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

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

Catalogação 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!

SUMÁRIO

Detalhamento acerca da nomenclatura das formulações 8
1. INTRODUÇÃO 15
1.1. Disfunção erétil 15
1.2. Terapias disponíveis para DE 17
1.3. Peptídeos sintéticos 20
1.3.1. Oxidação 20
1.3.2. Hidrólise 21
1.3.3. Deamidação 22
1.3.4. Desnaturação 23
1.3.5. Agregação 23
1.4. Estratégias que promovem a estabilidade peptídica 24
1.4.1. Tampão e pH 24
1.4.2. Surfactantes e polímeros 25
1.4.3. Mobilidade física na matriz 26
1.5. Nova terapia inovadora PnPP19 27
1.6. Hidrogéis termoreversíveis 30
1.7. Parceria UFCSPA/Biozeus Pharmaceuticals S.A. 33
2. OBJETIVOS 35
2.1. Objetivo geral 35
2.2. Objetivos específicos 35
3. ARTIGO CIENTÍFICO 36
4. AVALIAÇÃO DE CONSERVANTES E ANTIOXIDANTES 73
4.1. Seleção dos aditivos 73
4.1.1. Metodologia da etapa de seleção dos aditivos 78
4.1.2. Resultados e discussão da etapa de seleção dos aditivos 79
4.2. Estudo microbiológico 82
4.2.1. Metodologia do estudo microbiológico 83
4.2.2. Resultados e discussão do estudo microbiológico 85
4.3. Estudo de estabilidade das formulações aprovadas 88
4.3.1. Estabilidade peptídica à 25 ºC 89
4.3.2. Estabilidade peptídica à 40 ºC 90

5. ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO PEPTÍDICA 93
5.1. Metodologia do estudo de fotodegradação 94
5.2. Resultados e discussão do estudo de fotodegradação 94
6. DISCUSSÃO GERAL 98
7. CONCLUSÃO GERAL 103
8. PERSPECTIVAS 104
9. CURRÍCULO LATTES 105

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.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Mecanismo da ereção peniana.

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

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

Figura 4 – Estrutura primária PnPP-19.

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

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

Figura 7 – Esquema das etapas seguidas para o processo de incorporação de aditivos na formulação.

Figura 8 – Aspectos visuais das formulações, representando os estados de homogeneidade/não-homogeneidade e translúcido/opaco/esbranquiçado.

Figura 9 - Esquema das diluições seriadas no método de superfície padrão (A) e em escala reduzida (B).

Figura 10 - Gráfico de barras de degradação percentual do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA mantidas por 3 meses à 25 ºC.

Figura 11 - Gráfico de barras de degradação percentual do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA mantidas por 3 meses à 40 ºC.

Figura 12 - Estrutura primária do peptídeo BZ371A e as possíveis regiões de reações degradativas.

Figura 13 - Gráfico de barras de degradação do peptídeo sem proteção e com proteção (*) das formulações 10S-PEHG, 10F-PEHG e 16F-PEHG após 96h em câmara UVA/UVB.

Tabela 1 – Composição da formulação otimizada 16F

Tabela 2 - Parâmetros de avaliação das formulações com aditivos

Tabela 3 - Percentual mássico dos conservantes e antioxidantes avaliados.

Tabela 4 – Resultados das etapas 1 e 2 de seleção dos aditivos.

Tabela 5 – $T_{sol \rightarrow gel}$ das formulações aprovadas na etapa de seleção do sistema conservante.

Tabela 6A – Resultado do teste de diluição para visualização das colônia bactérias.

Tabela 6B– Resultado do teste de diluição para visualização das colônias de fungos.

Tabela 7 – Resultados análises microbiológicas.

Tabela 8 – Composição das formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA avaliadas em estabilidade após avaliação do crescimento microbiológico.

Tabela 9 – Degradação percentual do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA mantidas por 3 meses à 25 ºC.

Tabela 10 – ANOVA *one way* com múltiplas comparações utilizando teste *post-hoc* de *Tukey* para os resultados de degradação do peptídeo após 3 meses de estudo de estabilidade à 25ºC.

Tabela 11 – Degradação percentual do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA mantidas por 3 meses à 40 ºC.

Tabela 12 – ANOVA *one way* com múltiplas comparações utilizando teste *post-hoc* de *Tukey* para os resultados de degradação do peptídeo após 3 meses de estudo de estabilidade à 40ºC.

Tabela 13 - Composição das formulações avaliadas no ensaio de fotodegradação.

Tabela 14 - Resultados de degradação do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 10F-PEHG e 16F-PEHG após 96 h de incubação em câmera UVA/UVB.

Tabela 15 - ANOVA *one way* com múltiplas comparações utilizando teste *post-hoc* de *Tukey* com os grupos após 96 h em câmara UVA/UVB.

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 $T_{sol \rightarrow gel}$ na faixa de 25-27 ºC. 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 ºC por até 12 meses e a quantificação do peptídeo foi realizada por um método de HPLC-DAD desenvolvido e validado. Ao final, duas formulações (10S-PEHG e 16F-PEHG) foram consideradas para avaliações adicionais da estabilidade do peptídeo a 5, 25 e 40 ºC, além da caracterização reológica e de textura. A formulação 10S é a atual formulação padrão utilizada pela empresa Biozeus, possui uma consistência fluida sem formar gel e apresentou comportamento reológico Newtoniano a 35 ºC; enquanto que a formulação 16F-PEHG foi a formulação proposta após a otimização, forma gel com $T_{sol \rightarrow gel}$ na faixa estipulada (25,3 ºC ± 0,5) e apresentou comportamento reológico não-Newtoniano (à 35 ºC). Além disso, foi detectado que o peptídeo é fotossensível, sendo mais intenso na formulação 10S-PEHG, com degradação peptídeo de 59,06% ± 8,99 após 96h de exposição a luz UVA/UVB. Apenas adicionando o tampão fosfato pH 5,8, teve-se 31,92% ± 2,65 de degradação percentual do peptídeo. Os demais estudos de estabilidade também mostraram uma influência positiva do tampão fosfato na manutenção da integridade do peptídeo. Ao comparar os resultados de

percentual de degradação da formulação 16F-PEHG (19,39% ± 4,61) e 10S-PEHG (25,71% ± 3,02), ocorreu uma melhora na estabilidade na formulação 16F-PEHG (p = 0,0053) após 9 meses de armazenamento a 25 ºC. Resultado similar foi observado nos ensaios a 40 ºC, em que até o 5º mês, a formulação 16F-PEHG apresentou resultados superiores em relação à 10S-PEHG (62,85% ± 0,65 vs. 88,48% ± 2,49, respectivamente; p = 0,0019). Já no estudo à 5 ºC, foi observado melhora durante todo o período analisado. (16F 3,81% ± 2,38 vs. 10S 21,56% ± 0,53, p = 0,0043). 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 à 25 ºC foi mostrado que as formulações atingiram nível similar de degradação que a formulação 10S-PEHG no mesmo período (16,63% ± 3,68). Em contrapartida, no ensaio à 40 ºC, em ambas as formulações o percentual de degradação foi similar ao observado na formulação otimizada 16F-PEHG (36,51% ± 6,72) no mesmo período. Conclui-se que a formulação otimizada 16F-PEHG que contém tampão fosfato pH 5,8, $T_{sol \rightarrow gel}$ na faixa estipulada e consistência adequada para facilitar a aplicação tópica, apresentou melhores resultados de estabilização em relação à fórmula padrão 10S-PEHG nas condições de 4 (>8 meses), 25 (<12 meses) e 40 ºC (<6 meses). Para a proteção microbiana, foi evidenciado Nipaguard® SCE como sendo o melhor conservante avaliado. Ainda assim, considerando a fotosensibilidade do peptídeo, é imprescindível a utilizando de embalagem que promova proteção UV ao fármaco.

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 optimization trials of the formulation were carried out, in order to adapt the $T_{sol \rightarrow gel}$ to the range of 25-27 ºC. 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 ºC for up to 12 months and peptide quantification was performed using a developed and validated HPLC-DAD method. In the end, two formulations (10S-PEHG and 16F-PEHG) were considered for additional evaluations of the peptide stability at 5, 25 and 40 ºC, in addition to rheological and texture characterization. The 10S-PEHG formulation is the current standard formulation used by the Biozeus company, it has a fluid consistency without forming gel and showed Newtonian rheological behavior at 35 ºC; while formulation 16F-PEHG was the formulation proposed after optimization, it forms a gel with $T_{sol \rightarrow gel}$ in the stipulated range (25.3 ºC ± 0.5) and presented non-Newtonian rheological behavior (at 35 ºC). Furthermore, it was detected that the peptide is photosensitive, being more intense in the 10S-PEHG formulation, with peptide degradation of 59.06% ± 8.99 after 96h of exposure to UVA/UVB light. Just by adding the phosphate buffer pH 5.8, there was 31.92% ± 2.65 percentage degradation of the peptide. The other stability studies also showed a positive influence of the phosphate buffer on maintaining the integrity of the peptide. When comparing the percentage degradation results of formulation 16F-PEHG (19.39% ±

4.61) and 10S (25.71% ± 3.02), there was an improvement in stability in formulation 16F-PEHG (p=0.0053) after 9 months of storage at 25 ºC. A similar result was observed in tests at 40 ºC, in which up to the 5th month, the 16F formulation showed superior results compared to the 10S (62.85% ± 0.65 vs. 88.48% ± 2.49, respectively; p=0.0019). In the study at 5 ºC, improvement was observed throughout the analyzed period. (16F 3.81% ± 2.38 vs. 10S 21.56% ± 0.53, p=0.0043). 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 at 25 ºC, it was shown that the formulations reached a similar level of degradation as the 10S-PEHG formulation in the same period (16.63% ± 3.68). On the other hand, in the test at 40 ºC, in both formulations the percentage of degradation was similar to that observed in the optimized formulation 16F-PEHG (36.51% ± 6.72) in the same period. It is concluded that the optimized formulation 16F-PEHG, which contains phosphate buffer pH 5.8, $T_{sol \rightarrow gel}$ in the stipulated range and adequate consistency to facilitate topical application, presented better stabilization results in relation to the standard formula 10S under conditions of 4 (>8 months), 25 (<12 months) and 40 ºC (<6 months). For microbial protection, Nipaguard® SCE was found to be the best preservative evaluated. Still, considering the photosensitivity of the peptide, it is essential to use packaging that promotes UV protection for the drug.

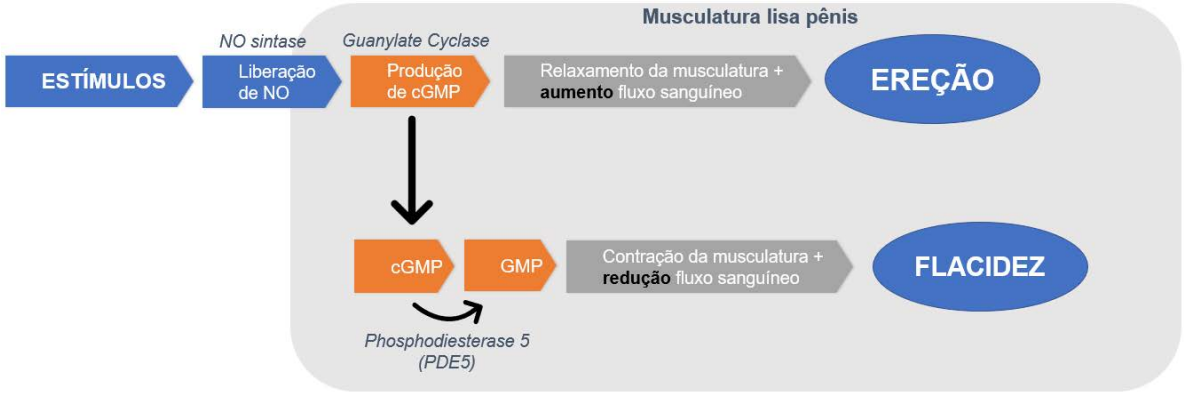
Keywords: peptide, Poloxamer 407, erectile dysfunction, iPDE5.

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 emocionais[1]. Esse mecanismo é mediado principalmente pela liberação de óxido nítrico (*Nitric Oxid* - NO) na corrente sanguínea, atingindo diferentes tecidos do corpo[2] (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 incialmente 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. Phosphodiestarease Type 5 Inhibitors as a Treatment for Erectile Dysfuncion: 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 satisfatória[3]. 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 idade[5]. Outros fatores de risco para o aparecimento da DE são diabetes, doenças cardíacas, obesidade, depressão, aterosclerose entre outros[6,7].

---

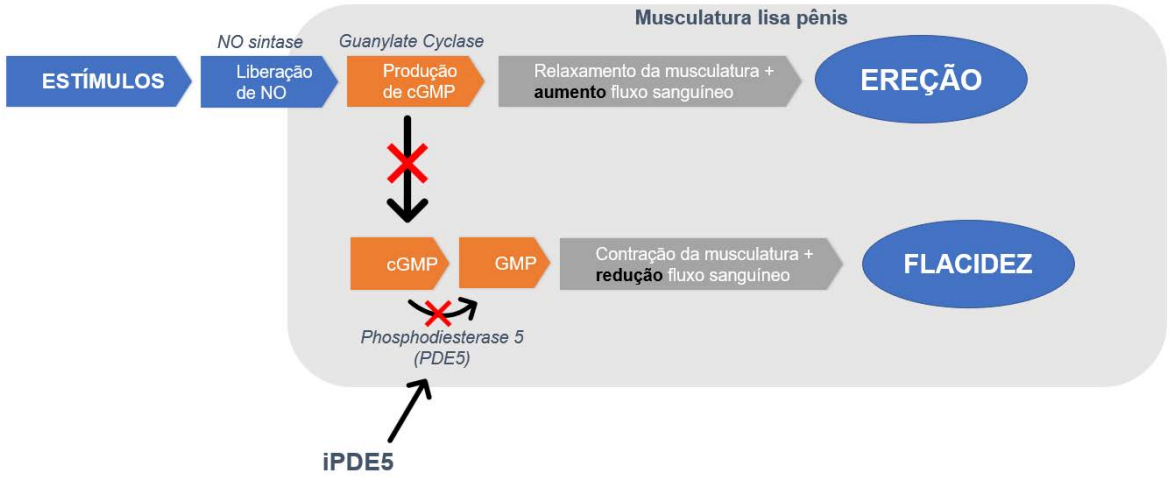
[3] MELMAN, Arnold; GINGELL, J. Clive. The Epidemiology and Pathophysiology of Erectile Dysfuncion. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 1; p. 5-11; jan/1999.
[4] KESSLER, Anna; *et al.* The Global Prevalence of Erectile Dysfuncion: A Review. **BJU International**, v. 124, n. 4, p.587-599, jul/2019.
[5] JOHANNES C. B. *et a*l. Incidence of Erectile Dysfuncion 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 Dysfuncion. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 1; p. 5-11; jan/1999.
[7] YETMAN, Daniel. Is Erectile Dysfuncion 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 sildenafila (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 resposta[8].

Embora a terapia com iPDE5 seja de primeira linha, aproximadamente 35% dos pacientes com DE não respondem ao tratamento[9]. 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 alternativas[10]. 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 ocular[12].

Sildenafila 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 sildenafila ocorre majoritariamente via CYP3A4 (79%) e CYP2C9 (20%)[13]. Com isso, fármacos inibidores ou indutores dessas isoenzimas

[8] FERGUSON, James E; CARSON, Culley C. Phosphodiestarease Type 5 Inhibitors as a Treatment for Erectile Dysfuncion: 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. Phosphodiestarease Type 5 Inhibitors as a Treatment for Erectile Dysfuncion: 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 severa[15]. Os principais representantes dessa classe: nitroglicerina, trinitrato de glicerila e mononitrato de isosorbida.

Conforme dados levantados pela companhia de pesquisa de mercado *Market Reasearch Future* (MRFR), o mercado mundial da disfunção erétil é avaliado em US$ 6,16 bilhões com expectativa de crescimento de 6,8%/ano[16], considerando o *forecast* 2022-2030. Mesmo tendo a patente expirada 2014, o Viagra® ainda representa 60% de vendas do mercado[17].

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 Dysfucion 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-19[18].

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 biológico[21]. 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 molecular[22].

---

[18] SANSONE, Andrea; *et al.* "Mask up to Keep it Up": Preliminary Evidence or 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** 1ª 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/intercadeias[23]. Também, o aminoácido metionina (Met) pode oxidar formando metionina sulfóxido[24]. Esse processo ocorre facilmente quando exposta à radiação UV[25].

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 dissulfeto[26]. 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 ácida[27]. 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-Asp[28].

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 Stabiility 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. Chemiical Pathways of Peptide Degradation. IV. Pathways, Kinetics, and Mechanism of Degradation of na Aspartyl Residue in a Model Hexapeptide. **Pharmaceuticals Research**, v. 10, n. 1, p. 95-102, jan/1993.
[28] Peptide Stabiility 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).

anteriormente[29]. 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 ocorrência[30]. 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-Asp[31]. Esse mecanismo é de comum ocorrência em sequências de Asn-Gly[32]. Já em condições ácidas, ocorre apenas a conversão de Asn em Asp sem haver a formação do intermediário cíclico[33].

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 livre[34]. 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 intermediáriocíclico[35]. 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 Adrenocorticotropic 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 Adrenocorticotropic Hormone. **Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 6, p.593-599, jun/1990.
[32] Peptide Stabiility 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. Kinectics of Deamidation of na 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 intermediário[36].

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 temperaturas[37].

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 tóxico[38]. 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 armazenamento[41].

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 conformacional[43].

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 3-6[44]. 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 Reserach**, 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 pH[46]. No geral, as reações de oxidação são reduzidas em pH<6,5[47].

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 negativas[48].

1.4.2. Surfactantes e polímeros

Surfactantes e polímeros são mencionados na literatura como estabilizantes por prevenirem 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-CSF[49].

---

[45] PATELL, Kamlesh; BORCHARDT, Ronald T. Chemical Pathways of Peptide Degradation. II. Kinectics of Deamidation of na 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 Granucyte 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 ocorrerem[50]. Como exemplo, difusão translacional é necessária durante a agregação; também o movimento flexional é importante durante o processo de deamidação da cadeia contendo Asn[51]. 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 clínicos[52]. 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 2019[53].

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 fentolamina[54]. Seu potente efeito vasodilatador desencadeia uma cascata de reações adversas, promovendo hipotensão[55]. Além disso, outros efeitos são relatados, como diarreia, bigeminismo, rubor e taquicardia[56]. Embora sua eficácia, a necessidade de administração invasiva (injeção intrapeniana) e seus

[50] CONSTANTINO, Henry R.; PIKAL, Michael J. **Lyophilization of Biopharmaceuticals.** 1ª ed. AAPS Press. Arlington, VA: p. 443-479. 2004.
[51] CONSTANTINO, Henry R.; PIKAL, Michael J. **Lyophilization of Biopharmaceuticals**. 1ª 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 (Sanetek). **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 crianças[57]. A toxina presente no veneno da aranha, fração semi-purifcada PnTx2-6, é responsável pelo efeito do veneno, induzindo sintomas excitatórios sistêmicos, como lacrimação, convulsão, salivação, paralisia espástica dos membros e priapismo[58]. 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 ratos[59]. Contudo, o efeito da toxina PnTx2-6 apresenta efeitos adversos dose-dependentes, como congestão vascular intensa em órgão vitais como rim, fígado, pulmão e coração[60].

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 PnTx2-6[61] (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 Phonetria 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.

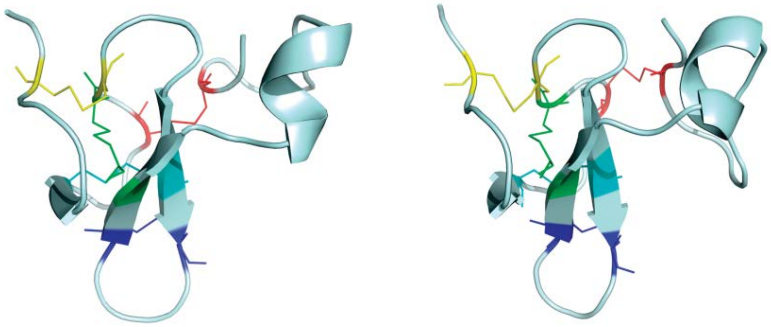
[59] SILVA, Carolina N. et al. Nitric oxide-induced vasorelaion in response to PnTx2-6 toxin from Phoneutria Nigriventer spider in rat cavernosal tissue. **Journal of Sexual Medicine**, v. 7, n. 12, p. 3879-3888, dez/2010.

[60] SILVA, Carolina N. *et al*. PnTx2-6, a toxin from Phonetria 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.

ATCAGQDQPCKETCDCCGERGECVCGG----------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 alvo[62].

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 elevadas[63]. 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.

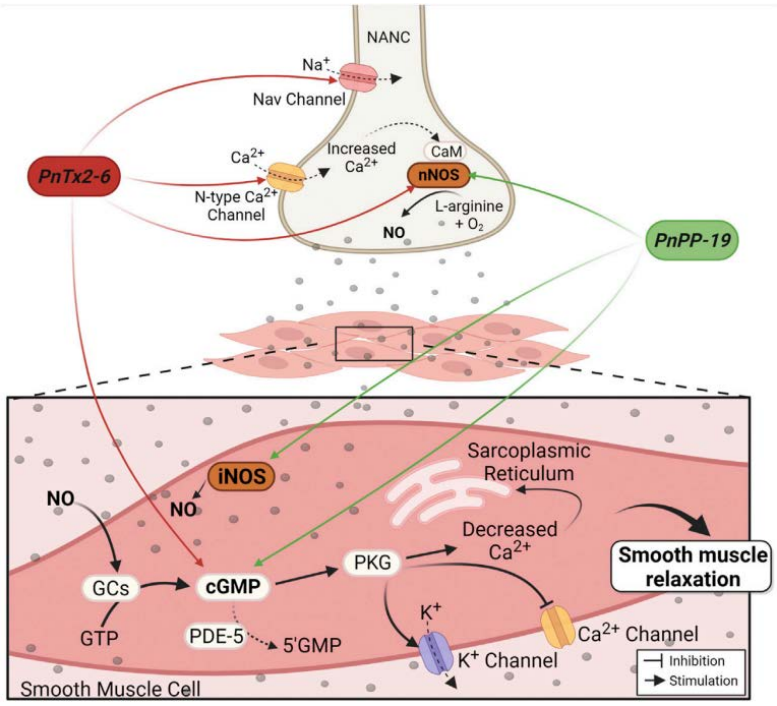
Figura 4 – Estrutura primária PnPP-19.

Ac-**Gly-Glu-Arg-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-Lys**-NH_2

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 laterais[64].

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 ativo[67].

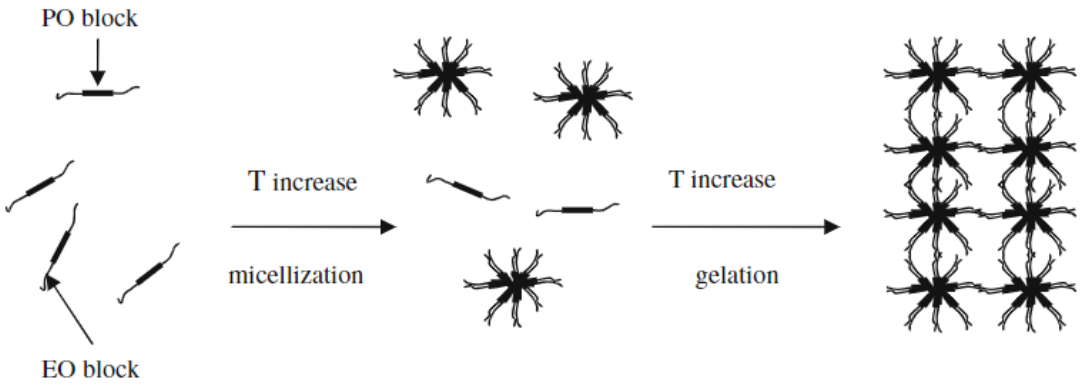
Poloxamer *blocks* é uma classe de polímeros anfifílicos utilizada para desenvolver geis termorreversíveis, formando a estrutura *triblock* EO_x-PO_y-EO_x[68], composto por óxido de etileno (EO, do inglês *ethylene oxide*) e óxido de propileno (PO, do inglês *propylene oxide*). São usados em diferentes aplicações que requerem a solubilização de ativos lipofílicos e estabilização de moléculas hidrofílicas[69]. Essa classe vem sendo utilizada para o desenvolvimento de novas formulações com ativos proteicos, como Ureases, IL-2 e rHGH[70], promovendo a redução da degradação e a estabilização da estrutura terciária dessas moléculas, e evitando a agregação[71].

Poloxamer 407, ou somente P407, apresenta EO_{97}-PO_{69}-EO_{97}. 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. **Phamarceutical 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 Sustein 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. **Phamarceutical 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. **Phamarceutical 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 thePhysicochemical Properties of Liquid Suppositoty 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 Scarreting (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 Chu[76], 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 alvo[77]. Além disso, a estrutura formada promove a imobilização do peptídeo, evitando a desnaturação e o desdobramento[78] em altas temperaturas[79]. Devido a essas propriedades e por ser um ingrediente biocompatível aprovado pelo FDA[80] e pela ANVISA[81], 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 Crystalograph**y, 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. **Phamarceutical Research**, v. 23, n. 12, p.2709-2728, dez/2006.
[79] SALAY, Luiz C. *et al*. Molecular Interactions Between Pluronic F127 and the Peptide Tritrpticin 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).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Otimizar uma formulação contendo o peptídeo PnPP19, promovendo o aumento da estabilidade físico-química do fármaco e possibilitando a aplicação tópica.

2.2. Objetivos específicos

I. Otimizar uma formulação semissólida padrão por meio da modificação da concentração das matérias-primas previamente selecionados;
II. Caracterizar as formulações promissoras em termos da $T_{sol \rightarrow gel}$, perfil reológico e textura;
III. Desenvolver e validar uma metodologia analítica para a quantificação e determinação do perfil de integridade química do PnPP19;
IV. Realizar ensaios de estabilidade de formulações promissoras nas temperaturas de 5, 25 e 40ºC determinando por, no mínimo, um período de 6 meses;
V. Avaliar a fotodegradação do peptídeo em diferentes formulações;
VI. Avaliar a incorporação de insumos conservantes e antioxidantes na formulação;
VII. Realizar ensaios microbiológicos para determinação do melhor sistema conservante.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico: A new drug product for erectile dysfunction therapy: thermoresponsive hydrogel formulation optimization and peptide stability study.

Manuscrito a ser submetido para a revista Internation Journal of Pharmaceutics (https://www.sciencedirect.com/journal/international-journal-of-pharmaceutics).

Fator de impacto: 5,8

A new drug product for erectile dysfunction therapy: thermoresponsive hydrogel formulation optimization and peptide stability study.

FROHLICH, Anna[a]; TRINDADE, Camilla[b]; NEVES, Gabriela[b]; AGUIRRE, Tanira Alessandra Silveira[a]

[a] Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

[b] Biozeus Biopharmaceutical S.A. Rua Visconde de Pirajá 623, 9 andar. 22410-003, Rio de janeiro, RJ, Brasil.

ABSTRACT

Erectile dysfunction (ED) is the inability to achieve or maintain an erection. The pharmacological treatment is usually phosphodiesterase-5 inhibitors (iPDE5), presenting limitations, such as the lack of effects on approximately one-third of patients. The PnPP19 is a synthetic peptide originated from a Brazilian spider toxin, which presents an alternative mechanism to iPDE5 therapy to ED. Poloxamer 407 (P407) is a polymer with thermoreversible gel characteristics, and it is used in developing pharmaceutical formulations. The objective of this work was to improve a P407 hydrogel-based preliminary formulation for PnPP-19 topical administration, aiming to improve sensorial aspects of the final product by reaching a higher viscosity and better physical-chemical stability of the peptide. Each component (polymer, propylene glycol, and buffer) was evaluated in order to determine the impact on the Tsol(gel), which means what increase in temperature is required for formulations to improve their viscosity until they achieve a gel consistency. It was shown that the increase of P407 reduces the $T_{sol \rightarrow gel}$; while the increase of propylene glycol promotes an increase in the $T_{sol \rightarrow gel}$. Notwithstanding, the use of different buffers also impacted the $T_{sol \rightarrow gel}$ of the formulation; phosphate buffer pH 5.8 decreased the $T_{sol \rightarrow gel}$ more significantly than the acetate buffer pH 5.0. Additionally, it was observed that different formulations presented two different rheologic behavior: 10S-PEHG with more fluidity characteristic, that do not form gel (a

Newtonian behavior) and 16F-PEHG with a more viscous formulation and a $T_{sol \rightarrow gel}$ around 25 ºC (a non-Newtonian behavior). Regarding the peptide stability study, it was shown that a formulation with no buffer (10S-PEHG) on its formula (containing saline acetate solution with pH 5.0 adjusted with HCl), low percentage of P407 and no transition to gel, displayed approximately 25.71 % ± 3.02 loss on peptide content after 9 months at 25 ºC; while a more viscous formulation (16F-PEHG) containing phosphate buffer pH 5.8 and with a $T_{sol \rightarrow gel}$ close to skin surface temperature showed 19.39 % ± 4.61 peptide content loss after 9 months at 25°C. This difference in the peptide content after 9 months at 25°C between formulations 10S-PEHG and 16F-PEHG was statistically significant (p=0.0053). After 12 months at 25 ºC, both formulations presented the same peptide stability profile, showing that the increase of viscosity improves the stability kinetics of peptide, retarding its degradation. A similar result was observed at 40 ºC after 6 months: 16F-PEHG and 10S-PEHG showed the same degradation profile (p=0.1183), while before that, 16F-PEHG presented a better result in peptide stability. Much better behavior of 16F-PEHG was observed at 5 ºC, in which the formulation was able to keep the peptide stability during the entire analyzed period (11.09 % ± 0.35), differenttly from 10S-PEHG (p=0.0211).

Keywords: Peptide PnPP19, Erectile Dysfunction, Poloxamer 407, Hydrogel.

1. INTRODUCTION

Erectile dysfunction (ED) is a condition that has a high prevalence in the world, ranging from 20.7% in North America to 71.2 % in the Asian continent [1]. ED is the inability to achieve or maintain a sufficient erection of the penis to engage in sexual intercourse [2]. It is a multifactorial condition caused mainly by endocrine dysregulation, neuronal and vascular diseases. The main risk factors for the onset of ED are age, diabetes, heart disease, obesity, depression, atherosclerosis, and others [2-4]. The mechanism of penile erection is mediated by the release of nitric oxide (NO) locally, achieving the penis's smooth muscles, stimulating the guanylate

cyclase enzyme to produce cGMP, and promoting muscle relaxation and erection [5]. This reaction cascade is stopped by the transformation of cGMP in GMP through the phosphodiesterase-5 enzyme.

The primary treatment for ED is the phosphodiesterase-5 inhibitors (iPDE5), acting as PDE5 enzyme blockers inhibiting cGPM-GMP conversion [6]. iPDE5 increases cGMP concentration on the penile smooth muscle, maintaining relaxation and high blood flow, and, as the final result, a penile erection occurs. The first drug iPDE5 approved by the FDA was Sildenafile (Viagra®, Pfizer) in 1998 [7]. Approximately 35 % of patients are non-responsive to the iPDE5 therapy, mainly patients with low NO levels distribution, such as patients submitted to prostatectomy surgery, and with endothelial dysfunction (like diabetes mellitus, sistemic hypertension) [6]. Also, for patients with heart diseases that use therapies based on nitric oxide donators, Viagra® is harmful because both therapies work by the same mechanism, which can promote severe hypotension [8]. The common adverse effects of the iPDE5 therapies include blush, headache, nasal congestion, stomach and visual disorders. The most severe effects reported include tachycardia, heart palpitations, drowsiness, dizziness, photophobia, and ocular hyperemia [9].

Synthetic peptides are a new class of innovative drugs, showing high specificity and reduced toxicity compared to drugs with low molecular weight [10]. However, free peptides are unstable molecules and, depending on their amino acid sequence and the environmental pH, are highly susceptible to hydrolysis, oxidation, and aggregation, leading to accelerated degradation [10,11]. The challenges associated with the physical-chemical stabilization of these biodrugs reduce the options available to patients [12]. Lantus®, Lupron®, Fuzeon®, and Neuprex®, are examples of commercialized peptides [13-15]. The biggest challenge associated with working with peptides is developing a pharmaceutical dosage form that presents an environment free of inducers for these degradation reactions, thus promoting a physical-chemical stabilization of the peptide.

The PnPP19 is an innovative peptide intended to treat ED by topical application with no systemic distribution [16] and a very good safety profile in mammals [17]. This peptide is formed by 19 amino acids (Fig. 1) and it is obtained

by a synthetic route using the solid phase FMOC strategy [16]. It acts directly by stimulating the NO synthase isoforms in the penile smooth muscle, stimulating local NO release, and enabling the entire reaction cascade until penile erection is achieved [17]. Thus, PnPP19 have synergistic effects with iPDE5 therapy and also can be effective in iPDE5 non-responsive patients since it has a different mechanism of action that occurres in a previous stage of the reaction cascade.

Figure 1: Amino acids sequence of PnPP19 [17].

Ac-**Gly-Glu-Arg-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-Lys**-NH_2

This peptide was designed based on the PnTx2-6 toxin present in the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer.* Its main effect is to cause excitatory reactions in the entire body, including priapism [18]. Through the molecular modeling, it was possible to determine the amino acid sequence responsible for the priapism and other cardiological adverse effects [17-21] and, thus, develop the essential amino acid structure (Fig. 1) that could promote penile erection safely and effectively [17].

Poloxamers, commercially available as Pluronic®, Kolliphor®, and Synperonic™, present a class of amphiphilic polymers used to create thermoreversible gels, where it is possible to modulate the physical condition of some formulations from a viscous liquid to a semi-solid gel. They are used in different applications that require the solubilization of lipophilic actives and the stabilization of hydrophilic molecules [22]. This class has been used in developing new formulations with protein actives, such as ureases, IL-2, and rHGH [23], promoting the reduction of degradation and stabilizing these molecules's tertiary structure, avoiding aggregation [24].

Poloxamer 407, known as Pluronic® F127, is formed by ethylene oxide (EO) and propylene oxide (PO) units covalently linked, forming a linear sequence: $(EO)_{97}$-$(PO)_{69}$-$(EO)_{97}$. The thermogelation process involves the dehydration of EO groups

in the side chains, where the polymer molecules are organized to create spherical micelles with a PO-hydrophobic core. The micellization process is followed by the gelation process through the organization of the micelles formed, generating a face-centered cubic structure (FCC) in the P407 concentration range of 20% [24]. The polymer concentration modifies the interaction with active, especially proteins and peptides, showing that at high concentrations, the diffusion coefficient of the drug is reduced due to increased viscosity, promoting a release control in target tissue [25]. Also, the formed structure promotes the immobilization of peptides, avoiding denaturation and unfolding [24] at high temperatures [26]. Therefore, P407 is an attractive component because of its properties and because it is a biocompatible ingredient approved by the FDA [27].

Starting from a preliminary formulation with low viscosity, this work aimed to study and optimize a P407 hydrogel-based formulation containing PnPP19 for topical administration, improving its viscosity by obtaining a gel consistency while applying it on the skin and promoting the peptide's physical-chemical stability to produce a new commercial topical drug product for the treatment of ED.

2. MATERIALS AND METHODS

Pluronic® F127 (Poloxamer 407) (Sigma-Aldrich), propylene glycol (Sigma-Aldrich), Synperonic™ PE/F 68 (Poloxamer 188) (Croda Pharma), sodium acetate (CH_3COONa – MW 82.03 g/mol) (Supelco - Merck), hydrochloric acid (HCl – MW 36.45 g/mol) (Alphatec), dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4 – MW 174.18 g/mol) (Synth), monopotassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4 – MW 136.09 g/mol) (Synth), Microcare® PEHG (Alpha Química) and peptide PnPP19 (Biozeus Pharmaceuticals S.A.).

2.1. Formulation optimization, evaluation of viscosity modifications, and $T_{sol \rightarrow gel}$

Different formulations were developed (Table 1) to study the influence of each ingredient on the viscosity, rheology, and texture profile. The preliminary formulation

previously prepared by Biozeus Biopharmaceuticals S.A (data not shown) comprises 3 components: polymer, buffer as a vehicle (aqueous base), and propylene glycol (lipophilic base). By changing the percentages of each ingredient, the modification of each formulation's physical-chemical characteristics was observed to understand how each component influenced the gel network by determining the temperature of transition to gel ($T_{sol \rightarrow gel}$). Acetate buffer pH 5.0, acetate saline solution + HCl pH 5.0, phosphate buffer pH 5.8, propylene glycol, poloxamer 407, and poloxamer 188 had their amount varied, following the same preparation methodology. Afterward, for each obtained formulation, the $T_{sol \rightarrow gel}$ was observed. Microcare® PEHG was added to the selected formulations as a preservative.

The formulations were prepared by the following procedure: in a conic flask, the polymers were weight and then added the propylene glycol. This pre-solution was homogenized with a magnetic bar for 30 s at room temperature. After this time, the peptide solution (concentration 30 mg mL^{-1}) was added in an appropriate volume, and the buffer solution was added. The final solution was homogenized with a magnetic bar for 4 h at room temperature and then put in a freezer overnight. Final peptide's concentration in the formulations was 5 mg mL^{-1}.

Table 1: Formulations prepared for optimization process varying the type and amount of buffer, P407, P188, and propylene glycol.

ID	Acetate Saline Solution pH 5.0 (%)	Acetate Buffer pH 5.0 (%)	Phosphate Buffer pH 5.8 (%)	Propylene Glycol (%)	Poloxamer 407 (%)	Poloxamer 188 (%)	Microcare® PEHG (%)
10S	60			30	10		
14S	71			15	14		
15S	70			15	15		
16S	69			15	16		
17S	68			15	17		
15A		55		30	15		
14A		71		15	14		
14A-188		68.5		15	14	2.5	
15A		70		15	15		

15A-188	67.5		15	15	2.5	
16A	69		15	16		
16A-188	66.5		15	16	2.5	
17A	68		15	17		
17A-188	65.5		15	17	2.5	
18A	67		15	18		
18A-188	64.5		15	18	2.5	
15APG	72.5		12.5	15		
14F-PEHG		70.2	15	14		0.8
14F		71	15	14		
15F-PEHG		69.2	15	15		0.8
15F		70	15	15		
16F-PEHG		68.2	15	16		0.8
16F		69	15	16		
17F-PEHG		67.2	15	17		0.8
17F		68	15	17		

The superficial temperature of skin is approximately 29-33 ºC. This temperature can be changed by external (environmental conditions) and internal factors (age, metabolism, fever, among others.) [42]. The objective is to develop a consistent gel formulation when it reaches the skin. Furthermore, the gelation temperature cannot be too low because it can make large-scale production difficult. It requires much energy to reduce the system's temperature to ensure the fluid state and facilitate homogenization. Therefore, the working range of $T_{sol \rightarrow gel}$ was defined as 25-27 ºC.

2.1.1. Rheology studies and determination of $T_{sol \rightarrow gel}$

The $T_{sol \rightarrow gel}$ is the transition temperature between the fluid and semi-solid states. This temperature was determined by visual inspection and rheology studies.

Formulations were added into a closed conical flask with a magnetic bar. The flask was put in a water bath with slow heating. Controlling the temperature increases with a thermometer, observing the movement of the magnetic bar in the

formulation. When the bar stopped its movement, the bath temperature was recorded.

It was also used a rheometer (ARES G2) with cone/plate geometries, which is capable of measuring the forces, stress, and shear rate determining the rheological behavior of the samples with a temperature ramp (15-35 ºC, 1 ºC min^{-1}) as a function of viscosity, with a constant shear rate (1 s^{-1}). This way, the $T_{sol \rightarrow gel}$ can be determined with a high accuracy. By varying the shear rate (1-300 s^{-1}) at a constant temperature (35 ºC), it was possible to determine the samples' Newtonian or non-Newtonian behavior.

All formulations had their gel transition temperatures measured by the visual inspection. The rheologic studies were performed to confirm the previous result and understand the solutions' behavior under external forces. Because of this, the rheologic studies was performed in two promising formulations, 16F-PEHG and 10S-PEHG.

2.1.2. Texture Analysis

The texture tests were performed using CT310K Texture Analyzer (Brookfield, EUA) in compression mode using the plate probe TA4 1000. This probe was forced down into each sample at a defined rate (2 mm s^{-1}) and to a defined depth (1 mm). When a trigger force of 2 g has been achieved, the probe penetrates the sample to a depth of 1 mm. During this time, the force to penetrate the sample increased. When the specified penetration distance was reached, the probe was withdrawn from the sample at the post-test speed of 2 mm s^{-1}. The maximum force value of the graph is a measure of the firmness of the sample at the specified depth. The minimum force value of the graph on the probe's return is a measure of adhesiveness. The test was performed in quadruplicate at a temperature range of 28.2 ºC ± 0.4 above the gelification temperature of samples.

2.2. Physical-chemical stability of PnPP19

In order to obtain the quantitative results about peptide content in formulations and the percentage of degradation of PnPP19 present in the promising formulations, a methodology of high-performance liquid chromatography (HPLC) was developed and validated.

2.2.1. Analytical method validation

The method was developed according to RDC nº 166 of 2017 ANVISA regarding selectivity, linearity, work range, precision, accuracy, detection, and quantification limit tests. It was used the equipment HPLC (PROMINENCE, Shimadzu), column oven CTO-20A, DAD SPDM20A, wavelength λ = 220 nm, column Shim pack CLC-C8 (M) 5 µm / 150 x 4,6 mm Shimadzu. Method: gradient (1 min 25% B; 1.01 – 20 min 45% B; 22 – 25 min 25% B; 30 min 25% B). Mobile phases: (A) Water 0.1% TFA; (B) Acetonitrile 0.1% TFA. Flow 0.6 mL min^{-1}; Injection volume 10 µL; Oven temperature: 25 ºC.

To obtain a linearity curve, samples with peptide in distilled water (0.1% TFA) were prepared in a 10-100 µg mL^{-1} concentration range. The process was performed in quadruplicate. For the precision assay, 7 samples with a known amount of peptide in 2 different groups were prepared to determine the inter/intra-day precision. Those samples were analyzed 2 times in different moments on the same day and the following day. For accuracy assay, 3 concentrations of peptide (at low, medium and high levels) were prepared in triplicate with an equivalent amount of each component of formulation to determine the signal variation in the presence of matrix.

2.2.2. Stability assay of different formulations

The promising formulations (Table 2) were exposed to 5 ºC, 25 ºC and 40 ºC without humidity control for 12 months to identify the peptide's stability profile according to external conditions. Each formulation was prepared three or six times (n = 3-6). In addition, Microcare® PEHG (*Phenoxyethanol and Ethylhexylglycerin*) was added as a preservative. This substance was chosen because is the most

commonly used in products applied under the skin [38], it is considered safe for topical application in 0.5-1 % dosages [39] and it is approved by the FDA [40] and ANVISA [44].

Table 2: Formulations prepared for stability assay (*n*=3-6).

ID	Acetate Saline Solution pH 5.0 (%)	Acetate Buffer pH 5.0 (%)	Phosphate Buffer pH 5.8 (%)	Propylene Glycol (%)	Poloxamer 407 (%)	Poloxamer 188 (%)	Microcare® PEHG (%)
10S-PEHG	59.2			30.0	10.0		0.8
18A-188-PEHG		63.7		15.0	18.0	2.50	0.8
17F-188-PEHG			64.7	15.0	17.0	2.50	0.8
17F-PEHG			67.2	15.0	17.0		0.8
14F-PEHG			70.2	15.0	14.0		0.8
14S-PEHG	70.2			15.0	14.0		0.8
16F-PEHG			68.2	15.0	16.0		0.8
16S-PEHG	68.2			15.0	16.0		0.8

When each formulation was prepared, aliquots were separated into flasks to be opened in specific periods for stability study. This way, we had one sealed flask for each period analyzed.

2.2.3. Statistical Analysis

All the statistical analyses were performed on GraphPad Prism (Version 8.0.2). For each group, if there was any outlier, it was identified using the ROUT and Q test methods. For comparisons among more than 2 groups, ANOVA one-way unpaired was performed, followed by Tukey post-hoc. For comparations between 2 groups, an unpaired *t*-test was performed, followed by Welch's correction of *p* value. The confidence interval considered in those tests was 95 %.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Formulation optimization: components influence on $T_{sol \rightarrow gel}$

The formulation 10S was previously developed for topical application of the peptide PnPP19 but presented a high fluidity and a sticky sensation after application to the skin (data not shown). Based on this premise, formulations with high viscosity but easy spreadability are required. Regarding the viscosity condition and physical characteristics of the formulation, given the thermoreversibility characteristics of the polymer, a formulation that is fluid during manufacturing is sought to facilitate homogenization on an industrial scale. However, as soon it is applied to the skin, turns into a gel because of the temperature change.

The formulation is composed mainly of three ingredients: buffer, which can be either acetate buffer pH 5.0 or phosphate buffer pH 5.8; an acetate saline solution pH 5.0 adjusted with HCl was also tested; propylene glycol and polymer, as Poloxamer 407 and 188. The presence of buffer in a medium with peptide is essential because the buffer controls ions on the amino acid's residues, promoting charge uniformity [11], stabilizing the peptide structure, and avoiding the hydrolysis reaction that occurs in an aqueous medium. The propylene glycol represents the lipophilic portion of the formulation. This ingredient facilitates the incorporation and solubilization of lipophilic actives, such as conservatives and antioxidants. In addition, propylene glycol has hygroscopic characteristics [29] and promotes water retention on formulation. Moreover, the polymer is responsible for the viscosity increment by forming the polymeric gel.

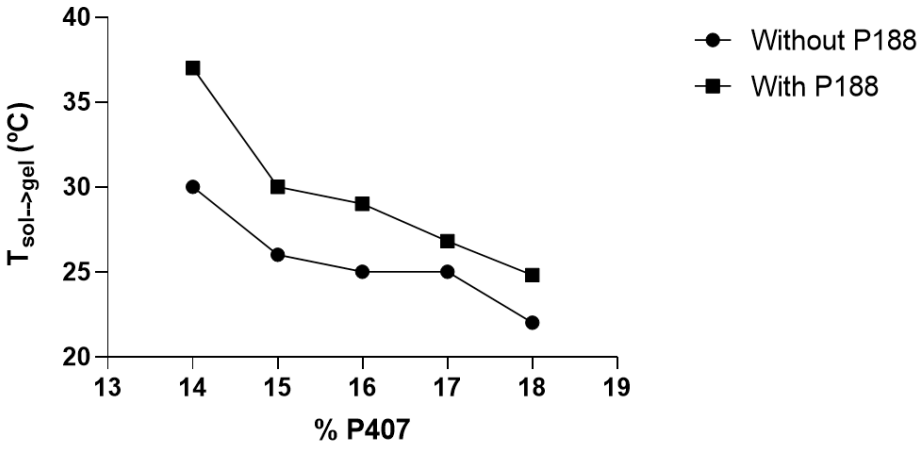
3.1.1 P407 and binary system P407/P188 effects on $T_{sol \rightarrow gel}$

The increase in the concentration of P407 in the medium promoted the reduction of $T_{sol \rightarrow gel}$. The literature mentions that formulations with <15 % P407 in water do not turn into gel [24]. This parameter can be modified by adding other components that directly interfere with P407 micelles and, consequently, in the temperature required to reach the gel phase.

When using a binary system that is usually seen in the literature, P407/P188, an increase in $T_{sol \rightarrow gel}$ can be observed (Fig. 2). This can be explained by the fact

that P188 has hydrophilic groups and its association promotes changes in micellar formation [30], and the hydration of micellar coronas is increased.

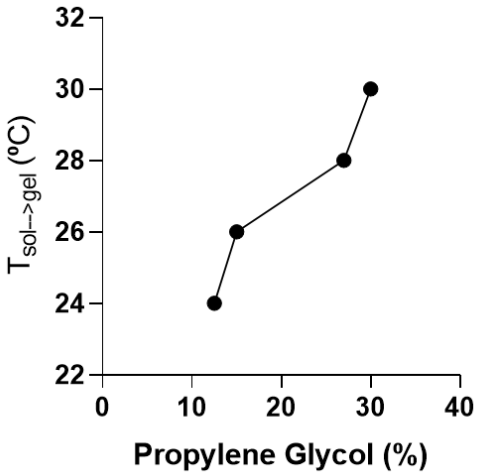
Figure 2: Influence of P188 in formulation with 15 % propylene glycol, acetate buffer pH 5.0 (*quantum satis*), and variable amounts of P407, with or without 2.5 % P188.



3.1.2 Propylene glycol effect on $T_{sol \rightarrow gel}$

According to Fig. 3, as the concentration of propylene glycol increases, it increases $T_{sol \rightarrow gel.}$ This effect was already observed by others [31] and, observing the chemical structures of both components, it could be justified by the fact that propylene glycol interacts by hydrogen bonding with hydrophilic chains of P407, and it makes it necessary to add more energy into the system to make free those polymeric chains to form micelles.

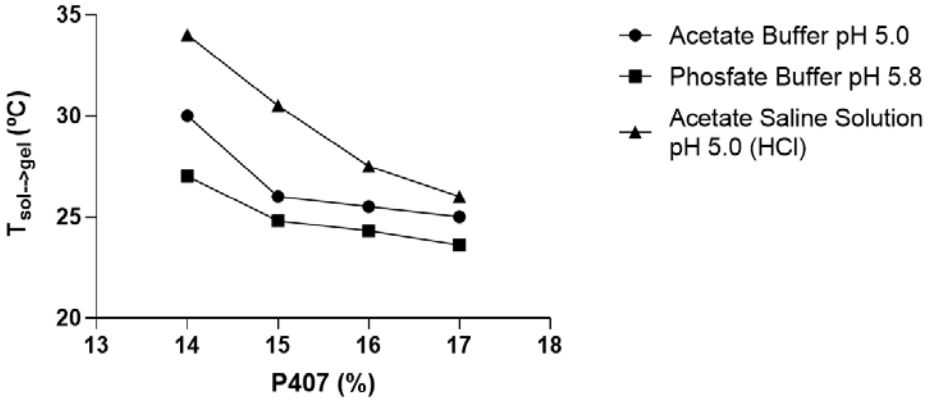
Figure 3: Influence of propylene glycol in formulation with 15 % P407, acetate buffer pH 5.0 (*quantum satis*), and variable amounts of propylene glycol.



3.1.3 Buffer effect on $T_{sol \rightarrow gel}$

It was observed that varying the buffer type results in a variation in $T_{sol \rightarrow gel}$ (Fig. 4). Comparing the formulations of the same composition, the formulation with acetate buffer pH 5.0 presents a $T_{sol \rightarrow gel}$ slightly higher than the formulation with phosphate buffer pH 5.8. This effect has already been reported [31], it is discussed that PO_4^{-3} ions manage to form strong cross-links with poloxamer, further favoring the organization of micelles. This phenomenon can be explained by the *salting-out* effect [25], where the presence of salts promotes a reduction in the solubility of other compounds in the medium. Thus, the EO-hydrated portions of poloxamer lose their water molecules with less energy required for micellization and subsequent gelation. Other authors justify this effect using calorimetric techniques and confirm that the presence of ions promotes the formation of smaller and more stable micellar aggregates, facilitating gelation [32]. On the other hand, for formulations containing the acetate saline solution pH 5.0 + HCl, an increase of $T_{sol \rightarrow gel}$ is observed. As the propylene glycol effect, HCl does not allow hydrogen bonds, weakening the bonds in the poloxamer matrix and resulting in reduced gel strength [31].

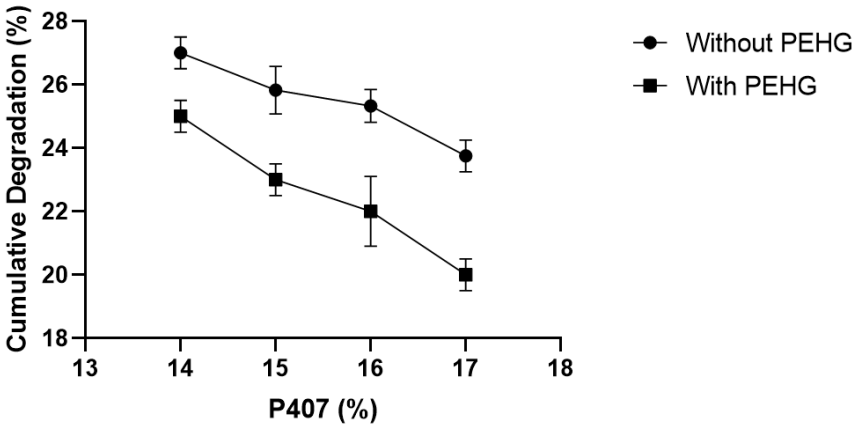
Figure 4: Influence of buffer type in formulation with variable amount P407, buffer (*quantum satis*), and 15 % propylene glycol.



3.1.4 Microcare® PEHG effect on $T_{sol \rightarrow gel}$

In addition, when the conservative Microcare® PEHG was added at a concentration of 0.8 % (w/w), it seemed to be a decrease in the $T_{sol \rightarrow gel}$ (Fig. 5). It may be hypothesized that this effect must be similar to the buffer effect, where the presence of these two new molecules in the medium (*phenoxyethanol and ethylhexylglycerin*) promotes the stabilization of smaller e stable micellar aggregates. Although, more studies may help to understand what is happening at the intermolecular level.

Figure 5: Influence of the presence of Microcare® PEHG (0.8 %) in formulation with variable amount P407, phosphate buffer pH 5,8 (*quantum satis*), and 15 % propylene glycol.



Therefore, considering the criteria for optimization study, eight formulations were chosen to proceed to stability assay as follows: (1) the 10S-PEHG formulation was chosen to compose the list of promising formulations because it was the first formulation developed to carry the topical delivery of the peptide (Biozeus Biopharmaceutical). This formulation does not form a gel and, although there are P407 micelles formed, matrix organization does not occur and, therefore, the peptide would be accessible in the medium; (2) the 18A-188-PEHG was chosen because it contains the acetate buffer pH 5.0 and reduced concentration of propylene glycol compared to the 10S-PEHG. It also presents the hybrid composition of P407/P188 with $T_{sol \rightarrow gel}$ within the desired range; (3) the 17F-188-PEHG formula contains the phosphate buffer pH 5.8 and has the hybrid composition P407/P188; (4) formulation 17F-PEHG has the same composition as the previous formulation but without the P188. Considering the $T_{sol \rightarrow gel}$ reduction occurred in the 17F-PEHG promoted by the withdrawal of P188, the following formulations (5) 14F-PEHG and (6) 16F-PEHG were prepared, they have the P407 concentrations according to the $T_{sol \rightarrow gel}$ range. Furthermore, formulations (7) 14S-PEHG and (8) 16S-PEHG were evaluated with the same composition as 14F-PEHG and 16F-PEHG but with acetate saline solution pH 5.0.

After the optimization step, the peptide was added to the concentration of 5 mg mL^{-1}. The lyophilized peptide was previously solubilized in distilled water at a concentration of 30 mg mL^{-1}, and it was added together in the buffer step. The final $T_{sol \rightarrow gel}$ after peptide addition can be observed in Table 3. To protect them from contamination, a preservative Microcare® PEHG in concentration 0,8 % was used to protect all formulations.

Table 3: $T_{sol \rightarrow gel}$ of formulations prepared for stability assay.

ID	$T_{sol \rightarrow gel}^{*}$ (ºC)
10S-PEHG	-
18A-188-PEHG	24.0 ± 0.5
17F-188-PEHG	26.8 ± 1.6
17F-PEHG	23.8 ± 0.5
14F-PEHG	27.0 ± 0.5

14S-PEHG	34.0 ± 1.4
16F-PEHG	25.3 ± 0.5
16S-PEHG	27.3 ± 0.4

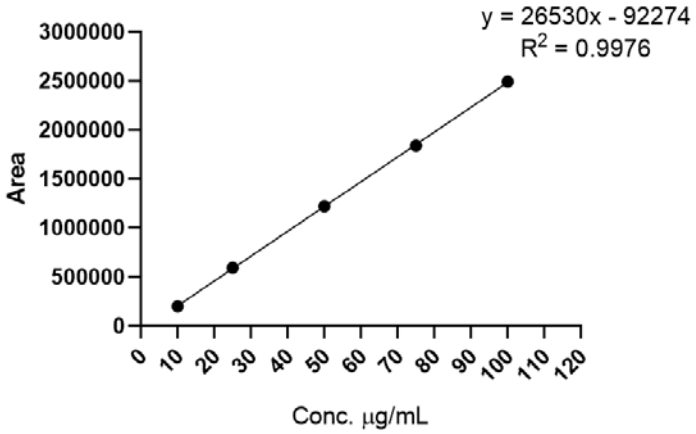
*after addition of peptide

3.2 Analytical Method Validation

In order to obtain a method to quantify the samples stored in stability studies, it was necessary to conduct an analytical method development and validation. It is important to certify whether the instrument is suitable for the intended analysis and is sensitive, precise, and accurate [41].

The method was linear within 10 to 100 µg mL^{-1} (Fig. S1), with a determination coefficient R^2 = 0.9976.

Figure S1: Mean linearity curve. Data fitted with a linear mathematical model. Range 10-100 µg mL^{-1}.



Precision tests on an analytical analysis method are necessary to determine if the quantification method is reproducible. Thus, intra-day (different analyses on the same day at different moments) and inter-day (analyses on different days) evaluations were performed. The developed method is precise and reproducible in both evaluations, with a variation coefficient of less than 2 % (Table 4).

The method's accuracy assesses whether other components impact the signal on the sample and how the analyte is quantified at three levels. The

intermediate points of the obtained linearity curve (25, 50, and 75 µg mL^{-1}) were analyzed, and a known amount of analyte and matrix ingredients were added. The method presented > 99 % accuracy, showing that other formulation ingredients, such as buffer salts, propylene glycol, and polymers, do not interfere with the obtained signal. Furthermore, the individual analysis of each component showed that they do not absorb energy at the analysis wavelength (220 nm), proofing that the method is also selective for the peptide.

Table 4: Precision, accuracy, work range, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) values.

Precision (%RSD ± SD)	Inter-day (*n*=7)	1.55% ± 0.06
	Intra-day (*n*=14)	1.66% ± 0.19
Accuracy (mean ± SD)	Low (25 mg mL^{-1}) (*n*=3)	101.18% ± 2.70
	Medium (50 mg mL^{-1}) (*n*=3)	99.75% ± 0.48
	High (75 mg mL^{-1}) (*n*=3)	101.01% ± 1.25
Range		10 – 100 µg mL^{-1}
LOQ		10 µg mL^{-1}
LOD		3.33 µg mL^{-1}

3.3 Stability assay

In order to understand how the components and their concentrations promote more or less significant peptide stabilization, some potential formulations were added to the stability study.

3.3.1 Peptide stability at 25 ºC

Formulation 18A-188-PEHG, after 3 months of stability test, showed less than 1 % of peptide degradation (Table 5). However, the formulation smells nasty because of the acetic acid on the acetate buffer. Because of this, it was decided to use the phosphate buffer, which has no residual odor. Surprisingly, the change of buffer and minor adjustment of P407 (amount changed 18 % to 17 %) caused an increase in degradation, 17.24% ± 0.23 in the same period of analysis, making the 17F-188-PEHG one of the formulas that most promoted peptide degradation. On the other hand, the 17F-PEHG formula without the P188 was one of the best-performing ones, showing results closer to 0 % of peptide degradation after 3 months. It seems that in the formula with acetate buffer, the P188 did not have any negative influence on peptide stability; however, when changing the buffer and keeping the P188 on the formulation, this polymer seems to have an exaggerated degradation effect in the peptide. Further studies are necessary to determine how the presence of P188 promotes more pronounced degradative reactions in the peptide. Also, the negative effect seemed to be resolved by removing the P188 and keeping the phosphate buffer.

Comparing formulations 14F-PEHG, 16F-PEHG, and 17F-PEHG containing the same buffer and modifying the P407 amount to fit the $T_{sol \rightarrow gel}$ range, (Table 5, Table S1) it was observed that in the first month, 14F-PEHG promotes more peptide degradation (3.60 % ± 0.64) compared to 16F-PEHG (0.00 % ± 2.42, p=0.0376) and to 17F-PEHG (0.00% ± 0.97, p=0.0175). Comparing 17F-PEHG and 16F-PEHG, there is no statistical difference in the first month. In the third month, 17F-PEHG showed the better result among these formulations, with 0.00 % ± 0.96 degradation, showing different behavior when compared with 14F (7.97 % ± 1.49, p=0.0003) and 16F-PEHG (9.01% ± 1.85, p<0.0001). This may be explained by the $T_{sol \rightarrow gel}$; 17F-PEHG is the formulation with the highest amount of Poloxamer 407 (17 %, Table 2) and the lowest transition temperature (23.8 ºC ± 0.5, Table 3), which reduces the peptide mobility and, consequently, the degradation reactions. However, at 6 months, these formulations showed similarities in the degradation profile (p>0.05, Table S1), which means that 14F-PEHG, 16F-PEHG and 17F-PEHG presented the same peptide degradation. This comparison suggests that formulations with

increased viscosity can modulate the kinetic of degradation in the initial months, but after 6 months different degradation processes can take place.

Comparing formulations that have the same composition but different pH modulators (14F-PEHG vs. 14S-PEHG and 16F-PEHG vs. 16S -PEHG) it was observed that the formulations with phosphate buffer pH 5.8 presented improved peptide stability (p<0.05, Table S2) compared to acetate saline solution pH 5.0 (which contains HCl as pH modulator). Here, the hypothesis that the charge uniformity provided by the buffer is necessary to stabilize the amino acid residues of peptide seems to be confirmed. The comparison among the percentage of peptide degradation is also shown in Fig. S2.

Table 5: Peptide percentual degradation in relation with t.0 at 25 ºC for 12 months. Results showed as mean ± standard deviation (SD) (n=3-6).

ID	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months	9 months	12 months
10S-PEHG	7.70% ± 3.69[f]	12.68% ± 3.85[f]	16.63% ± 3.68[f]	15.57% ± 2.87[f]	18.78% ± 6.27[f]	18.73% ± 1.75[f]	25.71% ± 3.02[f]	30.74% ± 5.12
18A-188-PEHG	2.57% ± 0.52	-	0.92% ± 0.50	-	-	13.91% ± 0.49	-	-
17F-188-PEHG	12.07% ± 0.54	-	17.24% ± 0.23	-	-	23.74% ± 0.28	-	-
17F-PEHG	0.00% ± 0.97[a]	-	0.00% ± 0.96[a, c]	-	-	14.07% ± 0.47	-	-
14F-PEHG	3.60% ± 0.64[a, b]	6.74% ± 1.18[d]	7.97% ± 1.49[a]	6.24% ± 3.14[d]	8.03% ± 0.36[d]	8.09% ± 3.23[d]	15.33% ± 2.66[d]	17.92% ± 6.69[d]
14S-PEHG	6.17% ± 1.31	12.71% ± 1.29[d]	11.97% ± 3.69	22.12% ± 2.73[d]	23.02% ± 1.33[d]	24.15% ± 4.70[d]	37.19% ± 5.09[d]	45.96% ± 7.99[d]
16F-PEHG	0.00% ± 2.42[b, f]	0.96% ± 1.61[e, f]	9.01% ± 1.85[b, c, e, f]	7.47% ± 2.45[e, f]	10.85% ± 3.00[e, f]	12.56% ± 4.40[e, f]	19.39% ± 4.61[e, f]	21.92% ± 4.26[e]
16S-PEHG	4.39% ± 2.04	9.70% ± 2.11[e]	16.49% ± 1.32[b, e]	19.56% ± 2.15[e]	25.30% ± 4.10[e]	30.63% ± 4.16[e]	42.40% ± 7.42[e]	58.28% ± 6.49[e]

Equal letters represent statistical differences among samples of $p<0.05$ or lower obtained by unpaired *t*-test with Welch's correction of *p*-value (for 2 samples) and ANOVA one-way unpaired with Tukey post-hoc (for 3 or more samples) carried in the same table column (i.e., for the same month).

Table S1: Statistical analysis of 14F-PEHG, 15F-PEHG, and 17F-PEHG in the 1, 3 and 6 months at 25 ºC.

Time (Month)	Comparison		*p*-value*
1	17F-PEHG	14F-PEHG	**0.0175**
	17F-PEHG	16F-PEHG	0.5775
	14F-PEHG	16F-PEHG	**0.0376**
3	17F-PEHG	14F-PEHG	**0.0003**
	17F-PEHG	16F-PEHG	**<0.0001**
	14F-PEHG	16F-PEHG	0.6771
6	17F-PEHG	14F-PEHG	0.1655
	17F-PEHG	16F-PEHG	0.8321
	14F-PEHG	16F-PEHG	0.2446

*ANOVA one-way unpaired with Tukey post-hoc.

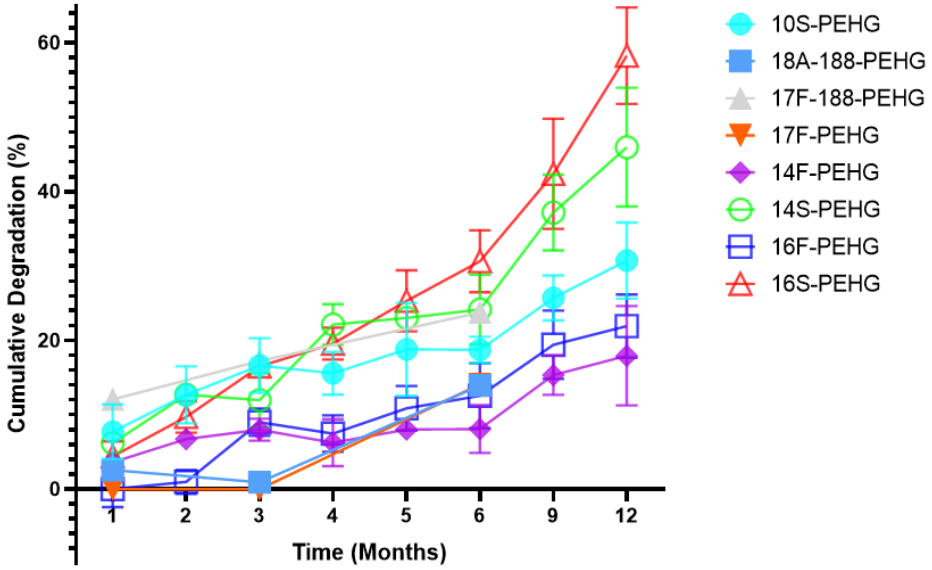
Table S2: Statistical analysis of 14S-PEHG Vs. 14F-PEHG and 16S-PEHG Vs. 16F-PEHG in the 1 until 9 months at 25ºC.

	p-value*	
Time (Month)	**14S-PEHG Vs. 14F-PEHG**	**16S-PEHG Vs. 16F-PEHG**
1	0.4149	0.0256
2	**0.0035**	**<0.0001**
3	0.1733	**0.0024**
4	**<0.0001**	**0.0002**
5	**0.0004**	**0.0003**
6	**0.0034**	**0.0004**

9	**0.0028**	**0.0009**

*Unpaired *t*-test with Welch's correction of *p* value.

Figure S2: Degradation behavior of selected formulations at 25 ºC.



This topic showed that phosphate buffer pH 5.8 is needed to provide chemical stabilization on the amino acid chain in the peptide. Also, a more viscous formulation can decrease the peptide mobility, avoiding its aggregation. Based on the results of stability and $T_{sol \rightarrow gel}$, in the next topic, we make a deeper analysis of the difference between 16F-PEHG and 10S-PEHG formulas in stability tests at 5, 25, and 40 ºC in order to understand if, in these conditions, the same behavior can be observed. Formulation 16F-PEHG was chosen among 14F-PEHG and 17F-PEHG because this formulation fits more precisely in the required $T_{sol \rightarrow gel}$ range (25-27 ºC).

3.3.2 10S-PEHG vs. 16F-PEHG peptide stability at 5, 25 and 40 ºC.

The difference in degradation between formulations 10S-PEHG and 16F-PEHG at 5 ºC was notable (Fig. S3A). Even in an environment less favorable to reactions due to the low temperature, the peptide in the 10S-PEHG formulation still

seemed sensitive. In the first 2 months, neither formulation shows a statistical difference (p=0.4590 1 month and p=0.0865 2 months, Table 6). At 3 months, the formulation 10S-PEHG showed elevated peptide degradation (16.69 % ± 0.87). The degradation increased each month until 8 months (41.38 % ± 7.78). The formulation 16F-PEHG kept peptide degradation level below 12 % after 8 months, showing that those formulations present different degradation behaviors at 5 ºC (p=0.0211, month 8). Due to formulation characteristics, it may be suggested that the reduced mobility of the peptide within the formulation and the phosphate buffer are crucial for its physical-chemical stabilization.

Table 6: Peptide percentual degradation on formulation 10S-PEHG vs. 16F-PEHG maintained at 5 ºC until 8 months with statistical analysis. Results are shown as mean ± standard deviation (SD) (n=3).

ID	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months	7 months	8 months
10S-PEHG	2.48% ± 1.58	6.99% ± 2.04	16.69% ± 0.87	18.29% ± 1.01	21.81% ± 2.58	21.56% ± 0.53	22.72% ± 2.69	41.38% ± 7.78
16F-PEHG	1.08% ± 2.46	3.60% ± 1.48	5.87% ± 2.4%	1.16% ± 3.24	3.46% ± 2.96	3.81% ± 2.38	1.71% ± 1.73	11.09% ± 0.35
p*	0.4590	0.0865	**0.0095**	**0.0072**	**0.0302**	**0.0043**	**0.0008**	**0.0211**

*Unpaired *t*-test with Welch's correction of *p* value.

Considering formulations 10S-PEHG and 16F-PEHG at 25 ºC, the last one presented improving peptide stabilization over 9 months (p<0.05) (Table 5, Table S3 and Fig. S3B). This result corroborates that a formulation with increased viscosity and containing phosphate buffer can promote better peptide stabilization until 9 months. After this period, both formulations showed the same degradative behavior (p=0.0856, Table S3).

Table S3: Statistical analysis of 10S-PEHG Vs. 16F-PEHG from 1 until 12 months at 25 ºC.

Time (Month)	*p*-value*
1	**0.0011**
2	**0.0003**
3	**0.0021**
4	**0.0004**
5	**0.0289**
6	**0.0170**
9	**0.0053**
12	0.0856

*Unpaired *t*-test with Welch's correction of *p* value

At 40 ºC, stability results for the 10S-PEHG formulation showed ~50 % of degradation in the first month of the assay, while the degradation for the 16F-PEHG formulation was below 10 % (Table 7). However, it seemed from Fig. S3C that the behavior of the 10S-PEHG showed an intense degradation in the first month, and after 2 months, the degradation kinetic was reduced. Meanwhile, the 16F-PEHG remained stable for up to 2 months and the curve slope increased up to 8 months, indicating an acceleration in the kinetic of peptide degradation. After 8 months, both formulations showed the same degradation profile (*p*=0.1503, Table 7). This result confirms that the formulation's composition modifies the degradation kinetics of the peptide.

Table 7: Peptide percentual degradation on formulation 10S-PEHG vs. 16F-PEHG maintained at 40 ºC until 8 months with statistical analysis. Results are shown as mean ± standard deviation (SD) (*n*=3).

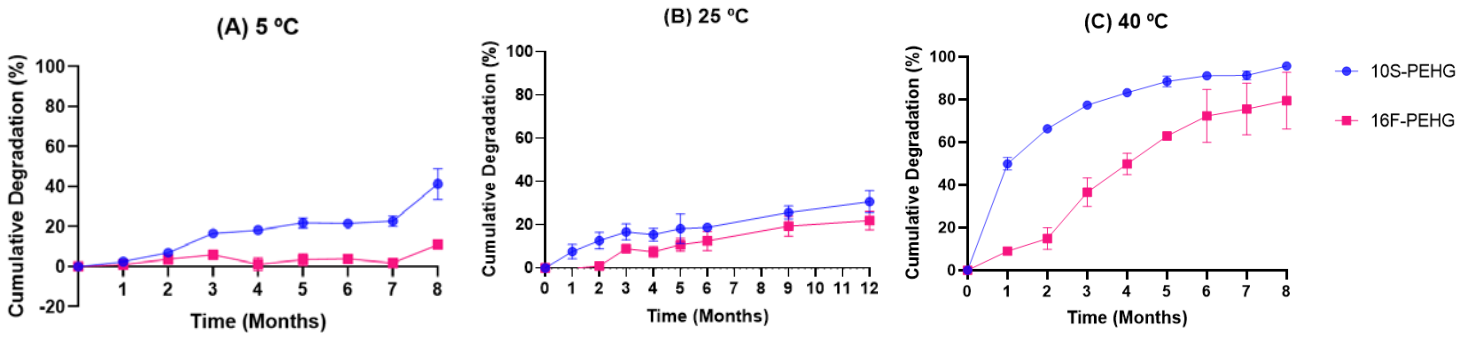
ID	1 month	2 months	3 months	4 months	5 months	6 months	7 months	8 months
10S-PEHG	49.91% ± 2.95	66.32% ± 1.68	77.34% ± 0.27	83.20% ± 1.16	88.48% ± 2.49	91.09% ± 1.54	91.25% ± 2.06	95.67% ± 0.92

16F-PEHG	8.94% ± 0.55	14.85% ± 5.09	36.51% ± 6.72	49.79% ± 4.99	62.85% ± 0.65	72.33% ± 12.43	75.54% ± 12.12	79.46% ± 13.25
p*	**0.0013**	**0.0015**	**0.0088**	**0.0053**	**0.0019**	0.1183	0.1503	0.3329

*Unpaired *t*-test with Welch's correction of *p* value.

The results showed the impact of the physical-chemical stabilization of the peptide according to the composition of different formulations. It seemed that the buffer had a strong influence, acting as a charge stabilizer by controlling the ionic reaction of the medium. Regarding consistency, the formulation's viscosity strongly influenced the peptide stabilization in the initial months, even under extremal conditions (40 ºC). As Salay et al. (2018) [26] mentioned, the P407 concentration modifies the form of binding and encapsulation of the peptide. At low concentrations, the polymer-peptide molecular structure can be characterized as condensed structures of a single bond, keeping the peptide freer. In contrast, the peptide may stay immobilized inside P407-micelles at high concentrations, which prevents denaturation when exposed to high-temperature conditions.

Figure S3: Cumulative percentual degradation behavior of the peptide in formulations 10S-PEHG and 16F-PEHG at 5 (A), 25 (B) and 40 ºC (C)



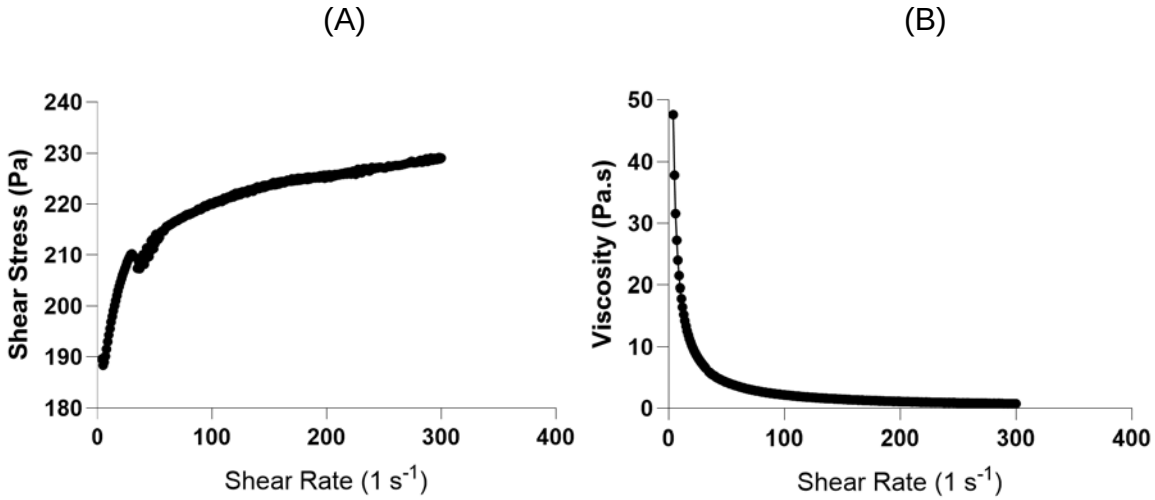
3.4 Rheologic assay

Two model formulations were used for the test: 16F-PEHG ($T_{sol \rightarrow gel}$ ~ 25ºC) and 10S-PEHG (does not form a gel) without peptide. Characterizing the

mechanical behavior of formulations is crucial because it modifies the drug release profile. Furthermore, these characteristics can show how the formulation accommodates the drug [33].

Several works in the literature bring the rheological differences of P407-based formulations in their pre-gel and post-gel states with other components [24,33]. For the first study, the 16F-PEHG formulation was already used at a constant temperature in a semi-solid state. The sample's shear rate was varied, resulting in shear stress and viscosity data (Fig. 6).

Figure 6: Rheologic behavior of 16F-PEHG formulation at 35ºC, with shear rate varying 1-300 s^{-1} in correlation with the shear stress (A) and viscosity (B).



Considering the relationship between the shear rate and shear stress (Fig. 6A), it is possible to determine that the gel has an initial stress, showing typical behavior of non-Newtonian fluids [34], where it is necessary to add higher stress to overcome this initial stress and the material begins to flow. Also, as the shear rate increases, the shear stress increases non-linearly, typical Herschel-Bulkley gel, which agrees with the literature [34]. This moldable rheological behavior is important for topical application, where the gel needs to be rubbed onto the skin to spread, but it remains intact until no force is added.

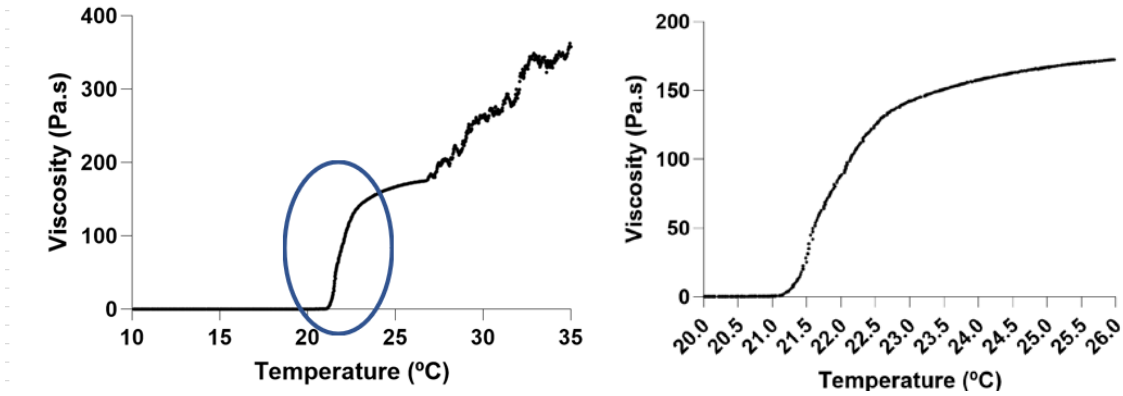
The viscosity of the material is high with low shear levels (Fig. 6B). As the shear rate increases, the viscosity is reduced, tending to zero. In this study, it is

possible to conclude that the sample needs an initial force to start flowing, favoring the topical application. Reducing viscosity when spreading over the skin is also interesting in facilitating drug delivery by the topical route.

Visually, the 16F-PEHG formulation forms a gel at a temperature of 25 ºC. When the formulation is submitted to the rheological test (Fig. 7), it is possible to observe a jump in viscosity increment in a range of 21.5 - 22.5 ºC. This sudden jump indicates the gelation process.

Figure 7: Rheologic behavior of 16F-PEHG formulation at 10-40 ºC with constant shear rate (1 s^{-1}) in correlation with viscosity (A) and detail (zoom) (B)

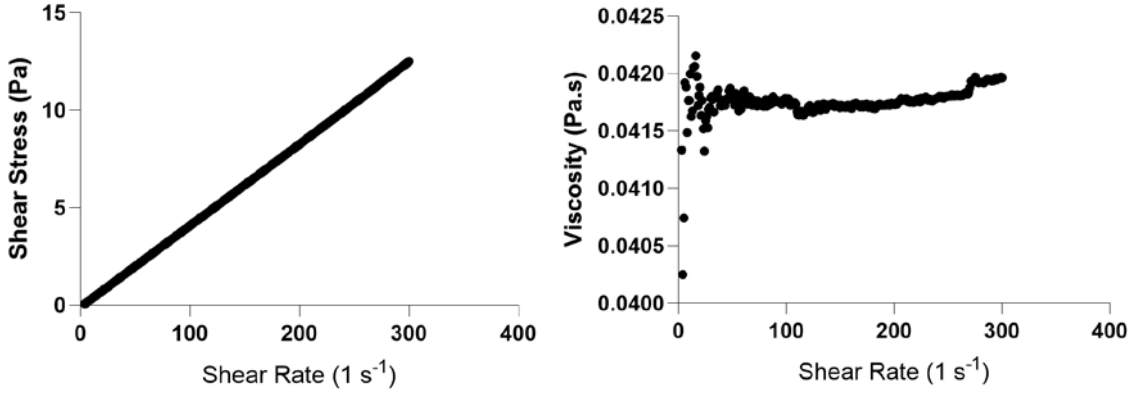
(A) (B)



A linear relationship between the shear rate and shear stress can be observed for formulation 10S-PEHG (Fig. 8A), which is the typical behavior of Newtonian materials. Also, the viscosity was not altered by the increase in the shear force (Fig. 8B), confirming the characteristics of Newtonian fluid [35].

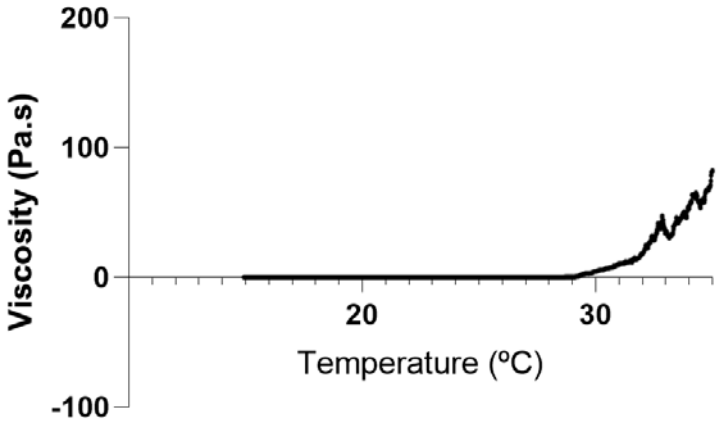
Figure 8: Rheologic behavior of 10S-PEHG formulation at 35 ºC, with shear rate varying 1-300 s^{-1} in correlation with shear stress (A) and viscosity (B).

(A) (B)



The viscosity test displayed an atypical result for formulation 10S-PEHG (Fig. 9). Here, the analysis showed an increase in viscosity close to the viscosity in the formulation of the semi-solid gel. However, visual analysis shows no gel formation up to temperatures above 50 ºC. Neither an increase in viscosity was observed in the sample. Also, in this specific analysis, showing viscosity around 10^2 Pa.s, when removing the sample from the equipment at this same temperature, around 30-35 ºC, it was still possible to observe the fluidity condition. It was hypothesized that the increase in temperature promotes the adhesive action of the material and, therefore, the equipment generates a viscosity result. However, a high adhesion force between sample geometry occurs as the temperature increases, generating tension and resistance to shear movement.

Figure 9: Rheologic behavior of 10S-PEHG formulation in range 15-40 ºC with constant shear rate (1 s^{-1}).



3.5 Texture analysis

At the first moment, the texture analysis aimed to compare the spreadability of the two formulations, 10S-PEHG and 16F-PEHG. To perform a spreadability test, it is necessary to use the TA-SF conical probe (male and female). The analysis is based on the probe descending until it reaches the material up to the trigger force (in our case, 2 g) and, after that, it penetrates the material up to the stipulated distance (1 mm) and the maximum force necessary for penetration occur is considered as spreadability. However, in the analysis of the 10S formulation, the conical probe (male) did not identify the initial flat point of the material, continuing downwards until reaching the base of the female probe. This can be explained by the reduced surface tension and viscosity for the 10S-PEHG formula, making the probe not sensitive enough to detect the fluid. Therefore, the analysis could be performed only in formulation with higher viscosity.

To have a standardized assay and just one protocol to analyze both samples, another probe (TA-DEC flat base) was used to increase the contact area with the material. This probe is usually used to determine firmness values of materials. The firmness parameter can generate insight into the spreading behavior of each formula since a formulation with high firmness has more resistance to spreading and vice-versa [36,37]. Firmness (or hardness) is the force required until the material presents the required deformation. In this analysis, the necessary force that the probe had to add until reaching 1 mm of depth. Adhesiveness is the work required to overcome the attractive forces of surfaces between the sample and the probe.

The 10S-PEHG formulation showed a closer texture to water (Table 8), demonstrating that the 10S-PEHG formula is fluid, making its topical application difficult because it may drip easily. The 16F formulation had an increase in firmness, around 600 g, and it also had higher adhesiveness, around 13 mJ. These results indicate that the 16F-PEHG formulation tends to be more resistant to spreading on the skin. These observations corroborate the results obtained from rheologic studies. The behavior of the 16F-PEHG formulation on the skin will follow that of a semi-solid gel that will remain intact when applied to the skin. By adding spreading

forces, the initial tension of the material is broken, and it begins to flow, followed by a reduction in viscosity and, consequently, becomes more spreadable. This profile does not occur in the 10S-PEHG formulation, as it has no semi-solid characteristic; the material will begin to flow over the skin immediately after application.

Table 8: Firmness and adhesiveness values of water of 10S-PEHG and 16F-PEHG formulation (28.2 ºC ± 0.4).

	Firmness (g)	Adhesiveness (mJ)
Water	23	0.3
10S-PEHG	34.50 ± 1.76	0.43 ± 0.14
16F-PEHG	604.20 ± 87.70	13.28 ± 1.50

A more viscous formulation could be ideal for the topical application in terms of patient convenience, as it ensured better peptide stabilization (Table 5). Due to the gel's rheological behavior, it maintains a firm semi-solid state when applied to the skin, keeping the immobilization of peptide in the core of P407-micelles, but when rubbed, the gel reduces its viscosity and starts to flow, releasing the peptide from it encapsulate state.

4 CONCLUSION

In the optimization step, the buffer type promoted modifications on the $T_{sol \rightarrow gel}$, showing that the acetate saline solution pH 5,0 promoted an increase in the $T_{sol \rightarrow gel}$ compared to phosphate buffer pH 5.8. A more viscous formulation, such as 16F-PEHG, could stabilize the peptide even under critical thermal conditions compared to the formulation of less viscous 10S-PEHG (5 ºC > 8 months; 25 ºC <12 months; and 40 ºC <6 months). This behavior can be explained by reduced peptide mobility combined with a buffered condition increasing the physical-chemical stability. Therefore, regarding formulation characteristics and peptide stability, formulation 16F-PEHG may be promising in carrying the new PnPP19 for topical application for erectile dysfunction treatment.

5 FUNDING SOURCE

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (nº 12/2020 MAI/DAI – Process 403639/2020-4) and the Biozeus Biopharmaceuticals S.A.

6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Professor Dr. C. Petzhold (Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil) for valuable guidance during the rheology analyses and for sharing some of his excellent knowledge. Also, Professor Drª. C. V. de Souza (University of Vale do Taquari, Lajeado, Brazil) for the support during the texture analysis. Finally, Professor Drª. Karina Paese (Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil) for the support during the photostability assays.

7 SUPPLEMENTARY MATERIALS

Figures and Tables named as Sxx.

8 REFERENCES

[1] A. Kessler, S. Sollie, B. Challacombe, K. Briggs, M.V. Hemelrijck, The Global Prevalence of Erectile Dysfunction: A Review, BJU Int. 4 (2019) 587-599, https://doi.org/10.1111/bju.14813.

[2] A. Melman, J.C. Gingell, The Epidemiology and Pathophysiology of Erectile Dysfunction, J. Urol. 161 (1999) 5-11, https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)62045-7.

[3] C.B. Johannes, A.B. Araujo, H.A. Feldman, C.A. Derby, K.P. Kleinman, J.B. McKinlay, Incidence of Erectile Dysfunction in Men 40 to 69 Years Old: Longitudinal Results from the Massachusetts Male Aging study, J. Urol. 163 (2000) 460-463, https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)67900-1.

[4] Is Erectile Dysfunction Common? Stats, Causes and Treatment, Healthline. https://www.healthline.com/health/how-common-is-ed, 2020 (accessed 19 February 2023).

[5] L. Fazio, G. Brock, Erectile Dysfunction: Management Update, CMAJ. 170 (2004) 1429-1437, https://doi.org/10.1503/cmaj.1020049.

[6] J.E. Ferguson III, C.C. Carson III, Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors as a Treatment for Erectile Dysfunction: Current Information and New Horizons, Arab Journal of Urology. 11 (2013) 222-229, https://doi.org/10.1016/j.aju.2013.07.009.

[7] E.G. Boyce, E.M. Umland, Sildenafil Citrate: A therapeutic Update, Clin. Ther. 23 (2001) 2-23, https://doi.org/10.1016/S0149-2918(01)80027-8.

[8] B.G. Schwartz, B.A. Kloner, Drug Interactions with Phosphodiesterase-5 Inhibitors Used for the treatment of Erectile Dysfunction or Pulmonary Hypertension, Circulation. 122 (2010) 88-95, https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.944603.

[9] S.G. Moreira Jr, R.E. Brannigan, A. Spitz, F.J. Orejuela, L.I. Lipshultz, E.D. Kim, Side-Effect Profile of Sildenafil Citrate (Viagra) in Clinical Practice, Urology. 56 (2000) 474-476, https://doi.org/10.1016/S0090-4295(00)00649-X.

[10] M.L. Houchin, E.M. TOPP, Chemical Degradation of Peptides and Proteins in PLGA: A Review of Reactions and Mechanisms, J. Pharm. Sci. 97 (2008) 2395-2404, https://doi.org/10.1002/jps.21176.

[11] L.N. Bell, Peptide Stability in Solids and Solutions, Biotechnology Progress. 13 (1997) 342-346, https://doi.org/10.1021/bp970057y.

[12] Peptide Stability and Potential Degradation Pathways, MERCK. https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/research-and-disease-areas/cell-and-developmental-biology-research/peptide-stability (accessed 12 August 2023).

[13] L.C. Ventura, J.P. Bezerra Neto, Peptídeos Antimicrobianos na Descoberta de Novos Fármacos e Aplicações no Tratamento de Doenças, Agron Science. 4 (2023) 39-54, https://doi.org/10.53934/9786585062046-4.

[14] K. Fosgerau, T. Hoffmann, Peptide Therapeutics: Current Status and Future Directions, Drug Discov. Today. 20 (2015) 122-128, https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003.

[15] J.C.M. BRITO, Peptídeo Antimicrobiano PEGuilado com Potencial Biofármaco para o Tratamento de Pneumonia Causada por *Acinetobacter baumannii*. Programa de Pós-Graduação em Inovação Tecnológica e Biofarmacêutica. Tese de Doutorado. UFMG, 2020.

[16] C.N. da Silva, K.P. Nunes, F.S. Torres, J.S. Cassoli, D.M. Santos, F.M. Almeida, A. Matavel, J.S. Cruz, A.S. Miranda, A.D.C. Nunes, C.H. Castro, R.A.M. Ávila, C.C. Olórtegui, S.S. Láuar, L. Felicori, J.M. Resende, E.R.S. Camargos, M.H. Borges, M.N. Cordeiro, S. Peigneur, M. E. de Lima, PnPP-19, a synthetic and non-toxic peptide designed from a P. nigriventer toxin, potentiates erectile function via NO/cGMP, J. Urol. 194 (2015) 1481-1490, https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.06.081.

[17] C.N. da Silva, K.P. Nunes, L.FN. Dourado, T.O. Vieira, X.M. Mariano, A.S. Cunha, M.E. de Lima. From the PnTx2-6 Toxin to the PnPP-19 Engineered Peptide: Therapeutic Potential in Erectile Dysfunction, Nociception, and Glaucoma, Front. Mol. Biosci. 9 (2022), https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.831823.

[18] C.N. da Silva, R.S. Lomeo, F.S. Torres, M.H. Borges, M.C. Nascimento, M.H.R. Mesquita-Britto, C. Rapôso, A.M.C. Pimenta, M.A. da Cruz-Hofling, D.A. Gomes, M.E. de Lima, 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. 150 (2018) 280-288, https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.073.

[19] F. Bucaretchi, R. Bertani, E.M. de Capitani, S. Hyslop, Envenomation by Wandering Spiders (Genus Phoneutria). In: Gopalakrishnakone, P. (Ed.), Clinical

Toxinology. Toxinology. Springer, Dordrecht. (2017) 1-44, https://doi.org/10.1007/978-94-007-6288-6_63-3.

[20] K.P. Nunes, M.N. Cordeiro, M. Richardson, M.N. Borges, S.O.F. Diniz, V.N. Cardoso, R. Tostes, M.E. de Lima, R.C. Webb, R. Leite, Nitric oxide-induced vasorelation in response to PnTx2-6 toxin from Phoneutria nigriventer spider in rat Cavernosal Tissue. J. Sex. Med. 7 (2010) 3879-3888, https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2010.01978.x.

[21] K.P. Nunes, F.S. Torres, M.H. Borges, A. Matavel, A.M.C. Pimenta, M.E. de Lima, New insights on arthropod toxins that potentiate erectile function, Toxicon, 69 (2013) 152-159, https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.03.017.

[22] A.M. Bodratti, P. Alexandridis, Formulation of Poloxamers for Drug Delivery, J. Funct. Biomater. 9 (2018), https://doi.org/10.3390/jfb9010011.

[23] J.G.V. Wenzel, K.S.S. Balaji, K. Koushik, C. Navarre, S.H. Duran, C.H. Rahe, U.B. Kompella, Pluronic F127 gel formulation of Deslorelin and GnRH Reduce Drug Degradation and Sustain Drug Release and Effect in Cattle. J. Control. Release. 85 (2002) 51-59, https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00271-7.

[24] G. Dumortier, J.L. Grossiord, F. Agnely, J.C. Chaumeil, A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics, Pharm. Res. 23 (2006) 2709-2728, https://doi.org/10.1007/s11095-006-9104-4.

[25] N.K. Pandit, D. Wang, Salts Effects on the Diffusion and Release Rate of Propranolol from Poloxamer 407 gels, Internacional Journal of Pharmaceutics. 167 (1998) 183-189, https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00074-X.

[26] L.C. Salay, E.A. Prazere, N.S.M. Huachaca, M. Lemos, J.P. Piccoli, P.R.S. Sanches, E.M; Cilli, R.S. Santos, E. Feitosa, Molecular Interactions Between Pluronic F127 and the Peptide Tritrpticin in Aqueous Solution, Colloid Polym. Sci. 296 (2018) 809-817, https://doi.org/10.1007/s00396-018-4304-0.

[27] Poloxamer 407. FDA Reports. https://fda.report/UNII/TUF2IVW3M2 (accessed 12 August 2023).

[28] M.N. Sawka, S.N. Cheuvront, R.W. Kenefick, High Skin Temperature and Hypohydration Impair Aerobic Performance, Experimental Physiology. 97 (2012) 327-332, https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.061002.

[29] A. Arellano, S. Santoyo, C. Martin, P. Ygartua, Influence of Propylene Glycol and Isopropyl Myristate on the In Vitro Percutaneous Penetration of Diclofenac Sodium from Carbopol Gels, Eur. J. Pharm. Sci. 7 (1998) 129-135, https://doi.org/10.1016/S0928-0987(98)00010-4.

[30] A.C.S. Akkari, J.Z.B. Papini, G.K. Garcia, M.K.K.D. Franco, L.P. Cavalcanti, A. Gasperini, M.I. Alkschbirs, F. Yokaichyia, E. de Paula, G.R. Tófoli, D.R. de Araujo, Poloxamer 407/188 Binary Thermosensitive Hydrogels as Delivery Systems for Infiltrative Local Anesthesia: Physico-Chemical Characterization and Pharmaceuticals Evaluation, Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 68 (2016) 299-307, https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.088.

[31] H.G. Choi, M.K. Lee, M.H. Kim, C.K. Kim, Effect of Additives on the Physicochemical Properties of Liquid Suppository bases, Int. J. Pharm. 190 (1999) 13-19, https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00225-2.

[32] D.R. Perinelli, M. Cespi, S. Pucciarelli, L. Casettari, G. F. Palmieri, G. Bonacucina, Effect of Phosphate Buffer on the Micellization Processo of Poloxamer 407: Microcalorimetry, Acoustic Spectroscopy and Dynamic Light Scarreting (DLS) Studies, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 436 (2013) 123-129, https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.06.002.

[33] E. Giuliano, D. Paolino, M.C. Cristiano, M. Fresta, D. Cosco, Rutin-Loaded Poloxamer 407-Based Hydrogels for In Situ Administration: Stability Profiles and Rheological Properties, Nanomaterials. 10 (2020), https://doi.org/10.3390/nano10061069.

[34] M. Jalaal, G. Cottrell, N. Balmforth, B. Stoeber, On the Rheology of Pluronic F127 Aqueous Solutions, J. Rheology.61 (2017) 139-146, https://doi.org/10.1122/1.4971992.

[35] E. Baloglu, S.Y. Karavana, Z.A. Senyigit, T. Guneri, Rheological and Mechanical Properties of Poloxamer Mixtures as a Mucoadhesive Gel Base, Pharm. Dev. Technol. 16 (2011) 627-636, https://doi.org/10.3109/10837450.2010.508074.

[36] G.E.D. Tchienou, R.K.T. Tsague, T.F.M. Pega, V. Bama, A. Bamseck, S.D. Sokeng, M.B. Ngassoum, Multi-Reponse Optimization in the Formulation of a Topical Cream from Natural Ingredients, Cosmetics, 5 (2018), https://doi.org/10.3390/cosmetics5010007.

[37] V. Pande, S. Patel, V. Patil, R. Sonawane, Design Expert Assisted Formulation of Topical Bioadheasive Gel of Sertaconazole Nitrate, Adv. Pharm. Bull. 4 (2014) 121-130, http://dx.doi.org/10.5681/apb.2014.019.

[38] J. Puschmann, M.E. Herbig, C.C. Muller-Goymann, Correlation of Antimicrobial Effects of Phenoxyethanol with its Free Concentration in the Water Phase of o/w-emulsion gels, Eur. J. Pharm. Biopharm. 131 (2018) 152-161, https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.08.007.

[39] F.K. Algethami, H.S. AlSalem, M. Gamal, N. Nabil, H.E. Zaazaa, M.A. Ibrahim, A.A. Mandour, Simultaneous Analysis of Flumethasone Pivalate and Clioquinol in the Presence of Phenoxyethanol Preservative in Their Pharmaceuticals Using TLC and UHPLC Methods, Processes. 11 (2023), https://doi.org/10.3390/pr11071888.

[40] U.S. Food and Drug Administration (FDA) Center for Drug Evaluation and Research. Inactive Ingredients Search for Approved Drug Products, 2023. https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/inactive-ingredients-database-download (accessed 18 July 2023).

[41] P. Araujo, Key Aspects of Analytical Method Validation and Linearity Evaluation, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 877 (2009) 2224-2234, https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030.

[42] W. Bierman. The Temperature of the Skin Surface. Jama. 106 (14) (1936) 1158-1162, https://doi.org/10.1001/jama.1936.02770140020007.

[43] M.C. Manning, D.K. Chou, B.M. Murphy, R.W. Payne, D.S. Katayama. Stability of Protein Pharmaceuticals: na update. Pharmaceuticals Research. 27 (4) (2010) 544-575, https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6.

[44] RDC nº 528, 4th august 2021. Available in: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5284308/RDC_528_2021_.pdf/b5f44e81-46ca-4eb5-a5f9-8e84ed067400

4. AVALIAÇÃO DE CONSERVANTES E ANTIOXIDANTES

Como uma complementação da etapa de otimização da formulação, foi realizado um estudo de incorporação de conservantes e antioxidantes e a avaliação das modificações causadas nas características físico-químicas das formulações. Se faz importante a incorporação dessas classes de insumos para proteger a formulação contra a proliferação de fungos e bactérias e, dessa forma, aumentar o tempo de *shelf-life* do produto no mercado. O estudo foi separado em 3 etapas: *I)* seleção dos aditivos e determinação do sistema conservante mais adequado para a formulação otimizada; *II)* estudo de crescimento microbiológico das formulações aprovadas na etapa I; e *III)* ensaio de estabilidade das fórmulas aprovadas na etapa II.

4.1. Seleção dos aditivos

Após os estudos de otimização, a formulação base utilizada para os ensaios foi a 16F, de composição conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Composição da formulação otimizada 16F.

	Composição
16F	16% P407
	15% Propilenoglicol
	69% Tampão Fosfato pH 5,8

Os percentuais de uso de cada aditivos estão conforme a indicação de cada fornecedor e a RDC nº 528 de 4 de agosto de 2021[82] que expressa as máximas concentrações autorizadas para uso de cada conservante e suas limitações. Com isso, conforme a especificidade de cada matéria-prima e a indicação de uso e diferentes faixas de pH, foram avaliados os seguintes conservantes:

[82] RDC nº 528, de 4 de agosto de 2021. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5284308/RDC_528_2021_.pdf/b5f44e81-46ca-4eb5-a5f9-8e84ed067400 (Acesso em 05/11/2023)

I) **Microcare® PEHG (THOR)**[83,84,85] e **Euxyl® PE 9010 (Ashland)** (*phenoxyethanol and ethylhexylglycerin*): *phenoxyethanol* é obtido a partir da reação entre óxido de etileno e fenol [86]. A composição *phenoxyethanol* e *ethylhexylglycerin* é um *blend* de conservantes líquido, miscível em água (0,5-2,67g/100g de água), álcoois e glicóis. *Phenoxyethanol* é um preservante de amplo espectro, particularmente como bactericida em organismos Gram-positivos. Ethylhexylglycerin é capaz de aumentar a atividade antimicrobiana, por meio da redução da tensão interfacial na membrana celular do microorganismo e, ainda, promover eficácia fungicida. Porém, ehtylhexylglycerin tem grande tendência à oxidação e, por isso, é indicado utilizar antioxidantes na composição, principalmente o α-Tocopherol (Vitamina E). O *phenoxyethanol* é inativado por compostos etoxilados, em razão de seu grupo terminal hidroxila estar sujeito a esterificação e oxidação. O *blend* apresenta boa estabilidade na presença de ácidos e álcalis e pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH (3-10). Indicação de uso: 0,50-1,00%.

Considerando que *phenoxyethanol and ethylhexylglycerin* é o *blend* mais utilizado em produtos cosméticos, essa mistura pode ser adquirida de diferentes fornecedores com diferentes proporções entre os ingredientes e o nível de fenol livre. Nesse trabalho, serão utilizadas as duas apresentações acima mencionadas para avaliar se, ao longo dos ensaios, haverá uma diferença nos resultados obtidos.

II) **Microcare® SB**[87] (*Sodium Benzoate and Potassium Sorbate*): *Blend* de sais do ácido benzóico e ácido sórbico. A ação conservante só é efetiva quando no formato de ácidos, enquanto que os sais não apresentam

[83] Catálogo de Produtos do fornecedor Alpha Química. Ano 2020.
[84] Microcare® PEHG, PROSPECTOR. Disponível em: https://www.ulprospector.com/pt/eu/PersonalCare/Detail/118097/5353484/Microcare-PEHG (Acesso em 29/05/2022)
[85] Microcare® PEHG. Summit. Disponível em: https://adonisdrug.com/en/Microcare-PEHG.aspx (Acesso em 29/05/2022).
[86] Conservantes. Revista Cosméticos & Perfumes. Editora Insumos. Disponível em: http://www.insumos.com.br/cosmeticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n%2044.pdf (Acesso em 29/05/2022).
[87] Catálogo de Produtos do fornecedor Alpha Química. Ano 2020.

função. Por isso, esse *blend* precisa estar exposto à uma faixa de pH baixa (<5,5) para que o equilíbrio químico esteja deslocado na forma de ácidos. Apresenta forte atividade fungicida e baixa ação contra bactérias. O ácido sórbico é sensível aos raios UV e sujeito à oxidação de outros componentes, podendo fazer a solução amarelar[88] e, por isso, é orientado utilizar antioxidante na formulação. Indicação de uso: 0,50-1,00%.

III) **SymOcide® PC**[89] (*phenoxyethanol and caprylyl glycol*): Líquido, miscível em álcoois e glicóis. O *caprylyl glycol* potencializa a ação do *phenoxyethanol* contra organismos Gram positivos. Ampla faixa de pH; Indicação de uso: 0,50-1,00%.

IV) **Nipaguard® SCE**[90] (*sorbitan caprylate, 1,3-propenodiol and benzoic acid*): *Blend* de ação sinérgica entre caprilato de sorbitan e ácido benzóico, potencializando a ação antimicrobiana e ainda fungicida. Baixa solubilidade em água (0,05 g/L de água 20ºC). Faixa de pH indicada: 4,00-8,00. Indicação de uso: 0,50-1,50%.

É visto que muitos conservantes apresentam tendências à oxidação e consequente inativação da função. Com isso, decidiu-se adicionar antioxidantes junto à formulação. A ação principal dos antioxidantes é reagir com os radicais livres e, consequentemente, proteger a formulação da degradação de seus componentes. Com isso, diferentes antioxidantes foram avaliados conforme listados abaixo:

[88] Conservantes. Revista Cosméticos & Perfumes. Editora Insumos. Disponível em: http://www.insumos.com.br/cosmeticos_e_perfumes/artigos/conservantes_n%2044.pdf (Acesso em 29/05/2022).
[89] SymOcide® PH, number 510179. Product Information. SYMRISE. Disponível em: http://chemical-centre.com/d/982327/d/symocidepc.pdf (Acesso em 29/05/2022).
[90] Nipaguard® SCE. PROSPECTOR. Disponível em: https://www.ulprospector.com/pt/la/PersonalCare/Detail/2063/326882/Nipaguard-SCE (Acesso em 29/05/2022).

I) **Vitamina E**[91] (*tocopheryl acetate*): Líquido oleoso, completamente imiscível em água. Indicação de uso: 0,1-2%.

II) **Tinogard® TS**[92,93] (*octadecyl di-t-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate*): Antioxidante fenólico, lipofílico, atuando como estabilizador de fase oleosa, evitando o amarelamento da formulação. Indicação de uso: 0,01-0,10%.

III) **Tinogard® TT**[8] (*pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate):* Antioxidante fenólico, lipofílico, completamente insolúvel em água. Indicação de uso: 0,01-0,10%.

IV) **BHT**[94] (*butylated hydroxytoluene*): Composto obtido a partir do 4-metilfenol e do 2-metilpropeno, reação catalisada por ácido sulfúrico. O BHT é insolúvel em água. Indicação de uso: 0,05-0,10%.

V) **Ácido Ferúlico**[95] (*ferulic acid*): Molécula da classe dos ácidos hidroxicinâmicos, presente naturalmente em farelo de arroz e milho. Lipofílico, insolúvel em água. Indicação de uso: 0,1-0,5%.

Com isso, foram desenvolvidas formulações com todas as combinações entre os conservantes e os antioxidantes disponíveis no laboratório, assim como os conservantes isoladamente. Desta forma, pretendeu-se avaliar a alteração da $T_{sol \rightarrow gel}$ e o impacto na característica visual em comparação com a formulação branca, 16F. A Tabela 2 mostra os parâmetros que foram avaliados, como

[91] Catálogo de produtos do fornecedor Embacaps. Ano 2022.
[92] Tinogard® TS. PROSPECTOR. Disponível em: https://www.ulprospector.com/pt/la/PersonalCare/Detail/1960/225763/Tinogard-TS (Acesso em 29/05/2022).
[93] Tinogard® TS. Boletim Técnico. ChemSpecs. Disponível em: https://www.cosmeticsonline.com.br/materia_prima/MP194_TINOGARD%20TS.pdf (Acesso em 29/05/2022).
[94] Antioxidante BHT. Brasile Química. Disponível em: http://www.basilequimica.com.br/produtos/antioxidante-bht/ (Acesso em 29/05/2022).
[95] Ferulic acid. Compound Summary. PubChem CID 445858. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ferulic-acid (Acesso em 29/05/2022).

homogeneidade e aspecto visual da formulação; onde, se ambos parâmetros fossem classificados como “Bom”, mais semelhante essa formulação era em comparação à formulação base 16F. O requisito inicial é de que todos os aditivos, a maioria de natureza lipofílica, necessitam apresentar solubilidade completa nos demais componentes da formulação base. Aqueles que não formaram misturas homogêneas foram automaticamente reprovados. Já as formulações aprovadas quanto ao parâmetro homogeneidade, foram avaliadas conforme o aspecto. Aquelas que apresentassem aspecto translúcido (+) ou opaco (++) foram aprovadas.

Tabela 2 - Parâmetros de avaliação das formulações com aditivos

Parâmetro	Bom (+)	Médio (++)	Ruim (+++)
Homogeneidade	Sim	-	Não
Aspecto	Translúcido	Opaco	Esbranquiçado

As etapas de todo o processo podem ser observadas no fluxograma da Figura 7. Na etapa 1, utilizou-se as concentrações máximas dos aditivos conforme RDC 29. Neste momento, as formulações aprovadas conforme parâmetros estabelecidos na Tabela 2 seguiram para o estudo microbiológicos. As formulações reprovadas nessa etapa, foram reavaliadas em uma etapa 2, utilizando a mínima concentração dos antioxidantes, conforme orientações dos respectivos fabricantes. As formulações aprovadas nesta segunda etapa também seguiram para o estudo microbiológico.

Figura 7 – Esquema das etapas seguidas para o processo de incorporação de aditivos na formulação.



Tabela 3 – Percentual mássico dos conservantes e antioxidantes avaliados.

Conservantes		**Antioxidantes**		
	Concentração (%)		Concentração (%)	
			ETAPA 1	ETAPA 2
Microcare® PEHG	1,00	**Vitamina E**	2,00	0,10
Microcare® SB	1,00	**Tinogard® TS**	0,10	0,01
SymOcice® PC	1,00	**Tinogard® TT**	0,10	0,01
Euxyl® PE 9010	1,00	**BHT**	0,10	0,05
Nipaguard® SCE	1,50	**Ácido Ferúlico**	0,50	0,10

4.1.1. Metodologia da etapa de seleção dos aditivos

A preparação das formulações seguiu o mesmo padrão das formulações mencionadas no artigo científico. Em um tubo cônico de borossilicato, foi pesado o P407 e após adicionado o propilenoglicol. Essa pré-mistura é homogeneizada com o auxílio de uma barra magnética de forma a dispersar o polímero no meio lipofílico. Após, é adicionado o tampão e, logo em seguida os aditivos: conservante e antioxidante, nesta ordem. Os frascos contendo as formulações são fechados e agitados com agitação magnética por 4 horas. Após esse período, a formulação é adicionada na geladeira (4-8 ºC) *overnight* de forma a promover hidratação completa do polímero. Os percentuais mássicos de cada aditivo estão

demonstrados na Tabela 3, já a nomenclatura das formulações preparadas está disposta na Tabela 4 juntamente com os resultados.

Para a determinação da $T_{sol \rightarrow gel}$, as formulações foram adicionadas ao banho-maria, controlando o aumento de temperatura do banho com o auxílio de um termômetro. Observando a movimentação da barra magnética no interior da formulação, no dado momento em que a barra cessa o movimento, ocorre a gelificação da amostra e é anotado a temperatura do banho naquele ponto.

4.1.2. Resultados e discussão da etapa de seleção dos aditivos

Nesta primeira etapa, utilizaram-se as concentrações máximas de cada conservante e antioxidante. Foram realizadas 30 combinações entre os aditivos de modo que cada conservante fosse combinado com cada um dos antioxidantes. As características das formulações foram comparadas com a formulação base 16F (Figura 8), sem conservante ou antioxidante.

Conforme comentado anteriormente, as formulações que não apresentassem homogeneidade seriam automaticamente reprovadas (Tabela 4, Figura 8). Com isso, na 1ª etapa, obteve-se a aprovação de 6 formulações (16F-PEHG, 16F-SB, 16F-SB-FA, 16F-PC, 16F-PE e 16F-SCE). Na 2ª etapa, após a utilização da mínima concentração de antioxidantes das formulações reprovadas na etapa anterior quando se utilizou concentrações máximas dos aditivos, teve-se a aprovação de mais 4 formulações (16F-PEHG-FA, 16F-PC-FA, 16F-PE-FA e 16F-SCE-FA) (Tabela 4 para as nomenclaturas). Ao final das duas etapas de ensaios, 10 formulações atenderam aos requisitos expostos, apresentando homogeneidade e aspecto adequado, conforme formulação base 16F.

Todos. os conservantes se mostraram solúveis/homogêneos no ambiente químico da formulação. A natureza dos antioxidantes avaliados é lipofílica e apenas o ácido ferúlico apresentou solubilidade quando utilizado em sua mínima concentração de orientação do fabricante, enquanto que os demais não tiveram solubilização e por isso foram reprovados do estudo.

Tabela 4 – Resultados das etapas 1 e 2 de seleção dos aditivos.

	ETAPA 1	ETAPA 2	STATUS

	Conservante	Antioxidante	Homog.	Aspecto	Homog.	Aspecto	
16F			H	+			**APROVADO**
16F-PEHG	Microcare® PEHG		H	+			**APROVADO[1]**
16F-PEHG-VITE		Vitamina E	NH		NH		REPROVADO
16F-PEHG-TS		Tinogard® TS	NH		NH		REPROVADO
16F-PEHG-TT		Tinogard® TT	NH		NH		REPROVADO
16F-PEHG-BHT		BHT	NH		NH		REPROVADO
16F-PEHG-FA		Ferulic acid	NH		H	+	**APROVADO[2]**
16F-SB	Microcare® SB		H	+			**APROVADO[1]**
16F-SB-VITE		Vitamina E	NH		NH		REPROVADO
16F-SB-TS		Tinogard® TS	NH		NH		REPROVADO
16F-SB-TT		Tinogard® TT	NH		NH		REPROVADO
16F-SB-BHT		BHT	NH		NH		REPROVADO
16F-SB-FA		Ferulic acid	H	+			**APROVADO[1]**
16F-PC	SymOcide® PC		H	+			**APROVADO[1]**
16F-PC-VITE		Vitamina E	NH		NH		REPROVADO
16F-PC-TS		Tinogard® TS	NH		NH		REPROVADO
16F-PC-TT		Tinogard® TT	NH		NH		REPROVADO
16F-PC-BHT		BHT	NH		NH		REPROVADO
16F-PC-FA		Ferulic acid	NH		H	+	**APROVADO[2]**
16F-PE	Euxyl® PE 9010		H	+			**APROVADO[1]**
16F-PE-VITE		Vitamina E	NH		NH		REPROVADO
16F-PE-TS		Tinogard® TS	NH		NH		REPROVADO
16F-PE-TT		Tinogard® TT	NH		NH		REPROVADO

16F-PE-BHT	Nipaguard® SCE	BHT	NH		NH		REPROVADO
16F-PE-FA		Ferulic acid	NH		H	+	**APROVADO²**
16F-SCE			H	+			**APROVADO¹**
16F-SCE-VITE		Vitamina E	NH		NH		REPROVADO
16F-SCE-TS		Tinogard® TS	NH		NH		REPROVADO
16F-SCE-TT		Tinogard® TT	NH		NH		REPROVADO
16F-SCE-BHT		BHT	NH		NH		REPROVADO
16F-SCE-FA		Ferulic acid	NH		H	+	**APROVADO²**

H = Homogêneo; NH = Não homogêneo; APROVADO[1]: formulação aprovada na Etapa 1 em que se utilizou o máximo permitido dos antioxidantes conforme a Tabela 3; APROVADO[2]: formulação aprovada na Etapa 2 em que se utilizou o máximo permitido dos antioxidantes conforme a Tabela 3.

Figura 8 – Aspectos visuais das formulações, representando os estados de homogeneidade/não-homogenidade e translúcido/opaco/esbranquiçado.



Formulação homogênea, translúcida | Formulação não homogênea e opaca | Formulação não homogênea e esbranquiçada

Todas as formulações aprovadas na primeira etapa foram avaliadas em termos da $T_{sol \rightarrow gel}$ e esse valor comparado a formulação base 16F (Tabela 5). Conforme já foi observado e discutido na etapa de otimização da formulação, a

adição do conservante Microcare® PEHG promoveu uma redução da $T_{sol \rightarrow gel}$. Comportamento similar ocorreu também com os demais conservantes, com exceção da formulação 16F-SB que contém o conservante Microcare® SB, o qual parece não ter modificado a $T_{sol \rightarrow gel}$. Além disso, a adição do ácido ferúlico no meio promoveu um aumento da $T_{sol \rightarrow gel}$ em todas as formulações. É sugerido que a molécula orgânica interaja com as micelas de P407, dificultando a organização em formato de rede, aumentando a energia necessária para formar gel.

Tabela 5 – $T_{sol \rightarrow gel}$ das formulações sem peptídeo aprovadas na etapa de seleção do sistema conservante.

Formulação	Conservante	Antioxidante	$T_{sol \rightarrow gel}$ (ºC)
16F	-	-	23
16F-PEHG	Microcare® PEHG	-	20
16F-PEHG-FA	Microcare® PEHG	Ácido ferúlico	24
16F-SB	Microcare® SB	-	23
16F-SB-FA	Microcare® SB	Ácido ferúlico	25
16F-PC	SymOcide® PC	-	22
16F-PC-FA	SymOcide® PC	Ácido ferúlico	24
16F-PE	Euxyl® PE 9010	-	20
16F-PE-FA	Euxyl® PE 9010	Ácido ferúlico	23
16F-SCE	Nipaguard® SCE	-	22
16F-SCE-FA	Nipaguard® SCE	Ácido ferúlico	24

4.2. Estudo microbiológico

Com a finalização da etapa de estudo de incorporação de aditivos e seleção de 11 formulações (incluindo a base 16F), iniciou-se a etapa de análises microbiológicas. A eficiência dos sistemas conservantes na formulação base 16F

contra a proliferação de bactérias e fungos foi avaliada seguindo-se os protocolos e procedimentos da Farmacopeia Brasileira[96] .

4.2.1. Metodologia do estudo microbiológico

O procedimento inicia com o preparo de solução salina 0,9% e dos meios de cultura Ágar Tryptic Soy (Merck®) e Ágar Sabouraud (Merck®). Conforme instruções do rótulo de cada meio, Ágar Tryptic Soy suspender 40 g L^{-1} e Ágar Sabouraud suspender 65 g/L, ambos sistemas foram autoclavados por 15 min a 121ºC. As placas de Petri foram preparas adicionando-se, separadamente, de 15 mL a 20 mL de Agar Tryptic Soy (TSA) e Ágar Sabouraud (SBA), deixando solidificar. Aguardou-se a secagem das placas. As amostras foram preparadas adicionando-se uma alíquota de 1000 µL da formulação à 9 mL de solução salina que está contida em um tubo de ensaio (essa é a primeira diluição, ou diluição -1). A partir dessa amostra realizou-se a diluição seriada em 5 (cinco) novas amostras. Essas amostras foram adicionadas às placas conforme o *Método de Superfície*, padrão ou em escala reduzida.

4.2.1.1. Método de superfície padrão

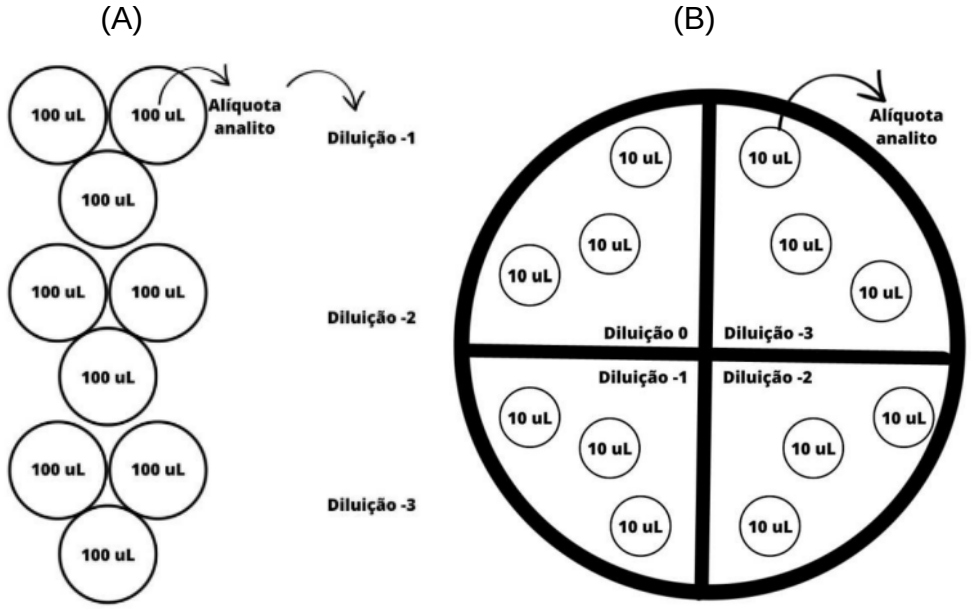
Uma alíquota de 100 µL de amostra foi pipetada sobre o meio de cultura. Devem ser feitas triplicatas da análise, portanto, para cada uma das seis diluições preparou-se três placas (Figura 9.A), espalhando a alíquota na placa com auxílio de alça de drigalski. Esse método foi utilizado apenas no teste piloto realizado para a determinação do fator de diluição que seria empregado.

4.2.1.2. Método de superfície em escala reduzida

[96] Farmacopeia Brasileira, Volume I. 6ª edição, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/VOLUME1FB6at2Erratappdfcomcapa.pdf (Acesso em 05/11/2023)

O Método da Superfície em escala reduzida (Figura 9.B) utiliza quadrantes em uma única placa e as triplicatas feitas por gotas contendo 10 µL do analito. Utilizando o Método de Superfície em escala reduzida, além da utilização de menos materiais e reagentes, otimiza-se também o tempo de preparo das análises, melhora-se a visualização dos resultados e diminui-se o potencial de contaminação externa, já que neste caso não se utiliza alça de drigalski. Esse método foi empregado para todas as análises microbiológicas realizadas, exceto para o teste piloto. Nesse método, utilizaram-se as diluições 0, -1, -2 e -3.

Figura 9 – Esquema das diluições seriadas no método de superfície padrão (A) e em escala reduzida (B).



4.2.1.3. Incubação e contagem de colônias

As placas foram incubadas conforme a Farmacopeia Brasileira[97]. As placas contendo TSA a 37 °C e as placas contendo SBA a 35 °C. Para o teste piloto, realizado para a determinação do fator de diluição, ambas as placas foram

[97] Farmacopeia Brasileira, Volume I. 6ª edição, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:https://www2.fcfar.unesp.br/Home/Instituicao/Departamentos/principiosativosnaturaisetoxicologianovo/farmacognosia/farmacopeia-6-edicao.pdf (Acesso em 17/08/2023)

incubadas durante 15 dias para determinação do número de microrganismos aeróbicos totais e bolores e leveduras e o comportamento de crescimento dos microrganismos. Para as demais amostras a incubação das placas contendo TSA a 37 °C foi realizada por três dias e as placas contendo SBA a 35 °C por 5 dias.

Para o método de superfície padrão, utilizou-se a equação padrão (*Equação 1*) para calcular o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama ou mL da amostra.

$$UFC/g\ ou\ mL = \left(\frac{Nº\ de\ colônias\ contadas}{fator\ de\ diluição}\right) x\ 10 \qquad \textbf{Equação 1}$$

Para o método de superfície em escala reduzida, utilizou-se a equação *Equação 2* para calcular o número UFC por grama ou mL da amostra.

$$UFC/g\ ou\ mL = \left(\frac{Nº\ de\ colônias\ contadas}{fator\ de\ diluição}\right) x\ 100 \qquad \textbf{Equação 2}$$

4.2.2. Resultados e discussão do estudo microbiológico

Inicialmente, realizou-se um teste piloto visando determinar o fator de diluição com o objetivo de obter a melhor visualização dos fungos e bactérias, para contagem das colônias (Tabela 6A e 6B). Para esse teste preliminar, foi utilizada a formulação branca 16F, sem presença de conservantes e antioxidantes. O teste piloto foi realizado utilizando o Método de superfície padrão.

Tabela 6A – Resultado do teste piloto para visualização das colônias de bactérias.

Bactérias		
Diluição -1	Diluição -3	Diluição -6

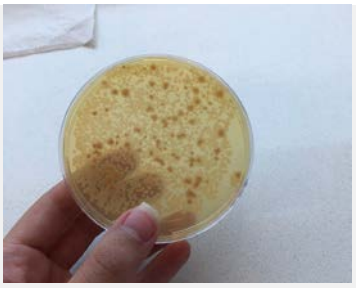
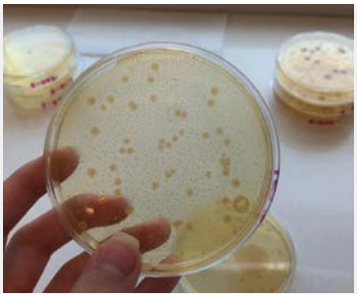
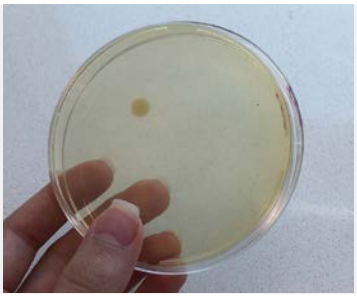
		
Resultado		
$3,4x10^5$ UFC/g		

Tabela 6B – Resultado do teste piloto para visualização das colônias de fungos.

Fungos		
Diluição -1	Diluição -3	Diluição -6
		
Resultado		
$7,6x10^5$ UFC/g		

Ao final do teste piloto o fator de diluição 10^{-3} se mostrou sendo a diluição com melhor visualização das colônias formadas, em relação às outras seis diluições realizadas, tanto para fungos quanto para bactérias. Comparando o resultado com as diluições 10^{-1} onde o crescimento das colônias foi elevado e a diluição 10^{-6} com crescimento foi escasso, a diluição 10^{-3} demonstrou o crescimento microbiológico ideal para realizar a contagem das colônias e foi selecionada para a continuidade dos experimentos.

Tendo definido o fator de diluição que apresenta os resultados de forma legível, o estudo de desempenho contra o crescimento microbiológico pode ser realizado de forma mais conveniente, considerando que três diluições em vez de seis tornam a realização do estudo mais enxuta.

Como parâmetro de qualidade da formulação utilizou-se a RDC Nº 752[98] de 19 de setembro de 2022, que regulamenta produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Conforme a normativa, capítulo V, art. 30, os parâmetros para controle microbiológico de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes classificados como "Tipo I" – que incluem os produtos que entram em contato com mucosas são: contagem de microrganismos mesófilos totais aeróbios: não mais que $1x10^2$ UFC/g, em que o limite máximo igual a $5x10^2$ UFC/g. Além disso, para que o resultado seja considerado representativo, segundo a Farmacopeia Brasileira[12] para produtos acabados de origem sintética ou biológica para uso tópico ou para uso vaginal, a contagem total de bactérias aeróbias UFC/g ou mL deve ser no máximo de $1x10^2$ e a contagem total de fungos UFC/g ou mL deve ser no máximo de 10. Porém, é aceitável um resultado duas vezes o valor de especificação em virtude da variabilidade maior de execução dos testes para determinação da biocarga, mas quando estes valores são encontrados com frequência, é necessário rever o processo produtivo. Assim para 10 UFC o valor máximo aceitável = 20 e para $1x10^2$ UFC o valor máximo aceitável = $2x10^2$.

Tabela 7 – Resultados das análises microbiológicas.

Formulação	Contagem Bactérias (UFC/g)	Contagem Fungos (UFC/g)	Status
16F	$1,0x10^5$	$1,3x10^5$	Reprovado
16F-PEHG	$9,0x10^4$	$1,8x10^6$	Reprovado
16F-PEHG-FA	$1,1x10^4$	$3,5x10^3$	Reprovado
16F-SB	$7,0x10^4$	$8,0x10^4$	Reprovado
16F-SB-FA	$2,7x10^4$	$4,0x10^2$	Reprovado
16F-PC	$1,2x10^4$	$2,6x10^5$	Reprovado
16F-PC-FA	$8,0x10^2$	$2,0x10^3$	Reprovado
16F-PE	$7,0x10^4$	$3,3x10^5$	Reprovado
16F-PE-FA	$9,0x10^5$	$6,0x10^3$	Reprovado
16F-SCE	sem crescimento	sem crescimento	**Aprovado**
16F-SCE-FA	sem crescimento	sem crescimento	**Aprovado**

[98] RDC nº 752, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5738443/RDC_752_2022_.pdf/66ee0d82-4641-441b-b807-109106495027 (acesso em 18/08/2023)

Ao final das análises, considerando o limite de crescimento de bactérias e fungos indicados tanto pela Farmacopeia Brasileira como na RDC Nº 752, as formulações aprovadas foram 16F-SCE e 16F-SCE-FA (Tabela 7). Ambas as contêm Nipaguard® SCE na composição. Esse é o único conservante avaliado que a legislação permite uma concentração de 1,5% (Tabela 3), e isso pode ter influenciado positivamente nos resultados.

O estudo microbiológico apresentou algumas limitações em sua realização, como a impossibilidade de uso de uma formulação esterilizada, pois seria necessário um estudo prévio para desenvolver uma metodologia adequada de esterilização ou da formulação ou dos componentes individuais; ou ainda o preparo das formulações em ambiente certificado para boas práticas de fabricação (BPF) e com o uso de componentes obtidos em grau também BPF.

Como próxima etapa, o peptídeo foi adicionado às formulações 16F-SCE e 16F-SCE-FA e essas foram submetidas ao estudo de estabilidade por 3 meses. Visando verificar se os aditivos incorporados à formulação, além de protegerem a formulação contra o crescimento de microrganismos terão influência na estabilidade do fármaco dentro da formulação.

4.3. Estudo de estabilidade das formulações aprovadas

De forma a compreender se os aditivos apresentam melhora ou piora na estabilidade peptídica, as formulações aprovadas no ensaio microbiológico (16F-SCE e 16F-SCE-FA) foram mantidas à 25 e 40 ºC por 3 meses e seus resultados foram comparados com 10S-PEHG e 16F-PEHG no mesmo período. As composições de cada formulação estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Composição das formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA avaliadas em estabilidade após avaliação do crescimento microbiológico.

ID	Solução Salina de Acetato pH 5,0 (%)	Tampão fosfato pH 5.8 (%)	Propilenoglicol (%)	Poloxamer 407 (%)	Microcare® PEHG (%)	Nipaguard® SCE (%)	Ácido Ferúlico (%)
10S-PEHG	40,8		30	10	0,8		
16F-PEHG		68,2	15	16	0,8		
16F-SCE		67,5	15	16		1,5	
16F-SCE-FA		67,4	15	16		1,5	0,1

4.3.1. Estabilidade peptídica à 25 ºC

A diferença na degradação das formulações avaliadas pode ser observada na Tabela 9 e na Figura 10. Nesta condição de temperatura, a única formulação que apresentou diferença estatística (Tabela 10) entre as demais é a fórmula 16F-PEHG, em que o peptídeo teve degradação inferior à 10%; enquanto as demais se apresentaram na faixa entre 15-20%. Surpreendentemente, ao adicionar o conservante Nipaguard® SCE na formulação de base 16F, ocorreu um aumento de degradação do peptídeo no mesmo nível que a formulação 10S-PEHG.

Tabela 9 – Degradação percentual do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA mantidas por 3 meses à 25 ºC.

Formulação	**Degradação** (Média ± DP)
16F-SCE	19,44% ± 3,32
16F-SCE-FA	17,33% ± 2,01
10S-PEHG*	16,63% ± 3,68
16F-PEHG*	9,01% ± 1,85

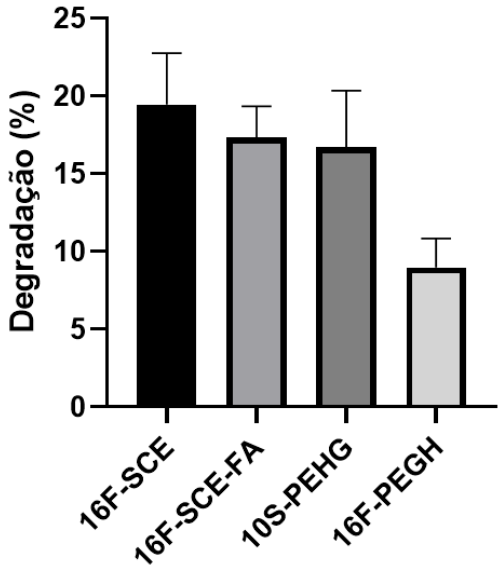
*Resultados já apresentados no Tópico 3, artigo científico. Esses resultados estão apresentados novamente aqui para fins de comparação.

Tabela 10 – ANOVA *one way* com múltiplas comparações utilizando teste *post-hoc* de *Tukey* para os resultados de degradação do peptídeo após 3 meses de estudo de estabilidade à 25 ºC.

Comparação		*p*-valor ajustado
16F-SCE	**16F-SCE-FA**	0,8811
	10S-PEHG*	0,6550
	16F-PEHG	**0,0037**
16F-SCE-FA	**10S-PEHG**	0,9927
	16F-PEHG	**0,0177**

*Resultado já apresentado no Tópico 3, artigo científico. Esses resultados estão apresentados novamente aqui para fins de comparação.

Figura 10 – Gráfico de barras de degradação percentual do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA mantidas por 3 meses à 25 ºC.



4.3.2. Estabilidade peptídica à 40 ºC

Já os resultados à 40 ºC (Tabela 11 e Figura 11) mostram relações diferentes dos que observados no ensaio à 25 ºC. Nesta condição, as formulações de mesma base, isto é, 16F-SCE, 16F-SCE-FA e 16F-PEHG apresentaram o mesmo nível de

degradação (Tabela 12), entre 30-40%. Aqui, a formulação que teve seu comportamento destoando das demais foi a 10S-PEHG, que apresentou a maior degradação por volta de 70%. Aqui pôde-se observar novamente que a formulação de maior viscosidade, de base 16F, apresentou uma estabilização melhorada possivelmente por meio da redução da mobilidade peptídica no meio.

Tabela 11 – Degradação percentual do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA mantidas por 3 meses à 40 ºC.

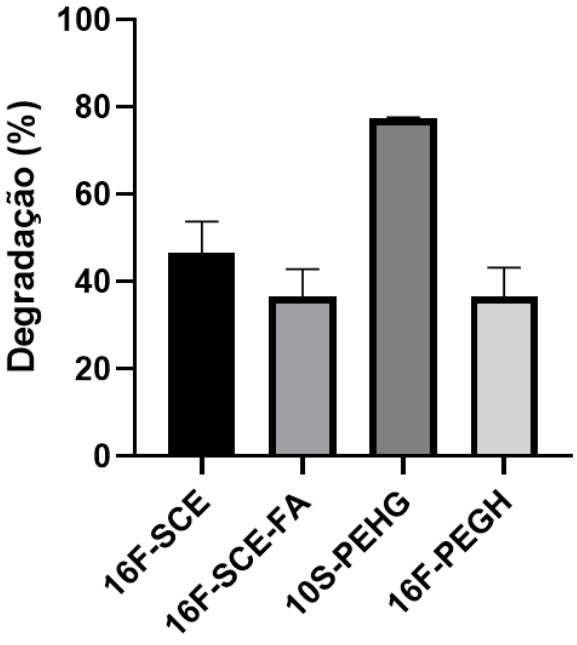
ID	**Degradação** (Média ± DP)
16F-SCE	46,64% ± 7,16
16F-SCE-FA	36,51% ± 6,41
10S-PEHG*	77,34% ± 3,27
16F-PEHG*	36,51% ± 6,72

*Resultados já apresentados no Tópico 3, artigo científico. Esses resultados estão apresentados novamente aqui para fins de comparação.

Tabela 12 – ANOVA *one way* com múltiplas comparações utilizando teste *post-hoc* de *Tukey* para os resultados de degradação do peptídeo após 3 meses de estudo de estabilidade à 40ºC.

Comparação		***p*-valor ajustado**
16F-SCE	**15FC5O5**	0,3442
	1HC1	**0,0036**
	15FC1	0,2816
16F-SCE-FA	**1HC1**	**0,0008**
	15FC1	1,0000

Figura 11 – Gráfico de barras de degradação percentual do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 16F-PEHG, 16F-SCE e 16F-SCE-FA mantidas por 3 meses à 40 ºC.



Ao final do estudo, foi possível concluir que o conservante utilizado até então, Microcare® PEHG (*Phenoxyethanol e Ethylhexylglycerin*) não se mostrou efetivo contra o crescimento microbiano. Dito isso, o único conservante que apresentou resultados positivos em termos da avaliação microbiológica foi o Nipaguard® SCE e, este em combinação com o antioxidante ácido ferúlico em formulações, foram avaliados em ensaio da estabilidade do peptídeo por 3 meses a 25 ºC e 40 ºC. Como resultado foi visto que na condição de 25 ºC ambas as formulações apresentaram estabilidade semelhante à formulação 10S-PEHG, enquanto a fórmula com o Microcare® PEHG (16F-PEHG) seguiu apresentando os melhores dados de estabilidade peptídica nessa temperatura. Já à 40ºC, a tendência se inverte, mostrando que nessa condição, as formulações 16F-SCE e 16F-SCE-FA apresentaram, estatisticamente, a mesma estabilidade que a formulação 16F-PEHG que contém o Microcare® PEHG. Importante deixar registrado que temporalmente os ensaios apresentados nesse tópico 4 foram realizados após os ensaios do tópico terem iniciado. Portanto, o uso do Microcare® PEHG no tópico 3 justifica-se por ser um conservante bastante empregado na indústria.

5. ENSAIO DE FOTODEGRADAÇÃO PEPTÍDICA

Considerando a estrutura primária do peptídeo e conforme o detalhamento apresentado na introdução dos mecanismos de degradação que as estruturas peptídicas estariam suscetíveis, é possível determinar as porções mais sensíveis (Figura 12) e, assim, obter *insights* acerca de como que esteja ocorrendo a degradação peptídica.

Figura 12 – Estrutura primária do peptídeo BZ371A e as possíveis regiões de reações degradativas.

Ac-Gly-Glu-Arg-Arg-Gln-Tyr-Phe-Trp-Ile-Ala-Trp-Tyr-Lys-Leu-Ala-Asn-Ser-Lys-Lys-NH_2

Observando a estrutura da Figura 12, em rosa e vermelho são destacados os aminoácidos mais suscetíveis à fotodegradação. Especialmente o aminoácido em vermelho (Triptofano - Trp), pode ser facilmente fotoexcitado em comprimentos de onda acima de 300 nm, levando à redução das ligações dissulfeto. Essa reação leva à perda da bioatividade e alteração de cor do produto[99]. Além disso, essa primeira reação leva à uma decomposição em cadeia, levando à agregação dos resíduos, que pode ser observada visualmente pela formação de turbidez na formulação[100].

Com isso, conhecendo a estrutura do peptídeo, realizou-se um estudo de fotodegradação com diferentes formulações com o objetivo de compreender se a composição da formulação apresenta influência na fotossensibilidade.

[99] MANNING, Mark C. *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Reserach**, v. 27, n. 4, p. 544-575, abr/2010.
[100] MANNING, Mark C. *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Reserach**, v. 27, n. 4, p. 544-575, abr/2010.

5.1. Metodologia do estudo de fotodegradação

As formulações que foram utilizadas para este estudo são as mesmas que já vêm sendo estudadas dos ensaios anteriores (Tabela 13). Aqui tem-se o objetivo de avaliar se a modificação do tampão é capaz de evitar ou retardar as reações em cadeia que ocorrem após a primeira quebra da ligação de sulfeto após a incidência de luz. Além disso, objetivou-se avaliar se a redução da mobilidade da matriz, isto é, uma formulação de maior viscosidade, também seria capaz de retardar as reações mencionadas.

Tabela 13 – Composição das formulações avaliadas no ensaio de fotodegradação.

ID	Solução Salina de Acetato pH 5,0 (%)	Tampão Fosfato pH 5,8 (%)	Propilenoglicol (%)	Poloxamer 407 (%)	Microcare® PEHG (%)
10S-PEHG	59,2		30,0	10,0	0,8
10S-PEHG		59,2	30,0	10,0	0,8
16F-PEHG		68,2	15,0	16,0	0,8

Com isso, cada formulação foi avaliada de duas formas: *I)* Com proteção UV; *II)* Sem proteção UV. A proteção diz respeito à colocação de papel alumínio ao redor do frasco contendo a amostra, de modo a refletir a radiação. Todas as amostras foram incubadas em câmara UVA/UVB (Fonte UVA (95%) + UVB (5%)) por 96 h. Após esse período, as amostras foram analisadas em HPLC-DAD utilizando a mesma metodologia analítica previamente validada.

5.2. Resultados e discussão do estudo de fotodegradação

Conforme os resultados observados (Tabela 14 e Figura 13), é possível concluir que o peptídeo apresenta sensibilidade à luz. Com 96h de incubação, as formulações sem proteção apresentaram degradação percentual do peptídeo entre 30-60%, enquanto as mesmas formulações com adição da proteção apresentaram degradação do peptídeo de aproximadamente 0-3%. Esse resultado sugere que, conforme comentado no início desse tópico, os repetidos resíduos de aminoácido triptofano estejam influenciando a degradação devido à sua facilidade em se fotoexcitar e promover o posterior rompimento das ligações de sulfeto. Além disso, visualmente observou-se que as formulações 10S-PEHG apresentaram uma mudança na coloração, também indicativo de degradação. Entretanto, uma análise mais detalhada do mecanismo de degradação seria possível apenas com uso de técnicas mais elaboradas, como por exemplo, a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa.

Observando os resultados sem proteção, de forma a discutir a respeito da influência de cada formulação na degradação peptídica, observou-se que a alteração do tampão parece ter influenciado positivamente. A formulação 10F-PEHG (31,92% ± 2,65) apresentou resultado de degradação peptídica estatisticamente inferior à formulação 10S-PEHG (59,06% ± 8,99) (p=0,0098, Tabela 15). A hipótese de que a redução da mobilidade peptídica poderia incrementar a fotoestabilidade não se confirmou. A formulação 16F-PEHG (40,81% ± 8,71) não apresentou diferença estatística em relação à formulação com o mesmo tampão, mas com maior fluidez 10F-PEHG (31,92% ± 2,65) (p=0,3663).

Ao adicionar proteção UV (cobrir com papel alumínio) às formulações, todas apresentam o mesmo comportamento de degradação, ficando na faixa de 0-3% de degradação do peptídeo após 96 h. Neste caso, também houve uma diferença estatística entre as fórmulas 10F-PEHG e 10S-PEHG (p=0,0227) decorrente do uso do tampão fosfato ao invés do ajuste do pH com ácido clorídrico.

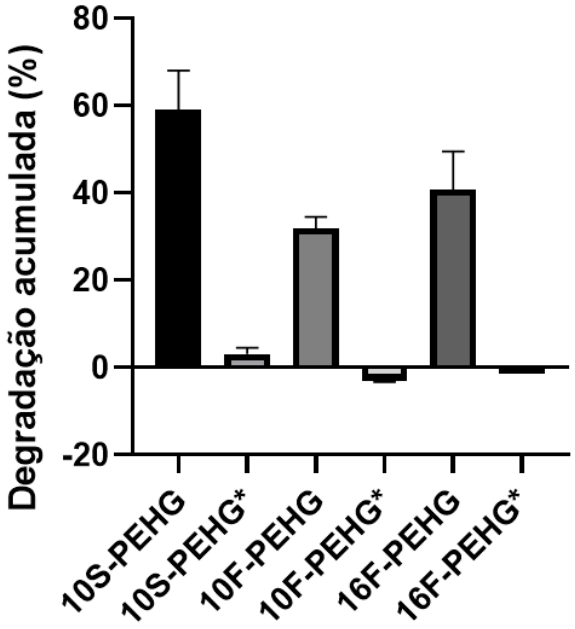
Tabela 14 – Resultados de degradação do peptídeo nas formulações 10S-PEHG, 10F-PEHG e 16F-PEHG após 96 h de incubação em câmera UVA/UVB.

ID	Sem proteção (%)	Com proteção (%)
10S-PEHG	59,06% ± 8,99	3,11% ± 1,46
10F-PEHG	31,92% ± 2,65	0,00% ± 3,18
16F-PEHG	40,81% ± 8,71	0,72% ± 2,30

Tabela 15 – ANOVA *one way* com múltiplas comparações utilizando teste *post-hoc* de *Tukey* com os grupos após 96 h em câmara UVA/UVB.

Comparação		Sem proteção *p*-valor	Com proteção *p*-valor
10S-PEHG	**10F-PEHG**	**0,0098**	**0,0227**
10S-PEHG	**16F-PEHG**	0,0527	0,0919
10F-PEHG	**16F-PEHG**	0,3663	0,5789

Figura 13 – Gráfico de barras de degradação do peptídeo sem proteção e com proteção (*) das formulações 10S-PEHG, 10F-PEHG e 16F-PEHG após 96h em câmara UVA/UVB.


Degradação acumulada (%)
80
60
40
20
0
-20
10S-PEHG
10S-PEHG*
10F-PEHG
10F-PEHG*
16F-PEHG
16F-PEHG*

6. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho teve-se como objetivos principal otimizar uma formulação preliminar de propriedade da empresa Biozeus (10S) de forma a melhorar a estabilidade físico-química do peptídeo bem como a viscosidade a fim de facilitar a aplicação tópica, visto que a formulação prévia apresenta alta fluidez e característica pegajosa, o que dificulta a proposta de aplicação. Para atingir esse objetivo, foi necessária uma otimização da formulação seguido de estudo de estabilidade, incorporando-se o peptídeo em formulações classificadas como promissoras.

Na etapa de otimização da formulação, foi possível entender de que forma a $T_{sol \rightarrow gel}$ pode ser modulada conforme a composição. Aumentando-se a concentração de P407, ocorre uma redução da $T_{sol \rightarrow gel}$, efeito previamente observado e discutido na literatura[101]. Também, foi avaliado o efeito da presença do polímero P188, de forma a entender se as micelas formadas a partir do sistema binário P407/P188 promoveriam uma estabilização melhorada do peptídeo. Foi observado que a presença do P188 promoveu um aumento da $T_{sol \rightarrow gel}$, provavelmente influenciada pela modificação na formação micelar[102].

A presença do propilenoglicol, além de representar a parte lipofílica da formulação e atuar como solvente para os demais insumos lipofílicos, também demonstrou ter o efeito de modificar a $T_{sol \rightarrow gel.}$ O aumento da concentração de propilenoglicol resultou em um aumento da $T_{sol \rightarrow gel}$, que pode ser explicado pela ligação de H com os grupamentos polares do P407 o que dificulta a formação micelar[103].

---

[101] DUMORTIER, Gilles, *et al*. A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. **Phamarceutical Research**, v. 23, n. 12, p.2709-2728, dez/2006.
[102] AKKARI, Alessandra C. S. *et al.* Poloxamer 407/188 Binary Thermosensitive Hydrogels as Delivery Systems for Infiltrative Local Anesthesia: Physico-Chemical Characterization and Pharmaceuticals Evaluation, **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 1, n. 68, p.299-307, nov/2016.
[103] CHOI, Han-Gon; LEE, Mi-Kyung; KIM, Moon-Hee; KIM, Chong-Kook. Effect of Additives on the Physicochemical Properties of Liquid Supposito bases**. International Journal of Pharmaceutical**, v. 190, n. 1, p. 13-19, nov/1999.

A presença de tampão na formulação é importante por diversos aspectos, principalmente estabilizar a estrutura tridimensional do peptídeo e por promover uma uniformidade de cargas iônicas no meio, evitando as reações degradativas que ocorrem nas cadeiras laterais do peptídeo[104]. Foi visto que a alteração do tipo de tampão promoveu uma alteração na $T_{sol \rightarrow gel}$, em que o tampão fosfato apresentou uma $T_{sol \rightarrow gel}$ inferior ao tampão acetato, causado pela presença de íons PO_4^{-3} que promove efeito *salting-out*[105], reduzindo a interação água-P407, reduzindo assim a $T_{sol \rightarrow gel.}$

Por fim, foi avaliado a influência da incorporação de diferentes conservantes e antioxidantes na formulação base 16F. Considerando a $T_{sol \rightarrow gel}$ da formulação base aproximadamente 23 ºC (sem o peptídeo), todos os demais conservantes avaliados apresentaram redução dessa temperatura de transição, enquanto que o antioxidante ácido ferúlico, único que foi solúvel na formulação, apresentou um leve aumento (+ 1-2 ºC).

Em termos da caracterização reológica da formulação de base de polímero P407, esta apresenta dois estados: solução e gel. Após ensaios reológicos, foi possível determinar que a formulação 10S-PEHG, que apresenta o estado de solução à 35 ºC, tem um comportamento Newtoniano. Já a formulação 16F-PEHG, que apresenta o estado gel nesta mesma temperatura, teve um comportamento não-Newtoniano à temperatura de 35 ºC, podendo ser classificada como um gel viscoplástico de Herschel-Bulkley, conclusão que está em concordância com a literatura[106]. Essa característica se faz importante considerando a aplicação tópica, em que a formulação se manterá imóvel na pele até que seja adicionada uma força que ultrapasse a tensão inicial de repouso da formulação. Neste momento, a formulação reduz a viscosidade e passa a escoar/espalhar com facilidade.

---

[104] BELL, Leonard N. Peptide Stability in Solids and Solutions, **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 4, p. 342-346, set/2008.

[105] 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.

[106] JALAAL, Maziyar; *et al*. On the Rheology of Pluronic F127 Aqueous Solutions, **Journal of Rheology**, v. 61, p.139-146, jan/2017.

Além disso, essa característica é importante pois modifica a forma de liberação dos fármacos. Quando em estágio de gel, com elevada viscosidade, o fármaco no interior da rede de gel fica retido, tendo um perfil de liberação lento. Após a aplicação da força e redução da viscosidade, o fármaco é liberado para o tecido de forma facilitada para promover a ação requerida[107]. Assim, é possível modificar a taxa de liberação do fármaco. Contudo, essa avaliação não foi realizada nesse trabalho e necessita ser realizada experimentalmente para confirmação da aplicação dos dados da literatura à formulação 16F-PEHG.

A partir do conhecimento adquirido acerca da influência de cada componente da formulação e seu efeito na $T_{sol \rightarrow gel}$, foi possível desenvolver algumas formulações que foram correspondentes aos parâmetros de consistência e $T_{sol \rightarrow gel}$ requeridas. As formulações foram mantidas a 5, 25 e 40 ºC de forma a avaliar o comportamento do peptídeo em termos das diferentes temperaturas e da composição das formulações, principalmente no que tange os tampões utilizados e a consistência da formulação.

Durante os ensaios à 25 ºC, foi possível ter diversas conclusões. A primeira delas é que a presença do tampão é imprescindível para a estabilização do peptídeo. O tampão fosfato pH 5,8, além de promover uma estabilização conformacional do peptídeo e, evitando a agregação[108], não apresenta nenhum residual de cheiro desagradável, o que ocorre nas formulações com tampão acetato pH 5,0. Também, a uniformidade de carga provinda do tampão também parece ser essencial para a estabilização. Visto que, ao comparar-se formulações de mesma base com tampão fosfato pH 5,8 e com solução salina de acetato pH 5,0 (14F-PEHG vs. 14S-PEHG e 16F-PEHG vs. 16S-PEHG) as formulações com tampão fosfato pH 5,8 apresentaram degradações do peptídeo estatisticamente inferiores após 4 meses até 12 meses de ensaio de estabilidade. A próxima conclusão é que pequenas modificações na formulação, considerando as fórmulas 14F-PEHG, 16F-PEHG e 17F-PEHG pode melhorar a estabilidade nos primeiros meses de

[107] 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.
[108] MANNING, Mark C. *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Reserach**, v. 27, n. 4, p. 544-575, abr/2010.

acompanhamento, mostrando que fórmulas mais viscosas apresentam menores níveis de degradação do peptídeo. Esse resultado corrobora com o fato de que a redução da mobilidade peptídica, resultado de fórmulas mais viscosas e com $T_{sol \rightarrow gel}$ inferiores, pode influenciar positivamente na estabilidade do peptídeo.

Outro resultado interessante é visto ao comparar as fórmulas 10S-PEHG e 16F-PEHG até 12 meses de estabilidade. Aqui, observou-se que até 9 meses as formulações apresentam diferença no perfil de degradação, porém, após esse período não existe diferença estatística (p=0,0856). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a formulação otimizada promove uma modificação na cinética de degradação do peptídeo nos primeiros meses, porém com o passar dos meses, ambas as formulações atingem o mesmo nível de teor de peptídeo íntegro.

Entretanto, quando se analisa os resultados de estabilidade dessas mesmas formulações à 5 ºC, é observado o contrário do estudo à 25 ºC. Nos primeiros meses não existiu diferença estatística entre as formulações 10S-PEHG e 16F-PEHG e, após isso, elas passaram a apresentar efeito distinto, em que a 16F-PEHG apresentou menor degradação peptídica até 8 meses (máximo período analisado).

Já na condição a 40 ºC, condição em que a desnaturação é favorecida[109], a formulação 10S-PEHG apresentou degradação do peptídeo na casa dos 50% já no primeiro mês de avaliação e atingiu 90% após 6 meses. Já a fórmula otimizada, nos mesmos períodos, apresentou 15% e 72% de degradação do peptídeo; mostrando que, formulações mais viscosas, promovem uma estabilização peptídica mais favorável. Essa tendência já foi mencionada na literatura, por ocorrer uma redução da mobilidade do peptídeo no meio[110]. Essa diferença é significativa até 5 meses (p=0,0019), após isso, ambas as formulações apresentam teor de peptídeo íntegro estatisticamente igual (p=0,1183).

Com isso, ao comparar o comportamento de ambas as formulações (10S-PEHG e 16F-PEHG) nas 3 condições de armazenamento, foi possível concluir que à 25 e 40 ºC existe uma melhoria na estabilidade até 9 e 5 meses, respectivamente.

---

[109] MANNING, Mark C. *et al.* Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Reserach**, v. 27, n. 4, p. 544-575, abr/2010.
[110] CONSTANTINO, Henry R.; PIKAL, Michael J. **Lyophilization of Biopharmaceuticals** 1ª ed. AAPS Press. Arlington, VA: p. 443-479. 2004.

Após esse período, ambas as formulações apresentam estatisticamente a mesma degradação. Já na condição a 5 ºC, após 3 meses, a formulação 16F-PEHG apresenta estabilidade duradoura. Neste sentido, ao comparar os parâmetros de estabilidade requeridos, observa-se que para o período de 12 meses, a formulação otimizada 16F-PEHG foi aprovada nas condições de 25 ºC e 5 ºC, enquanto apresenta bons resultados para a condição de 40 ºC.

A análise de fotoestabilidade mostrou que o peptídeo apresenta sensibilidade à luz UVA/UVB. Observou-se uma elevada taxa de degradação peptídica que foi atingida em formulações sem proteção (entre 30-60% após 96h) comparada com as amostras protegidas (0-3%). Ao avaliar a diferenças entre as formulações que não foram protegidas, é visto que a fórmula 10F-PEHG apresentou melhor estabilidade em relação à 10S-PEHG, tanto na condição protegida dos raios UVA/UVB com papel alumínio (p=0,0227) quanto da condição de exposição completa (p=0,0098). Novamente, a explicação pode ser atribuída ao fato do emprego do tampão fosfato com pH 5,8 ao invés do ácido clorídrico como modulador de pH. Ainda assim, a melhora de estabilidade promovida pelo tampão não foi suficiente e, por causa disso, é imprescindível que o produto final seja apresentado com uma embalagem primária com proteção UV.

O ensaio microbiológico mostrou que o conservante Microcare® PEHG, que foi utilizado durante os ensaios de estabilidade anteriores não se mostrou um sistema adequado para o controle de crescimento microbiológico nas condições avaliadas. Os sistemas com o conservante Nipaguard® SCE, composto por ácido benzóico e caprilato de sorbitano, com e sem antioxidante ácido ferúlico (16F-SCE e 16F-SCE-FA, respectivamente) mostrou-se mais efetivo em termos das análises de crescimento bacteriano e fúngico realizadas.

Por fim, a análise de estabilidade mostrou que, com 3 meses nas condições a 25 ºC, as formulações 16F-SCE e 16F-SCE-FA apresentaram o mesmo perfil de degradação da formulação 10S-PEHG. Já na condição à 40 ºC, ambas as fórmulas apresentaram o mesmo perfil que 16F-PEHG. Esse resultado mostrou que a alteração do conservante promoveu uma modificação na cinética de degradação dependendo da temperatura.

7. CONCLUSÃO GERAL

Foi possível desenvolver uma formulação dentro de parâmetros de consistência e $T_{sol \rightarrow gel}$ definidos no início do projeto em conjunto com a empresa parceira Biozeus. A formulação base otimizada denominada de 16F contém tampão fosfato pH 5,8 e elevada viscosidade quando comparada à formulação padrão denominada de 10S, o que acaba por facilitar a aplicação sobre a pele. A fórmula 16F-PEHG foi capaz de promover uma estabilização físico-química do peptídeo em todas as condições avaliadas, 5, 25 e 40 ºC quando comparada com a formulação 10S-PEHG, que não apresenta transição para gel e não tem tampão em sua composição. Também, o peptídeo apresenta característica fotossensível à fonte UVA/UVB que pôde ser reduzida por meio adição de tampão fosfato pH 5.8 no meio. Uma embalagem adequada que permita a fotoproteção da formulação pode ser uma alternativa para a comercialização da formulação otimizada 16F-PEHG. Com a inclusão de insumos com finalidade de proteção na formulação otimizada, é visto que o melhor sistema conservante contém Nipaguard® SCE, com e sem o antioxidante ácido ferúlico. Por fim, o trabalho como um todo apresentou resultados e informações relevantes de formulações de gel e comportamentos do peptídeo em diferentes bases, aumentando o nível de conhecimento técnico sobre esse novo peptídeo promissor que virá a ser comercializado como uma alternativa inovadora para o tratamento da disfunção erétil.

8. PERSPECTIVAS

Como etapas futuras deste trabalho, tem-se a determinação dos produtos de degradação após exposição do peptídeo em diferentes condições, de forma a conseguir identificar, caracterizar e quantificar os resíduos que podem ser gerados durante o processo produtivo e de estoque. Além disso, objetiva-se compreender se os resíduos gerados em cada tipo de exposição (temperatura, radiação UV, ambiente ácido/básico, dentre outros) promovem a formação de diferentes produtos de degradação, de forma a identificar as porções peptídicas sensíveis às modificações em cada uma dessas condições.

Após identificar que a formulação otimizada apresentou os mesmos níveis de degradação peptídica após 12 meses a 25 ºC, viu-se a necessidade de promover uma maior proteção do peptídeo em relação ao ambiente rico em água. Pretende-se proceder o nanoencapsulamento do peptídeo, de forma a incrementar a estabilidade à médio e longo prazo.

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 Biociências do Programa de Pós-Graduação em Biociências pela mesma insituição. Principais interesses: desenvolvimento de hidrogéis para aplicação tópica de fármacos, nanoencapsulamento lipídica 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 BIOCIÊNCIAS.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Porto Alegre, Brasil
Título: Encapsulamento da Biomolécula BZ371A para aplicações terapêuticas
Orientador: Tanira Alesssandra Silveira Aguirre
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 - DOCILE

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.

Producão

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: Univerdade 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.