



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS

ÁCIDO KÓJICO EM HIDROGÉIS POLIMÉRICOS-PROTEICOS COMO MATRIZES PARA APLICAÇÕES TÓPICAS

Projeto de pesquisa a ser desenvolvido junto ao Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC, apresentado à PROPES para solicitação de bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

O ácido kójico (AK) é um metabólito secundário produzido por fungos e bactérias, que ao realizarem a fermentação aeróbica, utilizam os carboidratos como substrato, sendo aplicado em várias áreas, como alimentícia, industrial, agrícola, de cosméticos e da saúde. O AK apresenta propriedades biológicas conhecidas como a capacidade de inibição da produção da tirosinase e, conseqüentemente, de melanina, auxiliando no tratamento de hiperpigmentações. Além disso, outro mecanismo molecular de ação desse bioativo envolve a inibição de vias intracelulares associadas à progressão da inflamação, tornando-o uma molécula promissora para aplicações no tratamento de dermatoses inflamatórias, considerando investigações anteriores que discutiram sua utilização no tratamento de inflamações intestinais. Vale ressaltar ainda, a possibilidade de integração do eixo intestino-pele, envolvido em muitas patologias inflamatórias, o que ressalta futuras investigações nesse campo. Nesse sentido, a abordagem tecnológica desta proposta refere-se ao desenvolvimento de diferentes formulações de hidrogéis a partir de componentes obtidos por rotas biotecnológicas, desde o bioativo, AK, produzido por fungos, às matrizes formadoras de géis, como polímeros e proteínas. Especificamente, em relação às matrizes-gel produzidas, essa proposta visa a obtenção de sistemas coloidais capazes de reter grandes quantidades de água e incorporar moléculas hidrofílicas como o AK, além de apresentarem propriedades bioadesivas e mecânicas adequadas à aplicação tópica. Outros fatores a serem ressaltados envolvem as propriedades farmacológicas inerentes aos componentes da matriz-gel, como cicatrizantes e antiinflamatórios, o que destaca a possibilidade de ações sinérgicas entre os componentes da formulação final.

SANTO ANDRÉ - SP

2022

1. Introdução

A Biotecnologia se tornou uma nova fonte de moléculas bioativas com origem a partir de seres vivos, como animais e plantas, denominados biofármacos. Esses compostos apresentam várias vantagens no tratamento de doenças crônicas com alta segurança e menos efeitos colaterais (ALBRECHT; RHODEN; PAMPHILE, 2015). Esses produtos biofarmacêuticos, como o ácido kójico, objeto de estudo desta proposta, apresentam vantagens, como biocompatibilidade, biodisponibilidade, biodegradação, baixa toxicidade e alta eficiência (SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019).

O ácido kójico (AK) é um metabólito secundário produzido por fungos, principalmente, e bactérias, que ao realizarem a fermentação aeróbica, utilizam os carboidratos como substrato, sendo aplicado em várias áreas, como alimentícia, industrial, agrícola, de cosméticos e da saúde (SILVA, 2011, p.16). O gênero *Aspergillus* é o mais importante, incluindo as espécies que tem melhor desempenho na produção do AK, como *A. flavus*, *A. niger*, *A. tamarii*, *A. parasiticus* e *A. oryzae* (CORRER, 2005; SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2018). Os fungos do gênero *Aspergillus* se reproduzem por pequenos esporos, os quais são facilmente transportados pelo ar; são aeróbicos, vivendo em ambientes ricos em oxigênio. Crescem em restos de alimentos, como pão e batata, por exemplo, e em plantas e grandes árvores e são reconhecidos como microrganismos seguros (*Generally Recognized as Safe- GRAS*) (SILVA, 2011, p.24).

A estrutura do ácido kójico é apresentada na figura 1, recebendo o nome, de acordo com a IUPAC, de 5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona (C₆H₆O₄) (SILVA, 2011, p.18 e 20). Consiste em um composto hidrofílico, devido aos seus dois grupos funcionais hidroxilas, que “atuam como agentes quelantes para íons de metais de transição, por exemplo, Cu²⁺ e Fe³⁺” (GONÇALEZ; CORRÊA; CHORILLI, 2013). Destaca-se pelas suas amplas aplicações com capacidade de clarear a pele, agir contra o envelhecimento, protegendo-a dos efeitos perigosos da radiação UV, ser antioxidante, agindo até contra o escurecimento de alimentos, além de ser anticâncer, antidiabético, anti-inflamatório e inibir a proliferação de microrganismos (SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019; KHEZRI et al., 2021).

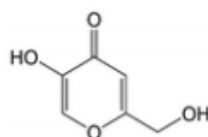


Figura 1- estrutura química do ácido kójico (CORRER, 2005)

O ácido kójico é muito conhecido devido a sua capacidade de inibição da produção da tirosinase, resultando na não formação de melanina, produzida pelos melanócitos. Dessa forma, o uso

desse composto auxilia no tratamento de hiperpigmentações, como o melasma (SILVA, 2011, p.22). A tirosinase consiste em uma enzima que realiza o processo de hidroxilação da tirosina em diidroxifenilalanina, seguida pela oxidação avançada de DOPA em DOPA quinona (processo apresentado na figura 2). A tirosinase contém íons de cobre no seu sitio ativo – ativados na presença de UV-, os quais são capturados pelo ácido kójico, devido a sua propriedade quelante, fazendo com que essa enzima não seja ativada. Isso impede com que seja produzida mais melanina na presença de luz solar (SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019).

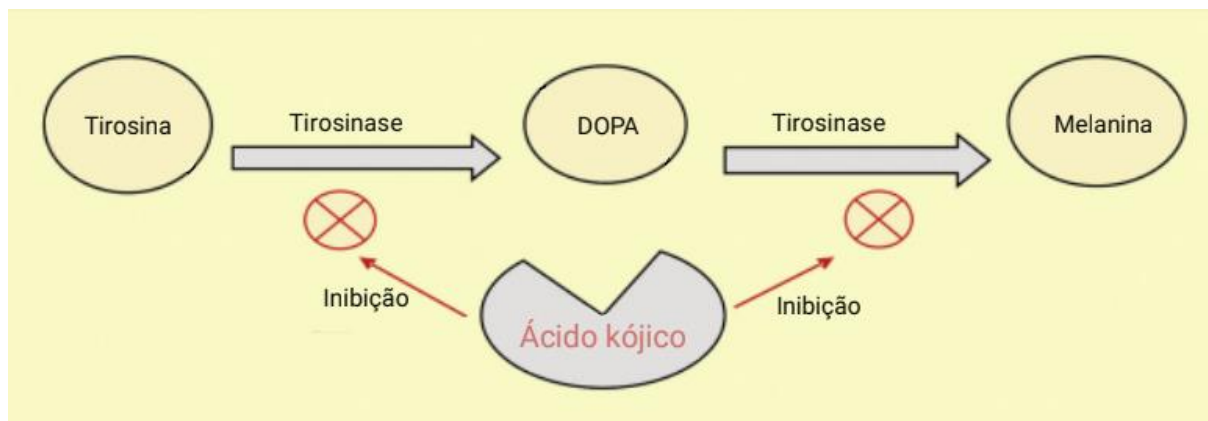


Figura 2 – inibição da atuação da enzima tirosinase pelo ácido kójico (adaptado de SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019).

Por mais que o ácido kójico apresente uma alta eficiência, existe uma tendência desse composto sofrer degradação devido a fatores externos, como, temperatura (não suportando temperaturas acima de 40°C), pH e não ser indicado seu contato direto com a luz, podendo sofrer fotodegradação (FAIG et al., 2017; OLIVEIRA; ANDRADE; SANTOS, 2021). Por esse motivo, é de extrema importância o desenvolvimento de sistemas que possam estabilizar a molécula e protegê-la da degradação, por exemplo, a incorporação em nanocarreadores (FAIG et al., 2017). Os sistemas nanocarreadores, além de proteger a molécula bioativa de fatores externos, que induzem a degradação da molécula, e serem biocompatíveis, podem modular a permeação cutânea, tornando-a contínua e controlada, como apontado nos estudos publicados por Afifah et al. (2018), Faig et al. (2017), Gonzalez et al., (2013), Khezri et al. (2020, 2021).

As nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) têm sido bastante empregadas na liberação de fármacos, com destaque para moléculas hidrofóbicas, mostrando resultados promissores, principalmente na aplicação tópica. Especificamente para o AK, os sistemas de SLNs a base de monoestearato de glicerila e colesterol, aumentaram a eficiência de encapsulação do AK, além da presença de lipídeos nas SLNs permitirem uma absorção celular mais eficiente (KHEZRI et al., 2020).

Mais recentemente, Khezri et al. (2021), desenvolveram sistemas de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs), que foram formulados para remover algumas limitações da SLNs, como instabilidade físico-química e expulsão de conteúdo encapsulado, devido a transição de fases do núcleo lipídico. Os resultados foram similares à aplicação de AK nas SLNs, entretanto, notou-se também um maior poder antioxidante e um maior acúmulo de AK quando comparado ao bioativo não encapsulado.

Outras nanotecnologias aplicadas no transporte e potencialização dos efeitos do AK e seus derivados, como o éster monooleato kójico (KMO) e o dipalmitato kójico (KDP), foram os sistemas de cristais líquidos (LCS) (GONÇALEZ; CORRÊA; CHORILLI, 2013), emulsões do tipo óleo em água (O/W) (AFIFAH et al., 2018) e as emulsões múltiplas (MEs) (GONÇALEZ et al., 2015) – nesse caso, foi utilizado o método de dispersão água da fase oleosa em água (W/O/W). Além de nanocarreadores lipídicos, há ainda as nanopartículas poliméricas, como aquelas sintetizadas por Faig et al. (2017) a base de poli(carbonato-ésteres) e poliésteres.

Dos LCS estudados Gonzalez, Corrêa e Chorilli (2013), destacou-se a composição 30% óleo, 50% surfactante e 20% água, a qual apresentou maior bioadesão para uso tópico, além de melhorar permeação de KA. Afifah et al. (2018) analisaram o transporte de KMO pela nanoemulsão de óleo em água, produzindo a uma formulação que penetra bem na pele, com boa estabilidade e pouca toxicidade, concluindo-se que pode ser usado em produtos cosméticos de uso tópico. Com semelhantes resultados, foi desenvolvido o carregamento de KDP por W/O/W, em que se obteve um aumento do efeito de KDP e uma boa bioadesão (GONÇALEZ et al., 2015).

Já sobre os nanocarreadores poliméricos, houve a incorporação com sucesso de KA em carreadores poliméricos, com liberação controlada nas condições da pele e melhoramento da atividade de inibição da produção de melanina (FAIG et al., 2017).

Outros sistemas muito utilizados para aplicação na pele, são os hidrogéis. Os hidrogéis, por definição, são estruturas poliméricas formadas por redes tridimensionais, com alta capacidade de absorver grandes quantidades de água, sem dissolver-se nesse solvente, sendo formados por redes de reticulação polimérica (SHARMA; TIWARI, 2020). Sua capacidade de absorver grandes quantidades de água se deve a grupos hidrofílicos presentes em sua estrutura, como, por exemplo, os grupos hidroxila (-OH) (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008) (Figura 3).

Esses sistemas apresentam vantagens, como, a biocompatibilidade, a baixa toxicidade, além de induzirem a regenerar tecidos, além de aumentarem o tempo de vida útil do bioativo e poderem ser usados como matrizes para crescimento de tecidos biológicos. Além dessas aplicações, hidrogéis são utilizados na entrega de fármaco e na aplicação mais eficaz de dosagens determinadas, e apresentam

boas propriedades de umectação, absorção, e os líquidos, apresentando elasticidade em temperaturas específicas e alta biocompatibilidade (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

Os sistemas de hidrogéis podem ser classificados de duas formas: sistemas controlados por tempo ou de liberação induzida por estímulos, sendo física ou quimicamente estruturados. Os hidrogéis sensíveis à temperatura, denominados termossensíveis, são estimulados pela temperatura no local da aplicação, realizando o processo de conversão contínua entre estruturas supramoleculares altamente organizadas de acordo com mudanças da temperatura do ambiente, e são promissora e aplicados na área farmacêutica (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Outros sistemas promissores são aqueles reticulados pela interação eletrostática entre os polímeros, enquanto as reações de condensação formam hidrogéis quimicamente reticulados (SHARMA; TIWARI, 2020).

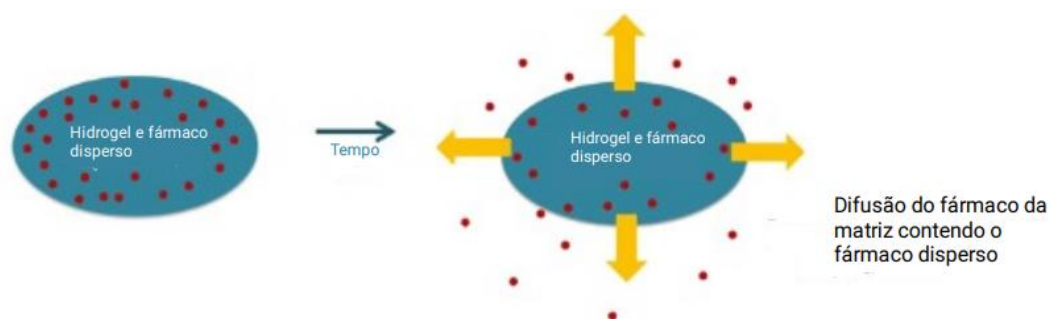


Figura 3- liberação de fármaco devido ao tempo em sistemas de matriz de hidrogel (adaptado de CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015).

Devido a adequada viscosidade e propriedades reológicas, essas matrizes são capazes de manter o bioativo em contato com área de aplicação na pele, além de promover hidratação e proteção da área lesionada. Esse sistema possui a capacidade de direcionar o bioativo para o local desejado, possibilitando uma atuação local (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Estudos recentes têm descrito a aplicação de diferentes compostos capazes de formar géis, dentre esses, aqueles de origem natural como a sericina (SER) e a quitosana (QUI).

A sericina (SER), cuja estrutura química é apresentada na figura 4, é uma proteína que compõe a fibra produzida pelo bicho-da-seda (*Bombyx mori*), altamente hidrofílica, com características adesivas. Essa biomolécula é aplicada em produtos cosméticos para a pele devido a algumas propriedades, por exemplo, a biocompatibilidade, biodegradabilidade e molhabilidade, além de ser anticoagulante e antioxidante, cicatrizante, sendo útil em produtos farmacêuticos (BARAJAS-GAMBOA et al, 2016). Essa proteína vem ganhando destaque como nanocarreador, tendo um papel importante para a liberação controlada de moléculas bioativas e quando se necessita de incremento nas

propriedades bioadesivas. Isso se deve as suas propriedades, apresentadas anteriormente, que permitem uma alta porcentagem de encapsulamento, liberação controlada da molécula e baixa citotoxicidade (SUKTHAM; KOOBKOKKRUD; WUTIKHUN; SURASSMO, 2018). Com grupos amino e carboxila, esse biopolímero apresenta carga negativa, além de ser capaz de reverter a carga superficial por meio da mudança de pH do meio. Por exemplo, suas nanopartículas têm sua carga superficial convertida de negativa para positiva em meios levemente ácidos, o que gera o aumento da captação celular, sendo resultado do aumento da razão amino/carboxila. Dessa forma, essa mudança de carga da nanopartícula de SER compõe um dos mecanismos de liberação de moléculas, sendo sensível ao pH (HU et al., 2017).

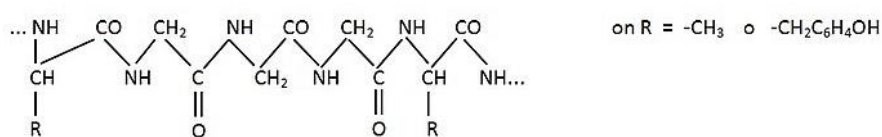


Figura 4- estrutura da proteína sericina (SER) por Mayer e Maric (2008) (apud SILVA, 2019, p.9).

Outro composto importante, é a quitosana (QUI) (figura 5), um carboidrato que vem sendo utilizado como biomaterial para liberação controlada e direcionada de bioativos, devido as suas propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, bactericida e boa adesão celular, além de ser anti-inflamatório e cicatrizante (PANKONGADISAK; SUWANTONG, 2018; BRAGA, 2019). É formada por meio da reação de desacetilação da quitina em meio alcalino, a qual é extraída de exoesqueleto de crustáceos e insetos. A QUI possui caráter hidrofílico permitindo seu uso na forma de nanopartículas e gel, sendo carregada positivamente, o que permite sua interação com polímeros carregados negativamente, como é o caso da sericina, citada anteriormente, o que favorece a difusão do fármaco pelo mecanismo de liberação. Esse biopolímero já foi usado com fármacos analgésico e anti-inflamatórios, melhorando a biodisponibilidade e potencializando a atividade desses compostos (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Além disso, esse carboidrato apresenta capacidade bioadesiva, sendo uma característica de vantagem para seu uso em produtos tópicos (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

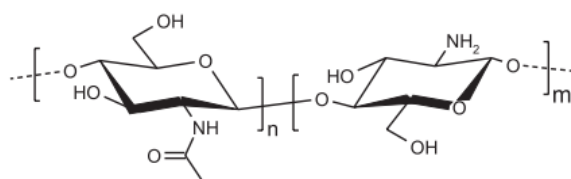


Figura 5 – estrutura química quitosana (QUI) (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A SER e a QUI são capazes de compor a matriz polimérica de hidrogéis. A adição de SER resulta em uma mais rápida degradação do hidrogel de QUI (PANKONGADISAK; SUWANTONG, 2018). Devido à carga negativa da SER, pela presença de grupos carboxila, e a carga positiva da QUI, formada por grupos amino, criam-se forças eletrostáticas entre os dois polímeros (hidrogel reticulado), formando uma matriz com interações intermoleculares que foram géis sem a utilização de solventes orgânicos, reduzindo o potencial tóxico da formulação final que será aplicada na pele (HU et al., 2017).

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo um sistema complexo com várias camadas, incluindo a epiderme, a derme e o estrato córneo, o qual é seletivo e permeável para determinadas drogas, permitindo uma rota de grande destaque para o carregamento de bioativos (SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019). Em situações normais, as células da pele são justapostas, formando uma barreira biológica, por esse motivo é tão importante os estudos de compostos que sejam mais bem absorvidos por esse órgão. Em uma situação de inflamação desse tecido, formam-se grandes espaços intercelulares, permitindo o acúmulo de fluido. Essa inflamação na pele é denominada dermatite, existindo quatro tipos principais: atópica, alérgica de contato, irritativa de contato, e seborreica (EMANUEL; HAWARDEN, 2018).

A dermatite atópica (DA) é uma doença crônica e hereditária, também nomeada eczema (EMANUEL; HAWARDEN, 2018). Causada por fatores endógenos, começa na infância, podendo também estar associada a outras doenças, como asma e rinite alérgica (ORMEROD; WHITE, 1984). A DA é caracterizada por lesões de eczema e pruriginosas (coceira), sendo mais comum em regiões urbanas, devido às altas concentrações de poluição (FERREIRA et al., 2014).

Já a dermatite de contato (DC) se divide em dois tipos principais: alérgica e irritativa. A primeira é resultado do contato com substâncias que causam reações de hipersensibilidade, como produtos de uso tópico, consistindo em uma forma subaguda pruriginosa e eritematosa, mais leve, sem a presença de vesículas (FERREIRA et al., 2014). Segundo Ormerod e White (1984), “se a dermatite se tornar crônica a pele ficará seca e escamosa com espessamento e lesões características”. Já a dermatite irritativa de contato “é uma erupção cutânea que ocorre como resultado do contato com substâncias que podem irritar a pele”, como óleos, sabonetes, solventes e detergentes (EMANUEL; HAWARDEN, 2018; ORMEROD; WHITE, 1984). Essa dermatite se caracteriza por lesões delimitadas (FERREIRA et al., 2014).

Por último, a dermatite seborreica, geralmente afeta áreas oleosas, como o couro cabeludo, costas e zona T do rosto. Caracteriza-se por manchas escamosas e caspa persistente (EMANUEL;

HAWARDEN, 2018). Ocorre devido a uma nítida influência hormonal, “geralmente associada à produção elevada de sebo em decorrência do fungo *Malassezia sp.*” (FERREIRA et al., 2014).

Em termos de mecanismos moleculares, a transcrição do complexo proteico NF-kB está relacionado a doenças, como o câncer, além estar associado a doenças autoimunes e inflamatórias (MA et al., 2011). O AK, em estudos realizados por Moon et al. (2001), apresentou potencial de inibir a atividade celular do NF-kB (apud SAEEDI; ESLAMIFAR; KHEZRI, 2019). Essa interrupção da atividade proteica na célula também foi verificada por Narawak et al. (2008), em que foram analisados os efeitos do AK sobre a expressão proteica em células, relacionadas com o melanoma maligno humano, para avaliar sua propriedade anticarcinogênica.

Em estudos realizados por Li et al. (2021), experimentos comprovaram o que o AK e seus derivados atuavam inibindo a expressão de mRNA de quatro citocinas, produzidas pelos macrófagos 264.7, ademais promoviam a expressão de IL-4, uma citocina que age como anti-inflamatório. Essas análises foram aplicadas no tratamento da colite induzida em camundongos, obtendo-se resultados positivos e melhores que fármacos convencionais, como a mesalazina, mostrando que o composto em questão pode ser aplicado no tratamento de doenças inflamatórias.

Em um estudo realizado com ratos e camundongos, o uso oral de AK resultou na formação de adenomas na tireoide, além de, mesmo com o uso tópico, apresentou-se um risco de genotoxicidade (NARAWAKA et al., 2008). Saeedi, Eslamifar e Khezri (2019) apontam para a necessidade dessa molécula ser administrada a uma concentração de 1%, pois concentrações mais altas resultaram reações adversas, como dermatites, irritação na pele, queimação pelo sol em peles sensíveis e câncer em peles danificadas. Dessa forma, a concentração e a formulação devem ser consideradas para controlar a permeação cutânea de AK, favorecendo a permanência desse composto no local de aplicação e evitando ações sistêmicas (GONÇALEZ; CORRÊA; CHORILLI, 2013).

2. Justificativa e Objetivos

A via tópica oferece inúmeras vantagens quando comparada às vias tradicionais, pois promove liberação local sustentada, minimiza efeitos do metabolismo de primeira passagem, possibilita o uso de moléculas com meia-vida curta e janela terapêutica estreita, pode veicular fármacos de baixa solubilidade oral, fácil aplicação e alta aceitação pelos pacientes. Contudo, a complexidade da pele como barreira biológica, devido a sua constituição do estrato córneo, é um fator limitante à terapia tópica. Por outro lado, a ruptura da barreira cutânea é caracterizada pelo aumento dos níveis de pH cutâneo, perda da água transepidérmica, redução da hidratação epidérmica, bem como síntese e liberação de citocinas inflamatórias, evidenciando o quadro clínico de dermatoses inflamatórias crônicas. Em vista das alterações morfofuncionais cutâneas complexas, ressalta-se a necessidade de avaliar a efetividade de diferentes moléculas, como o ácido kójico (AK), e desenvolver novas estratégias terapêuticas, desde as etapas iniciais do desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, como preparo e caracterização físico-química, até suas aplicações em modelos *in vitro*.

Com relação ao AK, seu mecanismo molecular de ação antiinflamatória, inibindo a transcrição do gene que codifica a NF- κ B, bem como sua atividade, associado à redução da expressão de citocinas inflamatórias enquanto promove a expressão de IL-4 (antiinflamatória), torna essa molécula promissora para aplicações no tratamento de dermatoses inflamatórias, considerando investigações anteriores que discutiram sua utilização no tratamento de inflamações intestinais. Vale ressaltar ainda, a possibilidade de integração do eixo intestino-pele, envolvido em muitas patologias inflamatórias, o que ressalta futuras investigações nesse campo.

Nesse sentido, a abordagem tecnológica desta proposta refere-se ao desenvolvimento de diferentes formulações de hidrogéis a partir de componentes obtidos por rotas biotecnológicas, desde o bioativo, AK, produzido por fungos, às matrizes formadoras de géis, como SER (obtida a partir do casulo do bicho da seda) e QUI (obtida de crustáceos). Especificamente em relação às matrizes-gel produzidas, essa proposta visa a obtenção de sistemas coloidais formados a partir de interações eletrostáticas entre SER e QUI, polímeros hidrofílicos capazes de reter grandes quantidades de água e incorporar moléculas hidrofílicas como o AK, além de apresentarem propriedades bioadesivas e mecânicas adequadas à aplicação na pele. Outros fatores a serem ressaltados envolvem as propriedades farmacológicas inerentes aos componentes da matriz-gel, como cicatrizantes e antiinflamatórios, o que destaca a possibilidade de ações sinérgicas entre os componentes da formulação final no tratamento de dermatoses inflamatórias.

Em vista do exposto, esta proposta envolve desde o preparo e caracterização físico-química até os estudos *in vitro* que compõem o desenvolvimento de hidrogéis a base de sericina e quitosana, contendo ácido kójico, para aplicação na pele visando o tratamento de dermatoses inflamatórias crônicas. Dessa forma, propõe-se o esquema de desenvolvimento e avaliação dos sistemas de acordo com a figura abaixo:

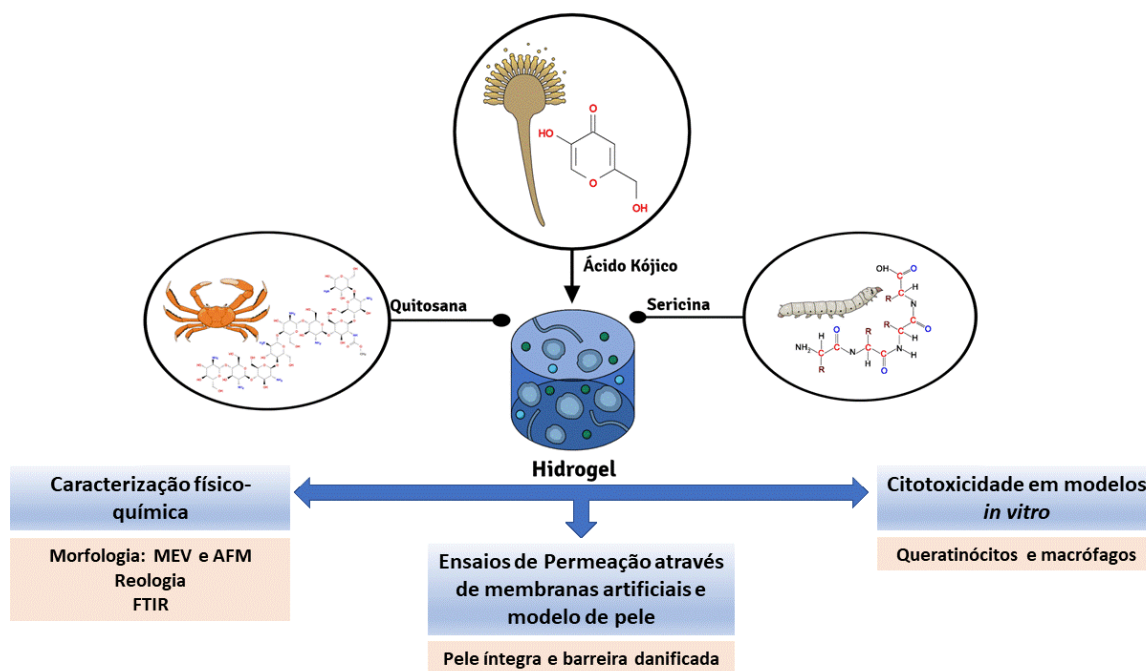


Figura 1- Representação esquemática das etapas do desenvolvimento e avaliação dos hidrogéis a base de sericina e quitosana contendo ácido kójico.

3. Objetivo Geral

Este projeto propõe a preparação, a caracterização físico-química e a avaliação *in vitro* de hidrogéis termosensíveis a base de sericina e quitosana contendo ácido kójico visando aplicações no tratamento de dermatoses inflamatórias.

3.1. Objetivos Específicos

- 1- Preparar os sistemas de hidrogéis compostos de sericina e quitosana, reticulados com β -glicerofosfato, contendo ácido kójico;
- 2- Realizar a caracterização físico-química dos hidrogéis, em suas diferentes constituições, considerando-se as variações na proporção entre os componentes, porcentagem de incorporação de ácido kójico, a temperatura de transição sol-gel, aspectos morfológicos e parâmetros reológicos;

- 3- Avaliar o processo de liberação e a permeação do ácido kójico a partir dos diferentes sistemas, através de membranas artificiais;
- 5- Caracterizar os perfis de permeação do ácido kójico, a partir dos hidrogéis, através de pele orelha de suínos íntegra e na presença de barreira epitelial danificada;

4. MATERIAIS, MÉTODOS E ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1. Reagentes, sais e solventes

Sericina (MM= 30-40 kDa., Sigma-Aldrich Chem. Co.), quitosana (baixa massa molecular, < 150 kDa., grau de desacetilação de 75 %, Sigma-Aldrich Chem. Co.), ácido kójico (Sigma-Aldrich Chem. Co.), β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich Chem. Co.). Os demais reagentes utilizados são de grau analítico. Os reagentes que envolvem a obtenção a partir de fontes biotecnológicas encontram-se devidamente cadastrados no SisGen (A1232B4, A2AD2FE, A9F69C1).

4.2. ETAPA 1- da preparação e caracterização dos hidrogéis

- **Preparação dos hidrogéis de quitosana- β -glicerofosfato (QUI-GCF) e sericina-quitosana- β -glicerofosfato (SER-QUI-GCF)**

Inicialmente, será realizada a preparação dos hidrogéis a base de QUI-GCF, a partir de uma solução de QUI a 3 % (m/v) em ácido acético a 1 %, mantida em agitação à temperatura ambiente por 12 h. Posteriormente, uma solução de GCF a 50 % será lentamente adicionada (1:1 v/v) à solução de QUI, sob agitação magnética (300 rpm), a 4°C, e homogeneizada por 20 min, até obtenção de um gel. Para a preparação dos sistemas SER-QUI-GCF, soluções aquosas de SER, a 1,5 ou 3 % (m/v) serão adicionadas à solução de QUI (3 %) e mantidas sob agitação magnética (300 rpm) até obtenção de um sistema homogêneo, à temperatura ambiente. Em seguida, uma solução de GCF a 50 % será adicionada à mistura QUI-SER na proporção de 1:1 (v/v) e mantida sob as condições de agitação magnética e temperatura descritas anteriormente (PANKONGADISAK; SUWANTONG, 2018; LIANG et al, 2018; MORI et al., 2016). O ácido kójico será adicionado aos hidrogéis após o preparo e à concentração final de 1 %. Todos os hidrogéis serão avaliados periodicamente quanto às propriedades organolépticas (cor, odor, aspecto), reológicas, pH e concentração de fármaco.

- **Análise reológica: influência da composição na temperatura de transição sol-gel (Tsol-gel) e nos parâmetros reológicos**

Para a análise reológica será utilizado um reômetro oscilatório com geometria do tipo cone-placa (Kinexus Lab., Malvern Instruments). As análises serão realizadas na faixa de temperatura de 0 °C a 50 °C, com variação de frequência (0,1 a 10 Hz) e, posteriormente, à frequência fixa de 1 Hz e temperatura de 32,5 °C, permitindo a obtenção de parâmetros relacionados ao módulo elástico (G') e

o módulo viscoso (G'') e à viscosidade (η). A temperatura onde será observada a maior variação entre os parâmetros G' e G'' , é considerada como a $T_{sol-gel}$ (AKKARI et al., 2016; VIGATO et al., 2019; QUEROBINO et al., 2019).

Além disso, análises posteriores como curvas de fluxo e determinação da força de adesão serão executadas. A partir desses dados, a força de adesão (ou força de contato) será calculada da seguinte forma:

$$F_a = \eta \times \gamma \quad (1)$$

onde γ é a taxa de cisalhamento na qual o valor de viscosidade foi calculado e a força de adesão (F_a) está relacionada com G' e frequência (ω), como segue:

$$G' = F_a \cdot \omega \quad (2)$$

Todos os resultados serão analisados usando o software rSpace for Kinexus®.

- **Caracterização morfológica e estrutural dos hidrogéis: técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Força Atômica (AFM) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Para todas as análises, amostras dos hidrogéis e de seus componentes isolados serão acondicionados em lâminas de vidro e mantidos em dessecador até completa desidratação. Posteriormente, os pós serão avaliados por meio das técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (AFM), para verificar a incorporação do fármaco e a homogeneidade dos sistemas. Paralelamente, os pós obtidos a partir da secagem dos hidrogéis e seus componentes isolados (polímeros, agente reticulante, fármaco e proteína) serão analisados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) utilizando o equipamento ParkinElmer Spectrum Two 160000A com acessório de ATR (Central Experimental Multiusuário, UFABC, Campus Santo André). As varreduras serão realizadas de 650 a 4000 cm^{-1} e os espectros registrados para averiguar os grupamentos químicos responsáveis pelas interações entre os componentes dos hidrogéis.

- **Condições analíticas para a quantificação de ácido kójico (AK)**

Inicialmente, será construída uma curva analítica para a quantificação de AK, a partir de uma solução-estoque a 100 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 7,4). A análise espectrofotométrica será executada em um intervalo de comprimento de onda de 200 a 400 nm, conforme descrito por Gonzalez et al., 2013, para determinação do comprimento de onda de absorbância máxima. Posteriormente, concentrações de AK entre 5 e 30 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato e metanol (30:70 v/v) serão analisadas, de forma a caracterizar o método analítico para a quantificação

de fármaco durante os ensaios de permeação através da pele. Para ambos os casos, serão determinados os coeficientes de regressão linear e as equações da reta, a partir de quintuplicatas de cada concentração de AK.

4.3. ETAPA 2- determinação dos perfis de liberação e permeação

- **Avaliação do perfil de liberação *in vitro* e ensaios de permeação (em modelos de pele íntegra e danificada)**

Para os ensaios de liberação *in vitro*, será utilizado um sistema de células de difusão vertical do tipo Franz (sistema automatizado Microette Plus, Hanson Research®) com área de 1,7 cm², com os compartimentos doador e receptor separados por uma membrana de acetato de celulose (com poro de exclusão molecular de 10000 Da., Spectrapore). As formulações serão dispostas no compartimento doador (1 g) enquanto do compartimento receptor (contendo tampão fosfato de sódio 20 mM em NaCl 150 mM, pH 7,4, 37 °C, sob agitação a 100 rpm) alíquotas serão retiradas em intervalos de 15, 30 e 60 min., durante 24 h e analisadas por Espectrofotometria no UV-VIS, para quantificação do fármaco. Para determinar os mecanismos de liberação dos fármacos a partir das diferentes formulações, os modelos matemáticos de zero-ordem, de primeira ordem, de Higuchi, de Hixson-Crowell e de Korsmeyer-Peppas serão aplicados. Os dados serão ajustados pelo método de regressão linear e o coeficiente de determinação (R^2) será avaliado. De forma semelhante, os ensaios de permeação *in vitro* serão executados em células difusão vertical, conforme descrição anterior. No entanto, a membrana para separação dos compartimentos doador e receptor será composta de múltiplas camadas de poliestireno, denominada Strat-M® (Merck-Millipore), validada como membrana para estimativa da permeação de fármacos através da pele humana (UCHIDA et al., 2015, GRILLO et al., 2019). Os ensaios de permeação serão realizados nos mesmos intervalos que aqueles de liberação, conforme descrição anterior.

Para os ensaios de permeação através da pele, as orelhas de suínos serão obtidas de um abatedouro devidamente certificado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento-SP e pelo Centro de Inspeção de Produtos de Origem Animal, SISP nº 1762, (Frigorífico Suzano Indústria e Comércio Eireli Abatedouro de Suíno - CNPJ: 49.907.009/0001/70). Todos os protocolos serão submetidos à análise pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Federal do ABC. Para o preparo da pele, a parte externa da pele da orelha será removida da cartilagem, sendo extraídos também vasos sanguíneos e tecido subcutâneo, visando a obtenção de uma estrutura mais homogênea com cerca de 2 mm de espessura e, posteriormente, dermatomizadas (0,45 mm). Os ensaios serão realizados em células de difusão vertical do tipo Franz, conforme descrição anterior. Para a execução dos ensaios de

permeação em pele danificada, a pele íntegra recentemente adquirida será submetida ao método de remoção do estrato córneo, pela técnica de *tape stripping*, na qual discos adesivos serão aplicados na superfície da pele por 5 s e removidos, sendo aplicados sucessivamente até 50 strips (SIMONSEN et al., 2007; RUBIO et al., 2011). Para acompanhar o processo de dano à barreira, a perda de água transepidérmica (TEWL, g/m² h) será avaliada utilizando um sensor de umidade relativa (VapoMeter, Defin Technologies, Kuopio, Finland). Os valores de TEWL (g/m².h) serão determinados antes (40.1 ± 1.4 g/m² h) e após 50 strips (10.2 ± 1.6 g/m² h) (CAMPOS et al., 2021).

- **Análise Estatística**

Os resultados serão expressos em média \pm desvio padrão (d.p.), sendo comparados por análise de variância de uma via (One-way ANOVA) com teste posterior de Tukey-Kramer. Para a construção dos gráficos, serão utilizados softwares como Microcal Origin e Graph Pad Prism.

5. Viabilidade, Infraestrutura disponível e Cronograma de execução

Este projeto será executado em laboratório de pesquisa, na UFABC, que dispõe dos equipamentos e consumíveis necessários às etapas de desenvolvimento e estudos de permeação *in vitro*. As análises por calorimetria, tomografia e espectroscopia no infra-vermelho serão realizadas na Central Experimental Multiusuário da UFABC (SA e SBC). O suporte financeiro para esta proposta é proveniente de um auxílio regular FAPESP em vigência (2019/20303-4)

<u>ATIVIDADES</u>	<i>1-2 meses</i>	<i>3-4 meses</i>	<i>5-6 meses</i>	<i>7-8 meses</i>	<i>9-10 meses</i>	<i>11-12 meses</i>
Preparação das diferentes formulações de hidrogéis e padronização do método analítico para o AK	X					
Caracterização dos hidrogéis: propriedades organolépticas e reologia	X	X	X			
Caracterização dos hidrogéis: análises morfológicas e estruturais		X	X			
Entrega de relatório parcial			X			
Ensaio de liberação e permeação <i>in vitro</i>				X	X	
Relatório final e submissão de artigo científico						X

6. Referências Bibliográficas

- ALBRECHT, I.; RHODEN, S.; PAMPHILE, J. **Evidência - Ciência e Biotecnologia**, v. 15, n. 1, p. 57, 14 jul. 2015.
- AKKARI, A et al. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, p. 299-307, 2016.
- AZHAR, S.; ASHARI, S.; SALIM, N. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 13, p. 6465-6479, out. 2018.
- BARAJAS-GAMBOA, J. et al. **Ing. compet.**, Cali, v.18, n.2, p.193-206, julho 2016. Disponível em: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-30332016000200018&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 fev. 2022.
- BRAGA, L.; FLAUZINO JUNIOR, A.; GONZÁLEZ, M.; QUEIROZ, A. **Research, Society And Development**, v. 8, n. 3, 1 jan. 2019.
- CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. **European Polymer Journal**, [S.L.], v. 65, p. 252-267, abr. 2015.
- CAMPOS, E. et al. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 1, p. 1-1, 2021.
- CORRER, C.; CORDEIRO, G.; GASPARETTO, J.; PERALTAZAMORA, P.; PONTAROLO, R. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, vol. 24, n° 3, p. 416-420, 2005.
- EMANUEL, S.; HAWARDEN, D. **Current Allergy & Clinical Immunology**, vol. 31, n° 3, p.164-165, setembro 2018. Disponível em: <https://hdl.handle.net/10520/EJC-10958249ec>. Acesso em: 25 fev. 2022.
- FAIG, J. et al. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 2, p. 363–373, 13 fev. 2017.
- FERREIRA, B.; FREITAS, E.; ALMEIDA, P.; MENDES, T.; NAKAOKA, V.; KASHIWABARA, T. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, Vol. 5, n. 2, p.22-26, fevereiro 2014.
- GONÇALEZ, M.; CORRÊA, M.; CHORILLI. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013.
- GRILLO, R et al. **Colloids Surf Biointerfaces**, p.56-62, 2019.
- HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.L.], v. 60, n. 15, p. 1638-1649, dez. 2008.
- HU, D.; XU, Z.; HU, Z.; HU, B.; YANG, M.; ZHU, L. **Acs Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1638-1647, 17 jan. 2017.
- KHEZRI, K.; SAEEDI, M.; MORTEZA-SEMNANI, K.; AKBARI, J.; ROSTAMKALAEI, S. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 841–853, 1 jan. 2020.
- KHEZRI, K.; SAEEDI, M.; MORTEZA-SEMNANI, K.; AKBARI, J.; HEDAYATIZADEH-OMRAN, A. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 38-47, 1 jan. 2021.
- LARANJEIRA, M.; FÁVERE, V. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 672-678, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/zMQsDMRnPPXXbBFWbsSspzs/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 28 fev. 2022.
- LEUNG, D.; BIEBER, T. **The Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151-160, jan. 2003.
- LI, T. et al. **Fitoterapia**, v. 154, p.1-6, 1 set. 2021.
- MA, D.; XU, T.; CHAN, D.; MAN, B.; FONG, W.; LEUNG, C. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 10, p. 1-8, 11 mar. 2011.
- NAWARAK, J. et al. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 9, p. 3737–3746, set. 2008.
- OLIVEIRA, C.; ANDRADE, G.; SANTO, J. **Research, Society And Development**, v. 10, n. 16, p. 1-6, 12 dez. 2021.
- ORMEROD, A.; WHITE, M. **British Medical Journal**, vol. 289, p. 605-608, 8 setembro 1984. Disponível em: <https://doi-org.ez42.periodicos.capes.gov.br/10.1136/bmj.289.6445.605>. Acesso em: 25 fev. 2022.
- PANKONGADISAK, P.; SUWANTONG, O. **Rsc Advances**, v. 8, n. 70, p. 40219-40231, 2018.
- QUEROBINO, S. et al. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, p. 1350-1361, 2019.

- RUBIO, L. et al. **Dermatol**, v. 50, p.881-889, 2011.
- SAEEDI, M.; ESLAMIFAR, M.; KHEZRI, K. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 582-593, fev. 2019.
- SHARMA, S.; TIWARI, S. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 737-747, nov. 2020.
- SILVA, Gabriele Lopes. **Análise do uso de coagulantes orgânicos no tratamento de efluente industrial gerado no processo de fiação de seda**. 2019. 62 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2019. Disponível em: https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/12138/1/LD_COEAM_2019_1_07.pdf. Acesso em: 4 mar. 2022
- SILVA, J. **Produção de ácido kójico através da fermentação do arroz**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Fundação Educacional do Município de Assis. Assis, 2011, p.55.
- SILVA, H; SANTOS, K; FERREIRA, E. **Quim. Nova**, São Paulo, v.29, n.4, 776-785, 2006.
- SIMONSEN, L.; FULLERTON, A. **Physiol**, p. 230-236, 2007.
- UCHIDA, T.; KADHUM, W.; KANAI, S.; TODO, H.; OSHIZAKA, T.; SUGIBAYASHI, K. **Eur J Pharm Sci**, p. 113-118, 2015.
- VIGATO, A. et al. **Eur J Pharm Sci**, p. 270-278, 2019.
- WU, H.; LIANG, H.; YUAN, Q.; WANG, T.; YAN, X. **Carbohydrate Polymers**, p. 613-617, 2010.
- MORI, M.; ROSSI, S.; FERRARI, F.; BONFERRONI, M.C.; SANDRI, G., RIVA, F., TENCI, M., DEL FANTE, C., NICOLETTI, G., CAMELLA, C. **J Pharm Sci**, p. 1188-1195, 2016.