-Newtoniano, se o fluido é plástico, pseudoplástico ou dilatante, se apresenta tixotropia e se possui comportamento viscoelástico (Muller-Goymann, 2004).

Na figura 28 estão apresentadas as curvas de fluxo das formulações F2, F7 e EM sem e com peptídeo.

Os reogramas apresentados na figura 28 demonstram que não existe relação linear entre os valores de tensões de cisalhamento e das taxas de cisalhamento, explicando o comportamento não-Newtoniano das formulações F2, F7 e EM (Milan et al., 2007).

Todas as formulações apresentam perfil da curva característico de um fluido plástico, onde é necessária uma tensão inicial para o fluido escoar na direção do fluxo, diminuindo a sua resistência interna e a viscosidade, em função da taxa de cisalhamento. Esta característica é desejável a produtos de aplicação tópica, em que após o cisalhamento a resistência inicial para a formulação fluir diminui, refletindo a facilidade de aplicação (Morais et al., 2005).

As formulações apresentam tixotropia, isto é, grande habilidade de voltar à estrutura inicial após a perturbação do sistema, devido à área de histerese entre a curva ascendente e descendente, ou seja, após ter sofrido o cisalhamento crescente ( $0-100 \text{ s}^{-1}$ ), com a redução gradual deste cisalhamento até que cessasse, não foi observada uma recuperação total da estrutura. Foi observada diferença estatisticamente significativa nos valores de área de histerese das formulações, o mesmo não ocorreu entre a formulação e a formulação incorporada de peptídeo, conforme apresentado na tabela 9.



**Figura 28.** Curvas de fluxo das formulações F2, F7 e EM, sendo que a formulação com a letra P contém o peptídeo.

**Tabela 9.** Área de histerese das formulações F2, F7 e EM, sendo que a formulação com a letra **P** contém o peptídeo.

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

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

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

$$\tau = \tau_0 + K\gamma^n \quad \text{Equação 10}$$

Os valores correspondentes as variáveis presentes na equação de Herschel-Bulkley para as formulações, estão apresentados na tabela 10.

**Tabela 10.** Média dos parâmetros que descrevem as formulações F2, F7 e EM, de acordo com o modelo reológico de Herschel-Bulkley.

	$\tau_0$	$K$	$n$
<b>F2</b>	57,91	7,63	0,5098
<b>F2P</b>	81,78	7,41	0,4222
<b>F7</b>	70,23	16,45	0,9426
<b>F7P</b>	125,03	15,79	0,9043
<b>EM</b>	7,63	12,42	0,4191
<b>EMP</b>	3,12	12,64	0,3807

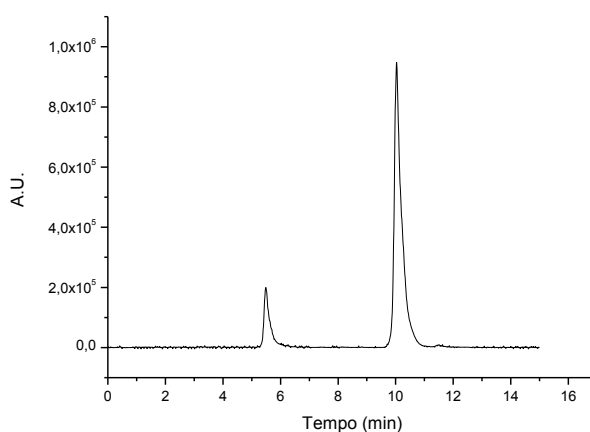
Os valores de  $K$  e  $n$  obtidos caracterizam o índice de consistência e o índice de comportamento de fluxo, respectivamente. O índice de consistência indica o grau de resistência do fluido diante do escoamento, ou seja, quanto maior o valor de  $K$ , mais viscoso será o fluido. O índice de comportamento de fluxo quando apresentar valor menor que 1, determina que o fluido é do tipo não-Newtoniano, pseudoplástico, como já foi observado nas curvas de fluxo (Borges et al., 2009).

## **6. Validação de metodologia analítica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

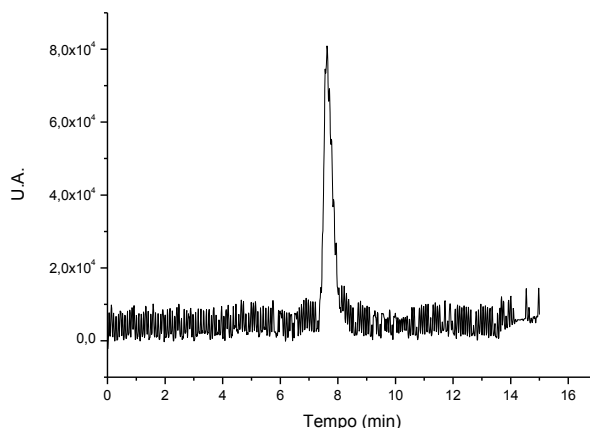
### **6.1 Especificidade e seletividade**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

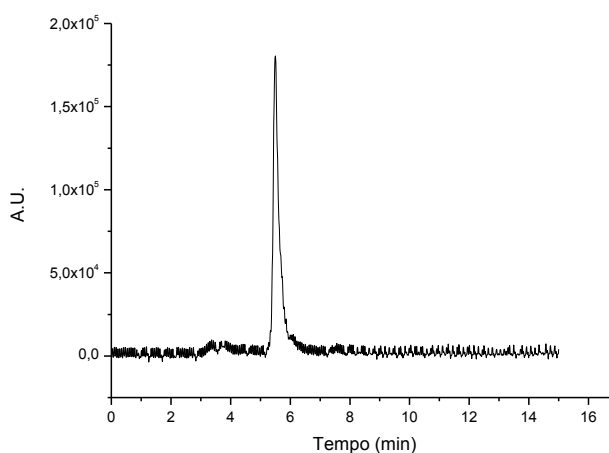
Foram injetadas soluções placebo das formulações EM, F2 e F7 para verificar se as formulações iriam interferir na quantificação do peptídeo. Os picos obtidos nas soluções placebo das formulações não apresentaram pico no mesmo tempo de retenção do peptídeo (aproximadamente 10,0 minutos), portanto não interferiram na análise, conforme figura 29. A figura 30 representa a injeção da solução placebo da formulação EM e a figura 31 a injeção da solução placebo da formulação F2, a injeção da F7 não foi necessária pois contém os mesmos componentes da formulação F2, variando-se somente a proporção deles.



**Figura 29.** Cromatograma da solução do peptídeo (1,5461  $\mu\text{mol/L}$ ) diluído em fase móvel. Condições cromatográficas: fases móvel constituídas por solvente A (0,045% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q) e solvente B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetonitrila), produzindo um gradiente de 10 – 25% de solvente B em 15 minutos de corrida, coluna C18 (0,46 cm – 25 cm, 5  $\mu\text{m}$ , KROMASIL 300-5C18), fluxo 1 mL/minuto, injeção 50  $\mu\text{L}$ , detector de fluorescência, detecção à 280 nm em 350 nm e temperatura do forno de 25 °C.



**Figura 30.** Cromatograma da solução placebo da formulação EM. Condições cromatográficas: fases móvel constituídas por solvente A (0,045% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q) e solvente B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetonitrila), produzindo um gradiente de 10 – 25% de solvente B em 15 minutos de corrida, coluna C18 (0,46 cm – 25 cm, 5  $\mu$ m, KROMASIL 300-5C18), fluxo 1 mL/minuto, injeção 50  $\mu$ L, detector de fluorescência, detecção à 280 nm em 350 nm e temperatura do forno de 25 °C.

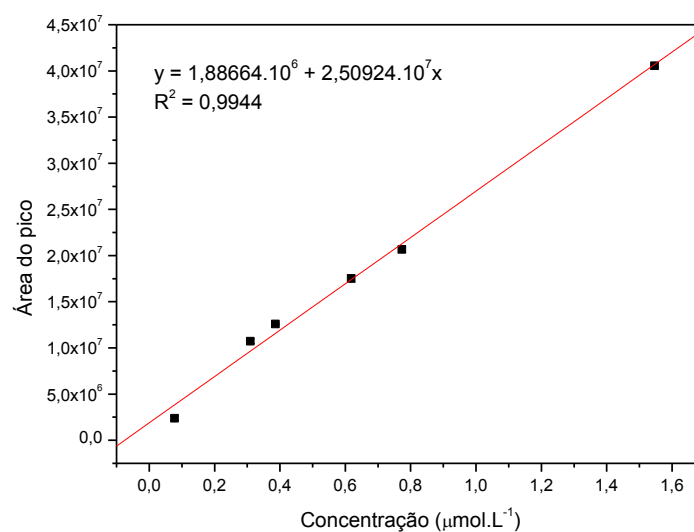


**Figura 31.** Cromatograma da solução placebo da formulação F2. Condições cromatográficas: fases móvel constituídas por solvente A (0,045% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q) e solvente B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetonitrila), produzindo um gradiente de 10 – 25% de solvente B em 15 minutos de corrida, coluna C18 (0,46 cm – 25 cm, 5  $\mu$ m, KROMASIL 300-5C18), fluxo 1 mL/minuto, injeção 50  $\mu$ L, detector de fluorescência, detecção à 280 nm em 350 nm e temperatura do forno de 25 °C.

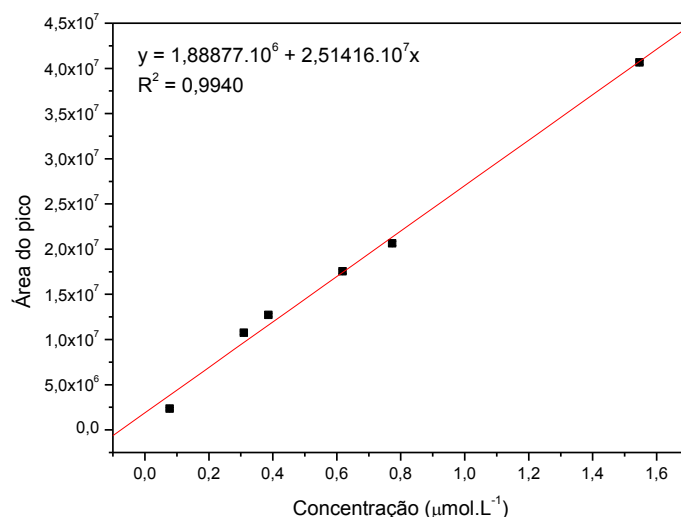
## 6.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

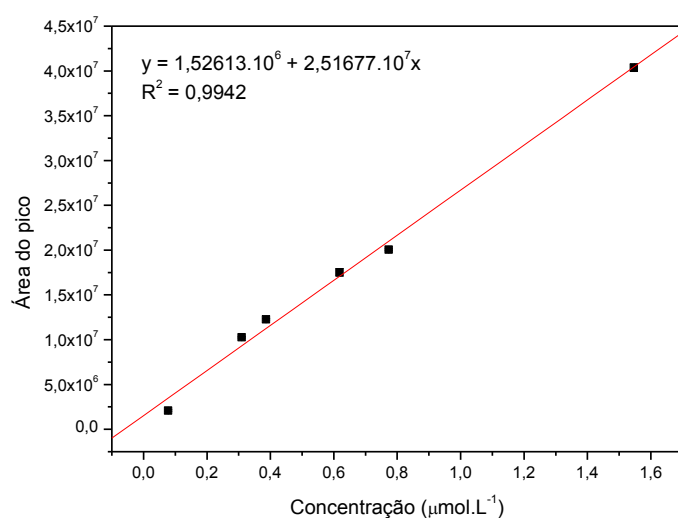
Foram construídas três curvas analíticas com seis concentrações (0,0773, 0,3092, 0,3865, 0,6184, 0,7731, 1,5461  $\mu\text{mol/L}$ ) do peptídeo que estão apresentadas nas figuras 32, 33 e 34.



**Figura 32.** Curva analítica 1 do peptídeo em fase móvel, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).



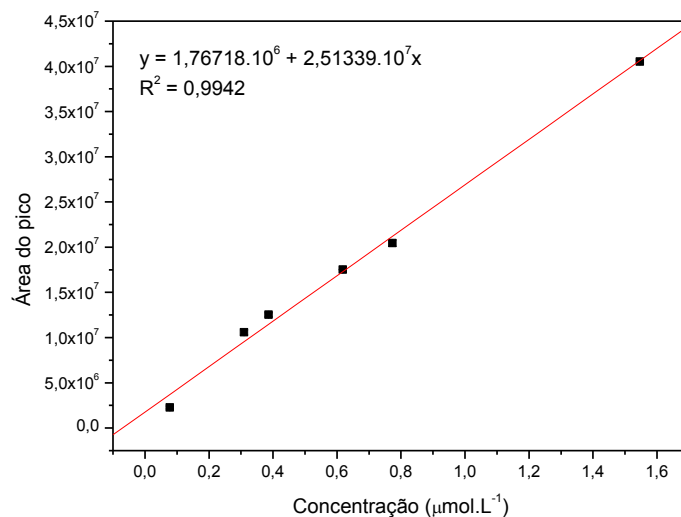
**Figura 33.** Curva analítica 2 do peptídeo em fase móvel, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).



**Figura 34.** Curva analítica 3 do peptídeo em fase móvel, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

As curvas 1, 2 e 3 apresentaram-se linear no intervalo de concentração de 0,0773 a 1,5461 µmol/L, com coeficiente de correlação acima de 0,99, sendo critério mínimo aceitável pela (ANVISA, 2003) para considerar o método linear. Assim, foi construída

uma nova curva analítica a partir do tratamento estatístico das curvas 1, 2 e 3, com médias e desvio padrão de cada ponto, representada na figura 35.



**Figura 35.** Média das curvas analíticas do peptídeo em fase móvel, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

Na curva média construída, foi obtido um coeficiente de correlação de 0,9942, a intersecção com o eixo Y (a) é igual a  $1,76718.10^6$  e o coeficiente angular é igual a  $2,51339.10^7$ . Estes valores são os parâmetros necessários para posterior quantificação do peptídeo.

### 6.3 Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ANVISA, 2003).

**Repetibilidade ou precisão intra-corrída**

Na tabela 11 estão apresentados os dados da repetibilidade do método de quantificação do peptídeo.

**Tabela 11.** Avaliação da repetibilidade do método analítico de quantificação do peptídeo.

CT	CE 1	CE 2	CE 3	Média	Desvio	DPR
( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\mu\text{mol/L}$ )		padrão	(%)
C 1	0,0736	0,0725	0,0687			
	0,0773			0,0726	0,0030	4,0725
C 2	0,0692	0,0733	0,0739			
C 1	0,4277	0,4294	0,4310			
	0,3865			0,4219	0,0164	3,8797
C 2	0,4201	0,4353	0,4235			
C 1	1,5522	1,5325	1,5455			
	1,5461			1,5453	0,0078	0,5072
C 2	1,5371	1,5506	1,5530			

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

C1: Corrida no período 1

C2: Corrida no período 2

**Precisão intermediária ou precisão inter-corrídas**

Na tabela 12 estão apresentados os dados da precisão intermediária do método de quantificação do peptídeo.

**Tabela 12.** Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do peptídeo.

CT	CE 1	CE 2	CE 3	Média	Desvio	DPR
( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\mu\text{mol/L}$ )	( $\mu\text{mol/L}$ )		padrão	(%)
C 1	0,0855	0,0805	0,0826			
	0,0773			0,0804	0,0031	3,8652
C 2	0,0808	0,0797	0,0763			
C 1	0,4277	0,4258	0,4308			
	0,3865			0,4179	0,0150	3,5781
C 2	0,4220	0,4184	0,4141			
C 1	1,5522	1,5324	1,5455			
	1,5461			1,5404	0,0122	0,7923
C 2	1,542087	1,548129	1,516512			

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

C1: Corrida no dia 1

C2: Corrida no dia 2

O método em análise pode ser considerado preciso, pois os valores de DPR obtidos são menores que 5% (ANVISA, 2003).

#### 6.4 Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a equação descrita nos métodos em Limite de detecção. Os valores estão apresentados na tabela 13.

**Tabela 13.** Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do peptídeo.

	<b>Intercepção com o eixo Y</b>
Curva 1	$1,88664 \cdot 10^6$
Curva 2	$1,88877 \cdot 10^6$
Curva 3	$1,52613 \cdot 10^6$
<b>Desvio padrão</b>	188758,1402
<b>Inclinação da curva de calibração</b>	$2,51339 \cdot 10^7$
<b>Limite de detecção</b>	0,02253 $\mu\text{mol/L}$

Sendo assim, o método analítico é capaz de detectar a concentração mínima de 0,02253  $\mu\text{mol/L}$ .

### 6.5 Limite de quantificação

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições estabelecidas (ANVISA, 2003).

O valor calculado segundo a equação descrita nos métodos em Limite de quantificação foi de 0,07510  $\mu\text{mol/L}$  de peptídeo, sendo esta a menor concentração que pode ser determinada pelo método em estudo.

### 6.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003).

A tabela 14 apresenta os resultados obtidos na análise da exatidão do método analítico.

**Tabela 14.** Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do peptídeo.

CT ( $\mu\text{mol/L}$ )	CE 1 ( $\mu\text{mol/L}$ )	CE 2 ( $\mu\text{mol/L}$ )	CE 3 ( $\mu\text{mol/L}$ )	Exatidão (%)
0,0773	0,0725	0,0738	0,0802	97,7640
0,3865	0,4136	0,4035	0,4079	104,9723
1,5461	1,5407	1,5435	1,5327	99,7404

CT: concentração teórica

CE: concentração experimental

O método foi considerado exato, pois não houve variação maior que 5% entre as concentrações teóricas e as concentrações experimentais analisadas (ANVISA, 2003).

### 6.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003). Para isto foi utilizado um solvente (acetonitrila) de fabricante diferente ao utilizado na construção da curva analítica e os resultados comparados para a determinação do DPR, conforme tabela 15.

**Tabela 15.** Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do peptídeo.

CT ( $\mu\text{mol/L}$ )	CE 1 ( $\mu\text{mol/L}$ )	CE 2 ( $\mu\text{mol/L}$ )	CE 3 ( $\mu\text{mol/L}$ )	Média	Desvio padrão	DPR (%)
<b>0,0773</b>	0,0699	0,0745	0,0712	0,0719	0,0024	3,2762
<b>0,3865</b>	0,3978	0,3702	0,3679	0,3787	0,0166	4,3954
<b>1,5461</b>	1,5579	1,5368	1,5935	1,5627	0,0286	1,8327

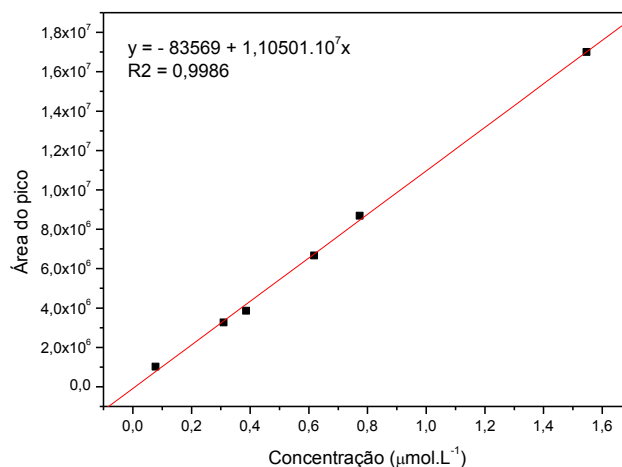
CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

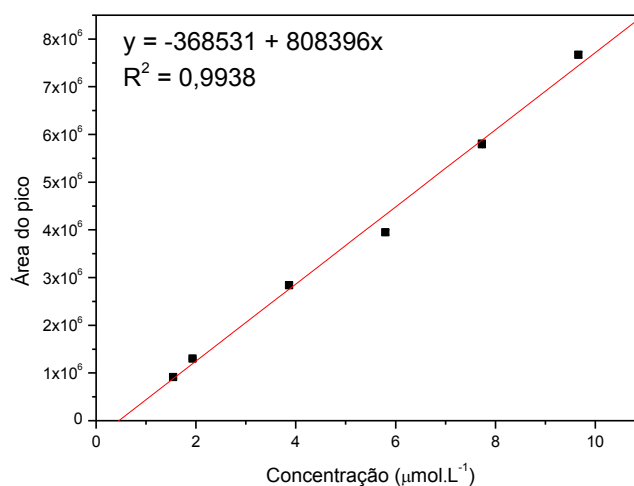
Diante dos resultados acima, o método foi considerado robusto.

### 6.8 Curva analítica com solventes diferentes

Duas novas curvas analíticas foram construídas com os solventes, tampão fosfato pH 7,4 (solução receptora) e acetonitrila/água (1:1), pois foram utilizados na avaliação da liberação do peptídeo e da permeação e retenção cutânea. As curvas estão apresentadas nas figuras 36 e 37.



**Figura 36.** Curva analítica do peptídeo em solução receptora, equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).



**Figura 37.** Curva analítica do peptídeo em acetonitrila/água (1:1), equação da reta (y) e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

## 7. Liberação do peptídeo, permeação e retenção cutânea *in vitro*

Foram avaliadas três formulações diferentes (F2, F7 e EM) contendo 220,87 µmol/L do peptídeo. Tal procedimento foi adotado para que fosse possível avaliar se a

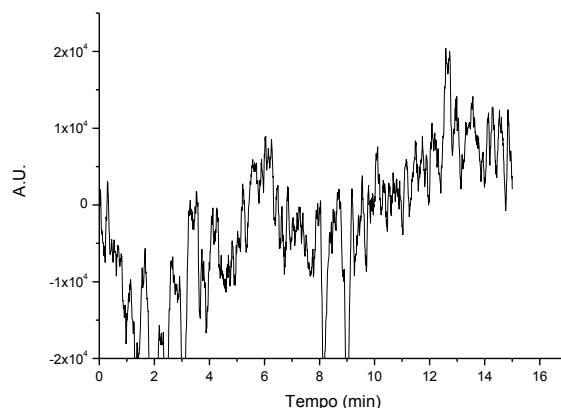
formulação tem influência no perfil de liberação, permeação e retenção cutânea e, sobretudo, para que a partir da concentração de liberação, permeação e retenção cutânea fosse possível avaliar a efetividade e segurança destas formulações, no que diz respeito aos ensaios de biossíntese de colágeno e avaliação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

Para a quantificação do peptídeo liberado da formulação, que permeou e ficou retido na epiderme e derme foi utilizada a metodologia desenvolvida e validada em CLAE. Para isso, foram utilizadas as curvas analíticas construídas com concentrações do peptídeo usando como solventes, o tampão fosfato (pH 7,4) e a uma solução de acetonitrila/água (1:1), mostradas nas figuras 36 e 37. Na avaliação da liberação do peptídeo e da permeação cutânea, o tampão fosfato (pH 7,4) foi usado como solução receptora e, na avaliação da retenção do peptídeo no estrato córneo e na epiderme/derme, a solução de acetonitrila/água (1:1) foi utilizada para a extração do ativo da membrana biológica.

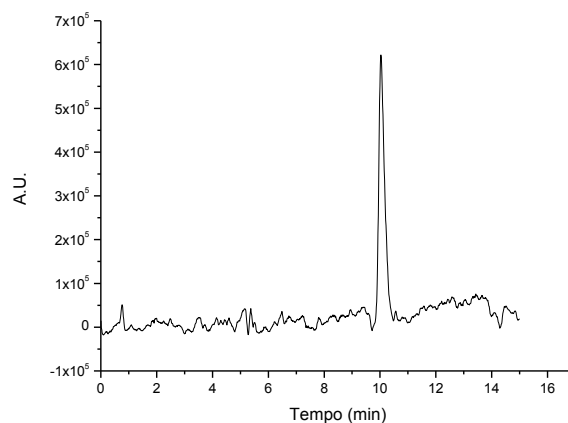
As condições “*sink*” foram garantidas, uma vez que a solubilidade do peptídeo em solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) é de 4,553 mol/L.

### **7.1 Análise de interferentes**

Foi injetada em CLAE, nas condições previamente validadas, a solução receptora e o peptídeo, uma concentração conhecida, dissolvido em solução receptora para verificação da sua influência nos ensaios de liberação e permeação. Os resultados obtidos estão na figura 38 e 39.



**Figura 38.** Cromatograma da solução receptora (tampão fosfato pH 7,4). Condições cromatográficas: fases móvel constituídas por solvente A (0,045% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q) e solvente B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetonitrila), produzindo um gradiente de 10 – 25% de solvente B em 15 minutos de corrida, coluna C18 (0,46 cm – 25 cm, 5  $\mu$ m, KROMASIL 300-5C18), fluxo 1 mL/minuto, injeção 50  $\mu$ L, detector de fluorescência, detecção à 280 nm em 350 nm e temperatura do forno de 25 °C.



**Figura 39.** Cromatograma do peptídeo em solução receptora (tampão fosfato pH 7,4). Condições cromatográficas: fases móvel constituídas por solvente A (0,045% de ácido trifluoroacético em água Milli-Q) e solvente B (0,036% de ácido trifluoroacético em acetonitrila), produzindo um gradiente de 10 – 25% de solvente B em 15 minutos de corrida, coluna C18 (0,46 cm – 25 cm, 5  $\mu$ m, KROMASIL 300-5C18), fluxo 1 mL/minuto, injeção 50  $\mu$ L, detector de fluorescência, detecção à 280 nm em 350 nm e temperatura do forno de 25 °C.

Verifica-se nas figuras 38 e 39, que a solução receptora não influencia a análise, pois não foi observado pico no mesmo tempo de retenção do peptídeo.

## 7.2 Avaliação da cinética de liberação do peptídeo *in vitro*

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

A solução receptora foi coletada das células de Franz nos tempos determinados e, em seguida quantificadas por CLAE. A partir dos resultados, a concentração de peptídeo foi calculada através da equação da reta obtida da curva analítica do peptídeo em solução receptora. Assim, as concentrações obtidas foram aplicadas na equação 8, descrita em Avaliação da cinética de liberação *in vitro* do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações. Através destes valores, foram elaboradas as tabelas 16, 17 e 18, para cada formulação. O coeficiente de variação (CV) foi calculado através da equação 11.

$$CV = \frac{DP}{M} \times 100 \quad \text{Equação 11}$$

Onde: *DP* é o desvio padrão

*M* é a média das seis replicatas

**Tabela 16.** Liberação do peptídeo da formulação F2.

Tempo (h)	Qreal ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ )	%	CV (%)
0,5	0,26	0,81	7,6
1	0,42	1,29	5,5
2	0,73	2,21	6,2
4	1,13	3,45	4,5
6	1,75	5,35	4,2
8	2,43	7,42	4,7
10	3,29	10,05	3,6
12	4,43	13,52	4,5

**Tabela 17.** Liberação do peptídeo da formulação F7.

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

**Tabela 18.** Liberação do peptídeo da formulação EM.

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

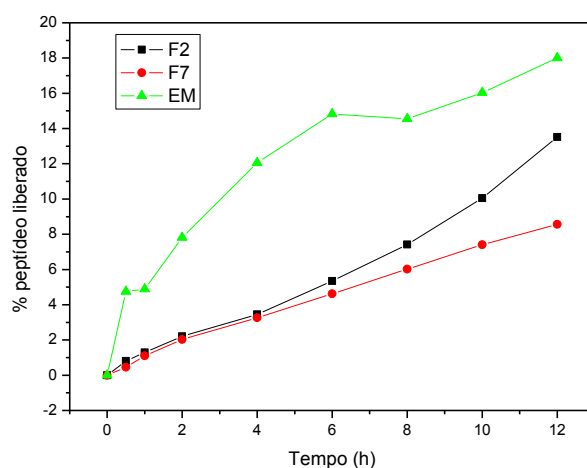
Observa-se que o CV do ensaio de liberação do peptídeo está dentro dos limites especificados pelo SCCP (*Scientific Committee on Consumer Products*, 2006), ou seja, menores que 10%.

Após 12 horas de avaliação, foi verificada maior porcentagem de liberação do peptídeo na formulação EM (18%). Nesta formulação o ativo está solubilizado na fase aquosa da emulsão e, esta não possui estruturas muito ordenadas, assim a difusão do peptídeo é favorecida, uma vez que as barreiras para a difusão do ativo são menores. As formulações F2 e F7 liberaram de forma controlada o peptídeo dos sistemas, sendo que uma menor porcentagem liberada após 12 horas é observada para a formulação F7, em comparação com a F2. Isto ocorre provavelmente em função do arranjo estrutural existente neste sistema (fase hexagonal). A mobilidade das moléculas do ativo é diminuída devido à presença de barreiras físicas existentes em razão da formação dos cilindros de tensoativo da fase líquido cristalina. Já na formulação F2, a liberação do ativo foi um pouco maior devido à presença de lamelas de tensoativo, que proporcionam

uma melhor mobilidade do ativo, pois são estruturas menos rígidas. Nas formulações F2 e F7, o ativo pode estar presente na interface tensoativo-água ou ainda interagindo com a fase aquosa localizada no exterior dos cilindros, fase hexagonal, e entre as lamelas, fase lamelar. A figura 40 apresenta o perfil de liberação do peptídeo nas formulações.

Sugere-se que a liberação do peptídeo contido nas formulações foi influenciada pelo arranjo estrutural presente nos SLC, e não pela viscosidade dos sistemas. Pois não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de viscosidade dos sistemas, como mostrado nas medidas reológicas em Caracterização dos Sistemas Coloidais.

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



**Figura 40.** Perfil de liberação das formulações F2, F7 e EM contendo peptídeo.

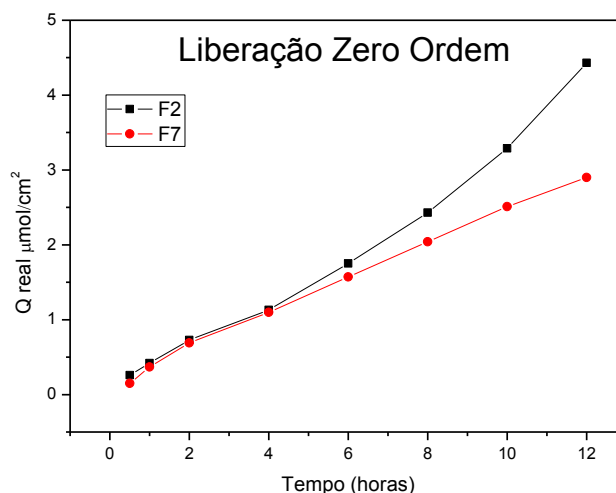
Foi avaliado também, o modelo de cinética de liberação do peptídeo nas formulações. Para isto, foram aplicados três modelos matemáticos para interpretação da

cinética de liberação: zero ordem, primeira ordem e modelo de Higuchi. Os modelos cinéticos foram avaliados através da linearização dos dados da liberação de acordo com o tempo e porcentagem do ativo liberado. O modelo de zero ordem representa a relação entre a quantidade real de peptídeo liberado ( $\mu\text{mol/L}$ ) em função do tempo; o modelo de primeira ordem representa o logaritmo da porcentagem de peptídeo liberado em função do tempo; o modelo de Higuchi representa a quantidade real de peptídeo liberado ( $\mu\text{mol/L}$ ) em função da raiz quadrada do tempo. Para a escolha do modelo mais adequado foi utilizado o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), que se aproxima da perfeita linearidade. Na tabela 19 estão apresentados os  $R^2$  da linearização das curvas dos perfis de liberação do peptídeo nas formulações.

**Tabela 19.** Coeficiente de correlação ( $R^2$ ) das formulações F2, F7 e EM dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi.

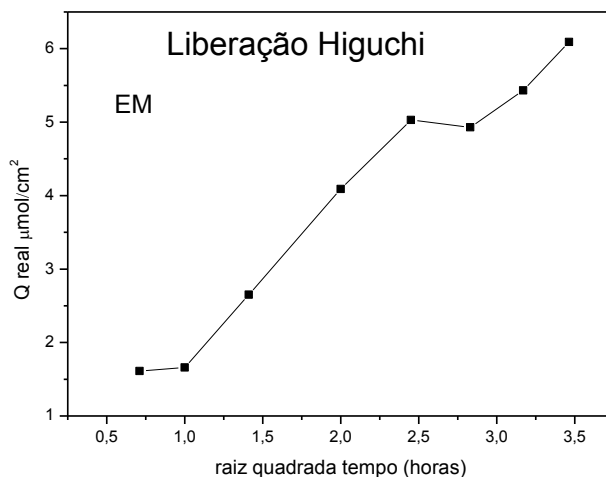
Formulação	Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi
F2	<b>0,9769</b>	0,9419	0,9068
F7	<b>0,9968</b>	0,8312	0,9829
EM	0,9076	0,8244	<b>0,9671</b>

Para as formulações F2 e F7, o modelo matemático que melhor se aplicou foi o de zero ordem e para a formulação EM, foi o modelo de Higuchi. A figura 41 apresenta o gráfico de cinética de liberação das formulações F2 e F7 e a figura 42 apresenta o gráfico de cinética de liberação da formulação EM.



**Figura 41.** Modelos de cinética de liberação das formulações F2 e F7 contendo peptídeo.

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



**Figura 42.** Modelo de cinética de liberação da formulação EM contendo peptídeo.

O modelo de Higuchi descreve a liberação do ativo por um processo de difusão de substâncias contidas nos sistemas matriciais (Monteiro et al., 2007). Este modelo foi o qual melhor se ajustou a formulação EM.

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

Bruschi e colaboradores obtiveram resultado semelhante em formulações contendo o polímero sintético Carbopol 934P e o extrato de própolis como ativo. Os autores observaram que o aumento de concentração do polímero resultou no aumento da viscosidade estática do sistema, o que interferiu no perfil de liberação do própolis. O mesmo foi observado neste trabalho, pois a formulação EM apresentou um perfil de liberação de forma controlada (Bruschi et al., 2007).

Barry criticou em seu estudo de revisão a falta de correlação entre a viscosidade de uma formulação e a sua liberação, pois, segundo o autor, as características reológicas de uma formulação podem afetar a liberação do ativo. Apesar de ser importante a determinação das propriedades reológicas de um sistema coloidal, estudos raramente correlacionam parâmetros como viscosidade com dados de liberação. O autor correlacionou valores de viscosidade plástica com a difusão de ativos em um gel de Ágar e verificou que os parâmetros reológicos analisados foram inversamente proporcionais à taxa de liberação (Barry, 1987).

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

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

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

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

##### Ac-WAhx-KTTKS contido nas formulações

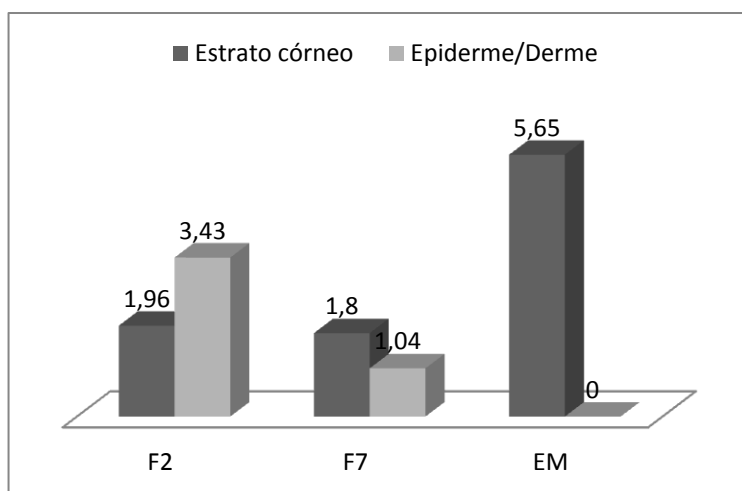
A tabela 20 apresenta os resultados de retenção do peptídeo no estrato córneo e na epiderme/derme empregando as formulações F2, F7 e EM após 12 horas de experimento.

**Tabela 20.** Retenção cutânea do peptídeo nas formulações após 12 horas de experimento ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ).

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

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

A figura 43 demonstra os valores obtidos no ensaio de retenção cutânea das formulações, no estrato córneo e epiderme mais derme.



**Figura 43.** Retenção cutânea do peptídeo nas formulações F2, F7 e EM no estrato córneo e epiderme/derme ( $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ) após 12 horas de ensaio.

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

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

O perfil de retenção no estrato córneo também pode ser observado na figura 44, e verifica-se que a formulação EM ficou 100% retida nesta camada (5,65  $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ ).

Nas formulações F2 e F7, observa-se uma retenção no estrato córneo maior para a formulação F7, quando comparada com a retenção na epiderme/derme.

Os resultados obtidos com as formulações F2 e F7 são satisfatórios, pois podemos dizer que não houve permeação do peptídeo, sendo uma característica desejada para um produto cosmético. Além disso, o peptídeo foi capaz de permanecer retido na epiderme/derme, sendo na derme, o local onde deve ter ação.

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



---

## *Conclusões*

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

Foi possível obter sistemas líquido cristalinos lamelares e hexagonais contendo o peptídeo Ac-WAhx-KTTKS que atuaram como sistemas de liberação controlada do mesmo.

As formulações líquido cristalinas avaliadas favoreceram a penetração do peptídeo Ac-WAhx-KTTKS até o local alvo (derme) em quantidade suficiente para promover um aumento na biossíntese de colágeno.



---

## *Referências*

- ABU SAMAH, N. H. & HEARD, C. M. (2011) Topically applied KTTKS: a review. *International Journal of Cosmetic Science*, **33**.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S., GLASS, B. D., WISCH, M. H. & ALANY, R. G. (2003) Prediction of a stable microemulsion formulation for the oral delivery of a combination of antitubercular drugs using ANN methodology. *Pharmaceutical Research*, **20**.
- ALANY, R. G., TUCKER, I. G., DAVIES, N. M. & RADES, T. (2001) Characterizing Colloidal Structures of Pseudoternary Phase Diagrams Formed by Oil/Water/Amphiphile Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **27**, 31-38.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (2004) *Biology Molecular of the Cell*.
- ALDRICH, S. (2010) Polyoxyethylene 10 oleoyl ether. In: *P6136* (Ed. F. D. I. D. PRODUTO). Brasil.
- ANDRADE, F. F., SANTOS, O. D. H., OLIVEIRA, W. P. & ROCHA-FILHO, P. A. (2007) Influence of PEG-12 Dimethicone addition on stability and formation of emulsions containing liquid crystal. *International Journal of Cosmetic Science*, **29**, 211-218.
- ANVISA Resolução-RE N° 899, de 29 de maio de 2003.
- ANVISA (2003) Resolução-RE N.899, 29 de maio de 2003., Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). Acesso em: jun. 2011.
- AUNGST, B. J., BLAKE, J. A. & HUSSAIN, M. A. (1990) Contributions of Drug Solubilization, Partitioning, Barrier Disruption, and Solvent Permeation to the Enhancement of Skin Permeation of Various Compounds with Fatty Acids and Amines. *Pharmaceutical Research*, **7**, 712-718.
- BAGATIN, E. (2009) Mecanismos do envelhecimento cutâneo eo papel dos cosmecêuticos. *Rev Bras Med*, **66**, 5-11.
- BARRY, B. (1987) *Dermatological Formulations, Percutaneous Absorption*, Marcel Dekker, New York.
- BECHTOLD, I. H. (2005) Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, **27**, 333-342.
- BENSON, H., CACCETTA, R., CHEN, Y., KEARNS, P. & TOTH, I. (2003) Transdermal delivery of a tetrapeptide: Evaluation of passive diffusion. *Letters in Peptide Science*, **10**, 615-620.
- BERMANN, P. E. (2007) Aging Skin: Causes, Treatments, and Prevention. *Nursing Clinics of North America*, **42**, 485-500.
- BOONME, P., KRAUEL, K., GRAF, A., RADES, T. & JUNYAPRASERT, V. (2006) Characterization of microemulsion structures in the pseudoternary phase diagram of isopropyl palmitate/water/Brij 97:1-butanol. *AAPS PharmSciTech*, **7**, E99-E104.

- BORGES, C. D., VENDRUSCOLO, C. T., MARTINS, A. L. & LOMBA, R. F. T. (2009) Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. *Polímeros*, **19**, 160-165.
- BORGES, L. F., GUTIERREZ, P. S., COSISKI MARANA, H. R. & TABOGA, S. R. (2007) Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detectin in vesical prolapse lesions. *Micron*, **38**.
- BRINON, L., GEIGER, S., ALARD, V., DOUCET, J., TRANCHANT, J.-F. & COUARAZE, G. (1999) Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. *Journal of Controlled Release*, **60**, 67-76.
- BRUSCHI, M. L., JONES, D. S., PANZERI, H., GREMIÃO, M. P. D., DE FREITAS, O. & LARA, E. H. G. (2007) Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: In Vitro release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **96**, 2074-2089.
- CARLSON, M. A. & LONGAKER, M. T. (2004) The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Repair and Regeneration*, **12**.
- CHIARI, B., MARTINI, P., MORAES, J., ANDRÉO, R., CORRÊA, M., CICARELLI, R. & ISAAC, V. (2012) Use of HepG2 cells to assay the safety cosmetic active substances. *International Journal of Research in Cosmetic Science*, **2**, 8-14.
- CHORILLI, M., PRESTES, P. S., RIGON, R. B., LEONARDI, G. R., CHIAVACCI, L. A., SARMENTO, V. H. V., OLIVEIRA, A. G. & SCARPA, M. V. (2011) Structural characterization and in vivo evaluation of retinyl palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **85**, 182-188.
- CHORILLI, M., PRESTES, P. S., RIGON, R. B., LEONARDI, G. R., CHIAVACCI, L. A. & SCARPA, M. V. (2009) Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. *Química Nova*, **32**, 1036-1040.
- CHUEALEE, R., ARAMWIT, P. & SRICHANA, T. (2007) Characteristics of Cholesteryl Cetyl Carbonate Liquid Crystals as Drug Delivery Systems. In: *Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, 2007. NEMS '07. 2nd IEEE International Conference on*.
- CHUNG, J. H., SEO, J. Y., CHOI, H. R., LEE, M. K., YOUN, C. S., RHIE, G.-E., CHO, K. H., KIM, K. H., PARK, K. C. & EUN, H. C. (2001) Modulation of Skin Collagen Metabolism in Aged and Photoaged Human Skin In Vivo. **117**, 1218-1224.
- COLEMAN, R. (2011) Picrosirius red staining revisited. *Acta Histochemica*, **113**.
- COSTA, P. & SOUSA LOBO, J. M. (2001) Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **13**, 123-133.
- DE OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V., CORREA, M. A., CERA, L. F. R. & FORMARIZ, T. P. (2004) Microemulsions: Structure and application as drug delivery systems. *Química Nova*, **27**.

- DEVELOPMENT, O.-O. F. E. C. A. (2004) Guidance document for the conduct of skin absorption studies. In: *n.28*. Paris.
- DRAELOS, Z. D. (2007) The latest cosmeceutical approaches for anti-aging. *Journal of Cosmetic Dermatology*, **6**, 2-6.
- FARKAS, E., ZELKÓ, R., NÉMETH, Z., PÁLINKÁS, J., MARTON, S. & RÁCZ, I. (2000) The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. *International Journal of Pharmaceutics*, **193**, 239-245.
- FAUCZ, L. R. L. (2011) Avaliação dos efeitos proliferativos e de síntese induzidos pela luz intensa pulsada em fibroblastos e células endoteliais humanas. In: *Faculdade de Medicina*. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FIELDS, G. B. & NOBLE, R. L. (1990) SOLID-PHASE PEPTIDE-SYNTHESIS UTILIZING 9-FLUORENYLMETHOXYCARBONYL AMINO-ACIDS. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **35**.
- FISHER, G. J., KANG, S. W., VARANI, J., BATA-CSORGO, Z., WAN, Y. S., DATTA, S. & VOORHEES, J. J. (2002) Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of Dermatology*, **138**.
- FORMARIZ, T. P., URBAN, M. C. C., SILVA JÚNIOR, A. A. D., GREMIÃO, M. P. D. & OLIVEIRA, A. G. D. (2005) Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **41**, 301-313.
- FRIBERG, S. E. (1990) APPLICATIONS OF AMPHIPHILIC ASSOCIATION STRUCTURES. *Advances in Colloid and Interface Science*, **32**.
- GABBOUN, N. H., NAJIB, N. M., IBRAHIM, H. G. & ASSAF, S. (2001) Release of salicylic acid, diclofenac acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. *International Journal of Pharmaceutics*, **212**, 73-80.
- GAISIN, N., GNEZDILOV, O., PASHIROVA, T., ZHIL'TSOVA, E., LUKASHENKO, S., ZAKHAROVA, L., OSIPOVA, V., DZHABAROV, V. & GALYAMETDINOV, Y. (2010) Micellar and liquid-crystalline properties of bicyclic fragment-containing cationic surfactant. *Colloid Journal*, **72**, 764-770.
- GARTI, N., YAGHMUR, A., ASERIN, A., SPERNATH, A., ELFAKES, R. & EZRAHI, S. (2003) Solubilization of active molecules in microemulsions for improved environmental protection. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **230**, 183-190.
- GILCHREST, B. A. (2008) A review of skin ageing and its medical therapy. *British Journal of Dermatology*, **135**, 867-875.
- GOROUHI, F. & MAIBACH, H. I. (2009) Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International Journal of Cosmetic Science*, **31**, 327-345.
- GRATIERI, T., GELFUSO, G. M. & LOPEZ, R. F. V. (2008) Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Química Nova*, **31**, 1490-1498.

- GREEN, P., FLANAGAN, M., SHROOT, B. & GUY, R. (1993) Pharmaceutical skin Penetration Enhancement. (Eds. K. WALTERS & J. HADGRAF). Marcel Dekker, London.
- HERNANDEZ, M. & MERCIER-FRESNEL, M. (1999) Manual de cosmetologia. *Rio de Janeiro: Revinter*, **3**.
- HIGUCHI, T. (1961) Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **50**, 874-875.
- HIRATA, L., SATO, M. & SANTOS, C. (2004) Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. *Acta Farm. Bonaerense*, **23**.
- HYDE, S. T. (2001) Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. **cap. 16**, 229 - 232.
- IWAI, H., FUKASAWA, J. & SUZUKI, T. (1998) A liquid crystal application in skin care cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, **20**, 87-102.
- KANITAKIS, J. (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*, **12**.
- KATAYAMA, K., ARMENDARIZ-BORUNDA, J., RAGHOW, R., KANG, A. H. & SEYER, J. M. (1993) A pentapeptide from type I procollagen promotes extracellular matrix production. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 9941-9944.
- KATAYAMA, K., SEYER, J. M., RAGHOW, R. & KANG, A. H. (1991) REGULATION OF EXTRACELLULAR-MATRIX PRODUCTION BY CHEMICALLY SYNTHESIZED SUBFRAGMENTS OF TYPE-I COLLAGEN CARBOXY PROPEPTIDE. *Biochemistry*, **30**.
- KREILGAARD, M. (2002) Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54**.
- KUDLA, P., SOKOLOWSKI, T., BLUEMICH, B. & WITTERN, K.-P. (2010) Phase behavior of liquid-crystalline emulsion systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, **349**.
- LAWRENCE, M. J. & REES, G. D. (2000) Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **45**.
- LEONARDI, G. R., GASPAR, L. R. & CAMPOS, P. M. B. G. M. (2002) Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, **77**, 563-569.
- LINTNER & PESCHARD (2000) Biologically active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product. *International Journal of Cosmetic Science*, **22**, 207-218.
- LOPES, L., FERREIRA, D., DE PAULA, D., GARCIA, M., THOMAZINI, J., FANTINI, M. & BENTLEY, M. (2006) Reverse Hexagonal Phase Nanodispersion of Monoolein and Oleic Acid for Topical Delivery of Peptides: in Vitro and in Vivo Skin Penetration of Cyclosporin A. *Pharmaceutical Research*, **23**, 1332-1342.

- LUPO, M. P. & COLE, A. L. (2007) Cosmeceutical peptides. *Dermatologic Therapy*, **20**, 343-349.
- MAKAI, M., CSÁNYI, E., NÉMETH, Z., PÁLINKÁS, J. & ERŐS, I. (2003) Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. *International Journal of Pharmaceutics*, **256**, 95-107.
- MARQUELE, F. D., OLIVEIRA, A. R. M., BONATO, P. S., LARA, M. G. & FONSECA, M. J. V. (2006) Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**.
- MCCULLOUGH, J. L. & KELLY, K. M. (2006) Prevention and Treatment of Skin Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1067**, 323-331.
- MILAN, A. L. K., MILÃO, D., SOUTO, A. A. & CORTE, T. W. F. (2007) Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **43**, 649-657.
- MONTEIRO, L., SOUZA, A., GIANOTTO, E., NERY, M., DUARTE, J., FREITAS, O., CASAGRANDE, R. & BARACAT, M. (2007) Comprimidos Matriciais Preparados com Hidroxipropilmetilcelulose e Pectina contendo Quercetina para Liberação Cólon-específica. In: *Lat. Am. J. Pharm.* 2 ed.
- MORAIS, G. G., SANTOS, O. D. H., MASSON, D. S., OLIVEIRA, W. P. & FILHO, P. A. R. (2005) Development of O/W Emulsions with Annato Oil (*Bixa orellana*) Containing Liquid Crystal. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **26**, 591-596.
- MULLER-GOYMANN, C. C. (2004) Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **58**.
- NAMJOSHI, S., CACCETTA, R. & BENSON, H. A. E. (2008) Skin peptides: Biological activity and therapeutic opportunities. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**, 2524-2542.
- NEGRINI, R. & MEZZENGA, R. (2011) pH-Responsive Lyotropic Liquid Crystals for Controlled Drug Delivery. *Langmuir*, **27**, 5296-5303.
- NESSEEM, D. I. (2001) Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **26**, 387-399.
- NETO, E. T., MALTA, M. M. & DOS SANTOS, R. G. (2009) SURFACE TENSION MEASUREMENT BY DROP COUNTING METHOD: METHOD DESCRIPTION AND EXPERIMENTS WITH ETOXILATED NON-IONIC SURFACTANTS. *Quimica Nova*, **32**.
- O'HARA, T., DUNNE, A., BUTLER, J. & DEVANE, J. (1998) A review of methods used to compare dissolution profile data. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, **1**, 214-223.

- OECD (2004) Guidance document for the conduct of skin absorption studies. *ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT*, **n.28**.
- OTTO, A., DU PLESSIS, J. & WIECHERS, J. W. (2009) Formulation effects of topical emulsions on transdermal and dermal delivery. *International Journal of Cosmetic Science*, **31**, 1-19.
- PATRAVALE, V. B. & MANDAWGADE, S. D. (2008) Novel cosmetic delivery systems: an application update. *International Journal of Cosmetic Science*, **30**, 19-33.
- PETERSZEKI, G., ANDRES, E., MOLINARI, J., RAVELOJAONA, V. & ROBERT, L. (2008) Effect of cellular aging on collagen biosynthesis I. Methodological considerations and pharmacological applications. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, **47**.
- PODLOGAR, F., ROGAC, M. B. & GAGPERLIN, M. (2005) The effect of internal structure of selected water-Tween 40 (R)-Imwitor 308 (R)-IPM microemulsions on ketoprofene release. *International Journal of Pharmaceutics*, **302**.
- POLLI, J. E., REKHI, G. S. & SHAH, V. P. (1996) Methods to Compare Dissolution Profiles\*. *Drug Information Journal*, **30**, 1113-1120.
- PRESTES, P. S., CHORILLI, M., CHIAVACCI, L. A., SCARPA, M. V. & LEONARDI, G. R. (2009) Physicochemical Characterization and Rheological Behavior Evaluation of the Liquid Crystalline Mesophases Developed with Different Silicones. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **31**, 117-123.
- REDDY, B. Y., JOW, T. & HANTASH, B. M. (2012) Bioactive oligopeptides in dermatology: Part II. *Experimental Dermatology*, **21**, 569-575.
- ROBINSON, L. R., FITZGERALD, N. C., DOUGHTY, D. G., DAWES, N. C., BERGE, C. A. & BISSETT, D. L. (2005) Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin1. *International Journal of Cosmetic Science*, **27**, 155-160.
- SCCP/0970 (2006) SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS - Basic Criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetics ingredients.
- SINGH, S. (2000) Phase transitions in liquid crystals. *Physics Reports-Review Section of Physics Letters*, **324**.
- SUHONEN, T. M., BOUWSTRA, J. A. & URTTI, A. (1999) Chemical enhancement of percutaneous absorption in relation to stratum corneum structural alterations. *Journal of Controlled Release*, **59**.
- THOMPSON, J. E. (2004) *A Practical Guide to Contemporary Pharmacy Practice*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- TIDDY, G. J. T. (1980) Surfactant-water liquid crystal phases. *Physics reports*, **57**, 1-46.
- TROMMER, H. & NEUBERT, R. H. H. (2006) Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration - A review. *Skin Pharmacology and Physiology*, **19**.

- TSAI, W.-C., HSU, C.-C., CHUNG, C.-Y., LIN, M.-S., LI, S.-L. & PANG, J.-H. S. (2007) The pentapeptide KTTKS promoting the expressions of type I collagen and transforming growth factor- $\beta$  of tendon cells. *Journal of Orthopaedic Research*, **25**, 1629-1634.
- UEDA, C., SHAH, V., DERDZINSKI, K., EWING, G., FLYNN, G., MAIBACH, H., MARQUES, M., RYTTING, H., SHAW, S., THAKKER, K. & YACOBI, A. (2009) Topical and Transdermal Drug Products. In: *Farmacopeial Forum* 3 ed. USP.
- VALENTA, C. & SCHULTZ, K. (2004) Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. *Journal of Controlled Release*, **95**.
- VICENTINI, F., CASAGRANDE, R., VERRI JR, W., GEORGETTI, S., BENTLEY, M. & FONSECA, M. (2008) Quercetin in Lyotropic Liquid Crystalline Formulations: Physical, Chemical and Functional Stability. *AAPS PharmSciTech*, **9**, 591-596.
- WALTERS, K. A. (2002) *Dermatological and transdermal Formulations*, New York.
- WANG, Z., DIAO, Z., LIU, F., LI, G. & ZHANG, G. (2006) Microstructure and rheological properties of liquid crystallines formed in Brij 97/water/IPM system. *Journal of Colloid and Interface Science*, **297**.
- WANG, Z. & ZHOU, W. (2009) Lamellar Liquid Crystals of Brij 97 Aqueous Solutions Containing Different Additives. *Journal of Solution Chemistry*, **38**.
- YAMAMOTO, A., SETOH, K., MURAKAMI, M., SHIRONOSHITA, M., KOBAYASHI, T., FUJIMOTO, K., OKADA, N., FUJITA, T. & MURANISHI, S. (2003) Enhanced transdermal delivery of phenylalanyl-glycine by chemical modification with various fatty acids. *International Journal of Pharmaceutics*, **250**.
- YARIV, D., EFRAT, R., LIBSTER, D., ASERIN, A. & GARTI, N. (2010) In vitro permeation of diclofenac salts from lyotropic liquid crystalline systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **78**, 185-192.
- YORK, P. & AULTON, M. E. (2005) Delineamento de formas farmacêuticas. *Delineamento de formas farmacêuticas*, **2**, 17-28.