



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**



FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
SISTEMAS LÍQUIDO-CRISTALINOS PARA
APLICAÇÃO DE UM PEPTÍDEO COM AÇÃO
ANTIMICROBIANA**

Michely Fernanda Leopoldo

ARARAQUARA-SP

2012

MICHELY FERNADA LEOPOLDO

**“Desenvolvimento e caracterização de sistemas líquido-cristalinos
para aplicação de um peptídeo com ação antimicrobiana”**

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Co-orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

Departamento de Bioquímica/Tecnologia Química
Instituto de Química-UNESP/ Araraquara

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de
Farmacêutica-Bioquímica.

ARARAQUARA-SP

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Marlene** e **Luís**, pelo amor incondicional e pela valorização do estudo.

Às minhas irmãs **Leidiany** e **Letícia** por sempre estarem ao meu lado.

Ao Prof. Dr. **Eduardo Maffud Cilli** pela orientação, ensinamentos e compreensão dedicados a mim durante todo o período em que trabalhamos juntos.

Ao Prof. Dr. **Marlus Chorilli** pela orientação e auxílio no desenvolvimento desse projeto.

À Profa Dra. **Hérica Nunes Salgado** por ceder seu laboratório para o desenvolvimento da avaliação da atividade antimicrobiana.

À minha querida amiga **Maria Lúcia** pelo apoio, carinho e pelos momentos alegres.

Aos companheiros de laboratório **Lentilha, Esteban, Grazielle, Paulo** e **Davi** pelos ensinamentos e auxílio nas atividades de laboratório.

Ao **Lucas** e à **Danila** por me ajudarem a realizar esse projeto.

Sumário

1. Introdução.....	8
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e Métodos	13
3.1. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS).....	13
3.2. Purificação e caracterização do peptídeo por CLAE.....	15
3.3. Espectrometria de massas.....	15
3.4. Obtenção dos sistemas líquido-cristalinos.....	16
3.4.1 Obtenção do oleato de sódio.....	16
3.4.2 Preparação das formulações	17
3.5. Análise estrutural das formulações	17
3.5.1. Microscopia de luz polarizada.....	17
3.5.2. Reologia.....	17
3.6. Determinação da incorporação do peptídeo no sistema líquido cristalino	18
3.7. Liberação <i>in vitro</i>	18
3.8. Avaliação da atividade antimicrobiana	20
4. Resultados e Discussão.....	22
4.1. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS).....	22
4.2. Purificação e caracterização dos peptídeos	22
4.3. Obtenção do diagrama de fases pseudoternário para o sistema estabilizado por (FS:OS:TW)	24
4.4. Análise estrutural das formulações	25
4.4.1. Microscopia de luz polarizada.....	25
4.4.2. Reologia.....	27
4.5. Determinação da incorporação do peptídeo no sistema líquido cristalino	29
4.6. Teste de liberação <i>in vitro</i>	33
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana	36
5. Conclusões.....	42
6. Bibliografia.....	43

Lista de Figuras

Figura 1. Rã <i>Hypsiboas albopunctatus</i>	9
Figura 2. Protocolo de síntese utilizado no trabalho.	14
Figura 3. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto (A) e da fração (B) com maior índice de pureza (97,8%), com os respectivos tempos de retenção na coluna de fase reversa C18.....	23
Figura 4. Espectro de massas do peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> puro (fração A).....	24
Figura 5. Diagrama de fases pontual da formulação constituído por sistema tensoativo (FO/OS/TW 1:1:1), tampão fosfato ph 7,4 (fase aquosa) e CHO (fase oleosa), no qual: SLT = sistema líquido transparente; SVT = sistema viscoso transparente; SLO = sistema líquido opaco; SVO = sistema viscoso opaco; SF= separação de fases.....	25
Figura 6. Fotomicrografia representativa do ponto 31 - 60% de ST (FS:OS:TW-20) (1:1:1 p/p), 10% de CO como fase oleosa e 30% de tampão fosfato. Aumento de 40 x.....	26
Figura 7. Fotomicrografia representativa do ponto 32 - 60% de ST (FS:OS:TW-20) (1:1:1 p/p), 20% de CO como fase oleosa e 20% de tampão fosfato. Aumento 40 x.	26
Figura 8. Fotomicrografia representativa do ponto 22 - 40% de ST (FS:OS:TW-20) (1:1:1 p/p), 10% de CO como fase oleosa e 50% de tampão fosfato. Aumento 40 x.	27
Figura 9. Fotomicrografia representativa do ponto 28 - 50% de ST (FS:OS:TW-20) (1:1:1 p/p), 20% de CO como fase oleosa e 30% de tampão fosfato. Aumento 40 x.	27
Figura 10. Reograma de fluxo (A) e de viscosidade (B) por taxa de cisalhamento da formulação sem peptídeo a 25°C (a temperatura foi mantida fixa durante todo o experimento). Em (A) o símbolo em preto representa a curva ascendente e o símbolo vermelho representa a curva descendente. Em (B) o símbolo em preto representa a curva descendente e o símbolo vermelho a curva ascendente.	28
Figura 11. Reograma de fluxo (A) e de viscosidade (B) por taxa de cisalhamento da formulação com peptídeo a 25°C (a temperatura foi mantida fixa durante todo o experimento). Em (A) o símbolo em preto representa a curva ascendente e o símbolo vermelho representa a curva descendente. Em (B) o símbolo em preto representa a curva descendente e o símbolo vermelho a curva ascendente.	29
Figura 12. Espectros de absorção na região do UV do peptídeo, da parte líquido cristalina e da parte oleosa . Na linha cor preto - sistema líquido cristalino, linha cor vermelha - fase oleosa e linha cor azul - colesterol.....	30
Figura 13. Cromatograma obtido por meio da CLAE em fase reversa do sistema líquido cristalino com o peptídeo.....	31
Figura 14. Cromatograma obtido por meio da CLAE em fase reversa da fase oleosa.....	31
Figura 15. Cromatograma obtido por meio da CLAE em fase reversa do peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> puro (sol. Estoque).	32
Figura 16. Relação entre a área do padrão e a área da amostra. A_a = área da amostra, C_a = concentração da amostra,.....	33
Figura 17. Curva analítica o peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> , equação da reta (y) e o seu respectivo coeficiente d correlação (r^2).....	33
Figura 18. Perfil de liberação do peptídeo incorporado ao SLC e do peptídeo livre em solução.	35
Figura 19. Modelo de cinética de liberação zero ordem.	36
Figura 20. Atividade antimicrobiana do peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> contra <i>S. aureus</i> . Sentido horário: controle positivo com ciprofloxacino e controle negativo com água ultrapura, 1°, 2° e 3° diluição respectivamente.	39
Figura 21. Atividade antimicrobiana do peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> contra <i>E. coli</i> . Sentido anti-horário: controle positivo com ciprofloxacino e ciprofloxacino incorporado ao SLC, controle negativo com água ultrapura, 1°, 2° e 3° diluição.	40
Figura 22. Atividade antimicrobiana do peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> <i>S. aureus</i> . Sentido horário: controle positivo com meropenem e controle negativo com água ultrapura, SLC, 1°, 2° e 3° diluição respectivamente.	41

Lista de Tabelas

Tabela 1: Massa das frações puras obtidas do peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> com seus índices de pureza	23
Tabela 2. Liberação do peptídeo <i>W6- Hy-a1</i> incorporado ao SLC.....	34
Tabela 3. Coeficiente de correlação r^2 da formulação com peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> incorporado dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi.....	35
Tabela 4. Diâmetros dos halos de inibição em mm do teste realizado com cilindros de aço inoxidável com peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> livre em solução.....	38
Tabela 5. Diâmetros dos halos de inibição em mm do teste realizado com cilindros de aço inoxidável com peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> incorporado ao SLC.....	38
Tabela 6. Diâmetros dos halos de inibição em mm do teste realizado com discos de papel com peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> livre em solução.....	39
Tabela 7. Diâmetros dos halos de inibição em mm do teste realizado com discos de papel com peptídeo <i>W6-Hy-a1</i> livre em solução, utilizando solução salina para o inóculo.....	40

Resumo

Atualmente o uso indiscriminado e não criterioso de antibióticos está causando um aumento alarmante de resistência bacteriana chegando a ser considerado um problema de saúde pública. Nesse contexto, a utilização do peptídeo antimicrobiano (PAM) *Hylina-a1* proveniente de uma rã da fauna brasileira está sendo estudado. Sua atuação na membrana celular dificulta a ocorrência de resistência bacteriana. No entanto, o uso de PAMs ainda apresenta problemas principalmente relacionados à disponibilidade, eficácia e toxicidade. A fim de contornar esses problemas, este trabalho teve como objetivo principal avaliar a incorporação deste peptídeo a um sistema líquido cristalino nanoestruturado com capacidade de regular a liberação e proteger os peptídeos da degradação química e física mantendo a bioatividade. O sistema líquido cristalino foi preparado com fosfatidilcolina de soja (FS), oleato de sódio (OS) e Tween 20 (TW), colesterol (CHO) e tampão fosfato, sendo que alguns pontos apresentaram fases líquido-cristalinas do tipo lamelar. Para os estudos posteriores foi escolhido um ponto com características visuais de viscosidade apropriadas ao uso tópico e a este se incorporou o peptídeo. A obtenção do peptídeo por meio da SPFS foi viável, obtendo-se materiais com alto índice de pureza. No ensaio de reologia a formulação apresentou-se como fluido pseudoplástico não-Newtoniano, com a presença de tixotropia; sendo possível também confirmar a incorporação do peptídeo ao sistema. A espectroscopia UV e a CLAE comprovaram que a maior parte do peptídeo é incorporada à fase líquido-cristalina do sistema. Os ensaios biológicos mostraram que o sistema líquido-cristalino possui atividade contra bactérias muito menor que o peptídeo livre. Este fato foi atribuído à baixa liberação do peptídeo pelo sistema.

Palavras-chave: sistema líquido cristalino; peptídeos antimicrobianos; liberação cutânea; atividade antimicrobiana.

1. INTRODUÇÃO

O uso indevido e não criterioso de antibióticos provoca o surgimento de um sério problema de saúde pública, com o aparecimento de cepas super-resistentes aos medicamentos tradicionais, dificultando o tratamento de doenças infecciosas podendo levar o paciente à morte (HAYDEL, 2010; JAPONI et al., 2011). Pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos fármacos que agem sobre estas cepas têm se intensificado atualmente. Nesse contexto, a fauna e flora brasileira com sua grande biodiversidade apresentam um potencial promissor para a descoberta de novas substâncias. Dentro dessa vertente, um dos campos que mais cresce é a procura e aplicação de peptídeos bioativos, particularmente os antimicrobianos (PAMs), devido ao elevado potencial de suas aplicações terapêuticas (ROMANELLI et al., 2010; GODBALLE et al., 2011).

A secreção da pele de anfíbios é uma fonte rica em compostos biologicamente ativos, incluindo alcaloides, esteroides, peptídeos e proteínas (CLARKE, 1997). Vários peptídeos hemolíticos e antimicrobianos têm sido isolados de várias espécies de rã (BARRA e SIMMACO, 1995), sendo considerados como parte de seu sistema de proteção contra diferentes patógenos encontrados no meio ambiente (MANGONI et al., 2001; APPONYI et al., 2004). Muitas destas sequências peptídicas mostram duas características em comum: grande quantidade de aminoácidos hidrofóbicos e básicos; e a distribuição destes em duas regiões espaciais distintas da cadeia, formando uma α -hélice anfipática que interage com a membrana biológica. Esses peptídeos interferem na estabilidade da membrana celular, afetando a sua integridade e causando a morte da célula (APPONYI et al., 2004).

Neste trabalho, o peptídeo alvo de estudo é o denominado de *Hylina-al* (IFGAILPLALGALKNLIK-NH₂) isolado da rã *Hypsiboas albopunctata* (CASTRO et al., 2009; CRUSCA et al., 2011) (Figura 1) e que possui atividade antimicrobiana e hemolítica. Esse peptídeo aumenta a permeabilidade na membrana celular do micro-organismo o que

causa lise culminando em morte celular. Esse mecanismo de ação pode ocorrer de várias maneiras ocorrendo mais frequentemente via formação de poros (MIHAJLOVIC e LAZARIDIS, 2012). O que é muito interessante, pois estudos recentes evidenciam que mutações conferindo resistência à membrana não surgem facilmente (COATES, HU e MITCHISON, 2008; SHAMAEI-TOUSI et al., 2010).



Figura 1: Rã *Hypsiboas albopunctatus*.

http://www.biodiversidade.cnpm.embrapa.br/FotosEspecies/Herpetofauna/Anuros/Pererecacabrinha._Hypsiboas_albopunctatus.jpg

Problemas associados à disposição e à eficácia são intrínsecos no desenvolvimento de agentes com atuação na membrana, além disto, a seletividade é um fator importante. Neste sentido, os PAMs apresentam falta de toxicidade seletiva, atuando também nas membranas dos mamíferos (PAYNE et al., 2007). Também não são tão adequados para administração oral, devido à hidrólise ácida e enzimática que ocorre no sistema digestivo (HURDLE et al., 2010). Assim, nesse trabalho o foco está sendo o desenvolvimento de sistemas que permitam a administração do fármaco diretamente sobre lesão cutânea, minimizando possíveis efeitos colaterais em outros órgãos e na pele não lesada.

Atualmente, há um aumento no interesse do desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, como os sistemas líquido-cristalinos (SLC), os quais apresentam vantagens

relacionadas principalmente ao fato de promoverem liberação controlada de fármacos, além de proteger as substâncias ativas da degradação térmica ou da fotodegradação (MOHANRAJ e CHEN, 2006; GUTERRES et al., 2007; YAGHMUR et al., 2012).

Também conhecidos como “estados mesomórficos”, os SLC apresentam propriedades tanto de sólidos quanto de líquidos. Os SCL podem ser divididos em duas principais classes: os termotrópicos e os liotrópicos. Os termotrópicos sofrem a influência da temperatura e são pouco estáveis. Os liotrópicos são misturas de compostos anfifílicos em um solvente, em geral a água. Dentre as mesofases liotrópicas, as mais importantes e comumente observadas são as lamelares, as hexagonais e as cúbicas (LEE et al., 2009; LI et al., 2009). Estas possuem ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidez como os líquidos (MÜLLER-GOYMANN, 2004; SANTOS et al., 2005; CHORILLI et al., 2009).

A fase lamelar é formada por bicamadas paralelas de tensoativo separadas por camadas de solvente, formando uma rede uni ou bidimensional. Na fase hexagonal, os agregados são formados pelo arranjo de cilindros longos formando estruturas bi ou tridimensionais. Fases cúbicas liotrópicas, por sua vez, apresentam estruturas mais complicadas de serem visualizadas, geralmente de simetria cúbica, apesar das fases romboédricas e tetragonais também serem detectadas em alguns sistemas (JOHNSSON et al., 2006; FARKAS, KISS e ZELKÓ, 2007).

Sistemas líquido-cristalinos oferecem grande potencial no campo dos peptídeos e proteínas apesar dessa aplicação ser ainda pouco explorada. Uma das mesofases liotrópicas mais estudadas é a fase cúbica que oferece a capacidade de controlar a liberação de substâncias por meio da variação de suas propriedades físico-químicas, protegendo peptídeos e proteínas da degradação química e física, além de manter a sua bioatividade (RIZWAN et al., 2010; ANGELOVA et al., 2010). SLC também têm sido empregados para uso tópico,

Hosmer e colaboradores (2010) desenvolveram uma fase lamelar e hexagonal para aplicação de paclitaxel, estudando além da aplicação em si, como a estrutura interna interfere e maximiza a liberação cutânea, controlando-se, desta forma, a citotoxicidade.

2. OBJETIVOS

O objetivo da pesquisa foi desenvolver um sistema de liberação para o peptídeo *Hylina-a1* em nível nanoestrutural, promovendo a otimização de sua ação microbicida e sua aplicação tópica. Neste sentido, os seguintes objetivos específicos foram desenvolvidos:

- Síntese do peptídeo análogo da *Hylina-a1*: *W6-Hy-a1* **IFGAIWPLALGALKNLIK-NH₂**;
- Purificação por CLAE e caracterização por espectrometria de massas do peptídeo;
- Desenvolvimento de sistemas nanodispersos líquido-cristalinos de fase lamelar para incorporação do peptídeo;
- Avaliação estrutural dos sistemas obtidos por meio da microscopia de luz polarizada;
- Caracterização da reologia do sistema líquido-cristalino com e sem a incorporação do peptídeo ao sistema;
- Avaliação antibacteriana *in vitro* com e sem a incorporação do peptídeo ao sistema líquido cristalino, frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Avaliação da liberação *in vitro* do peptídeo pelo sistema líquido cristalino.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese peptídica em fase sólida (SPFS)

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 que pode permitir sua automação.

A resina utilizada na obtenção do peptídeo foi a Rink-Amida, composta por uma matriz polimérica de poliestireno com 1% de divinilbenzeno.

A estratégia escolhida neste trabalho para a obtenção do peptídeo foi a que utiliza o grupo Fmoc para a proteção do grupo α -amino e os grupos terc-butila (Tbut), tritila (Trt), 2,2,4,6,7-pentametila-dihidrobenzofurano-sulfonila (Pbf) e terc-butiloxicarbonila (Boc) como protetores de cadeias laterais dos resíduos trifuncionais (lisina-(Boc), arginina-(Pbf), serina-(tBut), ácido glutâmico-(tBut), ácido aspártico-(tBut), glutamina-(Trt), treonina-(tBut) e triptofano-(Boc)). Como o grupo Fmoc é base-lábil, para a desproteção do grupo α -amino a peptidil-resina é submetida a uma solução básica para a retirada do grupo Fmoc (solução de piperidina 20% em DMF).

Na etapa de acoplamento utilizou-se os reagentes diisopropilcarbodiimida (DIC)/ 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) para ativar o grupo carbonila alfa do peptídeo que irá ser acoplado ao peptídeo, permitindo o ataque nucleofílico do grupo α -amino do último aminoácido ligado à resina. Quando estes reagentes não foram eficientes, se utilizou os reagentes hexafluorofosfato de *O*-(benzotriazol-1-ila)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HBTU)/ *N,N*-etildiisopropilamina (DIEA). Em ambos os casos, a reação ocorreu durante duas horas sob agitação.

Os aminoácidos e reagentes anteriormente mencionados foram utilizados com um excesso de duas vezes em relação à quantidade de sítios ativos livres na resina. Este valor foi calculado utilizando-se o grau de substituição da resina e a massa utilizada.

Os solventes orgânicos DCM (diclorometano), DMF (dimetilformamida) e NMP (metil-2-pirrolidona) foram utilizados para solvatar a resina na etapa de acoplamento. Entre cada passo de reação foram efetuadas lavagens com DCM e DMF para eliminação do excesso de reagentes.

Depois de cada acoplamento e desproteção foi realizado o teste de ninidrina, onde a ninidrina reage com os grupos aminos livres originando um composto de coloração azulada em altas temperaturas (com exceção da prolina que origina um composto de coloração amarronzada), evidenciando o acoplamento do aminoácido (resultado negativo) ou a desproteção (retirada do grupo FMOC - resultado positivo).

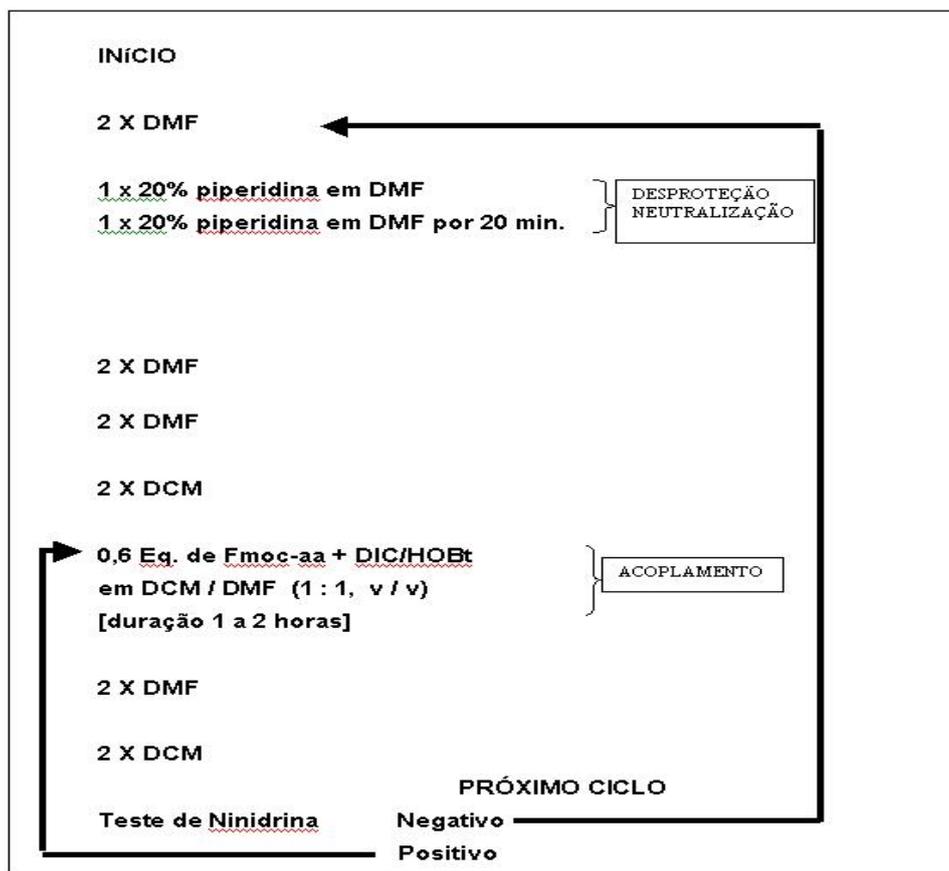


Figura 2. Protocolo de síntese utilizado no trabalho.

Clivagem

A clivagem foi realizada a fim de retirar o peptídeo da resina e os protetores das cadeias laterais dos aminoácidos trifuncionais. Esta etapa foi realizada por meio de uma

solução contendo água deionizada, triisopropilsilano (TIS) e ácido trifluoracético - TFA (Merck®) (proporção de 2,5%, 2,5% e 95%, respectivamente) em frasco de cintilação, sob agitação branda por 2 horas. O volume utilizado foi na proporção de 10 mL de solução para cada 1 g de resina. Depois foi feita a precipitação do peptídeo e da resina com éter etílico resfriado a 8°C para separá-los dos subprodutos da clivagem por meio de centrifugação. Esse processo foi repetido três vezes. Ao final o peptídeo foi extraído três vezes com água deionizada e centrifugado. O sobrenadante resultante contendo o peptídeo bruto foi liofilizado, obtendo-se um material branco e floculoso.

3.2. Purificação e caracterização do peptídeo por CLAE

Por meio da CLAE em fase reversa, foram realizadas a purificação e a caracterização do peptídeo. A utilização das frações do peptídeo só ocorreu quando o grau de pureza fosse maior que 95 %.

A purificação foi realizada em modo semipreparativo utilizando CLAE System Gold BECKMAN, com coluna de fase reversa C18 da marca Phenomenex de dimensão 250 x 21 mm. O grau de pureza das frações foi determinado em um cromatográfico Shimadzu, com uma coluna analítica (250 x 4,6 mm) de fase reversa C18 (Kromassil).

Os solventes utilizados para a purificação e verificação do teor de pureza dos peptídeos foram os solventes A (0,045 % de TFA em água deionizada) e B (0,036 % de TFA em acetonitrila).

3.3. Espectrometria de massas

O espectro de massas foi obtido em 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 fórmula:

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

Em que: MM_{pept} é a massa molecular do peptídeo analisado, MM_z é a massa molecular quando o peptídeo está com carga z ($z = 1, 2, 3\dots$), z é a quantidade de cargas que contém o peptídeo e MM_{H^+} é a massa molecular do hidrogênio protonado, de valor 1,008 g/mol.

3.4. Obtenção dos sistemas líquido-cristalinos

3.4.1. Obtenção do oleato de sódio

Transferiu-se para um béquer de 1000 mL o volume de 43 mL de ácido oleico (Sigma-Aldrich). Em seguida adicionou-se o hidróxido de sódio em excesso e deixou-se a mistura em repouso por 30 min. Posteriormente, lavou-se a amostra 3 vezes utilizando acetona como solvente para retirada dos subprodutos da reação e mediu-se o pH a fim de atingir o valor igual a 6, o que indicou a retirada do hidróxido de sódio não reagente. A amostra foi então colocada em bomba de vácuo para retirada do excesso de solvente por 10 horas e depois foi congelada com nitrogênio líquido. Após a obtenção da amostra congelada, esta foi liofilizada para retirada da água.

3.4.2. Preparação das formulações

Para a obtenção do sistema líquido-cristalino utilizou-se um diagrama de fases pseudo-ternário, foram utilizadas quantidades adequadas de sistema tensoativo composto por fosfatidilcolina de soja (FS), oleato de sódio (OS) e Tween 20 (TW). Para cada proporção de FS:OS:TW (1:1:1 p/p) foi adicionado colesterol (CHO) como fase oleosa e, em seguida, titulou-se com tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,4 (fase aquosa). Essa sequência de adição facilita a homogeneização da mistura, a qual foi sonicada usando Sonicador, Sonics[®], Vibra-Cell, com potência de 220 Watts, operando em modo descontínuo, por 20 minutos. A temperatura foi diminuída com o uso de uma bacia de gelo. As transições de mistura semi-sólida para sistema líquido transparente, sistema viscoso transparente ou sistema opaco foram detectadas visualmente contra fundo escuro.

3.5. Análise estrutural das formulações

3.5.1. Microscopia de luz polarizada

Uma pequena quantidade das formulações é colocada sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e analisadas com auxílio de microscópio de luz polarizada Jenamed 2, Carl Zeiss – Jena. Foi avaliada a homogeneidade das dispersões e, com auxílio de polarização, observada a presença de área de anisotropia (característico de sistemas líquidos cristalinos). A análise foi realizada à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.5.2. Reologia

A reologia estuda o escoamento e deformação da matéria. No caso de SLC é uma ferramenta que ajuda a caracterizar o sistema porque o comportamento fluido está diretamente relacionado com o tipo e grau de organização do sistema, sendo possível também analisar o efeito de aditivos, no caso o peptídeo, à estrutura do SLC (SCOTT, 2000).

O estudo foi realizado na presença e ausência do peptídeo. A quantidade de amostra

utilizada foi de 2 mL, o equipamento usado foi o reômetro AR 2000ex, com geometria cone (1.59⁰) e placa com espaçamento de 52 µm na região central e com um diâmetro de 40 mm. O experimento foi mantido à temperatura constante de 25 °C. Os dados do segmento ascendente do gradiente de cisalhamento foram fitados em um modelo de leis de potência utilizando o software Rheology Solutions (dados V1.1.7 da versão, TA Instruments) para descrever as características de fluxo do SLC.

Para determinação das propriedades reológicas as leituras foram feitas no intervalo de 0 a 300 s⁻¹ para a curva ascendente e de 300 a 0 s⁻¹ para curva descendente.

3.6. Determinação da incorporação do peptídeo no sistema líquido cristalino

Foram preparados 2 g da amostra selecionada (ponto 22) com 1 mL de solução estoque de peptídeo com concentração 900 µmol/L, e submetida à centrifuga (Excelsa II - Fanem) a 14.000 rpm durante 15 min, com trinta segundos para o tempo de aceleração e 30 segundos para o tempo de desaceleração, para verificar a estabilidade do sistema.

A análise qualitativa da incorporação do peptídeo ao sistema foi realizada por espectroscopia UV utilizando como solvente metanol e butanol. As leituras foram realizadas na faixa de 200 a 400 nm em espectrofotômetro Shimadzu. O experimento foi realizado a temperatura de 25 ± 2°C.

A análise quantitativa da incorporação foi feita em um CLAE Prostar 400/Dynamax System VARIAN, com uma coluna analítica (250 x 4,6 mm) de fase reversa C18 Ultrasphere BECKMAN. Os solventes utilizados foram os solventes A (0,045 % de TFA em água deionizada) e B (0,036 % de TFA em acetonitrila).

3.7. Liberação *in vitro*

O teste de liberação foi realizado para avaliar qual o perfil de liberação do peptídeo na formulação e a porcentagem de liberação do peptídeo.

O experimento foi realizado utilizando células de difusão modificadas (células de Franz) no equipamento de absorção cutânea Microette HANSON 0700-1251. Uma membrana de éster de celulose com poro de 0,45 μm foi colocada entre o compartimento doador e receptor da célula de difusão. A formulação contendo o sistema líquido-cristalino incorporado com o peptídeo foi colocada sobre a membrana no anel dosador (aproximadamente 270 mg de formulação em área de exposição de 1,77 cm^2) e o compartimento receptor foi preenchido com solução receptora composta por tampão fosfato pH 7,4.

A solução receptora foi agitada com velocidade de rotação de 300 rpm e mantida a 32,5 °C por banho circulante. Foram utilizadas seis células de difusão no experimento. Foram coletadas 2 mL das amostras na solução receptora nos intervalos de 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 e 12 horas, e depois filtradas em membrana de 0,45 μm e injetadas em CLAE para a quantificação do peptídeo liberado. Um volume de 0,8 mL foi desprezado antes do início de cada coleta e o volume coletado foi repostado automaticamente.

Para calcular a quantidade real liberada/permeada (Q real) foi utilizada a equação 1:

$$Q_{\text{real}, t} = C_t \cdot V_r + \sum V_c \cdot C_c \text{ (equação 1)}$$

Na qual:

$Q_{\text{real}, t}$ = quantidade real permeada referente ao tempo t;

C_t = concentração obtida referente ao tempo t;

V_r = volume da solução receptora (7 mL);

C_c = concentração da amostragem anterior;

V_c = volume amostrado (coletado + limpeza).

Foi construída a curva analítica em solução receptora para a quantificação do peptídeo no ensaio de liberação. Para isto, foram utilizadas seis concentrações, em triplicata, do peptídeo. Foi obtido por meio da curva analítica a equação da reta e o R^2 (coeficiente de correlação linear).

Os parâmetros utilizados na quantificação do peptídeo foram: coluna de fase reversa C18 utilizando o solvente A (água ultrapura + TFA 0,045%) e solvente B (acetonitrila + TFA 0,036%). O método utilizado foi isocrático, a porcentagem de solvente utilizado foi 50% de B

em 10 min. Os valores obtidos das áreas pelo CLAE foram aplicados na equação da curva analítica para a quantificação do peptídeo no ensaio de liberação. A detecção foi realizada por meio da fluorescência do triptofano com excitação em 280 nm e emissão em 350 nm.

3.8. Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a análise antimicrobiana, foi utilizado o teste de difusão em discos em placas de Petri e o teste de difusão em ágar utilizando para a aplicação da amostra em cilindros de aço inoxidável. Realizaram-se repiques de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922 em meios inclinados de TSA e incubou-se a 35 ± 1 °C, por 24 horas. Posteriormente, essas culturas bacterianas foram inoculadas em caldo BHI por 24 horas e diluídas convenientemente para se obter cerca de 10^8 UFC/mL (Unidade Formadora de colônia/mL), o que é preconizado para bactérias neste método (CHATTOPADHYAY et al., 2002; KARAMAN et al., 2003). A partir desta suspensão de bactérias preparou-se a camada superfície em ágar BHI (5 mL) na concentração de 1 % de inóculo que foi aplicada sobre 20 mL da camada base composta também de ágar BHI. Este procedimento foi realizado da mesma forma tanto para o teste de difusão em disco como para o teste de difusão utilizando cilindro de aço inoxidável. Alternativamente o teste de difusão em disco também foi realizado de outra forma, utilizando salina para inocular as bactérias e para se obter a UFC recomendada.

As soluções a serem avaliadas foram preparadas em seis diluições seriadas do peptídeo *W6-Hy-a1* (750,2 $\mu\text{mol/L}$), do peptídeo *W6-Hy-a1* incorporado ao Sistema Líquido Cristalino (680 $\mu\text{mol/L}$) e do SLC com água ultrapura (volume final de 200 μL), foram utilizadas essas concentrações para se atingir uma concentração final próxima a concentração inibitória mínima (MIC) do peptídeo Hylina, como descrito por Crusca e colaboradores (2011). Como controle positivo foi utilizado ciprofloxacino (13 $\mu\text{mol/L}$) e como negativo água ultrapura. Os discos de papel de 6 mm foram impregnados 12 horas antes com 15 μL

das diluições das amostras. A seguir, discos de papel foram colocados sobre a camada superficial do ágar e deixados em incubação por 24 horas a 35 ± 1 °C. Com o teste de difusão de cilindros de aço inoxidável, o procedimento foi praticamente o mesmo, tendo como diferença que o volume de amostra utilizada foi de 50 µL. A medida dos halos de inibição foi realizada com auxílio de um paquímetro digital.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese Peptídica em Fase Sólida (SPFS)

Para iniciar a síntese, foi realizada a retirada do grupo Fmoc da resina com piperidina 20% em DMF. A resina utilizada foi a Rink amida, de forma que o peptídeo obtido contém em sua extremidade C-terminal um grupo carboxiamida, como descrito por Castro e colaboradores (2009).

A síntese foi realizada até a obtenção da sequência Fmoc-IFGAIWPLALGALKNLIK utilizando a resina Rink Amida MBHA de grau de substituição 0,68 mmol/g, partindo de uma escala inicial de 0,2 mmol (294 mg de resina), por meio de etapas sucessivas de acoplamento, e desproteção. Após a clivagem do peptídeo da resina, foram obtidos 127 mg de peptídeo bruto.

4.2. Purificação e caracterização do peptídeo

A purificação do peptídeo *W6-Hy-a1* foi realizada em um sistema de CLAE semipreparativo, utilizando gradiente de 40 a 80 % de solvente B em 90 min. A determinação do gradiente a ser utilizado foi feita por meio do valor do tempo de retenção obtido no cromatograma do peptídeo em CLAE analítico (aproximadamente 20 min que corresponde a 60% de acetonitrila).

Os tubos coletados na purificação foram analisados em cromatógrafo analítico, com gradiente isocrático de 45% de solvente B em 8 min. Os tubos contendo o material puro foram juntados (processo denominado de corte) e liofilizados, obtendo-se as frações contendo o peptídeo. Estas frações foram analisadas por CLAE analítico em um programa de 5 a 95% de B em 30 min. A massa obtida em cada fração e a pureza obtida por CLAE estão descritas na Tabela 1. Os perfis cromatográficos do peptídeo bruto e da fração com maior grau de pureza podem ser observados na Figura 3.

A confirmação da obtenção do peptídeo *W6-Hy-a1* foi feita pela espectrometria de

massas, onde podemos observar a razão massa molecular/carga do peptídeo. Devido à calibração do aparelho para moléculas pequenas, os picos com 100% de saturação no espectro mostraram a razão massa/carga, principalmente para cargas 2 e 3 (Figura 4).

Tabela 1: Massa das frações puras obtidas do peptídeo *W6-Hy-a1* com seus índices de pureza.

Frações do peptídeo <i>W⁶-Hy-a1</i>	Massa (mg)	Índice de pureza (%)
A	59,7	97,8
B	15	90,9
C	17,7	77,5
D	6,3	50,0

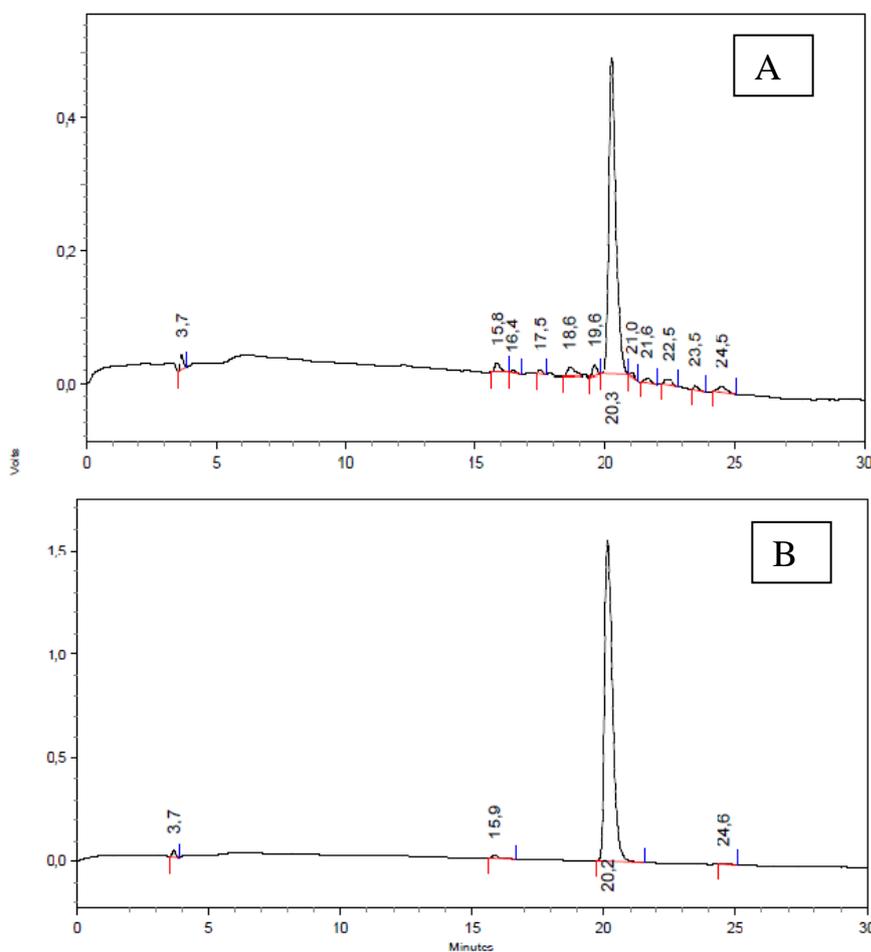


Figura 3. Perfil cromatográfico do peptídeo bruto (A) e da fração (B) com maior índice de pureza (97,8%), com os respectivos tempos de retenção na coluna de fase reversa C18.

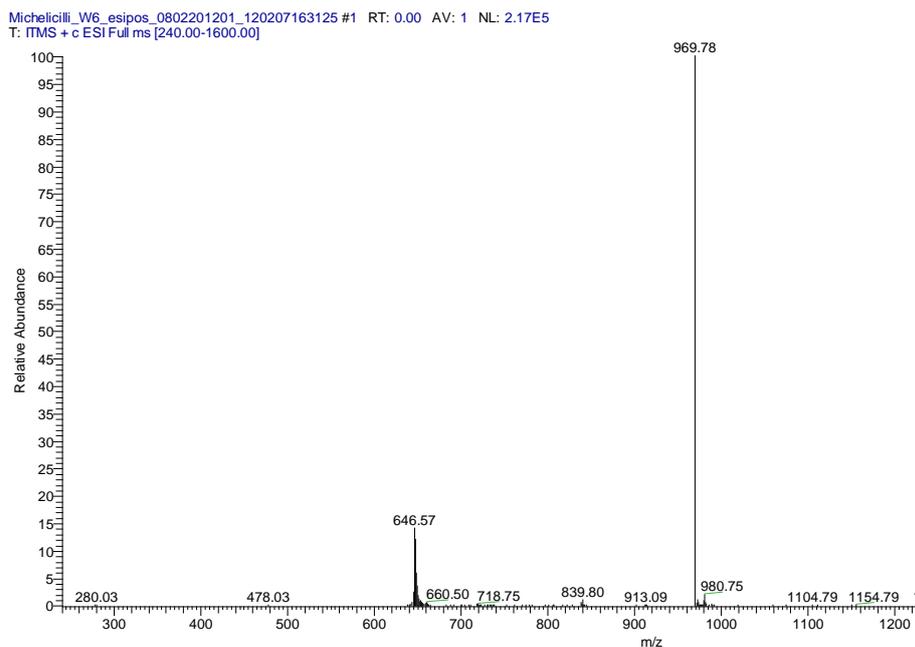


Figura 4. Espectro de massas do peptídeo *W6-Hy-a1* puro (fração A).

4.3. Obtenção do diagrama de fases pseudoternário para o sistema estabilizado por (FS:OS:TW)

O método da titulação foi utilizado por fornecer uma análise considerada mais rápida em relação à grande quantidade de composições possíveis entre os componentes utilizados para formar o SLC (BHARGAVA et al., 1987). Os pontos obtidos no diagrama de fases foram classificados visualmente contra fundo escuro como SLO (Sistema Líquido Opaco), SVT (Sistema viscoso Transparente), SLT (Sistema Líquido Transparente), SVO (Sistema Viscoso e Opaco) e SF (Separação de Fases). Por meio da classificação de cada ponto se obteve um gráfico (Figura 5). A leitura do diagrama foi realizada no sentido horário, sendo que o lado direito do diagrama refere-se ao sistema tensoativo, a base refere-se à fase oleosa enquanto o lado esquerdo refere-se ao tampão fosfato.

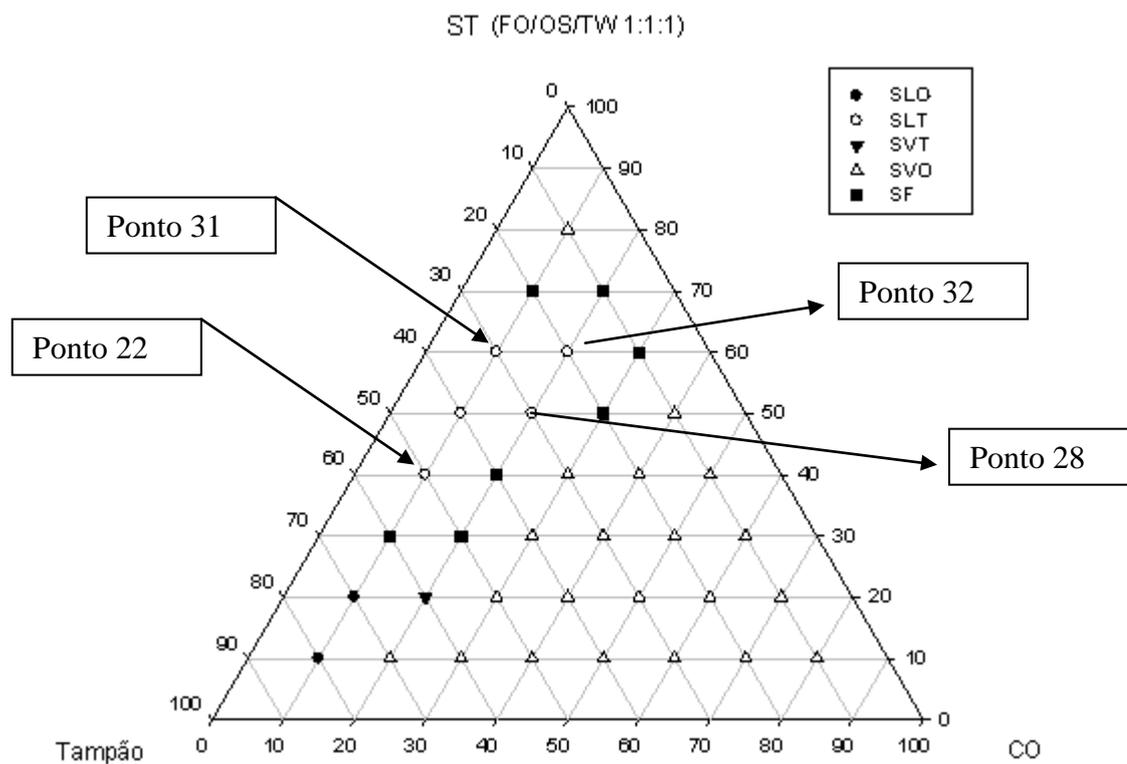


Figura 5. Diagrama de fases pontual da formulação constituído por sistema tensoativo (FO/OS/TW 1:1:1), tampão fosfato pH 7,4 (fase aquosa) e CHO (fase oleosa), no qual: \circ SLT = sistema líquido transparente; \blacktriangledown SVT = sistema viscoso transparente; \bullet SLO = sistema líquido opaco; \triangle SVO = sistema viscoso opaco; \blacksquare SF = separação de fases.

A transparência (SLT e SVT) é característica de microemulsão e de sistema líquido cristalino, sendo que podemos diferenciar as microemulsões fluidas dos cristais líquidos viscosos por meio da diferença de viscosidade. Por meio do gráfico foi possível perceber que para a obtenção do sistema líquido-cristalino necessitou-se de quantidades intermediárias de Sistema Tensoativo e tampão fosfato (40% a 60%) e de pequenas quantidades de CHO (10% a 20%). O aumento da quantidade de colesterol levou à formação de emulsões, acarretando aumento da viscosidade.

4.4. Análise estrutural das formulações

4.4.1. Microscopia de luz polarizada

Uma maneira de confirmar a formação de SLC é por meio da microscopia de luz polarizada. Desta forma, nos pontos em que foram encontradas características visuais de anisotropia (os pontos opticamente transparentes e líquidos) se utilizou a microscopia de luz

polarizada para visualizar a presença de estruturas que desviam o plano da luz polarizada (como cruz de malta, por exemplo) que são características de fase lamelar formando o sistema líquido-cristalino. Estas estruturas foram encontradas nos pontos 22, 28, 31 e 32, o que pode ser visualizado pelas imagens das Figuras 6 a 9. O ponto 22 foi o escolhido para a incorporação do peptídeo e os demais estudos.

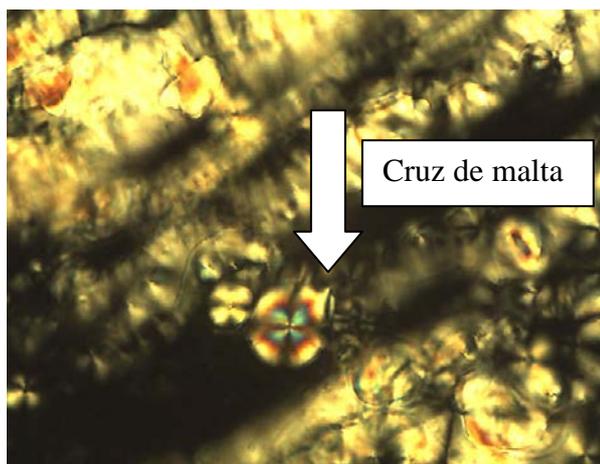


Figura 6. Fotomicrografia representativa do ponto 31 - 60% de ST (FS:OS:TW-20) (1:1:1 p/p), 10% de CO como fase oleosa e 30% de tampão fosfato. Aumento de 40 x.

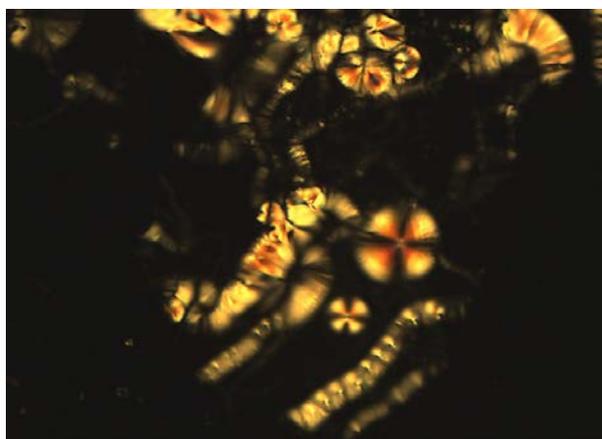


Figura 7. Fotomicrografia representativa do ponto 32 - 60% de ST (FS:OS:TW-20) (1:1:1 p/p), 20% de CO como fase oleosa e 20% de tampão fosfato. Aumento 40 x.

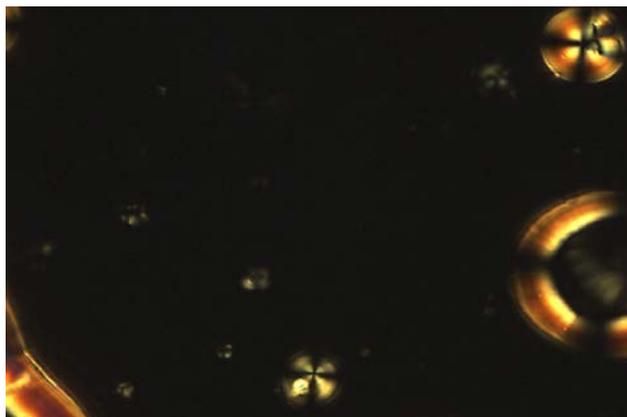


Figura 8. Fotomicrografia representativa do ponto 22 - 40% de ST (FS:OS:TW-20) (1:1:1 p/p), 10% de CO como fase oleosa e 50% de tampão fosfato. Aumento 40 x.

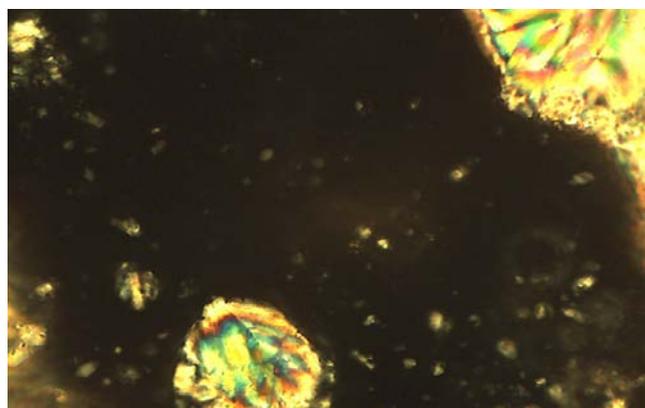


Figura 9. Fotomicrografia representativa do ponto 28 - 50% de ST (FS:OS:TW-20) (1:1:1 p/p), 20% de CO como fase oleosa e 30% de tampão fosfato. Aumento 40 x.

4.4.2. Reologia

Para analisar a fluidez do sistema, visando avaliar o uso tópico e obter informações sobre os parâmetros físico-químicos deste sistema macromolecular, a reologia do sistema foi determinada. Os ensaios foram realizados em cisalhamento estacionário, não ocorrendo variação na tensão de cisalhamento. A amostra é cisalhada entre as paredes interna e externa da porta-amostra cuja geometria usual compreende cone e placa, sendo submetida a sucessivas velocidades de cisalhamento pelo movimento de rotação do cone. Com isso foi possível construir os reogramas (Figuras 10 e 11).

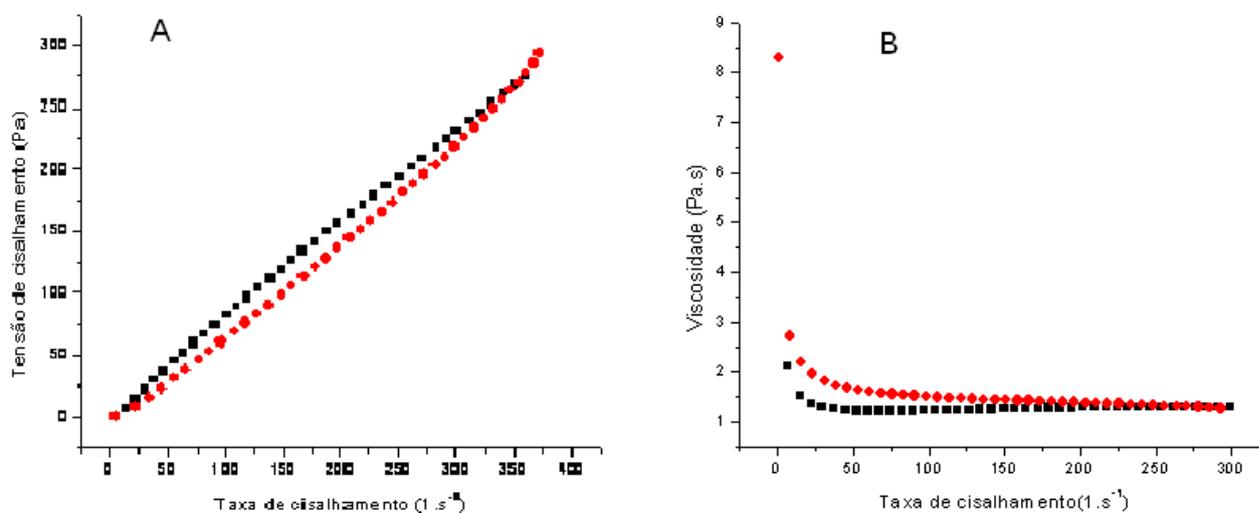


Figura 10. Reograma de fluxo (A) e de viscosidade (B) por taxa de cisalhamento da formulação sem peptídeo a 25°C (a temperatura foi mantida fixa durante todo o experimento). Em (A), o símbolo em preto representa a curva ascendente e o símbolo vermelho representa a curva descendente. Em (B) o símbolo em preto representa a curva descendente e o vermelho a curva ascendente.

Pela análise das curvas dos reogramas na Figura 10, conclui-se que a formulação caracteriza-se como sistema não-newtoniano (na faixa de 0 a 300 1.s⁻¹), pois sua viscosidade não se mantém constante com a variação da taxa de cisalhamento. Sendo possível observar que a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento o que classifica o sistema como pseudoplástico. Os sistemas pseudoplásticos podem apresentar um fenômeno chamado de tixotropia como é o caso do obtido neste trabalho, porque mesmo com a velocidade de cisalhamento removida o sistema tende a readquirir a estrutura inicial, de tal forma que as curvas ascendentes e descendentes do reograma ficam deslocadas, resultando em uma área de histerese. A tixotropia é diretamente proporcional à área de histerese, portanto quanto maior a área de histerese maior a tixotropia da formulação.

Por apresentar a característica de pseudoplasticidade, o sistema se torna adequado ao uso tópico fornecendo um bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme sobre a pele (BOODTS, 2003).

As propriedades tixotrópicas estão diretamente relacionadas com a interação entre os componentes da formulação e pode ser atribuído nesse caso ao fato de que o SLC ser uma

rede estruturada formada pelas interações entre os componentes do sistema. Devido à existência de forças de interações entre as regiões mais estruturadas, a estruturação pode ser destruída com o aumento da velocidade de cisalhamento e facilmente recomposta quando essa velocidade diminui.

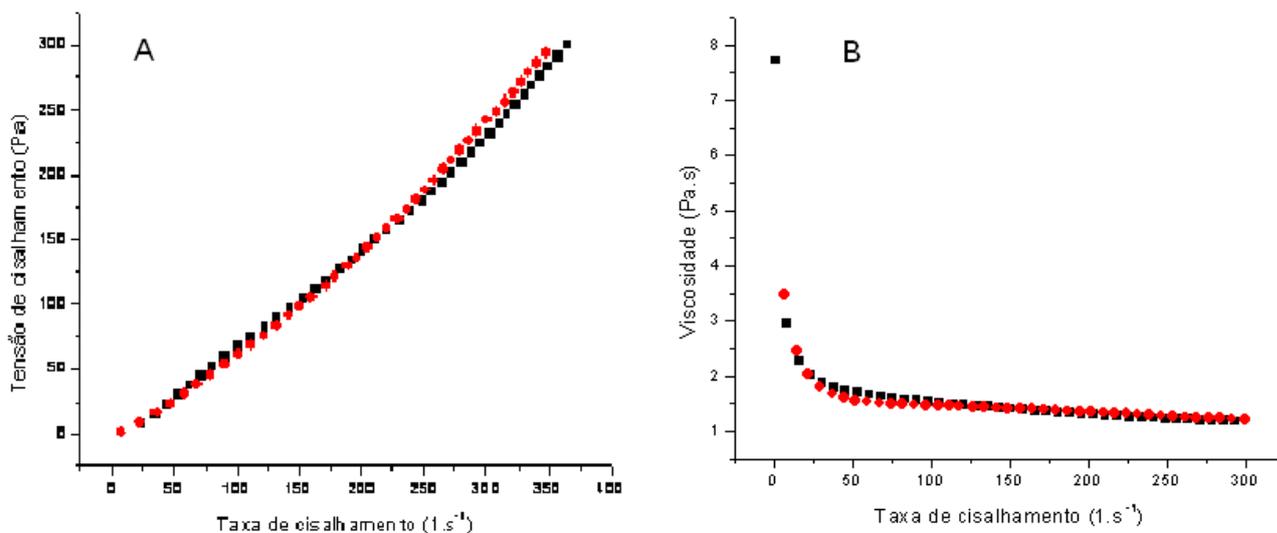


Figura 11. Reograma de fluxo (A) e de viscosidade (B) por taxa de cisalhamento da formulação com peptídeo a 25°C (a temperatura foi mantida fixa durante todo o experimento). Em (A), o símbolo em preto representa a curva ascendente e o símbolo vermelho representa a curva descendente. Em (B) o símbolo em preto representa a curva descendente e o vermelho a curva ascendente.

Uma solução do peptídeo *W6-Hy-a1* foi adicionada na fase aquosa da formulação a fim de se obter uma concentração final de 8 $\mu\text{mol/L}$ do peptídeo. Na Figura 11 é possível notar que o peptídeo diminui a área de histerese (A) e a variação de viscosidade do sistema se manteve mais estável (B). Estas variações indicam que o peptídeo foi incorporado ao sistema. No entanto, na análise comparativa entre as Figuras 10 e 11 é possível notar que a incorporação do peptídeo ao sistema não causa grandes alterações em sua estrutura.

4.5. Determinação da incorporação do peptídeo no sistema líquido-cristalino

Após a mistura de todos os componentes para a formação do SLC, foi realizada uma etapa de centrifugação, onde se verificou a separação de fases entre a parte líquido-cristalina e

o sobrenadante. Ambas as amostras foram analisadas para verificar se o peptídeo estava realmente presente no SLC.

Neste sentido, foram utilizadas duas técnicas: a espectrofotometria e a CLAE em fase reversa. As curvas de absorção obtidas por meio da espectrofotometria para o SLC contendo o peptídeo, o sobrenadante e o colesterol estão reunidas na Figura 12. Pelo gráfico pode-se observar que a absorção característica do Trp foi observada nitidamente no SLC, indicando que o sobrenadante quase não possui o peptídeo ou o possui em pequena concentração.

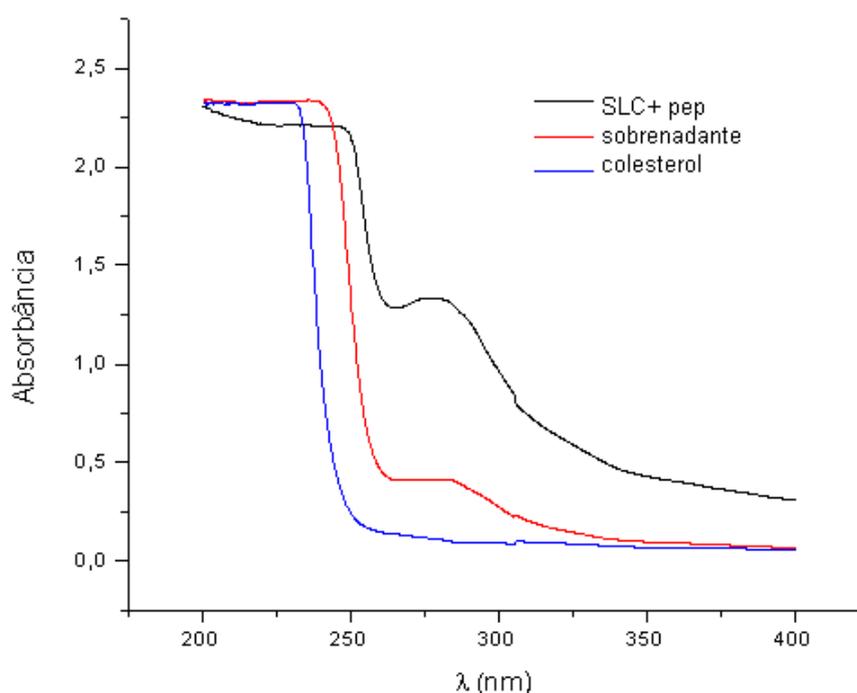


Figura 12. Espectros de absorção na região do UV do peptídeo, da parte líquido-cristalina e sobrenadante. Na linha cor preto - sistema líquido cristalino, linha cor vermelha – sobrenadante e linha cor azul - colesterol.

Desta forma, foi possível perceber por meio do espectro de absorção na região UV que a maior parte do peptídeo foi incorporada na fração líquido-cristalina.

Para confirmar o resultado acima e tentar obter valores quantitativos da incorporação do peptídeo ao SLC, foi utilizada a CLAE em fase reversa. Desta forma, o sobrenadante, o SLC e a solução estoque do peptídeo (1mg/1mL) foram analisados em cromatógrafo analítico

em um programa de 5 a 95% de solvente B em 30 min. Os perfis cromatográficos das frações e da solução estoque do peptídeo com os seus respectivos tempos de retenção na coluna podem ser observados nas Figuras 13, 14 e 15.

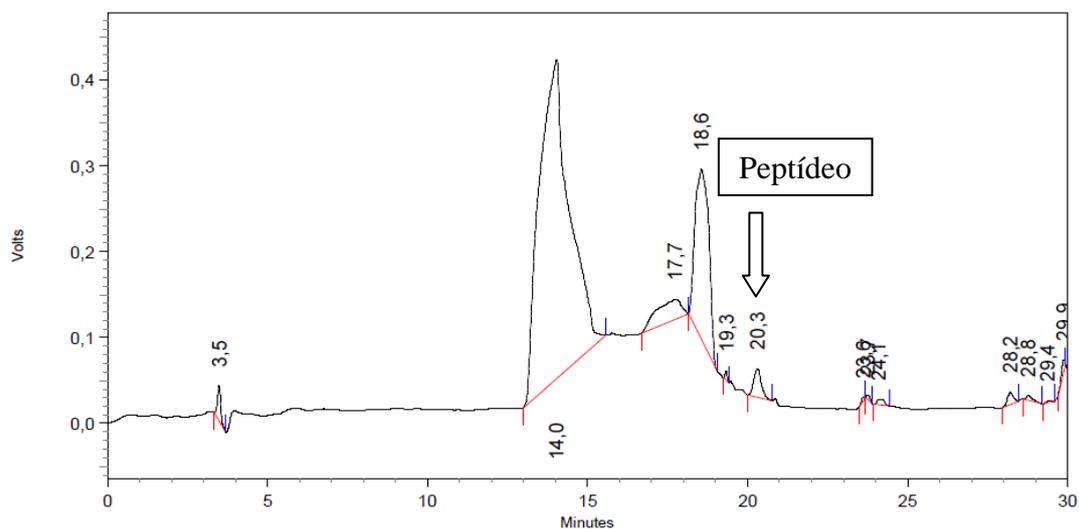


Figura 13. Cromatograma obtido por meio da CLAE em fase reversa do sistema líquido-cristalino com o peptídeo.

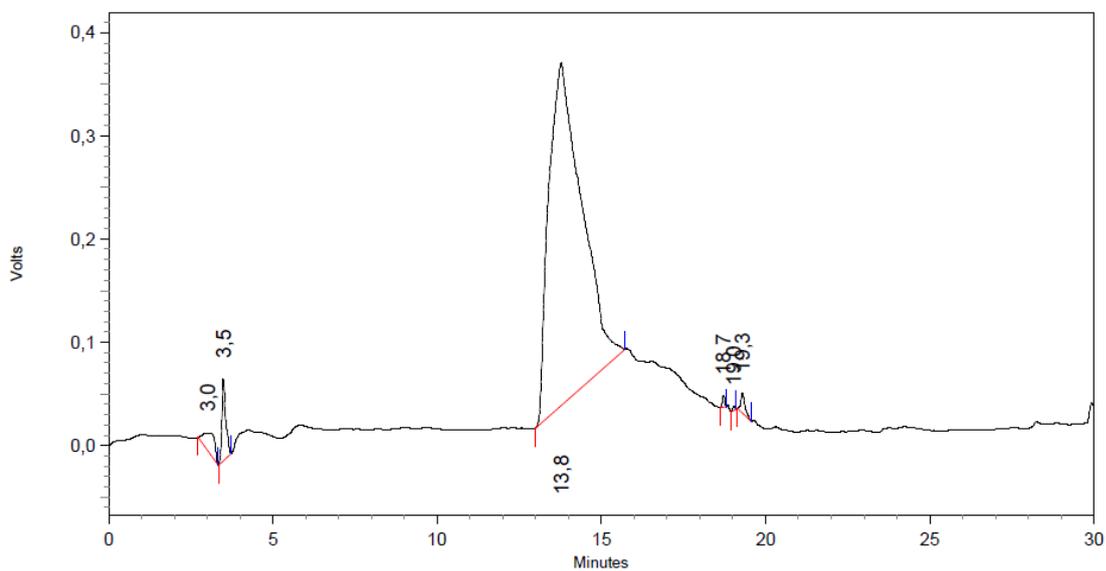


Figura 14. Cromatograma obtido por meio da CLAE em fase reversa do sobrenadante.

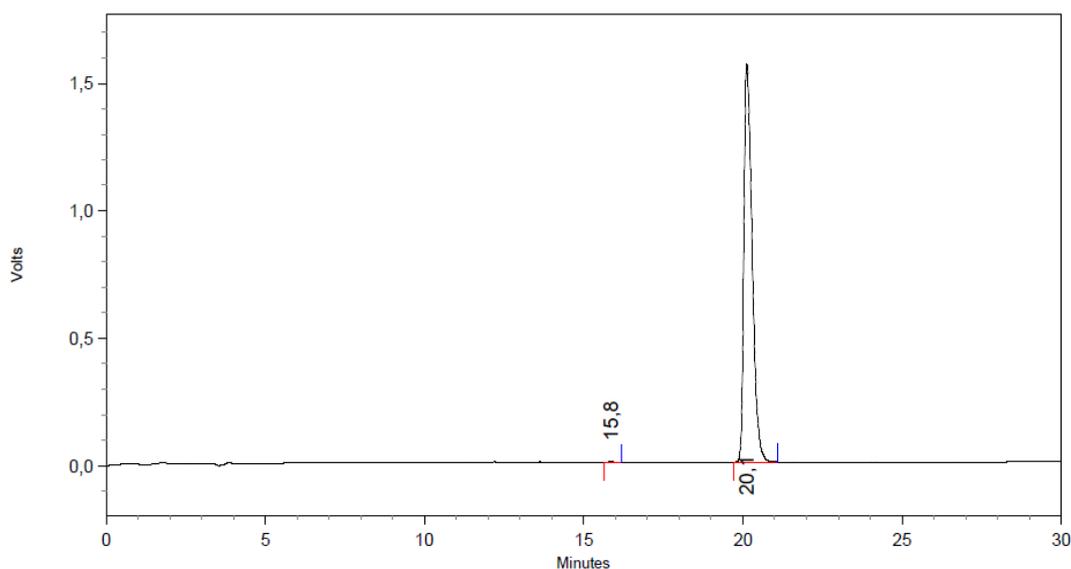


Figura 15. Cromatograma obtido por meio da CLAE em fase reversa do peptídeo *W6-Hy-a1* puro (sol. Estoque).

É possível observar pelo tempo de retenção que o peptídeo foi incorporado ao sistema líquido-cristalino, não sendo observado no sobrenadante.

Para a análise quantitativa do teor de incorporação, utilizou-se 1 mL de uma solução estoque com concentração inicial de 910 $\mu\text{mol/L}$ em de tampão fosfato. Posteriormente, essa solução foi incorporada ao SLC com volume final de 2 mL. A amostra foi então centrifugada a 14.000 rpm durante 30 minutos; descartou-se o sobrenadante, e o rendimento foi de aproximadamente 0,5 mL. Pelo fato do SLC apresentar viscosidade alta, este foi diluído em 500 μL de água ultrapura, obtendo assim um volume final de 1000 μL (concentração de peptídeo de 910 $\mu\text{mol/L}$). Uma alíquota de 20 μL desta solução foi adicionada de 80 μL de metanol e 80 μL de butanol para a desestruturação do SLC e injetou-se no sistema de CLAE. Utilizou-se como padrão, uma solução estoque de concentração igual a 143 $\mu\text{mol/L}$ que também foi aplicada em CLAE utilizando o mesmo método, para a obtenção das áreas do pico, as quais são proporcionais à concentração das substâncias (Figura 16).

$$\frac{A_p - C_p}{A_a - C_a}$$

$$C_a = \frac{A_a * C_p}{A_p}$$

Figura 16: Relação entre a área do padrão e a área da amostra. A_a = área da amostra, C_a = concentração da amostra, A_p = área do padrão, C_p = concentração do padrão.

Por CLAE obteve-se a área da amostra que foi igual a 663870 e a área do padrão igual a 9859341 para a concentração de $143 \mu\text{mol. L}^{-1}$. Aplicando esses valores na fórmula acima se obteve o valor de $38,6 \mu\text{mol. L}^{-1}$ que é o valor da concentração da amostra injetada no CLAE. Como a solução foi diluída 9 vezes, a concentração do peptídeo no SLC foi de $347,4 \mu\text{mol. L}^{-1}$, que é a concentração real do peptídeo incorporado ao sistema líquido cristalino. Assim o rendimento de incorporação foi de aproximadamente 39%.

4.6. Teste de liberação *in vitro*

O teste de liberação do peptídeo do sistema líquido cristalino foi realizado utilizando a CLAE. A Figura 17 apresenta o gráfico da curva analítica com a equação da reta e o seu coeficiente de correlação (r^2). A curva apresentou o critério mínimo aceitável pela ANVISA que é de 0,99 (BRASIL, 2003).

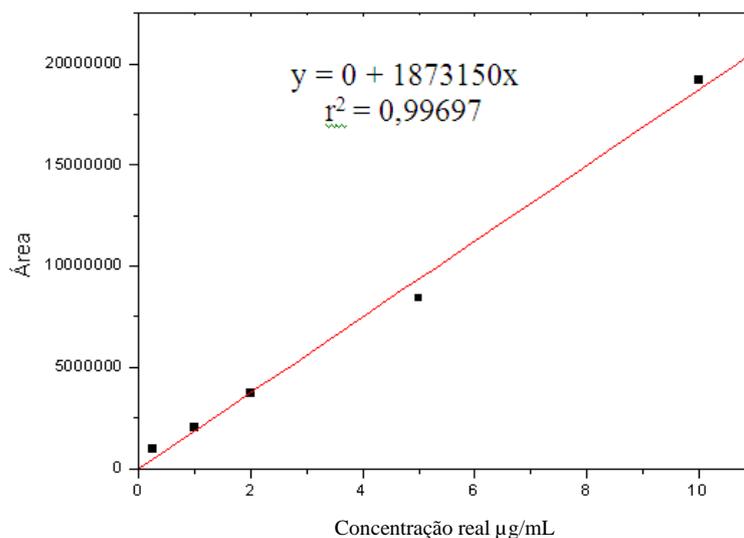


Figura 17. Curva de liberação do peptídeo *W6-Hy-a1*, equação da reta (y) e o seu respectivo coeficiente de correlação (r^2).

Foram realizados os cálculos por meio dos valores obtidos das áreas aplicando-as na equação da curva analítica, para se obter as concentrações de peptídeo liberadas da formulação. A Tabela 2 apresenta a porcentagem de liberação do peptídeo.

Tabela 2. Liberação do peptídeo W6- Hy-a1 incorporado ao SLC.

Tempo (h)	Qreal ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	% liberação	DPR(%)
0,5	0,63	0,2440	8,87
1	0,92	0,3596	8,96
2	1,27	0,4964	7,27
4	2,40	0,9359	3,97
6	3,46	1,3487	2,56
8	4,89	1,9076	2,58
10	6,34	2,3867	2,68
12	8,04	3,0264	6,32

Qreal é a quantidade real liberada de peptídeo e DPR é o desvio padrão relativo e porcentagem de liberação do peptídeo.

O desvio padrão relativo (DPR) é calculado através da equação 2: $\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{M}} \times 100$, em que DP é o desvio padrão e M é a média das seis replicatas. Observa-se que o DPR do teste de liberação está dentro dos limites das especificações que é menor que 10%.

Na liberação *in vitro* o peptídeo teve que passar do SLC para o meio externo tendo assim uma constante de liberação (K_1) e depois o peptídeo teve que passar pela membrana de celulose até a solução receptora tendo assim a constante de permeação (K_2). Como no teste com o peptídeo livre em solução aquosa ele está somente solubilizado, deveria ser liberado rapidamente para o meio. Quando o peptídeo estava incorporado ao SLC sua porcentagem de liberação foi menor, porém constante. Isso por que o peptídeo pode estar interagindo com o arranjo lamelar do sistema líquido-cristalino, promovendo uma liberação mais lenta para o meio receptor.

A Figura 18 traz o perfil de liberação do peptídeo incorporado à formulação e do peptídeo livre em solução.

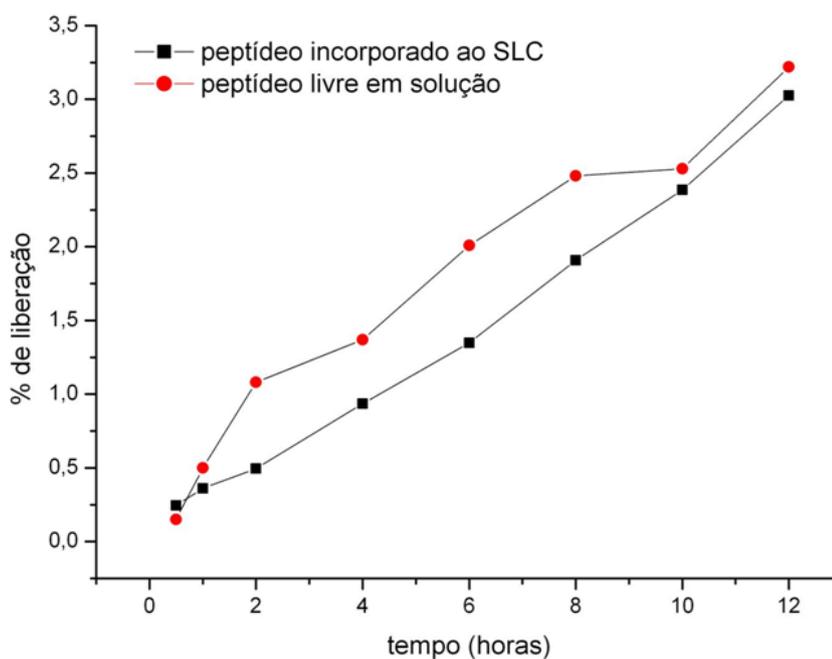


Figura 18: Perfil de liberação do peptídeo incorporado ao SLC e do peptídeo livre em solução.

Para obter a cinética de liberação do fármaco os resultados foram aplicados em três modelos matemáticos: zero ordem (Q_{real} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em função do tempo), primeira ordem (logaritmo da porcentagem de fármaco em função do tempo) e Higuchi (Q_{real} em $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ em função da raiz quadrada do tempo). A Tabela 3 traz o coeficiente de correlação (r^2) de cada modelo matemático.

Tabela 3. Coeficiente de correlação r^2 da formulação com peptídeo *W6-Hy-a1* incorporado dos modelos matemáticos de zero ordem, primeira ordem e Higuchi.

Formulação	Zero ordem	Primeira ordem	Higuchi
Ponto 22	0,9901	0,9303	0,9468

O modelo matemático que apresentou r^2 maior foi o de zero ordem. A Figura 19 traz o gráfico da cinética de liberação zero ordem e o seu respectivo r^2 .

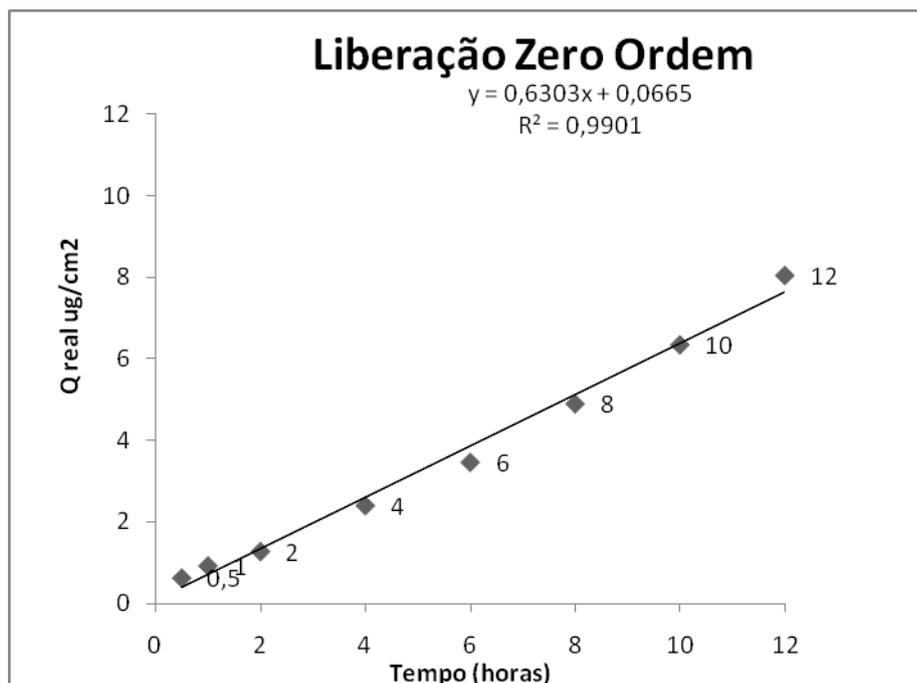


Figura 19. Modelo de cinética de liberação zero ordem.

A cinética de liberação zero ordem indica que a taxa de liberação do fármaco é independente do tempo sendo controlada pela estrutura lamelar do SLC, sendo que a mesma quantidade de fármaco é liberada por unidade de tempo independente da concentração do fármaco, sendo muito utilizada quando se pretende obter uma ação farmacológica prolongada (AULTON, 2005).

4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

O ensaio de inibição de crescimento microbiano foi realizado para avaliar a atividade antibacteriana do peptídeo W6-hylina-a1 quando incorporado ao SLC.

O SLC também poderia apresentar atividade antimicrobiana. Para verificar se o SLC é capaz de inibir o crescimento e em que proporção isto ocorre, foi realizado em uma placa em separado um ensaio contendo o SLC livre de peptídeo, mas esse não mostrou atividade antimicrobiana.

Foi utilizado para o teste de inibição de crescimento microbiológico uma bactéria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma de bactéria Gram negativa (*Escherichia coli*).

No estudo se aplicou o peptídeo livre em seis diluições seriadas diluídas 2 vezes a cada etapa em água ultrapura com solução estoque inicial de concentração 750,2 $\mu\text{mol/L}$. O mesmo ocorreu com o peptídeo incorporado ao sistema líquido-cristalino com concentração inicial de 680,7 $\mu\text{mol/L}$. Para controle positivo foi utilizado o Ciprofloxacino (13 $\mu\text{mol/L}$ que equivale a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). No teste de difusão em discos utilizando salina como inóculo utilizou-se como controle positivo o meropenem 10 μg por esse agir desestabilizando a membrana celular como os peptídeos antimicrobianos. O controle negativo utilizado foi a água ultrapura em todos os testes.

No teste de difusão, os cilindros de aço inoxidável foram colocados no meio de cultura solidificado inoculado, os cilindros receberam das soluções em estudos as diluições das concentrações iniciais descritas na metodologia. Neste ensaio foi avaliada somente a bactéria Gram positiva. O peptídeo apresentou atividade em todas as concentrações avaliadas, e o peptídeo incorporado ao SLC apresentou atividade somente na 1ª diluição (Tabelas 4 e 5).

O teste de difusão em discos é aceito pela FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee e Clinical Laboratory Standards) (BARRY & THORNSBERRY, 1991), neste se aplicou 17 μL da solução a ser avaliada em discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro. O peptídeo apresentou atividade nas três primeiras diluições tanto para a bactéria Gram positiva como para a bactéria Gram negativa, sendo que nesta última a atividade foi menor, e o peptídeo incorporado ao SLC não apresentou atividade antimicrobiana (Tabela 6 e 7).

No teste de difusão em discos utilizando solução salina (0,9 % de cloreto de sódio) no preparo do inóculo, o peptídeo apresentou atividade somente para *S. aureus* (Tabela 8) e quando incorporado ao SLC não apresentou atividade.

Tabela 4. Diâmetros dos halos de inibição em mm do teste realizado com cilindros de aço inoxidável com peptídeo *W6-Hy-a1* livre em solução.

Concentrações do peptídeo livre ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)
	<i>S. aureus</i>
375,1	1,77
187,56	1,25
93,78	0,77
46,89	0,45
23,45	0,40
11,72	0,30

Tabela 5. Diâmetros dos halos de inibição em mm do teste realizado com cilindros de aço inoxidável com peptídeo *W6-Hy-a1* incorporado ao SLC.

Concentrações do peptídeo incorporado ao SLC ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)
	<i>S. aureus</i>
340,35	0,84
170,2	0,0
80,10	0,0
42,54	0,0
21,27	0,0
10,63	0,0

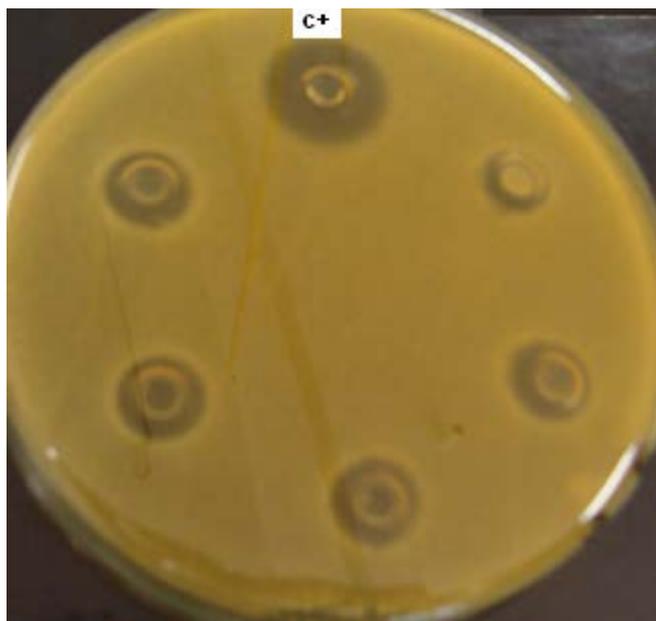


Figura 20. Atividade antimicrobiana do peptídeo *W6-Hy-a1* contra *S. aureus*. Sentido horário: controle positivo com ciprofloxacino e controle negativo com água ultrapura; 1°, 2° e 3° diluição, respectivamente.

Tabela 6. Diâmetros dos halos de inibição em mm do teste realizado com discos de papel com peptídeo *W6-Hy-a1* livre em solução.

Concentrações do peptídeo livre ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
375,1	1,86	1,00
187,56	2,07	0,30
93,78	2,00	0,29
46,89	0,0	0,0
23,45	0,0	0,0
11,72	0,0	0,0

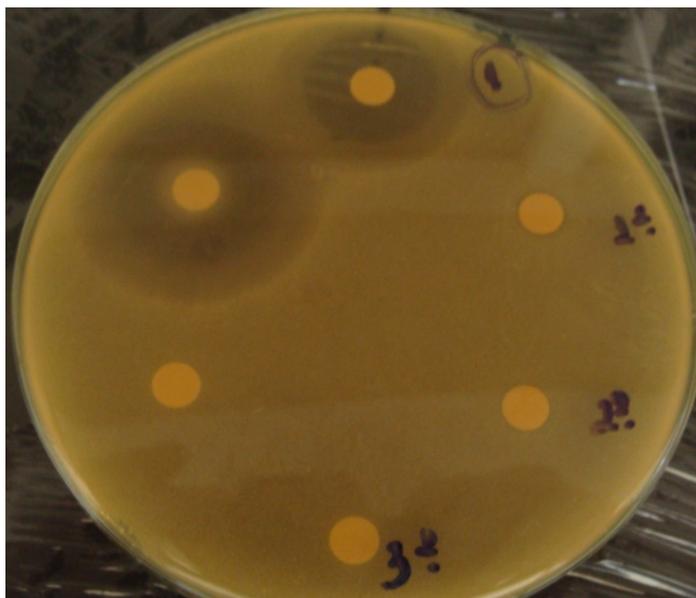


Figura 21. Atividade antimicrobiana do peptídeo *W6-Hy-a1* contra *E. coli*. Sentido anti-horário: controle positivo com ciprofloxacino e ciprofloxacino incorporado ao SLC, controle negativo com água ultrapura; 1°, 2° e 3° diluição.

Tabela 7. Diâmetros dos halos de inibição em mm do teste realizado com discos de papel com peptídeo *W6-Hy-a1* livre em solução, utilizando solução salina para o inóculo.

Concentrações do peptídeo livre (μmol L^{-1})	Diâmetro dos halos de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
375,1	3,86	0,0
187,56	3,07	0,0
93,78	2,00	0,0
46,89	0,0	0,0
23,45	0,0	0,0
11,72	0,0	0,0



Figura 22. Atividade antimicrobiana do peptídeo *W6-Hy-a1* contra *S. aureus*. Sentido horário: controle positivo com meropenem e controle negativo com água ultrapura; SLC, 1º, 2º e 3º diluição, respectivamente.

Foram realizados três testes diferentes pela dificuldade do SLC em se difundir pelo ágar, sendo necessário deixar as placas já inoculadas 2 horas em geladeira antes de se colocar na estufa. O método da microdiluição ou o tubidimétrico poderia ser testado, neles não haveria a limitação da não difusão.

5. CONCLUSÕES

- A metodologia SPFS, utilizando-se a estratégia Fmoc, mostrou-se viável para a obtenção do peptídeo *W6-Hy-a1*.
- A purificação do peptídeo *W6-Hy-a1* foi viável utilizando a CLAE.
- O diagrama de fases se mostrou eficiente para se obter as proporções adequadas de ST (sistema tensoativo), CHO (colesterol) e fase aquosa, e assim ter os pontos de anisotropia. A comprovação da obtenção do sistema líquido-cristalino foi realizada por meio de microscopia de luz polarizada. Os pontos 22, 28, 31 e 33 foram escolhidos por suas características translúcidas visualizadas contra fundo escuro, sendo que um destes (ponto 22) foi utilizado para a incorporação do peptídeo *W6-Hy-a1*.
- O ensaio de reologia mostrou que o sistema se comporta como pseudoplástico o que o torna propício ao uso tópico por conferir o espalhamento necessário durante a aplicação e fornecer a formação de um filme uniforme sobre a pele.
- A espectrofotometria na região do ultravioleta e a CLAE mostraram que o peptídeo foi incorporado ao sistema.
- No teste de liberação *in vitro* a formulação apresentou cinética de ordem zero.
- A avaliação da atividade antimicrobiana mostrou que o peptídeo quando incorporado ao SLC apresentou atividade muito menor que o peptídeo livre. Talvez isso esteja ocorrendo em virtude da liberação prolongada do peptídeo pelo sistema. Testes de diluição em caldo ou utilização de método turbidimétrico para verificação de ação antimicrobiana poderiam ajudar a elucidar este efeito.

6. BIBLIOGRAFIA

ANGELOVA, A.; ANGELOV, B.; MUTAFCHIEVA, R.; LESIEUR, S.; COUVREUR, P. Self assembled multicompartiment liquid crystalline lipid carriers for protein, peptide, and nucleic Acid Drug Delivery. **Acc Chem Res.**, 2010.

APPONYI, M. A.; PUKALA, T. L.; BRINKWORTH, C. S.; MASELLI, V. A.; BOWIE, J. H.; TYLER, M. J.; BOOKER, G. W.; WALLACE, J. C.; JOHN, A.; SEPAROVIC, F.; DOYLE, J.; LLEWELLYN, L. E. Host-defence peptides of Australian anurans: structure, mechanism of action and evolutionary significance. **Peptides**, v.25, n.6, p. 1035-1054, 2004.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2^a ed, Porto Alegre: Artmed, 2005, p.677 p.115.

BARRA, D.; SIMMACO, M. Amphibian skin - A promising resource for antimicrobial peptides. **Trends in Biotechnology**, 13, 6, p. 205-209, 1995.

BHARGAVA, H.N.; NARURKAR, A.; LIEB, L.M. Using microemulsions for drug delivery. **Pharm. Technol.**, v.3, p.46-54, 1987.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Resolução RE n° 899, **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2003.

BOODTS, J.B. **Estabilidade química e física de formulações dermocosméticas contendo retinaldeído**. 2003. 123p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

CASTRO, M.; FERREIRA, T.; CILLI, E. M.; CRUSCAJR, E.; MENDESGIANNINI, M.; SEBBEN, A.; RICART, C.; SOUSA, M.; FONTES, W. Hylin a1, the first cytolytic peptide isolated from the arboreal South American frog *Hypsiboas albopunctatus* (spotted treefrog). **Peptides** (New York), v. 30, p. 291-296, 2009.

CHATTOTADHYAY, D.; ARUNACHALAM, G.; MANDAL, A. B.; SUR, T. K.; MANDAL, S. C.; BHATTACHARYA, S. K. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of folklore: *Mallotus peltatus* leaf extract. **J Ethnopharmacol**, v. 82, p. 229-23, 2002.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SCARPA, M.V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluído de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p.1036-1040, 2009.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 72, n. 3, p. 365-379, 1997.

COATES, A.R.; HU, Y.; MITCHISON, D. A.; Comparison of the sterilising activities of the nitroimidazopyran PA-824 and moxifloxacin against persisting *Mycobacterium tuberculosis*. **Int. J. Tuberc. Lung Dis**, v. 12, p. 69-73, 2008.

CRUSCA, E.; REZENDE, A. A.; MARCHETTO, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; FONTES, W.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Influence of N-terminus modifications on the biological activity, membrane interaction, and secondary structure of the antimicrobial peptide hylin-a1. **Biopolymers** (New York Print), v. 96, p. 41-48, 2011.

FARKAS, E.; KISS, D.; ZELKÓ, R. Study on the release of chlorhexidine base and salts from different liquid crystalline structures. **Int. J. Pharm.**, v. 340, n.1-2, p.71-75, 2007.

GODBALLE, T.; NILSSON, L. L.; PETERSEN P.D.; JENSSEN, H. Antimicrobial b-Peptides and a-Peptoids. **Chem Biol Drug Des.**, v. 77, p.107–116, 2011

GUTERRES, S.S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A.R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules, for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HAYDEL, S. E. Extensively drug-resistant tuberculosis: A sign of the times and an impetus for antimicrobial discovery. **Pharmaceuticals** (Basel), v. 3, n.7, p. 2268–2290, 2010.

HOSMER, J.M.; SHIN, S.H.; NORNOO, A.; ZHENG, H.; LOPES, L.B. Influence of internal structure and composition of liquid crystalline phases on topical delivery of paclitaxel. **J Pharm Sci**, 2010.

HURDLE, J.G.; O'NEIL, A.J.; CHOPRA, I.; LEE, R.E. Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. **Nature** (review), v. 9, p. 62-75, 2011.

JAPONI, A.; JAMALIDOUST, M.; FARSHAD, S.; ZIYALYAN, M.; ALBORZI, A.; JAPONI, S.; RAFAATPOUR, N. Characterization of SCC mec types and antibacterial susceptibility patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Southern Iran. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 64, p. 28-33, 2011.

JOHANSSON, M.; BARAUSKAS, J.; NORLIN, A.; TIBERG, F. Physicochemical and drug delivery aspects of lipid-based liquid crystalline nanoparticles: a case study of intravenously administered propofol. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, n. 9-10, p. 3017-3024, 2006.

LEE, K.W.; NGUYEN, T.H.; HANLEY, T.; BOYD, B.J. Nanostructure of liquid crystalline matrix determines in vitro sustained release and in vivo oral absorption kinetics for hydrophilic model drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 365, n.1-2, p.190-199, 2009.

LI, P.; HYNES, S.R.; HAEFELE, T.F.; PUDIPEDDI, M.; ROYCE, A.E.; SERAJUDDIN, A.T. Development of clinical dosage forms for a poorly water-soluble drug II: formulation and characterization of a novel solid microemulsion preconcentrate system for oral delivery of a poorly water-soluble drug. **J. Pharm. Sci.**, v. 98, n. 5, p.1750-1764, 2009.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J Ethnopharmacol**, v.85 p. 231-235, 2003.

MANGONI, M. L.; MIELE, R.; RENDA, T. G.; BARRA, D.; SIMMACO, M. The synthesis of antimicrobial peptides in the skin of *Rana esculenta* is stimulated by microorganisms.

Faseb Journal, v. 15, n. 6, 2001.

MIHAJLOVIC, M.; LAZARIDIS, T. Charge distribution and imperfect amphipathicity affect pore formation by antimicrobial peptides. **Biochim Biophys Acta**. 2012.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 561-573, 2006.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 58, n. 2, p. 343-356, 2004.

PAYNE, D. J.; GWYNN, M. N.; HOLMES, D. J.; POMPLIANO D. L. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature** (Review), v. 6, p. 29-40, 2007.

RIZWAN, S. B.; BOYD, B. J.; RADES, T.; HOOK, S. Biocontinuous cubic liquid crystals as sustained delivery systems for peptides and proteins. **Expert opin drug deliv.** v. 7, p. 1133-1144, 2010.

ROMANELLI, A.; MOGGIO, L.; MONTELLA, R. C.; CAMPIGLIA, P.; IANNACCONE, M.; CUPUANO, F.; PEDONE, C.; CAPPARELLI, R. Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. **Peptide Science**, 2010.

SANTOS, O.D.H.; MIOTTO, J.V.; MORAIS, J.M.; ROCHA-FILHO, P.A.; OLIVEIRA, W.P. Attainment of emulsions with liquid crystals from marigold oil using the required HLB method. **J. Dispersion Sci. Technol.**, v. 26, p. 243-249, 2005.

SCOOT, H. Reology. In: REMINGTON, J.P., ed. **The science and practice of pharmacy**. 20^a ed. Philadelphia: Editora Lippincott, 2000. cap. 23, p. 335-335.

SHAMAEI-TOUSI; HU. Y.; LIU, A.; COATES, A.R. A new approach for the discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: a novel topical antibiotic for staphylococcal infections. **PloS ONE** 5 e 11818, 2010.

YAGHMUR, A.; RAPPOLT, M.; OSTERGAARD, J.; LARSEN, C.; LARSEN, S.W. Characterization of bupivacaine-loaded formulations based on liquid crystalline phases and microemulsions: The Effect of Lipid Composition. **Langmuir**, v. 28, p. 2881–2888, 2012.