

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DANIELE PRISCILA DA SILVA FARDIN DE ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
NANOCARREADORES CONTENDO ACETIL HEXAPEPTÍDEO-3 E TOXINA
BOTULÍNICA TIPO A**

PONTA GROSSA

2013

DANIELE PRISCILA DA SILVA FARDIN DE ASSUNÇÃO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
NANOCARREADORES CONTENDO ACETIL HEXAPEPTÍDEO-3 E TOXINA
BOTULÍNICA TIPO A**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima Padilha de Paula

PONTA GROSSA

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

A851 Assunção, Daniele Priscila da S.Fardin de
Desenvolvimento, caracterização e
avaliação de nanocarreadores contendo
acetil hexapeptídeo-3 e toxina botulínica
tipo A/ Daniele Priscila da S. Fardin de
Assunção. Ponta Grossa, 2013.
62f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^aDr^a Josiane de
Fátima Padilha de Paula.

1.Toxina botulínica. 2.Hexapeptídeo-3
3.Nanopartículas. 4.Lipossomas.
5.Permeação cutânea. I.Paula, Josiane de
Fátima Padilha de. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciências Farmacêuticas. III. T.

CDD: 616.5



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Ata nº. 09/2013

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA DANIELE PRISCILA DA SILVA FARDIN ASSUNÇÃO, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 25 DE FEVEREIRO DE 2013, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo quinto dia do mês de fevereiro de dois mil e treze, às 14 h, no Auditório do CIPP da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência da Profa. Dra. Josiane de Fátima P. de Paula, em sessão fechada, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Daniele Priscila da Silva Fardin de Assunção. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e controle de fármacos, medicamentos e correlatos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Profa. Dra. Josiane de Fátima P. de Paula (Presidente) / UEPG, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago / UEPG e Profa. Dra. Maria Helene Giovanetti Canteri / UTFPR, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi “**Desenvolvimento, caracterização e avaliação da toxina botulínica tipo A incorporada em nanocarreadores**”. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata aprovada. Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Rubyan Lucas Santos Piazzetta, _____, secretário do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG. Ponta Grossa, 25 de fevereiro de 2013.

Observação (se necessária):

Novo título: desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanocarreadores contendo acetil hexapeptídeo-3 e toxina botulínica tipo A.


Profa. Dra. Josiane de Fátima P. de Paula


Prof. Dr. Paulo Vitor Farago


Profa. Dra. Maria Helene Giovanetti Canteri

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Josiane de Fátima Padilha de Paula, por todos os ensinamentos e sabedoria. Agradeço a amizade, a paciência e a parceria durante todo esse trabalho. Obrigada por me ajudar nas horas que eu mais precisava e por toda a dedicação. Esse trabalho é resultado de toda essa parceria, amizade e dedicação, além de toda sua competência como pesquisadora e Mestre!

À Prof.^a Dr.^a Vanessa Lima Gonçalves Torres e ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago pelas considerações durante a qualificação.

À Prof.^a Dr.^a Sabrina Grassioli pela contribuição na realização dos ensaios *in vitro*.

À Prof.^a Dr.^a Rubiana Mainardes pela realização das primeiras análises de tamanho e distribuição.

Aos funcionários e aos técnicos do LABMU pelas análises realizadas e por todo o atendimento especial, Nilson Biagini Sabino, Carmen Voigt, Simone Ferraz Sabino e Luzia Chaves Simão.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas por todo o conhecimento transmitido durante as disciplinas.

Aos meus pais Alceu e Dorceli, pelo incentivo e pela confiança depositada em mim.

Ao meu marido Ivan pela paciência, compreensão e companheirismo.

À minha querida filha Nathalia por me fortalecer na realização desse trabalho.

À Deus, que me iluminou e me deu forças para enfrentar todos os obstáculos e conseguir concluir esse trabalho.

Às minhas amigas e amigos que sempre torceram por mim. Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O envelhecimento cutâneo é um fenômeno biológico complexo que depende da combinação de fatores intrínsecos, responsáveis pelo envelhecimento cronológico e extrínsecos, responsáveis pelo fotoenvelhecimento cutâneo. Outro fator importante a ser considerado é o aparecimento de rugas causadas pelos movimentos faciais repetitivos. Atualmente é grande a procura por produtos antienvelhecimento e, uma das estratégias mais empregada para esse fim é a aplicação da toxina botulínica do tipo A, que é considerada a principal atenuante de rugas. Outro ativo empregado com a mesma função da toxina botulínica é o acetil hexapeptídeo-3, comercialmente conhecido como Argireline. Este agente antienvelhecimento age de forma similar à toxina botulínica, reduzindo as linhas e rugas de expressão, ambos atuam na liberação da acetilcolina na junção neuromuscular. Uma das principais diferenças entre esses ativos está em sua forma de aplicação, enquanto a toxina botulínica é aplicada por meio de injeções intramusculares, o acetil hexapeptídeo-3 é empregado na forma de creme para aplicação tópica. Considerando que os dois ativos são neuropeptídeos hidrofílicos de elevada massa molar, sua penetração através da pele é improvável. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar sistemas constituídos por nanocarreadores capazes de permitir ou melhorar a permeação destes ativos através da pele. O acetil hexapeptídeo-3 foi encapsulado em lipossomas e a toxina botulínica foi encapsulada em dois sistemas, lipossomas e nanopartículas poliméricas. A avaliação do acetil hexapeptídeo-3 mostrou uma eficiência de encapsulação de 95%. As vesículas apresentaram um potencial zeta de -31 mV. Os resultados demonstraram que o ativo apresentou boa permeação cutânea e sua encapsulação não afetou a permeação através da pele. A toxina botulínica foi encapsulada com sucesso em nanopartículas poliméricas, pelo método de emulsão múltipla e evaporação do solvente. As nanopartículas apresentaram tamanho médio de aproximadamente 570 nm e potencial zeta de -7,40 mV, característico do poliéster utilizado. Os lipossomas multilamelares obtidos por hidratação do filme lipídico apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 1370 nm e potencial zeta de -37mV. Foi possível demonstrar, por meio dos espectros de infravermelho com Transformada de Fourier, a presença da toxina botulínica tipo A nas nanopartículas poliméricas e nos lipossomas. Os ensaios realizados *in vitro* indicaram que os lipossomas contendo a toxina botulínica tipo A apresentaram efeito sobre os neurotransmissores nos ensaios realizados, entretanto não foi possível identificar o mesmo efeito nas nanopartículas contendo a toxina botulínica. Esses resultados mostraram que a encapsulação da toxina botulínica A pode ser uma alternativa para sua aplicação tópica, de forma não invasiva e com muito conforto ao paciente. Quanto ao acetil hexapeptídeo-3, pôde-se constatar que este ativo na forma livre apresentou a mesma penetração através da pele do que o ativo encapsulado, o que indica que a penetração do acetil hexapeptídeo-3 não sofre

alteração quando encapsulado em lipossomas. Desta forma o ativo pode ser aplicado de forma direta.

Palavras-chave: toxina botulínica, hexapeptídeo-3, nanopartículas, lipossomas, permeação cutânea.

ABSTRACT

Cutaneous aging is a complex biological phenomenon that depends on a number of intrinsic, responsible for chronological aging and the extrinsic factors, which is responsible for cutaneous photo aging. Another important factor that must be taken into account is the appearance of wrinkles caused by repeated movements of the facial muscles. Currently there is a huge demand for anti-aging products and one of the strategies that is most commonly employed for this end, is the application of botulinum toxin Type A which is regarded as the principal treatment for the mitigation of wrinkles. Another active substance which functions in the same way as botulinum toxin A, is acetyl hexapeptide-3, which is marketed under the name of Argireline. This anti-aging agent acts in a similar way to botulinum toxin by smoothing out the expressive lines and wrinkles caused by repeated movements. Both the active agents are responsible for the release of acetylcholine at the neuromuscular junction. One of the main differences between these active agents is in their form of application since, whereas botulinum toxin A is administered by injection, acetyl hexapeptide-3 is used in the form of a cream for topical application. Given the fact that the two active agents are hydrophilic neuropeptides of high molecular mass, their ability to penetrate the skin is improbable. Thus, the purpose of this study was to develop, characterize and evaluate systems comprising nanocarriers that are able to allow or improve the permeation of these active agents through the skin. Acetyl hexapeptide-3 was encapsulated in liposomes and botulinum toxin was encapsulated through two systems, liposomes and polymeric nanoparticles. The evaluation of the acetyl-hexapeptide-3 showed an encapsulation efficiency of 95%. The vesicles showed a zeta potential of -31 mV. The results demonstrated that the active agent had a good cutaneous permeation and its encapsulation did not affect the permeation through the skin. The botulinum toxin Type A were successfully encapsulated into nanoparticles by multiple emulsion method and solvent evaporation. The nanoparticles had an average size of approximately 570 nm and a zeta potential of -7,40 mV, which is characteristic of the polyester used. The multilamellar liposomes were obtained through a method that involved hydrating the lipid film and showed an average size of approximately 1370 nm and a zeta potential of -37 mV. It was possible to demonstrate by means of infrared fourier transform spectroscopy, the presence of botulinum toxin Type A in the polymeric nanoparticles and the liposomes. The *in vitro* assays that were carried out suggested that the liposomes that contained the botulinum toxin Type A had an effect on the neurotransmitters in the assays that were conducted, whereas it was not possible to identify the same effect in the nanoparticles that contained the botulinum toxin. These results showed that the encapsulation of botulinum toxin A can be an alternative for the topical application of botulinum toxin Type A in a non-invasive way and with a good deal of comfort to the patient. With regard to acetyl hexapeptide-3, it can be claimed that this active agent when released shows the same degree of

penetration through the skin as the encapsulated active agent. This suggests that the penetration of acetyl hexapeptide-3 does not undergo any alteration when encapsulated in liposomes. Thus, the active agent can be applied topically in this way.

Keywords: botulinum toxin, hexapeptide-3, nanoparticles, liposomes, permeation.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1 Estrutura geral da pele e envelhecimento cutâneo	14
3.2 Absorção Percutânea.....	15
3.3 Sistemas Nanoparticulados: Nanopartículas e Lipossomas.....	16
3.4 Toxina Botulínica Tipo A	20
3.5 Acetil hexapeptídeo-3.....	25
4 REFERÊNCIAS.....	27
5 CAPÍTULO 1	32
6 CAPÍTULO 2	52
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da pele mostrando as diversas camadas da derme e epiderme.	14
Figura 2- Representação esquemática das vias de permeação cutânea.....	16
Figura 3 - Representação esquemática do lipossoma com os locais de encapsulação dos fármacos	19
Figura 4 - Diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas	20
Figura 5 - Representação da estrutura tridimensional da BoNT/A com os três domínios: de ligação (BD), translocação (TD) e a porção catalítica (CD).	22
Figura 6 - Representação da toxina botulínica, mostrando as cadeias leve e pesada, bem como sítio de clivagem proteolítica.....	23
Figura 7 - Molécula do acetil hexapeptídeo-3.....	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(A1/O)	emulsão primária água em óleo
(A ₁ /O/A ₂)	emulsão múltipla
A1	fase aquosa interna
A2	fase aquosa externa
AFM	Microscopia de Força atômica
BoNT/A	toxina Botulínica tipo A
DL50	dose capaz de matar 50% de indivíduos em população em teste
FDA	Food and Drug Administration
Hc	domínio de translocação da toxina botulínica
Hn	domínio de ligação da toxina botulínica
IVTF	infravermelho com transformada de Fourier
LIPOTB	lipossomas contendo a BoNT/A
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N0	nanopartículas vazias
NTB	nanopartículas contendo a BoNT/A
O	fase orgânica
PCL	Poli-ε-caprolactona
PH	proteína hemaglutinínica
PNH	proteína não hemaglutinínica
PVAI	poli(álcool vinílico)
SNAP-25	proteína de 25 kDa associada a sinaptossomas
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TBL	toxina botulínica A liberada
UV	radiação ultravioleta
VAMP	vesicle-associated membrane protein

1. INTRODUÇÃO

As rugas são os sinais mais expressivos do envelhecimento cutâneo, resultantes da combinação de fatores intrínsecos e de fatores extrínsecos. Outros fatores secundários, como movimentos faciais repetitivos causados pela contração dos músculos da face também devem ser considerados (BUCK; ALAM; KIM, 2009).

A contração mais ou menos intensa desses músculos pode originar rugas ou sinais de expressão, uma vez que ao longo do tempo o músculo torna-se hipertrofiado e adquire uma tonicidade aumentada. Este fenômeno natural faz com que os sulcos e as rugas permaneçam aparentes, mesmo quando o músculo não está contraído. Com o passar do tempo, a pele se torna flácida e as rugas se acentuam como marcas profundas (BATISTELA; CHORILLI; LEONARDI, 2007).

Atualmente é grande a procura por produtos antienvelhecimento e, um dos produtos mais empregados para este fim é a toxina botulínica do tipo A, considerada a principal atenuante de rugas, essa substância é produzida naturalmente pelo *Clostridium Botulinum*, uma bactéria anaeróbia, que produz sete tipos sorológicos de toxina, sendo a do tipo A usada clinicamente por ser a mais potente (SPOSITO, 2004).

A toxina botulínica atua impedindo a liberação da acetilcolina na junção neuromuscular produzindo paralisia (BLANES-MIRA et al., 2002). A toxina botulínica do tipo A foi aprovada primeiramente em 1989 para o uso em estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial. Em 2002 foi aprovada para uso cosmético (linhas faciais) e em 2004 para o tratamento de hiperidrose (MAHAJAN, BURBAKER, 2007).

A toxina botulínica tipo A é um peptídeo hidrofílico, de alta massa molar, o que confere a este ativo uma baixa difusibilidade através da pele, principalmente em função das características lipofílicas do estrato córneo (GOROUHI; MAIBACH, 2009). Desta forma, para que a toxina botulínica exerça sua função de rejuvenescimento, precisa ser aplicada por meio de injeções intramusculares, causando dor e desconforto ao paciente.

Outro ativo empregado com a mesma finalidade é o acetil hexapeptídeo-3. Atua de forma similar à toxina botulínica sobre a liberação dos neurotransmissores na junção neuromuscular (GOLDSMITH; GRANERA; WOLFE, 2009). Previne e reduz as linhas de expressão causadas por movimentos repetitivos. Além disso, estimula o aumento do número de fibroblastos, reestruturando a formação da pele, combatendo o envelhecimento (BLANES-MIRA et. al, 2002).

Este hexapeptídeo-3 é um peptídeo hidrofílico sintetizado com a finalidade de mimetizar a ação proporcionada pela toxina botulínica tipo A (Botox® da *Allergan Pharmaceuticals*, Irlanda), entretanto por ser de administração tópica, na forma de creme, seu emprego é mais confortável ao paciente.

Apesar de atuarem de forma semelhante na liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (BLANES-MIRA et al., 2002), o acetil hexapeptídeo-3 apresenta resultados mais discretos que a toxina botulínica A. Mesmo assim, o acetil hexapeptídeo-3 se apresenta como uma alternativa promissora à toxina botulínica e para formulações antienvelhecimento.

Como uma alternativa para garantir a penetração e ação na pele da toxina botulínica tipo A e do acetil hexapeptídeo-3, estes ativos devem ser encapsulados na forma de lipossomas ou, ainda, de nanopartículas poliméricas, possibilitando assim a aplicação tópica da toxina e melhores resultados com a aplicação do acetil hexapeptídeo-3.

Na literatura encontram-se poucos estudos sobre a encapsulação da toxina botulínica. Da mesma forma, são raros os relatos sobre o acetil hexapeptídeo-3, destacando-se, assim, a importância do desenvolvimento do presente trabalho.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar a ação de nanocarreadores contendo a toxina botulínica tipo A e o acetil hexapeptídeo-3.

Objetivos específicos

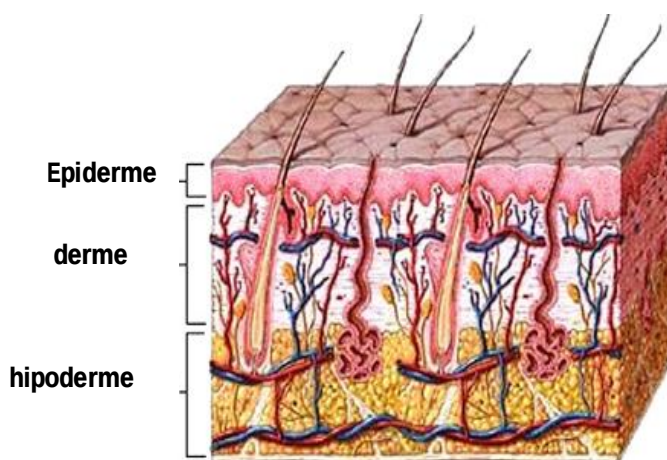
- Produzir nanopartículas poliméricas contendo a toxina botulínica tipo A, a partir de um poliéster biodegradável;
- Encapsular a toxina botulínica tipo A e o acetil hexapeptídeo-3 em lipossomas;
- Caracterizar os sistemas poliméricos e lipossomais por meio de estudos morfológicos e espectroscópicos.
- Avaliar o efeito das nanopartículas poliméricas e dos lipossomas obtidos a partir da toxina botulínica tipo A sobre a liberação de insulina nos ensaios *in vitro*.
- Realizar estudos de permeação cutânea dos lipossomas contendo o acetil hexapeptídeo-3.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. *Estrutura geral da pele e envelhecimento cutâneo*

A pele é um órgão complexo com diversas funções essenciais para sobrevivência humana. É formada por três camadas principais, a epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). A epiderme, camada mais externa da pele, é essencialmente celular e totalmente desprovida de vascularização, previne contra a perda de água e de calor, além de impedir a entrada de microorganismos patogênicos e limitar a penetração de agentes químicos. A derme, é uma camada essencialmente fibrosa, apresenta vascularização e um pequeno número de células, dentre as quais se encontram os fibroblastos, responsáveis pela síntese de importantes proteínas, como o colágeno e a elastina, envolvidos na sustentação e elasticidade da pele, bem como dos glicosaminoglicanos, que compõe a substância fundamental amorfa (NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011; SILBERT, 1979). A hipoderme corresponde à camada mais profunda da pele, logo abaixo da derme e repousa sobre o músculo subjacente, composta principalmente por células adiposas (KHAVKIN, ELLIS, 2011).

Figura 1 – Estrutura da pele.



Fonte: Adaptado de Khavkin; Ellis (2011)

A pele sofre alterações estruturais importantes no decorrer do tempo, que caracterizam o envelhecimento. O envelhecimento cutâneo é um fenômeno biológico complexo que depende da combinação de fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos são responsáveis pelo envelhecimento cronológico e resultam, principalmente, de determinantes genéticos e hormonais. Estes fatores ocasionam o afinamento da epiderme e o aumento de sua fragilidade, promove, ainda, a diminuição da espessura dérmica e da vascularização, redução no número de fibroblastos e na sua capacidade metabólica, além de uma resposta menor aos fatores de crescimento. Em geral, os tratamentos tópicos não podem evitar o envelhecimento intrínseco (KHAVKIN, ELLIS, 2011; BEITNER, 2003).

Por outro lado, os fatores extrínsecos consistem na exposição da pele a diversas agressões externas, tais como poluição atmosférica e, principalmente, radiação ultravioleta (UV), responsável pelo fotoenvelhecimento cutâneo. As manifestações clínicas correspondentes a esses danos são mudanças na textura da pele, rugas e hiperpigmentação (BEITNER, 2003). Outro fator importante a ser considerado é o aparecimento de rugas causadas pelos movimentos repetitivos dos músculos faciais (BUCK; ALAM; KIM, 2009).

3.2. *Absorção Percutânea*

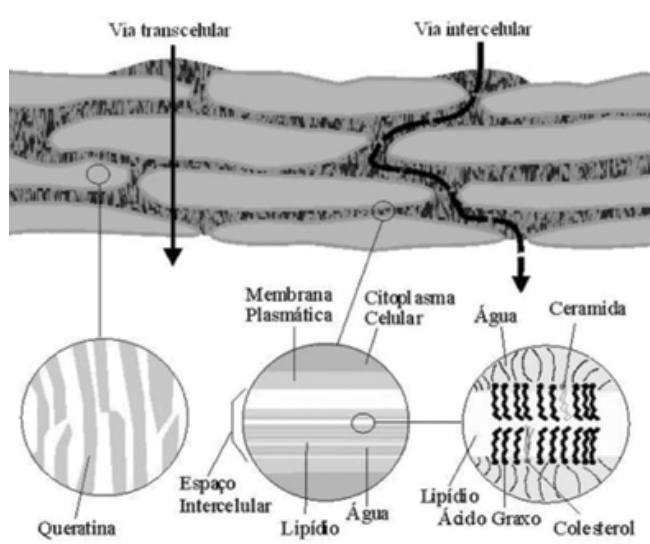
A pele atua como uma barreira que impede a entrada de muitos agentes químicos e outros materiais estranhos que possam causar danos ao nosso organismo. Este fato se deve principalmente ao estrato córneo, entretanto, é de conhecimento que a pele não é uma barreira total, e alguns produtos químicos penetram na pele, podendo, inclusive, serem absorvidos através dela (POET; MCDOUGAL, 2002).

A absorção percutânea se dá por três vias, uma delas, através dos espaços intercelulares do estrato córneo (transcelular). Estes espaços são preenchidos por lipídeos lamelares, o que confere uma barreira a ativos hidrofílicos e favorece a difusibilidade de ativos lipofílicos, outra pelas células do estrato córneo (intercelular) (Figura 2), e finalmente, pelos apêndices cutâneos, em especial pelos folículos pilosos, que apresentam pouca resistência à difusão, entretanto tem uma área superficial pequena, o que restringe a absorção (SCHAEFER; REDELMEIER, 1996).

A permeação de compostos é dependente de vários fatores, entre eles a lipofilicidade e o tamanho da molécula.

É consenso que moléculas hidrofílicas e de alta massa molar, apresentam uma baixa difusibilidade através da pele (GOROUHI; MAIBACH, 2009).

Figura 2- Representação esquemática das vias de permeação cutânea



Fonte: Adaptado de Moser et al. (2001)

O conhecimento da eficácia da penetração e da absorção de ativos aplicados na pele é muito importante para o desenvolvimento e otimização de produtos tópicos (LADEMANN et al., 2007).

3.3. Sistemas Nanoparticulados: Nanopartículas e Lipossomas

A nanotecnologia farmacêutica é a área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica ou micrométrica. Estudos de tais sistemas têm sido realizados ativamente no mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA et al., 2007).

Os nanossistemas oferecem diversas vantagens, como a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo, promovendo manutenção de níveis plasmáticos em concentração constante. Além disso, há um aumento da eficácia terapêutica e liberação progressiva e controlada do fármaco pelo condicionamento a estímulos do meio em que se encontram (sensíveis a variação de pH ou de temperatura).

A diminuição expressiva da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima e a diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis também deve ser considerada. A possibilidade de direcionamento a alvos específicos (sítio-especificidade), a incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos e a diminuição da dose terapêutica e do número de administrações complementam as principais vantagens desses sistemas.

Embora essas vantagens sejam significativas, alguns inconvenientes plausíveis não podem ser ignorados, como por exemplo, uma possível toxicidade, ausência de biocompatibilidade dos materiais utilizados e o elevado custo de obtenção dos nanossistemas comparados com as formulações farmacêuticas convencionais (DUNNE et al., 2003; TAO, DESAI, 2003).

Nos últimos anos, numerosos estudos demonstraram que a distribuição de um fármaco no organismo pode ser modificada pelo uso de nanossistemas tais como lipossomas, nanopartículas ou micropartículas. Estes carreadores podem proteger o princípio ativo da degradação e/ou inativação; melhoram a biodisponibilidade por aumento da penetração celular e proporcionam a liberação do fármaco no sítio de ação desejado, eliminando ou minimizando os efeitos colaterais da terapêutica convencional.

O desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada por micro e nanossistemas poderá permitir um melhor controle na cinética de liberação do fármaco, resultando em níveis plasmáticos terapêuticos, com menores efeitos tóxicos, o que pode repercutir na melhoria da qualidade de vida de milhões de pacientes, além do impulso técnico, científico e financeiro, potencialmente adquiridos (PIMENTEL et al., 2007).

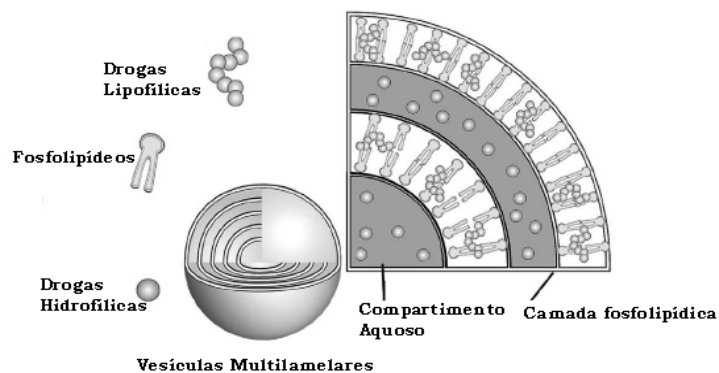
A preocupação com o sucesso dos tratamentos efetuados com fármacos de características particulares, como toxicidade elevada, faixa terapêutica estreita, metabolização rápida, ou que necessitam ser empregados em esquemas terapêuticos de longa duração, levou os pesquisadores da área farmacêutica a

buscarem novas alternativas de administração, além daquelas consideradas convencionais. O controle da liberação de substâncias ativas em sítios de ação específicos, por meio da utilização de formas farmacêuticas capazes de permitir a otimização da velocidade de liberação e do regime posológico, é uma área de pesquisa intensiva nos últimos anos. Dentre os principais materiais utilizados, incluem-se os lipossomas, as micropartículas e as nanopartículas (MAINARDES, 2007).

Lipossomas e nanopartículas são considerados nanossistemas e micropartículas, emulsões múltiplas e microemulsões são microssistemas (SILVA, 2004). Os lipossomas são vesículas aquosas esféricas formadas por bicamada lipídica podendo servir como veículo de fármacos a serem encapsulados na cavidade aquosa da vesícula ou na bicamada lipídica (LASIC, 1998; TYAGI et al., 2009). Nanopartículas são partículas poliméricas na forma de cápsulas ou matriciais, nas quais o fármaco está encapsulado ou adsorvido na malha polimérica (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002). O tamanho das nanopartículas varia de 10 a 1000 nm e o dos lipossomas de 20 nm a alguns micrômetros (PIMENTEL et al., 2007).

Os lipossomas têm sido amplamente utilizados como veículo em formulações cosméticas por proporcionar a encapsulação de ativos hidrofílicos e lipofílicos (Figura 3). Os lipossomas podem ser unilamelares, quando as vesículas são compostas de uma única bicamada lipídica ou podem ser ainda, multilamelares, compostas por bicamadas múltiplas concêntricas (BRUSCHI, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática do lipossoma com os locais de encapsulação dos fármacos

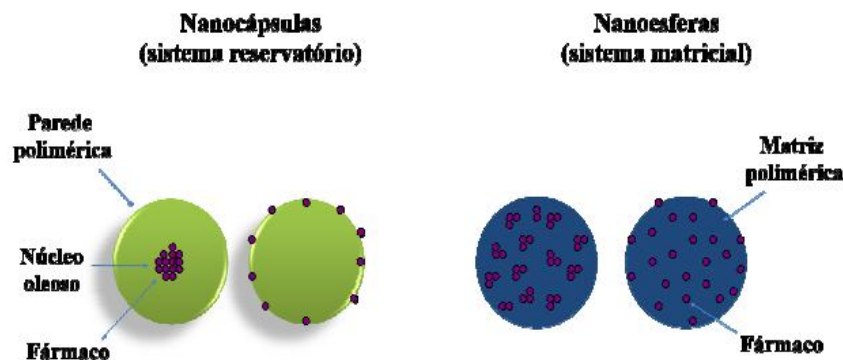


Fonte: adaptado de Keller (2001)

As nanocápsulas e as nanoesferas diferem entre si segundo sua estrutura e composição (Figura 4). As nanocápsulas possuem um invólucro polimérico e um núcleo lipídico, já as nanoesferas não possuem o núcleo oleoso, apenas uma matriz polimérica. O fármaco pode estar no núcleo oleoso ou adsorvido na matriz polimérica (SHAFFAZICK et. al, 2003).

Pode-se dizer que as nanocápsulas constituem os chamados sistemas do tipo reservatório, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo e as nanoesferas são obtidas por um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado (AZEVEDO, 2002).

Figura 4 - Diferenças estruturais entre nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: SCHAFFAZICK et al., 2003.

Entre os vários sistemas de liberação, as nanopartículas representam potencialmente uma das abordagens desse trabalho. As proteínas são facilmente degradáveis, devendo assim ser protegidas até chegar em seu local de ação. Várias técnicas de polimerização são utilizadas na incorporação de fármacos hidrofílicos no interior das nanopartículas. A técnica de emulsão múltipla é a mais apropriada para encapsular fármacos hidrofílicos e proteínas (LAMPRECHT et al., 2000).

3.4. Toxina Botulínica Tipo A

A Toxina botulínica tipo A ($C_{6760} H_{10447} N_{1743} O_{2010} S_{32}$) é um dos sete subtipos de toxinas produzidas pelo *Clostridium botulinum* (A, B, C1, D, E, F e G) (POULAIN; POPOFF; MOLGÓ, 2008; YONEDA et al, 2005). Embora cada subtipo da toxina seja antigenicamente distinto, eles apresentam massas molares e estruturas similares, com aproximadamente 150 kD e todos consistem de uma cadeia pesada e leve ligados por uma ligação dissulfeto (MAHAJAN; BRUBAKER, 2007).

Vários destes subtipos estão sendo investigados para uso clínico, mas somente a toxina do tipo A está aprovada para uso cosmético (VARTANIAN; DAYAN, 2003).

Na década de 1970, o cientista americano Alan Scott realizou experimentos com diminutas doses de BoNT/A (toxina botulínica tipo A) aplicada intramuscularmente em primatas, levando ao relaxamento com duração de vários

meses sem apresentar efeito sistêmico. Surgiu assim a pioneira em tratamentos oftalmológicos, como estrabismo e blefaroespasma (JOHNSON, 1999).

Nas últimas três décadas, a toxina botulínica tem sido empregada para fins terapêuticos em inúmeras afecções. A BoNT/A foi aprovada primeiramente em 1989 para o uso em estrabismo, blefaroespasma e espasmo hemifacial. Em seguida, os tipos A e B foram aprovados para o tratamento de distonias cervicais e, posteriormente, o tipo A foi aprovado para fins estéticos (ZAGUI et al., 2008; ROHRICH et al., 2003).

A toxina botulínica tipo B foi recentemente aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA para o tratamento de distonia cervical e estão sendo avaliados os usos clínicos para o sorotipo F (LAM, 2003).

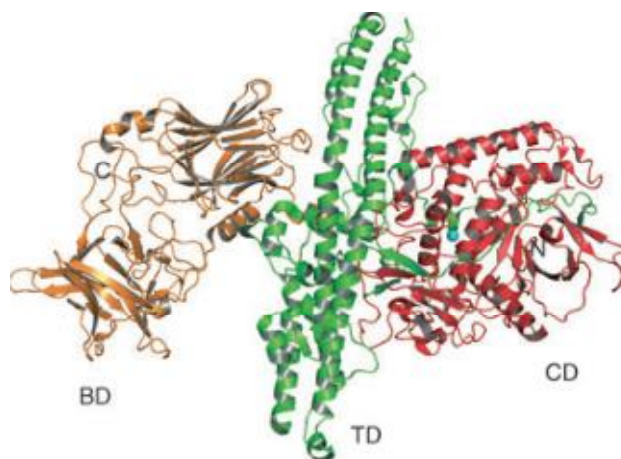
Nos EUA, de 2000 a 2008, os tratamentos cosméticos minimamente invasivos com a toxina botulínica tipo A tiveram um aumento de 537%, com 5 milhões de tratamentos por ano, enquanto procedimentos cirúrgicos estéticos, como a blefaroplastia e *facelift* apresentaram uma redução de 16 e 32%, respectivamente (JASPERS; PIJPE; JANSMA, 2011).

Carruthers e Carruthers (1991) começaram a usar BoNT/A para indicações cosméticas no início de 1988. Estes autores observaram uma atenuação consistente nas rugas faciais em pacientes cujos músculos foram tratados com a BoNT/A para o blefaroespasma essencial benigno. Este fato levou a realização de ensaios clínicos utilizando a toxina na área glabellar, entre as sobrancelhas.

Para a toxina se tornar ativa, é necessária uma clivagem proteolítica, formando assim, duas cadeias, uma pesada de 100kD e uma leve de 50kD, ligadas por uma ponte dissulfídica. A BoNT/A é constituída de três domínios, o catalítico, de translocação e de ligação (Figura 5). A cadeia leve é a porção catalítica, contém o íon Zinco, responsável pelo bloqueio da liberação dos neurotransmissores. A cadeia pesada é formada por dois domínios, o de ligação (Hn) e de translocação (Hc). O domínio de ligação é uma estrutura helicoidal associada com a atividade de fusão de membrana e envolvida com a formação de canais iônicos voltagem dependente. Já o domínio de translocação está envolvido com as ligações específicas aos receptores neuronais existentes na superfície externa dos neurônios colinérgicos periféricos. Dessa forma, a cadeia pesada é responsável pela ligação aos receptores extracelulares e internalização na célula nervosa, além de ajudar a translocação da

cadeia leve para o citoplasma do neurônio (POLI; LEBEDA, 2004; JOHNSON; MONTECUCCO, 2008; SWAMINTHAN, 2011).

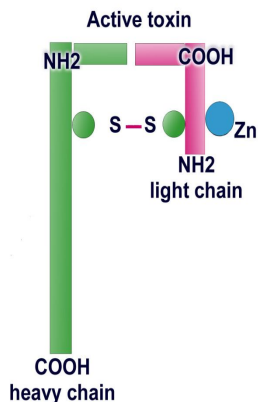
Figura 5 - Representação da estrutura tridimensional da BoNT/A com os três domínios: de ligação (BD), translocação (TD) e a porção catalítica (CD).



Fonte: Adaptado de SWAMINATHAM, (2011).

A parte ativa da molécula da neurotoxina é formada por uma única cadeia polipeptídica composta por 1295 aminoácidos. A cadeia leve da toxina botulínica é composta pelos primeiros 447 aminoácidos e a pesada composta pelos aminoácidos restantes (Figura 6). A ponte dissulfídica, responsável pela integridade da atividade biológica, está localizada entre os aminoácidos 430 e 454 (DRESSLER; BENECKE, 2007; POLI; LEBEDA, 2004).

Figura 6 - Representação da toxina botulínica, mostrando as cadeias leve e pesada, bem como o sítio de clivagem proteolítica



Fonte: SPOSITO, 2004

As preparações da toxina botulínica são formadas por um complexo ativo, representado pela cadeia leve e pesada da toxina e por proteínas não-tóxicas, constituídas de proteína hemaglutínica (PH) e não hemaglutínica (PNH), que possuem a função de proteger a neurotoxina da degradação (SIMPSON, 2000; DRESSLER; BENECKE, 2007; WENZEL, 2004).

Uma das finalidades da BoNT/A é reduzir as rugas de expressão, dessa forma o mecanismo de contração muscular deve ser compreendido. Os músculos são contraídos quando os neurotransmissores, mais especificamente a acetilcolina, são liberados através de vesículas na fenda sináptica. O processo envolve várias proteínas, canais e vesículas. O complexo de proteínas SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF] – attachment protein receptor) é essencial na liberação dos neurotransmissores na sinapse e é composto por três proteínas: proteína vesicular, VAMP (vesicle-associated membrane protein), sintaxina (associada à membrana do neurônio) e SNAP-25 (proteína de 25 kDa associada a sinaptossomas) este complexo é como um anzol celular que capta vesículas e os aproxima da membrana para permitir a sua fusão (PUIG; GARCIA-ANTÓN; MANGUES, 2006).

A Toxina Botulínica cliva a proteína SNAP-25 de forma irreversível, e portanto, o complexo SNARE não pode ser montado, assim o sinal nervoso não

pode ser retransmitido, o músculo não pode contrair e é paralisado, impedindo a formação de linhas e rugas (PUIG; GARCIA-ANTÓN; MANGUES, 2006; BHIDAYASIRI; TRUONG, 2005). Atua seletivamente no terminal nervoso periférico colinérgico, inibindo a liberação de acetilcolina. Não ultrapassa a barreira cerebral e não inibe a liberação de acetilcolina ou de qualquer outro neurotransmissor a esse nível. A cadeia pesada da toxina é seletiva para as terminações nervosas colinérgicas, ligando-se aos receptores específicos da placa motora. A cadeia leve é liberada no citoplasma da terminação nervosa, realizando a quebra das proteínas, impedindo assim a liberação da acetilcolina para a fenda sináptica (SPOSITO, 2004).

Essa neurotoxina também inibe a secreção das glândulas e induz paralisia no músculo liso, aumentando assim suas aplicações terapêuticas. O exato mecanismo sobre o músculo liso não está totalmente elucidado, alguns trabalhos sugerem que a toxina pode inibir a liberação de noradrenalina dos neurônios (SUTCLIFFE; SANDIFORD; KHAWAJA, 2005).

A BoNT/A é isolada a partir de cepas de *Clostridium Botulinum* em crescimento, através de precipitações ácidas até a formação de um complexo cristalino consistindo da toxina ativa de alta massa molar e uma proteína hemaglutinina associada. Esse complexo cristalino é, então, redissolvido numa solução contendo salina (0,9mg) e albumina (0,5mg) e esterilizado por filtração antes da secagem a vácuo. Essa solução ajuda a estabilizar a toxina na grande diluição necessária para o trabalho clínico (WILBER et al., 2000).

A toxicidade da BoNT/A desaparece quando se realizam diluições elevadas, como nas que são utilizadas para o tratamento humano. Após a diluição, cada frasco deve ser utilizado dentro de 4 horas, entretanto, Gartland e Hoffman (1993) não observaram perda significativa de atividade em 6 horas após a reconstituição, mas em 12 horas, observaram uma redução de 43,9% em sua atividade. O recongelamento após a reconstituição apresentou redução de aproximadamente 70% na potência em 1 a 2 semanas. Mesmo com esses resultados, observações clínicas não foram confirmadas, talvez porque o efeito clínico da BoNT/A não é facilmente quantificado (CARRUTHERS; KIENE; CARRUTHERS, 1996).

Estas neurotoxinas estão entre os venenos mais conhecidos e apresentam uma DL50 de 1-5 ng/kg de peso humano (SWAMINATHAN, 2011), ainda assim, a administração de todo o conteúdo de um frasco (100 U) está bem abaixo da dose

tóxica estimada para uma pessoa de 70 kg (2500 a 3000 U). Além disso, a maioria das aplicações cosméticas utiliza em torno de 20 a 30 U de BoNT/A por sessão, sendo altamente vantajoso considerando o risco/benefício (WILBER et al., 2000).

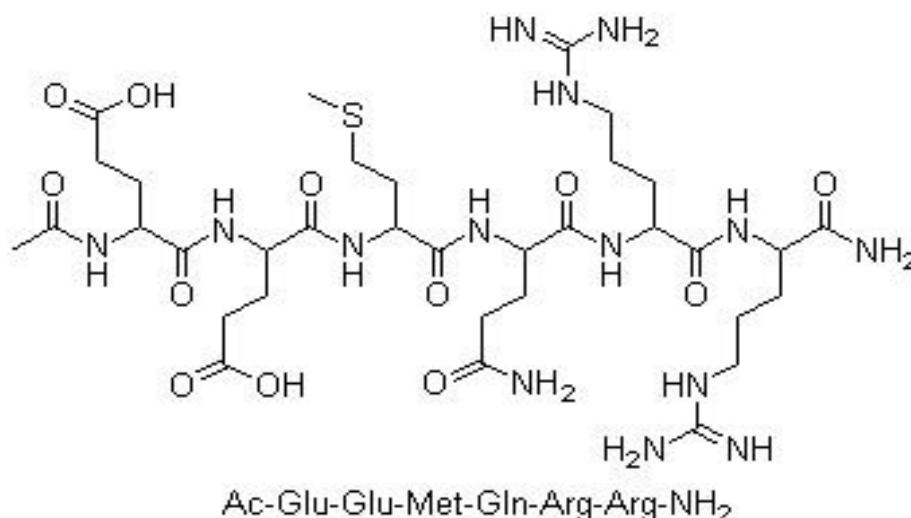
3.5. Acetil hexapeptídeo-3

Os peptídeos são biomoléculas que contêm de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos unidos entre si através de ligações peptídicas. Essas substâncias podem exercer diversas funções no organismo, como neuropeptídeos, neurotransmissores, antibióticos naturais ou substratos de proteases (MACHADO, 2004).

O Acetil hexapeptídeo-3 (Figura 7) é um peptídeo sintético formado por seis aminoácidos (arginina - ácido glutâmico - ácido glutâmico – metionina - ácido glutâmico - arginina), que vem sendo utilizado em formulações antienvhecimento, devido a seu efeito antirrugas (RUIZ et al., 2007).

Esse peptídeo sintético apresenta a fórmula molecular, $C_{34}H_{60}N_{14}O_{12}S$, massa molar de 888,99, pH de 2 a 5 quando puro e densidade relativa de 0,94 a 1,04 g/ml (CHEMBLINK, 2011).

Figura 7 - Molécula do acetil hexapeptídeo – 3



O acetil hexapeptídeo-3 é um imitador da porção N-terminal do SNAP-25 e compete com a proteína natural para uma posição no complexo SNARE, por isso desestabiliza a sua formação, sem quebrar nenhum de seus componentes. Com o complexo SNARE desestabilizado a vesícula não pode liberar os neurotransmissores, desta forma a descontração muscular é atenuada e o músculo está relaxado ao invés de paralisado, impedindo a formação de linhas e rugas (PUIG; GARCIA-ANTÓN; MANGUES, 2006). Assim, pode-se dizer que o mecanismo de ação do hexapeptídeo-3 é similar ao da toxina botulínica, entretanto com potência reduzida.

Análises topográficas da pele demonstraram que o acetil hexapeptídeo-3 em uma concentração de 10%, quando aplicado na face de voluntárias durante 30 dias, proporcionou efeito atenuante na profundidade das rugas de até 30% (BLANES-MIRA et al., 2002).

4 REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M. M. M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. **Monografia**. Campinas : 2002.

BATISTELA, A. M.; CHORILLI, M.; LEONARDI, R. G. Approach to the process knowledge of skin aging among different ethnics. **Revista Brasileira Farmacêutica**, v. 88 n. 2, p. 59-62, 2007.

BEITNER, H. Randomized, placebo-controlled, double blind study on the clinical efficacy of a cream containing 5% α -lipoic acid related to photoageing of facial skin. **British Journal of Dermatology**, v. 149, n. 4, p. 841-849, 2003.

BHIDAYASIRI, R.; TRUONG, D.D. Expanding use of botulinum toxin. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 235, p. 1-9, 2005.

BLANES-MIRA C., CLEMENTE J., JODAS G., GIL A., FERNANDEZ-BALLESTER, G., PONSATI, B., GUTIERREZ, L., PERZ-PAYA, E., FERRER-MONTIEL, A. A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. **International Journal of Cosmetic Science**. v. 24 : 303-310, 2002.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drugs Delivey Reviews**, v. 54, p. 631-651, 2002.

BRUSCHI, M. Formulações tópicas contendo nanocápsulas de adapaleno: avaliação da estabilidade e permeação cutânea. **Dissertação de Mestrado**, Santa Maria-RS, 2010.

BUCK, D.W.; ALAM, M.; KIM, J. Y.S. Injectable Fillers For Facial Rejuvenation: A Review. **Journal of Plastic Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 62, p. 11-18, 2009.

CARRUTHERS J.; CARRUTHERS, J.A. Botulinum toxin use for glabellar wrinkles. **Presented at the annual meeting of the American Society for Dermatology Surgery**, Orlando, 13-17 março, 1991.

CARRUTHERS, A.; KIENE, K.; CARRUTHERS, J. Botulinum exotoxin use in clinical dermatology. **Journal of the american academy of dermatology**, v. 34, n. 5, 1996.

CHEMBLINK. Banco de dados on-line de produto químicos. Disponível em: <http://www.chemblink.com/products/616204-22-9.htm> Acesso em: 22 jun. 2011.

DRESSLER D.; BENECKE R.; Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. **Disability and Rehabilitation**, v. 29, n. 23, p. 761-768, 2007.

DUNNE, M.; BIBBY, D.C.; JONES, J.C.; CUDMORE, S. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 92, p. 209-219, 2003,

GARTLAN, M.G.; HOFFMAN, H.T. Crystalline preparation of botulinum toxin type A (Botox): degradation impotency with storage. **Otolaryngology- Head and Neck Surgery**, v. 108, p. 135-140, 1993.

GOLDSMITH, J.; GRANERA, L.; WOLFE, C. Effects of Argireline on EPSP amplitude at the Crayfish Neuromuscular Junction. **Pioneering Neuroscience**, v. 10, p. 11-14, 2009.

GOROUHI, F.; MAIBACH, H. I. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 327-45, 2009.

JASPERS, G.W.C., PIJPE, J., JANSMA, J. The use of botulinum toxin type A in cosmetic facial procedures. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, p. 127-133, 2011.

JOHNSON, E. A. Clostridial toxins as therapeutic agents: benefits of nature's most toxic proteins. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 551-575, 1999.

JOHNSON, A. E., MONTECUCCO, C. Botulism. **Handbook of clinical Neurology**, v. 81, p. 333-368, 2008.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19. p. 229-234, 2011.

LADEMANN, J.; RICHTER, H.; TEICHMANN, A.; OTBERG, N.; BLUME-PEYTAVI, U.; LUENGO, J.; WEIB, B.; SCHAEFER, U. F.; LEHR, C. M.; WEPF, R.; STERRY, W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 159 – 164, 2007.

LAM, M. S. The basic science of botulinum toxin. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 11, p. 431– 438, 2003.

LAMPRECHT, A.; UBRICH, N.; PÉREZ, H. M. ; LEHR, C.M., HOFFMAN, M.; MAINCENT, P. Influences of process parameters on nanoparticle preparation performed by a double emulsion pressure homogenization technique. **International Journal of Pharmacology**, v. 196, p. 177 -182, 2000.

LASIC, D.D. Novel application of liposomes. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

MACHADO, A. ;LIRIA, W. C.; PROTI B. P.; REMUZGO, C.; MIRANDA, M. T.. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, 2004.

MAHAJAN, S. T.; BRUBAKER, L. Botulinum toxin: From life-threatening disease to novel medical therapy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 196, p. 7-15, 2007.

MAINARDES, R. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina**. 2007, 133f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2007.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E. B.; SHERRATT, M. J. Molecular Aspects of Skin Ageing. **Maturitas**, v. 69, p. 249– 256, 2011.

PIMENTEL, F. L.; JÚNIOR, J.T.A.; MOSQUEIRA, C.V.; MAGALHAES-SANTOS S. N. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, 2007.

POET, T. S.; MCDUGAL, J.N. Skin absorption and human risk assessment: Minireview. **Chemico-Biological Interactions**, v. 140, p. 19–34, 2002.

POLI, M.A.; LEBEDA, F.J. An overview of clostridial toxins. In: Handbook of neurotoxicology. **Totowa: Human Press**. p. 293-304, 2004.

POULAIN, B.; POPOFF, M.R.; MOLGÓ, J. How do the botulism neurotoxins block neurotransmitter release: from botulism to the molecular mechanism of action. **The Botulinum Journal**. v. 1, n. 1, p. 14-87, 2008.

PUIG, A., GARCIA-ANTÓN, M. J., MANGUES, M. An integral peptide treatment. **Euro cosmetics**, special issue, 2006.

ROHRICH, R.J., JANIS, J.E., FAGIEN, S., STUZIN, J.M. The cosmetic use of botulinum toxin. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 112, p. 177-192, 2003.

RUIZ, M. A., CLARES B., MORALES M. E., AZALLA S., GALLARDO V. Preparation and stability of cosmetic formulations with an anti-aging peptide. **Journal of cosmetic science**, v. 58, n. 2, p. 157-171, 2007.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 733-737, 2007.

SCHAEFER, H; REDELMEIER, T.E. **Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption**. Karger: 310p.1996.

SCHAFFAZICK, S. R., GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; FREITAS, L.C. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SILBERT, E. S. Mucopolysaccharides of ground substance. In: FITZPATRICK, T.B. et al. **Dermatology in general medicine**. 5^a ed. Vol.1. McGraw-Hill, 1979. Cap. 18.

SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surgical Neurology**, v. 61, p. 216-220, 2004.

SPOSITO, M. M. M. Toxina botulínica tipo A - propriedades farmacológicas e uso clínico. **Acta Fisiátrica**, 2004.

SUTCLIFFE, P.R.; SANDIFORD, A. N.; KHAWAJA, T.H. From frown lines to fissures: Therapeutic uses for botulinum toxin. **International Journal of Surgery**, v. 3, p. 141-146, 2005.

SWAMINATHAN, S. Molecular structures and functional relationships in clostridial neurotoxins. **The Federation of European Biochemical Societies Journal**, 2011.

TAO, S.L.; DESAI, T.A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 315-328, 2003.

TYAGI, P.; WU, P.C.; CHANCELLOR, M.; YOSHIMURA, N.; HUANG, L.: Recent advances in intravesical drug/gene delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, p. 369-379, 2006.

VARTANIAN, J. A.; DAYAN, H. S. Complications of botulinum toxin A use in facial rejuvenation. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 11, p. 483–492, 2003.

WENZEL R.G. Pharmacology of botulinum neurotoxin serotype A. **American Journal of Health-System Pharmacy**. v. 61, p. 5-10, 2004.

WILBER, H.; JILL, A.; FOSTER, A.J.; ROGACHEFSKY, A.S. Pharmacology of botulinum toxin. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 2, 2000.

YONEDA, S.; SHIMAZAWA, M.; KATO, M.; NONOYAMA, A.; TORII, Y.; NISHINO, H.; SUGIMOTO, N.; KOZAKI, S.; HARA, H. Comparison of the therapeutic indexes of different molecular forms of botulinum toxin type A. **European journal of Pharmacology**, v. 508, p. 223-229, 2005.

ZAGUI, R. M. B.; MATAYOSHI, S.; MOURA, C.F. Efeitos adversos associados à aplicação de toxina botulínica na face: revisão sistemática com meta-análise. **Arquivo Brasileiro oftalmologia** v. 71, n. 6, p. 894-901, 2008.

5 CAPÍTULO 1

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF BOTULINUM TYPE A INCORPORATED IN NANOCARRIERS

Este artigo apresenta o desenvolvimento, a caracterização e avaliação da toxina botulínica tipo A encapsulada em lipossomas e nanopartículas poliméricas.

As nanopartículas produzidas foram analisadas por mais de um tipo de Microscopia. Os lipossomas foram caracterizados através de Microscopia óptica e de Força Atômica. Os métodos espectroscópicos para analisar o perfil das nanopartículas foram a difração de Raios X e o infravermelho com transformada de Fourier. Os espectros de infravermelho dos lipossomas também foram analisados.

Outros fatores importantes avaliados foram o índice de polidispersão, a determinação do tamanho médio das partículas e o potencial zeta dos lipossomas e das nanopartículas.

Foi possível comprovar a formação das nanopartículas e dos lipossomas carregados com a toxina botulínica tipo A. Observou-se que os lipossomas contendo a toxina botulínica A apresentaram efeito sobre os neurotransmissores nos ensaios realizados *in vitro*, comparativamente às nanopartículas. Esses resultados demonstraram que é possível encapsular a toxina botulínica tipo A na forma de lipossomas sem alterar sua ação biológica.

Este artigo será submetido à *Latin American Journal of Pharmacy*.

DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND ASSESSMENT OF BOTULINUM TYPE A INCORPORATED IN NANOCARRIERS

Daniele P.S.F. ASSUNÇÃO¹, Paulo V. FARAGO¹, Cynthia M. de Oliveira¹,
Sabrina GRASSIOLI² & Josiane P. PAULA^{1*}

¹ *State University of Ponta Grossa, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Sciences, 4748, Carlos Cavalcanti Ave., Zip Code 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.*

Department of Structural Molecular Biology & Genetics, State University of Ponta Grossa, 4748, Carlos Cavalcanti Ave., Zip Code 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: jopadilha@terra.com.br

ABSTRACT

Botulinum toxin type A is one of the most used products in mitigation of wrinkles and expression lines by promoting muscle paralysis. Because of their hydrophilic and high molecular mass, this active agent has low diffusibility through the skin. Thus, to exert its action as rejuvenation agent, botulinum toxin needs to be applied through intramuscular injections, causing pain and discomfort to the patient. An alternative to minimize this problem is encapsulation of the neuropeptide in nanocarriers that can easily cross the skin barrier. Thus, the aim of this work was to study the feasibility of encapsulation of botulinum toxin A in polymeric nanoparticles and liposomes. It was possible to demonstrate the formation of nanoparticles and liposomes loaded with botulinum toxin A. It was observed that liposomes containing botulinum toxin had an effect on neurotransmitters most effective in tests *in vitro*. These results demonstrate that it is possible to encapsulate botulinum toxin type A in liposome form without altering its biological action.

Keywords: botulinum toxin type A, liposomes, nanoparticles

INTRODUCTION

Wrinkles are the most expressive signs of cutaneous aging, which is a complex biological phenomenon that depends on a combination of intrinsic and extrinsic factors. The intrinsic factors are responsible for chronological aging that is genetically determined and one of the main extrinsic factors is exposure to solar radiation that leads to photo-aging and causes alterations in the skin such as wrinkles, dry skin, loss of elasticity and irregular pigmentation¹.

The accumulation of elastin below the dermal-epidermal junction characterizes the elastosis that is typical of this aging. Other related characteristics are atrophy and collagen fragmentation, and elastic fibers¹.

In addition, other factors must be considering, such as repetitive facial movements caused by a contraction of the facial muscles².

Intense muscle contractions can lead to wrinkles or signs of expressive wrinkles, since over a period of time muscles become hypertrophied and acquire an increased tonicity. This natural phenomenon means that the furrows and wrinkles remain apparent even when the muscle is not contracted. As time passes, the skin becomes flaccid and the wrinkles accentuated into deep grooves³.

Currently there is an active search for anti-aging products and one of the strategies for this purpose is to employ botulinum toxin Type A, which is regarded as the main mitigating method for wrinkles. It is naturally produced from *Clostridium botulinum* an anaerobic bacterium that produces seven serological types of toxin, and Type A is used clinically because it is the most powerful⁴.

Botulinum toxin acts by preventing the release of acetylcholine in the neuromuscular junction and causing paralysis⁵. This neurotoxin was approved in 1989 for use in the treatment of squinting, eye-twitching and hemifacial spasms. In 2002, it was approved for cosmetic use to mitigate facial lines and in 2004 for the treatment of hyperhidrosis⁶.

Botulinum toxin type A is a hydrophilic neuropeptide with high molar mass. It has a low diffusibility through the skin, mainly because of the lipophilic characteristics of the stratum corneum⁷. Therefore, to carry out rejuvenation, botulinum toxin has to be applied by of intramuscular injection; however, this procedure causes pain and discomfort to the patient.

Regarding this problem, technological development of new pharmaceutical methods has proved to be a more promising strategy to allow a free passage of medicines through the skin. There has been a great interest in the selective release of medication in the skin and hence there have been several studies of carrier systems with the aim of improving the selection and efficiency of the formulations⁸.

Nanoparticles and liposomes are between the most important of these carriers. Liposomes are spherical vesicles formed by lipid bilayers with a size that can vary from 20 nm to a number of micrometers. They can be used to encapsulate hydrophilic drugs in the aqueous cavity of the vesicle or lipophilic drugs in the lipid bilayer^{9,10}.

According to the process and the composition used in the preparation of nanoparticles, it is possible obtain nanospheres or nanocapsules. Regarding the nanocapsules the drug is found in a nucleus of the particle and about the nanospheres the drug is encapsulated or adsorbed in the polymer mesh¹¹. The size of the nanoparticles varies from 10 to 1000 nm¹².

In order to alleviating the discomfort of the patient, it is possible to encapsulate botulinum toxin into liposomes or even into nanoparticles. This can carry out their topical application and ensure their penetration and activity in the skin.

There were found very few reports in the literature of the encapsulation of botulinum toxin Type A which underlines the innovative nature of the study being undertaken here.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and solvents

Onabotulinumoxin A (Botox® 100 U, Allergan Pharmaceuticals, Westport, Irlanda); Poly(vinyl alcohol) (PVA) (M_w 13.000 a 23. 000 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Cholesterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Phosphatidylcholine (EMBRAFARMA, São Paulo, Brazil); Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) (M_w 70.000 a 90.000 g.mol⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA); Other chemicals were analytical grade. Purified Milli-Q® water (Millipore, Bedford, USA) was used throughout the study.

Experimental procedure

Preparation of nanoparticles

The botulinum toxin A-loaded nanoparticles were prepared by a double emulsion/solvent evaporation technique^{13,14}. The inner aqueous phase (A₁) which consisted of 250 µL botulinum toxin A (20 UI.mL⁻¹) was added to an organic phase (O) containing 100 mg of poli(ε-caprolactona) in 20 mL in MC under vigorous mixing for 1 minute at 22,000 rev.min⁻¹ (Ultra-turrax®, model T18 N, IKA®). The resulting water-in-oil (A₁/O) emulsion was further dispersed into 100 ml of PVA (Mw 13,000 – 26,000 g.mol⁻¹) aqueous solution 5%, under vigorous mixing (22,000 rev.min⁻¹) for 3 minutes resulting in a multiple emulsion (A₁/O/A₂). Afterwards, this double emulsion was kept under mechanical stirring (800 rev.min⁻¹) for 4 h to allow complete evaporation of the MC. The nanoparticles were separated by centrifugation at 50,000 *g* for 20 minutes. Finally, the particles were washed with distilled water to remove the residual surfactant.

Preparation of the liposomes

Preparation of botulinum toxin A - loaded liposomes

Multilamellar liposomes were prepared according to Esteves (2011)¹⁵ by the thin film hydration method. Briefly, L-α-Phosphatidylcholine (PC) 0.192 g and cholesterol (CH) (0.060 g) were dissolved in chloroform. The lipid mixture was deposited as a thin film in a round-bottomed flask by rotary evaporator the chloroform under vacuum, at 40°C in a temperature-controlled water bath for a period of 2 h to ensure complete removal of traces of solvent. Hydration of the film was performed by adding 3 mL of saline solution (0,9%) and BoNT/A 250 µL to the flask. The dispersion was mechanically shaken for 30 min at 25°C. The liposomes remained refrigerated at 4°C overnight. Following this, the vesicles were lyophilized and stored in a desiccator under vacuum at room temperature.

Morphological characterization of nanoparticulated systems

Characterization of nanoparticulated systems

Optical microscopic evaluation

The liposomes and nanoparticles were characterized by optical microscopy (Nikon Eclipse E200) at 400X magnification for analysis of the vesicle formation and morphology. Optical micrographs were acquired by a digital Nikon camera coupled to an optical microscope.

Scanning electron microscopy (SEM)

Samples of nanoparticles were coated with a thin layer of gold by sputtering, using a Pelco 9100 sputter coater (Pelco, Clovis, CA, USA) and analyzed using scanning electron microscopy (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) at an intensity of 10 kV, captured at various magnifications.

Atomic force microscopy (AFM)

The atomic force microscopy (AFM) analyses were recorded using a SPM9600 Scanning Probe (Shimadzu Corporation) with 20 nm radius of curvature and using Si₃N₄ (silicon nitride) cantilever in contact mode. The scan size was 20 x 20 μ m and the scan frequency of 2 Hz was selected.

Zeta potential analysis

The zeta potential of liposome and nanoparticles was determined by using a zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Prior to the analysis, the samples were diluted with pure water in the ratio 1:10 in pure water. The diluted samples were then analyzed at a voltage of 4 mV.

X-Ray diffraction analysis

The materials were analyzed with a Shimadzu X-ray diffractometer XRD-6000 (SHIMADZU CORPORATION), scan of 2°. min^{-1} and 2θ from 5° to 55°, copper k-alpha radiation ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) 40mA of current and 40Kv voltage, for the observation of crystallinity-indicative peaks.

Spectroscopy evaluation in the infrared region with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Spectroscopy in the infrared region was carried out in tablets using 4mg of each sample and 196 mg of spectroscopic grade KBr powder (2% mass), with IR Prestige-21 equipment (Shimadzu Co.) 64 scans.min⁻¹, 4 cm⁻¹ resolution.

Determination of the presence of botulinum toxin in the polymer nanoparticles and liposomes

The determination of the presence of botulinum toxin Type A was carried out after the release of nanoparticles and liposomes. To obtain released botulinum toxin, nanoparticles and liposomes containing BoNT/A were weighed to obtain the exact amount of 0.018g and placed in 10mL of dissolution medium formed of phosphate buffer pH 6,8 (50 mmol.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 22,4 mmol.L⁻¹ de NaOH). The formulation was maintained at 37 °C ± 0,5 °C, under agitation of 75 rev.min⁻¹ for a total period of 24h. The solution was filtered with the aid of a syringe filter with pores of 0,22µm. Following this, an aliquot of the filtered sample was added to the KBr and the dry material in the oven at 37 °C. With the use of this material a tablet was prepared which was analyzed for FTIR in the analytical conditions described earlier.

Evaluation of the effects of botulinum toxin on the acetylcholin involved in the release of insulin, following the activation of the neurotransmitters

Animals

Male adult Wistar rats (weighing between 200 and 230g) were kept in the Vivarium of the Biology Dept, in collective cells under controlled temperature (23±2°C) and lighting (12-hour light-dark cycle). Water and food rations were supplied at random.

Isolation of Langerhans islets

The isolation of the islets was conducted through the destruction of the exocrine portion of the pancreas through the collagenase digestion where, after an incision of the abdominal wall of the Wistar rats to expose the pancreas, an occlusion was performed of the duodenal extremity of the pancreatic duct. Following

this, a Hank's solution containing collagenase Type V (1 mg.mL^{-1}) was injected in the hepatic portion of the same duct by means of a syringe connected to a cannula needle. After it was intumescent, the pancreas was removed and transferred to a plastic tube, with a stopper, containing 15 mL of Hank's solution.

After this, the tube was transferred to the water bath at 37°C for 20 minutes under oxygenation ($5\%\text{CO}_2/95\%\text{O}_2$). Later on, the tube was agitated manually for about 1 minute to ensure the dissolution of the pancreatic tissue which was filtered and transferred to a beaker. The exudate was submitted to repeated cleaning with Hank's solution in an ice bath to block the collagenase activity and purify the pancreatic islets of the exocrine tissue. The islets were then collected and placed under a magnifying glass with the aid of a pipette. After being isolated, the islets were separated into groups of 4 and transferred to the plates of a Costar Petri dish containing 24 wells.

Static insulin secretion

The islets were initially incubated at 37°C for one hour in Krebs-Ringer solution (1 mL) containing 5.6 mM of glucose. At the end of this period, the pre-incubation solution was replaced with 1mL of Krebs with 16.7 mM solution of glucose. The samples that had to be analyzed were added to this solution: 100 μL of the solution of the nanoparticles containing the BoNT/A (NTB), 100 μL of the solution of the liposomes containing BoNT/A (LIPOTB) and 100 μL of the BoNT/A. The incubation lasted for one hour at 37°C . When the incubation period was terminated, the plate was placed over the ice and with the aid of the magnifying glass the supernatant of each well was transferred to Eppendorf pipettes and stored at -20°C until the measurements of the insulin dosages were performed.

Insulin quantification

The insulin that was secreted was quantified by means of a sandwich-type immunoassay carried out in two places where there were direct chemoluminometric techniques which used constant amounts of two antibodies. The first antibody is a mouse monoclonal anti-insulin marked with ester of acridine. The second, in the solid phase, is a mouse monoclonal anti-insulin antibody which is bonded by the covalently to paramagnetic particles.

Statistical analysis

All the data were expressed as an average standard deviation. The statistical comparisons were used to evaluate the dosing of the insulin. ANOVA statistical analysis of insulin dose tests (Tukey test).

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of nanoparticulated materials containing BoNT/A

Optical microscopy

In the first stage of the formation of the nanoparticles, it was observed that there was a multiple emulsion (Figure 7). The formation of this emulsion is indispensable for the incorporation of hydrophilic remedies like botulinum toxin Type A^{16,17,18}.

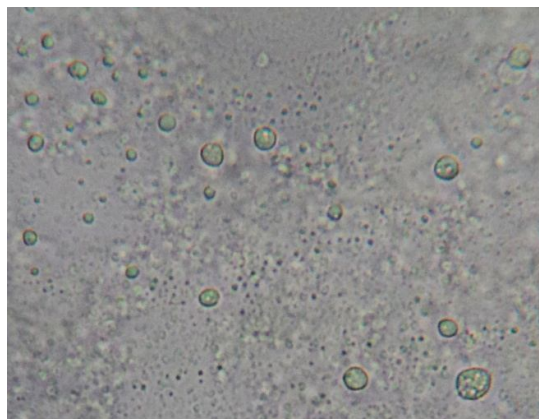


Figure 7 – Microscopy showing the formation of multiple emulsion in the preparatory process of the polymer nanoparticles

The formation of liposomes can also be determined by optical microscopy (Figure 8). The liposomes that are formed appear as concentric and non-concentric multimellar vesicles, which are the characteristics of liposomes obtained through the fine film technique¹⁹.



Figure 8 – Optical microscopy showing large formed multimellar vesicles

Morphological and surface analysis

The analysis carried out by AFM shows the nanoparticles containing BoNT/A (NTB) with a spherical shape and smooth and regular surface (Figure 9)

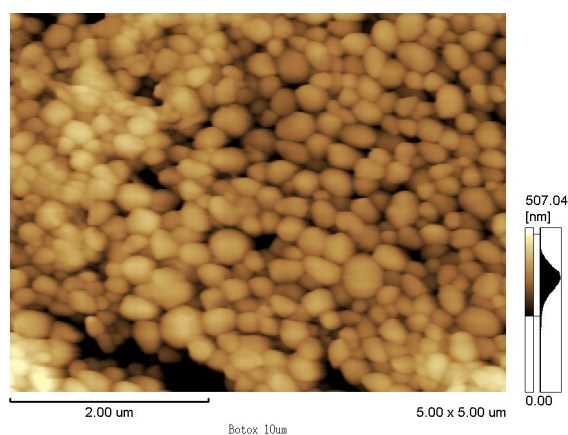


Figure 9 – A photomicrograph of the nanoparticles containing botulinum toxin A by MFA

Similar characteristics can be observed in the images obtained by MEV (Figure 10).

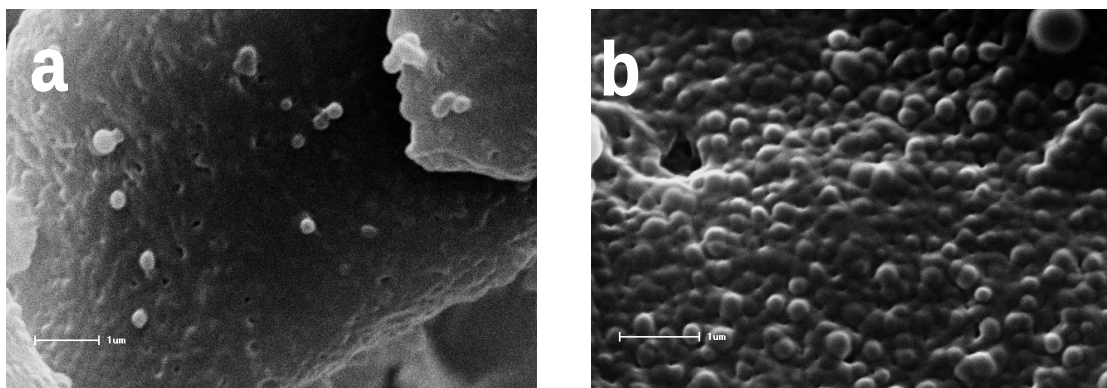


Figure 10 – Photomicrographs showing the morphological features of nanoparticles containing BoNT/A obtained by SEM, 15K.

The liposomes containing botulinum toxin Type A evaluated in AFM are shown in Figure 11. It can be seen that the vesicles that are formed have a spherical shape and regular surface, whereas the liposomes had heterogeneous sizes. This is probably due to the fact that in the formation of multilamellar vesicles both the number of lamellae and the shape can vary.

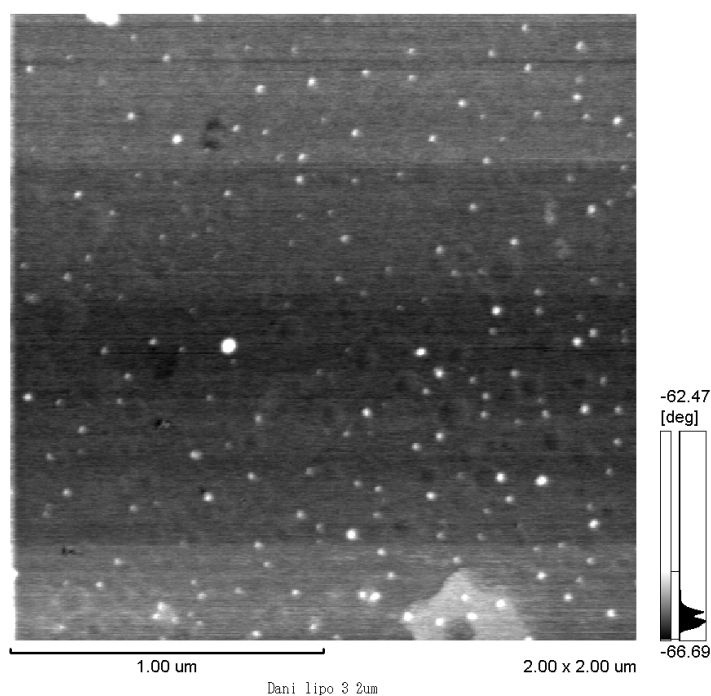


Figure 11 – Photomicrograph of the liposomes, obtained by AFM.

Determination of the average size, polydispersion and zeta potential

The nanoparticles loaded with botulinum toxin A had an average diameter of 578.4 nm. The graphical representation of the distribution of the sizes of the nanoparticles (Figure 12) shows a single population. The polydispersion index was 0.25, which suggests that there is a uniform distribution of the size of the particles and that this system is monodispersed.

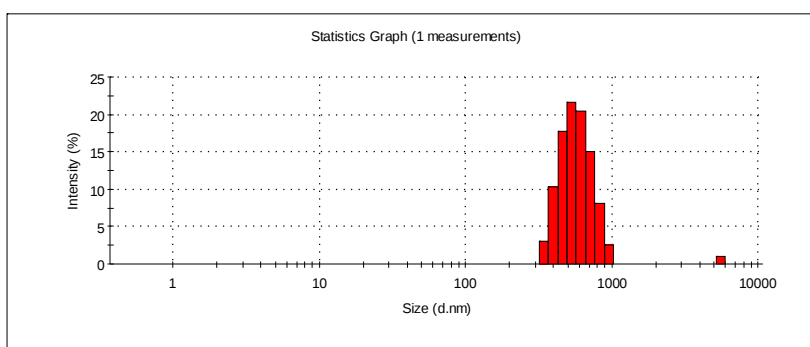


Figure 12 – Graphical representation of the nanoparticles containing BoNT/A (NTB)

The results obtained were similar to those found by Paese (2008)²⁰. These values show a uniform pattern in the distribution of the size of the particles that suggests a good level of suspension stability²¹. The results confirm the observations made about the analysis of the images carried out by SEM where homogeneous particles were observed. According to Bouchemal and collaborators (2004)²², the size of the particle recommended for use in topical formulations (both pharmaceutical and cosmetic) is lower than 600 nm, and as a result, the average diameter of the particles will be suitable for topical applications.

With regard to the liposomes, an average size of 1363 nm was observed and a polydispersion index of 0.57. Figure 13 shows the distribution of the size of the liposomes containing botulinum toxin Type A. Two sets of liposomes can be identified, which is also consistent with the optical microscopy images and the AFM (Figure 11).

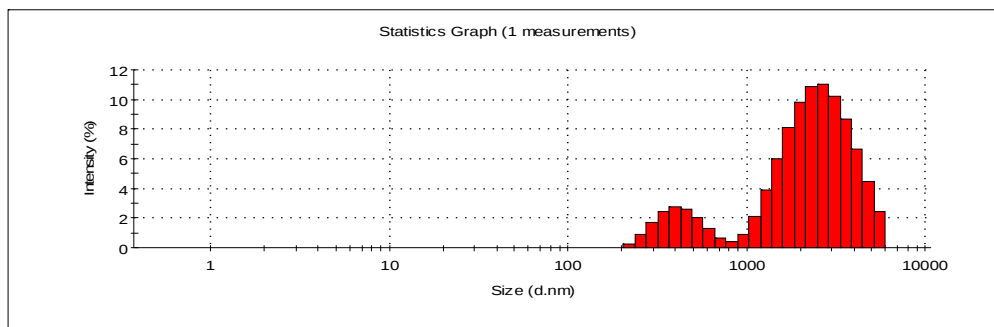


Figure 13 – Graphical representation of the size of the liposomes loaded with BoNT/A (LIPOTB)

The zeta potential of the nanoparticles loaded with BoNT/A (NTB) showed average values of -7.40 mV. The distribution of the zeta potential is represented in Figure 14. The negative values that are shown are caused by the presence of ester groups in the PCL^{18,22,23}. Lamprecht et al. (2001)²⁴ obtained similar results when working with the PCL nanoparticles. Singh et al. (2006)²⁵ used PVA in the preparation of the PCL nanoparticles and obtained a zeta potential of $-2,6 \pm 1,2$ mV.

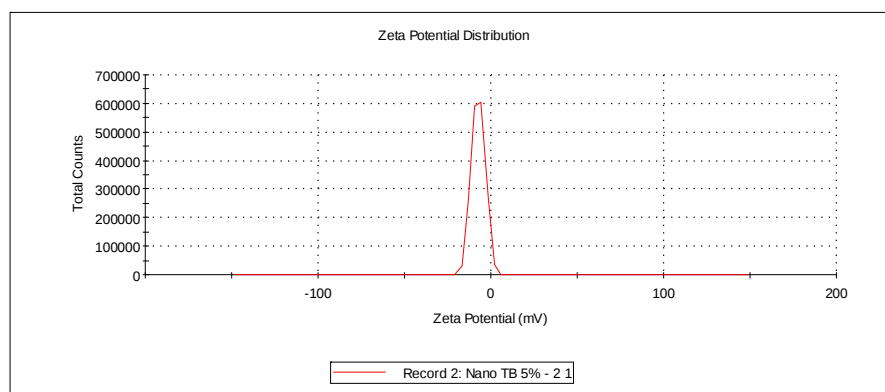


Figure 14 – Graphical representation of the zeta potential of the nanoparticles loaded with BoNT/A (NTB)

The liposomes containing botulinum toxin Type A (LIPOTB) showed average values of the zeta potential of -37.3 mV (Figure 15). This increased load found in the liposomes determines the degree of the repulsive force between the vesicles brings about stability and prevents the agglomeration of the particles²⁶.

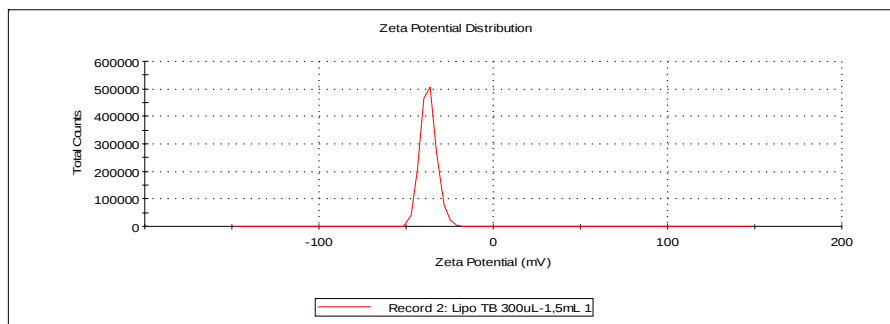


Figure 15 – Graphical representation of the zeta potential of the liposomes loaded with BoNT/A (LIPOTB).

Particles for cutaneous application with zeta potential (both negative and positive) are described in the literature ²⁷.

Characterization by X-ray diffraction

Figure 16 shows the results obtained by X-ray diffraction for the PCL, the nanoparticles containing botulinum toxin A (NTB) and the hollow nanoparticles (N0).

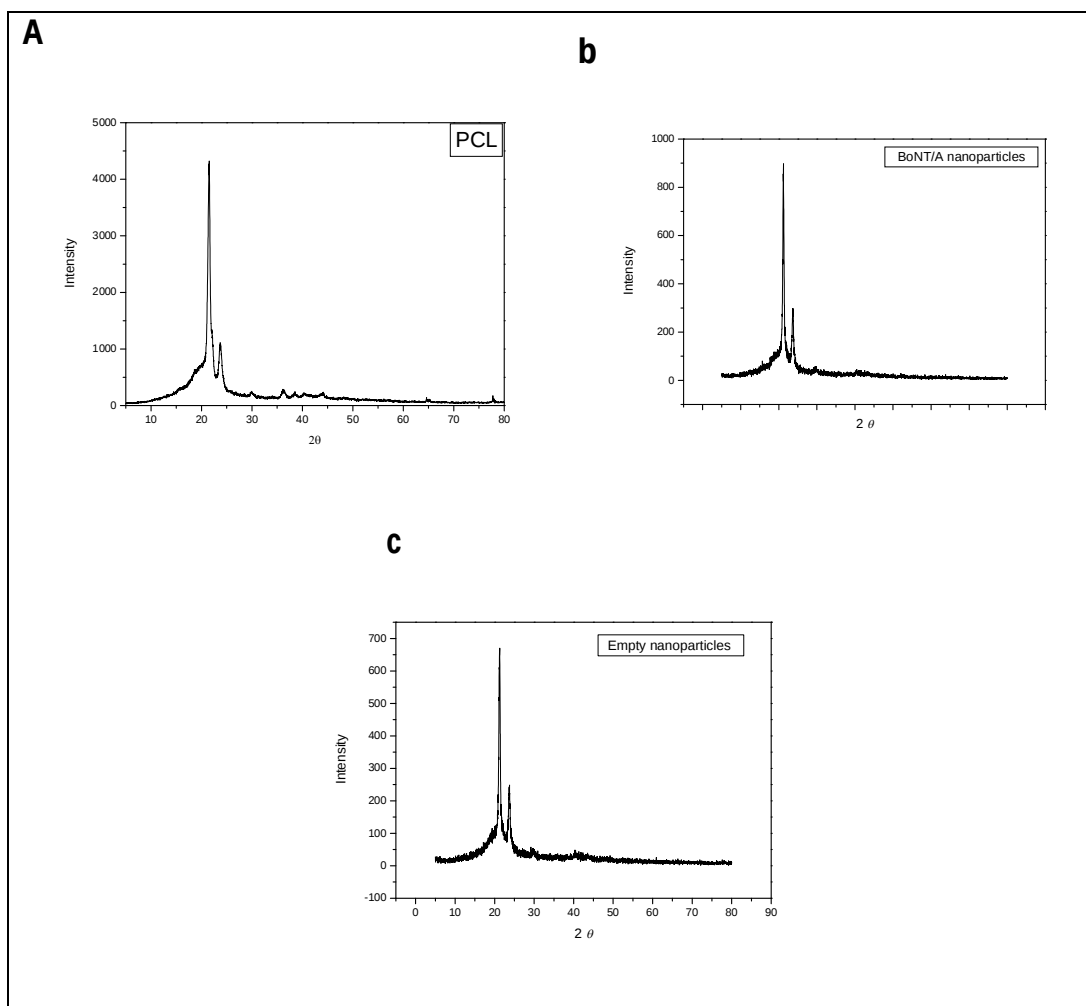


Figure 16 – X-ray diffractograms of the PCL(a) Nanoparticles containing botulinum toxin A – NTB (b) Empty nanoparticles – N0 (c).

The X-ray diffractogram of the hollow nanoparticles (N0) used as a negative control (Figure 16 c) shows a diffraction pattern for crystalline material similar to that of pure PCL and indicates that the main peaks are at (2θ) in $21,36^\circ$ and $23,57^\circ$ depending on the semicrystalline property of the polymer that is used, as already noted by Verger et al. (1998)²⁸ and Perez et al. (2000)²⁹.

The profiles of the crystalline diffraction of the nanoparticles containing botulinum toxin Type A were similar to the diffractogram of pure PCL. However, owing to the low concentration of the active agent, it is not possible to establish whether or not there exists a molecular dispersion³⁰.

Evaluation by spectroscopy in the FTIR region

The FTIR spectra of the nanoparticles that contain botulinum toxin type A (NTB), hollow nanoparticles (N0), botulinum toxin (TB) and released botulinum toxin A (TBL), are represented in Figure 17. The polycaprolactone spectrum showed a strong band of 1726 cm^{-1} corresponding to the vibration of the axial deformation of the C=O group and two bands at 2944 cm^{-1} and 2865 cm^{-1} which can be attributed to the stretching of the C-H groups^{30,31}. It can be noted further that the NTB and N0 spectra show the same bands as those of the PCL.

The TBL showed bands similar to those of BoNT/A and as well as this, did not show bands in the range of 2948 cm^{-1} and 2859 cm^{-1} which are present in the PCL and in the hollow nanoparticles (N0), which is a strong indication that the toxin was encapsulated in the nanoparticles.

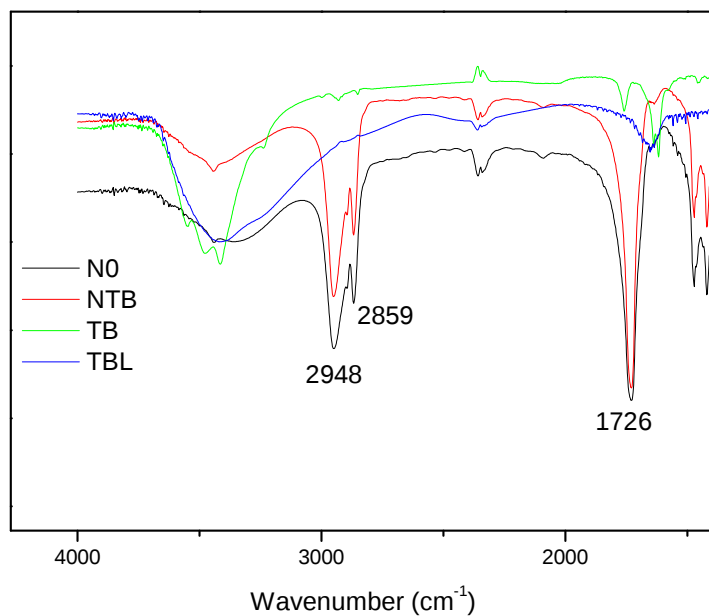


Figure 17 – FTIR spectra of the PCL; nanoparticles containing botulinum toxin A (NTB); empty nanoparticles (N0), botulinum toxin Type A (BoNT/A) and released botulinum toxin (TBL).

The spectrum of the liposomes containing botulinum toxin Type A (LIPOTB), hollow liposomes (L0), botulinum toxin Type A (BoNT/A) and botulinum toxin A

released from the liposomes (LIPOL) are represented in Figure 18. The cholesterol spectrum shows a wide band at 3250 cm^{-1} and 3500 cm^{-1} corresponding to the O-H vibration. The phosphatidylcholine shows two bands at 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} corresponding to CH_2 and CH_3 bonds. The C=O is represented at 1730 cm^{-1} the P=O bond is found to be 1088 cm^{-1} . It can be noted that within the spectra of the liposomes containing the BoNT/A and the hollow liposomes (Figure 18), they show bands that are characteristic of cholesterol and phosphatidylcholine as mentioned above.

The LIPOL showed bands similar to the bands of BoNT/A as well as not showing bands in the range of 2850 cm^{-1} and 2920 cm^{-1} which are present in the liposomes either containing BoNT/A or hollow.

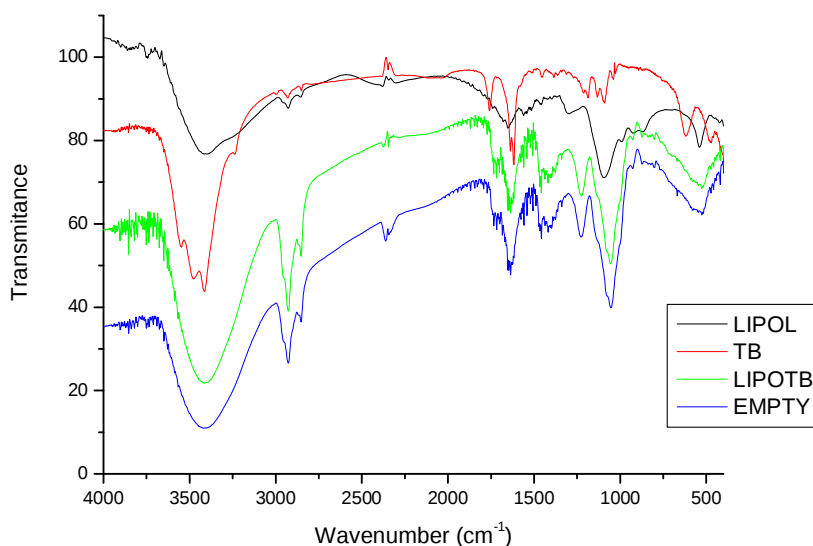


Figure 18 – FTIR spectra of the liposomes containing botulinum toxin A (LIPOTB), empty liposomes (empty-L0), botulinum toxin Type A (TB-BoNT/A) and released botulinum toxin (LIPOL).

Evaluation of the effects of botulinum toxin on the release of insulin as a result of the activation of the neurotransmitters

The results of the samples analyzed on the release of insulin are shown in Table 1. It was observed that the free botulinum toxin type A led to a greater release of insulin, followed by botulinum toxin type A encapsulated in liposomes (LIPOTB), whereas

lower accounts of insulin were observed in the samples that were incubated with the polymer nanoparticles that contained botulinum toxin Type A (NTB) and there was a negative control for the sample that consisted of glucose solution.

The botulinum toxin A encapsulated in liposomes, showed a significant difference when compared with the level of control and the botulinum toxin A encapsulated in nanoparticles. However, there was no significant difference when compared with botulinum toxin A (free). In contrast, the botulinum toxin encapsulated in nanoparticles showed a significant difference when compared with botulinum toxin A (free) but did not show any difference when compared with the negative control. These results suggest that the activity of the botulinum toxin type A is maintained after its encapsulation in liposomes but not when encapsulated in polymer nanoparticles. This fact can be attributed to the loss of botulinum toxin activity after the preparatory process.

Table 1 – Quantification of the insulin produced in islets of Langerhans after the incubation of the glucose solution produced by the free botulinum toxin and encapsulated in nanoparticles and liposomes.

Samples	Insulin (mU/mL)
Control (Glucose solution 16.7 mM)	15.9
Botulinum Toxin A encapsulated in nanoparticles	16.9
Botulinum Toxin A encapsulated in liposomes	381.2
Botulinum Toxin (free)	1078.2

CONCLUSION

The viability of producing polymer nanoparticles containing botulinum toxin Type A can be demonstrated by employing the multiple emulsion and solvent evaporation methods with a suitable size for application on the skin, although with a zeta potential that is below the expected values.

It was also possible to demonstrate that the formation of the multilamellar liposomes containing botulinum toxin Type A could be promising carriers of the botulinum toxin A.

Among the nanosystems that were developed, it can be noted that the liposomes had a better effect with regard to the release of insulin than that shown by the nanoparticles of botulinum toxin Type A.

References

1. Khavkin, J. & A. F. Ellis (2011) *Facial Plast Surg Clin North Am*, **19**:229-234.
2. Buck, D.W., M. Alam & Y.J.S. Kim (2009) *J Plast Reconstr Aes*, **62**: 11-18.
3. Batistela, A. M., M. Chorilli & R.G. Leonardi (2007), *Rev Bras Cienc Farm* **88**: 59-62.
4. Sposito, M.M.M. (2004) *Acta Fisiátrica*.
5. Blanes-Mira C., J. Clemente, G. Jodas, A. Gil, G. Fernandez-Ballester, B. Ponsati, L.Gutierrez, E. Perz-Paya & A. Ferrer-Montiel (2002) *Int J Cosmetic Sci*, **24**: 303-310.
6. Mahajan, S.T. & I. Brubaker (2007) *Am J Obstet Gynecol*, **196**: 7-15.
7. Gorouhi, F.& H. Maibach (2009) *Int J Cosmetic Sci*, **31**: 327-345.
8. Bruschi, M. “*Formulações tópicas contendo nanocápsulas de adapaleno: avaliação da estabilidade e permeação cutânea*” (2010), Santa Maria,RS.
9. Lasic, D.D. (1998) *Trends Biotechnol*, **16**: 307-321.
10. Tyagi, P., P.C. Wu, M.Chancellor, N. Yoshimura, I. Huang (2006) *Mol Pharmaceut*, **4**: 369-379.
11. Brigger, I., C. Dubernet & P. Couvreur (2002) *Adv Drugs Deliver Rev*, **54**: 631-651.
12. Pimentel, F. I.; J.T.A.Júnior, C.V. Mosqueira & Magalhaes-Santos (2007) *Braz J Pharm Sci*, **43**.
13. Feczko, T., J. Tóth & J. Gyenis (2007) *Colloids Surf A*.
14. Jiao, Y., N. Ubrich, M. Marchand-Avier, C. Vigneron, M. Hoffman, T. Lecompte & P. Maincent (2002) *Circulation*, **105**: 230-235.
15. Esteves, A.F. “*Lipossomas como modelos biomoleculares. Correlação entre coeficientes de partição (lipossoma/água e octanol) e actividade de compostos farmacologicamente activos*”. (2011) Fernando Pessoa University, Porto.
16. Couvreur, P. (2002) *Drug Carrier System*, **19**: 99-134.

17. Soppimath, S.H., M.T. Aminabhvi, R.A. Kulkarni & E.W. Rudzinski (2001) *J Control Release*, **70**: 1-20.
18. Schaffazick, S.R., S.S. Guterres, A.R. Pohlmann & L.C. Freitas (2003) *Quím Nova*, **26**: 726-737.
19. Batista, M.C., B.M.C. Carvalho & S.S.N. Magalhães (2007) *Rev Bras Cien Farm*, **43**: 167-179.
20. Paese, K (2008) “Desenvolvimento tecnológico, estudo de fotoestabilidade e avaliação da permeação cutânea in vitro da benzofenona-3 a partir das nanocápsulas poliméricas incorporadas em diferentes veículos semi-sólidos”., Curso de Pós-Graduação, UFRGS .
21. Gaumet, M., A. Vargas, R. Gurny & F. Delie (2008) *Eur J Pharm Biopharm*, **69**: 1-9.
22. Bouchemal, K., S. Briançon, E. Perrier & H. Fessi (2004) *Pharm Nanotech*, **280**: 241-251.
23. Müller, C. R., S.R. Schaffazick, A.R. Pohlmann, I. Freitas, N.P. Silveira, T. Dalla-Costa & S.S. Guterres (2001) *Pharmazie*, **56**: 864–867.
24. Lamprecht, A., N. Ubrich, H. Yamamoto, U. Schafer, H. Takeuchi, C.M. Lehr, P. Maincent & Y. Kawashima (2001) *J Control Release*, **71**: 297 – 306.
25. Singh, J., S. Pandit, V.W. Bramwell & H.O. Alpar (2006) *Methods*, **38**: 96–105.
26. Sengodan, T., B. Sunil, R. Vaishali & R.J. Chandra (2009) *Int J Pharm Tech Res*, **1**: 517-523.
27. Kulkamp, C.I., K. Paese, S.S. Gutierrez & A. R. Pohlman (2009) *Quím Nova*, **32**: 2078-2084.
28. Verger, M.L., I. Fluckiger, Y. Kim, M. Hoffman & P. Maincent (1998) *Eur J Pharm Biopharm*, **46**: 137 – 143.
29. Perez, M.H., C. Zinutti, A. Lamprecht, N. Ubrich, A. Astier, M. Hoffman, R. Bodmeier & P. Maincent (2000) *J Control Release*, **65**: 429 – 438.
30. Lima, F.F. & T.C. Andrade (2012) *Quím Nova*, **15**: 1-6.
31. Poletto, S.F., E. Jager, I. Cruz, A.R. Pohlmann & S.S. Guterres (2008) *Mater Sci Eng*, **28**: 472–478.

6 CAPÍTULO 2

LIPOSOMES CONTAINING ACETYL HEXAPEPTIDE-3 (ARGIRELINE): PREPARATION AND EVALUATION OF SKIN PERMEATION

Este artigo apresenta o desenvolvimento e a caracterização de lipossomas contendo o acetil hexapeptídeo-3. Os lipossomas produzidos foram analisados por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Outros fatores importantes avaliados foram o índice de polidispersão, a determinação do tamanho médio das partículas e o potencial zeta dos lipossomas.

Um dos pontos mais inovadores deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de um método espectrométrico para a quantificação do acetil hexapeptídeo-3. Este método foi, posteriormente, empregado para a determinação da eficiência de encapsulação do acetil hexapeptídeo-3 nos lipossomas, bem como no estudo de permeação cutânea *in vitro* do acetil hexapeptídeo livre e encapsulado.

Este artigo foi submetido à *International Journal of Cosmetic Science*.

**LIPOSOMES CONTAINING ACETYL HEXAPEPTIDE-3 (ARGIRELINE):
PREPARATION AND EVALUATION OF SKIN PERMEATION**

**Cynthia Matoso de Oliveira¹, Daniele Priscila da Silva Fardin de Assunção¹
Paulo Vitor Farago¹, Josiane Padilha de Paula¹**

¹ *State University of Ponta Grossa, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Science, 4748, Carlos Cavalcanti Ave., Zip Code 84030-900, Ponta Grossa, Paraná, Brazil. Fax: +55 42 42203300.*

[*jopadilha@terra.com.br](mailto:jopadilha@terra.com.br)

Synopsis

Acetyl-Hexapeptide-3 (Argireline®) is a synthetic neuropeptide that reduces lines and wrinkles by relieving the intensity of facial muscle contraction and relaxing facial tension, in a way that acts on the neuromuscular junction. Its large molecular size and hydrophilic character determines its poor diffusivity through the lipophilic stratum corneum. As an alternative to minimize this problem, liposomes are employed as cosmetics and cosmeceutical applications due to their ability to convey actives into the skin and increase their bioavailability. In the light of this, the aim of this work was prepare, characterize and assess the skin permeation of liposomes containing acetyl-hexapeptide-3 (Argireline®). Multilamellar liposomes were prepared by the thin film hydration method. A simple and efficient method was developed and validated for the quantification of HP-3 (Argireline®). 96.7% of the active were encapsulated into liposome. The vesicles showed a zeta potential of - 31 mV. The results demonstrated that the free Argireline® had good skin permeation and its encapsulation into liposomes did not affect the rate of permeation through the skin.

Keywords

Argireline, liposome, acetyl hexapeptide-3, penetration, skin barrier, spectroscopy.

Introduction

The appearance of wrinkles is the most significant sign of aging skin, and is a common complaint among the elderly population. This complex process is the result of biochemical changes, which are histological and physiological and may be aggravated by exposure to environmental and other secondary factors, such as repetitive facial movements caused by the contraction of the facial muscles [1, 2].

These wrinkles appear as expression lines which are caused by muscular contraction and do not disappear when stretched [3]. Currently, facial rejuvenation is becoming very popular. The development of new actives for cosmetics applications, such as acetyl-Hexapeptide-3 (Argireline®), is an example of a non-invasive cosmeceutical used for this purpose.

Acetyl-Hexapeptide-3 (Argireline®) is a synthetic neuropeptide containing glutamic acid, arginine and methionine residues that reduces lines and wrinkles by relieving facial muscle contraction and relaxing facial tension with regular use by mimicing the effects of *Botulinum* toxin. This neuropeptide acts on the neuromuscular junction at the SNARE complex (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) [4].

The permeation of molecules through the skin depends on a number of factors, including size and the number of hydrogen bonding groups in a molecule. Peptides have a large molecular size and are very hydrophilic. They are always charged at the skin physiological pH, this fact determines its poor diffusivity through the lipophilic stratum corneum, the main barrier to skin penetration [5]. As an alternative means of tackling this problem, liposomes are used in cosmetic and cosmeceutical applications because of their ability to convey actives into the skin and increase their bioavailability. In view of this, the aim of this study was prepare, characterize the liposomes, as well as to evaluate the skin permeation of liposomes containing acetyl-hexapeptide-3 (Argireline®).

Materials and methods

Reagents and chemicals

L- α -Phosphatidylcholine $\geq 99\%$ from egg yolk, and cholesterol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); acetyl hexapeptide-3 sol. 0.05% (Argireline[®]) was obtained from Galena (Campinas, SP, BR). Other reagents and solvents were of analytical grade.

Preparation of HP3-loaded liposomes

Multilamellar liposomes were prepared according to Esteves (2011) [6] by the thin film hydration method. Briefly, L- α -Phosphatidylcholine (PC) 0.192 g and cholesterol (CH) (0.060 g) were dissolved in chloroform. The hydrophobic mixture was deposited as a thin film in a round-bottom flask by rota-evaporating the chloroform under vacuum, at 40°C in a temperature-controlled water bath for a period of 2 h to ensure complete removal of traces of solvent. Hydration of the film was performed by adding 10 mL of aqueous solution of acetyl hexapeptide-3 (HP3) (Argireline[®]) to the flask. The dispersion was mechanically shaken for 1 h at 25°C. The liposomes remained refrigerated at 4°C overnight. Following this, the vesicles were lyophilized and stored in a desiccator under vacuum at room temperature.

Characterization of the liposomes

Assessment of optical microscopy

Liposomes were characterized by optical microscopy (Nikon Eclipse E200) at 400 $\times$ magnification for estimation of the vesicle formation and morphology. Optical micrographs were obtained with a Nikon camera coupled.

Scanning electron microscopy (SEM)

The samples were coated with a thin layer of gold by sputtering, using a Pelco 9100 sputter coater (Pelco, Clovis, CA, USA) and analyzed with the aid of a scanning electron microscope (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) at an intensity of 10 kV, by means of various magnifications.

Zeta potential analysis

The zeta potential of the liposomes was measured using a zetasizer Nano series nano-ZS90 (Malvern, UK). Prior to the analysis, the samples were diluted 1/10 in purified water. The diluted samples were then analyzed with a voltage of 4 mV.

Quantification of HP-3

Validation of method for quantification of HP-3

The method was validated according to the guidelines set on the International Conference on Harmonization (ICH) [7] for the validation of analytical procedures. The parameters which were used to validate the method were linearity, precision, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ). The linearity was assessed in the range of ng.mL⁻¹. Ten different concentration solutions (100 to 10,000 ng.mL⁻¹) were obtained exactly and the UV measured at 260 nm. The linearity was evaluated by calculating the correlation coefficient obtained from the linear regression analysis. The repeatability of the analytical method was assessed by assaying six sample HP-3 (Argireline®) solutions on the same day under the same experimental conditions. The intermediate precision was evaluated by analyzing the solutions on three different days. The absorbance was determined and compared and the precision was expressed as a relative standard deviation percentage (%CV).

Entrapment Efficiency (%EE of HP-3 loaded liposomes)

The entrapment efficiency of HP-3 loaded liposomes (% EE) was performed by a UV-VIS spectrophotometer, using the method that had been previously validated. The samples of HP-3-loaded liposomes were filtered with the aid of a syringe filter, 0.45 µm pore size (Nalgene® Syringe Filters PTFE) and the absorbance of free HP-3 was measured by UV-VIS at 260nm. The experiments were conducted in triplicate (n=3) and the entrapment efficiency was calculated by the following equation.

$$\% EE = \frac{\text{Mass of HP3 free} \times \text{theoretical mass of HP3}}{\text{theoretical mass of HP3}} \times 100$$

In Vitro Skin Permeation Study

Human skin was used as a model membrane for the skin permeation study. The skin samples were placed between the two compartments of the vertical diffusion chamber, with the epidermal side facing upwards and the dermal side facing downwards. The receptor chamber was filled with 0.1M PBS (pH 7.4) and stirred at 700 rpm with a teflon magnetic bar. The acceptor fluid was stirred magnetically at a

speed of 700 rpm and the assembled apparatus was adjusted and maintained at 37.0 °C (± 0.5 °C).

A 1 mL aliquot was withdrawn at time intervals of 2, 4, 8, 12 and, 24 h and the same volume was added back into the chamber receptor. The concentration of free HP-3 was analyzed by UV-VIS spectroscopy at 260 nm, as described earlier.

Results and discussion

Characterization of liposomes

As shown in Fig. 1, the morphological aspects of liposome containing HP-3 (Argireline[®]) in the light microscope appeared as a large multilamellar and spherical shape and heterogeneous size.

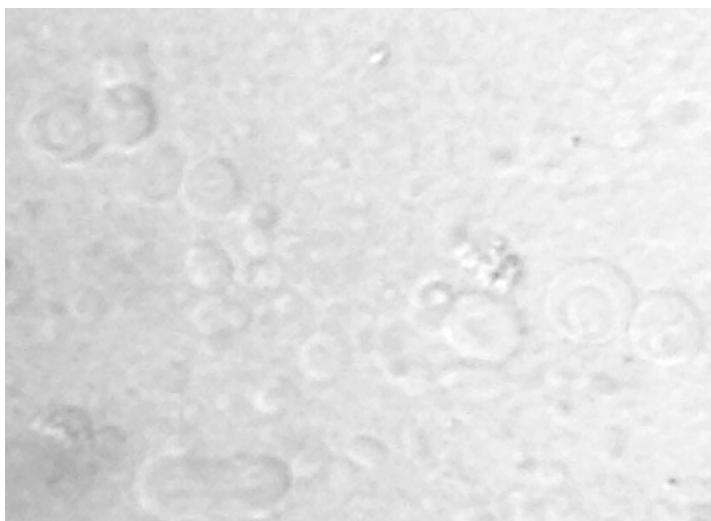


Figure 1 – Large multilamellar vesicle with heterogeneous size. Optical microscopy (400X).

Fig. 2 also shows spherical vesicles, although they are smaller than those displayed in the light microscopy. This difference can be explained by the lyophilization process that was carried out in preparing the sample for the SEM. This procedure removes water from the sample and results in a reduction of the size of the liposomes. Moreover, this is an important procedure to improve the stability of the liposomes [8].

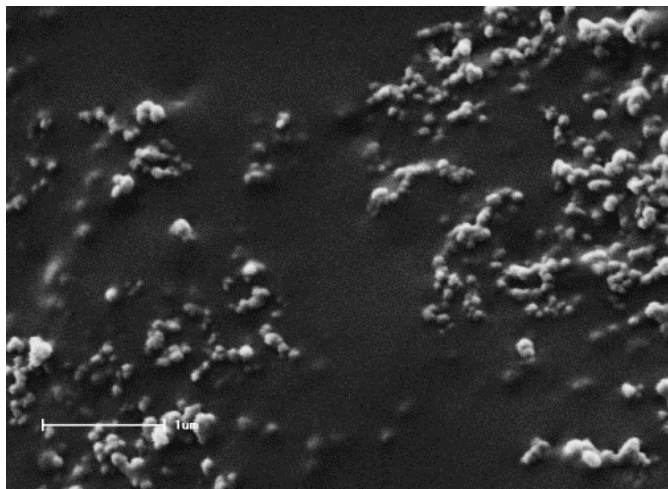


Figure 2 – Scanning electron microscopy showing spherical-shaped liposomes (18 K).

Validation of method for quantification of HP-3

A method was developed and validated to HP-3 (Argireline) quantification. Regarding to validation parameters, the linearity (Fig. 3) results on the $y = 0.0001x + 0.0004$ as a regression equation for the HP-3 determination. The Pearson correlation coefficient (r) of $= 0.9998$ was obtained as a mean value for the three plotted analytical curves. The calculated values of 380,16 and 1.150,0 ng.mL^{-1} were verified for the detection and quantification limits, respectively. The results of repeatability and intermediate precision were 3.9 % (100%) and 1.5 %, which is in accordance with the literature where less than 5 % is required [9].

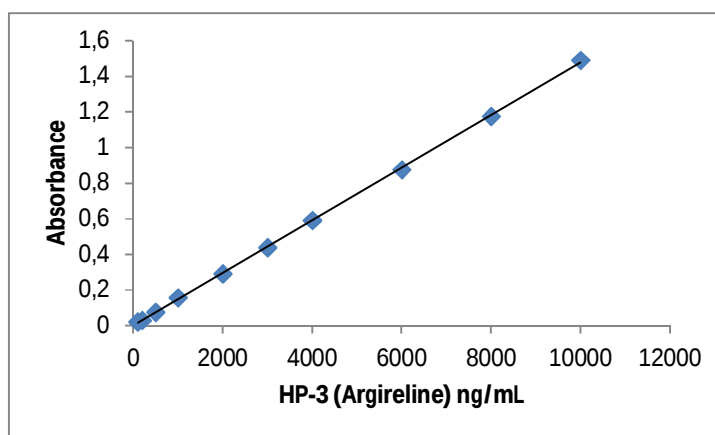


Figure 3 – Analytical curve HP-3

Entrapment Efficiency

The liposome HP-3 (Argireline) showed a drug content of 96.7 %; this result is in accordance with the results found for hydrophilic drugs encapsulated in aqueous systems that are usually around 95% [8]. This could be explained by the large volume of aqueous MLV [10,11].

In Vitro Skin Permeation Study

The skin permeation study indicated that there was a similar permeation for both free and encapsulated HP-3 (Argireline®). As shown in Table I, there was not a significant difference between the percentage rates of permeation at the time when it was tested.

Table I – Skin permeation of Free HP-3 and HP-3 loaded liposome

Time (h)	Skin Permeation (%)	
	Free HP-3	HP-3 –loaded Liposome
2	7.8	7.3
4	7.8	7.2
8	12.0	10.4
12	16.6	12.5
24	22.6	25.2

Although it is a peptide, the results indicated that HP-3 (Argireline) can penetrate the skin in the same way as the loaded liposome. This may have been due to the size and zeta potential of the liposomes vesicles. However, the encapsulation of peptides in liposomes can ensure a longer half-life by protecting them from degradation and by releasing the peptide at a slower rate [12].

Determination of the zeta Potential of the liposomes

The liposomes showed a zeta value of -31 mv (Fig. 4) and zeta deviation of 6,8 mv, that indicates a good stability of formulation. The Zeta Potential is one of the important factors affecting (Argireline®) the stability of liposomes, incorporation efficiency and interactions with the biological system [13].

The surface properties of liposome formulations depend on the composition of the phospholipid. Phosphatidylcholine was the phospholipid used to prepare the liposome; this lecithin which is obtained from either egg or soya, usually results in a negative zeta potential [14].

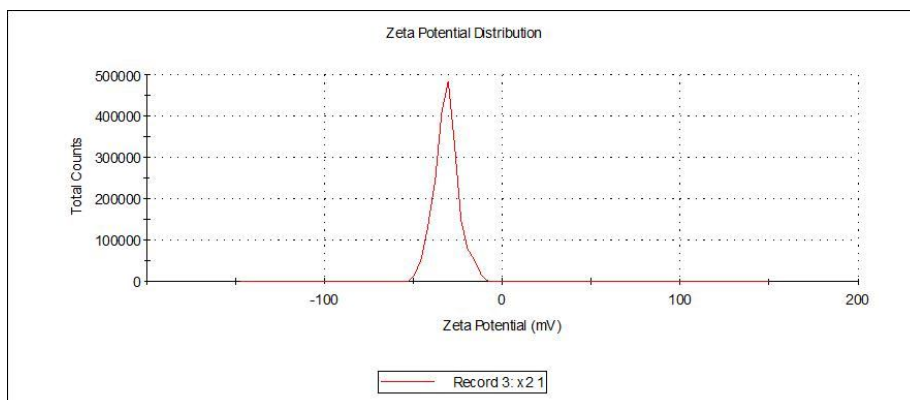


Figure 4 – The Zeta potential of liposome containing Argireline.

Conclusion

The acetyl hexapeptide-3 (Argireline®) was successfully encapsulated into liposome. A simple and efficient method was developed and validated to quantify HP-3 (Argireline®). The results demonstrated that the free Argireline® had good skin permeation and its encapsulation into liposome did not affect the rate of permeation through the skin.

References

1. Miyamoto, K, Inoue, Y, Hsueh, K, Liang, Z, Yan X, Yoshii, T, Furue, M. Characterization of comprehensive appearances of skin ageing: an 11-year longitudinal study on facial skin ageing in japanese females at akita. *J Dermatol Sci.* 64, 229–236 (2011).
2. Batistela, AM, Chorilli, M, Leonardi, RG. Approach to the process knowledge of skin aging among different ethnics. *Rev. Bras. Farm.* 88, 59-62 (2007).

3. Kligman, AM, Zheng, P, Lavker, RM. The anatomy and pathogenesis of wrinkles. *Br. J. Dermatol.* 113, 37–42 (1985).
4. Blanes-Mira, C, Clemente, L, Jodas, L, Gil, A, Fernández-Ballester, G, Pérez-Payá, E, Ponsati, B, Gutiérrez, L, e Ferrer-montiel A. A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. *Int J Cosmet Sci*, 24,303-310 (2002).
5. Gorouhi, F. & Maibach, H. I. Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *Int. J Cosmet Sci.* 31, 327-345 (2009).
6. Esteves, A.F. Lipossomas como modelos biomoleculares. Correlação entre coeficientes de partição (lipossoma/água e octanol) e actividade de compostos farmacologicamente activos. thesis. Fernando Pessoa University, Porto, 2011.
7. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: text and methodology, ICH, London (1996).
8. Chen, C.; Han, D.; Cai,C.; Tang, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. *J Control Release* 142, 299–311 (2010).
9. Zhong, H, Deng, Y, Wang, X, Yang, B. Multivesicular liposome formulation for the sustained delivery of breviscapine. *Int J Pharm.* 14, 301,15–24 (2005).
10. Ye et al. DepoFoam technology: a vehicle for controlled delivery of protein and peptide drugs. *J Control Release.* 64, 155-66 (2000).
11. Langston, M.V., Rampresad, M.P., Karali, T.T., Galluppi, G.R., Katre, N.V. Modulation of sustained delivery of myelopoietin (Leridistim) encapsulated in multivesicular liposomes (DepoFoam). *J Control Release.* 89, 87-99 (2003).
12. Jorgensen L., Moeller EH., van de Weert, Nielsen HM., Frokjaer S. Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *Eur J Pharm Sci.* 29, 174–182 (2006).
13. Labhasetwar V, Mohan, MS, Dorle AK. A study on zeta potencial and dielectric Constant of lipossomes. *J Microencapsul.* 11, 663-668 (1994).
14. Benita, S.; Levy, M.Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *J Pharm Sci.* 82, 1069-1079 (1993).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande procura por produtos antienvelhecimento, aliados à nanotecnologia, impulsiona o desenvolvimento de novos produtos, garantindo, cada vez mais, sua maior eficiência e menor desconforto ao paciente e melhores resultados.

Os nanossistemas desenvolvidos neste trabalho contendo o acetil hexapeptídeo-3 e a toxina botulínica tipo A são produtos inovadores e os resultados obtidos demonstraram que podem ser promissores para uso na indústria cosmética.

Os lipossomas comparando-se às nanopartículas apresentaram menor custo e tempo de preparo, sendo uma excelente alternativa de encapsulação desses ativos.

É importante ressaltar a necessidade da continuidade da pesquisa com esses ativos, pois são produtos de primeira escolha utilizados na prevenção de rugas e sinais de expressão.