

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA**

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

Anna Lúcia Frohlich

**Otimização, caracterização e estudo
de estabilidade de uma formulação de
hidrogel termorresponsivo para o
tratamento da disfunção erétil**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2023

Anna Lúcia Frohlich

Otimização, caracterização e estudo de estabilidade de uma formulação de hidrogel termorresponsivo para o tratamento da disfunção erétil

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador(a): Dr(a) Tanira Alessandra Silveira Aguirre

Porto Alegre

2023

Catálogo na Publicação

Frohlich, Anna Lúcia

Otimização, caracterização e estudo de estabilidade de uma formulação de hidrogel termorresponsivo para o tratamento da disfunção erétil / Anna Lúcia Frohlich. -- 2023.

107 p. : 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2023.

Orientador(a): Tanira Alessandra Silveira Aguirre.

1. Otimização de hidrogel . 2. Estabilização peptídica. 3. Estudo reológico. 4. Gel polimérico termorresponsível. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FONTES FINANCIADORAS

O projeto atual conta com um acordo de parceria entre UFCSPA e Biozeus Pharmaceuticals S.A., publicado no DOU de Nº 55, terça-feira, 21 de março de 2023. O presente Acordo de Parceria para PD&I tem por objeto a cooperação técnica e científica entre os parceiros para melhoramento e caracterização físico-química de uma formulação com estabilidade suficiente que possa permitir a comercialização do PNPP19, um peptídeo aplicado de forma tópica visando o tratamento da disfunção erétil (DE). O projeto em parceria com a BIOZEUS foi aprovado na Chamada CNPq Nº 12/2020 - Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação - MAI/DAI Processo: 403639/2020-4. Nesse Edital foram concedidas uma bolsa de mestrado e duas bolsas de iniciação tecnológica e industrial (ITI).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às pessoas que foram essenciais nessa caminhada de 2 anos e que tornaram possível esse trabalho.

Primeiramente, à minha orientadora professora Tanira. Fizemos um trabalho excelente até aqui e vamos seguir fazendo pelos próximos anos. Tem sido uma honra trabalhar com você!

À minha família, pelo apoio incondicional. Sempre.

Aos meus avós, Gladis e Delorges, que sempre acreditaram e apoiaram as minhas ideias mais malucas. A neta doutora está quase!

Ao Djonatan, sendo minha luz nos momentos mais sombrios e meu companheiro nos momentos de felicidade. Foi difícil, mas nós conseguimos!

Aos meus amigos que compreenderam minha ausência física durante esse período e me apoiaram durante todo o percurso.

Às minhas gestoras, Verônica e Simone, que compreenderam minhas ausências e sempre apoiaram o desenvolvimento constante.

Toda minha educação tem sido em instituições públicas, desde o primário até a universidade e é muito satisfatório poder dizer que cheguei até aqui graças ao ensino público de qualidade! Obrigada EEEM Guararapes e UFCSPA!

Com educação se chega à lua!

Obrigada a todos! Esse trabalho é nosso!

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

NO – Óxido Nítrico
NOs – Óxido Nítrico Sintase
nNOs – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
iNOs – Óxido Nítrico Sintase Induzível
sGC – Enzima Guanilato Ciclase
GTP – Guanosina Trifosfato
cGMP – Guanosina Monofosfato Cíclica
PDE5 – Enzima Fosfatodiesterase 5
DE – Disfunção Erétil
iPDE5 – Inibidores da Enzima Fosfodiesterase 5
ROS – *Reactive Oxygen Species*
UV – Ultravioleta
Ala (A) – Alanina
Arg (R) – Arginina
Asn (N) – Asparagina
Asp (D) – Ácido Aspártico
Cys (C) – Cisteína
Glu (E) – Ácido Glutâmico
Gln (Q) – Glutamina
Gly (G) – Glicina
His (H) – Histidina
Ile (I) – Isoleucina
Leu (L) – Leucina
Lys (K) – Lisina
Met (M) – Metionina
Phe (F) – Fenilalanina
Pro (P) – Prolina
Ser (S) – Serina

Thr (T) – Treonina

Trp (W) – Triptofano

Tyr (Y) – Tirosina

Val (V) – Valina

HCl – Ácido Clorídrico

P407 – Poloxamer 407

P188 – Poloxamer 188

EO – Óxido de Etileno

PO – Óxido de Propileno

$T_{sol \rightarrow gel}$ – Temperatura de transição do estado de solução para gel

Detalhamento acerca da nomenclatura das formulações

A metodologia de nomenclatura das formulações seguiu a seguinte ordem: \$%@&#, em que:

\$ - Número da formulação (1, 2, 3, etc). Esse número inicial está relacionado com a concentração de P407.

% - Tampão, onde **S** = Solução Salina de Acetato pH 5,0 ajustado com HCl; **A** = Tampão Acetato pH 5,0; e **F** = Tampão Fosfato pH 5,8.

@ - Presença do polímero P188 como um *blend* com o P407. Caso esteja presente na formulação, será utilizado indicado com **-188**.

& - Conservante, onde PEHG = Microcare® PEHG, SB = Microcare® SB, PC = SymOcide® PC, PE = Euxyl® PE 9010 e SCE = Nipaguard® SCE. Em caso de formulação sem a presença de conservante, não terá nenhuma indicação.

– Antioxidante, onde VITE = Vitamina E, TS = Tinogard® TS, TT = Tinogard® TT, BHT = BHT e FA = Ácido Ferúlico. Em caso de formulação sem a presença de antioxidante, não terá nenhuma indicação.

Como exemplo, temos **16F-SB-VITE**, onde **16** indica 16% de P407, **F** é tampão fosfato pH 5,8, **SB** é o conservante Microcare® SB e o **VITE** é o antioxidante Vitamina E.

RESUMO

A disfunção erétil (DE) é a dificuldade de atingir ou manter o estágio de ereção do pênis. A principal terapia da DE são os iPDE5, como principal exemplo o Viagra®, que apresenta algumas contraindicações e efeitos adversos potencialmente perigosos; além de que cerca de 35% dos pacientes não respondem ao tratamento. PNPP19 é uma terapia inovadora para o tratamento da DE, sendo uma molécula peptídica instável e sujeita a diversas reações de degradação, fazendo-a perder sua atividade biológica. Por isso, partindo de uma formulação prévia incompatível com a forma de administração, este trabalho teve como objetivo otimizar uma formulação que fosse capaz de melhorar a estabilização do peptídeo PnPP19 e que facilite a sua administração tópica, incrementando viscosidade. Para isso, foram realizados ensaios de otimização sistemática da formulação, de forma a adequar a $T_{sol \rightarrow gel}$. Diferentes géis a base do polímero Poloxamer 407 foram preparados para a incorporação do peptídeo PnPP19. Esses géis possuem característica termorreversíveis e podem ter sua $T_{sol \rightarrow gel}$ modulada pela modificação na concentração dos componentes. As formulações consideradas promissoras em termos de consistência e temperatura de gelificação foram avaliadas a 25 °C por até 12 meses e a quantificação do peptídeo foi realizada por um método de HPLC-DAD desenvolvido e validado. Ao final, duas formulações foram consideradas para avaliações adicionais da estabilidade do peptídeo a 5 e 40 °C, além da caracterização reológica e de textura. A formulação atual padrão utilizada pela empresa Biozeus, possui uma consistência fluida sem formar gel e apresentou comportamento reológico Newtoniano a 35 °C; enquanto que a formulação proposta após a otimização, forma gel à temperatura ambiente e apresentou comportamento reológico não-Newtoniano (à 35 °C). Os estudos de estabilidade mostraram uma influência positiva do tampão fosfato na manutenção da integridade do peptídeo, apresentando resultados superiores de estabilidade em comparação com outros tampões. Também, é mostrado que o aumento da viscosidade e consequente redução da $T_{sol \rightarrow gel}$ é importante para garantir a estabilidade para o peptídeo. No estudo de adição de aditivos de proteção microbiológica, foi mostrado que o Nipaguard® SCE, com ou sem ácido ferúlico como antioxidante, se mostrou o único sistema conservante capaz de proteger a formulação contra o crescimento

de bactérias e fungos. Na avaliação de estabilidade dessas novas formulações foi mostrado que as formulações atingiram níveis similares de degradação. Conclui-se que a formulação otimizada que apresenta consistência adequada para facilitar a aplicação tópica, apresentou melhores resultados de estabilização em relação à fórmula padrão nas condições avaliadas de 5, 25 e 40 °C. Para a proteção microbiana, foi evidenciado Nipaguard® SCE como sendo o melhor conservante avaliado para essa aplicação.

Palavras-chave: peptídeo, Poloxamer 407, disfunção erétil, iPDE5.

ABSTRACT

Erectile dysfunction (ED) is the difficulty in reaching or maintaining the penile erection stage. The main therapy for ED is iPDE5, the main example being Viagra®, which has some contraindications and potentially dangerous adverse effects; in addition, around 35% of patients do not respond to treatment. PnPP19 is an innovative therapy for the treatment of ED, being an unstable peptide molecule and subject to various degradation reactions, causing it to lose its biological activity. Therefore, starting from a previous formulation incompatible with the form of administration, this work aimed to optimize a formulation that was capable of improving the stabilization of the PnPP19 peptide and that facilitates its topical administration, increasing viscosity. To this end, systematic formulation optimization trials were carried out, in order to adapt the $T_{sol \rightarrow gel}$. Different gels based on the Poloxamer 407 polymer were prepared for the incorporation of the PnPP19 peptide. These gels have thermoreversible characteristics and their $T_{sol \rightarrow gel}$ can be modulated by changing the concentration of the components. The formulations considered promising in terms of consistency and gelation temperature were evaluated at 25 °C for up to 12 months and peptide quantification was performed using a developed and validated HPLC-DAD method. In the end, two formulations were considered for additional evaluations of the peptide stability at 5 and 40 °C, in addition to rheological and texture characterization. The current standard formulation used by the Biozeus company has a fluid consistency with no forming gel and showed Newtonian rheological behavior at 35 °C; while the proposed formulation after optimization forms a gel at room temperature and showed non-Newtonian rheological behavior (at 35 °C). Stability studies showed a positive influence of the phosphate buffer on maintaining the integrity of the peptide, presenting superior stability results compared to other buffers. Also, it is shown that the increase in viscosity and consequent reduction of $T_{sol \rightarrow gel}$ is important to guarantee stability for the peptide. In the study on the addition of microbiological protection additives, it was shown that Nipaguard® SCE, with or without ferulic acid as an antioxidant, was the only preservative system capable of protecting the formulation against the growth of bacteria and fungi. When evaluating the stability of these new formulations, it was shown that the formulations reached similar levels of degradation. It is concluded

that the optimized formulation, which has an adequate consistency to facilitate topical application, presented better stabilization results in relation to the standard formula under conditions of 5, 25 and 40 °C. For microbial protection, Nipaguard® SCE was found to be the best preservative evaluated for this application.

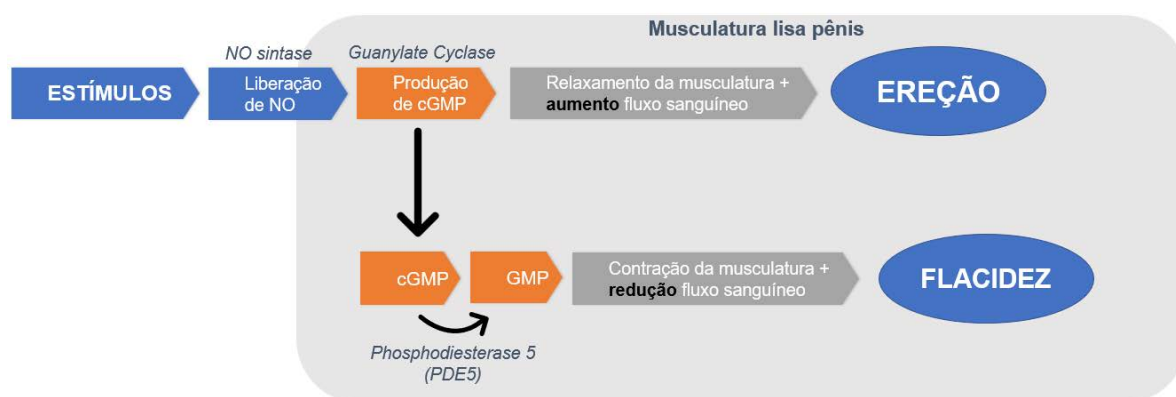
Keywords: peptide, Poloxamer 407, erectile dysfunction, iPDE5.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Disfunção erétil

A ereção peniana é uma ação natural do organismo que promove o enrijecimento do pênis, processo iniciado por meio de estimulações físicas, psicológicas e emocionais¹. Esse mecanismo é mediado principalmente pela liberação de óxido nítrico (*Nitric Oxid* - NO) na corrente sanguínea, atingindo diferentes tecidos do corpo² (Figura 1).

Figura 1 – Mecanismo da Ereção Peniana.



Fonte: Ferguson, J. E. (and) Carson, C. C. 2013 (adaptado).

Conforme a Figura 1, o mecanismo da ereção peniana depende inicialmente da liberação de NO, por meio da enzima *NO sintase* presente em células endoteliais e neuronais. A molécula NO consegue facilmente atravessar a membrana das células musculares lisas presentes nos corpos cavernosos do pênis. Nesta região, o NO estimula a enzima Guanilato Ciclase (sGC) a transformar a Guanosina Trifosfato (GTP) em Guanosina Monofosfato Cíclica (cGMP) e a presença desse

¹ SARRIS, Andrey Biff; *et al.* Physiology of Penile Erection: A Brief Review. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 18; n. 03, set/2017.

² FERGUSON, James E; CARSON, Culley C. Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors as a Treatment for Erectile Dysfunction: Current Information and New Horizons. **Arab Journal of Urology**, v. 11, n. 3, p. 222-229, set/2013.

nucleotídeo promove o relaxamento da musculatura lisa e, por consequência, ocorre o aumento do fluxo sanguíneo da região, ocorrendo a ereção do pênis.

O via de regulação dessa rota fisiológica passa pela transformação do cGMP em GMP por meio da enzima Fosfodiesterase 5 (PDE5), retornando a musculatura lisa ao estado de contração, reduzindo o fluxo sanguíneo e atingindo o estágio flácido do pênis.

A disfunção erétil (DE) é definida como a incapacidade de atingir ou manter o estágio de ereção do pênis suficientemente para a performance sexual satisfatória³. Conforme Kessler *et al.*⁴, é estimado que em 2025 aproximadamente 322 milhões de homens sejam acometidos com essa condição. Ainda segundo os autores, atualmente, a prevalência mundial da condição varia nas diferentes regiões do mundo, de 20,7% na América do Norte até 71,2% no continente asiático. No Brasil, a prevalência em homens na faixa etária 18-40 anos apresenta 35,0%, enquanto que a faixa 40-70 anos chega a 45,9% da população que apresenta DE.

A dificuldade em atingir a ereção tem relação com fatores endócrinos, neurológicos, vasculares e/ou estruturais. Há uma relação direta entre o aumento de pacientes com essa condição e o envelhecimento populacional, onde o principal fator de risco para o desenvolvimento da DE é a idade⁵. Outros fatores de risco para o aparecimento da DE são diabetes, doenças cardíacas, obesidade, depressão, aterosclerose entre outros^{6,7}.

³ MELMAN, Arnold; GINGELL, J. Clive. The Epidemiology and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 1; p. 5-11; jan/1999.

⁴ KESSLER, Anna; *et al.* The Global Prevalence of Erectile Dysfunction: A Review. **BJU International**, v. 124, n. 4, p.587-599, jul/2019.

⁵ JOHANNES C. B. *et al.* Incidence of Erectile Dysfunction in Men 40 to 69 Years Old: Longitudinal Results from the Massachusetts Male Aging study. **The Journal of Urology**, v. 163; n. 2, p.460-463, fev/2000.

⁶ MELMAN, Arnold; GINGELL, J. Clive. The Epidemiology and Pathophysiology of Erectile Dysfunction. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 1; p. 5-11; jan/1999.

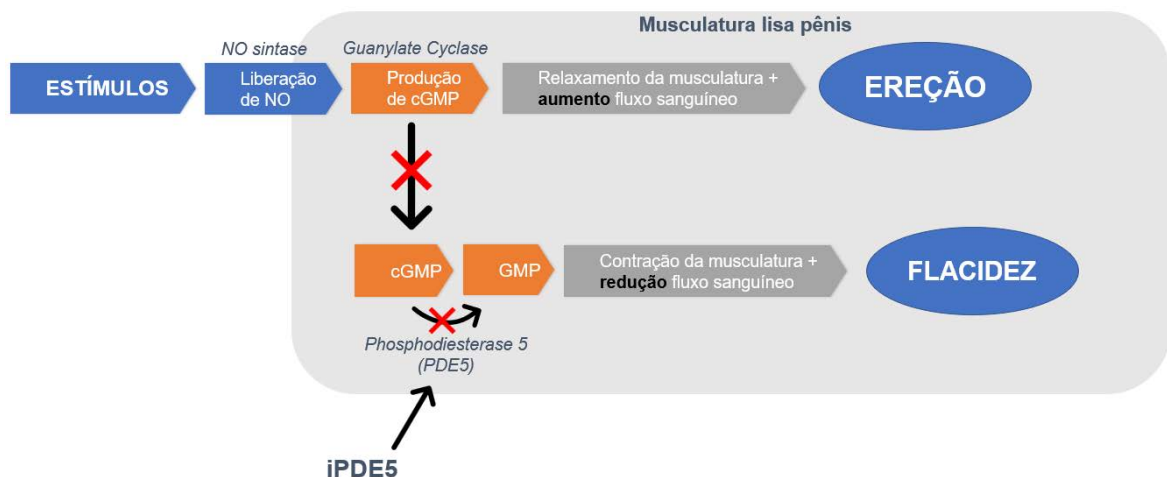
⁷ YETMAN, Daniel. Is Erectile Dysfunction Common? Stats, Causes and Treatment. **Healthline**. Mar/2020. Disponível em: <https://www.healthline.com/health/how-common-is-ed> (Acesso em 19/02/2023).

1.2. Terapias disponíveis para DE

Até o ano de 1998, os tratamentos para a DE eram invasivos e poucos eficazes, como supositórios uretais, injeções intracavernosas, prótese peniana, e ainda alguns fármacos orais utilizados naquele período que não tinham comprovação de eficácia e apresentavam muito efeitos adversos, como ioimbina, apomorfina e trazadona.

O principal tratamento da disfunção erétil atualmente é a utilização de fármacos inibidores da Fosfodiesterase 5 (iPDE5), fazendo com que seja bloqueada a via de modulação da rota (Figura 2). Isso impede a transformação do cGMP em GMP, mantendo a concentração de cGMP no músculo liso, aumentando o tempo do estágio de ereção peniana. A sildenafil (Viagra®, Pfizer) foi aprovada pelo *USA Food and Drug Administration* (FDA) em 1998, e foi o primeiro fármaco de administração oral para o tratamento da DE.

Figura 2 – Mecanismo de ação dos Inibidores da enzima Fosfodiesterase 5 (iPDE5).



Fonte: Ferguson, J. E. (and) Carson, C. C. 2013 (adaptado).

Atualmente, existem outras opções de iPDE5 no mercado, como tadalafila (Cialis®, Eli Lilly), vardenafila (Levitra®, Bayer) e lodenafila (Helleva®, Cristália). Farmacologicamente, são pequenas as diferenças entre as opções, apresentando

algumas variações na forma e força de ligação fármaco-alvo, a seletividade atrelada aos efeitos adversos, perfil metabólico e o tempo de resposta⁸.

Embora a terapia com iPDE5 seja de primeira linha, aproximadamente 35% dos pacientes com DE não respondem ao tratamento⁹. Principalmente pacientes com baixos níveis de distribuição de NO, distúrbios emocionais que impedem os primeiros estímulos e desregulação endócrina (baixos níveis de testosterona na maioria dos casos). Para estes pacientes, é necessário considerar terapias conjuntas com outras alternativas¹⁰. Ainda, existem grupos onde o Viagra® é contraindicado, por exemplo, pacientes que fazem uso de fármacos doadores de nitratos e estimuladores da enzima guanilato ciclase, pelo aumento do efeito hipotensor.

Os efeitos adversos mais comuns reportados na terapia com inibidores da Fosfodiesterase 5 são rubor (30%), dor de cabeça (25%), congestão nasal (18%), distúrbios estomacais (10%) e visuais (6%)¹¹. Há relatos de pacientes com apresentaram taquicardia, palpitações cardíacas, sonolência e episódios de tontura, mialgia, fotofobia e hiperemia ocular¹².

Sildenafil pode ser encontrada usualmente como um sal de citrato. O fármaco é metabolizado principalmente via citocromo P450, classe de proteínas metabólicas monoxigenases presentes em células intestinais e hepáticas. A biotransformação da sildenafil ocorre majoritariamente via CYP3A4 (79%) e CYP2C9 (20%)¹³. Com isso, fármacos inibidores ou indutores dessas isoenzimas

⁸ FERGUSON, James E; CARSON, Culley C. Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors as a Treatment for Erectile Dysfunction: Current Information and New Horizons. **Arab Journal of Urology**, v. 11, n. 3, p. 222-229, set/2013.

⁹ SAFARINEJAD, Mohammad R.; HOSSEINI, Seyyed, Y. Salvage of Sildenafil Failures With Bremelanotide: A Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Study. **The Journal of Urology**, v. 179, p. 1066-1071, mar/2008.

¹⁰ FERGUSON, James E; CARSON, Culley C. Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors as a Treatment for Erectile Dysfunction: Current Information and New Horizons. **Arab Journal of Urology**, v. 11, n. 3, p. 222-229, set/2013.

¹¹ MOREIRA, Sergio G. *et al.* Side-Effect Profile of Sildenafil Citrate (Viagra) in Clinical Practice. **Urology**, v. 56, n. 3, p.474-476, set/2000.

¹² MOREIRA, Sergio G. *et al.* Side-Effect Profile of Sildenafil Citrate (Viagra) in Clinical Practice. **Urology**, v. 56, n. 3, p.474-476, set/2000.

¹³ SCHWARTZ, Bryan G.; KLONER, Robert A. Drug Interactions with Phosphodiesterase-5 Inhibitors Used for the treatment of Erectile Dysfunction or Pulmonary Hypertension. **Circulation**, v. 122, n. 1, p. 88-95, jul/2010.

podem acabar modificando o perfil farmacocinético do Viagra®. Por exemplo, o ritonavir, fármaco com ação antirretroviral, é um potente inibidor dessas isoenzimas, fazendo com que ocorra um aumento de exposição à sildenafila. O risco disso é que, ao aumentar muito a concentração plasmática de um fármaco, por consequência potencializa os efeitos adversos. Efeito similar pode ser com outras classes de fármacos que também são inibidores da CYP450 como cetoconazol e cimetidina (aumenta exposição à sildenafila em 1,6 vezes)¹⁴.

A relação do citrato de sildenafila e o uso concomitante com fármacos anti-hipertensivos, de um modo geral, podem ser coadministrados sem haver redução significativa da pressão arterial. Com exceção à regra tem-se a classe de fármacos doadores de óxido nítrico, que agem por meio do aumento da produção de cGMP. Como ambos os fármacos apresentam o mesmo mecanismo de ação, a coadministração pode gerar um acúmulo de cGMP e, por consequência, desencadear uma hipotensão severa¹⁵. Os principais representantes dessa classe: nitroglicerina, trinitrato de glicerila e mononitrato de isosorbida.

Conforme dados levantados pela companhia de pesquisa de mercado *Market Research Future* (MRFR), o mercado mundial da disfunção erétil é avaliado em US\$ 6,16 bilhões com expectativa de crescimento de 6,8%/ano¹⁶, considerando o *forecast* 2022-2030. Mesmo tendo a patente expirada 2014, o Viagra® ainda representa 60% de vendas do mercado¹⁷.

O período de isolamento causado pela pandemia da COVID-19 impulsionou o mercado da DE durante o período de 2020-2022. Promovidos pelos *lockdown*, o

¹⁴ SCHWARTZ, Bryan G.; KLONER, Robert A. Drug Interactions with Phosphodiesterase-5 Inhibitors Used for the treatment of Erectile Dysfunction or Pulmonary Hypertension. **Circulation**, v. 122, n. 1, p. 88-95, jul/2010.

¹⁵ SCHWARTZ, Bryan G.; KLONER, Robert A. Drug Interactions with Phosphodiesterase-5 Inhibitors Used for the treatment of Erectile Dysfunction or Pulmonary Hypertension. **Circulation**, v. 122, n. 1, p. 88-95, jul/2010.

¹⁶ GOTADKY, Rahul. Erectile Dysfunction Drugs Market Research Report: Information by Drugs – Forecast till 2030. **Market Research Future**. March/2023. Disponível em: <https://www.marketresearchfuture.com/reports/erectile-dysfunction-drugs-market-1313> (Acesso em 06/03/2023).

¹⁷ Erectile Dysfunction Drugs Market Size, Share & Trends Analysis Report by Products, by Region and Segment Forecasts 2022-2030. **Grand View Research**. Report ID 978-1-68038-604-2. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/erectile-dysfunction-drugs-market> (Acesso em 06/03/2023).

período em casa intensificou ainda mais o estilo de vida sedentário das pessoas e, por consequência, o desenvolvimento prematuro de doenças crônicas que levam à disfunção erétil. Além disso, estudos vêm demonstrando que pacientes com históricos de COVID-19 têm um risco estimado de desenvolver disfunção erétil 5,66 vezes maior do que homens sem históricos de COVID-19¹⁸.

1.3. Peptídeos sintéticos

Peptídeos sintéticos representam uma classe de fármacos inovadores, mostrando alta especificidade e reduzida toxicidade quando comparado com fármacos de baixo peso molecular^{19,20}. No entanto, essas espécies moleculares são geralmente instáveis e com elevado peso molecular, suscetíveis a diferentes mecanismos de modificações física e química. Podem haver quebras das ligações peptídicas, inativando-o e até mesmo modificando a atividade biológica, principalmente quando essa modificação ocorre nas regiões responsáveis pela ligação no alvo biológico²¹. Alguns dos mecanismos de maior ocorrência serão comentados a seguir.

1.3.1. Oxidação

Reação de oxidação é o primeiro mecanismo de degradação observado em peptídeos e proteínas e pode ocorrer durante o processo de síntese, purificação e armazenamento do peptídeo. Ocorre na presença de ROS (do inglês *reactive oxygen species*) e também de oxigênio molecular²².

¹⁸ SANSONE, Andrea; *et al.* "Mask up to Keep it Up": Preliminary Evidence on the Association Between Erectile Dysfunction and COVID-19. **Andrology**, v. 9, p. 1053-1059, jul/2021.

¹⁹ MARX, Vivien. Watching Peptide Drugs Grow UP. **Chemical & Engineering News**, v. 83, n. 11, p. 17-24, mar/2005.

²⁰ HOUCHIN, M. L.; TOPP, E. M. Chemical Degradation of Peptides and Proteins in PLGA: A Review of Reactions and Mechanisms. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 97, n. 7, p. 2395-2404, jul/2008.

²¹ CONSTANTINO, Henry R.; PIKAL, Michael J. **Lyophilization of Biopharmaceuticals** 1^a ed. AAPS Press. Arlington, VA: p. 443-479. 2004.

²² MANNING, Mark C.; *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

O processo de oxidação da cisteína (Cys) é acelerado em pH mais altos, onde o grupamento tiol é facilmente desprotonado, formando ligações dissulfeto intra/intercadeias²³. Também, o aminoácido metionina (Met) pode oxidar formando metionina sulfóxido²⁴. Esse processo ocorre facilmente quando exposta à radiação UV²⁵.

Os aminoácidos mais sensíveis à fotodegradação são Trp, Tyr e Phe. Trp é o resíduo mais sensível, apresentando absorção de energia em qualquer comprimento de onda acima de 300 nm. Quando o Trp é fotoexcitado, ele pode afetar os aminoácidos vizinhos, promovendo a redução das ligações dissulfeto²⁶. A fotodegradação promove a perda da bioatividade e alteração de cor do produto, levando a agregação posterior.

1.3.2. Hidrólise

Diversos trabalhos presentes na literatura trazem que as ligações peptídicas com resíduos de aminoácido de Asp sofrem hidrólise facilmente por meio de catálise ácida²⁷. Estruturas de ligação Asp-Pro e Asp-Gly sofrem clivagem formando um intermediário cíclico imida. Posteriormente ocorrendo a hidrólise desse intermediário e liberando Asp livre ou seu análogo iso-Asp²⁸.

Por conta disso, peptídeos livres são comercialmente disponíveis na sua forma liofilizada, de forma a reduzir as reações intermoleculares mencionadas

²³ MANNING, Mark C.; *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

²⁴ LI, Shihong; SCHONEICH, Christian; WILSON, George S.; BORCHARD, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. V. Ascorbic Acid Promotes Rather than Inhibits the Oxidation of Methionine to Methionine Sulfoxide in Small Model Peptides. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 11, p. 1572-1579, nov/1993.

²⁵ Peptide Stability and Potential Degradation Pathways. Merck. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/cell-and-developmental-biology-research/peptide-stability> (Acesso em 20/07/2023).

²⁶ MANNING, Mark C.; *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

²⁷ OLIYAI, Cecilia; BORCHARDT, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. IV. Pathways, Kinetics, and Mechanism of Degradation of an Aspartyl Residue in a Model Hexapeptide. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 95-102, jan/1993.

²⁸ Peptide Stability and Potential Degradation Pathways. Merck. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/cell-and-developmental-biology-research/peptide-stability> (Acesso em 20/07/2023).

anteriormente²⁹. Porém, é importante considerar que esses produtos são incorporados em produtos comerciais em forma de soluções e, por isso, se faz importante encontrar meios de estabilizar esses ativos.

1.3.3. Deamidação

Deamidação dos resíduos de Asn é um dos mecanismos de degradação de peptídeos maior ocorrência³⁰. Em condições neutras a básicas, os resíduos Asn formam um intermediário cíclico de imida, o que leva a liberação de amônia livre e Asp e seu análogo iso-Asp³¹. Esse mecanismo é de comum ocorrência em sequências de Asn-Gly³². Já em condições ácidas, ocorre apenas a conversão de Asn em Asp sem haver a formação do intermediário cíclico³³.

De forma similar, resíduos de Gly também são suscetíveis à deamidação, por meio da formação de um intermediário cíclico de 6 membros, posteriormente ocorrendo a liberação de ácido carboxílico livre³⁴. Quando Gly-Asn se apresenta na região do C-terminal da cadeia peptídica, a reação de deamidação é especialmente rápida por não haver impedimento estérico para a formação do intermediário cíclico³⁵. Em contrapartida, peptídeos com resíduos volumosos de Val

²⁹ CONSTANTINO, Henry R.; PIKAL, Michael J. **Lyophilization of Biopharmaceuticals**. 1ª ed. AAPS Press. Arlington, VA: p. 443-479. 2004.

³⁰ BHATT, Neelima P; PATEL, Kamlesh; BOTCHARDT, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. I. Deamidation of Adrenocorticotrophic Hormone. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 6, p.593-599, jun/1990.

³¹ BHATT, Neelima P; PATEL, Kamlesh; BOTCHARDT, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. I. Deamidation of Adrenocorticotrophic Hormone. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 6, p.593-599, jun/1990.

³² Peptide Stability and Potential Degradation Pathways. Merck. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/cell-and-developmental-biology-research/peptide-stability> (Acesso em 20/07/2023).

³³ MANNING, Mark C.; *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

³⁴ PATELL, Kamlesh; BORCHARDT, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. II. Kinetics of Deamidation of an Asparaginyl Residue in a Model Hexapeptide. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 7, p.703-711, jul/1990.

³⁵ PATELL, Kamlesh; BORCHARDT, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. III. Effect of Primary Sequence on the Pathways of Deamidation of Asparaginyl in Hexapeptides. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 8, p.787-793, ago/1990.

e Leu no C-terminal do resíduo de Asn apresenta uma formação lenta do intermediário³⁶.

1.3.4. Desnaturação

Desnaturação é o processo físico que ocorre modificação mudança da estrutura secundária e/ou terciária de peptídeos e proteínas, promovendo perda ou alteração da ação biológica. Esse tipo de modificação ocorre, principalmente, em elevadas temperaturas³⁷.

1.3.5. Agregação

A agregação é o processo onde ocorre a junção de mais de uma estrutura intacta do peptídeo ou então, após um processo inicial de degradação química e consequente quebra em sequências menores, ocorre a associação desses monômeros, formando uma nova estrutura peptídica de efeito biológico desconhecido, potencialmente tóxico³⁸. Em soluções, a agregação pode ser facilmente observada pela formação de turbidez.

Esse processo ocorre naturalmente durante todo o processo, passando da síntese até o armazenamento do peptídeo e não precisa necessariamente de um indutor, porém é intensificado em condições potencialmente danosas, como formulações sólidas (desidratação) ou formulações com alta concentração de peptídeo, ar-líquido interface, altas ou baixas temperaturas, pH extremo e também a própria característica química do peptídeo, com grande presença de aminoácidos hidrofóbicos que se agregam por interações hidrofóbicas.

³⁶ PATELL, Kamlesh; BORCHARDT, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. III. Effect of Primary Sequence on the Pathways of Deamidation of Asparaginyl in Hexapeptides. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 8, p.787-793, ago/1990.

³⁷ MANNING, Mark C.; *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

³⁸ MANNING, Mark C.; *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

1.4. Estratégias que promovem a estabilidade peptídica

As formas utilizadas para evitar essas reações degradativas são inúmeras e muito bem estabelecidas na literatura científica^{39,40}. A estratégia mais discutida é a utilização de ligantes que estabilizem a forma nativa do peptídeo, estabilizando sua forma tridimensional, reduzindo o desdobramento da molécula e consequentemente reduzindo a agregação durante o armazenamento⁴¹.

1.4.1. Tampão e pH

Sabendo que o pH é crucial para a manutenção da estabilidade do peptídeo, o tampão é muito utilizado para promover esse controle do pH do meio. Além disso, certos grupos de tampões podem promover estabilização física de peptídeos agindo como *Radical Scavengers*, os conhecidos tampões de Good, *et al*⁴². Essas soluções são compostas de aminoácidos zwitteriônicos com *N*-substituições de taurina ou glicinas. Ainda, alguns tampões são capazes de se ligar diretamente nos resíduos de aminoácidos, aumentando a estabilidade conformacional⁴³.

As reações de hidrólise, oxidação e deamidação podem ser reduzidas por meio de utilização de tampões e controle de pH do meio. Manning, *et al* (2010) comenta que reações de hidrólise são efetivamente reduzidas em condições de pH entre 3-6⁴⁴. Patel, *et al* (1990) mostra que a reação de deamidação é extremamente reduzida quando adicionado tampão acetato pH 5,0 (0,01 mol L⁻¹) em comparação

³⁹ LI, Shihong, SCHONEICH, Christian; WILSON, George S.; BORCHARD, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. V. Ascorbic Acid Promotes Rather than Inhibits the Oxidation of Methionine to Methionine Sulfoxide in Small Model Peptides. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 11, p.1572-1579, nov/1993.

⁴⁰ MANNING, Mark C. *et al*. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p. 544-575, abr/2010.

⁴¹ MANNING, Mark C.; *et al*. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

⁴² GOOD, Norman E.; *et al*. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, fev/1966.

⁴³ MANNING, Mark C.; *et al*. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

⁴⁴ MANNING, Mark C.; *et al*. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

com um meio com HCl pH 2,0 (0,01 mol L⁻¹)⁴⁵. Também, a oxidação do resíduo Met em metionina sulfóxido é reduzido quando o peptídeo está em um tampão fosfato pH 7,2 (0,05 mol L⁻¹) quando comparado com um meio com HCl de mesma concentração e pH⁴⁶. No geral, as reações de oxidação são reduzidas em pH<6,5⁴⁷.

Tampão fosfato vem sendo muito comentado na literatura por apresentar aumento na estabilização de peptídeos. Ele age se ligando diretamente na estrutura do peptídeo, promovendo estabilização conformacional. Um mecanismo possível para isso pode explicado pelo fato de o fosfato ser altamente carregado, é suposto que ele estará ligado no N-terminal das estruturas, onde existe um dipolo que favorece a interação com cargas negativas⁴⁸.

1.4.2. Surfactantes e polímeros

Surfactantes e polímeros são mencionados na literatura como estabilizantes por prevenir a degradação em interfaces. Além de eles se ligam diretamente no peptídeo e, por consequência, promovem estabilização conformacional. Poloxamer 407, um polímero com ação surfactante não-iônica, já foi mencionado com ação ligante à glicoproteína G-CSF⁴⁹.

⁴⁵ PATELL, Kamlesh; BORCHARDT, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. II. Kinetics of Deamidation of the Asparaginyl Residue in a Model Hexapeptide. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 7, p.703-711, jul/1990.

⁴⁶ LI, Shihong, SCHONEICH, Christian; WILSON, George S.; BORCHARD, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. V. Ascorbic Acid Promotes Rather than Inhibits the Oxidation of Methionine to Methionine Sulfoxide in Small Model Peptides. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 11, p.1572-1579, nov/1993.

⁴⁷ LI, Shihong, SCHONEICH, Christian; WILSON, George S.; BORCHARD, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. V. Ascorbic Acid Promotes Rather than Inhibits the Oxidation of Methionine to Methionine Sulfoxide in Small Model Peptides. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 11, p.1572-1579, nov/1993.

⁴⁸ MANNING, Mark C.; *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p.544-575, abr/2010.

⁴⁹ WANG, Pao-Li; UDEANI, George O.; JOHNSTON, Thomas P. Inhibition of Granocyte Colony Stimulation Factor (G-CSF) Adsorption to Polyvinyl Chloride Using a Nonionic Surfactant. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 114, n. 2, p. 177-184, fev/1995.

1.4.3. Mobilidade física na matriz

Em um estado sólido, a mobilidade de peptídeos e proteínas é reduzida quando comparado a soluções. Essa livre mobilidade molecular é necessária para as reações de degradação ocorrerem⁵⁰. Como exemplo, difusão translacional é necessária durante a agregação; também o movimento flexional é importante durante o processo de deamidação da cadeia contendo Asn⁵¹. Por isso, formulações sólidas ou semi-sólidas são interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos peptídicos.

O primeiro peptídeo terapêutico desenvolvido foi a Insulina (Lantus®), em 1921. Após esse marco inicial, em 2020 existiam mais de 80 medicamentos à base de peptídeos disponíveis no mercado e mais de 170 em ensaios clínicos⁵². Em 2019, peptídeos *non-insuline* utilizados para o tratamento da *diabetes mellitus* Tipo 2 representaram mais de US\$ 8 bilhões em vendas (Trulicity®, Victoza® e Rybelsus®). Toda a classe de fármacos peptídicos representou mais de US\$ 70 bilhões de vendas no mundo em 2019⁵³.

Em 2000, aviptadil foi aprovado para tratamento da disfunção erétil. Comercialmente conhecido como Invicorp®, o aviptadil é uma formulação injetável de VIP (do inglês, *Vasoactive Intestinal Polypeptide*) em combinação com o fármaco adrenérgico fentolamina⁵⁴. Seu potente efeito vasodilatador desencadeia uma cascata de reações adversas, promovendo hipotensão⁵⁵. Além disso, outros efeitos são relatados, como diarreia, bigeminismo, rubor e taquicardia⁵⁶. Embora sua eficácia, a necessidade de administração invasiva (injeção intrapeniana) e seus

⁵⁰ CONSTANTINO, Henry R.; PIKAL, Michael J. **Lyophilization of Biopharmaceuticals**. 1^a ed. AAPS Press. Arlington, VA: p. 443-479. 2004.

⁵¹ CONSTANTINO, Henry R.; PIKAL, Michael J. **Lyophilization of Biopharmaceuticals**. 1^a ed. AAPS Press. Arlington, VA: p. 443-479. 2004.

⁵² WANG, Lei; *et al.* Therapeutic peptides: Current Applications and Future Directions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 48, fev/2022.

⁵³ WANG, Lei; *et al.* Therapeutic peptides: Current Applications and Future Directions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 48, fev/2022.

⁵⁴ WISNIEWSKI, K. Aviptadil (Sanetec). **Current Opinion Investigational Drugs**, v. 2, n. 4, p. 545-549, 2001.

⁵⁵ IWASAKI, Mari; AKIBA, Yasutada; KAUNITZ, Jonathan D. Recent Advances in Vasoactive Intestinal Peptide Physiology and Pathophysiology: Focus on the Gastrointestinal System. **F1000 Research**, v. 8, set/2022.

⁵⁶ Aviptadil. Drugs.com. Disponível em: <https://www.drugs.com/ppa/aviptadil.html> (Acesso em 22/07/2023).

efeitos adversos associados faz com que essa alternativa não seja muito atrativa para o tratamento da disfunção erétil.

1.5. Nova terapia inovadora PnPP19

Phoneutria nigriventer, popularmente chamada de aranha armadeira brasileira, é conhecida pela potência do seu veneno e responsável pelo maior número de casos de acidentes de araneismo, inclusive responsável pela morte de crianças⁵⁷. A toxina presente no veneno da aranha, fração semi-purificada PnTx2-6, é responsável pelo efeito do veneno, induzindo sintomas excitatórios sistêmicos, como lacrimação, convulsão, salivação, paralisia espástica dos membros e priapismo⁵⁸. Este último efeito foi observado em estudos em foi induzido por meio de aplicação local, causando relaxamento *in situ* de tecidos isolados de corpus cavernosos de ratos⁵⁹. Contudo, o efeito da toxina PnTx2-6 apresenta efeitos adversos dose-dependentes, como congestão vascular intensa em órgão vitais como rim, fígado, pulmão e coração⁶⁰.

PnTx2-6 retarda a inativação de diferentes canais de Na⁺, promovendo o relaxamento nos tecidos cavernosos do pênis e, por consequência, a ereção. A ligação ao alvo é dependente pela estrutura terciária da enzima PnTx2-6⁶¹ (Figura 3).

⁵⁷ BUCARETCHI, Fábio; BERTANI, Rogério; CAPITANI, Eduardo M.; HYSLOP, Stephen. Envenomation by Wandering Spiders (Genus *Phoneutria*). In: Gopalakrishnakone, P. (Ed.), *Clinical Toxinology. Toxinology*. Springer, Dordrecht. 2017

⁵⁸ SILVA, Carolina N. *et al.* PnTx2-6, a toxin from *Phoneutria nigriventer* spider venom, releases L-glutamate from rat brain synaptosomes involving Na⁺ and Ca²⁺ channels and changes protein expression at the blood-brains barrier. **Toxicon**, v. 150, p. 280-288, ago/2018.

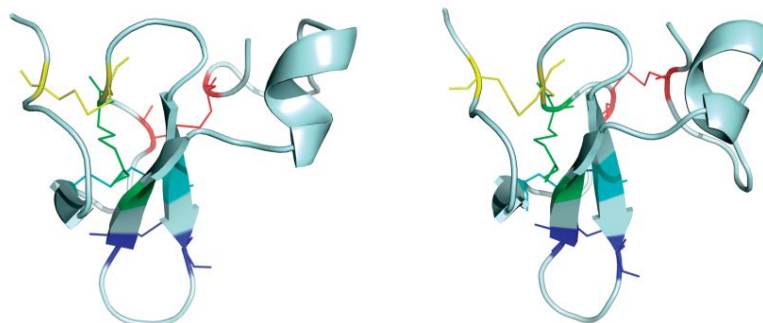
⁵⁹ SILVA, Carolina N. *et al.* Nitric oxide-induced vasorelaion in response to PnTx2-6 toxin from *Phoneutria Nigriventer* spider in rat cavernosal tissue. **Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 12, p. 3879-3888, dez/2010.

⁶⁰ SILVA, Carolina N. *et al.* PnTx2-6, a toxin from *Phoneutria nigriventer* spider venom, releases L-glutamate from rat brain synaptosomes involving Na⁺ and Ca²⁺ channels and changes protein expression at the blood-brains barrier. **Toxicon**, v. 150, p. 280-288, ago/2018.

⁶¹ NUNES, Kenia P. *et al.* New insights on arthropod toxins that potentiate erectile function. **Toxicon**, v. 69, p. 152-159, jul/2013.

Figura 3 – Estrutura primária e terciária da toxina PnTx2-6.

ATCAGQDQPKETCDCCGERGECVCGG-----PCICRQGYFWIAWYKLANCKK



Fonte: Matavel, A. *et al* (2009) / Nunes, K. *et al* (2013). (Adaptado)

A estrutura terciária da toxina PnTx2-6 apresenta um *core* hidrofóbico e protegido por resíduos de aminoácidos carregados positivamente (Arg e Lys). Esse arranjo fornece o requisito para a interação de alta afinidade com o alvo e, assim, promover o efeito. Além disso, a disposição dessa porção carregada adicionada à outra região aromática (composta por Phe, Trp e Tyr) compõe a superfície bioativa da toxina PnTx2-6 e a presença de Tyr e Trp é responsável pela alta afinidade com o alvo⁶².

Conhecendo o modo de ligação e a sequência de aminoácidos essenciais dessas superfícies ativas, foi possível projetar um peptídeo sintético. Inicialmente chamado de PnPP-19 (Figura 4), esse peptídeo é capaz de induzir o efeito de ereção e reduzir a toxicidade associada que está relacionada à atividade nos canais iônicos. PnPP-19 também potencializa a função erétil via NO/cGMP, agindo diretamente na enzima NOs por meio da estimulação e liberação de NO, mas não tem como alvo os canais de Na⁺ e, portanto, não apresenta ação tóxica mesmo em doses elevadas⁶³. Inclusive, o efeito pode ser obtido por meio da aplicação tópica, conforme estudos preliminares desempenhados com a toxina nativa visto anteriormente.

⁶² MATAVEL, Alessandra; *et al*. Structure and Activity Analysis of Two Spider Toxins That alter Sodium Channel Inactivation. **Biochemistry**, v. 48, n. 14, p. 3078-3088, abr/2009.

⁶³ SILVA, Carolina N. *et al*. From the PnTx2-6 Toxin to the PnPP-19 Engineered Peptide: Therapeutic Potential in Erectile Dysfunction, Nociception, and Glaucoma. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, abr/2022.

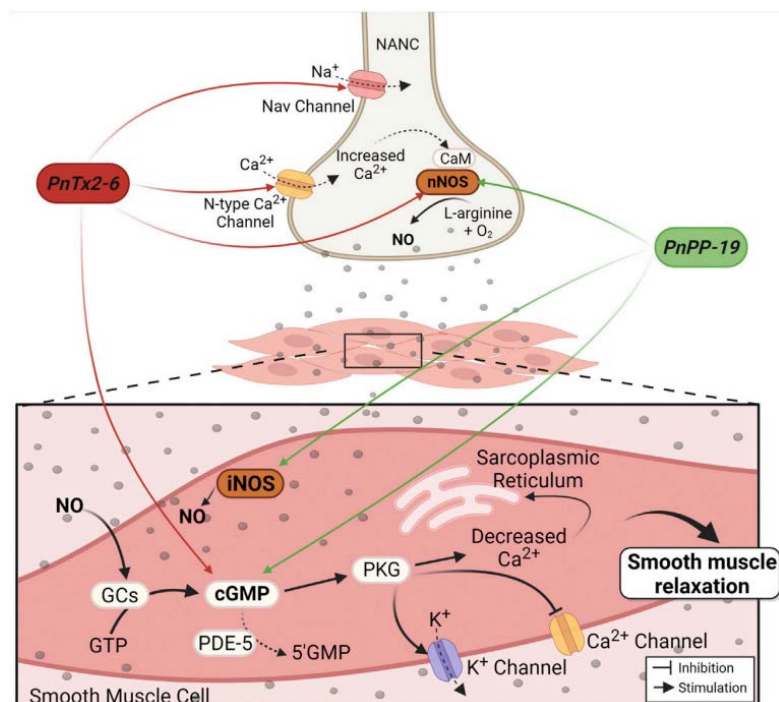
Figura 4 – Estrutura primária PnPP-19.

Ac-Gly-Glu-Arg-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-Lys-NH₂

Fonte: Silva, Carolina N. et al (2022)

O mecanismo de ação desse fármaco não está completamente estabelecido, porém existem estudos que demonstram a estimulação das isoformas nNOS (óxido nítrico sintase neuronal) e iNOS (óxido nítrico sintase induzível). nNOS e iNOS estão presentes nos tecidos neuronais e corpos cavernosos do pênis, estimulando a liberação de óxido nítrico e, assim, ativando toda a cascata de reações para atingir o efeito de ereção do pênis.

Figura 5 – Comparação entre o mecanismo de ação da toxina PnTx2-6 e PnPP-19.



Fonte: Silva, C. et al (2022)

Desta forma, a terapia com PnPP-19 tem potencial de agir em pacientes não responsivos aos iPDE5, visto que apresenta outro mecanismo de ação (Figura 5)

em uma etapa anterior da cascata de reações que estão relacionadas à ereção. Além disso, esse peptídeo pode ser utilizado para potencializar o efeito se utilizado de forma sinérgica com diferentes terapias sem oferecer risco ao paciente.

A rota sintética utilizada para a síntese do peptídeo utiliza a estratégia *Fmoc* em fase sólida, passando por etapas de proteção e desproteção das cadeias laterais⁶⁴.

Em 2016, a empresa Biozeus Pharmaceuticals S.A. adquiriu os direitos sobre esse peptídeo. O objetivo da empresa é seguir com ensaios clínicos e garantir a eficácia e segurança do fármaco para lançar no mercado. Para isso, é preciso desenvolver uma formulação que seja adequada para a aplicação local, atentando às interações químicas formulação-peptídeo. É importante garantir a sua estabilidade físico-química e, adicionalmente, entregar um sensorial agradável ao passar sobre a pele do pênis.

1.6. Hidrogéis termoreversíveis

Os géis são formas semissólidas que conferem consistência à uma solução ou dispersão. Geralmente, os componentes que conferem essa firmeza dos géis são polímeros de alto peso molecular que, ao serem expostos à determinada condição, se organizam de tal forma que conferem aumento de viscosidade à formulação. No caso de hidrogéis, o veículo principal é a água e isso faz com que a formulação tenha grande similaridade com os tecidos biológicos, fazendo com que os hidrogéis representem uma classe de materiais com excelente biocompatibilidade^{65,66}. O fenômeno de termoreversibilidade do gel é caracterizado por uma temperatura de transição do estado solução para o estado gel ($T_{sol \rightarrow gel}$). Abaixo dessa temperatura, a amostra se mantém fluida e acima dela já atinge o

⁶⁴ SILVA, Carolina N. et al. PnPP-19, a synthetic and non-toxic peptide designed from a P. nigriventer toxin, potentiates erectile function via NO/cGMP. **The Journal of Urology**, v. 194, n. 5, p. 1481-1490, nov/2015.

⁶⁵ PARHI, Rabinarayan. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 4, p. 515-530, dez/2017.

⁶⁶ LI, Jianyu; MOONEY, David J. Designing Hydrogels for Controlled Drug Delivery. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 12, out/2016.

estado de semissólido. Em termos de entrega de fármacos, a viscosidade modifica a liberação do fármaco para o tecido alvo, fazendo com que essa característica seja interessante para o desenvolvimento de formas farmacêuticas que requerem liberação controlada do ativo⁶⁷.

Poloxamer *blocks* é uma classe de polímeros anfifílicos utilizada para desenvolver geis termorreversíveis, formando a estrutura *triblock* EO_x-PO_y-EO_x⁶⁸, composto por óxido de etileno (EO, do inglês *ethylene oxide*) e óxido de propileno (PO, do inglês *propylene oxide*). São usados em diferentes aplicações que requerem a solubilização de ativos lipofílicos e estabilização de moléculas hidrofílicas⁶⁹. Essa classe vem sendo utilizada para o desenvolvimento de novas formulações com ativos proteicos, como Ureases, IL-2 e rHGH⁷⁰, promovendo a redução da degradação e a estabilização da estrutura terciária dessas moléculas, e evitando a agregação⁷¹.

Poloxamer 407, ou somente P407, apresenta EO₉₇-PO₆₉-EO₉₇. O processo de termogelificação envolve a desidratação dos grupamentos EO, resultando em uma organização esférica de forma micelar com um núcleo hidrofóbico de PO. A $T_{sol \rightarrow gel}$ pode ser modulada a partir de incorporação de outras matérias-primas na

⁶⁷ LI, Jianyu; MOONEY, David J. Designing Hydrogels for Controlled Drug Delivery. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 12, out/2016.

⁶⁸ DUMORTIER, Gilles, *et al.* A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p.2709-2728, dez/2006.

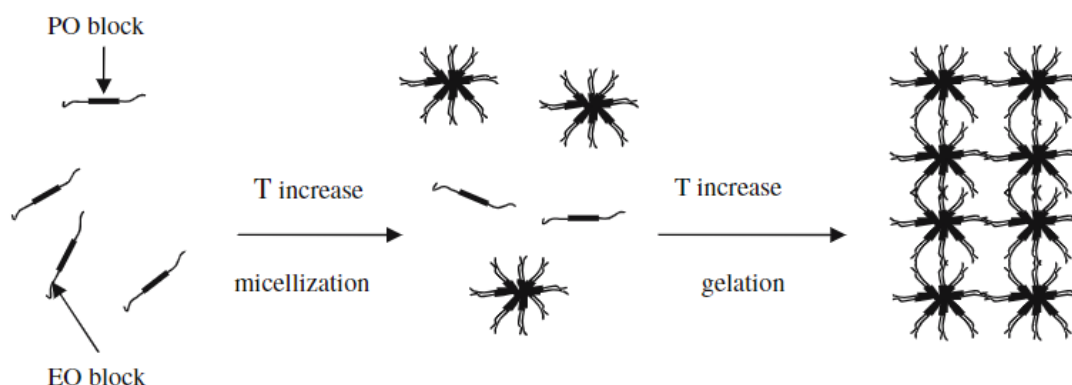
⁶⁹ BODRATTI, Andrew M.; ALEXANDRIDIS, Paschalis. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. **Journal of Funcional Biomaterials**, v. 9, n. 11, jan/2018.

⁷⁰ WENZEL, James G. W., *et al.* Pluronic F127 gel formulation of Deslorelin and GnRH Reduce Drug Degradation and Sustain Drug Release and Effect in Cattle. **Journal of Controlled Release**, v. 85, p. 51-59, dez/2002.

⁷¹ DUMORTIER, Gilles, *et al.* A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p.2709-2728, dez/2006.

formulação, como tampões e propilenoglicol^{72,73,74,75}. Abaixo, um esquema do mecanismo de formação de gel de uma solução a base de P407.

Figura 6 – Mecanismo de gelificação do P407 em ambiente aquoso.



Fonte: Dumortier, *et al.* 2006

Em uma amostra com as moléculas de P407 dispersas em uma solução aquosa, à medida que a temperatura aumenta, os grupamentos PO *blocks* passam por uma desidratação e essas porções se ligam entre si por interações hidrofóbicas, formando agregados, processo conhecido como micelização. Essas micelas são esféricas com um núcleo poliPO. Neste ponto, a amostra já está com incremento de viscosidade. Seguindo com o aumento de temperatura, ocorre a organização dessas micelas até a formação de uma rede polimérica estável, garantindo o estado de gel semi-sólido à amostra.

⁷² DUMORTIER, Gilles, *et al.* A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p.2709-2728, dez/2006.

⁷³ PANDIT, Nivedita K. (and) WANG, Diana. Salts Effects on the Diffusion and Release Rate of Propranolol from Poloxamer 407 gels. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 167, p. 183-189. 1998.

⁷⁴ CHOI, Han-Gon; LEE, Mi-Kyung; KIM, Moon-Hee; KIM, Chong-Kook. Effect of Additives on the Physicochemical Properties of Liquid Suppository bases. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 190, n. 1, p. 13-19, nov/1999.

⁷⁵ PERINELLI, Diego R. *et al.* Effect of Phosphate Buffer on the Micellization Process of Poloxamer 407: Microcalorimetry, Acoustic Spectroscopy and Dynamic Light Scattering (DLS) Studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 123-129, set/2013.

Dependendo a concentração de P407 na amostra, diferentes estruturas de rede podem ser obtidas. De acordo com Liu e Chu⁷⁶, por meio da metodologia cristalográfica de espalhamento de Raio-X de baixo ângulo (SAXS, do inglês *Small Angle X-ray Scattering*), em concentrações baixas (20-40%), é formada uma rede cúbica de face centrada (FCC, do inglês *Face-Centered Cubic*). Já em altas concentrações (>50%), é observado a estrutura rede cúbica de corpo centrado (BCC, do inglês *Body-Centered Cubic*).

A concentração do polímero também modifica a interação com os ativos, especialmente proteínas e peptídeos, mostrando que em altas concentrações. O coeficiente de difusão dos fármacos é reduzido em consequência do aumento da viscosidade da formulação, promovendo uma liberação controlada no tecido alvo⁷⁷. Além disso, a estrutura formada promove a imobilização do peptídeo, evitando a desnaturação e o desdobramento⁷⁸ em altas temperaturas⁷⁹. Devido a essas propriedades e por ser um ingrediente biocompatível aprovado pelo FDA⁸⁰ e pela ANVISA⁸¹, faz com que o P407 seja um componente atrativo para o preparo de formulações contendo peptídeos.

1.7. Parceria UFCSPA/Biozeus Pharmaceuticals S.A.

Para o desenvolvimento da formulação, diversas empresas e universidades foram contratadas pela empresa Biozeus Pharmaceuticals S.A., que é a atual detentora dos direitos do peptídeo PnPP19, para estudar sobre a estabilidade

⁷⁶ LIU, Tianbo; CHU, Benjamin. Formation of Homogeneous gel-like phases by mixed triblock copolymer micelles in aqueous solution: FCC to BCC phase transition. **Journal of Applied Crystallography**, v. 33, p. 727-730, ago/2000.

⁷⁷ PANDIT, Nivedita K. (and) WANG, Diana. Salts Effects on the Diffusion and Release Rate of Propranolol from Poloxamer 407 gels. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 167, p. 183-189. 1998.

⁷⁸ DUMORTIER, Gilles, *et al.* A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p.2709-2728, dez/2006.

⁷⁹ SALAY, Luiz C. *et al.* Molecular Interactions Between Pluronic F127 and the Peptide Tiritpticin in Aqueous Solution. **Colloid and Polymer Science**, v. 296, n. 4, p. 1-9, abr/2018.

⁸⁰ US Food and Drug Administration (FDA). Inactive Ingredients Search for Approved Drug Products. Disponível em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm> (Acesso em 24/07/2023).

⁸¹ Manual de Denominações Comuns Brasileiras (DCB) – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/dcb> (Acesso em 24/07/2023).

desse peptídeo em diferentes meios e se esses são compatíveis com a forma de administração tópica.

Embora atualmente exista uma formulação piloto de propriedade da empresa Biozeus em teste clínico Fase II, esta não atende aos requisitos de aplicação requeridas pela empresa e pela legislação, por apresentar característica extremamente fluida e pegajosa quando aplicada sobre a pele. Além disso, essa formulação também não atendeu aos requisitos de estabilidade físico-química em estudos preliminares. Devido a isso, há a necessidade de otimizar a formulação já existente. Incrementando-se a viscosidade e adicionalmente, facilitando a aplicação do produto e também aumentando a estabilidade química e física do fármaco; e assim retardando a formação de produtos de degradação e aumentando o tempo de *shelf-life* do produto.

O projeto atual conta com um acordo de parceria entre UFCSPA e Biozeus Pharmaceuticals S.A., publicado no DOU de Nº 55, terça-feira, 21 de março de 2023. O presente Acordo de Parceria para PD&I tem por objeto a cooperação técnica e científica entre os parceiros para melhoramento e caracterização físico-química de uma formulação com estabilidade suficiente que possa permitir a comercialização do PnPP19, um peptídeo aplicado de forma tópica visando o tratamento da disfunção erétil (DE). O projeto em parceria com a Biozeus foi aprovado na Chamada CNPq Nº 12/2020 - Programa de Mestrado e Doutorado Acadêmico para Inovação - MAI/DAI Processo: 403639/2020-4. Nesse Edital foram concedidas uma bolsa de mestrado e duas bolsas de iniciação tecnológica e industrial (ITI).

9. CURRÍCULO LATTES



Anna Lúcia Frohlich

Endereço para acessar este CV: <https://lattes.cnpq.br/3283967815294029>

Última atualização do currículo em 11/09/2023

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Química Medicinal pela Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (2021). Mestranda em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela mesma instituição. Principais interesses: desenvolvimento de hidrogéis para aplicação tópica de fármacos, nanoencapsulamento lipídico e polimérico de peptídeos. Atualmente trabalha no setor de Pesquisa e Desenvolvimento (PD) da empresa privada Docile Alimentos (Lajeado/RS).

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Anna Lúcia Frohlich

Dados pessoais

Nascimento 02/03/1998 - Lajeado/RS - Brasil

CPF 031.041.260-97

Formação acadêmica/titulação

2021 Mestrado em BIOCÊNCIAS.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: Encapsulamento da Biomolécula BZ371A para aplicações terapêuticas
Orientador: Tânia Alessandra Silveira Aguiar
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2016 - 2021 Graduação em Química Medicinal.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: SÍNTESE VERDE DE PIRAZÓIS UTILIZANDO MEIO EMSULSIONADO
Orientador: Simone Schneider Amaral

Formação complementar

2020 - 2020 Curso de curta duração em Dominando a ISO/IEC 17025:2017. (Carga horária: 12h).
Lince Consultoria, LINCE, Brasil

2020 - 2020 Extensão universitária em Learn Cosmetic Formulation - Introduction to Making Cosmetics. (Carga horária: 40h).
Chemists Corner, CHEMISTS CORNER, Estados Unidos

2020 - 2020 Extensão universitária em Cosmetologia. (Carga horária: 40h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil

2020 - 2020 Extensão universitária em Bromatologia. (Carga horária: 40h).
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil

2020 - 2020 Extensão universitária em Cosmetologia na Estética Facial e Corporal. (Carga horária: 40h).
Aliança Brasileira pela Educação, ABE, Brasil

Atuação profissional

1. Docile Alimentos LTDA - DOGILE

Vínculo institucional

2020 - Atual Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Analista Plena PD, Carga horária: 44, Regime: Integral
Outras informações:
Atividades desempenhadas: estudo e aplicação de novos ingredientes em novas formulações, realizando acompanhamento de Shelf Life e análise de estabilidade do produto final. Promove atividades relacionadas a implementação de projetos de novos produtos na área produtiva, realizando acompanhamento, validação e padronização dos parâmetros de produto e processo.

2. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Vínculo institucional

2020 - 2020 Vínculo: Voluntário, Enquadramento funcional: Vice-presidente Empresa Júnior Chemsul, Carga horária: 10, Regime: Parcial
Outras informações:
Pesquisa e melhoramento de processos e solução de problemas desde o setor produtivo até o tratamento final dos resíduos. Atividades: Liderança e gestão de equipe, coordenação de projetos com o setor privado e comunicação com clientes.

2018 - 2020 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Programa de Iniciação à Docência (PID), Carga horária: 10, Regime: Parcial

Outras informações:
Aplicação dos princípios da Química Verde em disciplinas teórico-práticas de Química Orgânica.
Atividades desempenhadas: Elaboração de material didáticos, pesquisa e testes laboratoriais de novas tecnologias sustentáveis e ministração de aulas sobre o tema para alunos dos cursos de Química Medicinal e Farmácia da UFCSPA. Objetivos de promoção do pensamento crítico acerca das ações desempenhadas pelos profissionais químicos/farmacêuticos em formação, conscientização do pensamento sustentável.

2017 - 2019 Vínculo: Voluntário , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 10, Regime: Parcial
Outras informações:
Desenvolvimento de uma nova metodologia de síntese de compostos de adição de Michael por meio de nanorreatores supramoleculares. Atividades: Acompanhamento de reação por CCD, extração líquido-líquido, purificação por coluna cromatográfica e caracterização por RMN e HPLC.

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. AMARAL, S. S.; BIAJOLI, M. N. G.; FROHLICH, A. L.
APLICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE EM DISCIPLINAS PRÁTICAS DE QUÍMICA ORGÂNICA NA UFCSPA In: Congresso UFCSPA: Conectando Saúde e Sociedade, 2019, Porto Alegre.
Anais do Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. Porto Alegre: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2019. v.1. p.1317 - 1318

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 11/09/2023 às 06:37:23.