

**FLÁVIA DE MARCO ALMEIDA**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO LIPOSSOMAL DE USO TÓPICO  
CONTENDO O PEPTÍDEO SINTÉTICO PNPP-19 PARA O TRATAMENTO DA  
DISFUNÇÃO ERÉTIL**

**&**

**ANÁLISE DE PATENTES EM BIOTECNOLOGIA, NA ÁREA DE FÁRMACOS E  
MEDICAMENTOS, QUE EXPLORAM VENENOS E TOXINAS PROVENIENTES DA  
FAUNA BRASILEIRA.**

Tese, como requisito parcial, para obter o grau de doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira - UFMG

Co-orientadores Profa. Dra. Maria Elena de Lima Pérez-Garcia e Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira - UFMG

Belo Horizonte – MG

2015

## AGRADECIMENTOS

**Aos meus orientadores**, pelo incentivo, apoio e dedicação: **Mônica**, por ter me aceitado no programa, por toda a orientação, paciência e apoio; **Maria Elena**, por ter me trazido de volta ao doutorado, por todo o carinho, entusiasmo e orientação; **Lucas**, por toda a orientação, dedicação e interesse.

**Aos membros da banca examinadora**, Dr. Paulo Lacativa, Professora Elaine Amaral Leite, Professor Álvaro Dutra e Professor Rubén, pela valiosa contribuição, pelas sugestões e pela dedicação.

**Às agências financiadoras** CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo suporte.

**Aos INCTs** INCTTOX, INCT NANOBIOTECNOLOGIA e INCT Nanofito, pelo apoio.

**A todos os amigos do LTF e do LVTA**, pela convivência agradável e apoio.

**Aos amigos da CTIT**, pela convivência e apoio, e à equipe DAPG, pela colaboração na redação dos estudos sobre a MP 2.186-16.

**À Sávia Caldeira Araújo**, por todo o apoio e pela orientação na validação do método de dosagem por HPLC.

**Ao Diêgo Ferreira**, por todo apoio e pela orientação na preparação dos lipossomas.

**À Carolina Nunes**, pela colaboração nos experimentos *in vivo*, e pelas discussões de resultado.

**Ao Daniel Santos**, pela colaboração nas análises por MALDI-TOF.

**À Fernanda Torres**, pela colaboração na elaboração do projeto, na execução dos experimentos *in vivo* e por todo apoio.

**À Marina Franco**, pela colaboração no desenvolvimento do Método de Aquecimento em Água.

**À Mariana Oliveira**, pela colaboração nos estudos sobre a MP 2.186-16.

**Ao Júlio César**, pelo auxílio na lida com os animais.

**Ao Dr. Felipe Lima Cardoso**, ao **Dr. Sebastião Nelson** e seus **pacientes**, pelo gentil fornecimento das peles abdominais.

**Ao Mateus Ribeiro**, aluno de iniciação científica, pela colaboração nos experimentos de permeação cutânea.

**À Marcia Borges** e ao **Professor Frézard**, pelo apoio na qualificação e pelas importantes sugestões.

**Ao Professor Valbert**, ao **Professor André** e ao Laboratório de Radioisótopos, pela colaboração e pelas importantes sugestões.

**Ao Professor Adriano Pimenta**, pela colaboração na redação do artigo sobre patentes.

**Aos professores e colegas do PPGCF**, pela convivência e aprendizado.

**À minha família**, por ser o meu porto seguro.

**Às minhas filhas**, minha razão de viver.

**Ao meu marido**, por todo apoio e incentivo.

**A Deus**, por iluminar o meu caminho.

**À Nossa Senhora**, pela proteção.

## RESUMO

A Parte I deste trabalho descreve o desenvolvimento de uma formulação lipossomal contendo PnPP-19, derivado da toxina PnTx2-6 da aranha *Phoneutria nigriventer*, para o tratamento tópico da disfunção erétil (DE). PnPP-19 é um peptídeo sintético de 19 aminoácidos, previamente descrito como uma nova substância bioativa para o tratamento da disfunção erétil. O objetivo desse trabalho foi avaliar as propriedades físico-químicas de lipossomas deformáveis catiônicos contendo PnPP-19 e a permeação cutânea de PnPP-19, tanto livre quanto encapsulado nesses lipossomas. Três preparações lipossomais diferentes foram avaliadas. Os lipossomas deformáveis catiônicos continham fosfatidilcolina de ovo, estearilamina e Tween 20. A concentração lipídica variou de 20 mM a 40 mM. O teor de encapsulação, o diâmetro médio, o potencial zeta e a estabilidade a 4°C das formulações foram avaliados. Os experimentos de permeação cutânea foram realizados com pele abdominal humana em células de Franz, com área de difusão de 3 cm<sup>2</sup> a 32°C. Um derivado fluorescente do peptídeo, contendo 5-TAMRA ligado à região C-terminal de PnPP-19, onde uma lisina adicional foi inserida, foi utilizado para estes experimentos. Os resultados mostram que os diferentes métodos de preparação apresentaram diferentes teores de encapsulação, de 6% a 30%, e o método de evaporação em fase reversa na concentração lipídica de 40 mM apresentou o melhor teor de encapsulação (30,2 ± 4,5 %). PnPP-19 livre foi capaz de permear a pele, na velocidade de 10,8 ng/cm<sup>2</sup>/h. Porém, PnPP-19 sofreu possivelmente uma hidrólise específica pelas enzimas proteolíticas presentes na pele, gerando um fragmento de 15 resíduos de aminoácidos. PnPP-19 encapsulado permeou a pele na velocidade de 12,6 ng/cm<sup>2</sup>/h. A encapsulação de PnPP-19 em lipossomas deformáveis catiônicos protegeu o peptídeo contra degradação, favorecendo sua administração tópica. O desenvolvimento de fármacos a partir da exploração da biodiversidade brasileira vem passando por uma fase de regulamentação no Brasil. A aplicação da medida provisória MP 2.186-16, de agosto de 2001, revogada pela lei Nº 13.123, de 20 de maio de 2015, gerou discussões importantes, com reflexos na produção científica e tecnológica brasileira. Nesse contexto, a Parte II do presente trabalho compreende o levantamento das patentes produzidas no Brasil e no exterior, entre 2000 e 2011, que descrevem fármacos ou medicamentos desenvolvidos a partir de venenos e toxinas da fauna brasileira. Nossos resultados mostraram que apenas 8 gêneros da fauna brasileira estão envolvidos em documentos de patente. As invenções geradas envolvem, em sua maioria, composições antitumorais, antimicrobianas, vacinas e

agentes hipotensivos. Os inventores brasileiros detêm 49% dos documentos de patente, sendo os outros documentos depositados por inventores da América do Norte e Europa. Desta forma, ainda há um grande arsenal de moléculas provenientes de venenos da rica fauna brasileira a serem exploradas para o desenvolvimento de novas substâncias bioativas. As leis brasileiras que regem a investigação e a exploração comercial de produtos provenientes do patrimônio genético brasileiro são também discutidas. **Palavras-chave:** peptídeo, lipossomas deformáveis, permeação cutânea, disfunção erétil, patentes

## ABSTRACT

In Part I, this work describes the development of a liposomal formulation containing PnPP-19, derived from the toxin PnTx2-6 from *Phoneutria nigriventer* spider, for the topical treatment of erectile dysfunction (ED). PnPP-19 is a 19-amino-acid synthetic peptide previously described as a novel bioactive compound for the treatment of erectile dysfunction. The aim of this work was to evaluate the physicochemical properties of cationic transfersomes containing PnPP-19 and the skin permeation of PnPP-19, whether free or encapsulated. Three different liposomal preparation methods were evaluated. Cationic transfersomes contained egg phosphatidyl choline, stearylamine and Tween 20. Lipid concentration varied from 20mM to 40mM. We evaluated the entrapment efficiency, mean diameter, zeta potential and stability at 4°C of the formulations. The skin permeation assays were performed with abdominal human skin using Franz diffusion cell with 3 cm<sup>2</sup> diffusion area at 32°C and a fluorescent derivative of the peptide, containing 5-TAMRA, bound to PnPP-19 C-terminal region, where an extra lysine was inserted. Our results showed variable entrapment efficiencies, from 6% to 30%, depending on the preparation method and the lipid concentration used, and reversed phase evaporation at 40 mM lipid concentration led to the best entrapment efficiency (30,2 ± 4,5 %). Free PnPP-19 was able to permeate skin at a rate of 10.8 ng/cm<sup>2</sup>/h. However, PnPP-19 was specifically hydrolyzed by skin proteases, generating a fragment of 15 amino acid residues. Encapsulated PnPP-19 permeated skin at a rate of 12.6 ng/cm<sup>2</sup>/h. The encapsulation in cationic transfersomes protected the peptide from degradation, favoring its topical administration. The use of drugs developed from the exploitation of the Brazilian biodiversity, as in the present work, is in a stage of regulamentation in Brazil. The provisional measure MP 2.186-16, into force since August 2001, revoked by the law 13.123, on May 20, 2015, was extensively questioned by Brazilian researchers, and has affected scientific and technological production. In this context, Part II involves a search at patent banks for inventions developed in Brazil and abroad, filed between 2000 and 2011, that describe drugs or medicines developed after venoms, toxins or their derivatives from the Brazilian fauna. Our results show that only 8 Brazilian genera are involved in patent applications. The inventions mostly involve anticancer compositions, antimicrobials, vaccines and hypotensives. Brazilian inventors hold 49% of the patent applications, and the other applications were filed by American and European inventors. Therefore, there is still a great arsenal of venom molecules from the rich Brazilian fauna to be explored for the development of new bioactive compounds.

Brazilian laws that rule the investigation and commercial exploitation of products comprising the use of Brazilian genetic resources are also discussed herein. **Key-words:** peptide, transfersomes, skin permeation, erectile dysfunction, patents.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática do sistema de irrigação e inervação do pênis.	18
<b>Figura 2</b> - Moléculas envolvidas na flacidez (A) e na ereção (B) do pênis.	19
<b>Figura 3</b> - Ilustração das camadas da pele.	24
<b>Figura 4</b> - Ilustração das três vias de penetração através do estrato córneo: intracelular, intercelular e folicular.	26
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de ação de PnTx2-6 proposto por Nunes e colaboradores (2008).	34
<b>Figura 6</b> - Alinhamento entre PnTx2-6 e PnPP-19.	35
<b>Figura 7</b> - Estrutura química dos componentes da formulação de lipossomas deformáveis catiônicos. (A) Fosfaditilcolina de ovo (EPC); (B) Esterilamina (SA); (C) Tween 20.	45
<b>Figura 8</b> - Sobreposição de perfis cromatográficos obtidos para solução do peptídeo PnPP-19 na concentração de 20 µg/mL (verde) e lipossomas brancos (vermelho).	49
<b>Figura 9</b> - Curva de calibração para o doseamento de PnPP-19 obtida pelo método de CLAE.	50
<b>Figura 10</b> - Sobreposição de perfis cromatográficos obtidos para solução do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA na concentração de 1 µg/mL (preto) e lipossomas brancos (vermelho).	58
<b>Figura 11</b> - Curva de calibração para o doseamento de PnPP-19-Lys-TAMRA obtida pelo método de CLAE.	58
<b>Figura 12</b> - Cromatograma de PnPP-19-Lys-TAMRA livre (preto) e encapsulado em lipossomas (vermelho) após ensaio de permeação cutânea. Maior concentração de peptídeo intacto (seta) foi recuperada para permeação do peptídeo encapsulado.	68
<b>Figura 13</b> - Degradação de PnPP-19-Lys-TAMRA.	69
<b>Figura 14</b> - Cromatograma de PnPP-19-Lys-TAMRA após ensaio de permeação cutânea na ausência da pele. Não houve degradação.	70
<b>Figura 15</b> - Cromatograma de PnPP-19-Lys-TAMRA livre (azul claro e rosa) e encapsulado em lipossomas (preto, verde e azul escuro) após ensaio de permeação cutânea com a pele do paciente 3 (sexo feminino, 38 anos). A encapsulação em lipossomas protegeu o peptídeo contra degradação.	71
<b>Figura 16</b> - Espectrometria de massa do líquido acceptor sem o peptídeo.	72
<b>Figura 17</b> - Espectrometria de massa do líquido acceptor com o peptídeo a 4 µg/mL.	73
<b>Figura 18</b> - Espectrometria de massa do peptídeo a 4 µg/mL, em água.	74
<b>Figura 19</b> - Número de patentes depositadas por ano.	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Determinação da precisão intradia para o método de quantificação de PnPP-19 por CLAE.	50
<b>Tabela 2</b> - Determinação do diâmetro médio de lipossomas deformáveis brancos, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação.	52
<b>Tabela 3</b> - Determinação do diâmetro médio de lipossomas deformáveis brancos, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, calibrados por sonicação e submetidos ao processo de congelamento/descongelamento.	52
<b>Tabela 4</b> - Determinação do diâmetro médio de lipossomas deformáveis contendo o peptídeo PnPP-19, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, calibrados por sonicação e submetidos ao processo de congelamento/descongelamento.	53
<b>Tabela 5</b> - Análise do diâmetro médio de lipossomas deformáveis preparados pelo método REV e calibrados por sonicação.	54
<b>Tabela 6</b> - Análise do diâmetro médio de lipossomas deformáveis preparados pelo método REV sem calibração por sonicação, com concentração lipídica de 20 mM.	55
<b>Tabela 7</b> - Análise do diâmetro médio de lipossomas deformáveis preparados pelo método REV sem calibração por sonicação, com concentração lipídica de 40 mM	56
<b>Tabela 8</b> - Análise do diâmetro médio de lipossomas deformáveis preparados pelo método REV, com incorporação do peptídeo na fase hidrofóbica, sem calibração por sonicação	57
<b>Tabela 9</b> - Determinação da precisão intradia para o método de doseamento de PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE.	59
<b>Tabela 10</b> - Porcentagem de permeação de PnPP-19-Lys- TAMRA livre ou encapsulado em lipossoma, em pele abdominal humana.	66
<b>Tabela 11</b> - Titulares de patentes concedidas pelo USPTO entre 2000 e 2007.	79
<b>Tabela 12</b> - Titulares de patentes brasileiras publicadas pela WIPO entre 2000 e 2007.	79
<b>Tabela 13</b> - Lista de espécies peçonhentas brasileiras utilizadas na busca em bancos de dados de patentes.	84
<b>Tabela 14</b> - Sítios de busca, palavras-chave e IPCs utilizados.	85
<b>Tabela 15</b> - Número de patentes por gênero.	87
<b>Tabela 16</b> - Número de patentes por titular.	88
<b>Tabela 17</b> - Número de patentes por tipo de instituição titular.	88

**Tabela 18 - Número de patentes por nacionalidade dos inventores.** 89

**Tabela 19 - Número de patentes por tipo de invenção.** 89

**Tabela suplementar - Patentes compreendendo utilização de informação proveniente de venenos e/ou toxinas de espécies brasileiras.** 113

## LISTA DE ABREVIATURAS

### PARTE I

ACh	Acetilcolina
ACN	Acetonitrila
Ang II	Angiotensina II
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva (do inglês: " <i>Area Under the Curve</i> ")
CaM	Calmodulina (do inglês: " <i>Calcium-modulated protein</i> ")
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica (do inglês: " <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> ")
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica (do inglês: " <i>Cyclic Guanosine Monophosphate</i> ")
CHOL	Colesterol
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNP	Peptídeo natriurético tipo C
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DE	Disfunção erétil
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTAP	Dioleiltrimetilamôniopropano
DPR	Desvio padrão relativo
EPC	Fostatidilcolina de ovo (do inglês: " <i>Egg Phosphatidylcholine</i> ")
ET-1	Endotelina-1
ER	Retículo endoplasmático (do inglês: " <i>Endoplasmic Reticulum</i> ")
GC-B	Receptor guanilil ciclase B
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato (do inglês: " <i>Geranylgeranyl pyrophosphate</i> ")
GGT	Enzima geranilgeraniltransferase
GTP	Guanosina trifosfato (do inglês: " <i>Guanosine-5'-triphosphate</i> ")
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência (do inglês: " <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ")
ip	Via intraperitoneal

IU	Unidade internacional (do inglês: “ <i>International Unit</i> ”)
iv	Via intravenosa
MLC	Cadeia leve da miosina (do inglês: “ <i>Myosin Light Chain</i> ”)
MLCK	Cinase da cadeia leve da miosina (do inglês: “ <i>Myosin Light Chain Kinase</i> ”)
MLCP	Fosfatase da cadeia leve da miosina (do inglês: “ <i>Myosin Light Chain Phosphatase</i> ”)
MWCO	Corte de peso molecular (do inglês: “ <i>molecular weight cut-off</i> ”)
Myo	Molécula de miosina (do inglês: “ <i>Myosin</i> ”)
NANC	Não adrenérgico não colinérgico
NE	Norepinefrina
NEP	Inibidor da endopeptidase neutra, neprilisina
NO	Óxido nítrico (do inglês: “ <i>Nitric Oxide</i> ”)
NOS	Óxido nítrico sintetase (do inglês: “ <i>Nitric Oxide Synthase</i> ”)
NR	Não realizado
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (do inglês: “ <i>Phosphate-buffered saline</i> ”)
PDE	Enzima fosfodiesterase (do inglês: “ <i>Phosphodiesterase</i> ”)
PG	Fosfatidilglicerol (do inglês: “ <i>Phosphatidylglycerol</i> ”)
PGE	Prostaglandina E
PK	Proteína cinase (do inglês: “ <i>Protein Kinase</i> ”)
PKG	Proteína cinase G
PnTx2-6	Toxina isolada da fração 2 do veneno da aranha <i>Phoneutria nigriventer</i> (do inglês: “ <i>Phoneutria nigriventer Toxin 2-6</i> ”)
PnPP-19	Peptídeo sintético de 19 aminoácidos desenvolvido a partir da região ativa de Pntx2-6
Ras	Proteína gtpase isolada de vírus do sarcoma de rato
REV	Evaporação em Fase Reversa
Rho	Pequena gtpase homóloga a Ras
ROCK	Proteína cinase associada a Rho (do inglês: “ <i>Rho-Associated Coiled-Coil-Containing Protein Kinase</i> ”)
RP-18	Coluna de fase reversa C18 (do inglês: “ <i>reverse phase</i> ”)

SA	Estearilamina
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: “ <i>sodium dodecyl sulfate</i> ”)
sGC	Guanilato ciclase solúvel
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Teor de encapsulação
TFA	Ácido trifluoracético
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo

## PARTE II

BP	Bioprospecção
CDB	Convenção da Diversidade Biológica
CEBRAP	Centro Brasileiro de Análise e Planejamento
CGEN	Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CTA	Conhecimento tradicional associado
DT	Desenvolvimento tecnológico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPO	European Patents Office
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FAPESP	Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FNRB	Fundo Nacional de Repartição de Benefícios
FUNAI	Fundação Nacional do Índio
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
IPC	Classificação internacional de patentes (do inglês: “ <i>international patent classification</i> ”)
MMA	Ministério do Meio Ambiente

MP	Medida provisória
OMPI	Organização Mundial da Propriedade Intelectual
PC	Pesquisa científica
PG	Patrimônio genético
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFSCAR	Universidade Federal de São Carlos
UnB	Fundação Universitária de Brasília
UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
USP	Universidade de São Paulo
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
USPTO	<i>United States Patent and Trademark Office</i>
WIPO	<i>World Intellectual Property Organization</i>

## SUMÁRIO

RESUMO .....	3
ABSTRACT .....	5
LISTA DE FIGURAS .....	7
LISTA DE TABELAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
PARTE I .....	17
1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 A Fisiologia da Ereção Peniana .....	18
1.2 A Epidemiologia da Disfunção Erétil (DE).....	20
1.3 O Tratamento da DE.....	21
1.4 Aplicação Tópica de Substâncias Bioativas e a Barreira Epitelial .....	23
1.5 Formulações de Uso Tópico à Base de Lipossomas .....	27
1.6 A Toxina PnTx2-6 .....	30
1.7 O Peptídeo PNPP-19 .....	35
2 JUSTIFICATIVA .....	38
3 OBJETIVO GERAL.....	39
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
CAPÍTULO I.....	40
I.1 INTRODUÇÃO.....	40
I.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	41
I.2.1 Obtenção dos Peptídeos Sintéticos PnPP-19 e PnPP-19-Lys-TAMRA.....	41
I.2.2 Quantificação do Peptídeo PnPP-19 por CLAE .....	41
I.2.3 Quantificação do Peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE .....	43
I.2.4 Preparação dos Lipossomas .....	44
I.2.4.1 <u>Método de Hidratação do Filme Lipídico</u> .....	45
I.2.4.2 <u>Método de Evaporação em Fase Reversa (REV)</u> .....	46
I.2.4.3 <u>Purificação dos Lipossomas por Ultracentrifugação</u> .....	46
I.2.4.4 <u>Purificação dos Lipossomas por Diálise</u> .....	46
I.2.5 Determinação do Diâmetro Médio, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta	47
I.2.6 Estudo da Estabilidade de Armazenamento dos Lipossomas .....	48
I.2.7 Análises Estatísticas .....	48

<b>I.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>I.3.1 Validação do Método de Quantificação de PnPP-19 por CLAE .....</b>	<b>49</b>
<b>I.3.1.1 <u>Seletividade</u>.....</b>	<b>49</b>
<b>I.3.1.2 <u>Linearidade</u>.....</b>	<b>50</b>
<b>I.3.1.3 <u>Precisão Intradia</u>.....</b>	<b>50</b>
<b>I.3.2 Preparação dos Lipossomas Deformáveis pelo Método de Hidratação do Filme Lipídico.....</b>	<b>51</b>
<b>I.3.3 Preparação dos Lipossomas Deformáveis pelo Método de Evaporação em Fase Reversa (REV).....</b>	<b>53</b>
<b>I.3.4 Validação do Método de Quantificação de PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE .</b>	<b>57</b>
<b>I.3.4.1 <u>Seletividade</u>.....</b>	<b>57</b>
<b>I.3.4.2 <u>Linearidade</u>.....</b>	<b>58</b>
<b>I.3.4.3 <u>Precisão Intradia</u>.....</b>	<b>59</b>
<b>I.3.5 Limite de Quantificação.....</b>	<b>59</b>
<b>I.3.6 Limite de Detecção.....</b>	<b>60</b>
<b>I.3.7 Encapsulação de PnPP-19-Lys-TAMRA em Lipossomas Deformáveis, pelo Método de Evaporação em Fase Reversa (REV).....</b>	<b>60</b>
<b>I.4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>62</b>
<b>II.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>II.2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
<b>II.2.1 Preparação da Pele .....</b>	<b>63</b>
<b>II.2. 2 Preparação das Células de Difusão de Franz .....</b>	<b>63</b>
<b>II.2. 3 Detecção e Quantificação do Peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE.....</b>	<b>65</b>
<b>II.2.4 Avaliação da Hidrólise do Peptídeo PnPP-19, Utilizando Espectrometria de Massas.....</b>	<b>65</b>
<b>II.2.5 Análises estatísticas.....</b>	<b>65</b>
<b>II.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>II.3.1 Avaliação da Permeação Cutânea do Peptídeo Marcado com Fluoróforo, PnPP-19-Lys-TAMRA, Livre ou Encapsulado em Lipossomas, em Ensaios de Células de Franz Utilizando Pele Abdominal Humana e Detecção por CLAE.....</b>	<b>66</b>
<b>II.3.2 Avaliação da Estabilidade do Peptídeo Marcado com Fluoróforo, PnPP-19-Lys-TAMRA, Livre ou Encapsulado em Lipossomas, em Ensaios de Células de</b>	

<b>Franz Utilizando Pele Abdominal Humana e Detecção por CLAE.....</b>	<b>68</b>
<b>II.3.3 Avaliação por Espectrometria de Massas (MALDI-TOF) da Hidrólise do Peptídeo PnPP-19 por Enzimas Proteolíticas Provenientes do Ensaio de Permeação Cutânea em Células de Franz, Utilizando Pele Abdominal Humana..</b>	<b>71</b>
<b>II.4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>PARTE II .....</b>	<b>77</b>
<b>A. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>A.1 Panorama da Situação Patentária na Área de Biotecnologia no Brasil .....</b>	<b>78</b>
<b>A.2 Patentes Envolvendo Venenos e Toxinas Animais .....</b>	<b>81</b>
<b>B JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>82</b>
<b>C. OBJETIVOS .....</b>	<b>83</b>
<b>D. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>83</b>
<b>D.1 Levantamento das Patentes Produzidas, no Brasil e no Exterior, que Descrevem o Desenvolvimento de Produtos Baseados em Toxinas de Animais da Fauna Brasileira .....</b>	<b>83</b>
<b>D.2 Revisão e Estudo das Leis que Tratam da Exploração da Biodiversidade Brasileira para Fins de Pesquisa Científica (PC), Bioprospecção (BP) E Desenvolvimento Tecnológico (DT).....</b>	<b>86</b>
<b>E. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>E.1 Levantamento das Patentes Produzidas, no Brasil e no Exterior, que Descrevem o Desenvolvimento de Produtos Baseados em Toxinas de Animais da Fauna Brasileira .....</b>	<b>86</b>
<b>E.2 Revisão e Estudo das Leis Brasileiras que Tratam da Exploração da Biodiversidade Brasileira para Fins de Pesquisa Científica (PC), Bioprospecção (BP) e Desenvolvimento Tecnológico (DT).....</b>	<b>90</b>
<b>F. CONCLUSÕES .....</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO I – Termo de Concordância.....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO III – Tabela Suplementar.....</b>	<b>113</b>

# PARTE I

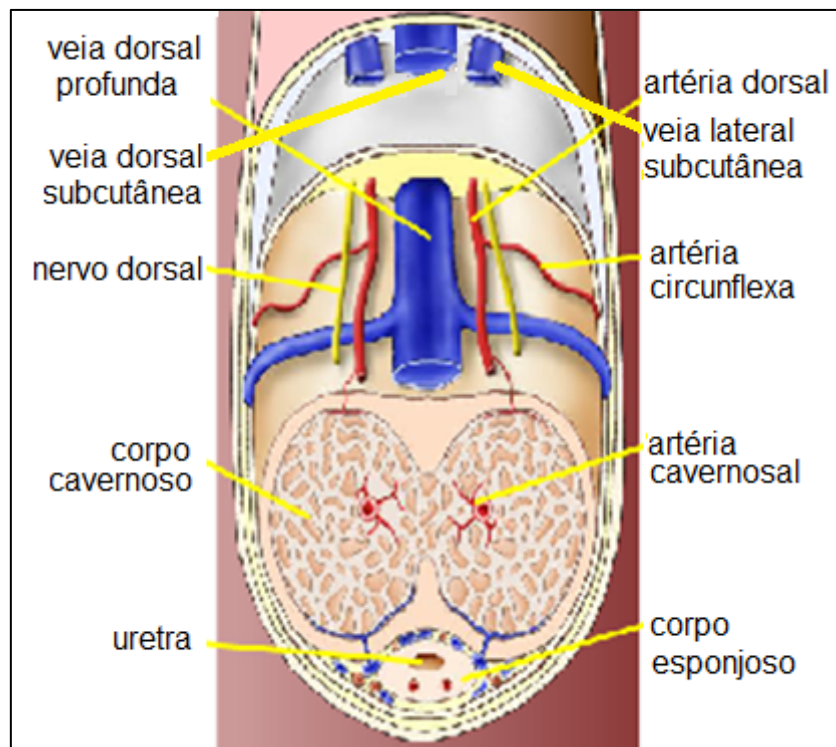
**Desenvolvimento de uma formulação lipossomal de uso tópico contendo o peptídeo sintético PnPP-19 para o tratamento da disfunção erétil**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A fisiologia da ereção peniana

O pênis é formado primariamente por massas cilíndricas de tecido erétil (corpo cavernoso e corpo esponjoso) que são preenchidos por sangue durante a ereção, por meio de um sistema de vasos, artérias e capilares (**Figura 1**). O pênis é rico em fibras simpáticas e parassimpáticas. A atividade simpática estimula o estado não ereto do pênis, com liberação de norepinefrina (NE) e outros agonistas, como a endotelina-1 (ET-1) e a angiotensina II (AngII). Por outro lado, a acetilcolina (ACh) estimula a manutenção do estado ereto ([Hirano, 2007](#)).

**Figura 1** – Representação esquemática do sistema de irrigação e inervação do pênis

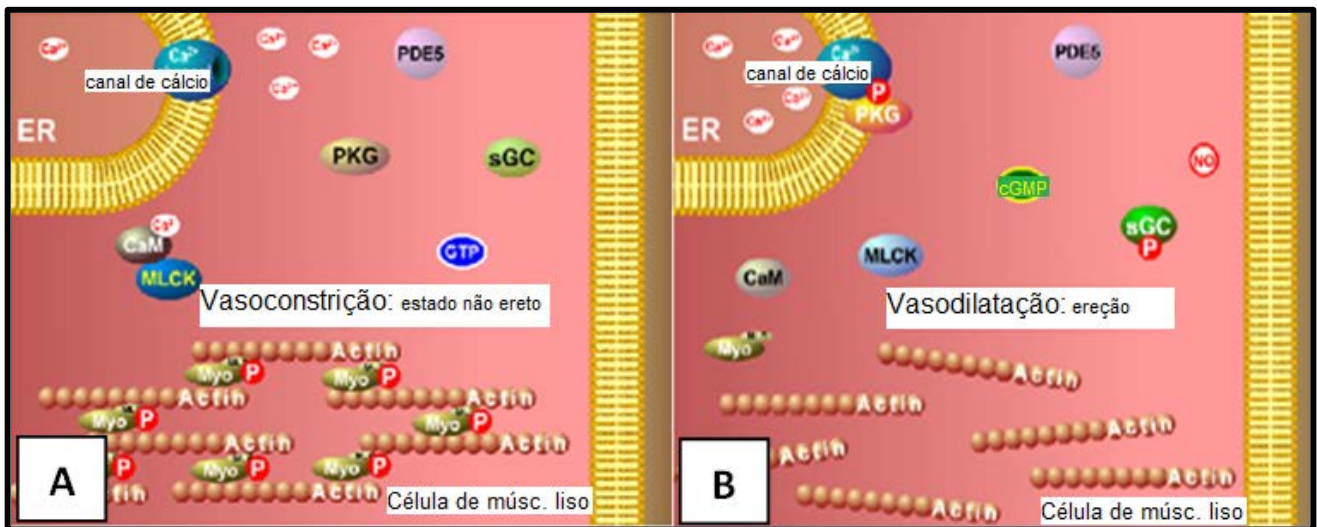


Adaptado de [Integrity, Thomson Reuters, 2012](#)

No estado não ereto, as células de músculo liso cavernosal e as células de músculo liso vascular peniano encontram-se contraídas (**Figura 2A**). Nesse estado, o cálcio intracelular do músculo liso está ligado à calmodulina (CaM), que ativa a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK), que por sua vez fosforila a cadeia leve da miosina (MLC). Esta fosforilação leva à formação de uma ligação cruzada entre as MLC e os filamentos de

actina, levando à contração do músculo liso vascular (vasoconstrição) e do músculo liso cavernosal. A enzima Rho-cinase também pode fosforilar a MLC e inibir sua desfosforilação, levando à contração do músculo liso. Nessas condições, o suprimento de sangue é diminuído e a ereção é impossibilitada (Chitale et al., 2001; Wang et al., 2002; Priviero et al., 2007).

**Figura 2 - Moléculas envolvidas na flacidez (A) e na ereção (B) do pênis**



Adaptado de Integrity, Thomson Reuters, 2012. Actin (actina); Myo (miosina); ER (retículo endoplasmático); MLCK (cinase da cadeia leve de miosina); CaM (calmodulina); PKG (proteína cinase G); sGC (guanilato ciclase solúvel); NO (óxido nítrico); PDE5 (fosfodiesterase 5); cGMP (guanosina monofosfato cíclica); GTP (guanosina trifosfato).

A ereção (**Figura 2B**) é um evento hemodinâmico, que depende do relaxamento do músculo liso vascular peniano (vasodilatação) e das células musculares lisas cavernosais. Ela ocorre após estímulo sexual físico ou emocional. Na presença de um estímulo sexual, a enzima óxido nítrico sintetase (NOS) converte L-arginina e  $O_2$  em óxido nítrico (NO). O NO é então liberado de terminações nervosas nitrérgicas ou de células endoteliais e se difunde para as células de músculo liso, causando ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC). A sGC converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP), que por sua vez ativa a proteína cinase G (PKG), também conhecida como proteína cinase (PK) dependente de cGMP, PK1. A PKG ativada inicia uma cascata de fosforilação que resulta na manutenção do cálcio em reservatórios intracelulares, como o retículo endoplasmático (ER). Baixos níveis de cálcio no citoplasma impedem a ligação da actina com a miosina, levando, portanto, ao relaxamento do músculo liso dos vasos

penianos (vasodilatação das arteríolas e sinusóides), e ao relaxamento do corpo cavernoso. A adenosina monofosfato cíclica (cAMP), ativada por vários mensageiros intracelulares, neuronais ou parácrinos, como as prostaglandinas E (PGE), também auxilia nesse processo. Como consequência, há um aumento do fluxo sanguíneo e um alargamento do tecido do corpo cavernoso, induzindo a ereção (Anderson, 2001; Priviero et al., 2007).

Existem várias isoformas da NOS: nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e iNOS (induzida). Essas três isoformas foram detectadas no pênis, com predominância de nNOS e eNOS (Toda et al, 2005; Leite et al, 2007).

Vários outros compostos envolvidos nos mecanismos de ereção foram descritos. Dentre eles, estão o Polipeptídeo Intestinal Vasoativo (VIP), encontrado em neurônios do tecido cavernoso (Hedlund e Andersson, 1985), os prostanóides da via metabólica do ácido araquidônico (Lin et al., 2013), PGE2 e PGF2 $\alpha$  (Moreland et al., 2001), tromboxano A2, PGE1 (Foldvari et al., 1998), canais para K<sup>+</sup> ativados por cálcio (Király et al., 2013), adrenomedulina (Marinoni et al., 2005), o peptídeo relacionado ao gene da calcitocina (Bivalacqua et al., 2001) e a testosterona (Isidori et al., 2014).

O término da ereção é regulado pela enzima fosfodiesterase 5 (PDE5), que rapidamente converte cGMP em GMP. A PDE5 é encontrada em vários tecidos, incluindo as células do músculo liso vascular nas paredes de artérias e veias sistêmicas (Lin et al., 2000).

## 1.2 A epidemiologia da disfunção erétil (DE)

A DE é definida como a incapacidade persistente em adquirir e/ou manter uma ereção suficiente para um desempenho sexual satisfatório (NIH Consensus Conference, 1993).

No Brasil, cerca de 25 milhões de homens com mais de 18 anos apresentam algum grau de dificuldade erétil, e 1,3 milhões apresentam disfunção moderada ou grave (Moreira Jr et al., 2000). Segundo Trivedi e colaboradores (2014), 52% dos homens entre 40 – 70 anos e 10% dos homens entre 18 – 59 anos sofrem de DE nos Estados Unidos, enquanto, no Reino Unido, 26% dos homens entre 18 – 75 anos e 20% dos homens com mais de 40 anos sofrem desta doença.

Existem quatro grupos diferentes de classificação da DE: (1) psicogênica; (2) vasculogênica ou orgânica (75% dos casos); (3) neurológica; (4) endocrinológica. Dentre as causas psicogênicas da DE pode-se citar a ansiedade. As causas neurológicas incluem a doença de Parkinson, danos na medula espinhal e esclerose múltipla. Existem ainda causas mecânicas, como traumas genitais ou cirurgias. Outra possível causa seria de origem iatrogênica, decorrente de efeitos colaterais de diferentes tratamentos farmacológicos. Dentre as condições que aumentam a incidência de DE, encontram-se a idade (diminuição dos neurônios contendo NOS), diabetes mellitus, tabagismo, alcoolismo, hipogonadismo, hiperprolactinemia, hipotireoidismo, hipertireoidismo, síndrome de cushing, aterosclerose e hipercolesterolemia (Bivalacqua et al., 2003; Ferrini et al., 2001).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que a idade é fator importante na prevalência de DE. Acredita-se que o principal fator na patogênese da DE associada à idade seja o aumento da sinalização via RhoA/Rho-cinase, que leva a um aumento na contração do músculo liso peniano mediante a inibição da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP) (Jin et al., 2006).

### 1.3 O tratamento da DE

Na década de 1930, o tratamento da DE era realizado mediante cirurgias (inserção de um pedaço de cartilagem da costela humana no pênis). Posteriormente, iniciou-se o uso de próteses e de procedimentos de revascularização. Atualmente, a farmacoterapia inclui agentes vasoativos, como o alprostadil (PGE1), administrado por via intrauretral ou intracavernosal, e inibidores de PDE5, como o sildenafil (Viagra<sup>®</sup>), o vardenafil e o tadalafil, administrados por via oral (Wright, 2006).

Os inibidores de PDE5 diminuem a degradação de cGMP. Dessa forma, permitem a manutenção do relaxamento do músculo liso e a vasodilatação, além de facilitar a liberação do neurotransmissor glutamato. O glutamato é liberado pelos neurônios pré-sinápticos e age em receptores acoplados à Proteína G, como NMDA e AMPA, que estão relacionados ao aprendizado e à memória. Além disso, o glutamato estimula a NOS a nível pós-sináptico. Desta forma, a inibição de PDE5 pode ser um tratamento eficaz para hipertensão, além de melhorar diferentes tipos de aprendizado e memória e proteger contra neurodegeneração, por exemplo, na doença de Alzheimer. Atualmente, o sildenafil é o inibidor de PDE5 mais utilizado para o tratamento da DE, por administração oral.

Formulações de sildenafil para administração tópica vêm sendo estudadas e resultados promissores vêm sendo apresentados. [Elnaggar e colaboradores \(2011\)](#) encapsularam citrato de sildenafil em carreadores lipídicos nanoestruturados (100 nm) e em nanopartículas lipídicas sólidas (180 nm) e mostraram aumento da permeação cutânea da droga, em comparação com sua forma livre, em ensaios *in vitro* utilizando pele humana. Embora os inibidores da PDE-5 tenham revolucionado o tratamento da DE, considerável número de pacientes (30-35%) não responde a esses fármacos, indicando a necessidade de tratamentos alternativos ([Nunes et al., 2008](#)).

A PGE1 atua diretamente no músculo trabecular, ao se ligar a receptores específicos, aumentando a síntese de cAMP ([Foldvari et al., 1998](#)). Atualmente, a PGE1 é utilizada mediante a auto-injeção intracavernosal ou injeção intrauretral por pacientes que não respondem aos inibidores de PDE5 ([Bivalacqua et al., 2000](#); [Hellstrom et al., 1996](#)).

Outras formulações contendo PGE1 ou seus derivados foram testadas, mas ainda não chegaram ao mercado, como formulações para administração por via oral (limaprost) ([Sato et al., 1997](#)); formulações onde a PGE1 foi incluída em alfa-ciclodextrina para auto-injeção intracavernosal ([Buvat et al., 1998](#)); formulações onde a PGE1 foi encapsulada em lipossomas para aplicação intrauretral ([Engelhardt et al., 1998](#)) e formulações lipossomais, géis ou PGE1 esterificada, para aplicação tópica ([Foldvari et al., 1998](#); [McVary et al., 1999](#); [Schanz et al., 2002](#)).

As estatinas também foram descritas como ativadores da função erétil. Seu mecanismo de ação envolve a inibição da via RhoA/Rho-cinase. Como consequência, a ereção é facilitada mediante a atenuação da vasoconstrição. Além disso, as estatinas regulam positivamente a atividade da eNOS ([Solomon et al., 2006](#)). Outros inibidores de Rho cinase vêm sendo estudados para o tratamento da DE, como o SAR407899, que compete com o ATP pelo sítio ativo dessa enzima ([Guagnini et al., 2012](#)).

[Gomaa e colaboradores \(1996\)](#) investigaram o uso de um creme contendo uma mistura de vasodilatadores com diferentes mecanismos de ação (aminofilina, dinitrato de isossorbídeo e mesilato de co-dergocrina) com resultados satisfatórios no tratamento da DE. Porém, [Naude e Le Roux \(1998\)](#) reportaram não ter conseguido reproduzir os efeitos favoráveis relatados por [Gomma e colaboradores \(1996\)](#).

O conhecimento tradicional de algumas regiões lista algumas plantas com poder afrodisíaco, algumas espécies com comprovação científica, como os polifenóis do vinho e

do chá verde e as saponinas do ginseng (Diebolt et al., 2001; Huang et al., 1999; De Andrade et al., 2007). Além disso, peptídeos provenientes da peçonha de artrópodes (aranhas e escorpiões) vêm sendo estudados quanto a seu efeito sobre a DE. Desses, destacam-se peptídeos isolados do veneno do escorpião *Tityus serrulatus* e da aranha *Phoneutria nigriventer* (Teixeira e cols, 1998; Nunes et al., 2008).

Segundo Ohebshalom e Mulhal (2005), o armamentário de substâncias bioativas para a farmacoterapia tópica e transdérmica no tratamento da DE masculina tende a crescer na próxima década.

#### 1.4 Aplicação tópica de substâncias bioativas e a barreira epitelial

A pele é uma rota alternativa para administração de drogas, promovendo mais conforto para o paciente e evitando vários efeitos colaterais provenientes da administração oral ou parenteral. Além disso, a administração tópica diminui a degradação enzimática das substâncias bioativas (Bolzinger et al., 2012). A rota transdérmica de administração evita o metabolismo hepático de primeira passagem e permite a liberação controlada de fármacos na circulação sistêmica. Porém, a pele constitui uma barreira a ser ultrapassada (Förster et al., 2009).

A pele é uma membrana heterogênea, que apresenta uma superfície lipofílica e camadas internas hidrofílicas. As camadas da pele se diferem em sua composição e estrutura. A hipoderme é composta de tecido adiposo e é a camada mais profunda da pele. A derme é uma camada hidrofílica irrigada pela circulação sanguínea e composta de um gel onde uma rede densa de fibras (colágeno e elastina) confere resistência mecânica à pele. Qualquer substância que atinge a derme é capaz de passar para a circulação sistêmica. A epiderme é um epitélio dividido em duas partes distintas: a epiderme viável, composta de uma camada hidrofílica viva (70% água), representada pelo estrato granuloso, o estrato espinhoso e o estrato germinativo; e o estrato córneo, uma camada hidrofóbica (13% água) formada por células mortas, resultando em uma estrutura córnea (Bolzinger et al., 2012; Förster et al., 2009). Em regiões de pele mais espessa, como a região palmoplantar, há uma camada adicional, o estrato lúcido, que se localiza entre o estrato granuloso e o córneo (**Figura 3**).

**Figura 3 – Ilustração das camadas da pele.**



Fonte: <http://www.iqb.es/dermatologia/atlas/anatomia/anatomia08.htm>, acessado em 01/10/2012.

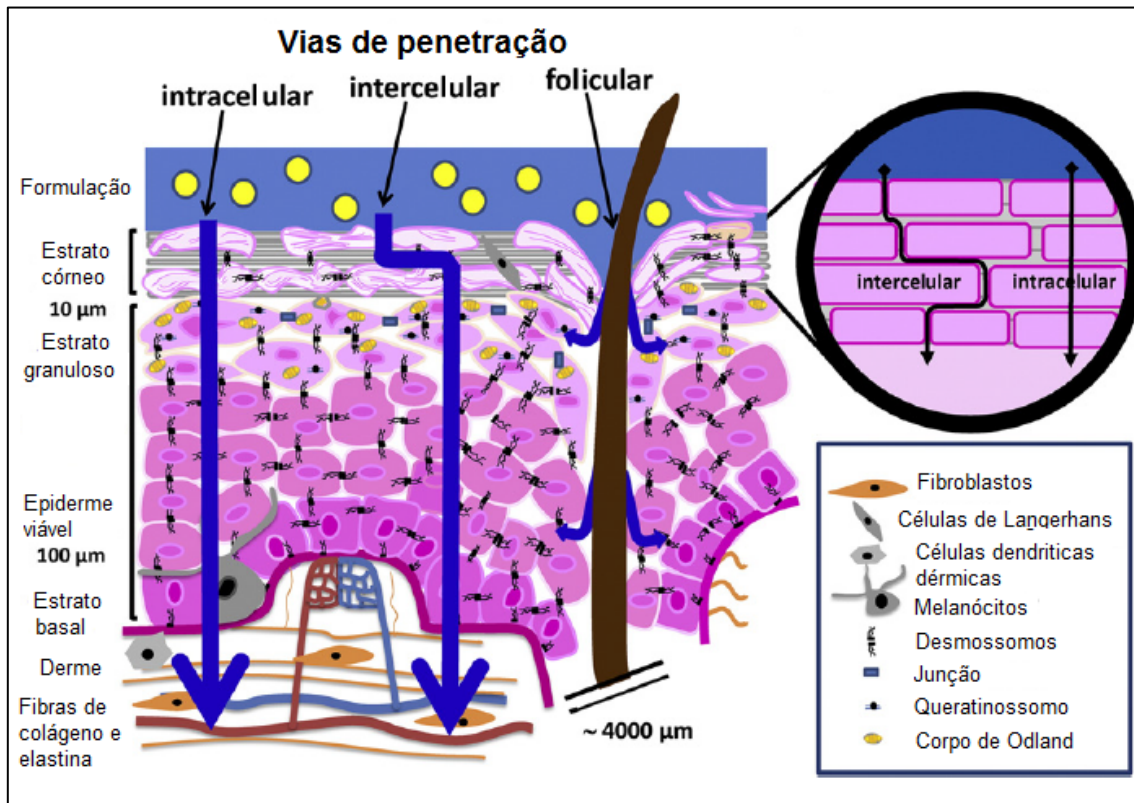
O estrato córneo é a camada mais externa da pele e constitui uma barreira altamente resistente que limita a penetração de fármacos na pele. Sua estrutura contribui para sua função, tanto como barreira contra a perda de água, quanto como uma barreira contra o ambiente externo. A camada córnea, de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de espessura, consiste em células mortas (geralmente de 15 a 20 camadas) denominadas corneócitos. Os corneócitos são preenchidos por queratina e embebidos em uma matriz intercelular complexa, formada por bicamadas lipídicas organizadas. As proteínas representam 75-80% do conteúdo do estrato córneo, enquanto que os lipídeos representam de 5 a 10%. O conteúdo remanescente ainda não foi elucidado. A composição dos lipídeos compreende nove tipos de ceramidas (40-50% da massa seca), colesterol (25%), ácidos graxos livres saturados (10-15%), e 5% de outros lipídeos (sulfato de colesterol, ésteres de colesterol, glicosil ceramidas). O arranjo lipídico apresenta uma estrutura que alterna regiões lipídicas e aquosas, o que dificulta a difusão tanto de substâncias apolares quanto de substâncias polares (Förster et al., 2009; Bolzinger et al., 2012).

O meio intercelular do estrato córneo não é apenas formado por lamelas lipídicas. Análises de microscopia eletrônica permitiram observar que esse meio apresenta um arranjo lamelar incomum: um padrão repetitivo de bandas translúcidas em uma sequência largo-estreito-largo. Mediante análises de difração de raios-X, observou-se que a fase lamelar tem uma longa periodicidade de 13 nm, sendo que em alguns casos foi observada uma periodicidade menor de 6 nm. As cadeias lineares insaturadas de ceramidas e ácidos graxos livres permitem que essas moléculas se empacotem lateralmente formando domínios altamente ordenados de fase gel, a qual apresenta uma baixa temperatura de transição de fase (32°C). A composição do estrato córneo humano, rico em ceramidas, resulta em um meio lipídico menos fluido que o de outras membranas biológicas compostas de fosfolípidos cristalinos. Além da organização lamelar, o empacotamento lateral de lipídeos é de grande importância para as propriedades de barreira da pele. Ele controla tanto a mobilidade dentro das lamelas lipídicas quanto a permeabilidade da membrana (Bolzinger et al, 2012).

A absorção percutânea descreve a entrada de substâncias bioativas pela pele a partir de uma formulação farmacêutica. Esse processo é dividido em três etapas: penetração (entrada de uma substância em uma camada específica da pele); permeação (a passagem da substância através das camadas da pele); e absorção (a captação da substância bioativa pelo sistema vascular) (Bolzinger et al., 2012). O grau de penetração e/ou permeação depende não apenas da substância bioativa como também do veículo no qual ela é formulada e da interação entre o veículo e a pele (Förster et al., 2009).

As três principais rotas de penetração através do estrato córneo (**Figura 4**) são: (1) a rota intercelular; (2) a rota intracelular; e (3) a rota via apêndices da pele (folículo piloso e glândulas sudoríparas). A terceira via é considerada pouco significativa, visto que apenas 0,1% do total da pele humana é ocupado por apêndices da pele; porém, estudos recentes sugerem que ela é relevante em situações específicas, como a penetração de partículas (Bolzinger et al., 2012). A segunda via é a mais direta, mas requer um transporte através dos densos corneócitos, preenchidos por queratina, seguido de múltiplas transferências entre os corneócitos e as áreas intercelulares preenchidas por lipídeos. A primeira via é a mais comum. Dessa forma, a principal barreira para a permeação de fármacos é a matriz lipídica intercelular (Förster et al., 2009).

**Figura 4 – Ilustração das três vias de penetração através do estrato córneo: intracelular, intercelular e folicular**



Adaptado de Bolzinger et al., 2012.

Devido à composição das diferentes camadas da pele, como mostrado anteriormente, substâncias lipofílicas tendem a se acumular no estrato córneo, substâncias muito hidrofílicas tendem a se acumular na superfície, e substâncias anfílicas tendem a atravessar a pele. Além da hidrofobicidade, a massa molecular e o volume da substância também interferem na penetração. Moléculas com massa molecular maior que 350 Da apresentam menor probabilidade de atravessar o estrato córneo (Song and Kim, 2006).

O maior desafio para aplicação dérmica e transdérmica é adequar o veículo no qual o fármaco está incorporado para atingir o sítio alvo (superfície celular, compartimentos da pele ou circulação sistêmica). Portanto, novas estratégias têm sido desenvolvidas para aumentar a penetração através da pele sem causar danos à mesma.

Segundo Moser e colaboradores (2001), o fluxo de um fármaco através do estrato córneo pode ser descrito pela primeira Lei de Fick:  $J = (D_m \times C_{sm} \times C_v) / (L \times C_{sv})$ ; onde  $D_m$  é o coeficiente de difusão do fármaco na membrana,  $C_{sm}$  é a solubilidade do fármaco na membrana,  $L$  é a espessura para difusão através da membrana,  $C_v$  é a concentração do

fármaco dissolvido no veículo,  $C_{sv}$  é a solubilidade do fármaco no veículo. A partir da primeira Lei de Fick, três estratégias podem ser postuladas para promover a permeação: (1) aumentar o coeficiente  $D_m$ , mediante a desorganização dos lípidos do estrato córneo; (2) aumentar  $C_{sm}$ ; (3) aumentar  $C_v/C_{sv}$ , ou seja, o grau de saturação do fármaco.

O comportamento de absorção pela pele é sensível a parâmetros físicos e químicos que alteram o empacotamento de lipídeos do estrato córneo. Como parâmetros físicos, a temperatura, estímulos externos como a radiação UV e o gradiente de concentração de água no estrato córneo são de grande importância. Como fatores químicos, são importantes os compostos que interagem com os lipídeos do estrato córneo e alteram seu comportamento. Esses compostos são denominados “ativadores de penetração” ou “promotores de permeação” e podem ser adicionados intencionalmente para acelerar a permeação. Excipientes da formulação ou o próprio fármaco podem atuar como ativadores de penetração, mesmo não sendo utilizados com esse objetivo. Os ativadores de penetração afetam tanto o fluxo de entrada quanto o fluxo de saída de água e outros compostos. A reversibilidade e o tempo de recuperação da organização molecular do estrato córneo *in vivo* são outros aspectos relevantes. Exemplos de ativadores de penetração são o Azone, DMSO, etanol, soluções micelares, propilenoglicol (Moser et al., 2001); ácidos graxos, como o ácido oléico (Golden et al., 1987); acilação de peptídeos com ácido butírico, capríco e octanóico (Yamamoto et al., 2003); surfactantes e terpenos. Os ativadores de penetração podem agir de duas formas distintas: (1) se misturando com os lipídeos do estrato córneo, ou (2) extraíndo parte dos lipídeos do estrato córneo ao solubilizá-los em micelas. A segunda forma leva a uma diminuição das propriedades de barreira do estrato córneo, afetando o transporte de material hidrofílico e levando à saída de água através da pele (Bolzinger et al., 2012).

### 1.5 Formulações de uso tópico à base de lipossomas

Lipossomas são estruturas lipídicas, geralmente constituídas por fosfolípidos, que em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas contendo uma camada aquosa interna, dispersas num meio aquoso externo. Os fármacos podem ser incorporados na bicamada lipídica (fármacos lipofílicos), no compartimento interno aquoso (fármacos hidrofílicos) ou na interface das bicamadas (fármacos anfifílicos) (Lasic, 1998). Os lipossomas podem ser classificados em termos de

tamanho, número de bicamadas (uni e multilamelares) e composição. Vesículas unilamelares pequenas (SUV) são formadas por uma bicamada única com diâmetro médio de 25-100 nm. Vesículas unilamelares grandes (LUV) também possuem uma bicamada única e apresentam diâmetro superior a 100 nm, enquanto as vesículas multilamelares (MLV) compreendem bicamadas lipídicas concêntricas com diâmetros de 1-5  $\mu\text{m}$  (Lasic, 1998). Com relação à composição e ao mecanismo de liberação, as vesículas podem ser classificadas como convencionais, de circulação prolongada, sítio-específicas e polimórficas (Batista; Carvalho; Magalhães 2007).

Os lipossomas são biocompatíveis, biodegradáveis e podem contribuir na redução de exposição de tecidos sensíveis a substâncias tóxicas. Podem ser administrados por uma variedade de vias: tópica, intramuscular, subcutânea, pulmonar, nasal, oral e intravenosa (Grant, 2002). São os sistemas nano e microparticulados mais estudados para aplicações farmacêuticas (Pardeike, Homos & Muller, 2009).

Lipossomas especiais, como os niossomas, os transferossomas e os etossomas, apresentam-se como potenciais sistemas carreadores transdérmicos, para entrega de moléculas iônicas e polipeptídeos (Azmin et al., 1985; Cevc e Blume, 1992; Touitou et al., 2000; Pierre e Costa, 2011).

Os niossomas são vesículas auto-organizáveis compostas por surfactantes sintéticos não-iônicos e apresentam uma estrutura semelhante à dos lipossomas (Azmin et al., 1985). Porém, os niossomas são mais estáveis que os lipossomas em relação a incompatibilidades químicas e oxidação. Além disso, são mais baratos (Pardeike, Homos & Muller, 2009).

Os etossomas são nanovesículas elásticas, à base de fosfolípidos, que contêm um alto teor de etanol (20-45%). O etanol aumenta a permeabilidade das vesículas, levando a um aumento na fluidez dos lipídeos e em sua permeabilidade através da membrana celular (Touitou et al., 2000; Fireman, 2011). Tanto os etossomas quanto os transferossomas são capazes de penetrar através da pele por canais no estrato córneo que apresentam diâmetro dez vezes menor que o das vesículas (Pirvu et al, 2010)

Os transferossomas são lipossomas deformáveis, contendo fosfolípidos como componente principal e um surfactante (10-25%) que aumenta sua elasticidade e deformabilidade. São geralmente compostos de fosfatidilcolina e colato de sódio (Cevc e Blume, 1992). Os transferossomas são também conhecidos como lipossomas

ultradeformáveis, lipossomas flexíveis ou flexossomas. Formulações para aplicação tópica utilizando essa classe de lipossomas apresentam maior penetração através da pele, e conseqüentemente, promovem uma maior entrega de drogas em diferentes camadas da pele (Cevc et al., 2002). Os lipossomas deformáveis consistem em vesículas formadas por fosfolípides e um ativador, que é geralmente um surfactante de cadeia única, que desestabiliza a bicamada lipídica dos lipossomas, aumentando sua elasticidade e flexibilidade (Elsayed et al., 2007). Vários estudos demonstraram que a penetração de vesículas lipossomais através da pele está diretamente relacionada com a sua deformabilidade. A alta flexibilidade de tais vesículas elásticas permite que elas se comprimam entre as células do estrato córneo e penetrem, de forma intacta, nas camadas profundas da pele, podendo resultar num efeito terapêutico comparável ao da injeção subcutânea (El Maghraby et al., 2008).

Para aumentar a permeação das formulações tópicas, os lipossomas catiônicos são mais indicados, visto que aumentam a penetração através do estrato córneo e camadas mais profundas da pele, quando comparados com lipossomas neutros e aniônicos (Dragicevic-Curic et al., 2010; Montenegro et al., 1996). Os lipossomas aniônicos tendem a aumentar a retenção da droga na pele, diminuindo sua permeação (Li et al., 2012; Puglia et al., 2005). Além disso, os lipossomas deformáveis catiônicos apresentam maior estabilidade que os lipossomas aniônicos, evitando fusão ou agregação de vesículas (Dragicevic-Curic et al., 2010).

Diferentes composições de lipossomas deformáveis catiônicos são descritas na literatura. Dragicevic-Curic e colaboradores (2010) apresentaram resultados de estabilidade para lipossomas deformáveis catiônicos contendo fosfatidilcolina de soja (SPC), esterilamina (SA) e Tween 20. Esses lipossomas foram estáveis a 4°C por todo tempo avaliado (9 meses), com pequena variação no diâmetro e índice de polidispersão, mantendo 96,22–97,59% do conteúdo encapsulado de termoporfina. Song e Kim (2006) utilizaram lipossomas deformáveis catiônicos compostos de dioleiltrimetilamôniopropano (DOTAP) e Tween 20. Esses lipossomas foram estáveis a 4°C por todo tempo avaliado (2 meses). Os mesmos autores demonstraram que a encapsulação de heparina de baixa massa molecular foi três vezes maior em lipossomas deformáveis catiônicos, em comparação a lipossomas deformáveis aniônicos ou neutros. Além disso, demonstraram

que a estabilidade físico-química, a penetração na pele *in vitro* e a localização nas camadas mais profundas da pele *in vivo* foram maiores para lipossomas catiônicos.

O uso de lipossomas para tratamento tópico tem sido amplamente estudado, tanto para entrega de drogas de baixo peso molecular, menores que 500 Da, quanto para drogas de alto peso molecular, maiores que 500 Da (Pinaki, Patiolla e Singh, 2010).

Carneiro e colaboradores (2010) avaliaram o uso de lipossomas constituídos por fosfatidilcolina e colesterol (diâmetro médio de aproximadamente 400 nm) como carreadores de paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, de massa molar igual a 713,61 Da, para tratamento tópico de leishmaniose cutânea. Observou-se um aumento da permeação cutânea do fármaco, o que certamente contribuiu para o aprimoramento de sua atividade leishmanicida em camundongos experimentalmente infectados.

Simões e colaboradores (2009) incorporaram as enzimas superóxido dismutase (> 30 KDa) e catalase (> 200 KDa) em lipossomas ultradeformáveis, com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade das enzimas em aplicação tópica. Os resultados sugerem que a utilização de lipossomas ultradeformáveis pode funcionar como uma nova forma de tratamento sítio-específico de inflamação.

Foldvari e colaboradores (1998) descreveram o uso de lipossomas contendo PGE1 (354 Da), para o tratamento tópico da DE. Nesse trabalho os autores demonstraram um aumento da permeação cutânea da PGE1 *in vitro*, e um aumento da sua penetração no corpo cavernoso *in vivo*, em pacientes humanos com DE, com efeito máximo 45 minutos após aplicação.

No banco de dados da EPO, foram encontrados, em janeiro de 2013, oito documentos de patentes (patentes concedidas ou pedidos de patentes) envolvendo o uso de lipossomas no tratamento da DE. Quatro compreendiam a PGE1 como princípio ativo (EP0399175; EP0512916; EP0760366; EP0874622); e os outros compreendiam EDTA e glutatona reduzida (US2007065497); extratos de *Erythroxylum vacciniifolium* (WO2008098329); peptídeos derivados da peçonha da aranha chilena *Latrodectus mactans* (US2011021445); e um doador de NO (WO2012125214).

### 1.6A toxina PnTx2-6

A toxina PnTx2-6 foi purificada da peçonha da aranha *Phoneutria nigriverter*, popularmente conhecida como aranha armadeira, que é responsável por 50% dos

acidentes com aranhas nas regiões sul e sudeste do Brasil (Cardoso et al., 2004). Inicialmente, obteve-se a fração PhTx2, pela combinação de cromatografias de gel filtração e de fase reversa (Rezende Jr. et al., 1991). Essa fração, uma mistura de 9 polipeptídeos na faixa de 2 a 9 KDa, foi submetida a cromatografias de filtração e fase reversa, o que permitiu a purificação de cinco polipeptídeos, que foram sequenciados e denominados PnTx2-1 (53 resíduos de aminoácidos, de massa molar igual a 5.838,8 Da), PnTx2-3 (40 resíduos, de massa molar igual a 6.015,0), PnTx2-5 (49 resíduos de aminoácidos, de massa molar igual a 5.116,6 Da), PnTx2-6 (48 resíduos de aminoácidos, de massa molar igual a 5.291,3 Da) e PnTx2-9 (32 resíduos, de massa molar igual a 3.742,1 Da). As toxinas PnTx2-1, PnTx2-5 e PnTx2-6 apresentam alto conteúdo de cisteínas e foram mais tóxicas quando ensaiadas em camundongos. Os sintomas tóxicos observados foram: lacrimejamento, salivação, sudorese, agitação e paralisia espástica seguida de morte (Cordeiro et al., 1992).

Os precursores codificadores das toxinas da peçonha de *Phoneutria* são estruturalmente apresentados como pré-pró-peptídeos (Kalapothakis et al., 1998, Diniz et al., 2006). O cDNA que codifica para a proteína precursora de PnTx2-6 codifica para uma sequência de 82 resíduos de aminoácidos, sendo que 17 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos formam o peptídeo sinal e 17 resíduos formam um pró-peptídeo rico em glutamato, que antecede a proteína madura. A toxina madura é composta por 48 resíduos de aminoácidos, incluindo a presença de 10 cisteínas (Kalapothakis et al., 1998).

A toxina PnTx2-6 tem sido alvo de vários estudos envolvendo canais iônicos, principalmente por reproduzir o efeito tóxico e a atividade eletrofisiológica da fração PhTx2 (Araújo et al., 1993; Matavel et al., 2002; 2009). Sua ação pode ser atribuída ao retardamento da corrente de inativação dos canais para sódio (Araújo et al., 1993; Mattiello-Sversuta; Cruz-Hofling, 2000; Matavel et al., 2009). Em relação à atividade em canais para sódio neuronais, PnTx2-6 apresenta seis vezes mais afinidade quando comparada com PnTx2-5 (Matavel et al., 2009). Essas duas toxinas diferenciam-se em apenas 5 resíduos de aminoácidos, que estão nas posições 9, 12, 35, 37 e 45, sendo Tyr e Pro, Val e Glu, Asn e Tyr, Leu e Trp, Ser e Asn, respectivamente para PnTx2-5 e PnTx2-6 (Cordeiro et al., 1992; Matavel et al., 2009).

Segundo Matavel e colaboradores (2009), os resíduos carregados positivamente (Arg20, Arg32, Lys42, Lys47 e Lys48) circundam a parte hidrofóbica da toxina, formando

uma região com as características necessárias para interação com o sítio 3 do canal de sódio. Os autores propõem que essa disposição de cargas, juntamente com os resíduos aromáticos Phe36, Trp40 e Tyr41, componham a superfície bioativa da PnTx2-6. A presença dos aminoácidos Tyr35 e Trp37 parece conferir maior afinidade ao canal, segundo os mesmos autores.

As toxinas PnTx2-5 e PnTx2-6 foram capazes de causar priapismo em camundongos e ratos, induzindo o relaxamento dos músculos lisos do corpo cavernoso desses animais (Andrade et al., 2008; Nunes et al., 2008). Segundo Andrade e colaboradores (2008), não foi observado efeito colateral local ou sistêmico após a administração intracavernosal em camundongos das duas toxinas na dose de 0,006 µg/kg. Com esta dose, observou-se ereção entre 35 e 45 minutos após a injeção, e perda da ereção após 120 a 140 minutos. Segundo Nunes e colaboradores (2008), a ereção induzida por PnTx2-6 pode ser observada aproximadamente 15 minutos após a injeção subcutânea ou intravenosa em ratos Wistar, numa dose de 12 µg/kg. Esses autores relataram que essa é a dose que induz melhor resposta, após testes preliminares com doses de 3 a 48 µg/kg. Estudos de biodistribuição utilizando PnTx2-6 marcada com tecnécio-99m e administrada por via intra-venosa revelaram que, após 20 minutos, a toxina marcada encontra-se predominantemente nos rins e bexiga, sendo também encontrada no tecido peniano. Sugere-se que existam receptores específicos para essa toxina no corpo cavernoso (Nunes et al., 2008).

Nunes e colaboradores (2010) sugeriram que o efeito potenciador de PnTx2-6 sobre a ereção peniana de ratos parece ser mediado pelo relaxamento da vasculatura e do músculo liso no corpo cavernoso, induzido pela liberação de NO. A atividade da toxina PnTx2-6 na potencialização da ereção em ratos anestesiados foi inibida por pré-tratamento com L-NAME (inibidor não seletivo da enzima NOS). Esses autores também verificaram que a toxina é capaz de reverter a DE em ratos hipertensos (DOCA-SAL). Em estudo mais recente, Nunes e colaboradores (2012a) verificaram que a toxina PnTx2-6 melhora a função erétil em ratos idosos (60-61 semanas), com aumento do relaxamento cavernoso via sinalização NO/cGMP. Além disso, demonstraram que a toxina não modifica a expressão da enzima NOS nos tempos investigados, mas parece aumentar a atividade dessa enzima, tanto em ratos normais, quanto em ratos idosos. Em outro estudo recente,

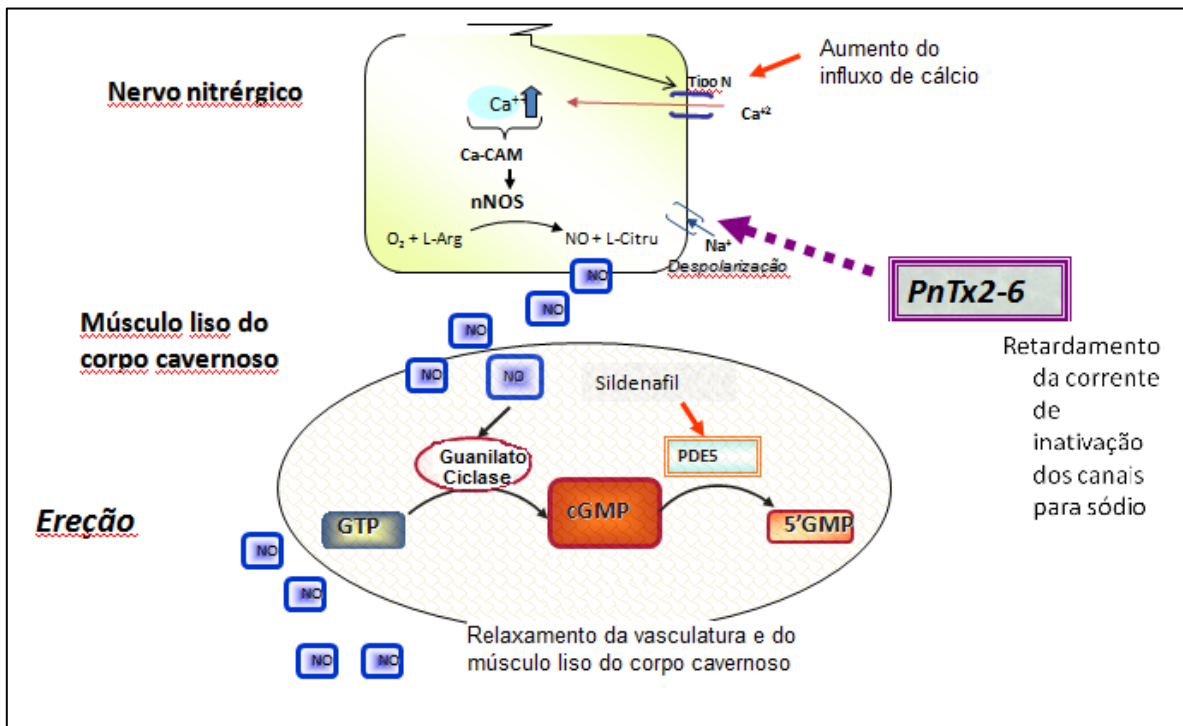
os mesmos autores mostraram que essa toxina foi capaz de recuperar a função erétil em camundongos diabéticos (Nunes et al., 2012b).

De acordo com Nunes e colaboradores (2008), visto que PnTx2-6 retarda a inativação de canais para sódio (Araújo et al., 1993; Matavel et al., 2002), esse efeito manteria o estado despolarizado das fibras nervosas, resultando em um aumento no influxo de cálcio (Moura et al., 1998). Dessa forma, a liberação neuronal ou a síntese de NO seria estimulada, visto que este processo depende da biodisponibilidade intracelular de  $Ca^{2+}$ , como demonstrado por Saito e colaboradores (1996), para o corpo cavernoso de coelho.

O mecanismo de ação de PnTx2-6 está representado na **Figura 5**. Nos terminais nervosos, PnTx 2-6 interage com canais para sódio, retardando sua inativação, mantendo o estado despolarizado e aumentando o influxo de cálcio. O cálcio interage com a CaM, que ativa a nNOS, levando a síntese de NO. O NO é liberado pelos terminais nervosos e, no músculo liso da vasculatura e do corpo cavernoso, ele estimula a síntese de cGMP ao ativar a enzima Guanilato ciclase. O cGMP leva a o relaxamento do músculo liso ao ativar a PKG, que inicia uma cascata de fosforilação que mantém o cálcio em reservatórios intracelulares, impedindo a ligação da actina com a miosina e levando, portanto, à vasodilatação e ao relaxamento do corpo cavernoso, aumentando o aporte sanguíneo, que culmina com a ereção. Na **Figura 5** está também representado o mecanismo de ação do Sildenafil, que inibe a enzima PDE5, e diminui a degradação de cGMP. Desta forma, a ação de PnTx2-6 e a ação dos inibidores de PDE5 apresentam um efeito sinérgico (Nunes et al., 2008).

Em tiras de corpo cavernoso de ratos e camundongos, pré-contraídas com fenilefrina ( $10^{-5}$  M) e relaxadas por estímulo elétrico, antes e após adição de PnTx2-6, Nunes e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento com atropina ( $10^{-6}$  M), um antagonista de receptor muscarínico, não alterou o efeito da toxina, indicando que o relaxamento induzido por PnTx2-6 não é mediado por ACh. Da mesma forma, o relaxamento induzido por ACh em tecido cavernosal não foi afetado por PnTx2-6. Por outro lado, bloqueadores de canais para cálcio do tipo N (tosilato de bretilio e  $\omega$ -conotoxina GVIA) aboliram o efeito de PnTx2-6. Esses resultados sugerem que canais de cálcio do tipo N nas terminações nervosas NANC (não adrenérgicas não colinérgicas) estejam envolvidos no relaxamento causado pela toxina.

**Figura 5 – Mecanismo de ação de PnTx2-6 proposto por Nunes e colaboradores (2008)**



Nunes e colaboradores (2012b) mostraram que a nNOS é essencial para o efeito da PnTx2-6, mediante a utilização de camundongos Knockout para eNOS e nNOS. A partir de análise dos níveis de GMPc no corpo cavernoso, os mesmos autores demonstraram que PnTx2-6 aumenta esses níveis, o que sugere que PnTx2-6 ativa canais de cálcio em nervos nitrérgicos, retarda a inativação da corrente para sódio e facilita a via NO/GMPc. O NO foi sugerido como o principal mediador do relaxamento induzido pelos nervos NANC do corpo cavernoso *in vitro*, bem como do aumento da pressão intracavernosa *in vivo*, em uma variedade de animais, incluindo ratos (Burnett et al., 1992), coelhos (Teixeira et al., 1998), cães (Hayashida et al., 1996), macacos (Okamura et al., 1998) e humanos (Leone et al., 1994).

Torres e colaboradores (2010) isolaram e clonaram o gene de 147 pares de bases correspondente à toxina PnTx2-6 madura e expressaram a proteína recombinante em organismo heterólogo (*E. coli*). A proteína recombinante apresentou atividade potenciadora da função erétil semelhante à da proteína nativa em corpo cavernoso de rato (Torres et al., 2010).



*nigriventer*, composições farmacêuticas contendo tal peptídeo e seu uso no tratamento da DE e/ou na potencialização da função erétil.

Como vantagem em relação à toxina PnTx2-6, o peptídeo PnPP-19 não apresentou toxicidade em modelos animais (ratos e camundongos), não apresentou atividade sobre o coração (em preparações de coração isolado de rato) e apresentou baixa imunogenicidade. Além disso, a síntese de PnPP-19, por apresentar menos resíduos de aminoácidos e por não apresentar resíduos de cisteína, torna-se mais simples e menos onerosa. PnPP-19 parece atuar sobre a função erétil por um mecanismo de ação diferente do proposto para PnTx2-6, visto que PnPP-19 não apresenta atividade sobre canais para sódio (Silva et al., 2015).

Surpreendentemente, estudos em andamento no Laboratório de Venenos e Toxinas Animais do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a coordenação da Profa. Maria Elena de Lima Pérez-Garcia, apontam para um efeito analgésico de PnPP-19. O peptídeo interage com receptores opióides  $\mu$  e  $\sigma$  e canabinóides CB1 (dados não publicados). Resultados recentes apontam para um mecanismo de ação de PnPP-19 como agente antinociceptivo semelhante ao das opiorfinas. Sugere-se que PnPP-19, assim como as opiorfinas, seja um inibidor da endopeptidase neutra neprilisina (NEP). A inibição de NEP prolongaria a ação de agonistas de receptores acoplados à proteína G (Davies et al., 2007).

A interação de PnPP-19 com a neprilisinase poderia também influenciar na função erétil do peptídeo. Um dos agonistas cuja ação seria prolongada pela inibição de NEP, o peptídeo natriurético tipo C (CNP), está envolvido no relaxamento do músculo liso do corpo cavernoso. Ele se liga ao receptor guanilil ciclase B (GC-B) e ativa o relaxamento mediado por cGMP: abertura de canais de potássio, hiperpolarização da membrana celular do músculo liso, inibição do influxo de cálcio e inativação da cinase da cadeia leve de miosina - MLCK (Davies et al., 2007).

Estudos para elucidar o mecanismo de ação de PnPP-19 sobre a função erétil ainda estão em andamento, mas os resultados mostram que PnPP-19 leva a um aumento nos níveis de GMPc em tiras de corpo cavernoso de ratos (Silva et al., 2015). Isto indica que PnPP-19 atua na via NO/GMPc em uma etapa anterior àquela em que atuam os inibidores de PDE5 (que inibem a degradação de GMPc). Este fato permite inferir que os efeitos de PnPP-19 e dos inibidores de PDE5 poderiam apresentar sinergismo. Desta

forma, PnPP-19 pode se tornar uma alternativa para o tratamento da DE em pacientes que não respondem ao tratamento por inibidores de PDE5, mas pode também ser utilizado para potencializar o efeito de tais inibidores. Além disto, por apresentar um mecanismo de ação diferente e não apresentar efeito sobre o coração, PnPP-19 pode ser uma alternativa no tratamento de pacientes para os quais os inibidores de PDE5 são contra-indicados.

## 2- JUSTIFICATIVA

O presente trabalho relata o desenvolvimento e a caracterização de uma formulação contendo lipossomas ultradeformáveis catiônicos encapsulando o peptídeo PnPP-19, a avaliação de sua estabilidade e de sua permeação cutânea em pele humana, visando sua aplicação por via tópica para o tratamento da DE e/ou a pontecialização da função erétil.

A aplicação tópica para o tratamento da DE é apontada como uma tendência (Ohebshalom e Mulhal, 2005), e vários autores descrevem o desenvolvimento de formulações de aplicação tópica para este fim (Foldvari et al., 1998; Elnaggar et al, 2011).

Como o peptídeo PnPP-19 apresenta uma ação local, sendo ativo sobre tiras de corpo cavernoso *in vitro*, e ativando a função erétil em ratos *in vivo*, após aplicação subcutânea (Silva et al., 2015), o desenvolvimento de uma formulação para uso tópico contendo PnPP-19 se justifica.

Como relatado anteriormente, o uso de lipossomas ultradeformáveis catiônicos em formulações para aplicação tópica tem sido demonstrado por vários autores, com resultados que apontam para uma maior permeação de substâncias bioativas através da pele, incluindo aquelas de massa molar maior que 500 Da (Dragicevic-Curic et al., 2010; Montenegro et al., 1996; Li et al., 2012; Puglia et al., 2005). Por esta razão, escolhemos desenvolver uma formulação lipossomal com tais características.

Considerando-se que PnPP-19 pode ser obtido por síntese química em grandes quantidades (miligramas), e que a encapsulação do peptídeo em lipossomas pode aumentar a sua permeação cutânea assim como sua estabilidade, ao proteger o peptídeo de degradação por enzimas proteolíticas da pele, a formulação lipossomal proposta no presente trabalho se justifica.

Portanto, propusemos o desenvolvimento e a caracterização química e físico-química de uma formulação lipossomal contendo o peptídeo PnPP-19, a avaliação de sua permeação cutânea e estabilidade a partir de aplicação tópica.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e caracterizar uma formulação contendo lipossomas deformáveis catiônicos encapsulando o peptídeo PnPP-19, para o tratamento da DE e/ou potencialização da função erétil mediante administração tópica.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desenvolver um método para preparação de lipossomas catiônicos deformáveis contendo o peptídeo PnPP-19;
2. Desenvolver um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do peptídeo PnPP-19 para cálculo do seu teor de encapsulação (TE) em lipossomas deformáveis;
4. Desenvolver um método para avaliação de permeação cutânea utilizando pele abdominal humana;
5. Avaliar e comparar a permeação cutânea do peptídeo PnPP-19, encapsulado e não-encapsulado, em lipossomas deformáveis catiônicos;
6. Avaliar a estabilidade do peptídeo PnPP-19 após aplicação tópica.

## **CAPÍTULO I**

# **DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E FÍSICO-QUÍMICA DE LIPOSSOMAS DEFORMÁVEIS CATIÔNICOS CONTENDO O PEPTÍDEO PnPP-19**

## I.1 INTRODUÇÃO

O primeiro capítulo do presente trabalho refere-se à investigação do emprego de diferentes métodos de preparo dos lipossomas deformáveis contendo o peptídeo PnPP-19, sua caracterização química e físico-química e o acompanhamento de sua estabilidade de armazenamento.

## I.2 MATERIAL E MÉTODOS

### I.2.1 Obtenção dos peptídeos sintéticos PnPP-19 e PnPP-19-Lys-TAMRA

O peptídeo sintético PnPP-19 foi sintetizado utilizando-se a estratégia Fmoc/t-butila de síntese manual em suporte sólido (Chan e White, 2000). Esse peptídeo foi sintetizado com os resíduos N e C-terminais protegidos por acetilação e amidação, respectivamente ( $\text{CH}_3\text{CO-GERRQYFWIAWYKLANSKK-NH}_2$ ). O procedimento de síntese foi realizado pela empresa chinesa ChinaPeptides Co., Ltd. (Shanghai, China).

O peptídeo sintético contendo o fluoróforo 5-TAMRA (éster succinimidílico de 5-carboxitetrametilrodamina) apresenta 20 aminoácidos, pois contém uma lisina na posição C-terminal, que foi utilizada para incorporação do fluoróforo. Os resíduos N e C-terminais foram protegidos por acetilação e amidação, respectivamente ( $\text{CH}_3\text{CO-GERRQYFWIAWYKLANSKKK(5-TAMRA)-NH}_2$ ). Este peptídeo foi denominado PnPP-19-Lys-TAMRA, e sua síntese foi realizada pela empresa chinesa GL Biochem Ltd. (Shanghai, China).

### I.2.2 Quantificação do peptídeo PnPP-19 por CLAE

Para a validação do método analítico para quantificação do peptídeo PnPP-19 por CLAE, foram avaliados os seguintes parâmetros: (1) seletividade; (2) linearidade; e (3) precisão (ANVISA, 2003).

O aparato cromatográfico consistiu de uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um detector ultravioleta/visível modelo 2487 (Waters Instruments, Milford, MA, EUA) monitorados por um computador utilizando o software Empower®. A coluna utilizada foi a Purospher®STAR, octadecilsilica C18, 4,6 mm x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Merck S.A. Indústrias Químicas, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída por acetonitrila 30% (v/v) em solução de TFA 0,1% (v/v). As amostras foram diluídas em

solução aquosa de TFA 0,1% (v/v). O volume das injeções foi de 20 µL, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,5 mL/min. O material eluído foi detectado no comprimento de onda de 216 nm e as análises foram processadas a 21 °C.

Para a avaliação da **seletividade** do método (ANVISA, 2003), verificamos se havia interferência de algum constituinte dos lipossomas ou do meio na análise quantitativa do peptídeo PnPP-19, comparando o cromatograma obtido para solução do peptídeo PnPP-19 a 20 µg/mL, com o cromatograma obtido após a abertura de lipossomas deformáveis catiônicos brancos (na ausência do peptídeo).

Para avaliar a **linearidade** (ANVISA, 2003), construímos uma curva de calibração apresentando as seguintes concentrações de PnPP-19: 5, 10, 20, 40 e 60 µg/mL. As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque de PnPP-19 10 mg/mL da seguinte maneira: a concentração de 60 µg/mL (solução A) foi obtida acrescentando-se 3 µL da solução estoque em 497 µL de solução de TFA 0,1% (v/v). A concentração de 40 µg/mL (solução B) foi obtida acrescentando-se 268 µL da solução A em 132 µL de solução de TFA 0,1% (v/v). A concentração de 20 µg/mL (solução C) foi obtida acrescentando-se 175 µL da solução B em 175 µL de solução de TFA 0,1% (v/v). A concentração de 10 µg/mL (solução D) foi obtida acrescentando-se 150 µL da solução C em 150 µL de solução de TFA 0,1% (v/v). A concentração de 5 µg/mL (solução E) foi obtida acrescentando-se 100 µL da solução D em 100 µL de solução de TFA 0,1% (v/v).

A partir das áreas dos picos obtidos, obteve-se a curva de calibração e avaliou-se a linearidade do método mediante o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism versão 4. Para a comprovação da linearidade, o coeficiente de correlação linear da curva ( $r$ ) deve ser maior que 0,99.

Para a determinação da **repetibilidade** (ANVISA, 2003), avaliamos a concordância entre os resultados obtidos em um mesmo dia, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Realizamos 9 determinações, para os pontos alto (60 µg/mL) médio (20 µg/mL) e baixo (5 µg/mL) da curva de calibração, com 3 réplicas cada, em solução de TFA 0,1% (v/v). As amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido, utilizando-se as condições descritas no item 3. Os valores foram expressos em desvio padrão relativo (DPR), calculado a partir dos valores das concentrações calculadas para cada amostra. Para métodos analíticos, os valores de DPR devem ser menores que 5%.

**Para avaliação do teor de encapsulação (TE)**, uma alíquota dos lipossomas contendo o peptídeo PnPP-19 e não purificados, assim como dos purificados, foi solubilizada em álcool isopropílico na proporção volumétrica de 1:2, respectivamente. O peptídeo PnPP-19 foi quantificado por CLAE como descrito anteriormente. O TE foi determinado pelo emprego da equação:

$$TE = \frac{\text{concentração de peptídeo PnPP-19 nos lipossomas purificados}}{\text{concentração de peptídeo PnPP-19 nos lipossomas não purificados}} \times 100$$

### I.2.3 Quantificação do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE

Para a validação do método analítico para doseamento do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE, foram avaliados os seguintes parâmetros: (1) seletividade; (2) linearidade; e (3) precisão (ANVISA, 2003), como descrito para PnPP-19.

O aparato cromatográfico consistiu de uma bomba modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um detector de fluorescência modelo 2475 (Waters Instruments, Milford, MA, EUA) monitorados por um computador utilizando o software Empower®. A coluna utilizada foi a Purospher®STAR, octadecilsílica C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm (Merck S.A. Indústrias Químicas, Darmstadt, Alemanha). A fase móvel foi constituída por acetonitrila 35% (v/v) em solução de TFA 0,1% (v/v). As amostras foram diluídas em solução contendo H<sub>2</sub>O:isopropanol:TFA (1:2:0,006). O volume das injeções foi de 20 µL, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,5 mL/min. O material eluído foi detectado no comprimento de onda de excitação de 545 nm e emissão 579 nm.

A curva de calibração para análise de linearidade apresentou as seguintes concentrações de PnPP-19-Lys-TAMRA: 4; 2; 1; 0,5 e 0,25 µg/mL. As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque de PnPP-19-Lys-TAMRA 0,2 mg/mL da seguinte maneira: a concentração de 4 µg/mL (solução A) foi obtida acrescentando-se 8 µL da solução estoque em 392 µL de solução de diluição [H<sub>2</sub>O:isopropanol:TFA (1:2:0,006)]. A concentração de 2 µg/mL (solução B) foi obtida acrescentando-se 200 µL da solução A em 200 µL de solução de diluição. A concentração de 1 µg/mL (solução C) foi obtida acrescentando-se 180 µL da solução B em 180 µL de solução de diluição. A concentração de 0,5 µg/mL (solução D) foi obtida acrescentando-se 150 µL da solução C em 150 µL de solução de diluição. A concentração de 0,25 µg/mL (solução E) foi obtida acrescentando-se 100 µL da solução D em 100 µL de solução de diluição.

A partir das áreas dos picos obtidos, obteve-se a curva de calibração e avaliou-se a linearidade do método mediante o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism versão 4. Para a comprovação da linearidade, a raiz quadrada do coeficiente de correlação linear da curva ( $r^2$ ) deve ser maior que 0,99.

Para a determinação da **repetibilidade**, avaliamos a concordância entre os resultados obtidos em um mesmo dia, com o mesmo analista e mesma instrumentação. Realizamos 9 determinações, para os pontos alto (4 µg/mL) médio (1 µg/mL) e baixo (0,25 µg/mL) da curva de calibração, com 3 réplicas cada, em solução de diluição. Os valores foram expressos em DPR, calculado a partir dos valores das concentrações calculadas para cada amostra.

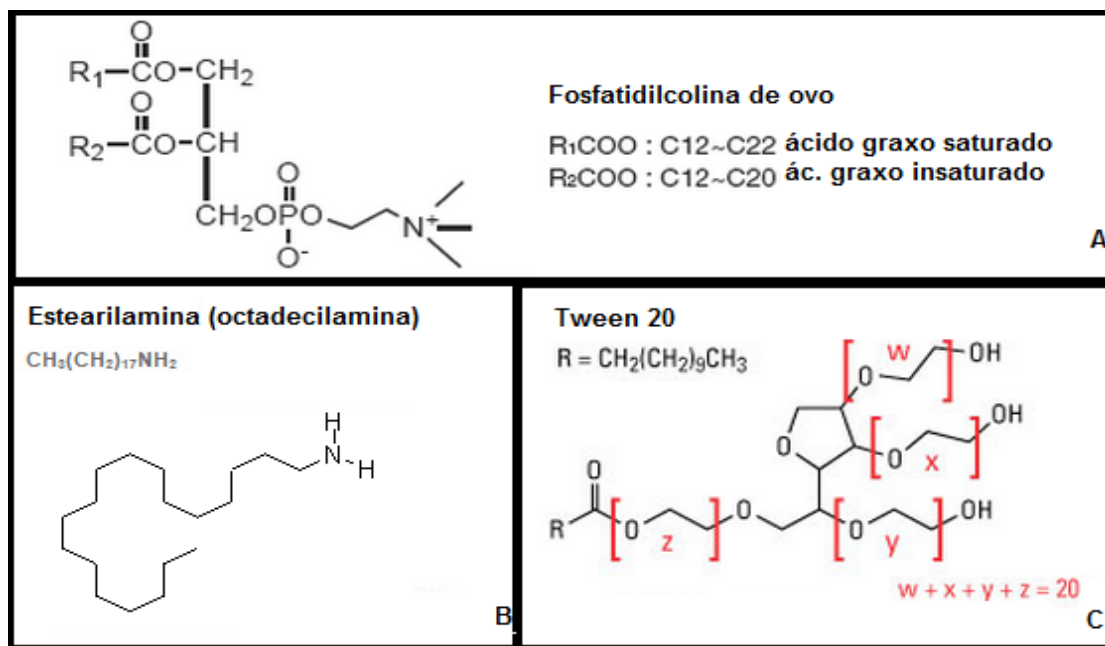
**Para avaliação do TE**, uma alíquota dos lipossomas contendo o peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA e não purificados, assim como dos purificados, foi solubilizada em álcool isopropílico na proporção volumétrica de 1:2, respectivamente, acrescentando-se TFA, para a concentração final de 0,1% (v/v). O peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA foi quantificado por CLAE, como descrito anteriormente. O TE foi determinado pelo emprego da equação:

$$TE = \frac{\text{concentração de peptídeo nos lipossomas purificados}}{\text{concentração de peptídeo nos lipossomas não purificados}} \times 100$$

#### 1.2.4 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas deformáveis catiônicos tiveram sua composição semelhante à descrita por [Dragicevic-Curic e colaboradores \(2010\)](#), com algumas modificações. Foram utilizadas soluções metanólicas de fosfatidilcolina de ovo (EPC) e de estearilamina (SA), na proporção molar de 9:1, respectivamente (concentração lipídica total de 20 ou 40mM), na presença de Tween 20. A razão entre lípidos e Tween 20 foi de 84,6:15,4 (p/p). A massa utilizada de cada componente da formulação, para um volume final de dispersão lipossomal de 4 mL, foi de 54,7 mg de EPC; 2,15 mg de SA; 10,36 mg de Tween 20 (para a concentração lipídica de 20mM). A **Figura 7** ilustra a estrutura química dos componentes da formulação de lipossomas deformáveis catiônicos.

**Figura 7 - Estrutura química dos componentes da formulação de lipossomas deformáveis catiônicos.**



(A) Fosfatidilcolina de ovo (EPC); (B) Esterilamina (SA); (C) Tween 20.

#### I.2.4.1 Método de Hidratação do Filme Lipídico

Os lipossomas deformáveis catiônicos foram preparados de acordo com o método descrito por [Dragicevic-Curic e colaboradores \(2010\)](#), com modificações. Alíquotas de soluções metanólicas de EPC e SA foram transferidas para um balão de fundo redondo, de forma que a concentração lipídica total foi igual a 20 mM e a razão molar igual a 9:1, respectivamente. O Tween 20 foi adicionado numa quantidade igual a 2,6 mg/mL, sendo a razão entre lípidos e Tween 20 igual a 84,6:15,4 (p/p). A formação do filme foi realizada sob vácuo (206 mbar), a 50°C, 150 rpm, com auxílio de um evaporador rotativo da marca Buchi Labortechnik AG, modelo R-215, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). A hidratação do filme lipídico foi feita com água purificada, por agitação, à temperatura ambiente, com auxílio de um mini-shaker Ika, modelo MS1 (Staufen, Alemanha). Após hidratação, realizou-se calibração dos lipossomas por sonicação (500 Watt Model CPX 500, Cole-Parmer Instrument Co, Vernon Hills, Illinois, EUA), com 21% de amplitude, por 5 minutos, em banho de gelo. Após a calibração do diâmetro dos lipossomas, a encapsulação do peptídeo PnPP-19 foi realizada por congelamento/descongelamento (3 ciclos de congelamento, de 5 minutos cada, em nitrogênio líquido, seguido de descongelamento a 40°C), após adição de 0,1 mL da

solução aquosa do peptídeo PnPP-19 na concentração igual a 720µg/mL para 4 mL da dispersão lipossomal calibrada.

#### **I.2.4.2 Método de Evaporação em Fase Reversa (REV)**

Alíquotas de soluções metanólicas de EPC e SA foram transferidas para um balão de fundo redondo, de forma que a concentração lipídica total foi igual a 20 mM ou 40 mM e a razão molar igual a 9:1, respectivamente. O Tween 20 foi empregado na razão lípidos e Tween 20 igual a 84,6:15,4 (p/p). A formação do filme lipídico foi realizada sob vácuo (206 mbar), a 50°C, 150 rpm, com auxílio de um evaporador rotativo da marca Buchi Labortechnik AG, modelo R-215, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça). O filme lipídico foi então dissolvido em éter etílico pré-tratado com solução HEPES (HEPES 10mM, NaCl 145 mM, EDTA 5 mM; razão de volume éter etílico: HEPES igual a 3:1). Em seguida, acrescentou-se a solução aquosa do peptídeo PnPP-19 (180 µg/mL) na razão 3:1 (éter etílico: solução aquosa do peptídeo PnPP-19). A evaporação do éter etílico foi realizada em evaporador rotativo da marca Buchi Labortechnik AG, modelo R-215, acoplado a uma bomba de vácuo de mesma marca, modelo V-700 (Flawil, Suíça), à temperatura ambiente, por 2 horas a 300 mbar, 120 rpm. Em seguida, para a completa eliminação do éter etílico foi realizada a evaporação a 100 mbar, 120 rpm, durante um período de tempo igual a 1 hora ou superior.

Os lipossomas foram calibrados por sonicação (Cole-Parmer Ultrasonic Processors 500-watt, CPX 500) com 21% de amplitude por 2 minutos, em banho de gelo.

#### **I.2.4.3 Purificação dos lipossomas por ultracentrifugação**

A dispersão lipossomal foi submetida a ultracentrifugação (Optima™ L-80 XP Ultracentrifuge - Beckman Coulter, Inc., Brea, California, EUA), a 150.000 g, por 90 minutos, a 4°C. Os lipossomas purificados foram ressuspensos com um volume de água purificada semelhante ao do sobrenadante retirado.

#### **I.2.4.4 Purificação dos lipossomas por diálise**

As membranas de diálise (Sigma D9652-100F, MWCO 14kDa) foram preparadas de acordo com a recomendação do fabricante, com algumas alterações. Brevemente, as membranas foram lavadas para a remoção do glicerol com água miliQ por 4 horas, à

temperatura ambiente, sob agitação, com a troca do líquido (500 mL) a cada 30 minutos. Em seguida, a membrana foi tratada para remoção de compostos sulfurados, adicionando-se 150 mL de solução de sulfeto de sódio 0,3% (p/v), a 80°C, por 1 min; seguindo-se lavagem com água miliQ (500 mL, 60°C), por 2 min; adição de ácido sulfúrico 0,2% (v/v), por 5 min; e lavagem com água miliQ (60°C, 3X 500 mL, 15 min. por vez); sendo que todo o procedimento foi realizado sob agitação magnética. As membranas foram mantidas em geladeira, em água miliQ até o uso (armazenamento por no máximo 48 horas).

O procedimento de diálise foi realizado à temperatura ambiente, sob agitação magnética, com a utilização de 1,5 ou 2 mL de amostra, sendo o volume do líquido acceptor (água purificada) correspondente a 20X o valor do volume de amostra (30 ou 40 mL). Após 22 horas de diálise, o líquido acceptor foi totalmente coletado, sendo acrescentado novo líquido acceptor de igual volume, por mais 2 h, totalizando-se 24 horas de diálise. Este procedimento de diálise foi validado utilizando-se o peptídeo livre (50 µg/mL, 1,5mL). Após este período de diálise, não houve detecção, por CLAE, do peptídeo no conteúdo dialisado, indicando que o peptídeo livre havia passado para o líquido acceptor (H<sub>2</sub>O, 30 mL).

A dosagem do peptídeo foi realizada por CLAE, tanto na amostra dialisada quanto no líquido acceptor. A concentração do peptídeo na amostra de lipossomas não dialisada foi também determinada e utilizada como o valor total para fins de determinação do TE.

### **1.2.5 Determinação do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta**

As análises do diâmetro médio e índice de polidispersão das partículas foram realizadas por espectroscopia de correlação de fótons a 25 °C e ângulo de 90°. O potencial zeta foi avaliado por espalhamento dinâmico da luz associado à mobilidade eletroforética, a um ângulo de 90°. As medidas foram efetuadas utilizando-se o equipamento Zetasizer 3000 Hs (Malvern Instruments Ltd., Inglaterra).

No presente trabalho, todas as análises de diâmetro de partículas foram representadas pela determinação do diâmetro médio, análise por volume e análise por número (Horiba, 2012; União Européia, 2011, 2011b).

### **I.2.6 Estudo da estabilidade de armazenamento dos lipossomas**

O armazenamento dos lipossomas na forma líquida foi feito a 4 °C, sob atmosfera de nitrogênio. A estabilidade de armazenamento foi avaliada nos períodos de 1 semana, assim como de 1, 2 e 3 meses. Após cada intervalo de tempo, as amostras de lipossomas foram avaliadas quanto ao diâmetro médio e índice de polidispersão.

### **I.2.7 Análises Estatísticas**

Todos os dados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes e foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com o Programa PRISM statistical software (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando One-way ANOVA e Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### I.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

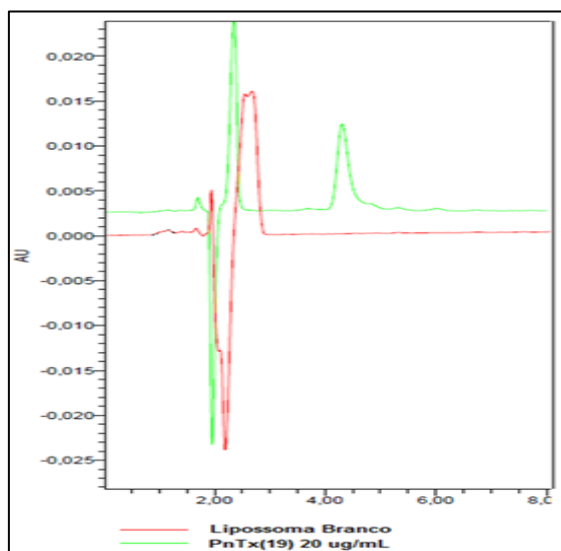
#### I.3.1 Validação do método de quantificação de PnPP-19 por CLAE

O método de CLAE para quantificação de peptídeos é comumente empregado e apresenta alta sensibilidade, tendo sido demonstrado limites de quantificação para peptídeos na faixa de 2 µg/mL (Trapani et al, 2010) e 0,2 µg/mL (Bonifacio et al., 2009).

##### I.3.1.1 Seletividade

Na **Figura 8** estão apresentados os cromatogramas da solução do peptídeo PnPP-19 livre na concentração de 20 µg/mL (em verde) e dos lipossomas brancos (em vermelho). O tempo de retenção do pico atribuído ao peptídeo foi de 4,8 minutos. A análise da sobreposição dos perfis cromatográficos demonstrou que no cromatograma obtido para os lipossomas brancos não foi observado nenhum pico interferente próximo ao tempo de retenção do peptídeo PnPP-19, indicando que o método apresentou seletividade para determinação do PnPP-19 incorporado em lipossomas.

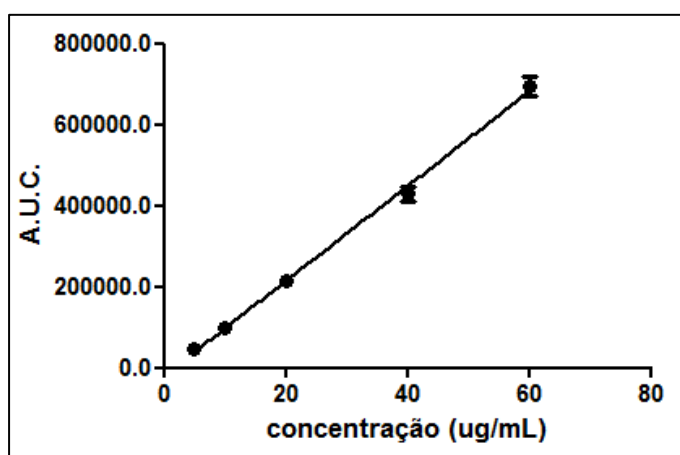
**Figura 8** – Perfis cromatográficos obtidos para solução do peptídeo PnPP-19 na concentração de 20 µg/mL (verde) e lipossomas brancos (vermelho).



### I.3.1.2 Linearidade

A linearidade do método de quantificação do peptídeo PnPP-19 por CLAE foi confirmada pela construção da curva padrão no intervalo de concentração de 5 a 60 µg/mL apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,9976. A equação da curva de calibração encontrada foi igual a  $y = 11.680x - 18.810$  (Figura 9).

**Figura 9** – Curva de calibração para o doseamento de PnPP-19 obtida pelo método de CLAE.



### I.3.1.3- Precisão intradia (repetibilidade)

Na **Tabela 1** estão apresentados os valores médios das áreas dos picos e os DPR referentes às soluções de PnPP-19, de concentrações iguais a 5; 20 e 60 µg/mL, determinados em um mesmo dia, em triplicata.

**Tabela 1** - Determinação da precisão intradia para o método de doseamento de PnPP-19 por CLAE.

[ ] nominal de PnPP-19 (µg/mL)	ÁREA	[ ] de PnPP-19 determinada (µg/mL)	DPR INTRADIA (%)
5	44413	5,41	3,1
	46773	5,61	
	49236	5,83	
20	202954	18,97	3,9
	225352	20,90	
	215392	20,05	
60	677463	59,61	2,7
	721845	63,41	
	683621	60,14	

Os valores de DPR devem ser inferiores a 5,0%, conforme preconizado pela ANVISA (2003). Os nossos resultados indicam boa precisão do método analítico empregado para doseamento de PnPP-19 em termos de repetibilidade (intradia).

### I.3.2 Preparação dos lipossomas deformáveis pelo método de hidratação do filme lipídico

A preparação de lipossomas deformáveis é comumente realizada pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de calibração do diâmetro por sonicação (Nardotto, 2009). Desta forma, este foi o primeiro método avaliado para o preparo dos lipossomas deformáveis catiônicos no presente trabalho.

A caracterização dos lipossomas deformáveis catiônicos brancos, ou seja, sem a encapsulação de PnPP-19, preparados por hidratação do filme lipídico seguida de sonicação, está sumarizada na **Tabela 2**. A **Tabela 2** mostra o diâmetro médio das vesículas antes e após 5 minutos de sonicação. Os resultados mostram que o método de sonicação para calibração destas vesículas foi adequado, permitindo a produção de vesículas com diâmetro menor que 100 nm e um índice de polidispersão menor que 0,5.

O diâmetro médio obtido após sonicação foi semelhante àquele obtido por Dragicevic-Curic e colaboradores (2010), que relataram a obtenção de um diâmetro médio de  $96,0 \pm 0,17$  nm para lipossomas com a mesma formulação de lipossomas deformáveis. Porém, esses autores obtiveram um menor índice de polidispersão, de  $0,13 \pm 0,005$ .

O método de congelamento/descongelamento foi avaliado no primeiro momento sem a incorporação do peptídeo PnPP-19. Desta forma, após calibração do diâmetro dos lipossomas por sonicação, a dispersão lipossomal foi preparada para o procedimento de congelamento e descongelamento. A **Tabela 3** mostra que, após 3 ciclos de congelamento/descongelamento, o diâmetro médio das vesículas se manteve estável, indicando que o método pode ser realizado para encapsulação do peptídeo, sem a necessidade de adição de um crioprotetor.

**Tabela 2 - Determinação do diâmetro médio de lipossomas deformáveis brancos, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação.**

	Preparação 1	Preparação 2	Preparação 3	IP*	Diâmetro médio
<b>Antes da sonicação</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,844	703,7
	18,7 % 367,1 nm	100,0% 1087,9 nm	28,7% 22,4 nm	0,462	1547,5
	81,3% 1732,6 nm		20,8% 126,6 nm	0,559	228,5
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>	39,9% 1292,5 nm		
	96,1% 352,9 nm	100,0% 1069,9 nm			
	3,9% 1678,2		<b>Análise por número</b>		
			99,0% 21,6		
<b>Após 5 min de sonicação</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,346	86,7
	71,9% 34,6 nm	75,2% 25,7 nm	100,0% 64,5 nm	0,467	91,3
	28,1% 97,5 nm	24,8% 80,3 nm		0,222	87,5
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	98,4% 33,2 nm	99,0% 23,2 nm	33,3% 25,9 nm		
	1,6% 96,5 nm	1,0% 74,3 nm	66,7% 49,4 nm		

\* Os valores de IP indicados referem-se às preparações 1, 2 e 3, respectivamente. Lipossomas preparados em PBS.

**Tabela 3 – Determinação do diâmetro médio de lipossomas deformáveis brancos, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, calibrados por sonicação e submetidos ao processo de congelamento/descongelamento.**

	Preparação 1	Preparação 2	IP*	Diâmetro médio
<b>Antes do congelamento</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,346	81,0
	71,9% 34,6 nm	75,2% 25,7 nm	0,467	91,3
	28,1% 97,5 nm	24,8% 80,3 nm		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	98,4% 33,2 nm	99,0% 23,2 nm		
	1,6% 96,5 nm	1,0% 74,3 nm		
<b>Após 1 ciclo</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,225	60,2
	100,0% 44,9 nm	38,3% 31,7 nm	0,185	73,4
		61,7% 65,3 nm		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	100,0% 31,5 nm	100,0% 33,3 nm		
<b>Após 2 ciclos</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,322	65,4
	98,9% 48,7 nm	99,0% 59,7 nm	0,238	79,0
	1,1% 117,9 nm	1,0% 899,5 nm		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	99,9% 47,8 nm	100,0% 48,2 nm		
<b>Após 3 ciclos</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,334	67,7
	97,5% 48,4 nm	31,3% 27,2 nm	0,245	80,3
	2,5% 113,0 nm	66,4% 64,0 nm		
		2,3% 415,1 nm		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	99,8% 48,2 nm	100,0% 29,7 nm		

\* Os valores de IP indicados referem-se às preparações 1 e 2, respectivamente.

A encapsulação do peptídeo PnPP-19 realizada pelo método de congelamento/descongelamento mostrou um TE igual a  $18,4 \pm 4,9$  % (n=2). Os valores do diâmetro das vesículas lipossomais contendo o peptídeo PnPP-19 estão representados na

**Tabela 4.** As vesículas apresentaram potencial zeta de  $31,3 \pm 4,4$  mV. Esse valor de potencial zeta foi semelhante ao obtido por Dragicevic-Curic e colaboradores (2010), que apresentaram o valor de  $39,10 \pm 0,78$ mV, e é adequado para manter a estabilidade física da dispersão lipossomal, pois é maior que 30 mV (Nanosight, 2014). A estabilidade das vesículas foi avaliada por até 90 dias e os resultados demonstram que o diâmetro médio aumentou durante o armazenamento, mas manteve-se abaixo de 200 nm por todo o período avaliado (**Tabela 4**).

**Tabela 4 – Determinação do diâmetro médio de lipossomas deformáveis contendo o peptídeo PnPP-19, preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, calibrados por sonicação e submetidos ao processo de congelamento/descongelamento.**

	Preparação 1	Preparação 2	IP*	Diâmetro médio** (nm)
Após preparo	<b>Análise por volume</b> 100,0% 34,5 nm	<b>Análise por volume</b> 92,4% 10,6 nm 5,8% 43,9 nm 1,9% 131,3 nm	0,480 0,683	90,6 117,8
	<b>Análise por número</b> 100,0% 20,8 nm	<b>Análise por número</b> 99,9% 10,6 nm		
Estabilidade 60 dias	<b>Análise por volume</b> 72,0% 142,9 nm 23,0% 345,3 nm	<b>Análise por volume</b> 79,8% 108,2 nm 20,2% 396,4 nm	0,234 0,299	190,7 160,0
	<b>Análise por número</b> 100,0% 97,8 nm	<b>Análise por número</b> 99,8% 75,8 nm		
Estabilidade 90 dias	<b>Análise por volume</b> 53,3% 144,8 nm 46,7% 481,8 nm	<b>Análise por volume</b> 100,0% 89,5 nm	0,202 0,740	183,0 180,5
	<b>Análise por número</b> 97,9% 134,8 nm 2,1% 468,0nm	<b>Análise por número</b> 100,0% 67,4 nm		

\* Os valores de IP indicados referem-se às preparações 1 e 2, respectivamente.

\*\* Os valores de diâmetro médio indicados referem-se às preparações 1 e 2, respectivamente.

### I.3.3 Preparação dos lipossomas pelo método de evaporação em fase reversa (REV)

O método REV é indicado para a encapsulação de compostos hidrofílicos (Szoka e Papahadjopoulos, 1978), como é o caso do peptídeo PnPP-19.

A **Tabela 5** apresenta a análise do diâmetro médio das vesículas, que se mostraram estáveis durante 90 dias de armazenamento a 4°C. O potencial zeta das vesículas foi de  $38,5 \pm 8,4$ mV. O TE calculado para esta preparação foi de  $6,2 \pm 2,9\%$ .

**Tabela 5 – Análise do diâmetro médio de lipossomas deformáveis preparados pelo método REV e calibrados por sonicação**

	Preparação 1	Preparação 2	Preparação 3	IP*	Diâmetro médio* (nm)
<b>Antes de sonicar</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,815±0,119	304,2 ± 27,4
	45,5% 432,7nm	12,0% 149,4nm	29,9% 27,5nm		
	40,4% 91,0nm	88,0% 686,3nm	12,4% 149,3nm		
	14,1% 24,7nm		37,8% 813,4		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	92,4% 24,7nm	93,0% 147,6 nm	99,6% 27,5nm		
	7,5% 77,0nm	7% 679,3nm			
<b>Após sonicação (2 min)</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,533±0,070	99,1 ± 16,9
	89,7% 11,6 nm	100,0% 64,2 nm	96,7% 8,7 nm		
	9,4% 58,8 nm		3,3% 77,8nm		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	99,9% 11,2 nm	100,0% 36,1nm	100,0% 8,5 nm		
<b>Após diálise</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,724±0,207	104,1 ± 14,6
	86,9% 16,3nm	93,0% 9,0nm	95,2% 8,1nm		
	8,2% 81,4nm	5,9% 36,4nm	3,6% 35,8nm		
	4,9% 422,5nm	1,1% 149,3nm	1,2% 129,4nm		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	99,9% 15,6nm	99,9% 9,0nm	100,0% 8,1nm		
<b>Estabilidade 30 dias</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,566±0,001	94,3 ± 10,9
	81,1% 19,9nm	92,0% 12,0nm	78,5% 7,6nm		
	17,1% 61,6nm	7,2% 56,9nm	20,1% 24,7nm		
	1,8% 228,9nm		1,4% 125,0nm		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	99,1% 19,1nm	99,9% 11,8nm	99,1% 7,6nm		
<b>Estabilidade 60 dias</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,594±0,004	105,3 ± 11,7
	97,7% 31,1nm	100,0% 54,3nm	87,3% 8,8nm		
	1,1% 376,9nm		11,3% 30,0nm		
	1,2% 779,6nm	<b>Análise por número</b>	1,4% 133,8nm		
	<b>Análise por número</b>	100,0% 47,4 nm	<b>Análise por número</b>		
	100,0% 19,3nm		99,6% 8,8 nm		
<b>Estabilidade 90 dias</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,565±0,008	94,2 ± 19,0
	99,9% 40,5nm	100,0% 71,5nm	96,0% 12,0nm		
			4,0% 79,2nm		
	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>		
	100,0% 22,4 nm	100,0% 71,5 nm	100,0% 10,4 nm		

\*Resultados representam a média ± desvio padrão.

A partir da análise deste resultado, pode-se observar, pela análise por número, uma prevalência de vesículas com diâmetro médio inferior a 20 nm. Após 90 dias de armazenamento, o diâmetro das vesículas não apresentou alteração significativa. Sabendo-se que existe uma correlação entre o TE e o diâmetro das vesículas (Mishra et al., 2007), preparamos vesículas pelo método REV e não submetemos as mesmas à sonicação.

Como resultado, obtivemos vesículas com diâmetro médio de 204,6 ± 34,0 nm após a diálise (Tabela 6). Considerando a análise do diâmetro por número, observa-se a ocorrência de populações preponderantes de vesículas com diâmetros inferiores a 40 nm. O potencial zeta desses lipossomas foi igual a 56,1 ± 11,3 mV, e o TE foi de 15,6 ± 6,0%

(2,5 vezes maior que o obtido para a preparação calibrada por sonicação). As vesículas se mostraram estáveis por todo período avaliado (30 dias), não apresentando diferença significativa em seu diâmetro médio.

**Tabela 6 – Análise do diâmetro médio de lipossomas deformáveis preparados pelo método REV sem calibração por sonicação, com concentração lipídica de 20 mM**

	Preparação 1	Preparação 2	Preparação 3	IP*	Diâmetro médio*(nm)
<b>Antes da diálise</b>	<b>Análise por volume</b> 52,7% 23,5nm 21,9% 137,0nm 25,5% 945,3nm	<b>Análise por volume</b> 56,7% 90,9nm 43,3% 470,3nm	<b>Análise por volume</b> 39,5% 143,1nm 60,5% 661,0nm	0,522±0,029	204,7 ± 13,5
	<b>Análise por número</b> 99,7% 22,4nm	<b>Análise por número</b> 99,9% 43,3nm	<b>Análise por número</b> 98,2% 116,6nm 1,8% 499,8		
<b>Após diálise</b>	<b>Análise por volume</b> 8,9% 26,1nm 53,4% 92,8nm 37,7% 569,2nm	<b>Análise por volume</b> 27,0% 31,9nm 21,0% 101,0nm 32,0% 484,1nm 20,0% 2432,1nm	<b>Análise por volume</b> 56,2% 37,8nm 18,8% 205,4nm 25,0% 842,6nm	0,587±0,043	204,6 ± 33,9
	<b>Análise por número</b> 77,9% 24,0nm 22,1% 63,2nm	<b>Análise por número</b> 100,0% 29,3nm	<b>Análise por número</b> 99,7% 37,8nm		
<b>Estabilidade 30 dias</b>	<b>Análise por volume</b> 14,9% 24,0nm 64,0% 100,3nm 11,0% 404,1nm 10,0% 1556,7nm	<b>Análise por volume</b> 31,8% 23,2nm 24,3% 105,4nm 44,0% 454,3nm	<b>Análise por volume</b> 63,6% 86,7nm 36,4% 381,9nm	0,501±0,044	174,4 ± 18,1
	<b>Análise por número</b> 86,1% 22,8nm 13,9% 61,6nm	<b>Análise por número</b> 98,9% 23,2nm 1,1% 91,1nm	<b>Análise por número</b> 99,7% 64,3nm		

\*Resultados representam a média ± desvio padrão. O valor de diâmetro médio foi considerado por intensidade.

Posteriormente, investigamos se uma maior concentração lipídica (40 mM) melhoraria o TE. Os resultados (**Tabela 7**) mostram que as vesículas assim preparadas têm potencial zeta adequado ( $78,5 \pm 4,7$  mV) e diâmetro médio ( $288,0 \pm 67,0$  nm) semelhante ao das preparadas com menor concentração lipídica ( $204,6 \pm 34,0$  nm). Essas vesículas apresentaram um TE de  $30,2 \pm 4,5$  % (2 vezes maior que o da preparação a 20 mM). Em relação à estabilidade de armazenamento no período de 30 dias, observamos um comportamento variável das preparações em relação ao diâmetro, considerando como parâmetro de medida a análise por número ou volume, mas o diâmetro médio não apresentou diferença significativa.

**Tabela 7 – Análise do diâmetro médio de lipossomas deformáveis preparados pelo método REV sem calibração por sonicação, com concentração lipídica de 40 mM.**

	Preparação 1	Preparação 2	Preparação 3	IP*	Diâmetro médio* (nm)
<b>Antes da diálise</b>	<b>Análise por volume</b> 30,7% 166,7nm 69,3% 1170,0 nm	<b>Análise por volume</b> 16,4% 55,2nm 11,2% 245,4nm 72,4% 838,5nm	<b>Análise por volume</b> 64,6% 24,5nm 14,7% 126,9nm 14,5% 410,3nm 6,3% 2565,8nm	0,592 ± 0,1	280,5 ± 51,2
	<b>Análise por número</b> 99,1% 140,4nm 0,9% 844,3nm	<b>Análise por número</b> 99,0% 55,2nm	<b>Análise por número</b> 100,0% 22,3nm		
	<b>Após diálise</b>	<b>Análise por volume</b> 32,1% 159,9nm 67,9% 987,6nm <b>Análise por número</b> 98,8% 135,7nm 1,2% 722,7 nm	<b>Análise por volume</b> 55,0% 55,0nm 45,0% 375,2nm <b>Análise por número</b> 99,0% 37,7nm		
<b>Estabilidade 30 dias</b>	<b>Análise por volume</b> 39,6% 571,8nm 21,6% 98,2nm 38,8% 5.302nm <b>Análise por número</b> 100% 85,55nm	<b>Análise por volume</b> 18,2% 127,7nm 81,8% 684,7nm <b>Análise por número</b> 97,1% 125,8nm 2,9% 669,8nm	<b>Análise por volume</b> 43,4% 38,1nm 11,6% 170,7nm 45,0% 834,6nm <b>Análise por número</b> 99,7% 38,1nm	0,653 ± 0,3	279,4 ± 58,6

\* Resultados representam a média ± desvio padrão.

Tendo em vista os resultados de [Silva e colaboradores \(2015\)](#), que mostraram que PnPP-19 assume uma conformação de alfa-hélice quando em solução contendo SDS, em ensaios de dicroísmo circular, avaliamos se o peptídeo poderia apresentar maior TE se incorporado na fase hidrofóbica, durante o processo de preparo dos lipossomas. Por este procedimento, obtivemos um TE de  $25,05 \pm 2,25$  %. Este valor foi semelhante ao encontrado para a incorporação na fase hidrofílica. Os diâmetros médios e índices de polidispersão também foram semelhantes (**Tabela 8**). O potencial zeta foi igual a  $64,8 \pm 6,5$  mV.

**Tabela 8 – Análise do diâmetro médio de lipossomas deformáveis preparados pelo método REV, com incorporação do peptídeo na fase hidrofóbica, sem calibração por sonicação.**

	Preparação 1	Preparação 2	IP*	Diâmetro médio* (nm)
<b>Antes da diálise</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,481 ± 0,01	354,2 ± 26,2
	24,1% 128,5nm	26,4% 75,5nm		
	75,9% 605,3nm	26,6% 437,1nm		
		46,9% 1988,0nm		
<b>Após diálise</b>	<b>Análise por número</b>	<b>Análise por número</b>	0,523 ± 0,01	412,7 ± 12,3
	96,7% 122,2nm	99,2% 72,9nm		
	3,3% 543,9nm	0,7% 352,5nm		
		0,1% 1628,0nm		
<b>Após diálise</b>	<b>Análise por volume</b>	<b>Análise por volume</b>	0,523 ± 0,01	412,7 ± 12,3
	9,0% 96,6nm	24,3% 122,7nm		
	20,7% 597,8nm	75,7% 781,6nm		
	70,3% 3910,0nm	<b>Análise por número</b>		
<b>Após diálise</b>	<b>Análise por número</b>	98,6% 106,9nm	0,523 ± 0,01	412,7 ± 12,3
	98,7% 92,4nm	1,4% 618,8nm		
	1,2% 501,5nm			

\* Resultados representam a média ± desvio padrão. A concentração lipídica total utilizada foi igual a 40 mM.

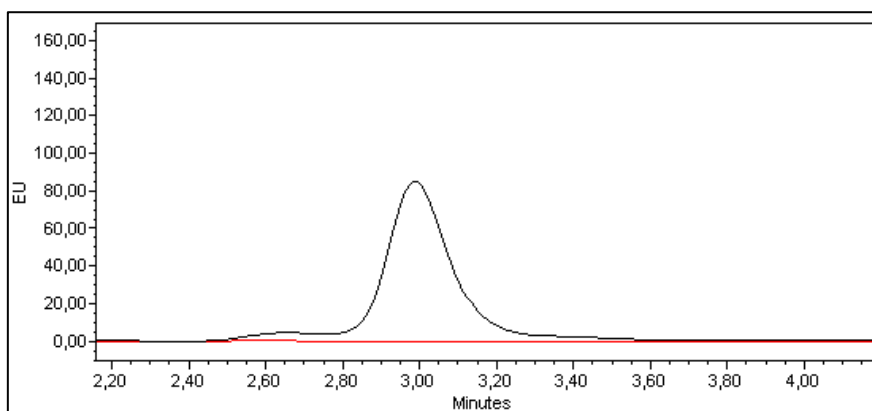
Diante dos resultados, o método REV, sem sonicação e com incorporação do peptídeo na fase hidrofílica, com concentração lipídica de 40 mM, foi escolhido para preparação dos lipossomas deformáveis catiônicos contendo o peptídeo PnPP-19 ou o peptídeo marcado com fluoróforo, PnPP-19-Lys-TAMRA.

### I.3.4 Validação do método de quantificação de PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE

#### I.3.4.1 Seletividade

Na **Figura 10** estão apresentados os cromatogramas da solução do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA livre, na concentração de 1 µg/mL (em preto) e dos lipossomas brancos (em vermelho). O tempo de retenção do pico atribuído ao peptídeo foi de aproximadamente 3 minutos. A análise da sobreposição dos perfis cromatográficos demonstrou que no cromatograma obtido para os lipossomas brancos não foi observado nenhum pico interferente próximo ao tempo de retenção do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA, indicando que o método apresentou seletividade para determinação do PnPP-19-Lys-TAMRA incorporado em lipossomas.

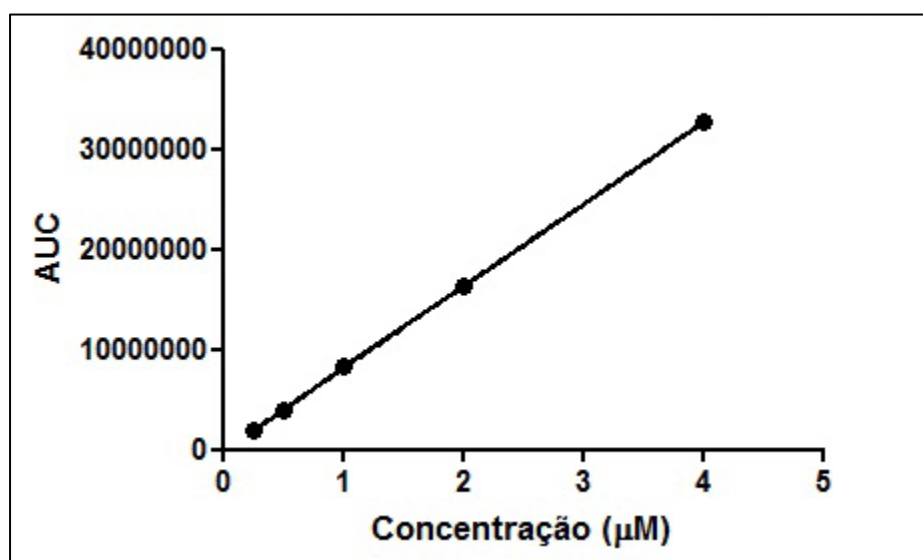
**Figura 10** – Perfis cromatográficos obtidos para solução do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA na concentração de 1 µg/mL (preto) e lipossomas brancos (vermelho).



### I.3.4.2 Linearidade

A linearidade do método de quantificação do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE foi confirmada pela construção da curva padrão no intervalo de concentração de 0,25 a 4 µg/mL, que apresentou um coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,9997. A equação da curva de calibração encontrada foi igual a  $y = 8.924.000x - 64.540$  (Figura 11).

**Figura 11** – Curva de calibração para o doseamento de PnPP-19-Lys-TAMRA obtida pelo método de CLAE.



### I.3.4.3- Precisão intradia (repetibilidade)

Na **Tabela 9** estão apresentados os valores médios das áreas dos picos e os DPR referentes às soluções de PnPP-19-Lys-TAMRA, de concentrações iguais a 0,25; 1 e 4 µg/mL, determinados em um mesmo dia, em triplicata.

**Tabela 9 - Determinação da precisão intradia para o método de doseamento de PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE.**

[ ] nominal de PnPP-19-Lys-TAMRA (µg/mL)	ÁREA	[ ] de PnPP-19-Lys-TAMRA determinada (µg/mL)	DPR INTRADIA(%)
0,25	2.215.997	0,25	1,9
	2.201.698	0,25	
	2.040.783	0,24	
1	9.095.641	1,03	2,4
	8.900.467	1,00	
	8.584.523	0,97	
4	36.130.735	4,06	1,6
	35.842.742	4,02	
	34.831.505	3,91	

Os valores de DPR devem ser inferiores a 5,0%, conforme preconizado pela [ANVISA \(2003\)](#). Os nossos resultados indicam boa precisão do método analítico empregado para doseamento de PnPP-19-Lys-TAMRA em termos de repetibilidade (intradia).

### I.3.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado por meio da equação  $LQ=(DPa \times 10)/IC$ , em que: DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de 3 curvas de calibração, e IC é a inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação assim calculado foi de 0,009 µg/mL.

### I.3.6 Limite de Detecção

O limite de detecção é definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). A estimativa do limite de detecção foi realizada com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, determinado pela equação:

$$LD = \frac{\text{desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de 3 curvas de calibração} \times 3}{\text{inclinação da curva de calibração}}$$

O limite de detecção assim calculado foi igual a 0,003 µg/mL.

### I.3.7 Encapsulação de PnPP-19-Lys-TAMRA em lipossomas pelo método de evaporação em fase reversa (REV)

A encapsulação do peptídeo fluorescente em lipossomas visa permitir as análises de permeação cutânea, com sensibilidade adequada para detecção por CLAE. Inicialmente, com o objetivo de comparar o TE de PnPP-19-Lys-TAMRA com o do peptídeo sem fluoróforo, preparamos lipossomas com a mesma concentração de peptídeo descrita para PnPP-19 (0,18 mg/mL). Como resultado (n=2), obtivemos lipossomas com diâmetro médio de  $238,6 \pm 52,3$  nm (IP  $0,490 \pm 0,03$ ), potencial zeta de  $62 \pm 12$  mV e TE de  $12,7 \pm 3,7$  %. O menor TE de PnPP-19-Lys-TAMRA em relação a PnPP-19 pode ser resultante da repulsão eletrostática entre o peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA, que apresenta maior carga positiva do que o peptídeo PnPP-19, e a bicamada lipídica carregada positivamente.

Para os ensaios de permeação cutânea, os lipossomas foram preparados com concentração total de peptídeo fluorescente igual a 2 mg/mL. A concentração lipídica total foi mantida a 40 mM. Os lipossomas assim preparados apresentaram diâmetro médio de  $276,4 \pm 48,4$  nm (IP  $0,450 \pm 0,04$ ) e potencial zeta de  $57,2 \pm 1,4$  mV. A distribuição de tamanho, por número, foi de 100% das vesículas com  $90,5 \pm 24,4$  nm. Por volume, as vesículas apresentaram duas populações, com diâmetros médios de  $116,8 \pm 36,5$  nm e  $813,9 \pm 358,9$  nm. O TE foi igual a  $15,7 \pm 2,5$ % (n=3). Desta forma, verificamos que o aumento na concentração total de peptídeo não levou a um aumento significativo na porcentagem de encapsulação, mas a concentração de peptídeos encapsulados foi efetivamente maior, possibilitando seu uso nos ensaios de permeação.

## I.4 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no capítulo I, pode-se inferir que:

- ✓ O método de dosagem do peptídeo PnPP-19, com ou sem fluoróforo, por CLAE, apresentou seletividade, linearidade e repetibilidade.
- ✓ O método de preparo de lipossomas deformáveis contendo o peptídeo PnPP-19 que conduziu ao maior TE e diâmetro médio apropriado para a administração tópica foi o REV com inclusão do peptídeo na fase hidrofílica, sem a etapa de calibração por sonicação e com o emprego de uma concentração lipídica total igual a 40 mM.

## **CAPÍTULO II**

### **AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DO PEPTÍDEO PnPP- 19 LIVRE OU ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS**

## II.1 INTRODUÇÃO

O segundo capítulo do presente trabalho refere-se à investigação da permeação cutânea do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA livre ou encapsulado em lipossomas, em ensaios *in vitro* (ensaio de permeação em células de Franz, utilizando pele abdominal humana), além de avaliar a estabilidade do peptídeo em ensaios de permeação cutânea.

## II.2 MATERIAL E MÉTODOS

### II.2.1 Preparação da pele

Para os estudos de permeação, foi utilizada pele abdominal humana obtida a partir de cirurgia plástica, de três pacientes do sexo feminino, com idade entre 35 e 60 anos. A cirurgia foi realizada pelos cirurgiões Felipe Lima Cardoso ou Sebastião Nelson, na Clínica Sebastião Nelson Ltda (**Anexo I**), e os fragmentos de pele excisados foram fornecidos para este trabalho após assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE, **Anexo II**). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, sob protocolo 35098814.6.0000.5149.

Logo após a cirurgia, os fragmentos de pele foram transportados para o Laboratório de Pesquisa em Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG, em isopor contendo bolsas de gelo. O tecido adiposo subcutâneo foi removido da pele com o uso de bisturi e pinças cirúrgicas. A superfície da pele foi lavada com solução Ringer e, depois de seca, foi embalada em saco plástico envolvido em folha de papel alumínio e estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso. Nessas condições, a pele fica estável para estudo de permeação por 3-6 meses ([Harrison et al., 1984](#)).

### II.2.2 Preparação das células de difusão de Franz

Discos de pele de 30 mm de diâmetro foram recortados após seu descongelamento, lavados com solução Ringer e transferidos para células de difusão de Franz. O compartimento receptor (6 mL) foi preenchido com solução de NaCl 0,9% (p/v). As células assim preparadas foram equilibradas a  $32^{\circ}\text{C}$ , sob agitação magnética, por 1h, para hidratação da pele. O líquido acceptor foi descartado e substituído para início dos testes. A formulação a ser testada foi aplicada sobre a pele e, após 4 horas, uma alíquota do líquido

acceptor foi removida para avaliação da concentração de PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE. Cada procedimento foi realizado em triplicata.

Para os experimentos com o PnPP-19-Lys-TAMRA livre ou com a preparação lipossomal não-purificada, a concentração de PnPP-19-Lys-TAMRA livre aplicada sobre a pele foi de 2 mg/mL. A concentração de PnPP-19-Lys-TAMRA presente na preparação lipossomal foi de 2 mg/mL, sendo que apenas  $15,7 \pm 2,5\%$  dessa concentração representa a concentração de peptídeo encapsulado. O volume aplicado foi de 60  $\mu$ L, que correspondeu ao maior volume aplicável que levaria à total secagem do material sobre a pele no período avaliado. A permeação cutânea foi avaliada 4 horas após a aplicação da amostra sobre a pele em aparato de célula de Franz, tendo salina como líquido acceptor. Utilizamos peles abdominais de 2 pacientes, do sexo feminino, com idade de 46 e 57 anos,

Para os experimentos com os lipossomas purificados contendo PnPP-19-Lys-TAMRA, aplicamos 60  $\mu$ L do lipossoma purificado, contendo PnPP-19-Lys-TAMRA na concentração de 265  $\mu$ g/mL (massa de peptídeo aplicada: 15,9  $\mu$ g), sobre a pele, em triplicata. Como controle (n=2), aplicamos 60  $\mu$ L do peptídeo livre, diluído em H<sub>2</sub>O, na mesma concentração (265  $\mu$ g/mL), sobre a pele. Utilizamos a pele proveniente do paciente 3 (sexo feminino, 38 anos).

Para os experimentos de controle de estabilidade com pele, aplicamos a amostra no líquido acceptor. 60  $\mu$ L de amostra contendo 2 mg/mL de peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA livre ou a formulação lipossomal contendo o peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA não-purificada foram aplicados no líquido acceptor, e não sobre a pele. A concentração de peptídeo no líquido acceptor foi, portanto, de 20 $\mu$ g/mL. Utilizamos a pele proveniente do paciente 3 (sexo feminino, 38 anos). Para os experimentos com lipossoma purificado, aplicamos 60  $\mu$ L de suspensão lipossomal, contendo PnPP-19-Lys-TAMRA na concentração de 265  $\mu$ g/mL (massa de peptídeo aplicada: 15,9  $\mu$ g), em triplicata. Como controle (n=2), aplicamos 60  $\mu$ L do peptídeo livre, diluído em H<sub>2</sub>O, na mesma concentração (265  $\mu$ g/mL).

Para os experimentos de controle de estabilidade sem pele, aplicamos a amostra no líquido acceptor, utilizando o mesmo protocolo acima, mas, no lugar da pele, colocamos Parafilm®. O peptídeo foi aplicado ao líquido acceptor e foi quantificado após 4 horas, por CLAE.

### **II.2.3 Detecção e quantificação do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE**

300 µL do líquido acceptor após 4 horas de permeação cutânea em células de Franz foram diluídos em 600 µL de isopropanol e agitados vigorosamente, por 1 minuto. Em seguida, acrescentou-se TFA para uma concentração final de 0,2% (v/v). A amostra foi filtrada (0,45 µm) e submetida à cromatografia, como descrito no item I.2.3.

### **II.2.4 Avaliação da hidrólise do peptídeo PnPP-19, utilizando espectrometria de massas**

Para avaliação da hidrólise de PnPP-19 quando em contato com o líquido acceptor proveniente de experimento controle de célula de Franz com pele humana, 20 µL de uma solução aquosa do peptídeo (40 µg/mL) foram adicionados a uma alíquota de 180 µL de líquido acceptor (concentração final do peptídeo: 4 µg/mL). Comparamos o espectro do peptídeo diluído em água com o espectro do líquido acceptor na ausência e presença do peptídeo. Este último espectro foi avaliado após 30 minutos e após 4 horas de exposição. O experimento foi realizado em triplicata.

Alíquotas de 0,7 µL da solução preparada como descrito acima foram aplicadas em placa MTPAnchorChip-400/384 (Bruker Daltonics, EUA) e ionizadas com 0,7 µL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico. Utilizou-se espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF/TOF AutoFlex III (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) no modo positivo/refletor, controlado pelo software Flex-Control. As análises foram feitas utilizando-se o software FlexAnalysis (Bruker Daltonics, EUA). A calibração do aparelho foi realizada utilizando-se solução padrão de peptídeos (Peptide Calibration Standard II - Bruker Daltonics, EUA).

### **II.2.5 Análises Estatísticas**

Todos os dados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes e foram expressos pela média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com o Programa PRISM statistical software (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando One-way ANOVA e Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## II.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### II.3.1 Avaliação da permeação cutânea do peptídeo marcado com fluoróforo, PnPP-19-Lys-TAMRA, livre ou encapsulado em lipossomas, em ensaios de células de Franz utilizando pele abdominal humana e detecção por CLAE

Para os ensaios de permeação cutânea em pele humana, utilizamos um peptídeo marcado com o fluoróforo 5-TAMRA (éster succinimidílico de 5-Carboxitetrametilrodamina), que permite sua detecção e/ou quantificação por CLAE, com maior sensibilidade. O método analítico de quantificação de PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE apresentou adequada seletividade, linearidade e precisão, como descrito no capítulo I.

A **Tabela 10** apresenta os resultados de permeação cutânea em células de Franz, com aplicação do PnPP-19-Lys-TAMRA livre ou da preparação lipossomal não-purificada, contendo PnPP-19-Lys-TAMRA. Amostras 1 e 2 representam triplicatas, realizadas no mesmo dia, ao mesmo tempo, com fragmentos de pele diferentes, do mesmo paciente.

**Tabela 10 – Avaliação de permeação de PnPP-19-Lys-TAMRA livre ou encapsulado em lipossomas (Lip-PnPP-19-Lys-TAMRA) através de pele abdominal humana.**

Amostra*	□ calculada (µg/mL)	% permeação (em 4 horas)	Velocidade de permeação (ng/cm <sup>2</sup> /h)
<b>Paciente 1</b> Lip-PnPP-19-Lys-TAMRA - 1	0,067	1	32,5
<b>Paciente 1</b> Lip-PnPP-19-Lys-TAMRA - 2	0,035	0,5	16,3
<b>Paciente 1</b> Lip-PnPP-19-Lys-TAMRA - 3	0,020	0,3	9,8
<b>Paciente 2</b> Lip-PnPP-19-Lys-TAMRA - 1	0,012*	0,2	6,5
<b>Paciente 2</b> Lip-PnPP-19-Lys-TAMRA - 2	0,009*	0,1	3,3
<b>Paciente 1</b> PnPP-19-Lys-TAMRA livre	0,011*	0,2	6,5
<b>Paciente 1</b> PnPP-19-Lys-TAMRA livre	0,043	0,6	19,5
<b>Paciente 1</b> PnPP-19-Lys-TAMRA livre	0,013*	0,2	6,5
<b>Paciente 2</b> PnPP-19-Lys-TAMRA livre	0,026	0,4	13,0
<b>Paciente 2</b> PnPP-19-Lys-TAMRA livre	0,014*	0,2	6,5

\*Paciente 1: sexo feminino, 57 anos; Paciente 2: sexo feminino, 46 anos. A porcentagem de permeação foi calculada tendo como base 100% de permeação (6,7 µg/mL). (\*) concentração próxima do limite de quantificação.

Os resultados mostram que PnPP-19-Lys-TAMRA foi capaz de permear através da pele humana, tanto na forma livre quanto encapsulado em lipossomas catiônicos deformáveis. A permeação cutânea de PnPP-19-Lys-TAMRA livre ou encapsulado em lipossomas apresentou algumas concentrações próximas ao limite de quantificação ( $\leq 1\%$ ). Por esta razão, não foi possível inferir se a presença dos lipossomas levou a um aumento na porcentagem de permeação.

É importante notar que, em comparação com os resultados obtidos por Dragicevic-Curic e colaboradores (2010), que demonstraram uma porcentagem de permeação cutânea para termoporfina igual a  $0,03\%/h$ , em uma velocidade de  $1,6\text{ ng/cm}^2/h$ , PnPP-19-Lys-TAMRA, mesmo livre, apresenta porcentagem e velocidade de permeação cutânea muito satisfatórias  $0,08 \pm 0,05\%/h$  e  $10,4 \pm 5,8\text{ ng/cm}^2/h$ , respectivamente.

Desai, Patlolla e Singh (2010) descrevem que os peptídeos penetradores de células, caracteristicamente catiônicos ou anfipáticos, apresentando 30 resíduos de aminoácidos ou menos, são capazes de ativar a permeação cutânea de proteínas e peptídeos maiores. Como PnPP-19-Lys-TAMRA apresenta um caráter anfipático, com uma alta porcentagem de aminoácidos catiônicos, e um ponto isoelétrico de 10,16, apresentando carga positiva de 3,9 em pH 7, acreditamos que suas propriedades físico-químicas apresentam-se favoráveis para a permeação cutânea, o que explica as altas taxas de permeação observadas em comparação com os resultados de Dragicevic-Curic e colaboradores (2010).

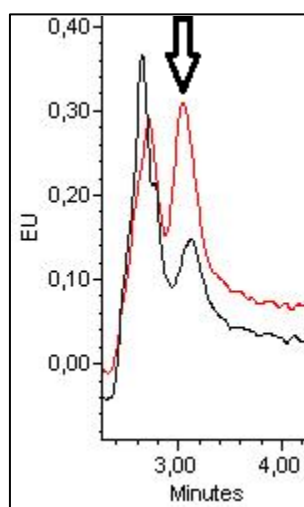
No experimento acima, utilizamos a formulação lipossomal total, contendo apenas  $15,7 \pm 2,5\%$  de peptídeo encapsulado e comparamos com a permeação do peptídeo livre. Com este experimento, seria possível avaliar se os lipossomas atuam como promotores de permeação, facilitando não só a permeação do PnPP-19-Lys-TAMRA encapsulado nos lipossomas como também a da sua forma livre.

Para avaliar, porém, se a encapsulação do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA em lipossomas catiônicos deformáveis levaria a um aumento de sua permeação, utilizamos lipossomas purificados contendo PnPP-19-Lys-TAMRA.

Visto que as concentrações aplicadas neste experimento foram menores do que as aplicadas no experimento realizado com a formulação lipossomal não purificada contendo o peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA, os resultados, como esperado, mostraram concentrações de peptídeo no líquido acceptor abaixo ou próximas do limite de

quantificação, mas foi possível detectar permeação para todas as amostras. Porém, foi possível observar que, após permeação, havia o aparecimento, no cromatograma, de um pico indicativo de degradação do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA, com tempo de retenção próximo de 2,5 minutos. Esse pico indicativo de degradação apareceu mais pronunciado para os experimentos realizados com o peptídeo livre (**Figura 12**).

**Figura 12** - Cromatograma de PnPP-19-Lys-TAMRA livre (preto) e encapsulado em lipossomas catiônicos deformáveis (vermelho) após ensaio de permeação cutânea.



A seta indica o pico atribuído ao peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA intacto.

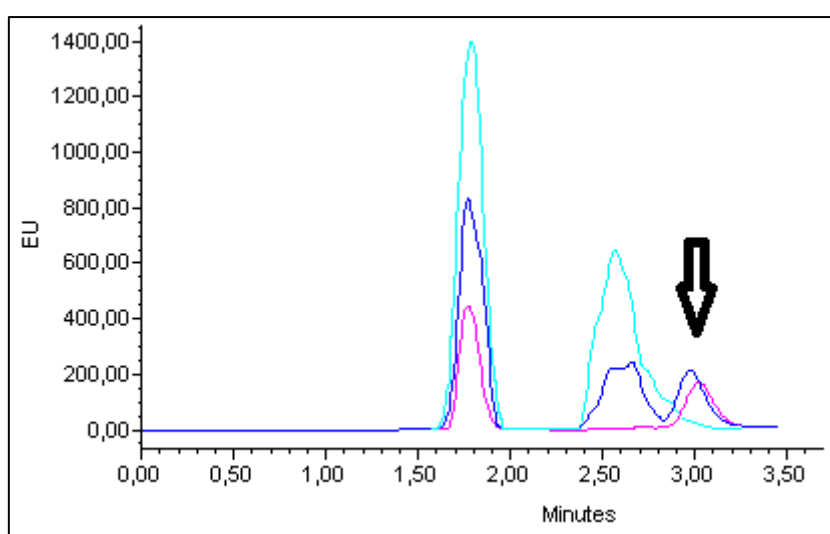
Por esta razão, realizamos as análises a seguir, para avaliar a estabilidade do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA frente ao experimento de permeação cutânea em células de Franz, utilizando pele humana.

### **II.3.2 Avaliação da estabilidade do peptídeo marcado com fluoróforo, PnPP-19-Lys-TAMRA, livre ou encapsulado em lipossomas, em ensaios de células de Franz utilizando pele abdominal humana e detecção por CLAE**

Para avaliar a estabilidade do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA após 4 horas de ensaio em células de Franz, realizamos experimentos controle, onde a amostra foi aplicada no líquido acceptor, como descrito no item Material e Métodos. Os resultados com aplicação do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA livre mostraram um perfil cromatográfico indicando degradação do peptídeo, visto que o pico com retenção próxima a 3 minutos não foi observado, estando presente apenas o pico próximo a 2,5 minutos. Para a amostra

lipossomal contendo o peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA, esta degradação foi parcial, e o pico referente ao peptídeo intacto, com retenção próxima a 3 minutos, apresentou concentração semelhante à do peptídeo controle aplicado (3 µg/mL) (**Figura 13**). Pode-se sugerir, a partir desse resultado, que o peptídeo esteja sofrendo hidrólise, por alguma enzima proteolítica proveniente da pele, e que a encapsulação do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA em lipossomas catiônicos deformáveis protege o peptídeo contra degradação.

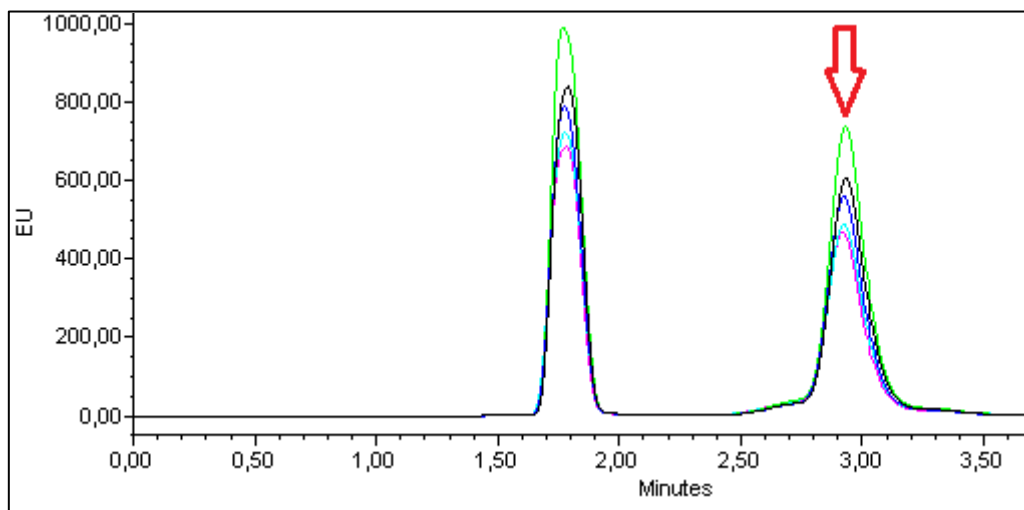
**Figura 13** - Perfil cromatográfico de PnPP-19-Lys-TAMRA após permeação cutânea por 4 horas, utilizando pele abdominal humana.



As curvas azul escuro e azul claro referem-se à preparação lipossomal não purificada contendo o PnPP-19-Lys-TAMRA e ao PnPP-19-Lys-TAMRA livre, respectivamente, aplicados no líquido acceptor, o qual foi mantido em contato com a pele em ensaio de célula de Franz durante 4 horas. A concentração final do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA no líquido acceptor de ambas as amostras foi igual a 20 µg/mL. Rosa: PnPP-19-Lys-TAMRA controle (3 µg/mL), não submetido ao ensaio de célula de Franz. A seta indica o pico atribuído ao peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA íntegro. O pico entre 1,5 e 2 minutos corresponde, provavelmente, ao fluoróforo 5-TAMRA livre, não associado ao peptídeo.

Para confirmarmos se a hidrólise observada era realmente devido à presença de algum composto proveniente da pele (enzima proteolítica, por exemplo), realizamos o experimento sem pele, como descrito no item Material e Métodos. Como ilustrado pela **Figura 14**, o perfil cromatográfico do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA não apresentou degradação. Esse resultado sugere que a degradação do peptídeo depende da presença de algum composto proveniente da pele.

**Figura 14** – Cromatograma de PnPP-19-Lys-TAMRA após ensaio de permeação cutânea na ausência da pele (n=5).

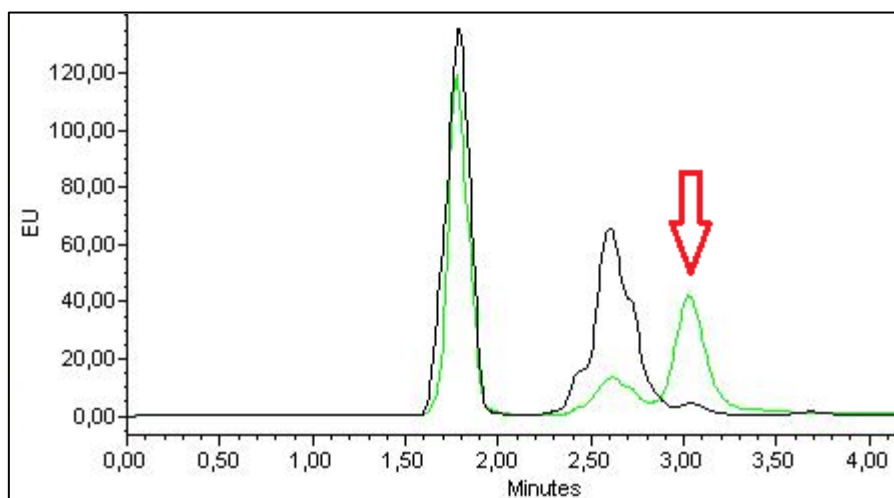


A seta indica o pico atribuído ao peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA. O pico entre 1,5 e 2 minutos corresponde, provavelmente, ao fluoróforo 5-TAMRA livre, não associado ao peptídeo.

Para avaliar a hipótese de que a encapsulação do PnPP-19-Lys-TAMRA em lipossomas catiônicos deformáveis levaria a uma proteção do peptídeo contra uma suposta hidrólise enzimática, realizamos um experimento controle, com pele, onde aplicamos, no líquido receptor, lipossomas purificados contendo PnPP-19-Lys-TAMRA.

Os resultados mostram que, para o peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA livre, apenas  $1,04 \pm 0,96\%$  da concentração aplicada estava presente no tempo de retenção próximo de 3 minutos (peptídeo não degradado); enquanto que, para o peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA encapsulado em lipossomas,  $58,3 \pm 0,2\%$  de seu conteúdo estavam presentes na retenção próxima de 3 minutos (**Figura 15**). Desta forma, pode-se concluir que a encapsulação do peptídeo em lipossomas catiônicos deformáveis protege contra sua degradação.

**Figura 15 – Cromatograma de PnPP-19-Lys-TAMRA livre (preto) e encapsulado em lipossomas catiônicos deformáveis (verde) após ensaio de permeação cutânea utilizando pele abdominal humana.**



O pico entre 1,5 e 2 minutos corresponde, provavelmente, ao fluoróforo 5-TAMRA livre, não associado ao peptídeo.

### **II.3.3 Avaliação por espectrometria de massas (MALDI-TOF) da hidrólise do peptídeo PnPP-19 por enzimas proteolíticas provenientes do ensaio de permeação cutânea em Células de Franz, utilizando pele abdominal humana**

Para avaliar se o cromatograma indicativo de degradação mostrado anteriormente realmente correspondia a uma degradação do peptídeo, avaliamos por espectrometria de massas os produtos de degradação gerados após o contato do peptídeo com o líquido acceptor proveniente de ensaio de células de Franz. Neste experimento, utilizamos o peptídeo PnPP-19 não marcado com fluoróforo.

Inicialmente, avaliamos se a detecção por MALDI-TOF do peptídeo diluído no líquido acceptor proveniente de ensaio de permeação cutânea utilizando pele abdominal humana apresentaria seletividade. Desta forma, submetemos o líquido acceptor, na ausência do peptídeo, a uma análise por MALDI-TOF, para avaliar se a detecção do peptídeo PnPP-19 sofreria interferência por algum composto proveniente da pele que poderia estar presente no líquido acceptor. Os resultados (**Figura 16**) permitem inferir que o método apresenta seletividade, visto que não houve detecção de nenhum peptídeo com massa próxima àquela do PnPP-19 (2.485 Da) no líquido acceptor. Vale ressaltar que a matriz utilizada (alfa-ciano) é própria para detecção de peptídeos de até 5KDa, excluindo

assim da análise proteínas grandes e compostos não protéicos, que podem estar presentes no líquido acceptor, provenientes do tecido cutâneo.

**Figura 16** – Espectrometria de massa do líquido acceptor sem o peptídeo PnPP-19.

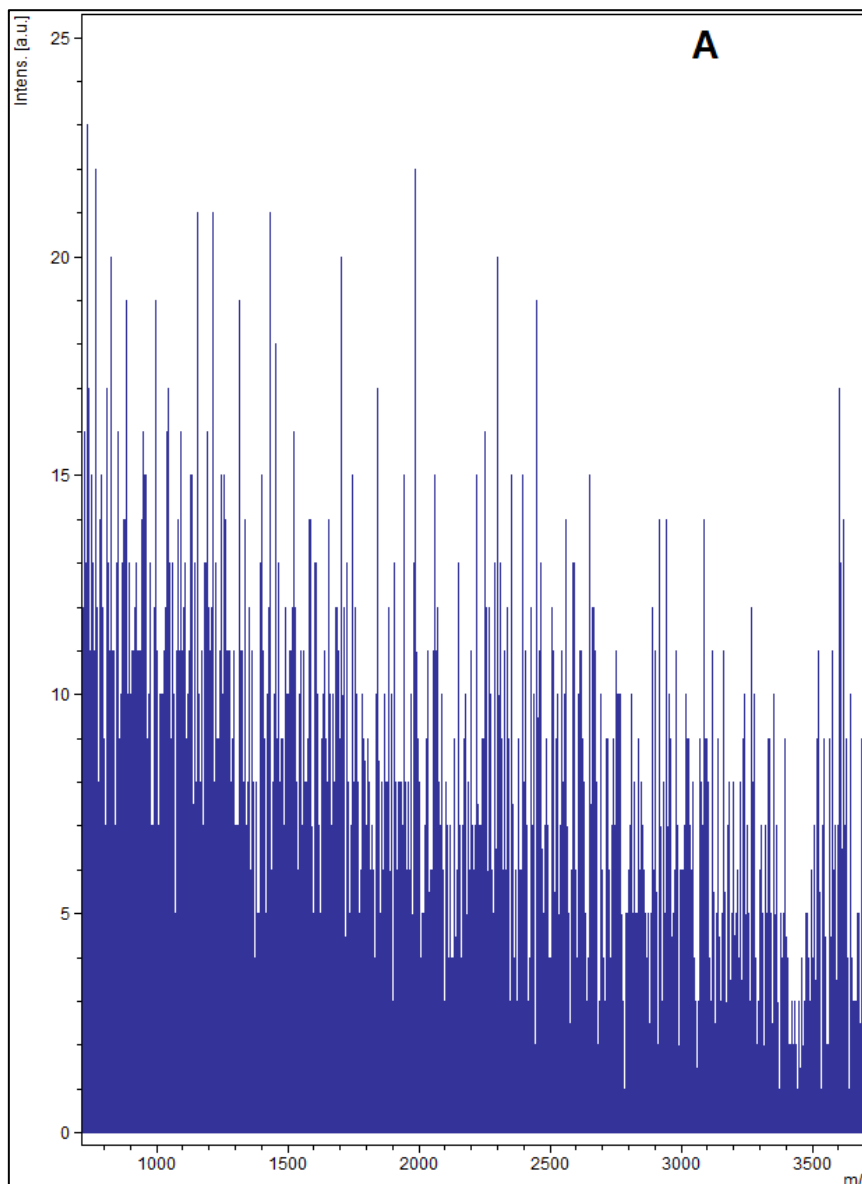
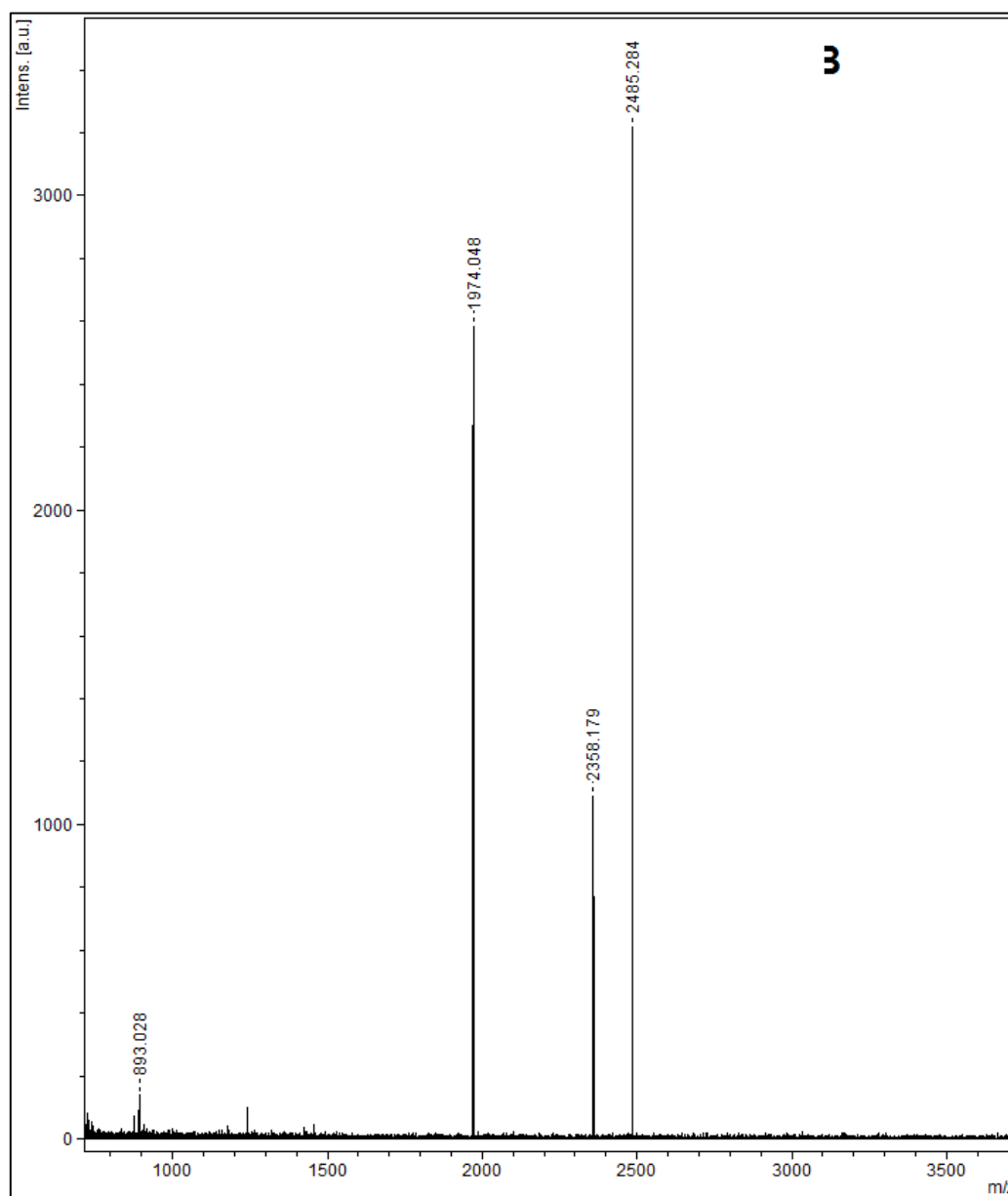
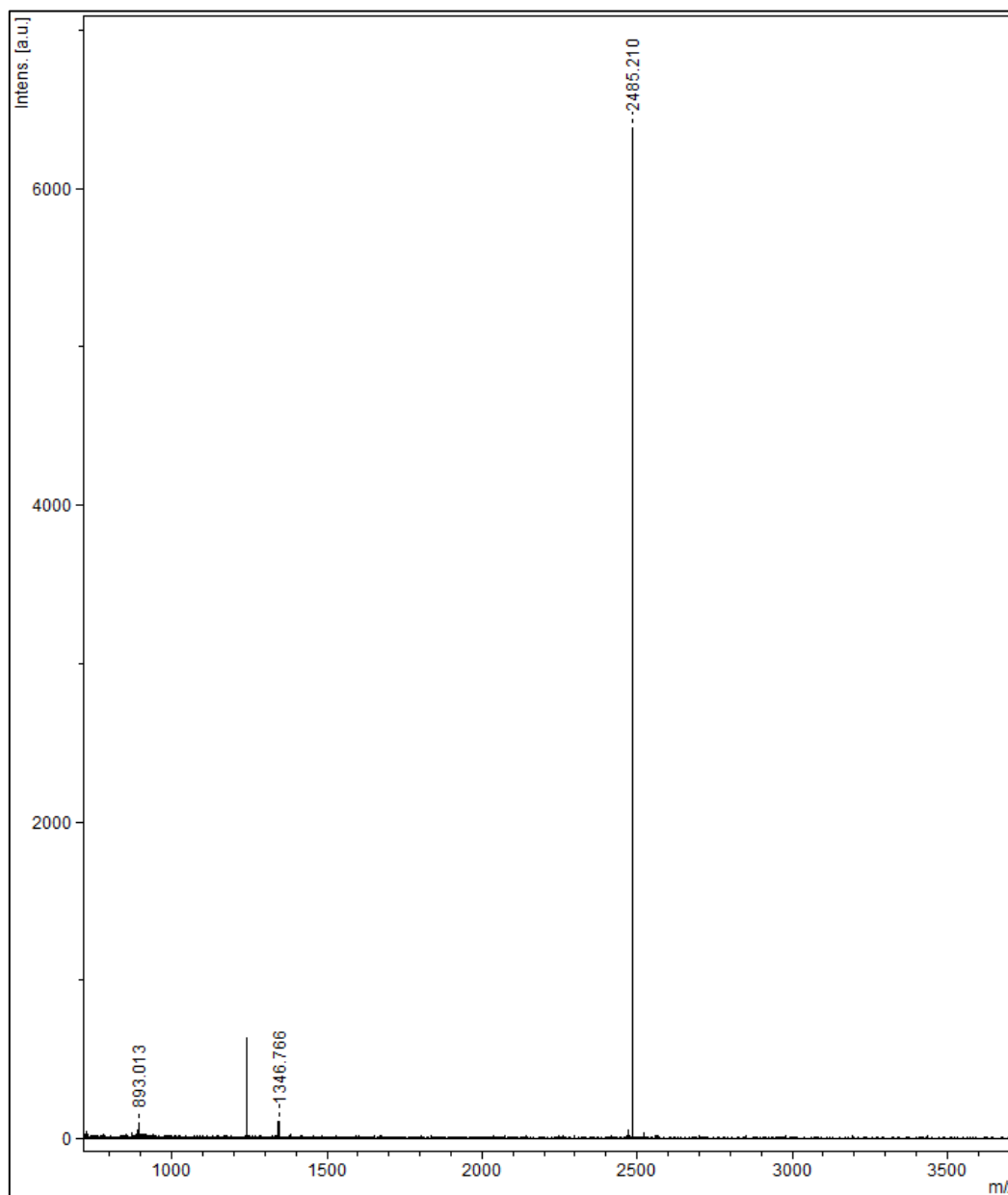


Figura 17 – Espectrometria de massa do líquido aceptor com o peptídeo PnPP-19 a 4 µg/mL.



**Figura 18** – Espectrometria de massa do peptídeo PnPP-19 a 4 µg/mL, em água.



Para avaliação da hidrólise de PnPP-19 quando em contato com o líquido acceptor proveniente de experimento controle de célula de Franz com pele humana, comparamos o espectro do peptídeo diluído em água (**Figura 18**) com o espectro do líquido acceptor na ausência (**Figura 16**) e presença (**Figura 17**) do peptídeo PnPP-19. Os resultados nos permitem inferir que o peptídeo PnPP-19 (2.485 Da) sofre uma hidrólise específica no líquido acceptor, gerando fragmentos de 2.358 e 1.974 Da. O fragmento de 1.974 Da foi

encontrado em todas as amostras avaliadas, 30 minutos após a exposição. Após 4 horas em presença do líquido aceptor, apenas a massa de 1.974 Da foi detectada.

A presença de enzimas proteolíticas e peptidases em extratos de pele humana foi relatada por vários autores. [Hopsu-Havu e Jansén \(1969\)](#) demonstraram a presença de peptidases específicas para a lise de glicina-prolina (G-P), lisina-alanina (K-A) e arginina-arginina (R-R). Considerando-se a presença de tais peptidases, a sequência de PnPP-19 (CH<sub>3</sub>CO-GERRQYFWIAWYKLANSK-NH<sub>2</sub>) poderia ter sido clivada entre as duas argininas (aminoácidos 3-4).

As carboxipeptidases do tipo B (CPB) clivam especificamente lisinas C-terminais e estão presentes de forma ubíqua no organismo. Sua forma circulante, a carboxipeptidase plasmática do tipo N (CPN), remove rapidamente a lisina C-terminal de peptídeos (Van den Bremer et al., 2015)

Pelas massas moleculares encontradas, pode-se sugerir que, na porção C-terminal, o peptídeo PnPP-19 tenha inicialmente sofrido um a hidrólise por uma carboxipeptidase B que levou à excisão da lisina amidada (145,19 Da) na posição 19, gerando o fragmento de 2.358 Da, que apresenta 18 aminoácidos. Já o fragmento de 1.974 Da corresponderia à sequência RQYFWIAWYKLANSK, que teria sido gerada pela excisão da lisina amidada (145,19 Da), além de uma hidrólise específica, entre os aminoácidos 3 e 4, pela peptidase descrita por [Hopsu-Havu e Jansén \(1969\)](#).

## II.4 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no capítulo II, pode-se inferir que:

- ✓ O ensaio de permeação cutânea em células de Franz seguida de detecção do peptídeo PnPP-19-Lys-TAMRA por CLAE apresentou seletividade.
- ✓ PnPP-19-Lys-TAMRA, tanto livre quanto encapsulado em lipossomas catiônicos deformáveis, é capaz de permear a pele abdominal humana.
- ✓ PnPP-19-Lys-TAMRA na forma livre parece sofrer uma hidrólise por enzimas presentes na pele.
- ✓ A encapsulação de PnPP-19-Lys-TAMRA em lipossomas catiônicos deformáveis permitiu maior porcentagem de permeação cutânea do peptídeo de forma intacta, protegendo-o contra hidrólise.
- ✓ O peptídeo PnPP-19 parece sofrer uma hidrólise específica na presença do líquido acceptor do ensaio de permeação cutânea usando pele abdominal humana, gerando um peptídeo menor, com 15 resíduos de aminoácidos.

# PARTE II

**Análise de patentes em biotecnologia, na área de fármacos e medicamentos,  
que exploram toxinas provenientes da fauna brasileira**

## A. INTRODUÇÃO

### A.1 Panorama da situação patentária na área de biotecnologia no Brasil

As invenções na área da biotecnologia estão, há vários anos, no ranking dos dez maiores campos técnicos em termos de patentes depositadas no Escritório de Patentes Europeu (EPO) (<http://www.epo.org/news-issues/issues/biotechnology.html> acessado em 29/11/2011). Porém, no período de 2000 a 2007, apenas oito patentes concedidas pelo EPO nesta área foram depositadas por inventores residentes no Brasil (Albornoz et al., 2008).

De acordo com Albornoz e colaboradores (2008), foram concedidas 33 patentes depositadas por inventores residentes no Brasil junto ao Escritório de Patentes dos Estados Unidos (USPTO) na área de biotecnologia, entre 2000 e 2007, sendo que aproximadamente 1/3 dos depósitos eram de titularidade de universidades, e 2/3 eram de titularidade de fundações, como a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), e do setor privado (**Tabela 11**).

Setenta e nove inventores brasileiros foram listados como participantes das patentes em biotecnologia concedidas pelo USPTO entre 2000 e 2007. A classificação internacional (IPC) mais frequente foi a C12 (Bioquímica), que aparece em 82% das patentes brasileiras.

Foram publicados pela Organização Mundial da Propriedade Intelectual “*World Intellectual Property Organization*” (OMPI / WIPO) oitenta e dois pedidos de patentes brasileiras na área de biotecnologia no período de 2000 a 2007 (**Tabela 12**), correspondendo a 0,1% do total de pedidos na área (73.231 pedidos).

Com relação às patentes depositadas no escritório de patentes do Brasil (INPI) entre 2000 e 2007, 5.381 eram da área de biotecnologia, sendo que 94%, em média, pertenciam a inventores externos, não residentes no Brasil. Os Estados Unidos foram o principal depositante, com um total de 2.279 registros entre 2000 e 2007. A Alemanha veio em segundo lugar, com 497, a Suíça em terceiro, com 291, seguida do Japão, com 269. O Brasil aparece na 27ª posição (Albornoz et al., 2008).

**Tabela 11 - Titulares de patentes concedidas pelo USPTO entre 2000 e 2007 (segundo Albornoz e colaboradores, 2008)\***

Titular	Número de Patentes
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG	6
Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo - FAPESP	5
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA	5
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ	4
Ludwig Institute For Cancer Research	2
Universidade de Brasília - UnB	3
BIOMM	2
Petróleo Brasileiro S.A. -Petrobrás	2
Usina da Barra S/A	2
Universidade Federal do Pará	1
Suzano Bahia Sul Papel e Celulose	1
Biobrás	1
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq	1
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto	1
Fundação Antônio Prudente	1

\*O número total de patentes é maior do que 33, devido ao fato de que algumas patentes possuem mais de um titular.

**Tabela 12 – Titulares de patentes brasileiras publicadas pela WIPO entre 2000 e 2007.**

Titular	Número de Patentes
Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Sao Paulo - FAPESP	17
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ	15
ALELLYX	7
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq	6
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA	5
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ	5
Biolab Sanus Farmacêutica Ltda.	4
Cognis Brasil	3
Phb Industrial	3
Universidade Federal De Minas Gerais - UFMG	3
Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.	2

Segundo Albornoz e colaboradores, 2008.

Diante destes números, torna-se importante a mobilização dos pesquisadores para a proteção das tecnologias desenvolvidas no Brasil, pois a produção científica brasileira é muito maior do que a expressa pelas patentes brasileiras. Por exemplo, no mesmo período analisado por [Albornoz e colaboradores \(2008\)](#), uma busca no site Biotechnology Research Abstracts (<http://search.proquest.com/biotechresearch>, acessado em novembro de 2015) revelou 2746 artigos científicos publicados por autores com filiação brasileira em revistas indexadas nas áreas de biotecnologia (médica, agrícola e ambiental) e bioengenharia (busca realizada com a palavra chave bra\*il no campo “afiliação”, no intervalo entre 01 de janeiro de 2000 e 31 de dezembro de 2007). Esse número é uma pequena amostra da produção científica total do Brasil na área de biotecnologia, visto que o site utilizado realiza busca em um número selecionado de revistas.

Convém também ressaltar que a produção de tecnologias inovadoras, com aplicação industrial, vem sendo alvo de grande parte das pesquisas hoje desenvolvidas no Brasil, tendo em vista o incentivo à inovação e à pesquisa científica e tecnológica, estabelecido pela Lei N° 10.973, de 2 de dezembro de 2004.

A enorme biodiversidade do país o coloca em posição privilegiada para o desenvolvimento de produtos na área de biotecnologia (estima-se que o Brasil possui 22% de todas as espécies animais e vegetais do planeta). Porém, segundo levantamento de [Moreira e colaboradores \(2006\)](#), a maior parte dos documentos de patentes envolvendo tecnologias desenvolvidas a partir de plantas brasileiras é de propriedade de depositantes estrangeiros (aproximadamente 94%, em comparação com 6% depositados por indústrias, universidades e institutos de pesquisa brasileiros, publicados até novembro de 2003). Segundo os mesmos autores, esses resultados demonstram que os fundamentos e práticas da propriedade industrial precisam de melhor disseminação no Brasil. Os cientistas precisam se preocupar com a proteção da tecnologia, antes de se preocuparem em divulgá-la.

Outro fator que pode ter influenciado a produção de patentes na área de biotecnologia no Brasil se refere à Medida Provisória (MP) 2.186-16 de agosto de 2001 ([Brasil, 2001a](#)), criada em decorrência da Convenção da Diversidade Biológica (CDB) de 1992. De acordo com a CDB, os recursos genéticos devem ser reconhecidos como bens sobre os quais incide a soberania do Estado em que estão situados. Desta forma, a MP 2.186-16 foi elaborada pelo Brasil, como país signatário da CDB, para regular o acesso

aos recursos genéticos e conhecimentos tradicionais associados, possibilitando o gerenciamento da sua exploração econômica e uma repartição dos benefícios dela resultantes. Para exercer as atividades de controle do acesso ao patrimônio genético (PG), foi criado o Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN) e sua Secretaria Executiva, ambos integrados ao Ministério do Meio Ambiente (MMA). A MP 2.186-16, porém, apresentava vários déficits, que dificultaram o desenvolvimento de pesquisas no Brasil que envolviam a exploração da biodiversidade brasileira para fins de bioprospecção e/ou desenvolvimento tecnológico (Paiva, 2009). Tal MP foi recentemente revogada pela lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, que entra em vigor a partir de 20 de novembro de 2015 (Brasil, 2015).

Rates e colaboradores (2011) publicaram uma revisão do estado da arte sobre moléculas de venenos de espécies de aracnídeos brasileiros de importância médica, com potenciais aplicações biotecnológicas. Com foco especial nas toxinas isoladas do escorpião *Tityus serrulatus* e das aranhas *Phoneutria nigriventer* e *Lycosa erythrognatha*, destacaram moléculas com atividades moduladoras da função erétil, anti-hipertensivas, analgésicas, neuroprotetoras e antimicrobianas. Essa é uma amostra do potencial de moléculas isoladas de peçonhas de animais da fauna brasileira no desenvolvimento de fármacos e medicamentos com importantes aplicações.

## A.2 Patentes envolvendo venenos e toxinas animais

Atualmente, existem nos bancos de dados vários documentos de patentes (patentes concedidas ou pedidos de patentes) que tratam de produtos desenvolvidos a partir de venenos e toxinas animais. Como exemplo, podemos citar documentos de patentes envolvendo o uso de veneno e/ou toxina de serpentes (CN101845093; CN102234314; CN101933957; CN102451463; CN102133232 CN102351951), aranhas (CN102205113), abelhas (US2011195482; KR2011120732 KR2012062328), escorpiões (CN101875691; US2011237523; CN102399279; WO2012041261), centopéias (CN101899095), cnidários (CN120516379) e sapos (CN102106904) (pesquisa realizada pela ferramenta de busca Integrity – [www.thomsonreutersintegrity.com](http://www.thomsonreutersintegrity.com), no modo “quick search”, com as palavras-chave “venom” e “toxin”, separadamente, em 21/08/2012).

Como pode ser observado acima, o país que mais deposita pedidos de patente de produtos envolvendo a exploração de sua fauna e de seu conhecimento tradicional é a

China (CN). Uma diferença importante existe entre a China e o Brasil. A lei de patentes da China, alterada em 2008, contém uma emenda que obriga o depositante a informar a origem dos recursos genéticos e do conhecimento tradicional associado (CTA), evitando que as invenções que estiverem em desacordo com as leis referentes ao acesso ao PG e ao CTA sejam patenteadas (GANEA, 2010). Porém, a lei chinesa não prevê multas ou outras punições para os depositantes de patente sem autorização de acesso. Portanto, os pesquisadores chineses ainda estão depositando patentes de forma aleatória, até que haja uma regularização efetiva para a implementação da lei. Ao contrário, no Brasil, muitas empresas e universidades foram multadas por usar os recursos naturais sem autorização. Em 2012, 35 empresas de medicamentos e cosméticos foram multadas em um total de R\$ 88 milhões (FARIELLO, 2012). Por outro lado, o processo para obter autorização para desenvolvimento tecnológico utilizando o PG nacional é ainda lento e ineficiente (SACCARO JUNIOR, 2013).

Desta forma, faz-se necessária uma ampla discussão entre os órgãos regulatórios e os pesquisadores brasileiros envolvidos na produção do conhecimento em áreas que requerem o acesso a materiais advindos da biodiversidade brasileira, no sentido de não se criar entraves que possam vir a dificultar os possíveis benefícios sociais e econômicos resultantes da investigação científica.

## **B. JUSTIFICATIVA**

No presente trabalho, realizou-se o mapeamento da produção patentária do Brasil e de países estrangeiros na área de desenvolvimento de fármacos e/ou medicamentos baseados em toxinas de animais da fauna brasileira, no período de 2000 a 2012.

O levantamento dos documentos de patente que exploram toxinas provenientes da fauna brasileira, depositados entre 2000 e 2012 pelo Brasil e por outros países, permitirá mostrar a situação atual do Brasil em relação ao mundo na produção de patentes nesta área, possibilitando indicar perspectivas para o desenvolvimento biotecnológico brasileiro.

## C. OBJETIVOS

1. Identificar as patentes produzidas, no Brasil e no exterior, que descrevem o desenvolvimento de produtos baseados em toxinas de animais da fauna brasileira, listando os países que fazem uso da biodiversidade brasileira para esse fim;

2. Revisar e estudar as leis brasileiras que tratam da exploração da biodiversidade brasileira para fins de pesquisa científica (PC), bioprospecção (BP) e desenvolvimento tecnológico (DT).

## D. MATERIAL E MÉTODOS

### D.1 Levantamento das patentes produzidas, no Brasil e no exterior, que descrevem o desenvolvimento de produtos baseados em toxinas de animais da fauna brasileira

Este levantamento foi realizado mediante pesquisa nos seguintes bancos de patentes: WIPO ([patentscope.wipo.int/search](http://patentscope.wipo.int/search)); EPO ([worldwide.espacenet.com](http://worldwide.espacenet.com)); INPI ([patentesonline.com.br](http://patentesonline.com.br)).

As buscas realizadas com palavras-chave mais genéricas, como *Brazilian*, *Brazil*, *toxin*, *venom*, *peptide*, *peçonha*, foram realizadas utilizando-se o código de IPC (International Patent Classification) A61K, que abrange “necessidades humanas; ciências médicas ou veterinárias; higiene; preparações para propósitos médicos, dentais ou de toalete”. As buscas utilizando as espécies listadas abaixo (**Tabela 13**) não foram realizadas com restrição de IPC.

A lista de espécies da **Tabela 13** foi produzida a partir de uma busca de artigos científicos no sítio de busca PubMed, usando-se as palavras-chave “Brazilian” e “venom”. Esta busca selecionou 263 artigos, datados de 1955 a 2013, e, a partir desses, as espécies brasileiras cujo veneno tem sido estudado foram listadas. Acrescentaram-se à lista, posteriormente, espécies brasileiras encontradas nas patentes ou pedidos de patentes encontrados.

A **Tabela 14** mostra uma relação dos sítios de busca utilizados e das combinações de palavras-chave utilizadas, além dos IPCs.

**Tabela 13- Lista de espécies peçonhentas brasileiras utilizadas na busca em bancos de dados de patentes**

<b>Grupos</b>	<b>Espécies</b>	<b>Gêneros</b>
Abelhas, Mariposas e Vespas	<i>Apis mellifera</i> <i>Cerodirphia speciosa</i> <i>Polybia ignobilis</i> ; <i>P. paulista</i> <i>Protonectarina sylveirae</i>	<i>Apis</i> <i>Cerodirphia</i> <i>Polybia</i> <i>Protonectarina</i>
Anêmonas	<i>Anemonia erythraea</i> <i>Bunodosoma caissarum</i>	<i>Anemonia</i> <i>Bunodosoma</i>
Aranhas	<i>Acanthoscurria brocklehursti</i> ; <i>A. geniculata</i> ; <i>A. gomesiana</i> <i>Ctenus medius</i> Keyserling <i>Phoneutria nigriventer</i> ; <i>P. reidy</i> <i>Lasiadora sp.</i> <i>Lycosa erythrognatha</i> <i>Loxosceles adalaida</i> ; <i>L. gaucho</i> ; <i>L. intermedia</i> ; <i>L. laeta</i> ; <i>L. similis</i> <i>Nephilengys cruentata</i> <i>Avicularia juruensis</i> <i>Parawixia bistrata</i> <i>Vitalius dubius</i> Mello-Leitão	<i>Acanthoscurria</i> <i>Ctenus</i> <i>Phoneutria</i> <i>Lasiadora</i> <i>Lycosa</i> <i>Loxosceles</i> <i>Nephilengys</i> <i>Avicularia</i> <i>Parawixia</i> <i>Vitalius</i>
Cnidários	<i>Olindias sambaquiensis</i> <i>Tamoya haplonema</i> <i>Chiropsalmus quadrumanus</i> <i>Physalis physalis</i>	<i>Olindias</i> <i>Tamoya</i> <i>Chiropsalmus</i> <i>Physalis</i>
Cobras e serpentes	<i>Bothrops alternatus</i> ; <i>B. atrox</i> ; <i>B. cotiara</i> ; <i>B. erythromelas</i> ; <i>B. fonsecai</i> ; <i>B. insularis</i> ; <i>B. jararaca</i> ; <i>B. jararacuçu</i> ; <i>B. moojeni</i> <i>Crotalus durissus cascavella</i> ; <i>C. durissus durissus</i> ; <i>C. durissus terrificus</i> ; <i>C. durissus ruruima</i> <i>Lachesis muta muta</i> ; <i>L. muta rhombeata</i> ; <i>L. trigonocephalus</i> <i>Micrurus altirostris</i> ; <i>M. Corallines</i> ; <i>Mi. Frontalis</i> ; <i>M. lemniscatus</i> <i>Oxyrhopus trigeminus</i>	<i>Bothrops</i> <i>Crotalus</i> <i>Lachesis</i> <i>Micrurus</i> <i>Oxyrhopus</i>
Conídios	<i>Conus regius</i>	<i>Conus</i>
Escorpiões	<i>Opisthacanthus cayaporum</i> <i>Tityus bahiensis</i> ; <i>T. Cambridgei</i> ; <i>T. costatus</i> Karsch; <i>T. Fasciolatus</i> ; <i>T. Obscurus</i> ; <i>T. Serrulatus</i> ; <i>T. Stigmurus</i>	<i>Opisthacanthus</i> <i>Tityus</i>
Peixes	<i>Cathorops spixii</i> <i>Potamotrygon cf. Scobina</i> ; <i>P. gr. Orbigyni</i> <i>Scorpaena brasiliensis</i> Cuvier; <i>S. plumieri</i> Bloch <i>Thalassophryne nattereri</i>	<i>Cathorops</i> <i>Potamotrygon</i> <i>Scorpaena</i> <i>Thalassophryne</i>
Quilópodes	<i>Cryptops iheringi</i> <i>Otostigmus pradoi</i> <i>Scolopendra viridicornis</i>	<i>Cryptops</i> <i>Otostigmus</i> <i>Scolopendra</i>
Sapos, rãs e pererecas	<i>Brachycephalus ephippium</i> <i>Bufo rubescens</i> <i>Epipedobates flavopictus</i> <i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	<i>Brachycephalus</i> <i>Bufo</i> <i>Epipedobates</i> <i>Phyllomedusa</i>

**Tabela 14 – Sítios de busca, palavras-chave e IPCs utilizados**

Sítio de busca	Campo	Palavras-chave	IPC
WIPO	English description	Brazil*	A61K
	English claims	Toxin*	
	English description	Brazil* venom*	A61K
	English description	Brazil* *scorpion*	A61K
	English description	Brazil* *fish* venom*	A61K
	English description	Brazil* *spider*	A61K
	English description	Acanthoscurria	-
	English description	“Apis melifera” and Brazil*	A61K
	English description	“Apis melifera” and venom*	A61K
	Description	Phoneutria	A61K
	Description	Tityus	A61K
	Description	Crotalus and Bra*il	A61K
	Description	Bothrops and Bra*il	A61K
	Description	Loxosceles and Bra*il	A61K
	Description	Opisthacanthus or Lachesis or Micrurus and Bra*il	-
	Description	Oxyrhopus or Ctenus or Lasiodora or Lycosa and Bra*il	-
	Description	Nephilengys or Parawixia or Vitalius or Avicularia and Bra*il	-
	Description	Cerodirphia or Polybia or Protonectarina or Anemonia or Bunodosoma and Bra*il	-
	Description	Olindias or Tamoya or Chiropsalmus or Physalis or Conus and Bra*il	-
	Description	Cathorops or Potamotrygon or Scorpaena or Thalassophryne and Bra*il	-
Description	Cryptops or Otostigmus or Scolopendra and Bra*il	-	
Description	Brachycephalus or Bufo or Epipedobates or Phyllomedusa and Bra*il	-	
EPO	Title or abstract	Venom and Brazil*	-
EPO, INPI	Title or abstract	Phoneutria / TityusAcanthoscurria / Bothrops / Crotalus / Loxosceles / Opisthacanthus / Lachesis / Micrurus / Oxyrhopus / Ctenus / Lasiodora / Lycosa / Nephilengys / Parawixia / Vitalius / Avicularia / Cerodirphia / Polybia / Protonectarina / Anemonia / Bunodosoma / Olindias / Tamoya / Chiropsalmus / Physalis / Conus / Cathorops / Potamotrygon / Scorpaena / Thalassophryne / Cryptops / Otostigmus / Scolopendra / Brachycephalus / Bufo / Epipedobates / Phyllomedusa	A61K
EPO	Applicant	FUNED or “Ezequiel Dias”	
EPO	Applicant	Butantan	
INPI		veneno	
INPI		toxina	

A partir dos resultados da busca foram selecionadas as patentes e os pedidos de patente que envolviam espécies da fauna brasileira, assim como relacionados os países envolvidos e os titulares das tecnologias.

As buscas foram realizadas entre agosto de 2012 e maio de 2013, e somente as patentes ou pedidos de patentes com data de prioridade a partir do ano 2000 foram analisadas, visto que a MP 2.052 data de 29 de junho de 2000, não havendo outro tipo de regulamentação quanto ao acesso ao patrimônio genético anterior a esta data.

## **D.2 Revisão e estudo das leis que tratam da exploração da biodiversidade brasileira para fins de pesquisa científica (PC), bioprospecção (BP) e desenvolvimento tecnológico (DT)**

Esta etapa envolveu o estudo da MP 2.186-16 de 2001 ([Brasil, 2001a](#)) e o estudo das exigências do CGEN para pesquisa com acesso ao PG para fins de bioprospecção, além das resoluções do INPI para adaptação dos pedidos de patente à MP. Envolveu ainda uma comparação da MP 2.186-16 com a recente lei da biodiversidade (lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015), cuja entrada em vigor se dará em 20 de novembro de 2015 ([Brasil, 2015](#)).

## **E. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **E.1 Levantamento das patentes produzidas, no Brasil e no exterior, que descrevem o desenvolvimento de produtos baseados em toxinas de animais da fauna brasileira**

Os resultados aqui apresentados foram publicados em um artigo de revisão ([Almeida et al., 2015](#)). Os 55 documentos de patentes (incluindo pedidos de patentes e patentes concedidas) encontrados a partir das buscas, as espécies da fauna brasileira envolvidas e os depositantes das tecnologias estão listados na **Tabela suplementar (ANEXO III)**.

A análise destes resultados permite concluir que, dos 39 gêneros investigados, apenas 9 (23%) estão envolvidos em propriedade intelectual (**Tabela 15**). Este dado nos mostra que, apesar de nossa grande biodiversidade, do grande número de pesquisa e da elevada produção científica, o desenvolvimento de propriedade intelectual é ainda pequeno.

Analisando a produção de propriedade intelectual por titulares da tecnologia (**Tabela 16**), a instituição que possui o maior número de documentos de patente envolvendo o uso de venenos, toxinas e/ou seus derivados provenientes de espécies da fauna brasileira é a Universidade Federal de Minas Gerais (16%), seguida da empresa alemã Toximed GMBH (13%). É importante notar que, de todos os titulares brasileiros (49% das invenções), as universidades e instituições públicas detêm a maioria dos documentos de patente (70%). O oposto pode ser observado para os titulares estrangeiros

(51% das invenções), dos quais 85% dos pedidos foram depositados por empresas e inventores independentes (**Tabela 17**).

Esses dados mostram que, embora os pesquisadores brasileiros estejam iniciando a produção de propriedade intelectual a partir do resultado de sua pesquisa, suas invenções permanecem na universidade e não são licenciadas, transferidas ou submetidas a parcerias com a indústria de forma satisfatória.

A **Tabela 18** mostra que, embora os inventores brasileiros detenham apenas 49% dos documentos de patente, o Brasil é o país que detém o maior número de documentos de patentes, seguido dos Estados Unidos (16%) da Alemanha (15%). É importante ressaltar que a lei que rege sobre o uso do PG no Brasil só é aplicável para pedidos de patente depositados junto ao INPI, e que os pedidos de patente depositados no exterior não são regidos pela MP 2.186-16. Desta forma, a pesquisa envolvendo a exploração da fauna brasileira no exterior não está submetida a toda a burocracia que os inventores brasileiros precisam enfrentar ([SACCARO JUNIOR, 2013](#)).

As invenções envolvendo o uso de venenos, toxinas e/ou seus derivados, provenientes da fauna brasileira, estão principalmente relacionadas com drogas anticâncer ou antimicrobianas (42%), anti-venenos e/ou vacinas (13%) e composições hipotensivas (11%), mas outras classes de drogas são também encontradas, como mostrado na **Tabela 19**.

**Tabela 15 - Número de patentes por gênero**

Gênero	Número de patentes
Crotalus	14
Lachesis	11
Bothrops	11
Loxosceles	10
Phoneutria	5
Tityus serrulatus	5
Apis	3
Acanthoscurria	1
Phyllomedusa	1

**Tabela 16 - Número de patentes por titular**

<b>Titular</b>	<b>Número de patentes</b>
UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais)	9
TOXIMED GmbH	7
FUNED (Fundação Ezequiel Dias)	4
FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)	4
FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais)	3
FUNDAÇÃO INSTITUTO BUTANTAN	3
USP (Universidade de São Paulo).	3
BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA	3
WEICKMANN, DIRK	3
REID, PAUL	3
UFPR (Universidade Federal do Paraná)	2
PIRAINO, ROBERTO	2
NEBERA, SERGEJ ANATOL'EVICH	2
EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)	1
UNB (Universidade de Brasília)	1
UFU (Universidade Federal De Uberlândia)	1
UFSCAR (Universidade Federal de São Carlos)	1
UERJ (Universidade Estadual do Rio de Janeiro)	1
EAST CAROLINA UNIVERSITY	1
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO	1
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO	1
LABORATORIOS SILANES S.A.	1
LABORATÓRIO BIOSINTÉTICA LTDA	1
QILU PHARMACEUTICAL CO LTD	1
FUTURAGENE ISRAEL LTD	1
SHENYANG SHOUZHENG BIOLOG TECH	1
AMUNIX INC	1
AMGEN INC	1
CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique)	1
COLETICA	1
COSTA, LUIS ALBERTO	1
ROMANOV, VLADIMIR VLADIMIROVICH	1
LECCA, PEDRO J	1
DAVYDENKOV VALERIJ NIKOLAEVICH	1
GOPALAKRISHNAKONE, PONNAMPALAM	1
REEVES WILLIAM H	1
FARRINGTON, DANIEL	1

**Tabela 17 – Número de patentes por tipo de instituição titular**

<b>Tipo de instituição titular</b>	<b>Número de patentes</b>
Universidades públicas brasileiras	19
Universidades e institutos estrangeiros	3
Fundações e Institutos Brasileiros	4
Empresas Brasileiras	2
Empresas Estrangeiras	8
Pessoa física brasileira	3
Pessoa física estrangeira	9

**Tabela 18 – Número de patentes por nacionalidade dos inventores**

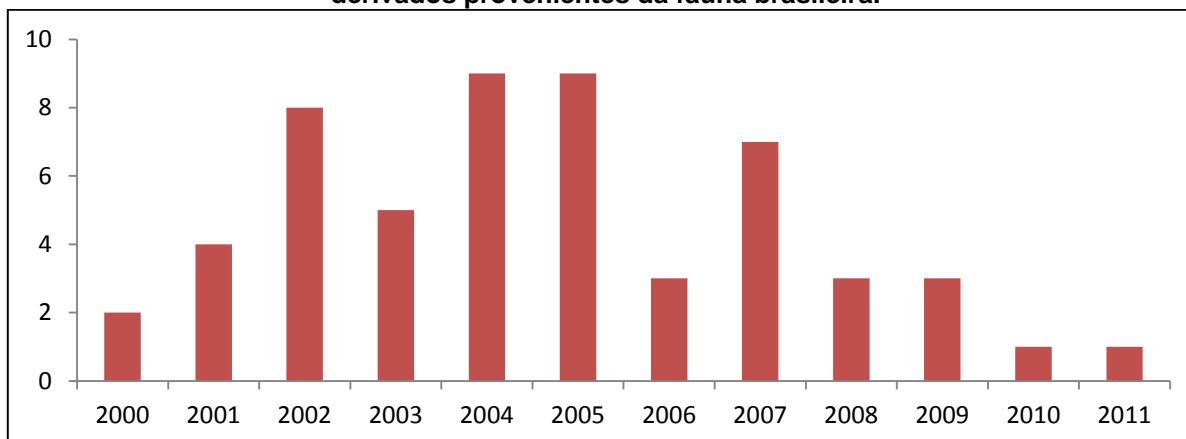
<b>Nacionalidade dos Inventores</b>	<b>Número de patentes</b>
Brasil	27
Estados Unidos	9
Alemanha	8
Rússia	4
França	3
Argentina	2
China	2
Espanha	1
Irlanda	1
México	1
Singapura	1
Israel	1

**Tabela 19 – Número de patentes por tipo de invenção**

<b>Tipo de Invenção</b>	<b>Número de patentes</b>
Composição farmacêutica para tratamento de tumores	12
Composições antimicrobianas e imunomoduladores	11
Composições para tratamento de doenças degenerativas, Aids e/ou outras doenças	12
Anticorpos, vacinas e soros	7
Composições anti-hipertensivas e/ou para tratamento de doenças vasculares	6
Composições antinociceptivas e/ou antiinflamatórias	5
Métodos e Kits	3
Outros	2

A análise do número de pedidos de patente por ano (**Figura 19**) permite perceber que, de 2000 a 2005, o número de pedidos de patentes envolvendo venenos, toxinas ou derivados provenientes da fauna brasileira cresceu. Porém, de 2005 a 2011, este número cai bruscamente, de 9 para 1 pedido por ano. Este dado provavelmente mostra que a pesquisa envolvendo espécies brasileiras tem sido desencorajada por todas as leis que regulamentam o acesso ao PG. Embora a MP 2.186-16 esteja em vigor desde 2001, suas consequências para a produção científica só puderam ser notadas alguns anos mais tarde.

**Figura 19 - Número de patentes depositadas por ano relativo ao uso de venenos, toxinas ou derivados provenientes da fauna brasileira.**



## **E.2 Revisão e estudo das leis que tratam da exploração da biodiversidade brasileira para fins de pesquisa científica (PC), bioprospecção (BP) e desenvolvimento tecnológico (DT)**

Em 1992, ocorreu no Rio de Janeiro a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (popularmente conhecida como Rio 92), durante a qual foi assinada a CDB ([Brasil, 1994](#)). Antes dela, qualquer pessoa ou empresa tinha livre acesso aos recursos naturais, que eram considerados patrimônio comum da humanidade. Somente após a CDB foram reconhecidos os direitos de soberania nacional sobre os recursos biológicos. A CDB incorporou questões relativas a acesso aos recursos genéticos, direitos dos detentores do conhecimento tradicional e formas de repartição de benefícios provenientes da utilização desse conhecimento e/ou dos recursos genéticos entre os países provedores e os usuários ([Marinho, 2006](#)). Conforme o artigo 15.1 da CDB, em razão da soberania dos Estados, “a autoridade para determinar o acesso a recursos genéticos pertence aos governos nacionais e está sujeita à legislação nacional” ([Berger Filho, 2004](#)). Desta forma, a apropriação injusta do patrimônio genético (PG) e do conhecimento tradicional associado (CTA) de uma nação passou a ser classificada como biopirataria ([Dias, 2007](#)).

O acesso ao PG e ao CTA no Brasil está regulado pela MP 2.186-16, publicada 2001 ([Brasil, 2001a](#)), que vigora até 17 de novembro de 2015, quando entra em vigor a Lei nº 13.123, de 2015, que revoga tal MP ([Brasil, 2015](#)). A MP 2.186-16/2001 substitui a MP

2.052/2000, que foi adotada sob o argumento de que a ausência de legislação regulamentadora da bioprospecção impossibilitava a total aplicação da matéria preconizada na CDB no Brasil. Contudo, a urgência na publicação de uma medida provisória visava, na realidade, evitar a biopirataria que decorreria de um acordo firmado entre a organização social brasileira BioAmazônia e a empresa suíça Novartis Pharma AG, o qual não havia sido submetido à intervenção dos órgãos da administração direta do governo federal. Se por um lado a elaboração apressada da MP evitou a efetivação de um acordo desfavorável ao Brasil, por outro resultou em uma legislação cheia de lacunas e imprecisões conceituais (Machado e Godinho, 2011).

De acordo com a MP 2186-16/2001, toda PC, BP ou DT que envolva acesso PG, existente em condição *in situ*, ou ao CTA deverá solicitar prévia autorização de acesso. Segundo o art. 7º, inciso I da MP 2186-16/2001, patrimônio genético refere-se à “informação de origem genética, contida em amostras do todo ou de parte de espécime vegetal, fúngico, microbiano ou animal, na forma de moléculas e substâncias provenientes do metabolismo destes seres vivos e de extratos obtidos destes organismos vivos ou mortos, encontrados em condições *in situ*, inclusive domesticados, ou mantidos em coleções *ex situ*, desde que coletados em condições *in situ* no território nacional, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva”. Já o inciso IV do mesmo artigo define o termo “acesso ao patrimônio genético” como a “obtenção de amostra de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando a sua aplicação industrial ou de outra natureza”. Cabe ressaltar que, segundo a Orientação Técnica nº1 (Brasil, 2003a) emitida pelo CGEN, a “obtenção de amostra de componente do patrimônio genético” neste referido inciso deve ser entendida como “a atividade realizada sobre o patrimônio genético com o objetivo de isolar, identificar ou utilizar informação de origem genética ou moléculas e substâncias provenientes do metabolismo dos seres vivos e de extratos obtidos destes organismos”. Por fim, o “acesso ao CTA”, conforme o inciso V do art. 7º, refere-se à “obtenção de informação sobre conhecimento ou prática individual ou coletiva, associada ao PG, de comunidade indígena ou de comunidade local, para fins de pesquisa científica, desenvolvimento tecnológico ou bioprospecção, visando sua aplicação industrial ou de outra natureza”.

O CGEN, tratado no artigo 10 dessa MP, é o órgão responsável por deliberar as autorizações de acesso. O CGEN é formado por representantes de cada um dos nove ministérios (MMA; Ministério da Ciência e Tecnologia; Ministério da Saúde; Ministério da Justiça; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Ministério da Defesa; Ministério da Cultura; Ministério das Relações Exteriores; Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior) e dos órgãos: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Fundação Nacional do Índio (FUNAI), INPI, Fundação Cultural Palmares, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), EMBRAPA, FIOCRUZ, Instituto Evandro Chagas e Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio De Janeiro (Brasil, 2001b). O IBAMA tem competência para emitir autorização de acesso e remessa de amostra de componente do PG para fins de PC (Brasil, 2003b). Já o CNPq pode emitir autorizações para acesso e remessa de amostra de componente do PG para fins de pesquisa científica, BP e DT (Brasil, 2010). A partir de 2003, outros órgãos foram designados pelo CGEN para emitir algumas autorizações de acesso específicas, como o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) que foi credenciado para emitir autorizações de acesso ao CTA ao PG para fins de PC (Brasil, 2011a).

Cabe ressaltar que os processos envolvendo acesso ao PG ou ao CTA sujeitos a essa legislação são aqueles desenvolvidos ou concluídos a partir de 30 de junho de 2000, data da primeira edição da MP, sendo, portanto, a data em que o marco legal do acesso ao PG ou ao CTA foi instituído no Brasil. Porém, o CGEN só passou a funcionar a partir de 2002, pois o Decreto nº 3.945, que definiu sua composição e estabeleceu as regras do seu funcionamento, data de 28 de setembro de 2001. Desta forma, a aplicação da legislação referente ao acesso ao PG ou ao CTA começou a ser efetiva apenas após esta data.

### **A propriedade intelectual no Brasil e o acesso ao PG ou ao CTA**

O art. 31 da MP 2.186-16/2001 dispõe que “a concessão de direito de propriedade industrial pelos órgãos competentes, sobre processo ou produto obtido a partir de amostra de componente do PG, fica condicionada à observância desta MP, devendo o requerente informar a origem do PG e do CTA, quando for o caso”. Para assegurar que os pedidos de patente que utilizam componentes da biodiversidade nacional cumpram a legislação

vigente no país, o INPI, através da Resolução PR nº 69/2013 (antes Resolução 207/09), normalizou os procedimentos relativos aos pedidos de patente de invenção cujo objeto tenha sido obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do PG nacional. De acordo com o artigo 2º desta resolução, “o requerente de pedido de patente de invenção cujo objeto tenha sido obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do PG nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000, deverá informar ao INPI, em formulário específico, instituído por este ato, na forma do seu anexo 1, isento do pagamento de retribuição, a origem do PG e do CTA, quando for o caso, bem como o número da Autorização de Acesso correspondente”. Segundo o artigo 3º-A, “até 15 de maio de 2009, fica facultado ao requerente de pedido de patente de invenção, a que se refere o art. 2º e o § 2º do art. 3º, apresentar ao INPI as informações exigidas nesta Resolução por meio do formulário instituído pela Resolução nº 134, de 13 de dezembro de 2006”. Desta forma, após 15 de maio de 2009, torna-se obrigatória a apresentação da Declaração de Acesso (e o número da Autorização de Acesso) ou da Declaração Negativa de Acesso, seja no ato do depósito, seja mediante resposta a exigências emitidas pelo INPI. Conforme o artigo 3º, “por ocasião do exame do pedido de patente, o INPI poderá formular a exigência necessária a sua regularização, com vistas ao cumprimento do disposto no art. 2º, que deverá ser atendida no prazo de sessenta dias, sob pena de arquivamento do pedido de patente, nos termos do art. 34, inciso II, da Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996.”

A Resolução nº 35, de 23 de maio de 2011, elaborada pelo CGEN, possibilitou a regularização retroativa dos pedidos de patentes que apresentavam acesso ao PG ou ao CTA e não haviam requerido Autorização de Acesso aos órgãos competentes. Esta resolução dispõe sobre a regularização de atividades de acesso ao PG e/ou ao CTA e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a MP 2.186-16, estipulando a data de 30 de junho de 2000 como marco para possíveis regularizações.

As resoluções e procedimentos citados valem apenas no território nacional, para pessoas físicas ou jurídicas, brasileiras ou estrangeiras, que desejem depositar patentes no Brasil (Dias, 2007). Desta forma, no Brasil, os pedidos de patente que envolvem acesso à informação proveniente de recursos genéticos e conhecimentos tradicionais associados somente serão analisados pelo INPI se atenderem aos requisitos estabelecidos pela legislação de acesso ao PG ou ao CTA. Porém, é importante destacar que pedidos de

patentes relacionados aos mesmos produtos e processos podem ser livremente depositados e, possivelmente, concedidos em qualquer outro país que não exija a autorização de acesso, o consentimento prévio fundamentado e a repartição de benefícios (Berger Filho, 2004).

### **A Biodiversidade Brasileira e o Acesso ao PG ou ao CTA**

De acordo com um levantamento realizado pelo MMA, em 2006 o país contava com, pelo menos, 103.870 espécies animais e 43.020 espécies vegetais (Brasil, 2006). Segundo o “Quarto Relatório Nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica” do MMA (Brasil, 2011b), em média, 700 novas espécies animais são reconhecidas por ano no Brasil. O mesmo relatório afirma que, até 2011, apesar de apenas 7.302 espécies brasileiras de animais terem sido descritas cientificamente, os materiais biológicos existentes nas coleções zoológicas sugerem que 120.384 espécies animais sejam conhecidas no país.

É inegável que a Amazônia, a Mata Atlântica e os cerrados constituem um rico patrimônio biológico e, aliado a essa riqueza em biodiversidade, o Brasil, juntamente com outros países que integram o ecossistema amazônico, possui um dos maiores repositórios de conhecimento tradicional da humanidade (Mascarenhas, 2004). Porém, antes da MP 2.186-16/2001, este conhecimento vinha sendo apropriado sem que seus detentores autorizassem, ou mesmo, tivessem conhecimento sobre o seu valor, potencial ou real. Segundo Azevedo (2003), aproximadamente 74% das drogas derivadas de plantas medicinais foram obtidas a partir de pesquisa junto a comunidades tradicionais, sendo que menos de 0,0001% dos lucros do setor farmacêutico retornaram para estas comunidades.

O conhecimento tradicional permite o desenvolvimento de novos produtos ou processos pela indústria farmacêutica com menores investimentos. Por exemplo, a bioprospecção, que envolve a pesquisa de princípios ativos a partir da biodiversidade, permite, em média, a seleção de apenas uma amostra em cada 10.000, o que a torna uma atividade de alto risco. O CTA diminui em muito este risco, uma vez que esse conhecimento permite um melhor direcionamento à pesquisa (Azevedo, 2003).

Apesar da rica biodiversidade, do vasto conhecimento tradicional e do grande interesse pela busca de novos produtos e processos no Brasil, o número de Solicitações de Autorização de Acesso ao PG ou ao CTA ainda é inexpressivo: apenas 36 solicitações foram autuadas pelo CGEN em 2010; 44 em 2011 e 53 em 2012. Esses números sugerem que ainda há muitos projetos de pesquisa sendo desenvolvidos sem as devidas autorizações, e que nem todas as universidades e empresas estão efetivamente comprometidas com os processos de solicitação e/ou regularização de acesso.

Quanto às autorizações concedidas, os números são ainda menores. Por exemplo, no ano de 2010 apenas sete, das 36 solicitações (19,4%) foram emitidas pelo CGEN, enquanto nove autorizações foram concedidas pelo CNPq. A porcentagem de autorizações concedidas pelo CGEN em relação ao número de solicitações vem crescendo: 34,1 % em 2011 e 66% em 2012, o que demonstra uma adaptação progressiva dos órgãos emissores de tais autorizações à crescente demanda. Porém, apesar do número de autorizações concedidas pelo CGEN e CNPq estar crescendo, ele certamente não corresponde aos números reais de PC, BP e DT com acesso ao PG ou ao CTA que estão sendo realizados no país.

Quanto às 43 instituições que receberam autorização de acesso pelo CNPq, entre 2010 e 2013, apenas 5 eram empresas privadas. Estes números não refletem o número de instituições e empresas potencialmente envolvidas em PC, BP e/ou DT com acesso ao PG ou ao CTA. De acordo com os dados consolidados do relatório de 2012 do Formict (Formulário para Informações sobre a Política de Propriedade Intelectual das Instituições Científicas e Tecnológicas do Brasil) do Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI), existem 160 Instituições de Ciência e Tecnologia (ICTs) públicas e 33 ICTs privadas, totalizando 193 instituições envolvidas no processo de inovação ([Formict, 2012](#)). Segundo mapeamento realizado pelo Centro Brasileiro de Análise e Planejamento (CEBRAP) em 2011, 237 empresas atuavam na área de biotecnologia no país ([Freire, 2011](#)).

### **A Lei da Biodiversidade: LEI Nº 13.123, DE 20 DE MAIO DE 2015**

A Lei da Biodiversidade (lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015), em vigor desde 17 de novembro de 2015, foi elaborada levando em consideração muitos aspectos apontados pela comunidade como negativos em relação à MP-2.186-16. Os principais aspectos apontados foram: (I) baixo protagonismo de povos e comunidades tradicionais em relação ao CTA; (II) excesso de burocracia, com exigências de difícil cumprimento; (III) criminalização e desestímulo à pesquisa; (III) entrave à inovação e à concessão de patentes, condicionadas à autorização do CGEN; (IV) repartição de benefícios ineficiente, não alcançando a maioria dos povos e comunidades (Azevedo, 2003; Berger Filho, 2004; Dias, 2007; Machado e Godinho, 2011).

Em resposta aos problemas apontados acima, a lei nº 13.123 apresenta regras e definições mais claras, que facilitam e permitem maior agilidade ao processo de autorização de acesso ao PG ou ao CTA. Por exemplo, o acesso ao PG ou ao CTA será definido como para Pesquisa ou para Desenvolvimento Tecnológico, extinguindo-se Bioprospecção. A definição das espécies que são consideradas como PG nacional ficou mais clara, incluindo-se o conceito de população espontânea (espécies exóticas, mas capazes de se reproduzir naturalmente, sem a ajuda humana) como parte do PG nacional, além de incluir todos os microrganismos coletados no território nacional.

A nova lei define que toda a pesquisa envolvendo PG ou CTA deve ser cadastrada, com caráter auto-declaratório, o que significa que não haverá análise do projeto para a emissão do registro, agilizando o processo. Outra novidade, é que o cadastro não precisa ser realizado previamente ao início da pesquisa, mas deve ser feito antes da divulgação, comercialização, requerimento de patentes ou envio de amostra ao exterior.

Com relação à repartição de benefícios, esta somente será feita com a comunidade quando a origem do PG ou CTA for identificável. Quando não identificável, a repartição se dará com a União, através do Fundo Nacional de Repartição de Benefícios (FNRB).

Além disso, a lei nº 13.123 está mais adaptada ao Protocolo de Nagoya, de 29 de outubro de 2010, sobre Acesso a Recursos Genéticos e Repartição de Benefícios

decorrentes da sua utilização, que prevê a soberania dos países na regulamentação ao acesso a seus recursos genéticos no âmbito internacional (disponível em <https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf>, acessado em novembro de 2015). De acordo com os termos do Protocolo de Nagoya, este entraria em vigor 90 dias após a confirmação de 50 países signatários, que ocorreu em outubro de 2014, ainda sem a ratificação por parte do Brasil.

Após a publicação do regulamento vinculado à lei nº 13.123 e após entrada em vigor da mesma, será possível avaliar, com maior clareza, os impactos dessas novas regras.

## **F. CONCLUSÕES:**

Diante dos resultados obtidos, é possível destacar as seguintes conclusões:

- ✓ Apesar de sua rica biodiversidade, o Brasil representa uma pequena porção de todas as invenções em biotecnologia envolvendo venenos, toxinas e seus derivados.
- ✓ A maioria dos documentos de patente brasileiros é depositada por universidades públicas, e nenhum deles foi licenciado até o momento.
- ✓ As políticas públicas deveriam ser adaptadas para que o investimento privado seja possibilitado, melhorando a inovação e a transferência de tecnologia no país.

## REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ M. et al., "Catalogue of Biotechnology Patents in the Mercosur" *Biotecsur*, ([http://docs.biotecsur.org/informes/en/inventario\\_9\\_patentes\\_ms.pdf](http://docs.biotecsur.org/informes/en/inventario_9_patentes_ms.pdf)., acessado em fevereiro de 2012), 60 pages, 2008
- ALMEIDA F.M., PIMENTA A.M.C., OLIVEIRA M.C., DE LIMA M.E, "Venoms, toxins and derivatives from the Brazilian fauna: valuable sources for drug Discovery", *Acta Physiologica Sinica*, vol. 67, no. 3, pp. 261–270, 2015
- ANDERSON, KE, "Pharmacology of penile erection", *Pharmacol Ver* 53, 417-450, 2001
- ANDRADE E., VILLANOVA F., BORRA P., LEITE K., TRONCONE L., CORTEZ I., MESSINA L., PARANHOS M., CLARO J., SROUGI M., "Penile erection induced in vivo by a purified toxin from the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer*", *BJU Int.*, vol. 102, no. 7, pp. 835-7, 2008
- ANVISA, " RE nº 899, de 29 de maio de 2003 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"; *D.O.U. - Diário Oficial da União*; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003
- ARAÚJO D.A., CORDEIRO M.N., DINIZ C.R., BEIRÃO P.S., "Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current", *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, vol. 347, no. 2, pp. 205-8, 1993
- AZEVEDO C.M.A., "Bioprospecção – Coleta de materiais biológicos com a finalidade de explorar os recursos genéticos". Série Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. Caderno nº17, 2º Edição revisada. São Paulo, 2003
- AZMIN MN, FLORENCE AT, HANDJANI-VILA RM, STUART JF, VANLERBERGHE G, WHITTAKER JS., "The effect of non-ionic surfactant vesicle (niosome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice", *J Pharm Pharmacol.*, 37(4):237-42, 1985
- BAHIA A.P., AZEVEDO E.G., FERREIRA L.A., FRÉZARD F., "New insights into the mode of action of ultradeformable vesicles using calcein as hydrophilic fluorescent marker", *Eur J Pharm Sci.*, 39(1-3):90-6, 2010
- BANGHAM A.D., STANDISH M.M., WATKINS J.C., "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids", *J. Mol. Biol.*, vol. 13, pp. 238–252, 1965
- BATISTA C. M., de CARVALHO C.M.B., MAGALHÃES N.S.S., "Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte". *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 43, no. 2, pp. 167-179, 2007
- BENSON G.S., MCCONNELL J., LIPSHULTZ L.I., CORRIERE J.N. JR., WOOD J., "Neuromorphology and neuropharmacology of the human penis: an in vitro study", *J Clin Invest*, vol. 65, no. 2, pp. 506-13, 1980

BERGER FILHO A.G.B., "Acesso a propriedade intelectual sobre biodiversidade e os conhecimentos tradicionais associados". Tese de Mestrado em Direito – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2004

BIVALACQUA T.J., CHAMPION H.C., HELLSTROM W.J., KADOWITZ P.J., "Pharmacotherapy for erectile dysfunction", *Trends Pharmacol Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 484-9. Review. 2000

BIVALACQUA T.J., CHAMPION H.C., ABDEL-MAGEED A.B., KADOWITZ P.J., HELLSTROM W.J., "Gene transfer of prepro-calcitonin gene-related peptide restores erectile function in the aged rat", *Biol Reprod.*, vol. 65, no. 5, pp. 1371-7, 2001

BIVALACQUA, TJ et al., "Endothelial dysfunction in erectile dysfunction: role of the endothelium in erectile physiology and disease", *J Androl*, 26(6): 517-37, 2003

BOLZINGER, M., BRIANÇON, S., PELLETIER, J., CHEVALIER, Y., "Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17(3), 156-165, 2012

BONIFACIO F.N., GIOCANTI M., REYNIER J.P., LACARELLE B., NICOLAY A., "Development and validation of HPLC method for the determination of Cyclosporin A and its impurities in Neoral capsules and its generic versions", *J Pharm Biomed Anal.*, vol 49, no. 2, pp. 540-6, 2009

BRASIL (1994) Decreto Legislativo nº 2, de 04 de fevereiro de 1994

BRASIL (2001a) Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001

BRASIL. (2001b) Decreto Presidencial nº 3.945, de 28 de setembro de 2001.

BRASIL (2003a) Ministério do Meio Ambiente. Conselho De Gestão Do Patrimônio Genético. Orientação Técnica Nº 1, de 24 de setembro de 2003

BRASIL (2003b). Ministério do Meio Ambiente. Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. Deliberação nº 40, de 24 de setembro de 2003.

BRASIL (2006). Ministério do Meio Ambiente. Avaliação do Estado do Conhecimento da Biodiversidade Brasileira. Volume I. Brasília, pp269

BRASIL (2010). Ministério do Meio Ambiente. Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. Deliberação nº 268, de 09 de dezembro de 2010.

BRASIL (2011a). Ministério do Meio Ambiente. Conselho de Gestão do Patrimônio Genético Resolução nº 35, de 27 de abril de 2011.

BRASIL(2011b). Ministério do Meio Ambiente. Quarto Relatório Nacional para a Convenção Sobre Diversidade Biológica. Brasília, pp 250.

BRASIL (2015). Lei nº 13.123, de 20 de Maio de 2015. "Regulamenta o inciso II do § 1o e o § 4o do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea j do Artigo 8, a alínea c do

Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3o e 4o do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto no 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências”, 2015.

BURNETT A.L., LOWENSTEIN C.J., BREDT D.S., CHANG T.S., SNYDER S.H., “Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection”, *Science*, vol. 257, no. 5068, pp. 401-3, 1992

BUVAT J., COSTA P., MORLIER D., LECOCQ B., STEGMANN B., ALBRECHT D., “Double-blind multicenter study comparing alprostadil alpha-cyclodextrin with moxisylyte chlorhydrate in patients with chronic erectile dysfunction”, *J Urol.*, vol. 159, no. 1, pp. 116-9, 1998

CARDOSO J.L.C, FRANÇA F.O.S., WEN F.H., MÁLAQUE C.M.S., HADDAD JR V., “Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes”, *Elsevier, São Paulo, Brasil*, pp. 468, 2004

CARNEIRO G., SANTOS D.C., OLIVEIRA M.C., FERNANDES A.P., FERREIRA L.S., RAMALDES G.A., NUNAN E.A., FERREIRA L.A., “Topical delivery and in vivo antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous leishmaniasis”, *J Liposome Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 16-23, 2010

CEVC G., BLUMEG., “Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1104, pp. 226–232, 1992

CEVC G., SCHATZLEIN A. and RICHARDSEN H., “Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements”, *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1564, no. 1, pp. 21-30, 2002

CHAN W.C., WHITE P.D., “Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach”, *Oxford University Press*, 2000

CHITALEY K., WINGARD C.J., CLINTON WEBB R., BRANAM H., STOPPER V.S., LEWIS R.W., MILLS T.M., “Antagonism of Rho-kinase stimulates rat penile erection via a nitric oxide-independent pathway”, *Nat Med*, vol. 7, no. 1, pp. 119-22, 2001

CORDEIRO M.N., DINIZ C.R., VALENTIM A.C., VON EICKSTEDT V.R., GILROY J., RICHARDSON M., “The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer*” *FEBS Lett.*, vol. 310, no. 2, pp. 153-6, 1992

DAVIES K.P., TAR M., ROUGEOT C., MELMAN A., “Sialorphin (the mature peptide product of Vcsa1) relaxes corporal smooth muscle tissue and increases erectile function in the ageing rat”, *BJU Int.*, February ; vol. 99, no. 2, pp. 431–435, 2007

DE ANDRADE E. et al., "Study of the efficacy of Korean Red Ginseng in the treatment of erectile dysfunction", *Asian J Androl*, 9(2):241-4, 2007

DESAI P., PATLOLLA R.R., SINGH M., "Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery", *Mol. Membr. Biol.*, vol. 27, no. 7, pp. 247-259, 2010

DIAS J.M.C.S., "Brasil fortalece proteção à biodiversidade nativa com normas sobre depósito de patentes". *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, 2007 (Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2007/artigo.2007-03-07.4199112659/>, acessado em fevereiro, 2014)

DIEBOLT M., BUCHER B., ANDRIANTSITOHAINA R., "Wine polyphenols decrease blood pressure, improve NO vasodilatation, and induce gene expression", *Hypertension*, 38: 159-65, 2001

DINIZ M.R., THEAKSTON R.D., CRAMPTON J.M., NASCIMENTO CORDEIRO M., PIMENTA A.M., DE LIMA M.E., DINIZ C.R., "Functional expression and purification of recombinant Tx1, a sodium channel blocker neurotoxin from the venom of the Brazilian "armed" spider, *Phoneutria nigriventer*", *Protein Expr Purif.*, vol. 50, no. 1, pp. 18-24, 2006

DRAGICEVIC-CURIC N, et al., "Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: in vitro skin penetration studies and stability", *Int J Pharm.*, 15;384(1-2):100-8, 2010

EL MAGHRABY G.M., BARRY B.W. and WILLIAMS A.C., "Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 34, no. 4-5, pp. 203-222, 2008

ELNAGGAR Y.S., EL-MASSIK M.A., ABDALLAH O.Y., "Fabrication, appraisal, and transdermal permeation of sildenafil citrate-loaded nanostructured lipid carriers versus solid lipid nanoparticles", *Int J Nanomedicine*, Vol. 6, pp. 3195-205, 2011.

ELSAYED M.M.A. et al., "Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 332, no. 1-2, pp. 1-16, 2007

ENGELHARDT P.F., PLAS E., HÜBNER W.A., PFLÜGER H., "Comparison of intraurethral liposomal and intracavernosal prostaglandin-E1 in the management of erectile dysfunction", *Br J Urol.*, vol. 81, no. 3, pp. 441-4, 1998

FARIELLO D, Cerco à Biopirataria, 2012. (Disponível em: <http://oglobo.globo.com/economia/cerco-biopirataria-5554377>; acessado em outubro, 2013).

FERRINI, M et al., "Aging – related expression. Of inducible nitric oxide synthase and markers of tissue damage in the rat pênis", *Biol Reprod*, 64, 974-982, 2001

FIREMAN et al., "A look at emerging delivery systems for topical drug products", *Dermatol Ther*, 25(5):477-88, 2011

FLEURY, C. "Bioinformatics tools dedicated to the study of the structure-function-antigenicity relationship in animal peptide toxins", Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós graduação em Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, 2009

FOLDVARI, M; OGUEJIOFOR, C; AFRIDI, S; KUDEL, T AND WILSON, T; "Liposome encapsulated prostaglandin e1 in erectile dysfunction: correlation between in vitro delivery through foreskin and efficacy in patients", *Urology*, 52 (5), 838-843, 1998

FORMICT (2012) Relatório do Formulário para Informações sobre a Política de Propriedade Intelectual das ICTs do Brasil – Ano base 2012. Disponível em: [http://www.mct.gov.br/upd\\_blob/0228/228464.pdf](http://www.mct.gov.br/upd_blob/0228/228464.pdf), acessado em fevereiro, 2014.

FÖRSTER M, BOLZINGER MA, FESSI H, BRIANÇON S, "Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery", *Eur J Dermatol*. 19(4):309-23, 2009

FREIRE C.T., "Mapeamento da Biotecnologia no Brasil 2011". Cebrap, 2011

GANEA, P., "China's amended legal regime on patents for inventions and utility models", *Journal of Intellectual Property Law & Practice*, 5(9), 650-662, 2010

GOLDEN G.M., GUZEK D.B., KENNEDY A.H., MCKIE J.E., POTTS R.O., "Stratum corneum lipid phase transitions and water barrier properties", *Biochemistry*, vol. 26, no. 8, pp. 2382-8, 1987

GOMAA A, Shalaby M, Osman M, Eissa M, Eizat A, Mahmoud M, et al. "Topical treatment of erectile dysfunction: randomised double blind placebo controlled trial of cream containing aminophylline, isosorbide dinitrate, and co-dergocrine mesylate". *BMJ* 312:1512-5, 1996

GRANT S.A., "The Holy Grail: long-acting local anaesthetics and liposomes", *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, vol. 16, no. 2, pp. 345-352, 2002

GUAGNINI F, FERAZZINI M, GRASSO M, BLANCO S, CROCI T, "Erectile properties of the Rho-kinase inhibitor SAR407899 in diabetic animals and human isolated corpora cavernosa", *J Transl Med*, 23;10:59. 2012

HARRISON S.M., BARRY B.W., DUGARD, P.H., "Effects of freezing on human skin permeability", *J. Pharm. Pharmacol.*, Vol. 36, pp. 261–262, 1984

HAYASHIDA H., OKAMURA T., TOMOYOSHI T., TODA N., "Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum", *J Urol*, vol. 155, no. 3, pp. 1122-7, 1996

HEDLUND H., ANDERSSON K.E., "Effects of some peptides on isolated human penile erectile tissue and cavernous artery", *Acta Physiol Scand*, vol. 124, no. 3, pp. 413-9, 1985

HELLSTROM W.J., BENNETT A.H., GESUNDHEIT N., KAISER F.E., LUE T.F., PADMA-NATHAN H., PETERSON C.A., TAM P.Y., TODD L.K., VARADY J.C., PLACE V.A., "A double-blind, placebo-controlled evaluation of the erectile response to transurethral alprostadil", *Urology*, vol. 48, no. 6, pp. 851-6, 1996

HIRANO K., "Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca<sup>2+</sup> sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle". *J Pharmacol Sci.*;104: 109-15, 2007

HOPUSU-HAVU V. K. AND JANSÉN C. T., "Peptidases in the Skin II. Demonstration and Partial Separation of Several Specific Dipeptide Naphthylamidases in the Rat and Human Skin", *Arch. klin. exp. Derm.*, vol. 235, pp. 53—62, 1969

HORIBA SCIENTIFIC, "A Guidebook to Particle Size Analysis", (disponível em: [http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA\\_Guidebook.pdf](http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/eMag/PSA/Guidebook/pdf/PSA_Guidebook.pdf); acessado em 29/07/2014), 2012

HUANG Y, CHAN NW, LAU CW, YAO XQ, CHAN FL, CHEN ZY., "Involvement of endothelium/nitric oxide in vasorelaxation induced by purified green tea (-)epicatechin", *Biochim. Biophys. Acta*, 1427: 322–8, 1999

ISIDORI A.M., BUVAT J., CORONA G., GOLDSTEIN I., JANNINI E.A., LENZI A., PORST H., SALONIA A., TRASH A.M., MAGGI M., "A critical analysis of the role of testosterone in erectile function: from pathophysiology to treatment-a systematic review". *Eur Urol.*, vol. 65, no. 1, pp. 99-112, 2014

JIN L, LIU T, LAGODA GA, CHAMPION HC, BIVALACQUA TJ, BURNETT AL, "Elevated RhoA/Rho-kinase activity in the aged rat penis: mechanism for age-associated erectile dysfunction", *The FASEB Journal express article*, 10.1096/fj.05-4232fje. Published online January 5, 2006.

KALAPOTHAKIS E., PENAFORTE C.L., BEIRÃO P.S., ROMANO-SILVA M.A., CRUZ J.S., PRADO M.A., GUIMARÃES P.E., GOMEZ M.V., PRADO V.F., "Cloning of cDNAs encoding neurotoxic peptides from the spider *Phoneutria nigriventer*", *Toxicon*, vol. 36, no. 12, pp. 1843-50, 1998

KIRÁLY I., PATARICZA J., BAJORY Z., SIMONSEN U., VARRO A., PAPP J.G., PAJOR L., KUN A., "Involvement of large-conductance Ca(2+) -activated K(+) channels in both nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarization-type relaxation in human penile small arteries", *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, vol. 113, no. 1, pp. 19-24, 2013

LASIC D.D., "Novel application of liposomes". *Trends in Biotechnology*, vol. 16, pp. 307-321, 1998

LEITE R. et al – "Targets for the treatment of erectile dysfunction: is NO/cGMP still the answer?" – *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov* , vol. 2, pp. 119-132, 2007

LEONE A.M., WIKLUND N.P., HÖKFELT T., BRUNDIN L., MONCADA S., "Release of nitric oxide by nerve stimulation in the human urogenital tract", *Neuroreport*, vol. 5, no. 6, pp. 733-6, 1994

Li W.Z., Zhao N., Zhou Y.Q., Yang L.B., Xiao-Ning W., Bao-Hua H., Peng K., Chun-Feng Z., "Post-expansive hydrogel foam aerosol of PG-liposomes: a novel delivery system for

vaginal drug delivery applications”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 47; no. 1, pp. 162-169, 2012

LIN C.S., LAU A., TU R., LUE T.F., “Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum”, *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 268, no. 2, pp. 628-35, 2000

LIN H., YUAN J., RUAN K.H., YANG W., ZHANG J., DAI Y., WANG R., “COX-2-10aa-PGIS gene therapy improves erectile function in rats after cavernous nerve injury”, *J Sex Med.*, vol.10, no. 6, pp. 1476-87, 2013.

MACHADO C.J.S. & GODINHO R.S., “Dinâmica e características do processo brasileiro de regulação do acesso à diversidade biológica e aos conhecimentos tradicionais associados”. *Revista de Informação Legislativa*, vol 191, pp. 99-121, 2011

MARINONI E., DI IORIO R., VILLACCIO B., VELLUCCI O., DI NETTA T., SESSA M., LETIZIA C., COSMI E.V., “Adrenomedullin in human male reproductive system”, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, vol. 122, no. 2, pp. 195-8, 2005

MARINHO V.M.C., “A Biodiversidade e a geração de novas oportunidades para a indústria farmacêutica nacional”, XXVI ENEGEP - Fortaleza, CE, Brasil, 2006. (Disponível em [http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2006\\_TR560372\\_7387.pdf](http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2006_TR560372_7387.pdf), acessado em fevereiro, 2014)

MASCARENHAS G., “A Biodiversidade Brasileira no Âmbito do Acordo TRIPS” *Revista Brasileira de Inovação*, vol. 3, n. 2, pp 393-416, 2004

MATAVEL A., CRUZ J.S., PENAFORTE C.L., ARAÚJO D.A., KALAPOTHAKIS E., PRADO V.F., DINIZ C.R., CORDEIRO M.N., BEIRÃO P.S., “Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6”, *FEBS Lett.*, vol. 523, no. 1-3, pp. 219-23, 2002

MATAVEL A., FLEURY C., OLIVEIRA L.C., MOLINA F., DE LIMA M.E., CRUZ J.S., CORDEIRO M.N., RICHARDSON M., RAMOS C.H., BEIRÃO P.S., “Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics”, *Biochemistry*, vol. 48, no. 14, pp. 3078-88, 2009

MATTIELLO-SVERZUTA A.C., DA CRUZ-HÖFLING M.A., “Toxin 2 (PhTx2), a neurotoxic fraction from *Phoneutria nigriventer* spider venom, causes acute morphological changes in mouse skeletal muscle”, *Toxicon*, vol. 38, no. 6, pp. 793-812, 2000

MCVARY K.T., POLEPALLE S., RIGGI S., PELHAM R.W., “Topical prostaglandin E1 SEPA gel for the treatment of erectile dysfunction”, *J Urol.* Vol. 162(3 Pt 1), pp. 726-30; discussion 730-1, 1999

MISHRA D., GARG M., DUBEY V., JAIN S., JAIN N.K., “Elastic liposomes mediated transdermal delivery of an anti-hypertensive agent: Propranolol hydrochloride”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 96, no. 1, pp. 145–155, 2007

MONTENEGRO, L. et al., "In vitro retinoic acid release and skin permeation from different liposome formulations", *Int J Pharm* 113, 89-96, 1996

MOREIRA A. C, MULLER A. C. A., ANTUNES A. M. S., PEREIRA JR N. "Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: Policy, law and statistics", *World Patent Information*, vol. 28, no. 1, pp. 34-42, 2006

MOREIRA JR et al., "Prevalence and correlates of erectile dysfunction: results of the Brazilian study of sexual behavior", *Urology*, 58, 583-588, 2000

MORELAND R.B., ALBADAWI H., BRATTON C., PATTON G., GOLDSTEIN I., TRASH A., WATKINS M.T., "O<sub>2</sub>-dependent prostanoid synthesis activates functional PGE receptors on corpus cavernosum smooth muscle", *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 281, no. 2, pp. H552-8, 2001

MOSER K., KRIWET K., FROELICH C., NAIK A., KALIA Y.N., GUY R.H., "Permeation enhancement of a highly lipophilic drug using supersaturated systems", *J Pharm Sci*, Vol. 90, no. 5, pp. 607-16, 2001

MOURA J.R., PRADO M.A., GOMEZ M.V., KALAPOTHAKIS E., DINIZ C.R., CORDEIRO M.N., ROMANO-SILVA M.A., "Investigation of the effect of PhTx<sub>2</sub>, from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the release of [3H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes", *Toxicon*, vol 36, no. 8, pp. 1189-92, 1998

NANOSIGHT, "Zeta Potential Analysis" (Disponível em: <http://www.nanosight.com/technology/zeta>; acessado em: 30/07/2014), 2014

NARDOTTO, G.H.B., "Desenvolvimento de lipossomas deformáveis para administração transdérmica de remifentanil" – Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 97 páginas, 2009.

NAUDE JH, LE ROUX PJ. "Topical treatment of erectile dysfunction did not show results". *BMJ*. 316(7140):1318, 1998

NUNES K.P., COSTA-GONÇALVES A., LANZA L.F., CORTES S.F., CORDEIRO M.N., RICHARDSON M., PIMENTA A.M., WEBB R.C., LEITE R., DE LIMA M.E., "Tx<sub>2</sub>-6 toxin of the *Phoneutria nigriventer* spider potentiates rat erectile function", *Toxicon*, vol. 51, no. 7, pp. 1197-206, 2008

NUNES K.P., CORDEIRO M.N., RICHARDSON M., BORGES M.N., DINIZ S.O., CARDOSO V.N., TOSTES R., DE LIMA M.E., WEBB R.C., LEITE R., "Nitric oxide-induced vasorelaxation in response to PnTx<sub>2</sub>-6 toxin from *Phoneutria nigriventer* spider in rat cavernosal tissue", *J Sex Med*, vol. 7, no. 12, pp. 3879-88, 2010

NUNES K.P., TOQUE H.A., BORGES M.H., RICHARDSON M., WEBB R.C., DE LIMA M.E., "Erectile function is improved in aged rats by PnTx<sub>2</sub>-6, a toxin from *Phoneutria nigriventer* spider venom", *J Sex Med*, vol. 9, no. 10, pp. 2574-81, 2012a

NUNES K.P., WYNNE B.M., CORDEIRO M.N., BORGES M.H., RICHARDSON M., LEITE R., DELIMA M.E., WEBB R.C., "Increased cavernosal relaxation by *Phoneutria nigriventer*

toxin, PnTx2-6, via activation at NO/cGMP signaling”, *Int J Impot Res. Vol. 24, no. 2, pp.69-76*, 2012b

OHEBSHALOM M, MULHALL JP. “Transdermal and topical pharmacotherapy for male sexual dysfunction”. *Expert Opin Drug Deliv.* 2(1):115-20, 2005.

OKAMURA T., AYAJIKI K., TODA N., “Monkey corpus cavernosum relaxation mediated by NO and other relaxing factor derived from nerves”, *Am J Physiol*, vol. 274, no. 4 Pt 2, pp. H1075-81, 1998

PAIVA D.B., “Retrato da MP 2.186-16: estado da arte de sua aplicação técnico-jurídica como subsídio para o aperfeiçoamento legislativo”, *Centro Universitário do Pará, Faculdade de Direito, Monografia*, 2009

PARDEIKE, HOMOS & MULLER, “Lipid nanoparticless (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products”, *Int J Pharm* 366:170-184, 2009

PIERRE M.B.R., COSTA I.S.M., “Liposomal systems as drug delivery vehicles for dermal and transdermal applications”, *Arch. Dermatol. Res.*, vol. 303, pp. 607-621, 2011

PIRVU et al, “Elastic vesicles as drug carriers through the skin”, *Farmacia*, 58(2):128-134, 2010

PRIVIERO, FB et al, “Neurophysiological basis of penile erection” *Acta Pharmacol Sin*, 28: 751-755, 2007

PUGLIA, C. et al., “Effectt of charge and lipid concentration on in-vivo percutaneous absorption of methyl nicotinate from liposomal vesicles”, *J Pharm Pharmacol*, 57, 1169-1176, 2005

RATES B., VERANO-BRAGA T., SANTOS D.M., NUNES K.P., PIMENTA A.M., DE LIMA M.E., “From the stretcher to the pharmacy's shelf: drug leads from medically important brazilian venomous arachnid species”, *Inflamm Allergy Drug Targets*, vol. 10, no. 5, pp. 411-9, 2011

REZENDE JÚNIOR L., CORDEIRO M.N., OLIVEIRA E.B., DINIZ C.R., “Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the 'armed' spider Phoneutria nigriventer”, *Toxicon*, vol. 29, no. 10, pp. 1225-33, 1991

SACCARO JUNIOR N. L., “Como Impulsionar a Bioprospecção no Brasil: bases para uma moderna regulação do acesso a recursos genéticos e ao conhecimento tradicional associado”. Texto para Discussão, n. 1807 Brasília: Ipea, 2013 (Disponível em: [http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/985/1/TD\\_1807.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/985/1/TD_1807.pdf), acessado em janeiro, 2014)

SAITO M., BRODERICK G., WEIN A.J., LEVIN R.M., “Effect of alteration in the extracellular potassium and calcium on field-stimulated relaxation of the rabbit corpus cavernosum”, *Gen Pharmacol*, vol. 27, no. 2, pp. 375-8, 1996

SATO Y., HORITA H., ADACHI H., SUZUKI N., TANDA H., KUMAMOTO Y., TSUKAMOTO T., "Effect of oral administration of prostaglandin E1 on erectile dysfunction", *Br J Urol.*, Vol. 80, no. 5; pp. 772-5, 1997

SCHANZ S., HAUSWIRTH U., ULMER A., FIERLBECK G., "Prostaglandin E(1) ethyl ester, a new agent for topical penile therapy", *Int J Impot Res.*, vol. 14, no. 4, pp. 317-8, 2002

SIMÕES S., MARQUES C., CRUZ M.E., MARTINS M.B., "Anti-inflammatory effects of locally applied enzyme-loaded ultradeformable vesicles on an acute cutaneous model", *J Microencapsul.* Vol. 26, No. 7, pp. 649-58, 2009

SILVA C.N., NUNES K.P., TORRES F.S., CASSOLI J.S., SANTOS D.M., ALMEIDA F.M., MATAVEL A., CRUZ J.S., SANTOS-MIRANDA A., NUNES A.D., CASTRO C.H., MACHADO DE ÁVILA R.A., CHÁVEZ-OLÓRTEGUI C., LÁUAR S.S., FELICORI L., RESENDE J.M., CAMARGOS E.R., BORGES M.H., CORDEIRO M.N., PEIGNEUR S., TYTGAT J., DE LIMA M.E., "PnPP-19, a Synthetic and Nontoxic Peptide Designed from a Phospholipase A2 Toxin, Potentiates Erectile Function via NO/cGMP", *J Urol.* Jun 26. pii: S0022-5347(15)04292-5. doi: 10.1016/j.juro.2015.06.081, 2015

SOLOMON H. et al., "Erectile dysfunction and statin treatment in cardiovascular risk patients", *Int J Clin Pract*, vol. 60, no. 20, pp. 141-5, 2006

SONG Y.K., KIM C.K., "Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes. *Biomaterials*", vol. 27, no. 2, pp. 271-80, 2006

SZOKA F. JR., PAPAHAADJOPOULOS D., "Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 75, no. 9, pp. 4194-8, 1978

TEIXEIRA C.E., BENTO A.C., LOPES-MARTINS R.A., TEIXEIRA S.A., VON EICKESTEDT V., MUSCARÁ M.N., ARANTES E.C., GIGLIO J.R., ANTUNES E., DE NUCCI G., "Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom on the rabbit isolated corpus cavernosum and the involvement of NANC nitrergic nerve fibers". *Br J Pharmacol*, vol. 123, no. 3, pp. 435-42, 1998

TODA, N. et al., "Nitric oxide and penile erectile function", *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 106, 233-266, 2005

TORRES F.S., SILVA C.N., LANZA L.F., SANTOS A.V., PIMENTA A.M., DE LIMA M.E., DINIZ M.R., "Functional expression of a recombinant toxin - rPnTx2-6 - active in erectile function in rat", *Toxicon*, vol. 56, no. 7, pp. 1172-80, 2010

TOUITOU E., DAYAN N., BERGELSON L., GODIN B., ELIAZ M., "Ethosomes-novel vesicular carriers: characterization and delivery properties", *J. Control. Rel.*, 65, pp. 403-418, 2000

TRAPANI A., LOPEDOTA A., FRANCO M., CIOFFI N., IEVA E., GARCIA-FUENTES M., ALONSO M.J., "A comparative study of chitosan and chitosan/cyclodextrin nanoparticles as

potential carriers for the oral delivery of small peptides”, *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 75, no. 1, pp. 26-32, 2010

TRIVEDI D, WELLSTED DM, COLLARD JB, KIRBY M., “Simvastatin improves the sexual health-related quality of life in men aged 40 years and over with erectile dysfunction: additional data from the erectile dysfunction and statin trial”, *BMC Urol*. Vol. 14, pp. 24, 2014

TRONCONE L.R.P., RAVELLI K.G., MAGNOLI F.C., LEBRUN I., HIPOLIDE D.C., RAYMOND R., NOBREGA J.N, “Regional brain c-fos activation associated with penile erection and other symptoms induced by the spider toxin Tx2-6”, *Toxicon*, vol. 58, pp. 202–208, 2011

UNIÃO EUROPÉIA, “What is a "nanomaterial"? European Commission breaks new ground with a common definition”, *European Commission Press Release*, IP/11/1202, 18/10/2011(Disponível em: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-11-1202\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_en.htm); acessado em 13/06/2014)

UNIÃO EUROPÉIA, “Questions and answers on the Commission Recommendation on the definition of nanomaterial” *European Commission Press Release*, MEMO/11/704, 18/10/2011b (Disponível em: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_MEMO-11-704\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-11-704_en.htm); acessado em 13/06/2014)

VAN DEN BREMER ET, BEURSKENS FJ, VOORHORST M, ENGELBERTS PJ, DE JONG RN, VAN DER BOOM BG, COOK EM, LINDORFER MA, TAYLOR RP, VAN BERKEL PH, PARREN PW, “Human IgG is produced in a pro-form that requires clipping of C-terminal lysines for maximal complement activation”, *MAbs*, vol. 7, no. 4, pp. :672-80, 2015

WANG H. et al., “Rho\_A-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization in erectile function”, *J Biol Chem*, vol. 277, pp. 30614 – 30621, 2002

WRIGHT P.J. – “Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors”, *Int J Clin Pract*, vol. 60, no. 11, pp. 1517, 2006

YAMAMOTO A. et al., “Enhanced transdermal delivery of phenylalanyl-glycine by chemical modification with various fatty acids”, *Int J Pharm.*, vol. 250, no. 1, pp. 119-28, 2003

## ANEXO I

## TERMO DE CONCORDÂNCIA

Declaro para os devidos fins junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais que me foi apresentado o projeto de pesquisa intitulado "Desenvolvimento de uma formulação lipossomal tópica contendo o peptídeo PnPP-19 para a potencialização da função erétil e o tratamento da disfunção erétil", pela doutoranda Flávia De Marco Almeida, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFMG. Os objetivos deste projeto são o desenvolvimento e a caracterização química, físico-química e biológica de uma formulação lipossomal contendo o peptídeo PnPP-19, a avaliação de sua permeação através da pele, sua atividade como potenciador da função erétil e sua toxicidade após aplicação tópica. A avaliação da permeação cutânea do peptídeo envolve o uso de pele humana, extraída a partir de cirurgia plástica.

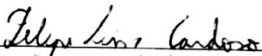
Desta forma, concordo em participar do referido projeto, fornecendo fragmentos de pele provenientes de cirurgia plástica abdominal de doze indivíduos adultos, independente do sexo, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (em anexo) por parte dos pacientes envolvidos.


O procedimento cirúrgico será realizado na Clínica Clínica Sebastião Nelson Ltda, localizada na Avenida do Contorno, 505, bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte, MG, CEP 30110-031, CNPJ: 19.890.821/0001-79, que, através de seu representante legal, declara no presente termo estar ciente e de acordo com a participação acima descrita.


Por ser verdade, firmo o presente.

30/06/2014

Data

 (CRM: 50573 -MG,  
Cirurgião responsável

  
Dr. Renato Nelson de Moura Guerra  
CRM-MG 46.563  
Representante legal da Clínica Sebastião Nelson Ltda.

  
Testemunha

## ANEXO II

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Eu, Flávia De Marco Almeida, doutoranda em Ciências Farmacêuticas pela UFMG e responsável pela pesquisa intitulada “**Desenvolvimento de uma formulação lipossomal tópica contendo o peptídeo PnPP-19 para a potencialização da função erétil e o tratamento da disfunção erétil**”, estou fazendo um convite para você participar como voluntário deste estudo.

Esta pesquisa pretende avaliar a permeação do peptídeo através da pele, utilizando a formulação desenvolvida. Acreditamos que ela seja importante porque permitirá o desenvolvimento de um gel, de uso tópico, para o tratamento da DE, com menores doses e menos efeitos colaterais.

Para a realização deste estudo, utilizaremos fragmentos de pele abdominal humana, excisada em procedimentos de cirurgia plástica. Sua participação constará em permitir que o fragmento de pele retirado durante o processo cirúrgico seja fornecido ao nosso laboratório (Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais), para ser utilizado em experimentos *in vitro* de permeação cutânea.

É importante esclarecer que, caso você decida participar, você receberá uma via assinada do presente termo e, durante todo o período da pesquisa, você tem o direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento. Para isto, você pode entrar em contato com algum dos pesquisadores abaixo relacionados, envolvidos no projeto de pesquisa. Sobre os aspectos éticos, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (E-mail: coep@prpq.ufmg.br; telefax (31) 3409-4592; endereço: Av. Antônio Carlos, 6627; Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005; Campus Pampulha; Belo Horizonte, MG – Brasil; CEP 31.270-901).

Você tem garantido o seu direito de não aceitar participar ou de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

A participação neste projeto não envolve riscos à sua saúde, mas caso você considere constrangedora esta abordagem, vale esclarecer que as informações desta pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação.

Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

**Pesquisadores responsáveis:** Mônica Cristina de Oliveira<sup>1</sup>; Lucas Antônio Miranda Ferreira<sup>1</sup>; Maria

Elena de Lima<sup>2</sup>; Doutoranda responsável: Flávia De Marco Almeida<sup>1,2</sup>

- 1 -Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal de Minas Gerais – Fone (31) 3409-6961
- 2 -Laboratório de Venenos e Toxinas Animais – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – Fone (31) 3409-2659

**Autorização:**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício.

Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar.

Diante do exposto expesso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Local e data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário ou de seu representante legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura de uma testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário (ou de seu representante legal) para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE

## ANEXO III

**Tabela suplementar – Patentes compreendendo utilização de informação proveniente de venenos e/ou toxinas de espécies brasileiras**

	Número do depósito original	Data de prioridade	Depósitos em outros países	Titulares da tecnologia	Nacionalidade dos inventores	Espécies brasileiras envolvidas	Invenção
1.	DE20001024383 WO2001EP05670	17-05-2000 17-05-2001	WO0187346 JP2003533203 EP1283726 AU6229701	WEICKMANN DIRK	Alemanha	<i>Loxosceles laeta</i>	Células dendríticas carregadas com toxinas para tratamento de <b>tumores de mucosa e pele.</b>
2.	BR20000001870	29-05-2000	WO0192290 US2006276380 US7723468 US2003186854 AU6367601	USP CNRS	Brasil e França	<i>Acanthoscurria gomesiana</i>	Peptídeo de 18 aa, denominado gomesina, com atividade <b>antiparasítica, fungicida e bactericida.</b>
3.	BR20010001088	19-03-2001	WO2002074782 US2005031604 JP2005505245 EP1587819 CA2440749	Biolab Sanus Farmacêutica Ltda	Brasil	<i>Bothrops jararaca</i>	Peptídeos com atividade inibitória de vasopeptidases, para <b>redução da pressão arterial e vasodilatação.</b>
4.	AR2001P101891 AR2001P105751 WO2002ES00198	24-04-2001 11-12-2001 24-04-2002	WO02085391 EP1391207 US2007184046 US2004166104	Luis Alberto Costa	Argentina e Espanha	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	PLA2 para o tratamento de <b>infecções virais, bacterianas ou parasíticas.</b>
5.	BR20010104510	27-07-2001	US2004242488 MXPA04000806 JP2005508878 EP1412380 CA2453112 WO03010191 AU2002317638 AR036192	EMBRAPA; UNB	Brasil	<i>Phyllomedusa hypochondrialis</i>	Peptídeo com <b>ação antimicrobiana</b>

6.	RU20010122763	13-08-2001	-	Nebera Sergej Anatol'evich	Rússia	<i>Lachesis</i>	Preparação homeopática <b>antioxidante, para rejuvenescimento.</b>
7.	BR20020205774	27-02-2002	WO03072132 AU2003209869	FUNED; FAPEMIG	Brasil	<i>Bothrops jararaca</i>	Sistema adjuvante para a produção de <b>anticorpos e vacina</b>
8.	RU20020111635	06-05-2002	-	Romanov Vladimir Vladimirovich	Rússia	<i>Lachesis</i>	Formulação homeopática para <b>prevenção e tratamento de infecções virais e bacterianas</b> em aves.
9.	BR20020002157	07-06-2002	WO2003104274 US2007275901 US2006014928 US7192925 EP1534743 EP1534743 BR0202157 AU2003229155 AT417061	UFMG	Brasil e França	<i>Tityus serrulatus</i>	Peptídeos com atividade <b>anti-hipertensiva</b>
10.	BR20020202596	27-06-2002	-	UFMG	Brasil	<i>Loxosceles intermedia</i>	Proteína para produção de <b>anti-veneno e vacina</b>
11.	BR20020204051	01-10-2002	-	Roberto Piraino	Brasil	<i>Lachesis muta</i>	Medicamento homeopático imunomodulador, auxiliar no tratamento de <b>oncologia, hiv/aids.</b>
12.	FR20020014490	19-11-2002	KR101172700 US2004096925 JP2012224637 JP2009108104 JP2004166684 FR2847267 DE10362194 DE10320603 CH694107	COLETICA	França	<i>Crotalus durissus</i>	<b>Método</b> para testar inibidores potenciais de PLA2

13.	US20020306958 US20060336630 US2006240117	02-12-2002 20-01-2006	-	LECCA PEDRO J	EUA	<i>Crotalus durissus</i>	Pó do corpo da cobra para tratamento de <b>câncer</b>
14.	BR20020005449	09-12-2002	WO2004052273 US2008199503 MXPA05006170 JP2006517520 EP1581550 CN1820018 CA2507980 AU2003302871	Biolab Sanus farmacêutica	Brasil	<i>Bothrops jararaca</i>	Peptídeos denominados Evasinas para o <b>tratamento de doenças degenerativas crônicas.</b>
15.	RU20030102092	27-01-2003		DAVYDENKO V VALERIJ NIKOLAEVICH	Rússia	<i>Lachesis mutus</i>	Formulação homeopática para uso veterinário no tratamento e <b>prevenção de sepse crônica ou aguda.</b>
16.	BR20030301513	16-05-2003	WO2004100860	FAPESP	Brasil	<i>Bothrops, Crotalus durissus terrificus</i>	Lipossomas contendo venenos animais para <b>obtenção de soro hiperimune</b>
17.	DE20031022656	20-05-2003	-	TOXIMED GMBH; WEICKMANN, DIRK	Alemanha	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Peptídeo para tratamento de <b>tumor renal</b>
18.	RU20030116638	04-06-2003	-	NEBERA O.A; NEBERA S.A	Rússia	<i>Lachesis</i>	Agente homeopático para <b>reabsorção e profilaxia de hemorragias</b> da retina em doenças vasculares oftálmicas.
19.	DE20031057970	11-12-2003	WO2005056027 EP1699473	TOXIMED GMBH; WEICKMANN, DIRK	Alemanha	<i>Loxosceles laeta;</i> <i>L. gaucho</i>	<b>Solvente</b> orgânico compreendendo coquetel de venenos

20.	BR2004PI00192	11-02-2004	WO2005081613	Biolab Sanus Farmacêutica	Brasil	<i>Bothrops jararaca</i>	Peptídeos denominados Evasinas como <b>moduladores de receptores de ACh</b>
21.	DE200410008417	20-02-2004	-	TOXIMED GMBH	Alemanha	<i>Crotalus durissus durissus</i>	Composição farmacêutica para tratamento de <b>câncer de fígado, cólon e rim.</b>
22.	DE200410019323	21-04-2004	WO2005103231	TOXIMED GMBH	Alemanha	<i>Loxosceles</i>	Toxinas para tratamento de <b>carcinoma renal</b>
23.	BR2004PI01702 BR2005PI02399 WO2005BR00073	06-05-2004 02-05-2005 06-05-2005	WO2005107357 US2009203618 PT1765851 JP2008504234 ES2377635 EP1765851 CN101048170 CA2565731 AU2005239771 AT533776	Laboratório Biosintética Ltda	Brasil	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Peptídeos com atividade <b>analgésica</b>
24.	US20040917143	13-08-2004	-	REID PAUL; QIN ZHENG H	EUA	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Toxina, denominada crotoxina, para tratamento de <b>dor crônica</b>
25.	MX2004PA08435 WO2005MX00071	31-08-2004 29-08-2005	US8287860 WO2006025718 BRPI0514809 AU2005280742 AR055482	UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO; LABORATORIOS SILANES S.A. DE C.V	México	<i>Loxosceles laeta</i>	Fragmentos de DNA codificadores de esfingomielinas e D como <b>imunógenos e anti-venenos</b>
26.	US20040934594	02-09-2004	-	REID PAUL F	EUA	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Toxina, denominada crotoxina, para o tratamento da <b>AIDS</b>
27.	BR2004PI04765	03-11-2004	-	FUNDACAO BUTANTAN	Brasil	<i>Loxosceles intermedia</i>	Processo de obtenção de soro equino anti-loxoscélico

28.	BR2004PI06273	23-12-2004	-	FAPEMIG; UFU	Brasil	<i>Bothrops moojeni</i>	Enzima <b>anticoagulante e trombolítica</b>
29.	DE200510011111	10-03-2005	-	TOXIMED GMBH	Alemanha	<i>Loxosceles laeta</i> ; <i>L. gaucho</i>	Coquetel de venenos para tratamento de <b>tumores compreendend o células dendríticas</b>
30.	BR2005PI01233	04-04-2005	-	UFSCAR; FAPESP; UERJ	Brasil	<i>Bothrops alternatus</i>	Uso da alternagina-C (ALT-C) nos processos de indução e nos <b>processos de supressão da formação de novos vasos sanguíneos.</b>
31.	US20050674342P	22-04-2005	WO2006116156 BRPI0607750 NZ562201 NO20076013 MX2007013031 KR20080021606 JP2008538506 EP1896080 EA200702313 CR9452 CA2604999 AU2006239928 AR053234 (A1)	AMGEN INC	EUA	<i>Tityus serrulatus</i>	Composição farmacêutica para tratamento de doença auto- imune
32.	BR2005PI02080	02-06-2005	-	FUNDACAO BUTANTAN	Brasil	<i>Lachesis muta</i>	<b>Processo</b> de obtenção de <b>soro equino anti-laquélico</b>
33.	DE200510027478	14-06-2005	-	TOXIMED GMBH	Alemanha	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Peptídeos para tratamento de <b>tumores renais</b>
34.	DE200510027665	15-06-2005	WO2006134166	TOXIMED GMBH	Alemanha	<i>Loxosceles gaucho</i> ; <i>Loxosceles laeta</i>	Mistura de peptídeos para tratamento de <b>tumor cerebral</b>

35.	US20050721270P	27-09-2005	WO2007038619 JP2009509535 EP1929073 CA2622441 AU2006294644	AMUNIX INC	EUA	<i>Phoneutria</i>	Proteínas e composições farmacêuticas
36.	US2005073429 US20060594173	08-11-2005 08-11-2006	-	GOPALAKRIS HNAKONE PONNAMPAL AM; SAMY RAMAR P	Singapura	<i>Crotalus durissus terrificus</i> , <i>Bothrops jararacuçu</i> , <i>Apis mellifera</i>	Fosfolipases com <b>função bactericida</b>
37.	US20050313377	22-12-2005	-	REID PAUL F	EUA	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Uso de crotoxina como analgésico
38.	CN20061044594	25-05-2006	-	QILU PHARMACEU TICAL CO LTD	China	<i>Bothrops atrox</i>	<b>Método</b> para extração de Batroxobina
39.	CN20061047690	08-09-2006	-	SHENYANG SHOUZHENG BIOLOG TECH	China	<i>Bothrops atrox</i>	Mistura de Batroxobina e interleucina-11 para <b>cessar sangramento.</b>
40.	BR2006PI05484	21-11-2006	WO2008061329 US2010168009 EP2086558 CA2669975	UFMG	Brasil	<i>Phoneutria nigriventer</i>	Toxina de 55 aminoácidos, Pha-1B, bloqueadora de canais de cálcio, para tratamento de <b>doenças neurológicas e dor.</b>
41.	BR2007PI02089 WO2007BR00306	09-03-2007 08-11-2007	EP2134368 US2010226863	ROBERTO PIRAINO	Brasil	<i>Lachesis muta</i>	Furmulação homeopática <b>imunomoduladora</b> para o tratamento de doenças do sistema imunológico.

42.	BR2007PI02734	02-04-2007	-	UFMG	Brasil	<i>Phoneutria nigriventer</i>	Toxina PhKv, para tratamento de derrame, injúria traumática da cabeça e doenças degenerativas do SNC
43.	US20070916923P US20080118030	09-05-2007 09-05-2008	-	REEVES WILLIAM H; LAGUENS RUBEN P; MARSHECK WILLIAM J; LAGUENS MARTIN	Argentina EUA	<i>Lachesis muta muta</i>	Formulações com veneno de Lachesis para <b>diminuir os níveis circulantes de TNF-alfa</b> no tratamento de sepse, infecções parasíticas, nefrotoxicidade a cisplatina, artrite reumatoide, câncer e AIDS.
44.	BR2007PI05590	07-08-2007	WO2009018643	UFMG	Brasil	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Toxina denominada crotoxina, para tratamento de <b>estrabismo, blefaroespasmos e nistagmo.</b>
45.	IE20070000737 WO2008EP08602	10-10-2007 10-10-2008	US2010316737	FARRINGTON , DANIEL; FARRINGTON , THOMAS	Irlanda EUA	<i>Lachesis muta</i>	Complexo homeopático com <b>ação anti-microbiana.</b>
46.	BR2007PI06261	08-11-2007	-	UFPR	Brasil	<i>Lachesis</i>	<b>Uso</b> de medicamento homeopático complexo na <b>regulação positiva de células apresentadoras de antígenos</b> (apcs).

47.	BR2007PI06234	08-11-2007	-	UFPR	Brasil	<i>Lachesis</i>	uso de medicamento homeopático complexo na <b>regulação negativa da multiplicação do vírus h5n1</b>
48.	BR2008PI00596 WO2009BR00040	31-01-2008 30-01-2009	WO2009094742 EP2247730 CN101981190 AU2009208322	UFMG; FUNED; FAPEMIG	Brasil	<i>Phoneutria nigriventer</i>	Toxina, denominada Tx2-6, para <b>potencialização da função erétil.</b>
49.	BR2008PI01542	18-03-2008	-	UFMG	Brasil	<i>Tityus serrulatus</i>	Peptídeos <b>hipotensivos</b>
50.	BR2008PI04652	20-06-2008	-	UNESP USP; FAPESP; FUNDACAO BUTANTAN	Brasil	<i>Apis mellifera</i>	Soro equino <b>anti-veneno</b> de abelha.
51.	BR2009PI02312	15-07-2009	-	FAPESP; USP	Brasil	<i>Crotalus durissus terrificus</i> e <i>Tityus serrulatus</i>	usos das hialuronidases no preparo de medicamentos indicados como <b>antitumorais, antiinflamatórios, em particular, no reparo tecidual</b>
52.	US20090234429P	17-08-2009	WO2011022357 EP2467477 CA2770185	EAST CAROLINA UNIVERSITY	EUA	<i>Tityus serrulatus</i>	Metaloproteínas e isolada do veneno e uso para tratamento de várias doenças.
53.	BRPI0904036	07-10-2009	WO2011041865	UFMG; FUNED	Brasil	<i>Apis mellifera</i>	Fração isolada de apitoxina com ação <b>analgésica e anti-inflamatória</b>

54.	BR2010PI04449	30-04-2010	-	UFMG; FUNED	Brasil	<i>Bothrops jararaca</i>	Kit contendo enzima extraída do veneno, para <b>testar a potência neutralizante de soro anti bothrópico in vitro</b>
55.	US201113704729	16-06-2011	WO2011158242	FUTURAGEN E ISRAEL LTD	Israel	<i>Phoneutria nigriventer</i>	<b>Plantas resistentes a pesticidas</b> contendo uma combinação de toxina de aranha e uma quitinase

Abreviações: CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique); EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária); FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais); FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo); FUNED (Fundação Ezequiel Dias); UERJ (Universidade Estadual do Rio de Janeiro); UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais); UFPR (Universidade Federal do Paraná) UFSCAR (Universidade Federal de São Carlos); UFU (Universidade Federal De Uberlândia); UNB (Fundação Universitária de Brasília); UNESP (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho); USP (Universidade de São Paulo).