UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e avaliação de composições precursoras de filmes formados in situ contendo anestésico para tratamento de infecções por *Herpes simplex*

Amanda Cristina Funari Silva

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento e avaliação de composições precursoras de filmes formados in situ contendo anestésico para tratamento de infecções por *Herpes simplex*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 23/03/2018 para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Amanda Cristina Funari Silva

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 23/03/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

SILVA, A.C.F.	Desenvolvimento e avaliação de composições precursoras de filmes formados in situ contendo anestésico para tratamento de infecções por *Herpes simplex*		MESTRADO FCFRP USP 2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO.

Silva, Amanda Cristina Funari.
Desenvolvimento e avaliação de composições precursoras de filmes formados in situ contendo anestésico para tratamento de infecções por *Herpes simplex*
89 p.; 30cm.
Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP
Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Freitas, Osvaldo de.

1. Anestésicos. 2. Herpes. 3. Virucida. 4. Permeação
5. Lidocaína. 6. Prilocaína

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Amanda Cristina Funari Silva
Título do trabalho: Desenvolvimento e avaliação de composições precursoras de filmes formados in situ contendo anestésico para tratamento de infecções por *Herpes simplex*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr._____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr._____
Instituição:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

A todos os pacientes que contribuíram, ainda que indiretamente, sendo a minha principal fonte de encorajamento para que esse estudo pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTOS

Em uma sociedade de jovens insatisfeitos com seus trabalhos, agradeço a Deus pela oportunidade de trabalhar com o que me faz genuinamente feliz.

Aos meus pais por serem meu norte e maiores incentivadores.

Ao meu irmão, pelas sempre sensatas opiniões e parceria.

À minha vó Aurora, por garantir que, a cada retorno para casa, eu possa desfrutar do seu abraço.

Ao Vitor por incentivar a minha melhor versão, como profissional e ser humano.

Ao Professor Osvaldo de Freitas, pela oportunidade, confiança e boa convivência nos últimos anos. Agradeço por sua orientação, que foi essencial para meu amadurecimento pessoal e acadêmico. Sua forma de enxergar a individualidade de cada aluno e, acima de tudo, respeitá-la, fez a diferença neste processo de aprendizado e formação.

Ao professor Vinícius Pedrazzi, por compartilhar sua experiência.

Aos professores, Leonardo Pereira, Marcos Bruschi e Renata Lopez pela avaliação e sugestões construtivas no exame de qualificação.

A professora Tânia Nakamura pelo auxílio nos experimentos biológicos.

A professora Cristiane Gaitani por abrir seu laboratório para os experimentos analíticos iniciais.

À Maíra, pela amizade, incentivo e presença dentro e fora do laboratório. Pelas sempre ricas discussões e boas ideias para que esse trabalho fosse concluído.

À Maria Paula, pela amizade e exemplo profissional.

À Taís, pela amizade construída no início desse projeto.

À Érica, pela dedicação e paciência em me auxiliar nessa parceria.

À Fer pela ajuda nos experimentos de revalidação analítica.

Ao Zé, Cristina, Mariana e à Patrícia, pela disposição em me auxiliar.

Aos amigos da pós graduação, em especial, Hugo Favacho, Luciana Dalmolin, Camila Cubayachi, e Carol Bonjovanni pela troca de experiências.

À todos os pacientes que participaram do estudo clínico, obrigada pela confiança depositada em nossa equipe.

À FCFRP, ao programa de pós graduação e a todos os colaboradores.

Ao CNPq (Processo 406500/2016-9) e à FAPESP (2015/26138-4) pelo suporte financeiro.

“Sucesso não é o final, fracasso não é fatal: a coragem para continuar é o que importa.”

Winston Churchill

RESUMO

SILVA, A. C. F.. **Desenvolvimento e avaliação de composições precursoras de filmes formados in situ contendo anestésico para tratamento de infecções por *Herpes simplex*.** 89f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As infecções causadas pelo *Herpes simplex virus*, tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) são consideradas problema de saúde pública no mundo, com prevalência em dois terços da população mundial. A doença é caracterizada pelo aparecimento de vesículas que ocasionam dor e constrangimento ao portador, devido à aparência desagradável que apresentam. As infecções que levam a lesões orofaciais são geralmente ocasionadas pelo HSV-1, enquanto as genitais, pelo HSV-2. O tratamento de escolha baseia-se no uso de antivirais em géis ou pomadas, entretanto, recidivas são comuns e dependentes do estado imunológico do indivíduo, além de exposição a fatores hormonais ou ambientais. Os anestésicos locais diminuem a dor ocasionada pela lesão além de mostrarem ter propriedades antivirais. A forma semissólida facilita a aplicação e a sua transformação em uma película fina, após curto período de tempo, favorece a manutenção da formulação no local, com aspecto final mais discreto quando comparada às opções disponíveis. O objetivo desse trabalho foi desenvolver e avaliar in vitro e in vivo formulações contendo anestésicos para o tratamento do herpes labial. Para tanto, duas formulações semissólidas formadoras de filme foram desenvolvidas e avaliadas (F1 e F1T), contendo HPMC K100, lidocaína (LIDO) e prilocaína (PRILO) combinados a adjuvantes, na presença (F1T) ou não (F1) do promotor de absorção Transcutol®. A mistura de PRILO e LIDO acarretou na formação de uma mistura eutética (ME). Para quantificação dos fármacos a partir da formulação, um método analítico por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foi revalidado e atendeu aos parâmetros preconizados na literatura. A recuperação dos fármacos a partir da pele suína foi satisfatória. As formulações apresentaram homogeneidade na distribuição do conteúdo. A formação do filme in situ foi avaliada e ocorreu em aproximadamente 20 minutos. A adição do promotor de absorção aumentou a concentração dos fármacos no líquido receptor no experimento de permeação passiva in vitro, utilizando pele de orelha suína. E a quantidade de PRILO e LIDO quantificada no estrato córneo foi maior para a formulação sem o Transcutol®. As análises reológicas de cisalhamento contínuo e oscilatório classificaram as formulações como fluídos newtonianos e a F1T apresentou maior estruturação em relação a F1. A avaliação in vitro da multiplicação viral sugere atividade virucida para ambos os fármacos, com proteção a infecção superior a 80% para as concentrações de fármaco avaliadas. As formulações não apresentaram irritação dérmica ao exame macroscópico. O teste in vivo de eficácia comprovou a capacidade dos anestésicos em regredir as lesões causadas por HSV-1. Sendo assim, as formulações propostas mostraram-se boas alternativas ao tratamento de lesões labiais causadas pelo HSV-1. Análises estatísticas adequadas foram realizadas.

Palavras-chave: anestésicos, HSV, herpes labial, formulação semissólida

ABSTRACT

SILVA, A. C. F. **Development and evaluation of film forming compositions for the treatment of Herpes vírus infections. 89p.** Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Science of Ribeirao Preto. University of São Paulo, Ribeirao Preto, 2018.

Infections by *Herpes Simplex virus*, type 1 and 2 (HSV 1 e HSV-2) are a public health problem in the world with prevalence of two thirds of the mundial population. This disease is characterized by painful vesicles and embarrassment because of wound appearance. Orofacial wounds are mostly caused by HSV-1 and genital wounds are by HSV-2. Nowadays, current treatment is based on the use of antiviral in cream and ointments but, recurrences are very common and depend of individual state of immunological system besides environmental factors. Topical anesthetics minimize the pain and have shown antiviral properties. The semisolid composition improves application and its transformation into a thin film, after a short period of time, favors the maintenance at the site with good final aspect compared to the currently available treatment options. In this research, we developed and evaluated in vitro and in vivo compositions containing topical anesthetics for treatment of labials herpes. The compositions were prepared using HPMC K100, lidocaine (LIDO) and prilocaine (PRILO) combined with adjuvants, with permeation promoter Transcutol® (F1T) or not (F1). The mix of PRILO and LIDO results in eutectic mixture. For quantified drugs in compositions an analytical method by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) was revalidated with satisfactory parameters, as well the recovery of drug on porcine skin. The formulations were with homogeneous content and film formation occurs in approximately 20 minutes. The addition of Transcutol® results in more PRILO and LIDO in receptor medium for F1T at in vitro passive permeation study. The quantify of drugs in corneum layer is mayor in F1 than F1T. Rheological analyses shown the compositions are newtonians fluids and F1T has more cohesion than F1. Evaluation of in vitro viral multiplication suggests activity before virus infects host cells, with 80% of protection of infection for evaluated concentrations. None composition shown dermal irritation in macroscopical examination. The in vivo efficacy study proves the anesthetics capacity of regress the HSV-1 wounds. Therefore, the developed compositions are good alternatives for labialis herpes caused by HSV-1.

Keywords: anesthetics, HSV, labialis herpes, semisolid composition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática do HSV. 3

Figura 2: Sistema esquemático do ciclo de vida do HSV. 4

Figura 3: Manifestações clínicas presentes no período prodrômico. 5

Figura 4: Manifestação clínica no período clinicamente ativo. 6

Figura 5: Processo de cicatrização de lesão herpética. 6

Figura 6: Estrutura da pele. 8

Figura 7: Vias de permeação de substâncias na pele. 9

Figura 8: Célula de difusão vertical encamisada; **A:** saída de água; **B:** entrada de água; **C:** coleta de alíquotas; **D:** compartimento doador; **E:** compartimento receptor. 15

Figura 9: Fragmento de pele dermatomizada após a retirada da formulação remanescente. 18

Figura 10: (I) Filme formado após 1h **(II)** Representação esquemática do método de tape stripping. 19

Figura 11: (I) Aparato para a realização do experimento; **(II)** Experimento em execução. 20

Figura 12: Cromatogramas **(I)** Prilocaína; **(II)** Lidocaína; **(III)** Prilocaína e Lidocaína; **(IV)** Amostra extraída do homogeneizado da pele dermatomizada **(V)** Formulação inerte, detecção em 203nm. 28

Figura 13: Curvas analíticas para prilocaína e lidocaína em fase móvel e meio de liberação. . 29

Figura 14: Curvas analíticas de prilocaína e lidocaína. 30

Figura 15: Gráficos de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica. 32

Figura 16: Estruturas químicas da lidocaína **(I)** e prilocaína **(II)** nas formas base. 37

Figura 17: Perfil de liberação in vitro dos fármacos a partir formulação (F1), em solução salina, pH=7,0 a 25°C. 40

Figura 18: Perfil de liberação in vitro dos fármacos a partir de F1 em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37°C ± 2°C. 41

Figura 19: Comparação entre perfis de liberação in vitro dos fármacos a partir da formulação (F1) e da formulação contendo Transcutol®, em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37ºC. 42

Figura 20: Comparação entre perfis de liberação *in vitro* dos fármacos a partir da formulação (F1) e da formulação contendo Transcutol®, em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37ºC, durante 24h. 43

Figura 21: (I) Formulação semissólida (F1) t=0, **(II)** Filme após aplicação de F1 t=60 min... 44

Figura 22: Quantidade (mg) de prilocaína e lidocaína remanescentes nos filmes formados no braço de voluntários..... 45

Figura 23: (I) Concentração dos fármacos quantificados no líquido receptor; **(II)** Concentração dos fármacos retidos na pele ao final de 1h de experimento. 46

Figura 24: (I) Quantidade de prilocaína remanescente no filme e quantificada no EC e pele; **(II)** Quantidade de lidocaína remanescente no filme e quantificada no EC e pele. 48

Figura 25: Reograma de fluxo das formulações a 25ºC. 49

Figura 26: Reogramas para as formulações FInerte (FI), FL, FP e F1 51

Figura 27: Reograma para a F1T. 52

Figura 29: Análise macroscópica dos animais (n=10) após a retirada das composições. 57

Figura 30: Evolução diária (machos) com o escore das lesões durante o teste de eficácia terapêutica..... 58

Figura 31: Evolução diária (fêmeas) com o escore das lesões durante o teste de eficácia terapêutica..... 58

Figura 32: (I) Vesículas fechadas **(II)** Lesões em processo de cicatrização após o rompimento das vesículas. 59

Figura 33: Lesões no dia de pico da infecção, **(I)** machos, **(II)** fêmeas..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das formulações semissólidas formadoras de filmes *in situ*..... 14

Tabela 2: Análise estatística da Regressão Linear. 30

Tabela 3: Teste de Grubbs para o fator resposta da curva de calibração em relação à detecção de *outliers*. 31

Tabela 4: Dados de precisão do método analítico, avaliação da repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dias)..... 33

Tabela 5: Dados de exatidão (prilocaína e lidocaína) do método analítico..... 34

Tabela 6: Parâmetros avaliados para determinação da robustez do método analítico. 35

Tabela 7: Dados de Robustez dos parâmetros temperatura, pH tampão, vazão fase móvel, lote da coluna e composição da fase móvel..... 35

Tabela 8: Recuperação de prilocaína e lidocaína a partir da pele dermatomizada..... 36

Tabela 9: Solubilidade (mg/mL) dos fármacos prilocaína e lidocaína, nas formas base nos diferentes meios, à temperatura ambiente 37

Tabela 10: Índice de consistência **(κ)** índice de comportamento de fluxo **(*n*).** 50

Tabela 11: Trabalho de bioadesão para FI, F1 e F1T..... 54

Tabela 12: Citotoxicidade da prilocaína e lidocaína em células Vero 54

Tabela 13: Atividade antiviral da prilocaína e lidocaína pelo método do MTT em células Vero 55

Tabela 14: Atividade virucida expressa em porcentagem de proteção da infecção para prilocaína e lidocaína..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACV	Aciclovir
ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATPase	Enzima adenosinatrifosfatase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Estrato Córneo
F1	Formulação 1
F1T	Formulação 1 acrescida de 1% de Transcutol®
FINERTE	Formulação sem adição de fármacos
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HSV	Herpes simplex vírus
INT	Infectados e não tratados
LIDO	Lidocaína
LIDO HCl	Cloridrato de Lidocaína
LogP	Logaritmo do Coeficiente de Partição
ME	Mistura Eutética
NT	Não Tratados
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PRILO	Prilocaína
PRILO HCl	Cloridrato de Prilocaína
PTFE	Politetrafluoretileno
RDC	Resolução Da Diretoria Colegiada
RVL	Região Viscoelástica Linear
SNC	Sistema Nervoso Central
US	United States
WO	World Intellectual Property Organization

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Lista De Figuras iii
Lista De Tabelas v
Lista De Abreviaturas e Siglas vi

1 INTRODUÇÃO....1
2 REVISÃO DE LITERATURA....3
3 OBJETIVO....11
4 MATERIAIS E MÉTODOS....12
Materiais 12
4.1.1 Pele suína....12
4.1.2 Solução para ensaios de liberação e permeação in vitro 12
Métodos 12
4.1.3 Quantificação simultânea dos fármacos.... 12
4.1.4 Estudo de solubilidade dos fármacos 13
4.1.5 Desenvolvimento de composições precursoras de filmes in situ 13
4.1.6 Teor dos fármacos na composição 14
4.1.7 Avaliação in vitro do perfil de liberação dos fármacos a partir das formulações.... 14
4.1.8 Avaliação da formação de filme in situ 16
4.1.9 Estudos de permeação passiva dos fármacos 16
4.1.10 Ensaio de bioadesão in vitro 19
4.1.11 Análises Reológicas 20
4.1.12 Avaliação biológica in vitro 22
Cultura de células, vírus 22
Atividade antiviral 23
Atividade virucida 24
4.1.13 Avaliação biológica *in vivo*.... 24
Animais.... 24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO....27
5.1.1 Quantificação simultânea dos fármacos.... 27
Seletividade 27
Linearidade 29
Precisão.... 32
Exatidão 33
Limite de Detecção e Limite de Quantificação 34

Robustez 34
Recuperação a partir da pele suína 36
5.1.2 Estudo de solubilidade dos fármacos 37
5.1.3 Desenvolvimento de formulações precursoras de filmes *in situ* 38
5.1.4 Teor dos fármacos na composição 39
5.1.5 Avaliação in vitro do perfil de liberação dos fármacos a partir da composição 40
5.1.6 Avaliação da formação de filme in situ 43
5.1.7 Experimentos in vitro de permeação passiva dos fármacos 45
5.1.8 Análises Reológicas 48
5.1.9 Ensaio de bioadesão in vitro 53
5.1.10 Avaliação da citotoxicidade dos fármacos em células Vero 54
5.1.11 Avaliação in vitro da inibição da multiplicação viral (HSV-1) pelos fármacos 55
5.1.12 Avaliação biológica in vivo 56
5.1.13 Avaliação da eficácia terapêutica in vivo 57
6 CONCLUSÕES 62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63
ANEXOS 70

1 INTRODUÇÃO

Herpesviridae é uma família de vírus infecciosos que atingem os humanos. Até 2011, foram isoladas 8 diferentes espécies: os herpes simplex virus 1 e 2 (HSV-1) (HSV-2), varicella zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus, human herpesvirus 6 (HHV-6), human herpesvirus 7, (HHV-7) e human herpesvirus 8 (HHV-8). São vírus de DNA envelopados de cadeia dupla e estão intimamente relacionados com infecções cutâneas. (CHISHOLM & LOPEZ, 2011)

A doença infecciosa denominada como herpes é causada pelos vírus *Herpes simplex* tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2). O HSV-1 está mais relacionado com as lesões orofaciais e labiais, enquanto o HSV-2, as genitais. Entretanto, estudo realizado pela OMS, mostrou que o HSV-1 é também uma causa importante de herpes genital (LOOKER et al., 2015).

A infecção por HSV-1e 2, não possui cura e o vírus é transmitido pelo contato direto com secreções das áreas infectadas. Após a infecção primária, o vírus é transportado ao longo dos neurônios sensoriais periféricos para os gânglios onde permanecem em estado não replicante. Porém, periodicamente, o HSV pode se reativar, principalmente em condições específicas de estresse onde há depressão do sistema imunológico (CONSOLARO & CONSOLARO, 2009; BRADY & BERNSTEIN, 2004).

A lesão tem aspecto desagradável e sintomas desconfortáveis, incluindo dores e ardência. Além de impactar psicossocialmente na vida dos portadores da doença (DRÉNO et al., 2012). O tratamento convencional é feito pelo uso de antivirais de ação tópica ou sistêmica, como por exemplo, o aciclovir e seus derivados. Entretanto, recidivas são comuns e o uso generalizado desse antiviral tem levado ao desenvolvimento de resistência ao fármaco (MORFIN & THOUVENOT, 2002). Nesse sentido, o desenvolvimento de novas terapias, principalmente contra os vírus resistentes ao aciclovir se faz necessário.

O desenvolvimento de uma terapia local efetiva para o herpes periódico, para uso em indivíduos imunocompetentes enfrenta vários desafios, entre outros, a remissão natural da lesão, que é relativamente rápida, o que dificulta a demonstração da eficácia clínica (SPRUANCE & KRIESEL, 2002). Dessa forma, o desenvolvimento de sistemas mais eficazes para o tratamento do herpes requer um enfoque multidisciplinar, sendo necessário o conhecimento da patogenia e da área de desenvolvimento de formulações. Além da necessidade de que se estabeleça um protocolo clínico que possibilite a demonstração da eficácia clínica das formulações.

O uso de anestésicos locais com finalidade de dessensibilização e prevenção da sensação dolorosa representa um dos grandes avanços na área da saúde humana. Aos anestésicos locais também são atribuídas: a) atividade antiviral.,onde um dos mecanismos de ação sugerido foram interações físico-químicas entre os anestésicos e o envelope do vírus (YANAGI & HARADA, 1989) ou inibição da replicação viral (DE AMICI et al.,1996), a inibição da fusão do vírus com a parede celular (POSTE & REEVE, 1974) e inibição da ATPase (KUTCHAI & GEDDIS, 2001) também foram propostas; b) ação anti-inflamatória superior aos dos agentes anti-inflamatórios não esteroidais e alguns esteroidais, e reduzidos efeitos colaterais (CASSUTO et al., 2006; JEFFREY et al., 2008) e c) ação antimicrobiana; sendo considerados adjuvantes ou alternativos aos tradicionais agentes antimicrobianos em função da habilidade de desestruturar ou aumentar a permeabilidade da membrana celular (JOHNSON et al., 2008; BATAI, et al., 1999).

A primeira evidência clínica do uso de anestésicos em herpes data de 1989. Cassuto, realizou estudo duplo-cego em pacientes infectados com, HSV 1 ou 2, utilizando uma formulação placebo e outra, contendo os anestésicos tópicos locais, prilocaína e lidocaína, aplicados na fase prodrômica (fase anterior ao aparecimento da lesão, na qual o local fica dolorido com a sensação de ardência e apresenta-se eritematoso). Nenhum medicamento antiviral foi usado pelos voluntários por 2 meses antes da inclusão no estudo. Nesse estudo, é relatado que houve prevenção de 29% da erupção de lesões orais e 50% das lesões genitais (CASSUTO, 1989; CONSOLARO & CONSOLARO, 2009).

Diante das ações farmacológicas atribuídas aos anestésicos e das evidências científicas até o momento, e a inexistência no mercado nacional de produtos com anestésicos, para a aplicação em herpes, sua utilização em formulação tópica para esse fim é promissora.

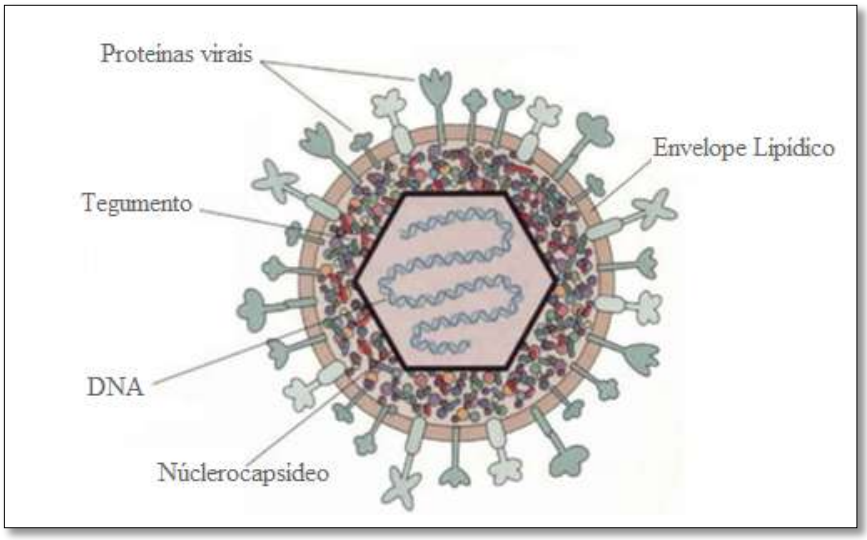
Os anestésicos além de combater o vírus, contribuem com a redução do processo inflamatório e infecções secundárias, especialmente após o rompimento das vesículas. Várias formas farmacêuticas podem ser utilizadas para tal finalidade. No entanto a semissólida facilita a aplicação e o espalhamento. A transformação em uma película fina e transparente, sobre a lesão, após um curto período de tempo, favorece a manutenção da formulação no local, a permeação do fármaco, além de oferecer proteção à lesão, evitando a desidratação do local e, novos ferimentos. O filme transparente sobre o local de aplicação torna o aspecto final mais discreto evitando constrangimento ao usuário.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Herpes simplex vírus 1 e 2

O HSV-1 e HSV -2 são vírus de DNA fita dupla com capsídeo icosaédrico, envolto por tegumento proteico e envelope lipídico contendo proteínas virais (**Figura 1**) e pertencentes à subfamília Alphaherpesvirinae. Embora sejam estruturalmente idênticos, diferem antigenicamente: o HSV-1 dissemina-se, em maioria, pela via oral, seja pela saliva infectada ou por lesões em fase ativa; enquanto o HSV-2 ocorre preferencialmente nas regiões genitais, sendo transmitido pelo contato com região infectada. Entretanto, tanto o HSV-1 pode estar presente em lesões genitais como o HSV-2 em lesões orofaciais (CHISHOLM & LOPEZ, 2011; EL HAYDERI et al., 2011; AZAMBUJA, BERCINI & FURLANETTO, 2004; LOOKER et al., 2015).

Figura 1: Ilustração esquemática do HSV.



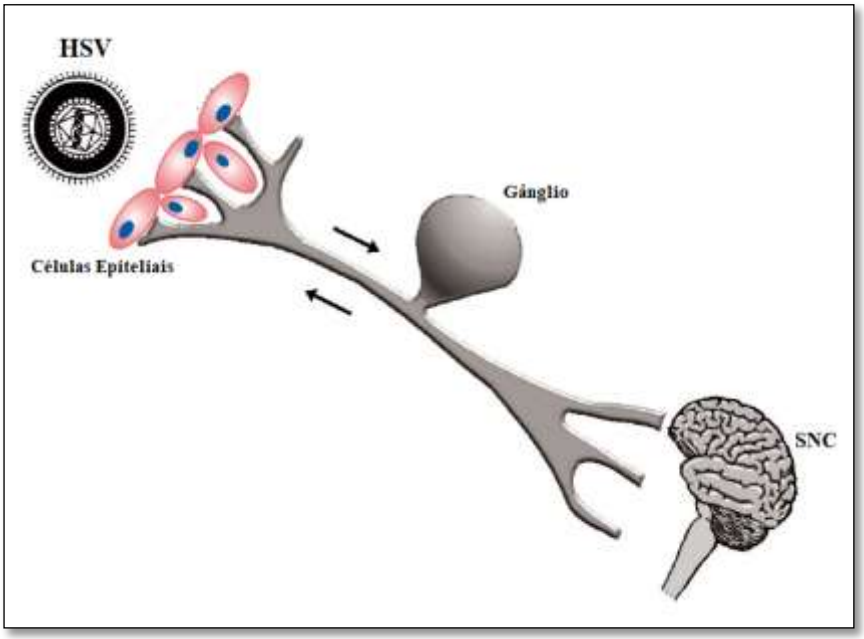
Adaptado de Google Imagens.

A entrada do HSV 1 e 2 no organismo é iniciada por interações específicas entre os viriões e glicosaminoglicanos presentes na superfície das células do hospedeiro (TIWARI et al., 2008). A infecção primária pode ocorrer por dois mecanismos distintos em função da célula a ser infectada. O primeiro é através da fusão da partícula viral com os receptores presentes nas células do hospedeiro, promovendo a entrada do nucleocapsídeo (e. g. células Vero). Enquanto o segundo acontece por meio da endocitose dos vírions em vesículas ligadas à membrana (e.g. células HeLa) (SHUKLA& SPEAR, 2001; NICOLA et al., 2005). Análises

realizadas por microscopia eletrônica, logo após a infecção de células epiteliais detectaram tanto vírions fundidos a membrana plasmática, como dentro das vesículas (NICOLA, MC EVOY & STRAUS, 2003).

Uma vez estabelecida a infecção primária, os HSV é transportado ao longo dos neurônios sensoriais periféricos para os gânglios neuronais onde permanece por tempo indeterminado em estado não replicativo, denominado estado latente de infecção (**Figura 2**) (BRADY & BERNSTEIN, 2004). Em casos clínicos que acometem a face, o gânglio mais afetado é o trigemial (CONSOLARO & CONSOLARO, 2009). O mecanismo na regulação da latência ainda não é bem esclarecido, mas envolve a transcrição de genes de latência (LATs) nos neurônios infectados (NICOLL, PROENÇA & EFSTATHIOU, 2012).

Figura 2: Sistema esquemático do ciclo de vida do HSV.



Adaptado de Perkins, 2002.

Periodicamente, o HSV pode ser reativado em condições específicas de saúde (e.g. exposição excessiva ao sol, queda no sistema imunológico) e migra pela terminação nervosa até a pele ou mucosa, caracterizando a fase de recorrência da infecção (BRADY & BERNSTEIN, 2004).

Herpes labial

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a prevalência de pessoas infectadas com HSV-1 corresponde a 67% da população mundial. A Organização alerta para o fato de que as estimativas são baseadas em casos sintomáticos, entretanto, um grande número de infecções é assintomática (LOOKER et al., 2015).

O primeiro contato com o HSV-1 acontece geralmente na infância (NICOLL, PROENÇA & EFSTATHIOU, 2012). Infecções em seres humanos foram documentadas ainda na Grécia Antiga. Hipócrates usou a palavra herpes, cujo significado é rastejar, para descrever as lesões que apareciam próximas umas das outras (FONSECA, 1999). Embora a doença tenha sido caracterizada anteriormente pela presença das lesões, apenas em 1873, foi reconhecido o potencial infeccioso do HSV em humanos (WILDY, 1973).

A manifestação clínica do herpes simples labial ocorre em 3 períodos clínicos distintos: prodrômico, clínico ativo e reparatório. O primeiro se inicia geralmente, 24 horas antes da aparição das vesículas. Essa fase é caracterizada por discreto edema, prurido, ardência e eritema **(Figura 3)**. Na maioria dos casos, é relatado formigamento na região peribucal. A percepção da sintomalogia nesse momento e início do tratamento previne, na maioria dos casos, o avanço para o período clinicamente ativo da doença (CONSOLARO & CONSOLARO, 2009).

Figura 3: Manifestações clínicas presentes no período prodrômico.

Adaptado de Consolaro & Consolaro, 2009.

O período clínico ativo inicia-se com o aparecimento das primeiras pápulas que evoluem para vesículas e bolhas contendo o exsudato inflamatório e partículas virais (**Figura 4)**. O agrupamento das vesículas origina a lesão herpética, conhecidamente dolorosa. Essa fase dura de 2 a 4 dias e tem alto risco de contaminação, uma vez que as vesículas se rompem e liberam os vírions (CONSOLARO & CONSOLARO, 2009).

Figura 4: Manifestação clínica no período clinicamente ativo.

Arquivo do grupo de pesquisa.

Após o rompimento das bolhas há melhora significativa nos sinais e sintomas. Em alguns casos, as lesões involuem e o exsudato seroso é reabsorvido. Inicia-se o processo de cicatrização, denominado como período reparatório com formação da crosta e duração 2 a 4 dias **(Figura 5)** (CONSOLARO E CONSOLARO, 2009).

Figura 5: Processo de cicatrização de lesão herpética.

Arquivo do grupo de pesquisa.

O aciclovir (2-amino-1,9-diidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purina-6-ona) é um nucleosideo análogo de purina, cujo alvo é a DNA polimerase viral. Outros análogos são disponíveis comercialmente para o tratamento do herpes entre eles, o ganciclovir e penciclovir. Ainda que eficazes estes compostos análogos a nucleosideos purínicos são pouco solúveis em água e, portanto tem reduzida biodisponibilidade. Sendo assim, é necessário um tempo relativamente longo para o paciente se recuperar, aproximadamente duas semanas.

Formulações com estes compostos são disponíveis no mercado tanto para aplicação tópica e ação local (cremes e pomadas), quanto para administração por via oral e ação sistêmica (comprimidos), para ambas o período de tratamento varia de 7 a 14 dias.

O tratamento de doenças graves, tais como infecções neonatais ou encefalite, requer o uso de infusão intravenosa de antiviral (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002). A aplicação de terapia fotodinâmica é uma das opções atuais para o tratamento (MAROTTI et al., 2008). Entretanto, essa técnica necessita de profissional capacitado para a aplicação e equipamentos de alto custo, onerando o tratamento.

Embora bem estabelecido, o tratamento atual para herpes tem eficácia limitada especialmente sobre sinais, sintomas e formação de crosta durante o processo de cicatrização, uma vez que não oferece proteção à lesão (KHEMIS, et al., 2012). Ademais, recidivas são comuns de acordo com o sistema imunológico do indivíduo e condições climáticas as quais é exposto. Dessa forma, o desenvolvimento de novas terapias, incluindo vacinas e sistemas de liberação, contra o HSV vem sendo estudado, principalmente devido ao aumento da incidência da doença nos últimos anos (LOOKER et al., 2015; BELSHE et al., 2012; JOHNSTON, KOELLE & WALD, 2014).

Ainda que haja o empenho na busca de novos agentes antivirais, nenhum deles foi capaz de promover a cura para a infecção ou diminuir o tempo de tratamento, uma vez que, agem após a infecção do vírion na célula hospedeira. A busca por novos agentes terapêuticos deve ser direcionada anteriormente a entrada do vírion na célula (AKHTAR & SHUKLA, 2009).

Prilocaína e Lidocaína

A anestesia local é definida como o bloqueio reversível da condução nervosa sem alteração da consciência. Sendo assim, os anestésicos locais atuam no processo de excitação-condução na membrana celular (CARVALHO, 1994).

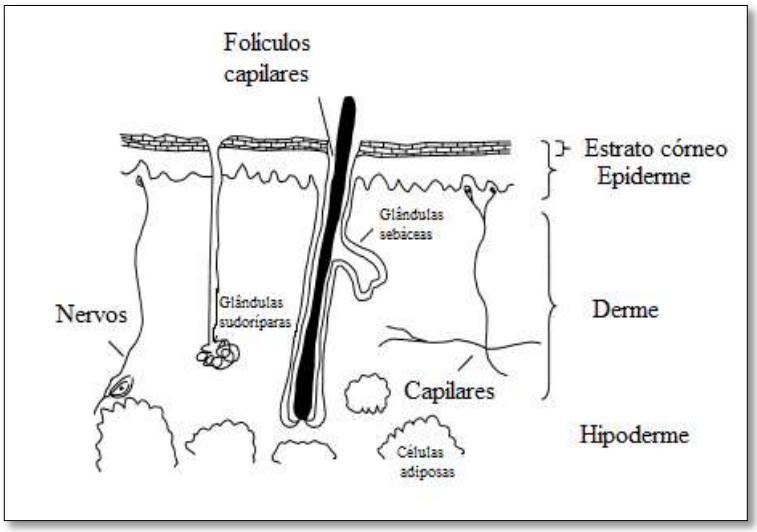
Em 1860, Niemann descreveu o primeiro anestésico local, a cocaína (*Erytroxycolon coca),* um éster do ácido benzóico (JACKSON & McLURE, 2006). Em 1884, Karl Koller utilizou pela primeira vez o fármaco em um procedimento oftálmico (BISCOPING & BACHMANN-MENNENGA, 2000). Essa descoberta possibilitou a síntese da benzocaína, seguida da procaína. Finalmente, em 1943, Loefgren sintetizou a lidocaína, derivada do ácido dietil-aminoacético, primeiro anestésico da classe das amidas e com menos reações alérgicas quando comparada aos anestésicos da classe dos ésteres (SOBANKO, MILLER & ALSTER, 2012).

A prilocaína foi descrita pela primeira vez em 1960 (MALAMED, 2004). A sua associação com a lidocaína por via tópica, é uma estratégia comumente utilizada tanto em procedimentos dermatológicos como odontológicos. A junção desses fármacos resulta em uma mistura eutética à temperatura ambiente, com ponto de fusão abaixo da temperatura da corporal, o que favorece a permeação dos fármacos (FIALA, JONES, BOWN, 2010; SOBANKO, MILLER, ALSTER, 2012).

Administração tópica de fármacos

A pele constitui a principal barreira de entrada para substâncias e agentes nocivos no organismo. Além de oferecer proteção contra a radiação ultravioleta e desidratação. É formada por três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme. Além de apêndices cutâneos: glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos, **(Figura 6)** (FOLDVARI, 2000).

Figura 6: Estrutura da pele.



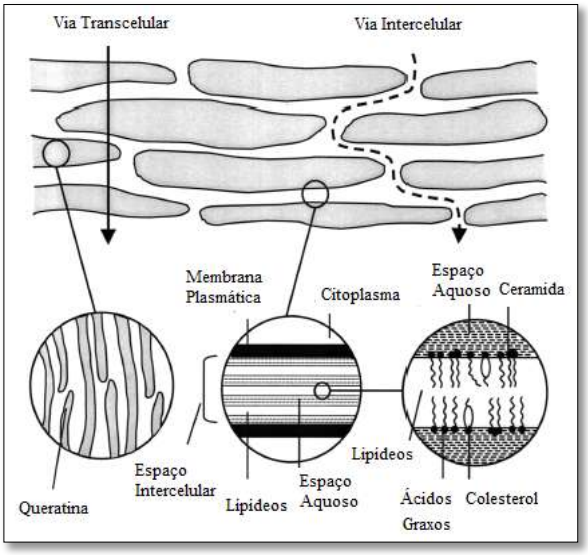
Adaptado de Moser et al., 2001.

A epiderme é uma camada estratificada e avascularizada. Na superfície externa da epiderme há uma camada de células mortas e queratinizadas, denominadas corneócitos dispersos em uma matriz lipídica, que constituem o estrato córneo. Essa estrutura altamente organizada confere a essa camada uma característica altamente lipofílica, e a ela é atribuída a função de maior barreira contra o ambiente externo (MOSER et al., 2001; MEDEIROS et al., 2010). A chamada epiderme viável é constituída por múltiplas camadas de queratinócitos em diversos estágios de diferenciação celular. Melanócitos, células de Langerhans, fosfolipídeos, enzimas e células dendríticas (FOLDVARI, 2000).

A derme é rica em vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas. Macrófagos, mastócitos, fibroblastos e leucócitos também estão presentes. A hipoderme é a camada subjacente e é composta, em maioria, por tecido adiposo. Folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas são encontrados na derme e hipoderme (FOLDVARI, 2000).

Existem, em teoria, três maneiras de substâncias atravessarem o estrato córneo. Na via transcelular, as substâncias se difundem através dos corneócitos e matriz lipídica. Na via intercelular, as substâncias se difundem apenas pela matriz lipídica entre os corneócitos. A terceira via, consiste na permeação de substâncias através da estrutura dos apêndices cutâneos, entretanto, esses representam apenas 0,1% da superfície da pele **(Figura 7)**. Nesse sentido, fármacos que apresentam elevada hidrofilia, quando incorporados em formulações destinadas à permeação pela via cutânea, terão dificuldade em penetrar o estrato córneo. Enquanto, se apresentar elevada lipofilia, terá tendência a ficar retido (OLIVEIRA, 2008).

Figura 7: Vias de permeação de substâncias na pele.



Adaptado de Moser et al., 2001.

Sendo assim, o grande desafio no desenvolvimento de novos sistemas de uso tópico, é fazer com o que o ativo penetre o estrato córneo e permeie para a camada da pele onde se deseja obter efeito.

3 OBJETIVO

Desenvolver e avaliar in vitro e in vivo formulações semissólidas contendo anestésicos tópicos locais para o tratamento de lesões causadas pelo vírus HSV-1.

Metas

▪ Revalidar método analítico de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação simultânea da prilocaína e lidocaína;

▪ Desenvolver composições semissólidas formadoras de filme in situ;

▪ Avaliar o efeito do promotor de absorção Transcutol®;

▪ Caracterizar farmacotecnicamente as composições por meio de experimentos de liberação, permeação, propriedades adesivas e análises reológicas;

▪ Avaliar o potencial in vitro dos anestésicos na inibição da multiplicação viral;

▪ Avaliar o potencial in vivo de irritação dérmica das composições desenvolvidas;

▪Avaliar a eficácia in vivo do tratamento desenvolvido;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

4.1.1 Pele suína

Foram obtidas de orelha de porco coletadas imediatamente após o abate dos animais em frigorífico fiscalizado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (Frigorífico Olhos D'água, Ipuã, SP, Brasil). As orelhas foram mantidas em aproximadamente 4°C enquanto transportadas para o laboratório, onde foram dissecadas.

4.1.2 Solução para ensaios de liberação e permeação in vitro

Solução aquosa composta por mistura de sais sendo 0,16M de Na_2HPO_4, 0,00138M de KH_2HPO_4 e 0,136M de NaCl (MASHRU et al., 2005). O pH foi ajustado para 7,0 usando soluções de HCl 0,1M ou NaOH 0,1M.

Métodos

4.1.3 Quantificação simultânea dos fármacos

As análises foram realizadas usando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), modelo Proeminence (Shimadzu®) com detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (DAD - modelo SPDM20A), degaseificador (DGU-20A5R) e auto-amostrador (SIL-10AF).

As condições cromatográficas se basearam no método desenvolvido por CUBAYACHI, 2014, e o método analítico foi revalidado para adequar aos objetivos do estudo. Fase móvel composta por mistura de acetonitrila, tampão fosfato de sódio 0,03M pH 6,0 (1:1 v/v) e 0,03% (v/v) de dietilamina, volume de injeção de 20 µL, fluxo isocrático com vazão de 1 ml/min em coluna de fase reversa C18 (Gemini Phenomenex 250 x 4,6 mm, 5µm) e temperatura controlada a 40°C. O tempo de eluição totalizou 20 min e a detecção ocorreu a 203nm. A aquisição e análise dos dados foram feitas com o *software* Shimadzu® LabSolution.

A revalidação do método analítico contemplou parâmetros de seletividade, linearidade e intervalo, sensibilidade (limites de detecção e quantificação), precisão, (repetibilidade e

precisão intermediária), exatidão e robustez segundo as diretrizes propostas na RDC 166, 2017 (ANVISA, 2017).

Para as quantificações das amostras provenientes dos ensaios de liberação, teor e fármaco remanescente no filme formado in situ, as curvas foram preparadas em fase móvel com ambos os padrões analíticos (100%, Sigma®) na faixa de concentração de 1,0µg/mL a 50,0 µg/mL.

As quantificações envolvendo extrações a partir de tecido biológico, curvas analíticas foram inicialmente preparadas seguindo o mesmo protocolo de extração (**item 4.1.9.2**) para avaliação de possíveis perdas dos analitos durante o processo.

4.1.4 Estudo de solubilidade dos fármacos

A solubilidade de cada fármaco (PRILO e LIDO) foi avaliada em água, tampão fosfato de sódio 30mM pH 7, solução receptora **(item 4.1.2)** contendo ou não tween 80 a 1%. Após 48h de agitação (300rpm) e 24h de repouso, as dispersões foram filtradas em membranas de nylon 0,22µM, 13mm de diâmetro e os fármacos quantificados.

4.1.5 Desenvolvimento de composições precursoras de filmes in situ

O sistema semissólido é composto por hidroxipropilmetilcelulose K100 (Colorcon®), propilenoglicol (Synth®), policarbofil (Noveon®) e tampão fosfato de sódio pH 7. Para o preparo da composição, os fármacos (PRILO e LIDO Nortec®) foram homogeneizados em gral e pistilo até a formação da mistura eutética (ME), na sequência, adicionou-se o policarbofil, propilenoglicol, Transcutol P® (Gattefossé®) quando incluído, HPMC K100 e o tampão fosfato de sódio pH 7. Os cloridratos foram preparados de maneira similar, exceto a mistura eutética. Após preparação, as formulações foram mantidas em repouso por 24h **(Tabela 1).**

Tabela 1: Composição das formulações semissólidas formadoras de filmes in situ.

Componentes (% m/m)	F INERTE	F1	F1Cl	FP base	FPCl	FL base	FLCl	F1T
PRILO	-	8,8	-	8,8	-	-	-	8,8
LIDO	-	8,8	-	-	-	8,8	-	8,8
PRILO HCl	-	-	8,8	-	8,8	-	-	-
LIDO HCl	-	-	8,8	-	-	-	8,8	-
HPMC K100	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Carbofil	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Propilenoglicol	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
Transcutol®	-	-	-	-	-	-	-	1,0
Tampão Fosfato Na pH 7	qsp 100%	qsp 100%	qsp 100%	qsp 100%	qsp 100%	qsp 100%	qsp 100%	qsp 100%

FINERTE: Formulação sem fármacos, **F1:** Formulação 1,**F1Cl:** Formulação 1 com cloridratos, **FPbase:** Formulação prilocaína base, **FPCl:** Formulação prilocaína cloridrato, **FLbase:** Formulação lidocaína base, **FLCl:** Formulação lidocaína cloridato**, F1T:** formulação 1 + Transcutol®

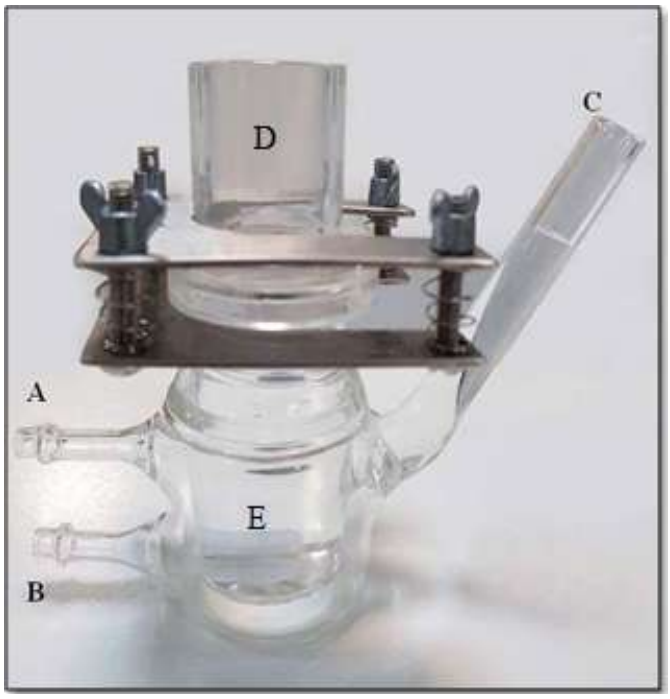
4.1.6 Teor dos fármacos na composição

Amostras de 20mg de composição foram diluídas em fase móvel sem o aditivo (dietilamina) e mantidas em banho de ultrassom por 5 min. Após filtração em membrana de nylon 0,22nm, os fármacos foram quantificados no filtrado**.** Os teores foram expressos como porcentagem de fármaco na composição semissólida. Os ensaios foram feitos em triplicata.

4.1.7 Avaliação in vitro do perfil de liberação dos fármacos a partir das formulações

O estudo foi realizado inicialmente à temperatura ambiente (em torno de 25°C) utilizando células modificadas de difusão vertical, com agitação constante (300rpm) em agitador magnético. Posteriormente, essas células foram substituídas por células de difusão vertical encamisadas, (**Figura 8**) acopladas a um sistema de circulação de água com controle de temperatura, tornando possível a realização do ensaio a 37ºC, sob a mesma agitação. Solução salina foi utilizada como meio receptor **(item 4.1.2).**

Figura 8: Célula de difusão vertical encamisada; **A:** saída de água; **B:** entrada de água; **C:** coleta de alíquotas; **D:** compartimento doador; **E:** compartimento receptor.



Arquivo do grupo de pesquisa.

Entre os compartimentos doador e receptor foi inserida membrana de éster de celulose previamente hidratada (Fisher Scientific®). No compartimento doador das células foram colocados 170 mg da composição, equivalente a 30 mg dos fármacos. A mistura eutética (ME) PRILO:LIDO (1:1) também foi avaliada.

Alíquotas de 1,0 mL do líquido receptor foram coletadas em tempos pré-determinados pelo tempo total do experimento, realizado em dois tempos, por 1h e 24h e o volume equivalente reposto com nova solução. Os fármacos foram quantificados por CLAE. Os ensaios foram realizados em quintuplicata. As quantidades cumulativas de fármaco dissolvidos foram calculadas segundo a **equação 1**:

$$Qreal, t = (Cm, t * Vr) + \left(\sum_{n-1} Qa * Va \right) \quad \textbf{(1)}$$

Onde:

Qreal, t = quantidade real liberada acumulada no tempo t;

Cm, t = concentração determinada da amostra no tempo t;

Vr = volume do receptor;

Va = volume de amostra coletada;

Qa = quantidade de amostra coletada

Para análise estatística empregou-se Análise de Variância (ANOVA Two way), seguida do pós-teste Bonferroni, utilizando o *software* GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Em todas as análises, foram considerados significativos valores de *p* menores ou iguais a 5% ($p \leq 0,05$).

***Comparação entre os dois sistemas em relação ao controle de temperatura*:** Com o intuito de avaliar a influência do controle da temperatura nos resultados bem como o novo modelo de células, foi realizado um estudo comparativo entre as duas técnicas no ensaio de liberação *in vitro*.

4.1.8 Avaliação da formação de filme in situ

Sobre área delimitada do antebraço higienizado (com sabonete líquido) de voluntários, com filme adesivo e transparente (n=2), (CAAE: 45356915.6.0000.5419 – Anexo 1), foram aplicados 170mg da composição F1 e F1T (equivalente a 30mg de fármaco). O experimento foi realizado em quintuplicata e acompanhado por uma hora, foi observado o tempo de formação do filme e a facilidade de remoção do mesmo. Os fármacos remanescentes foram extraídos do filme formado in situ em 10mL de fase móvel (ACN:Tampão pH6 sem dietilamina) e quantificados por CLAE.

Para análise estatística aplicou-se teste t de Student, não pareado, utilizando soft*ware* GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Foram considerados significativos valores de *p* menores ou iguais a 5% ($p \leq 0,05$).

4.1.9 Estudos de permeação passiva dos fármacos

4.1.9.1 Preparo e seleção das peles

Após a dissecação das orelhas suínas, as peles foram lavadas com água destilada e armazenadas em freezer (-80°C) até o momento de seleção para os experimentos de permeação passiva.

Para os experimentos de permeação passiva *in vitro*, as peles foram dermatomizadas (espessura de 700µm) e o excesso de pelo aparado. A integridade das peles foi avaliada pela resistência a passagem da corrente elétrica (resistividade elétrica) (POLAT et al., 2011; KARANDE, JAIN, MITRAGORTRI, 2006).

Os fragmentos de pele dermatomizada foram colocados entre os compartimentos doador e receptor das células de difusão vertical encamisadas e com temperatura mantida a 37°C ± 2 e área disponível para permeação de 4,9 cm^2 e estas, foram preenchidas com solução salina pH 7. O eletrodo de Ag foi colocado no compartimento doador e o AgCl no receptor e ligados a gerador de sinal (modelo 33210 A Agilent) e a multímetro digital (modelo ET 2053, Minipa). Após a aplicação de corrente alternada de 100 mV (RMS) de potência e 10 Hz de frequência, a intensidade da corrente elétrica gerada foi medida. A resistência das peles (*r*) foi calculada segundo a **equação 2:**

$$r\ (K\Omega/cm^2) = \frac{V/I}{A} \quad (2)$$

Onde:

V: tensão aplicada (100mV)

I: intensidade da corrente medida (μA)

A: área da mucosa em contato com o meio receptor (4,9cm^2)

Foram consideradas intactas e adequadas ao uso, as peles com resistividades iguais ou superiores a 50,0 $K\Omega/cm^2$ (POLAT et al., 2011).

Nos experimentos de permeação passiva in situ foram utilizadas peles de orelha de porco sem o processo de dermatomização.

Os resultados foram analisados usando teste T Student não pareado monocaudal com o *software* GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EUA). Em todas as análises, foram considerados significativos valores de *p* menores ou iguais a 5% ($p \leq 0,05$).

4.1.9.2 Experimento de permeação passiva da formulação in vitro

Foram utilizadas células e condições descritas no item **4.1.9.1**. O compartimento doador foi isolado do receptor utilizando peles de orelha suína dermatomizadas. Após atingir o equilíbrio da temperatura, em aproximadamente 1h, foi adicionado, no compartimento doador 170mg da composição, equivalente a 30 mg dos fármacos, a composição foi distribuída por toda a área disponível. O líquido receptor (item **4.1.2**) foi mantido sob agitação (300 rpm) em agitador magnético. Ao final dos 60 minutos uma alíquota de 1,0mL foi retirada. O experimento foi realizado em quintuplicata. Os fármacos foram quantificados por CLAE.

Ao final do experimento, as peles foram removidas das células de difusão, lavadas por cerca de 30 segundos, com água destilada até a remoção de toda a formulação **(Figura 9)**, em seguida picotadas usando tesoura previamente higienizada, colocadas em tubos cônicos tipo *Falcon*®, adicionadas de 20 mL de fase móvel sem aditivo. Após agitação em vórtex por 1 min e em banho de ultrassom por 30 min, as suspensões foram centrifugadas a 70000*rpm* por 15 min. Os conteúdos foram filtrados em membrana PTFE. 0,45μm e quantificados em CLAE para determinação das quantidades retidas no tecido (μg/cm^2).

Figura 9: Fragmento de pele dermatomizada após a retirada da formulação remanescente.

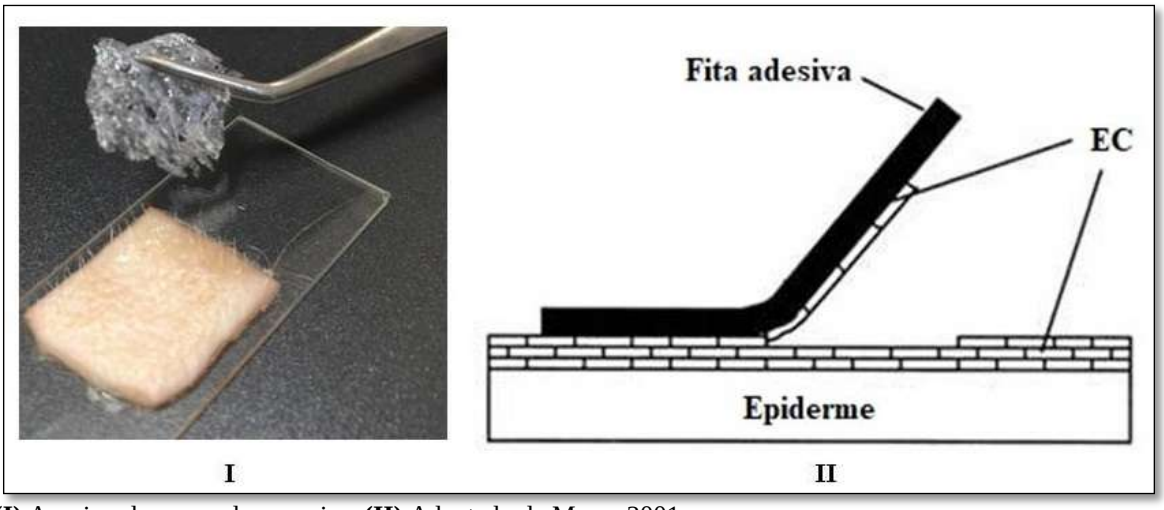
.

Arquivo do grupo de pesquisa.

4.1.9.3 Experimento indireto de permeação passiva in situ

Sobre área conhecida (4cm^2) de pele não dermatomizada foram colocados 170mg de formulação. Para favorecer a formação do filme, as peles foram mantidas em estufa (45°C) por 30 minutos. E na sequência, em temperatura ambiente (25± 2°C) até o final de 1 hora. O filme formado foi retirado e reservado para quantificação dos fármacos remanescentes **(Figura 10I)**. A região da pele que esteve em contato com a formulação foi submetida à técnica de *tape stripping*. Nesse experimento há a remoção progressiva do estrato córneo por meio de fitas adesivas **(Figura 10II).**

Figura 10: (I) Filme formado após 1h **(II)** Representação esquemática do método de tape stripping.



(I) Arquivo do grupo de pesquisa; **(II)** Adaptado de Moser 2001.

As 10 fitas adesivas utilizadas foram colocadas em um tubo tipo *Falcon*®, com 40 mL de fase móvel sem aditivo e o conteúdo foi agitado em vórtex por 1 minuto e filtrados em membrana PTFE. 0,45µm. Os fármacos foram quantificados por CLAE para determinação das quantidades retidas no estrato córneo.

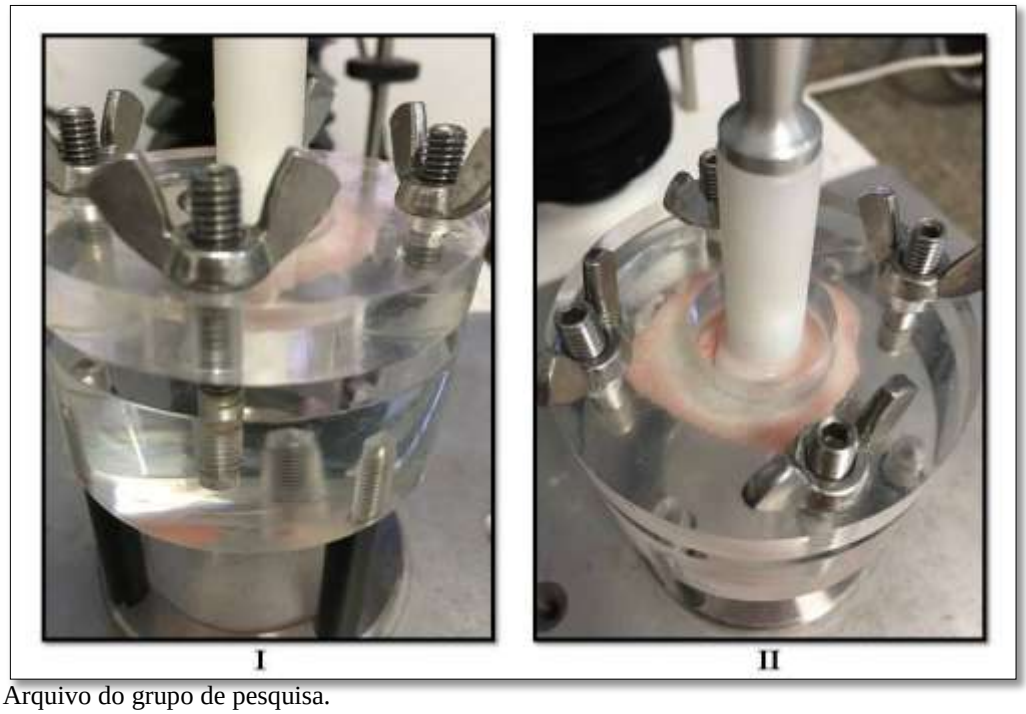
A pele remanescente foi processada conforme descrito no **item 4.1.9.2**. O experimento foi realizado em quintuplicata.

4.1.10 Ensaio de bioadesão in vitro

A bioadesividade das composições foi avaliada em analisador de textura TAXT plus (Stable Micro Systems®) utilizando pele de orelha de porco sem o processo de dermatomização.

Fragmentos de pele com aproximadamente 5cm^2 de área foram fixados com cola instantânea (LOCTite®) em placas circulares de acrílico e então, colocadas na parte inferior do aparato do analisador **(Figura 11I)**. Em seguida, o dispositivo superior do equipamento, contendo 0,5g de formulação foi movimentado para baixo até encontrar a pele e mantido em contato por 60s **(Figura 11II)**. A força aplicada foi de 0,5N e a velocidade de pré-teste e pós teste foi de1 mm/s. O trabalho de mucoadesão (área sob a curva de força *vs.* distância) foi determinado com o auxílio do *software Exponent* (Stable Micro Systems, UK). A análise foi realizada em quintuplicata.

Figura 11: (I) Aparato para a realização do experimento; **(II)** Experimento em execução.



Arquivo do grupo de pesquisa.

4.1.11 Análises Reológicas

4.1.11.1 Reometria de cisalhamento contínuo

As análises reológicas de cisalhamento contínuo foram obtidas utilizando reômetro Haake MARS II (Haake®), no modo de fluxo, em temperatura ambiente (25°C ± 2), com geometria de cone-placa de 35 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,104 mm. As amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso (relaxamento da tensão introduzida antes da análise) de 1min antes de cada análise. A curva ascendente de fluxo foi obtida com gradiente de cisalhamento partindo de 0 s^{-1} a 2000 s^{-1}e a descendente de 2000 s^{-1}até 0 s^{-1}.

O gradiente de cisalhamento foi aumentado durante um período de 150 s, mantido no limite superior por 10 s e posteriormente diminuído durante um período de 150 s. A seleção da faixa de gradientes de cisalhamento foi realizada de acordo com a consistência de cada formulação (JONES et al., 2001). Em cada caso, as propriedades de cisalhamento continuo de, no mínimo, três replicatas foram determinadas. As curvas ascendentes de fluxo foram

analisadas utilizando a equação de Oswald de Waele (Lei da Potência - Power Law; Equação 3) (MALKIN, 1994; MARTIN; BUSTAMENTE; CHUN, 1993):

$$\sigma=\kappa.\gamma^{n} \quad (4)$$

Onde:

σ= Tensão de cisalhamento;
κ= Índice de consistência;
ɣ= Gradiente de cisalhamento;
n = Índice de fluxo.

A tensão de cisalhamento, o índice de consistência, o gradiente de cisalhamento e o índice de fluxo foram determinados utilizando o programa RheoWin 4.10.0000 (Haake®).

4.1.11.2 Reometria oscilatória

A análise do comportamento viscoelástico dos sistemas foi realizada na temperatura de 25 ºC utilizando um reômetro MARS II (Haake®), no modo oscilatório, com geometria cone-placa de 35 mm de diâmetro, separadas por uma distância fixa de 0,052 mm. Para cada amostra, a Região Viscoelástica Linear (RVL) foi investigada pelo aumento da tensão oscilatória a uma frequência fixa. A RVL foi identificada como a região onde a tensão e a deformação foram diretamente proporcionais e o módulo elástico (G') permaneceu constante.

Uma tensão dentro da RVL foi selecionada para subsequentes análises de varredura de frequência. Assim como na reometria de fluxo contínuo, as amostras foram cuidadosamente aplicadas à placa inferior do reômetro, assegurando o mínimo cisalhamento da formulação e permitindo um tempo de repouso, para relaxamento da tensão aplicada antes da análise, durante 5 minutos anteriormente a cada determinação (BRUSCHI, 2006; BRUSCHI et al., 2007). Três replicatas, foram analisadas para cada amostra sob tensão constante e intervalo de frequência de 0,1 a 10,0 Hz. O módulo elástico (G'), o módulo viscoso ou de perda (G"), a viscosidade dinâmica (η') e a tangente de perda ou viscosa (tan δ) foram determinados utilizando o programa RheoWin 4.10.0000 (Haake®).

4.1.12 Avaliação biológica in vitro

Os estudos foram realizados em parceria com o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, da Universidade de Maringá, liderado pela professora Tânia Ueda Nakamura.

Cultura de células, vírus

Foram utilizadas células VERO (CCL-81 – ATCC), cultivadas em garrafas plásticas, com tampa rosca e dispositivo de entrada de CO2 (TTP), com meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM – GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB – GIBCO) e penicilina(50u/mL) e estreptomicina (0,05mg/mL), mantidas em estufa úmida com tensão de 5% de CO_2, 37ºC (Fischer Scientific), durante todo o seu cultivo. Para observação das células em cultura, foi utilizado microscópio invertido (Olympus, modelo CKX 41).

A cepa de HSV-1 utilizada foi a KOS (VR-1493 – ATCC). Para a propagação e obtenção de novas alíquotas virais, uma garrafa de células, com monocamada confluente, foi infectada com alíquotas da suspensão viral pura, e mantida em estufa úmida, 37°C. Quando apresentaram 80% ou mais de efeito citopático o conteúdo da garrafa foi centrifugado e o sobrenadante, contendo as partículas virais, coletado, aliquotado e armazenado em freezer -20°C.

4.1.12.1 Avaliação da citotoxicidade dos fármacos em células Vero

As células foram subcultivadas com tripsina, e distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 2,5 x 10^5 céls/mL e incubadas em estufa úmida, 37°C, 5% de CO_2. As células foram recobertas com 200 µL/poço das soluções de meio de cultura (DMEM), contendo a concentração desejada de cada fármaco, em triplicata.

Após a incubação, a viabilidade celular foi determinada pelo Método Indireto do MTT, desenvolvido por Mosmann, é um método colorimétrico que se baseia na redução enzimática realizada por desidrogenases mitocondriais, do sal de MTT (*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium*, sal de coloração amarela e solúvel em água) em formazan (*E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-1,3-difenilformazan*, sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) em células metabolicamente ativas. Dessa forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (MOSSMAN,1983).

Após remoção dos meios de cultura contendo os fármacos, os poços foram lavados com 100 µL de PBS, e, posteriormente, adicionados 50 µL/poço de MTT (2 mg/mL), exceto no branco. Em seguida, a placa foi incubada por 4h, ao abrigo da luz, em estufa 37 °C. DMSO (dimetilsulfóxido) foi adicionado em todos os poços (150 µL/poço), inclusive no branco, e a leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), em 570 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata. A viabilidade celular dos tratamentos foi comparada com a viabilidade do controle de células e determinada a concentração capaz de destruir/inviabilizar 50% da monocamada celular, de acordo com a fórmula a seguir.

% de toxicidade celular = [1 – (D.O. tto/ D.O. cc)] x 100

Onde:

D.O. tto: densidade óptica das células tratadas;

D.O. cc: densidade óptica do controle de células.

4.1.12.2 Avaliação in vitro da inibição da multiplicação viral (HSV-1) pelos fármacos

Atividade antiviral

Para experimentos de atividade antiviral (atividade do fármaco após a infecção) monocamadas de células Vero foram cultivadas em placas de 96 poços e, após 24 horas de incubação para confluência, as células foram lavadas com PBS e infectadas com 25 µL de suspensão viral TCID50 (dose infectiva de 50%), de cepa KOS, e incubadas por 1h, 37 °C, 5% CO_2. Após a incubação, sobre as células infectadas foram adicionados 175 µL/poço de cada concentração avaliada, em triplicata. Após 72h de incubação em estufa úmida 37°C, 5% CO_2, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. Aciclovir foi utilizado como controle positivo. A atividade antiviral para a cepa KOS foi determinada de acordo com o percentual de inibição do efeito citopático:

% inibição = [(DO ttdo – DO cv) / (DO cc – DO cv)] x 100

Onde:

DO ttdo: densidade óptica do tratado;

DO cv: densidade óptica do controle de vírus;

DO cc: densidade óptica do controle de células.

Atividade virucida

A fim de verificar a atividade direta sobre a partícula viral, anterior à infecção na célula, uma suspensão de HSV-1 foi incubada 1h em estufa úmida, 37 °C, 5% CO_2 juntamente com as concentrações testadas dos fármacos. (EKBLAD et al., 2010).

Após esse período, as amostras tratadas, não tratadas e meio de cultura sem o vírus foram adicionadas à monocamada de células por uma hora, a 37°C. O inóculo foi então retirado, as células foram lavadas com PBS duas vezes e DMEM (2x). Carboximetilcelulose (1% em água estéril) foi adicionada.

Após 72 horas de incubação em estufa úmida 37°C, 5% CO_2, as células foram fixadas, coradas com solução de cristal violeta e, as placas de lise contadas. Os ensaios foram realizados em duplicata em dois momentos diferentes. A porcentagem de inibição é obtida pela relação como na equação abaixo:

% da inibição de placas = 1 – (n° de placas de lise do tratado/ n° de placas de lise do controle de células) x 100

4.1.13 Avaliação biológica in vivo

Os estudos foram realizados em parceria com o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, da Universidade de Maringá, liderado pela professora Tânia Ueda Nakamura.

Animais

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as metodologias preconizadas pela ANVISA (2013) e o projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA n° 4800161216, Anexo 2).

4.1.13.1 Avaliação do potencial de irritação dérmica in vivo

A capacidade de causar irritação dérmica foi avaliada conforme metodologia descrita por Chattopadhyay e colaboradores (2009). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, sendo cada grupo composto por 10 animais (cinco machos e cinco fêmeas), anestesiados com 50mg/kg de pentobarbital para remoção dos pelos da região dorsal. No dia seguinte, sobre o local epilado, com o auxílio de espátula descartável, foi aplicado o esquema terapêutico a seguir:

Dose de 170 mg de formulação:

- *Grupo 1:* Formulação Inerte (F Inerte);
- *Grupo 2:* Formulação 1 (F1);
- *Grupo 3:* Formulação 1T (F1T);
- Grupo 4: Controle (Animais não tratados - NT)

Após 24h, as formulações foram removidas com água morna e os animais foram examinados após 1h para avaliar o aparecimento de eritema, edema ou espessamento cutâneo. Novas avaliações foram realizadas nas próximas 72h, em intervalos de 8h. Após as 72h, os animais foram sacrificados e tiveram a pele retirada para posterior análise histológica.

4.1.13.2 Avaliação da eficácia terapêutica in vivo

O teste de eficácia terapêutica foi realizado de acordo com o proposto por Cardozo e colaboradores (2013), com pequenas modificações. Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, cada grupo composto por dez animais (cinco machos e cinco fêmeas). Para a execução do experimento, os animais foram anestesiados com pentobarbital (50mg/kg) três dias antes da infecção, para epilação da região dorsal. No dia do experimento, a pele dos animais foi escarificada com agulha estéril, apenas para que houvesse o rompimento do epitélio. Posteriormente foi inoculada 50µL de suspensão contendo $1x10^5$ UFP (Unidades Formadoras de Placas). O esquema terapêutico consistiu em 3 doses de 170mg, a cada 8 horas, durante 24 horas, aplicadas com auxílio de espátula descartável. Para o aciclovir creme, a posologia utilizada foi a recomendada pelo fabricante Medley® (5 vezes ao dia, por 5 dias):

- *Grupo 1:* Formulação Inerte (F Inerte);

▪ *Grupo 2:* Formulação 1 (F1);

▪ *Grupo 3:* Formulação 1T (F1T);

▪ Grupo 4: Aciclovir (ACV)

▪ Grupo 5: Infectados e não tratados (INT)

Ao início dos sintomas visuais, que incluem: edema, eritema e aparecimento de vesículas, o tratamento foi iniciado.

Os animais foram acompanhados diariamente quanto à morte e desenvolvimento de lesões durante 9 dias, que foram classificadas de acordo com Cardozo e colaboradores (2013):

0: nenhuma lesão visível;

1: vesículas amareladas, inchaço visível ou úlceras de cura;

2: úlceras no local da inoculação apenas com inchaço, crosta, e/ou eritema, ou úlceras com crosta de cicatrização.

3: úlceras espalhadas, crostas, algumas úlceras claras ou úlceras de cicatrização além da região escarificada;

4: forma zosterioforme (lesões agrupadas em formato de cordão);

5: erupções confluentes, sem necrose ou ulceração;

6: erupção cutânea completa com necrose ou ulceração, paralisia dos membros posteriores, inchaço ou morte.

No décimo dia de infecção, os animais foram sacrificados.

Foi realizada análise estatística utilizando análise de variância de comparações múltiplas (ANOVA) seguido de Dunnett. Foi considerado significativo $p<0,05$. Para os testes de eficácia terapêutica, os tratamentos foram comparados com os animais infectados e não tratados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1.1 Quantificação simultânea dos fármacos

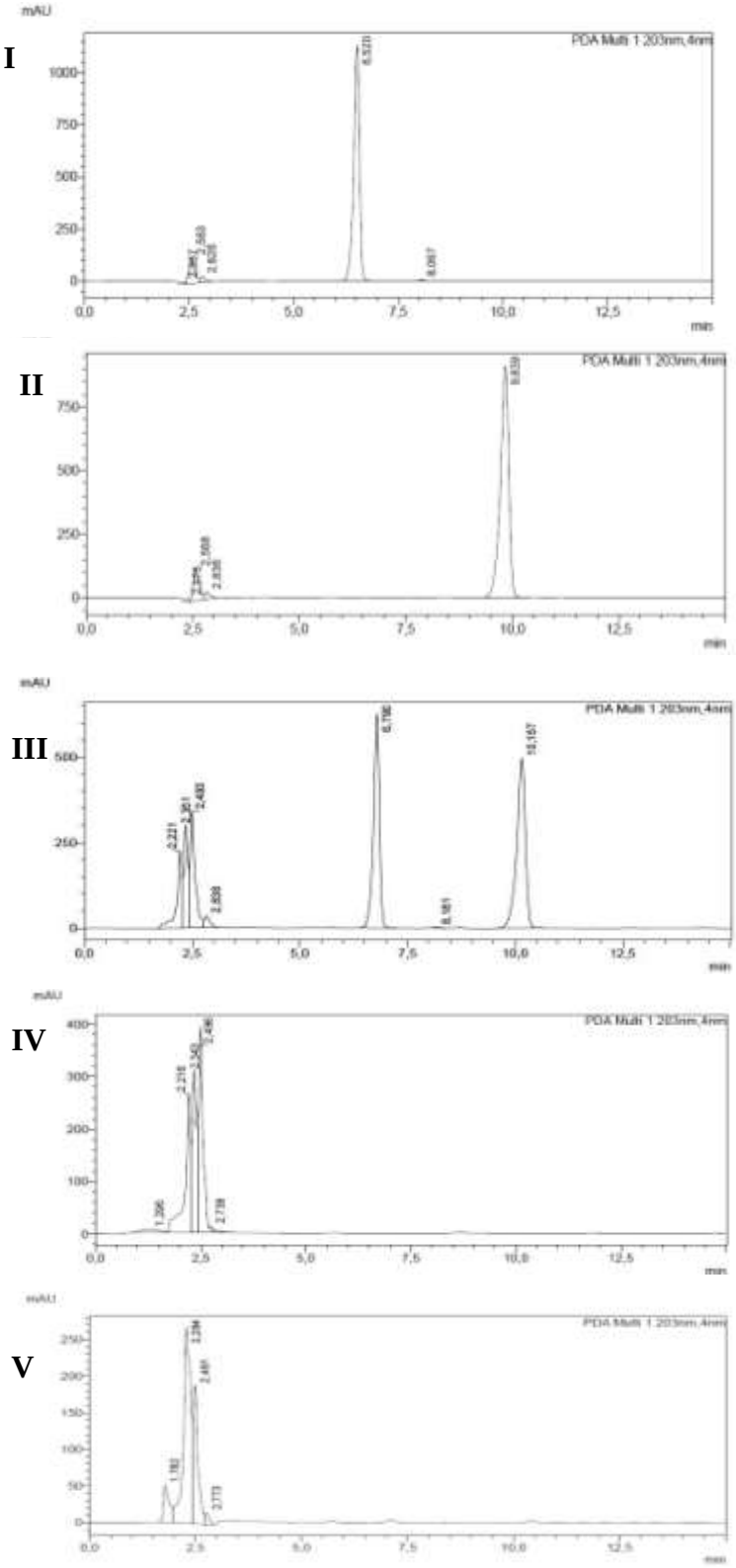
5.1.1.1 Revalidação de método analítico para quantificação simultânea de Prilocaína e Lidocaína

De acordo com todos os testes aplicados para a determinação da precisão, exatidão e linearidade, demonstrados a seguir e, considerando os propósitos de aplicação do método, o intervalo de linearidade estabelecido para ambos os analitos, foi de 1,0 µg/mL a 50,0 µg/mL, segundo as diretrizes apresentadas na resolução 166, de 24 de julho de 2017.

Seletividade

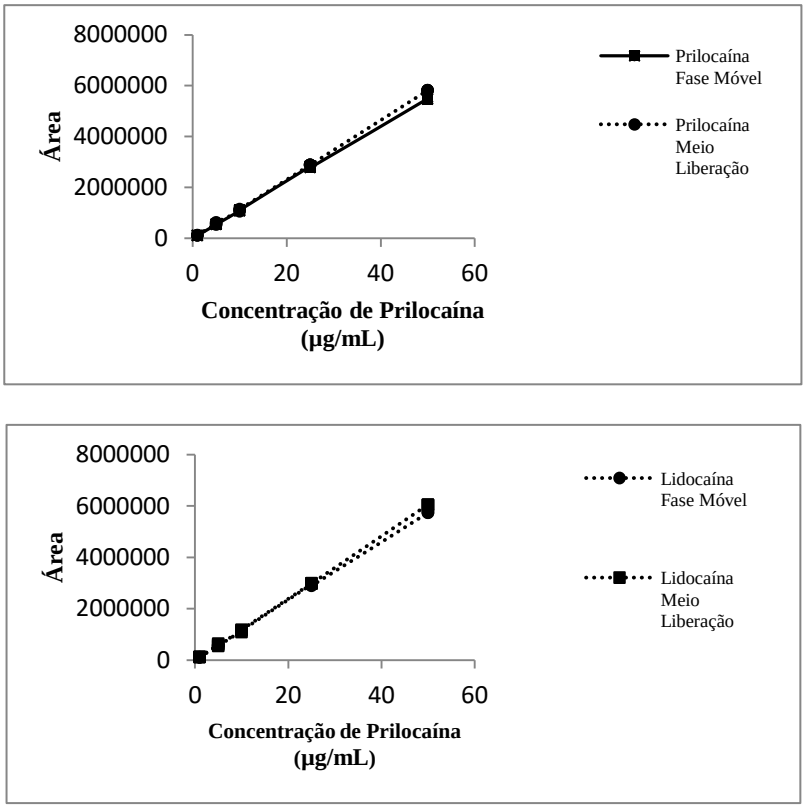
O método analítico deve identificar e quantificar os fármacos, fidedignamente, na presença dos componentes da matriz, garantindo sua seletividade em relação aos possíveis interferentes (adjuvantes, pele utilizada nos experimentos). Dessa forma, foram realizadas análises em triplicata do homogeneizado da pele de orelha de porco dermatomizada e com a formulação inerte, a 203 nm. Esses cromatogramas foram comparados a cromatogramas com os fármacos de modo a verificar se a detecção dos possíveis interferentes ocorre no mesmo tempo de eluição dos fármacos **(Figura 12)**.

Figura 12: Cromatogramas **(I)** Prilocaína; **(II)** Lidocaína; **(III)** Prilocaína e Lidocaína; **(IV)** Amostra extraída do homogeneizado da pele dermatomizada **(V)** Formulação inerte, detecção em 203nm.



A **Figura 13** contém as curvas analíticas da prilocaína e da lidocaína construídas separadamente em fase móvel e em solução receptora do ensaio de liberação e permeação. Percebe-se sobreposição entre as mesmas indicando mesmo comportamento de solubilidade dos fármacos entre os meios. Portanto, é possível afirmar que o meio de liberação não tem influência no perfil de liberação e nem na quantificação dos analitos.

Figura 13: Curvas analíticas para prilocaína e lidocaína em fase móvel e meio de liberação.



Linearidade

Para a construção das curvas analíticas foram preparadas três soluções-mãe, na concentração de 500 µg/mL dos fármacos em metanol. A partir de cada solução-mãe foram realizadas diluições sucessivas em fase móvel (1:1, acetronila grau cromatográfico e tampão fosfato 30 µM pH=6), obtendo-se soluções de trabalho nas seguintes concentrações: 1,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0µg/mL. As amostras foram filtradas em membrana de 0,45 µm. A **Figura 14** apresenta os gráficos da área em relação às concentrações de Prilocaína e Lidocaína respectivamente, incluindo as equações do modelo de regressão Linear. A análise estatística é apresentada na **Tabela 2**.

Figura 14: Curvas analíticas de prilocaína e lidocaína.

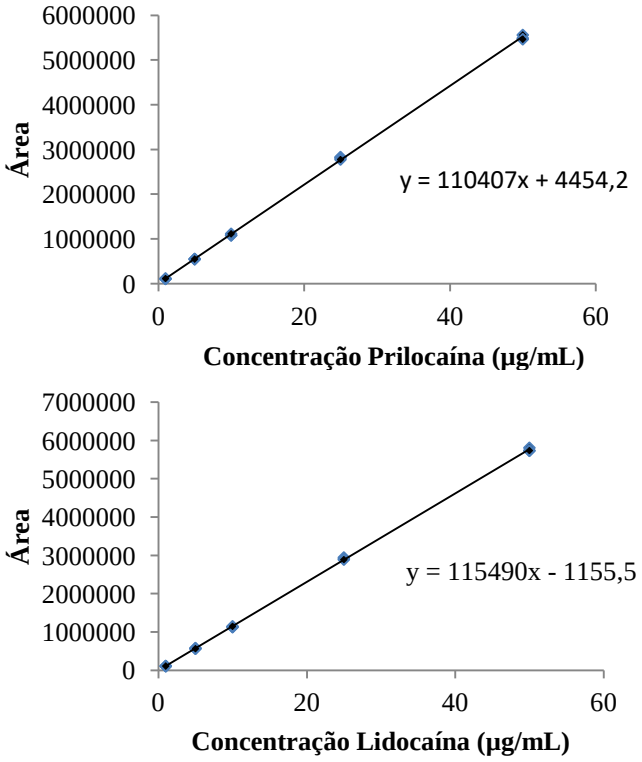


Tabela 2: Análise estatística da Regressão Linear.

Parâmetro	Resposta obtida		Critério de aceitação
	Prilocaína	**Lidocaína**	
Coeficiente de correlação	0,9998	0,9998	>0,990
Coeficiente de determinação	0,9999	0,9999	>0,998
Teste F	Fcalculado = 52533,04	Fcalculado = 84799,97	Fcalculado > Ftabelado*
Teste de Cochran*	Ccalculado= 0,676	Ccalculado= 0,665	Ccalculado < Ctabelado**

*F tabelado = 4,67, **C tabelado = 0,684 com 5% de significância. Os valores foram calculados seguindo critérios estatísticos baseados no número de réplicas e níveis.

O Teste de Cochran avalia se os dados são homocedásticos, e nesse caso o C calculado a partir da razão entre a maior variância observada para os conjuntos de dados de y e a soma das variâncias de y observadas para todos os níveis de concentração foi menor que o C crítico pré-estabelecido, caracterizando dados homocedásticos.

A verificação da presença de *outliers* foi realizada pelo teste de Grubbs **(Tabela 3)** o qual considera o fator resposta da curva.

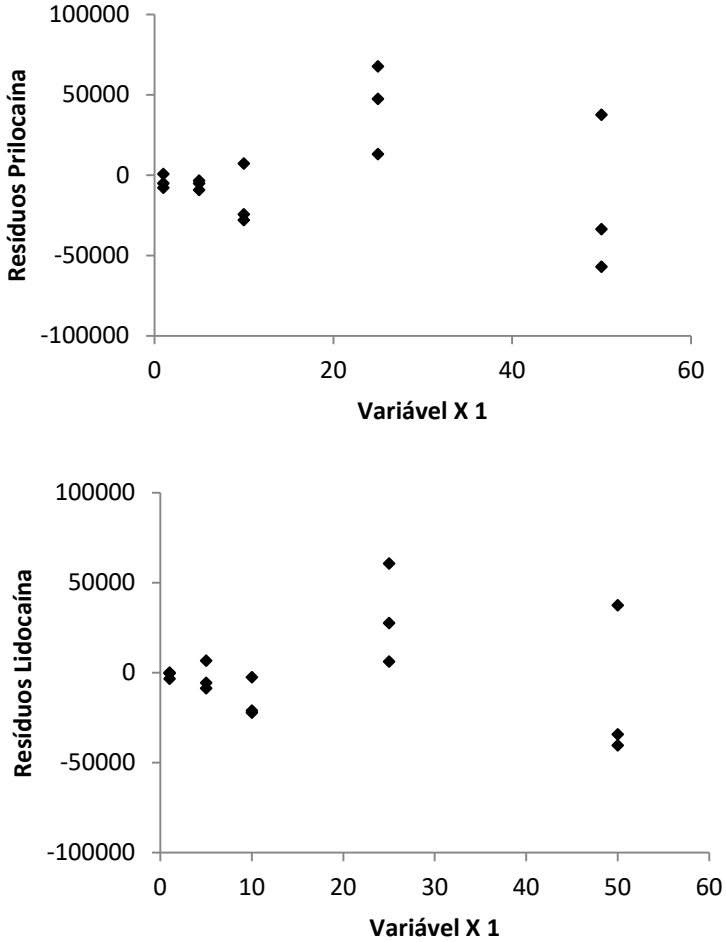
Tabela 3: Teste de Grubbs para o fator resposta da curva de calibração em relação à detecção de outliers.

Concentração teórica µg/mL	Fator resposta		G calculado	
	Prilocaína	Lidocaína	Prilocaína	Lidocaína
1,0	109769,0	114362,0	0,355	0,209
1,0	107002,0	110953,0	1,632	2,193
1,0	115586,0	113954,0	2,331	0,447
5,0	109458,0	114129,4	0,498	0,344
5,0	110613,2	116592,0	0,035	1,089
5,0	110267,4	113524,4	0,124	0,697
10,0	108414,9	113154,0	0,980	0,912
10,0	108056,0	113268,1	1,145	0,846
10,0	111573,3	115122,1	0,479	0,233
25,0	113292,0	117868,4	1,272	1,831
25,0	112483,6	116545,8	0,899	1,062
25,0	111108,7	115690,2	0,264	0,564
50,0	109824,1	114659,5	0,329	0,036
50,0	111247,9	116215,4	0,328	0,869
50,0	109356,3	114781,4	0,545	0,035
Média	**110536,8**		**114721,3**	
DP	**2165,8**		**1718,4**	
Critério de aceitação	**G calculado < G tabelado (2,548)**			

G tabelado = 2,548 calculado seguindo critérios estatísticos baseados no número de réplicas, nível de significância de 2,5%. Quando o G calculado é maior que o G crítico tabelado, considera-se um *outlier*

A avaliação da distribuição dos resíduos em função da resposta analítica foi realizada visualmente **(Figura 15)**. Os dados se apresentam com distribuição aleatória não sendo observadas tendências. Neste caso, a variância dos resíduos parece ser constante (homocedasticidade) o que condiz com a análise de Cochran onde o C calculado foi menor que o C crítico em ambos os fármacos avaliados.

Figura 15: Gráficos de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica.



Precisão

A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR, %) da série de medições (25µg/mL**)**. É desejável que o desvio não ultrapasse o valor de 5% considerando se tratar de um método analítico. Em vista disso, nossos dados **(Tabela 4)** contemplam o valor recomendado.

Tabela 4: Dados de precisão do método analítico, avaliação da repetibilidade (intra-dia) e a precisão intermediária (inter-dias).

Amostras	**Concentração normalizada de acordo com a massa pesada (µg/mL)**			
	PRILOCAÍNA		**LIDOCAÍNA**	
	Analista 1	**Analista 2**	**Analista 1**	**Analista 2**
1	25,46	24,64	27,09	26,23
2	24,58	24,57	25,83	26,08
3	23,80	25,54	25,59	27,10
4	23,58	26,27	25,41	28,03
5	25,94	24,54	28,27	25,99
6	25,37	24,51	26,85	26,10
	Média Repetibilidade (n=6)			
	24,79	25,01	26,51	26,59
	DPR% Repetibilidade (n=6)			
	3,87	**2,92**	**4,16**	**3,07**
	Média Inter-dias (n=12)			
	24,90		26,55	
	DPR% Inter-dias (n=12)			
	3,30		**3,49**	

Exatidão

A exatidão foi obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em relação a um valor aceito como verdadeiro, e expressa em porcentagem de recuperação (R, %). Os valores obtidos **(Tabela 5)** atenderam aos critérios desejáveis de intervalo, e estiveram entre 98,7 a 102,3% considerando os três níveis avaliados.

Tabela 5: Dados de exatidão (prilocaína e lidocaína) do método analítico.

Níveis de concentração Nominal	PRILOCAÍNA			LIDOCAÍNA		
	Conc. observada	Desv. Pad.	R, %	Conc. observada	Desv. Pad.	R, %
Baixo 1,0 µg/mL	1,01 0,94 1,05	0,06	**100,0**	1,01 0,96 0,99	0,03	**98,7**
Médio 25,0 µg/mL	24,31 25,77 24,29	0,85	**99,2**	25,38 25,69 25,64	0,17	**102,3**
Alto 50,0 µg/mL	48,67 49,20 51,63	1,58	**99,7**	49,06 51,25 50,98	1,19	**100,9**

Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) é demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado com exatidão e precisão. Essa quantidade seria o Limite de Quantificação (LQ). Segundo a RDC 166, 2017 (ANVISA) para métodos utilizados para doseamento, o que inclui dissolução (quantificação), uniformidade de conteúdo e potência, a determinação desses parâmetros não se faz necessária. Dessa forma consideramos o menor nível (1,0 µg/mL) do intervalo de linearidade tanto da prilocaína quanto da lidocáina como LQ real do método revalidado, uma vez que foram quantificados com precisão e exatidão.

Robustez

A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico e indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (ANVISA, 2017). Para essa avaliação foram contemplados parâmetros descritos pela RDC 166, 2017 conforme **Tabela 6** a seguir:

Tabela 6: Parâmetros avaliados para determinação da robustez do método analítico.

Parâmetro	Valor ótimo	Valor baixo	Valor alto
Temperatura Forno	40° C	35° C	45° C
pH Tampão	6,0	5,8	6,2
Vazão Fase Móvel	1,0	0,8 mL/min	1,2 mL/min
Coluna Variação*	-	-	-
Composição FM	50:50 (ACN:Tampão)	45:55 (ACN:Tampão)	55:45 (ACN:Tampão)

*Para avaliação desse parâmetro foram utilizados 2 lotes distintos de coluna cromatográfica.

A partir desses parâmetros foi avaliada a influência dessas alterações sob algumas condições como concentração dos analitos a partir da recuperação, fator de cauda e tempo de retenção **(Tabela 7).**

Tabela 7: Dados de robustez dos parâmetros temperatura, pH tampão, vazão fase móvel, lote da coluna e composição da fase móvel.

	Amostra PRILOCAÍNA			Amostra LIDOCAÍNA		
Parâmetro	**Recuperação %**	**Variação TR %**	**Variação Fator de cauda%**	**Recuperação %**	**Variação TR %**	**Variação Fator de cauda%**
Temperatura 35°C	98,92	-3,39	2,89	99,87	-1,19	3,98
Temperatura 45°C	98,42	2,10	2,82	99,76	-0,24	3,66
pH Tampão 5,8	72,26	15,15		46,34	8,67	
pH Tampão 6,2	62,44	15,30		40,39	8,80	
Vazão FM 0,8 mL/min	123,57	25,09	2,20	124,98	24,86	3,34
Vazão FM 1,2 mL/min	82,55	-16,52	1,63	83,50	-16,58	2,63
Coluna Variação Lote	99,08	2,93	36,85	100,53	6,95	33,03
Composição FM 45:55 (ACN:Tampão)	97,41	16,69	1,44	98,00	28,17	3,21
Composição FM 55:45 (ACN:Tampão)	99,86	-12,73	2,57	102,91	-19,48	3,41

TR: tempo de retenção, ACN: acetonitrila, FM: fase móvel

A variação dos parâmetros pH do tampão e vazão da fase móvel interferiu na quantificação de ambos analitos sendo que os demais parâmetros mantiveram recuperação dos fármacos entre 98 e 102,9 % o que é considerado um valor dentro do esperado. Sendo assim

estes parâmetros (pH tampão e vazão fase móvel) devem ser bem controlados no momento da análise.

Com relação ao tempo de retenção, as variações mais altas (8 a 28%) considerando os dois analitos, foram nas alterações do pH do tampão, vazão da fase móvel e composição da fase móvel. Nesse caso, esses resultados já eram esperados uma vez que influenciam diretamente na força cromatográfica e nas interações durante a corrida analítica pois altera a ionização dos fármacos, portanto devem ser controlados com rigor.

O fator de cauda variou em 33% e 36% nas análises da prilocaína e lidocaína respectivamente, somente na alteração do lote da coluna, os demais parâmetros apresentaram variação menor que 5%. Para o parâmetro alteração do pH não foi possível o cálculo do fator de cauda, muito provavelmente pela instabilidade da linha de base ao se alterar o pH, o qual deve ser muito bem controlado.

Recuperação a partir da pele suína

Para verificar possível perda na quantificação dos analitos no processo de extração, curvas analíticas foram construídas com 6 níveis de concentração no intervalo de 1 a 50 µg/mL seguindo o mesmo procedimento de extração **(4.1.9.2).** Ao final, as curvas foram comparadas com as curvas em fase móvel, e por apresentarem recuperação satisfatória dos fármacos, optou-se por utilizar a curva sem extração para as quantificações provenientes do ensaio de permeação **(Tabela 8).**

Tabela 8: Recuperação de prilocaína e lidocaína a partir da pele dermatomizada.

PRILOCAÍNA			**LIDOCAÍNA**		
Concentração teórica (µg/mL)	Recuperação (µg/mL)±DP	Recuperação %	Concentração teórica (µg/mL)	Recuperação (µg/mL)±DP	Recuperação %
1	1,2 ±0,07	104,0%	**1**	1,2±0,10	104,0%
25	24,8 ±0,18	99,2%	**25**	24,8±0,34	99,2%
50	49,9 ±0,38	99,8%	**50**	49,7±0,51	99,4%

Resultados expressos em média e desvio padrão, n=3.

5.1.2 Estudo de solubilidade dos fármacos

A **Tabela 9** mostra os resultados de solubilidade para os fármacos considerando as condições nas quais o experimento foi realizado.

Tabela 9: Solubilidade (mg/mL) dos fármacos prilocaína e lidocaína, nas formas base nos diferentes meios, à temperatura ambiente.

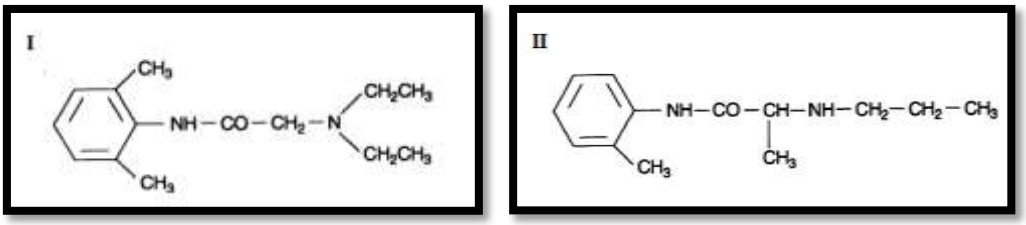
Fármacos (mg/mL)	A	B	C	D
Prilocaína	7,17	7,23	6,51	10,50
Lidocaína	3,67	5,24	4,26	5,92

A: água; **B:** tampão fosfato de sódio pH 7; **C:** solução salina composta por mistura de sais pH 7; **D:** solução salina composta por mistura de sais pH 7 acrescida de 1% de Tween.

Nos quatro diluentes avaliados, a PRILO foi mais solúvel quando comparada com a LIDO. Esse comportamento pode ser atribuído à estrutura e à característica física e química dos fármacos **(Figura 16)**. A PRILO possui menos impedimento estérico dos grupos orgânicos favorecendo a solvatação pela água e como consequência aumento da solubilidade em meio aquoso, além disso possui menor valor de log P 2,11 em relação a LIDO (log P 2,44) (FIALA,. JONES & BROWN, 2010). Não foi encontrado na literatura valores de solubilidade dos fármacos para comparação com os valores obtidos nesse experimento.

A presença de um agente tensoativo no meio diluente promoveu, como esperado, aumento da solubilidade para ambos os fármacos avaliados.

Figura 16: Estruturas químicas da lidocaína **(I)** e prilocaína **(II)** nas formas base.



Adaptado de ChemSpider.

5.1.3 Desenvolvimento de formulações precursoras de filmes in situ

Atualmente, o que há disponível no mercado para uso no tratamento da lesão herpética, são medicamentos contendo agentes antivirais de administração oral com ação sistêmica ou de uso tópico nas formas de géis e pomadas. Entretanto, para o uso de pomadas em aplicação tópica, a eficácia é limitada especialmente sobre sinais, sintomas e formação de crosta durante o processo de cicatrização, uma vez que não oferece proteção à lesão. Sendo, este último, essencial ao processo de cicatrização, uma vez que, sua ausência ocasionará ressecamento da região lesionada, bem como exposição a fatores externos, (poeira, infecção por novos micro-organismos) possibilitando a aparição de novos ferimentos além de possíveis contaminações, retardando o processo de cicatrização (KHEMIS, et al., 2012).

Outro problema recorrente é o abandono do tratamento pelos pacientes, que relatam constrangimento pela aparência grosseira das formulações de uso tópico/local. Frente a esse contexto, o desenvolvimento de sistemas mucoadesivos como composições semissólidas e filmes, com aparência mais discreta podem ter vantagens, além de capacidade de aumentar o tempo de permanência dos princípios ativos em sítios específicos (BRUSCHI & DE FREITAS, 2005). Ademais, a utilização de sistemas formadores de filme in situ, oferece proteção à lesão herpética com satisfatório aspecto e a utilização dos anestésicos, confere alívio da sensação dolorosa ocasionada pela doença.

De acordo com a literatura, há relatos de que os anestésicos possuem atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e antiviral (CASSUTO et al., 2006; JEFFREY et al., 2008; JOHNSON et al., 2008; BATAI, et al., 1999). A patente US 4914131 (1990) revindica o uso de lidocaína como antiviral. Outras (US 0068007 A1, (2004) e WO 159731 A1 (2014)), associam anestésicos locais a antivirais e outros agentes anti-inflamatórios visando minimizar o desconforto durante o aparecimento da lesão. As atividades atribuídas aos anestésicos locais os tornam promissores para o desenvolvimento de formulações destinadas ao uso tópico/local para o controle do herpes. Estas formulações, além de eficazes devem ter atributos cosméticos que não causem constrangimento ao usuário. Essas características agregadas a algumas evidências clínicas já vivenciadas em nosso grupo de pesquisa justificam a escolha da utilização dessa classe de fármacos para a incorporação no sistema desenvolvido.

A quantidade utilizada de fármaco foi baseada na dosagem comumente usada na anestesia clínica. A associação de PRILO e LIDO é embasada em suas diferentes propriedades. A LIDO, anestésico padrão em odontologia tem início de ação entre 2 e 3

minutos, enquanto a PRILO tem potência duas vezes maior e início de ação mais retardado, entre 2 a 4 minutos (PAIVA & CAVALCANTI, 2005).

Ainda que o uso dos fármacos separadamente não fosse a princípio uma alternativa, uma vez que, a associação de PRILO e LIDO, à temperatura ambiente, gera uma mistura eutética que, por sua vez, é pouco solúvel no sistema proposto de caráter hidrofílico e sem a presença de tensoativos. A incompatibilidade gerada acerca da solubilidade levará ao aumento da atividade termodinâmica do sistema, ocasionando maior gasto energético para acomodação dos fármacos, e assim um considerável "estresse" interno. Diante disso, o uso da mistura eutética favorecerá a permeação dos ativos que tenderão a particionar para um ambiente mais compatível (FIALA, JONES & BROWN, 2010; WOOLFSON et al., 2000). Entretanto, para fins de documentação, foram avaliados separadamente, tanto as formas base quanto cloridrato para ambos os fármacos **(Tabela 1)**.

As formulações que utilizaram apenas um dos fármacos cristalizaram durante o armazenamento, e por isso, foram descartadas como opção de tratamento nesse estudo. Não houve cristalização nas formulações onde houve associação dos fármacos. É importante ressaltar que as formas cloridrato das aminoamidas citadas não são eutéticas.

Posto isso e com o respaldo da literatura de que, moléculas em sua forma não ionizada tendem a permear mais facilmente através das membranas lipídicas, uma vez que apresentam coeficiente de partição adequado em virtude de sua lipofilicidade (YORK, 2005) optou-se pela formulação F1 para prosseguir com os estudos de caracterização.

Na composição desenvolvida utilizou-se o HPMC K100, polímero semissintético derivado da celulose, biocompatível, não iônico, de baixa viscosidade (80 - 120 cP, solução a 2% em água, 20°C) com alta velocidade, grande potencial de hidratação e formação de filme bioadesivo, após evaporação do solvente. Como umectante e plastificante foi usado o propilenoglicol. O Transcutol® (forma purificada do dietilenoglicol monoetil éter – DEGEE) foi utilizado a fim de avaliar a melhora na propriedade de permeação dos fármacos utilizados.

Com o intuito de aumentar a viscosidade e adesividade da composição semissólida adicionou-se policarbofil, um polímero aniônico, de elevado peso molecular que possui excelentes propriedades bioadesiva e formadora de filme. O tampão fosfato pH 7 foi selecionado como solvente na obtenção dos sistemas semissólidos, por favorecer a permanência dos fármacos na forma não ionizada.

5.1.4 Teor dos fármacos na composição

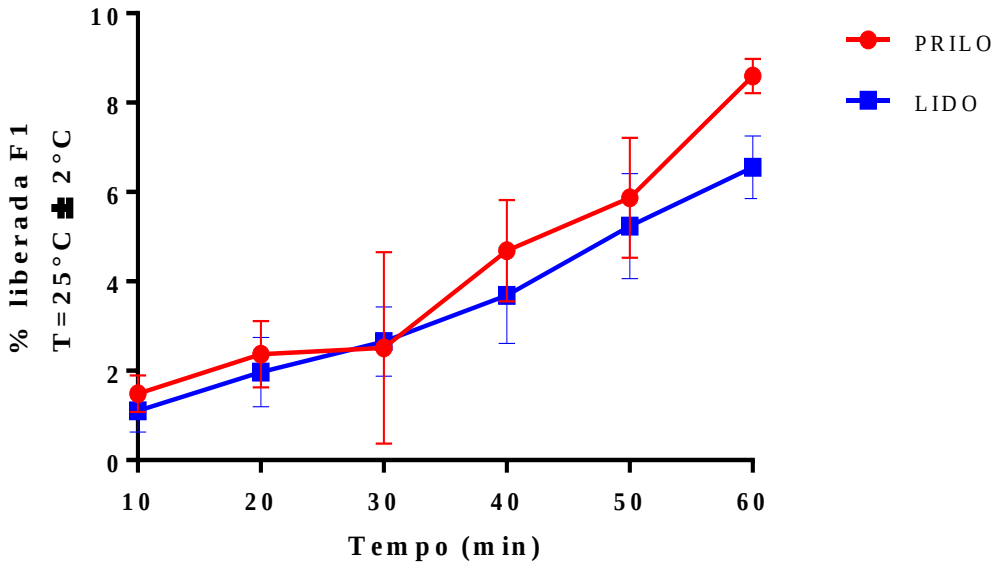
Os teores dos fármacos nas composições estão de acordo com os limites pré-determinados na literatura para as formas farmacêuticas já descritas (95-115%), sendo 107,67% para a PRILO com coeficiente de variação 1,59% e 110,15% para a LIDO com coeficiente de variação 2,6% na F1, e para a F1T os valores foram 97,9% para a PRILO com coeficiente de variação 2,2% e 93,8 para LIDO com coeficiente de variação 2,5% demonstrando assim, a homogeneidade da distribuição dos fármacos (USP XXX).

5.1.5 Avaliação in vitro do perfil de liberação dos fármacos a partir da composição

A avaliação in vitro do perfil de liberação iniciou-se com as células de difusão de Franz sem o controle da temperatura. Na **Figura 17** está apresentado o perfil de liberação *in vitro* dos fármacos à temperatura ambiente (em torno de 25ºC) a partir de F1. Neste experimento, observou-se baixa liberação dos fármacos, 8,6% para a PRILO e 6,6% para a LIDO. A liberação a partir da mistura eutética foi ainda menor, sendo, 0,29% ± 0,06 para PRILO e 0,19% ± 0,10 para a LIDO, resultado esperado por ser uma mistura oleosa.

Neste caso, já é possível notar que a formulação influenciou o comportamento dos fármacos, promovendo aumento da liberação quando comparado aos fármacos em ME. Possivelmente, devido ao envolvimento da ME pelos componentes hidrofílicos da formulação e aumentando a atividade termodinâmica da ME.

Figura 17: Perfil de liberação in vitro dos fármacos a partir formulação (F1), em solução salina, pH=7,0 a 25°C.

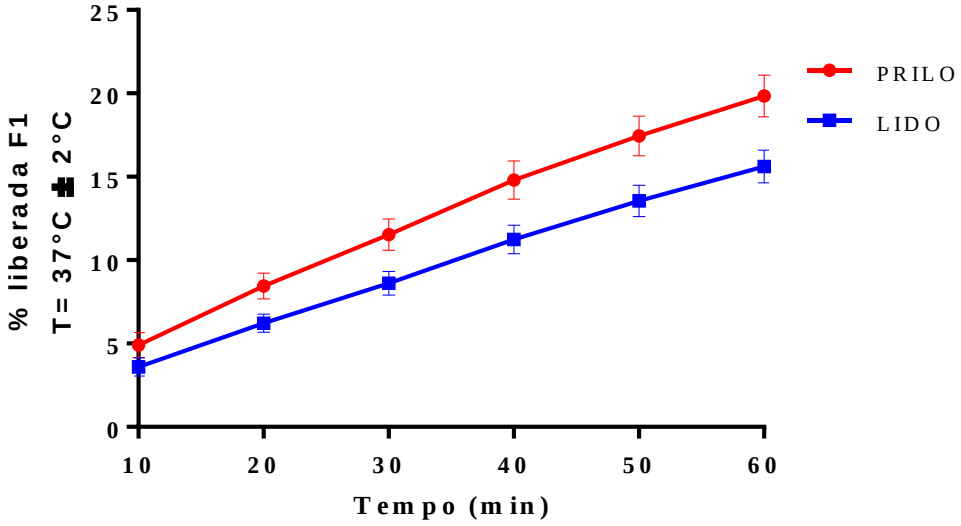


Resultados expressos em média e desvio padrão (n=5).

Entretanto, à temperatura de 37ºC, observou-se aumento da liberação proporcional para ambos os fármacos, sendo, ao final dos 60 minutos, em torno de 5 vezes maior para a ME e de 2 vezes maior para os fármacos na F1 Para os fármacos na ME a liberação foi de 1,58% ± 0,18 para PRILO e 1,31% ± 0,13 para LIDO. E, quando em formulação (F1) a liberação foi de 20,15% para PRILO e 15,88% para LIDO **(Figura 18)**.

Houve menor variação entre as replicatas, o que foi atribuído ao maior controle das variáveis (células com diâmetro exato, temperatura controlada). O aumento da concentração de fármacos no líquido receptor com o aumento da temperatura caracteriza uma dissolução endotérmica. Isto é, o aumento da temperatura favoreceu a saída dos fármacos, uma hipótese é a fluidificação da matriz.

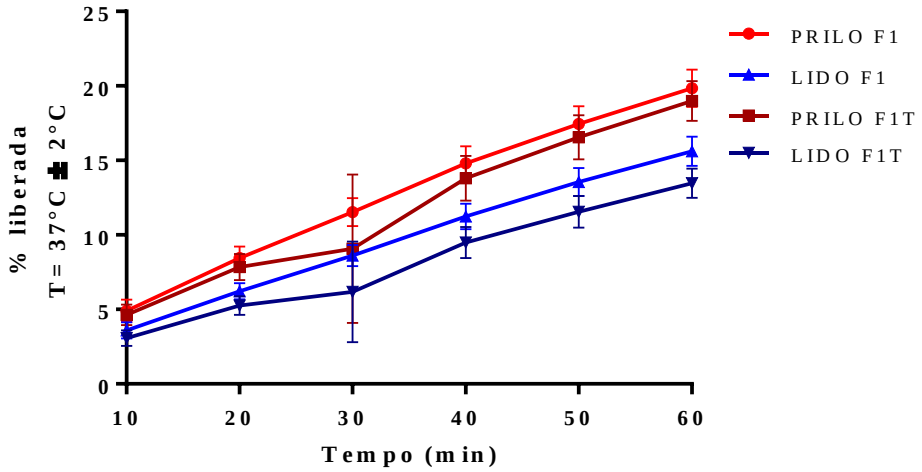
Figura 18: Perfil de liberação in vitro dos fármacos a partir de F1 em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37°C ± 2°C.



Resultados expressos em média e desvio padrão (n=5).

Para avaliar a influência do Transcutol® na liberação da PRILO e LIDO, foi realizado um experimento de liberação com esse sistema (F1T). Na **Figura 19** é possível ver a comparação entre a liberação das duas composições, onde ao final dos 60 minutos a liberação foi de 19,03% e 13,44% para a composição com Transcutol®.

Figura 19: Comparação entre perfis de liberação in vitro dos fármacos a partir da formulação (F1) e da formulação contendo Transcutol®, em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37ºC.



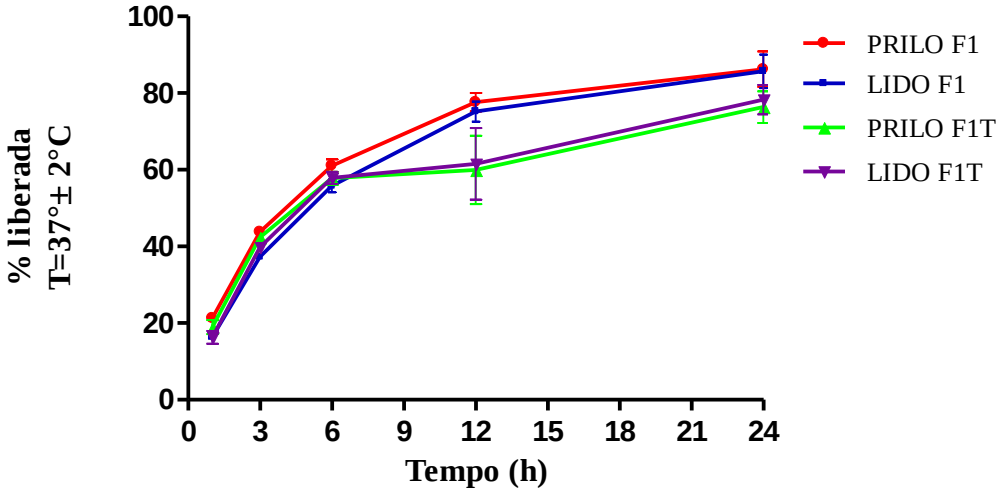
Resultados expressos em média e desvio padrão (n=5).
Analisados usando ANOVA Two way, seguida do pós teste Bonferroni.

O Transcutol® não alterou a liberação dos fármacos (p>0,05) a partir da formulação, conforme esperado, uma vez que, esse componente tem a propriedade intrínseca de promotor de absorção e por isso, sua influência na formulação foi melhor observada no experimento de avaliação da formação do filme in situ e permeações in vitro (SULLIVAN, GAD & JULIEN , 2014).

Por fim, para avaliar a liberação dos fármacos em um período prolongado, as formulações foram avaliadas por 24h, com coletas no tempo de 1h, 3h, 6h, 12h e 24h. Ao final do experimento (t=24h), a liberação para F1 foi de 82% ± 2,40 para PRILO e 81,5% ± 2,45 para LIDO. Para F1T a liberação chegou a 80% ± 5,5 para PRILO e 81,6% ± 4,64 para LIDO **(Figura 20)**. Ainda, o perfil permanece em curva ascendente, garantindo que não houve saturação do meio de liberação. Não houve diferença significativa entre F1 e F1 T (p>0,05).

.

Figura 20: Comparação entre perfis de liberação *in vitro* dos fármacos a partir da formulação (F1) e da formulação contendo Transcutol®, em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37ºC, durante 24h.



Resultados expressos em média e desvio padrão (n=5). Analisados usando ANOVA Two way, seguida do pós teste Bonferroni.

5.1.6 Avaliação da formação de filme in situ

A formação do filme aconteceu em média 20 minutos **(Figura 21)** após a aplicação para ambos os voluntários (n=2). O filme formado foi de fácil remoção e nenhum dos voluntários relatou dor ao retirá-lo.

A quantidade de fármaco remanescente foi em média 66% em relação à quantidade aplicada para PRILO e 65% para LIDO em F1. Já para a formulação contendo Transcutol® (F1T) foi de 53% para PRILO e 49% para a LIDO.

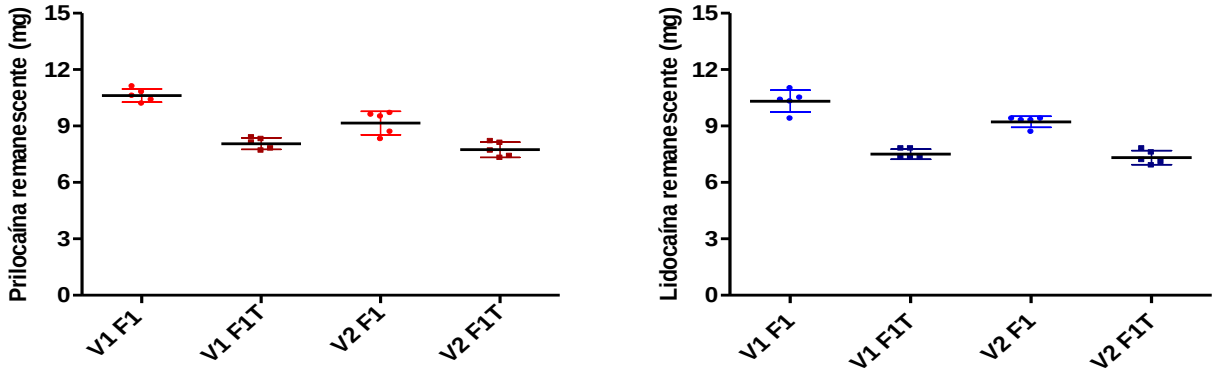
Figura 21: (I) Formulação semissólida (F1) t=0, **(II)** Filme após aplicação de F1 t=60 min.

Arquivo do grupo de pesquisa.

O Transcutol® (dietileno glicol monoetil éter – DEGEE) é um promotor de absorção cutânea. Atua melhorando a penetração de ativos na pele e a permeação local de fármacos por desestabilizar reversivelmente, as células do estrato córneo. Ademais, é amplamente usado em formulações farmacêuticas de uso oral, tópico, transdérmico e injetável por suas propriedades de agente solubilizante, sendo capaz de solubilizar ativos insolúveis em solventes convencionais, como o etanol (SULLIVAN Jr, GAD &JULIEN , 2014).

A **Figura 22** mostra as quantidades em miligramas de PRILO e LIDO remanescente. Houve diferença significativa na quantidade dos fármacos entre os filmes formados a partir de F1 e os filmes formados a partir de F1T em ambos os pacientes ($p<0,05$). Ainda que sejam necessários experimentos complementares, é possível notar a ação do agente promotor de absorção, uma vez que a quantidade de fármaco remanescente para os filmes onde houve a adição do Transcutol® foi menor. Assim, sugere-se que a quantidade que deixou a formulação e penetrou na pele é maior.

Figura 22: Quantidade (mg) de prilocaína e lidocaína remanescentes nos filmes formados no braço de voluntários.



Resultados expressos em média e desvio padrão, n=2. Analisados usando Teste T Student não pareado (monocaudal).

5.1.7 Experimentos in vitro de permeação passiva dos fármacos

5.1.7.1 Experimento de permeação passiva in vitro

Os ensaios de permeação passiva foram realizados para F1 e F1T. A dose usada nos experimentos de permeação passiva foi de 15mg para cada fármaco, equivalentes a 170 mg da formulação.

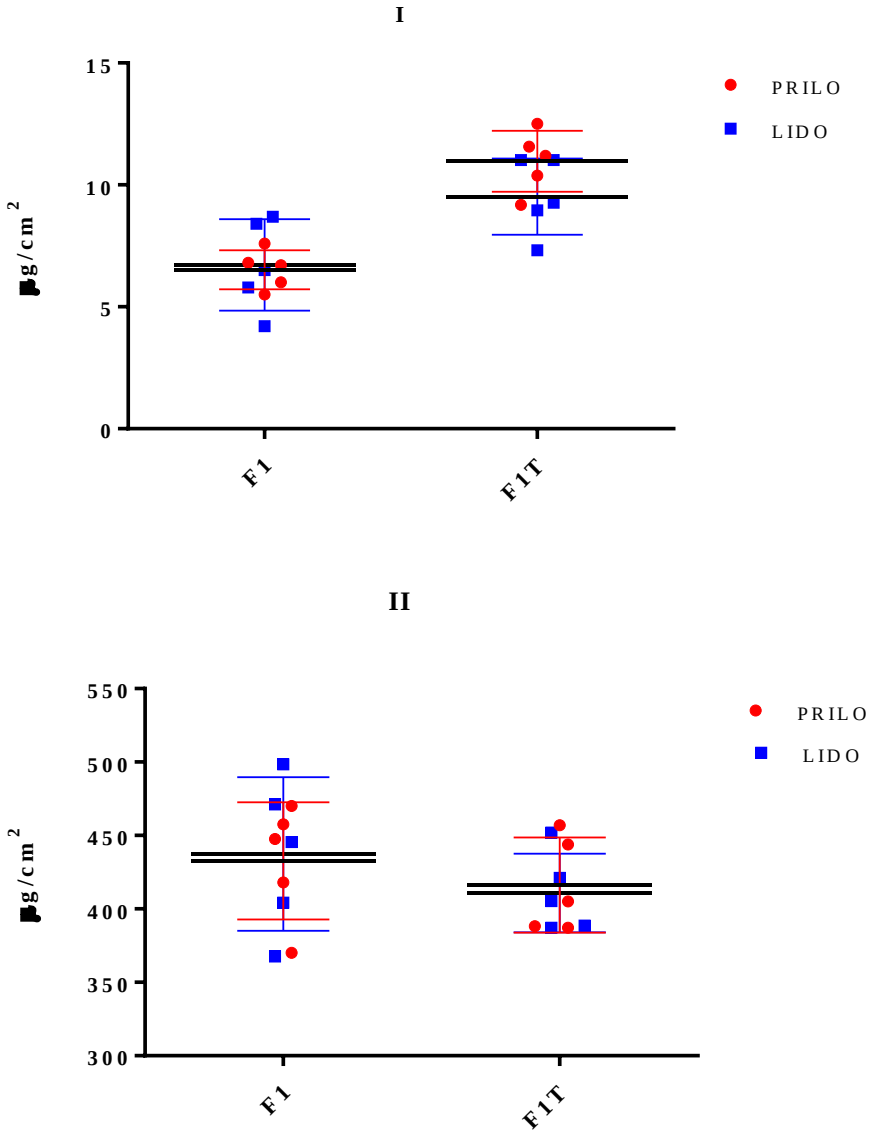
Ao final de uma hora após o início do ensaio de permeação, foi possível quantificar, ainda que em baixas concentrações, a prilocaína e a lidocaína no líquido receptor para F1 e F1T **(Figura 23)**. Esse resultado assegura que os fármacos conseguiram atravessar o estrato córneo e permear através das camadas da pele.

A concentração máxima encontrada no líquido receptor para prilocaína e lidocaína não ultrapassou 2µg/mL. Essas concentrações estão abaixo dos níveis considerados tóxicos. A administração de prilocaína não deve ultrapassar 6,0 mg/kg em adultos, não excedendo 500mg, enquanto a de lidocaína não deve ultrapassar 7,0 mg/kg não excedendo 600mg em adultos (PAIVA & CAVALCANTI 2005). Sendo assim, a dose administrada está dentro dos limites de segurança para ambos os fármacos.

Houve diferença significativa na permeação dos fármacos entre as 2 composições avaliadas, onde para F1T aumentou significativamente a quantidade de PRILO ($p<0,001$) e LIDO ($p< 0,05$) no líquido receptor em relação à F1. Não houve diferença significativa nas quantidades de fármaco retidas no tecido entre F1 e FIT ($p>0,05$) a quantidade de fármaco retida equivale em média a 3% para cada um dos fármacos.

Esses resultados estão dentro do esperado para a aplicação tópica sugerida, já que as concentrações que penetram a pele e passam para o líquido receptor estão em concentrações ínfimas, não oferecendo risco e efeitos terapêuticos sistêmicos. Igualmente, permanecem retidas na pele, aonde deverão exercer efeito contra o HSV-1.

Figura 23: (I) Concentração dos fármacos quantificados no líquido receptor; **(II)** Concentração dos fármacos retidos na pele ao final de 1h de experimento.



Resultados expressos em média e desvio padrão (n=5).
Analisados usando Teste T Student não pareado (monocaudal).

5.1.8 Experimento indireto de permeação passiva in situ

Como não foi possível a formação do filme no experimento de permeação passiva in vitro, uma vez que o contato com o líquido receptor inviabiliza a secagem da formulação, este estudo foi realizado com o intuito de oferecer dados complementares sobre o comportamento dos fármacos na presença do promotor de permeabilidade utilizado e à aplicação real do produto. Esse estudo foi realizado apenas para F1 e F1T.

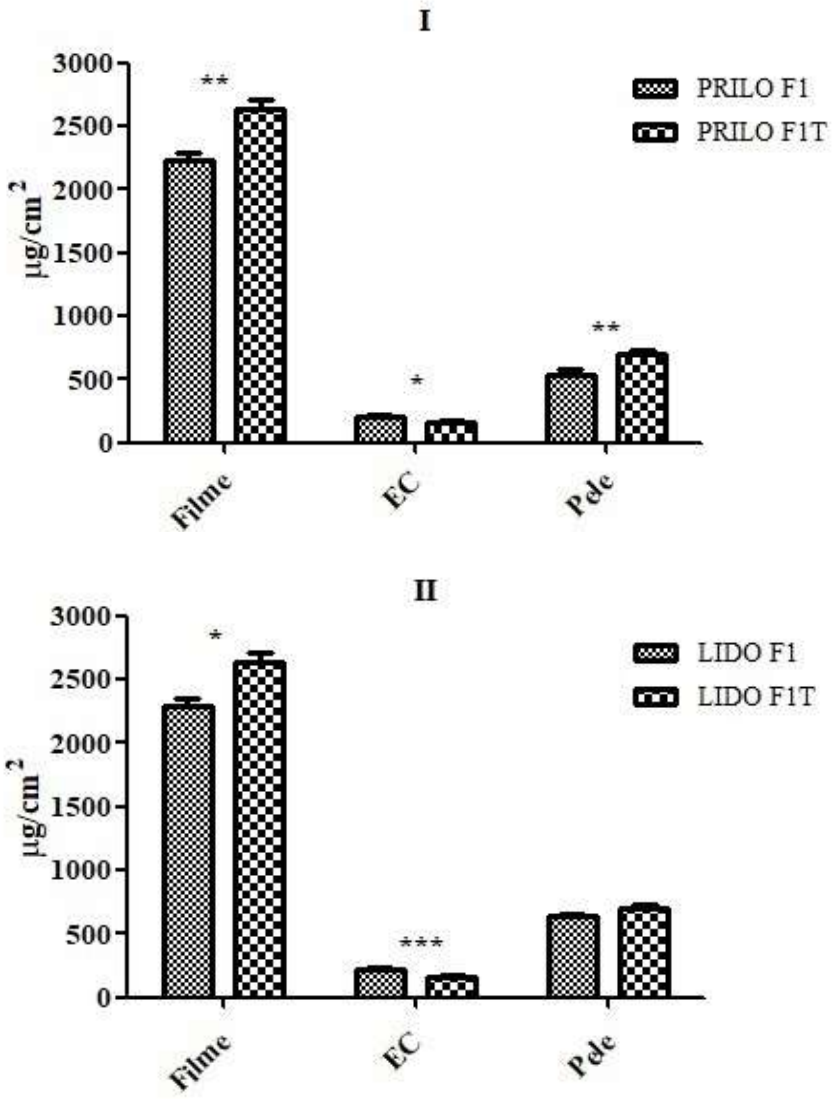
A **Figura 24** mostra a quantidade (µg/cm^2) dos fármacos remanescente no filme formado, no EC e na pele (epiderme + derme), após 1h de experimento. A quantidade remanescente foi em média 9mg para ambos os fármacos, o que corresponde a aproximadamente 60% do total, após 1h de contato entre a formulação e a pele. Esses dados são complementares aos apresentados no item **5.1.6** (experimento realizado em voluntários)**,** onde a quantidade de fármaco remanescente no filme formado, 1h após a aplicação das formulações foi em média 50%. A diferença na quantidade de fármaco, menor para o experimento realizado em voluntários, pode ser atribuída à circunstância em que ocorreu a permeação, ou seja, em um sistema dinâmico.

Desse modo, a maior carga de fármaco no sistema é importante para que, após a formação do filme, além da oclusão da lesão herpética, haja a liberação gradual de fármaco e a manutenção de um sistema reservatório que proporcionará ao usuário final do produto, não só conforto devido ao alívio da dor, propriedade intrínseca dos anestésicos em geral, mas também o impedimento da disseminação viral no momento do rompimento das vesículas herpéticas, fato melhor explicado no item **5.1.12.2**.

A pele constitui a principal barreira de entrada para substâncias e agentes nocivos no organismo (FOLDVARI, 2000). Sendo assim, o grande desafio no desenvolvimento de novos sistemas de uso tópico, é viabilizar a penetração do fármaco no EC e permeação para a camada da pele onde se deseja obter efeito. A quantidade de PRILO ($p<0,05$) e LIDO ($p<0,0005$) quantificada no EC foi significativamente maior para F1 em relação em F1T.

Ainda, a quantidade de PRILO retida na pele foi significativamente menor em F1($p<0,005$) quando comparada ao sistema que contém Transcutol® como promotor de permeabilidade. Já para a LIDO não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) na quantidade de fármaco retido na pele.

Figura 24: (I) Quantidade de prilocaína remanescente no filme e quantificada no EC e pele; **(II)** Quantidade de lidocaína remanescente no filme e quantificada no EC e pele.



Resultados expressos em média e desvio padrão (n=5). Analisados usando Teste T Student não pareado (monocaudal); (n=5); * p<0,05; ** p<0,005; *** p< 0,0005.

5.1.9 Análises Reológicas

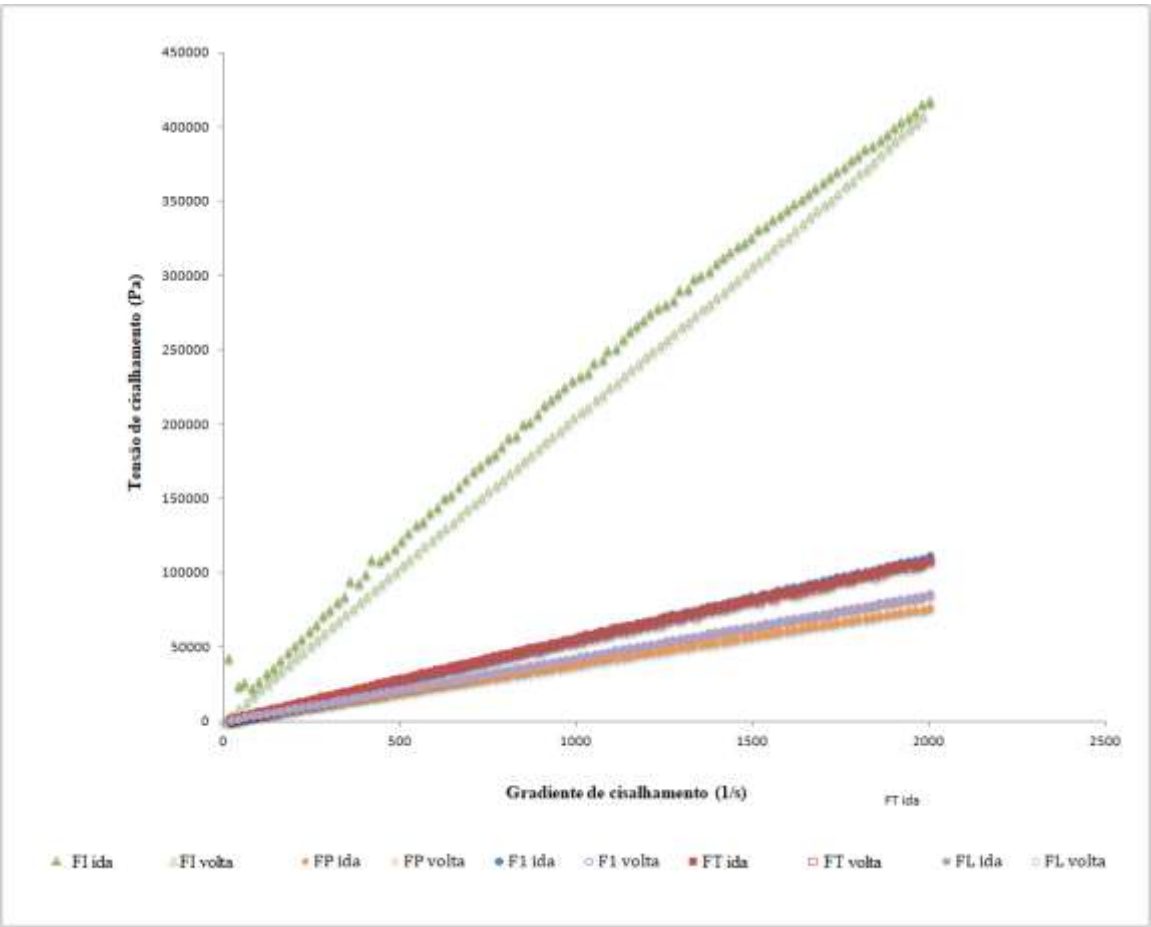
5.1.9.1 Reometria de cisalhamento contínuo

Um sistema semissólido formador de filme in situ, a ser utilizado na face e próximo à região bucal principalmente, deve não somente ter propriedades cosméticas adequadas, mas também boa espalhabilidade ao ser aplicado, ser confortável ao usuário, além de viscosidade

adequada a sua aplicação, isto é, ao ser aplicado não deve escorrer, pois assim terá o filme formado adequadamente sobre a lesão.

Na **Figura 25** estão dispostos os reogramas de cisalhamento contínuo das formulações FInerte, FP, FL, F1 e F1T. As formulações contendo somente PRILO (FP) e somente LIDO (FL) foram também analisadas para melhor entendimento da contribuição isolada de cada fármaco na formulação F1 em relação às propriedades reológicas.

Figura 25: Reograma de fluxo das formulações a 25ºC.



Cada reograma é a média de três replicatas. **FI (FInerte):** Formulação sem fármacos; **F1:** Formulação 1; **FP:** Formulação apenas com prilocaína base; **FL:** Formulação apenas com lidocaína base; **F1T:** formulação 1 + 1%Transcutol®.

Todos os sistemas apresentaram características de fluxo do tipo newtonianas, ou seja, relação quase linear entre tensão e gradiente de cisalhamento o que implica em viscosidade praticamente constante.

Essa característica, além de favorecer a formação adequada do filme in situ, permitindo a oclusão da lesão e consequente proteção a fatores externos (poeira, microorganismos), confere outra vantagem para o produto: independente do manuseio do

usuário, transporte e condições de armazenamento após a dispensação, a viscosidade será mantida conservando uma das propriedades fundamentais a esse sistema.

A comparação estatística dos efeitos de cada componente nas propriedades reológicas foi realizada utilizando a equação matemática da Lei da Potência, a partir do qual o índice κ e o índice *n* foram obtidos e estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10: Índice de consistência **(κ)** índice de comportamento de fluxo **(*n*).**

Formulações	κ (mPa.s)	*n*
FInerte	1125,966 ±41,6197	1,0583 ± 0,0165
FP	45,7067 ± 0,5493	1,0203 ± 0,0012
FL	58,7549 ± 1,8221	1,0136 ± 0,0129
F1	112,4100 ± 1,6145	1,0051 ± 0,0035
F1T	127,1333 ± 7,1164	1,0308 ± 0,0011

Resultados apresentados como média e DP de três replicatas. **FInerte:** Formulação sem fármacos; **FP:** Formulação apenas com PRILO base; **FL:** Formulação apenas com LIDO base;**F1:** Formulação 1; **F1T:** formulação 1 + 1%Transcutol®.

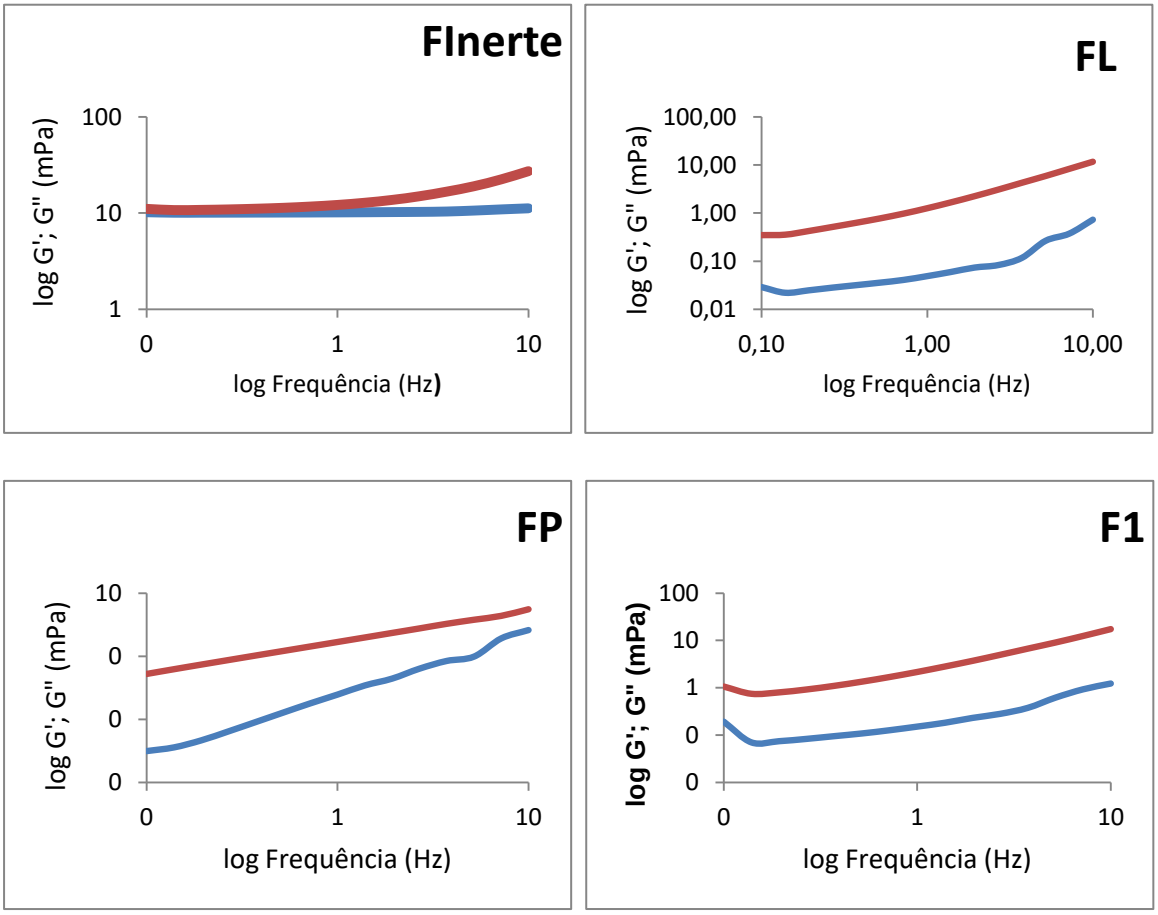
O maior índice de consistência ocorreu na FInerte. A adição dos fármacos isoladamente diminuiu drasticamente o índice de consistência, devido à diminuição da interação entre os polímeros. Entretanto, quando adicionados em conjunto, na ME, a diminuição foi mais branda, o sistema eutético, alterou a organização dos polímeros na formulação de maneira diferente em relação aos fármacos separados.

Para todas as formulações, o índice de comportamento de fluxo foi aproximadamente 1, confirmando o observado nos reogramas. Lasfargues et al., (2015), determinaram que a mistura eutética de nitrato de sódio e nitrato de potássio (60:40) também apresentam características de viscosidade praticamente constante, independente da taxa de cisalhamento. Dessa forma, pode-se inferir que o sistema eutético de PRILO: LIDO (1:1) seja o principal responsável pelas propriedades reológicas apresentadas nas composições.

5.1.9.2 Reometria oscilatória

Na **Figura 26** estão apresentados os reogramas oscilatórios para as formulações FInerte, FL, FP e F1.

Figura 26: Reogramas para as formulações FInerte (FI), FL, FP e F1.



Módulo elástico (G')(azul) e módulo viscoso (G'')(vermelho). Cada reograma é a média de três replicatas. **FI (FInerte):** Formulação sem fármacos; **FL:** Formulação apenas com LIDO base; **FP:** Formulação apenas com PRILO base; **F1:** Formulação 1.

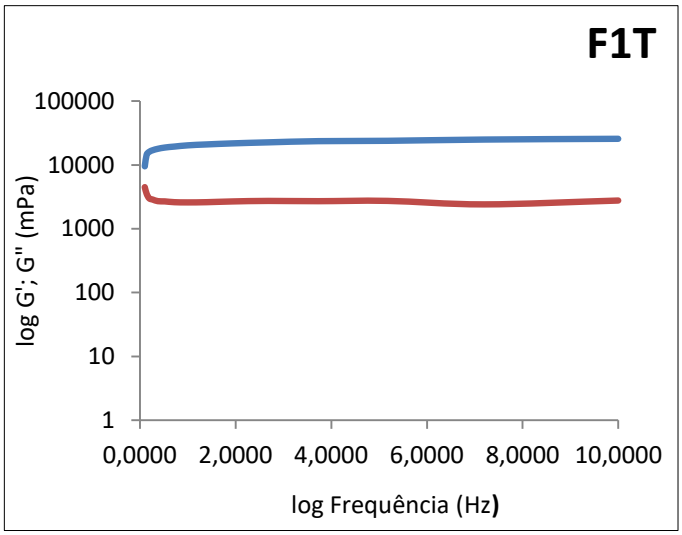
As propriedades viscoelásticas proporcionam informação sobre a natureza das estruturas de uma formulação e seu comportamento frente a forças não destrutivas, características que influenciam diretamente o desempenho de sistemas semissólidos (BRUSCHI, 2006). A medida oscilatória G' (módulo elástico) representa a energia armazenada por ciclo, dita como a resposta do sólido elástico. Ao tempo que, G'' (módulo viscoso) representa a energia dissipada por ciclo, referente ao comportamento líquido viscoso (JONES, 1999). Sendo assim, medidas de G''>G' caracterizam composições viscoelásticas.

O inverso G''< G' é, em reologia, considerado características dos géis (ROSSMURPHY & MCEVOY, 1986). Essas composições apresentaram um módulo viscoso maior que o elástico, comportando-se em toda faixa de frequência testada como um líquido viscoso.

Diferentemente das outras preparações, aquela que continha o Transcutol® mostrou um comportamento inverso **(Figura 27)** onde o módulo elástico foi maior que o viscoso pela

amplitude de frequência de 0,1 a 10 Hz. Dessa forma, esse sistema é considerado viscoelástico. Ainda, é possível depreender que houve um aumento da elasticidade da formulação com a adição desse componente.

Figura 27: Reograma para a F1T .



.

Módulo elástico (G')(azul) e módulo viscoso (G'')(vermelho).
Cada reograma é a média de três replicatas.
F1T: formulação 1 + 1%Transcutol®.

A reometria oscilatória fornece dados sobre a natureza estrutural da formulação (G'/G''). De acordo com as análises, o sistema F1T apresentou maior grau de estruturação e coesão em comparação às outras amostras. A adição do Transcutol® como promotor de absorção, com o intuito de melhorar a penetração e permanência dos fármacos na derme, também colaborou para melhorar as propriedades físico-químicas do sistema, tornando o agrupamento das moléculas de fármaco e polímero mais coeso, possivelmente por beneficiar a superfície de contato entre elas e mantê-las unidas. O Transcutol® é considerado um excelente agente solubilizante, sendo utilizado como cosolvente em diversos casos onde haja dificuldade de solubilização. Sendo assim, atribui-se a essa propriedade o comportamento da composição F1T perante as demais composições (BRUSCHI et al., 2007; JONES et al., 2009; SULLIVAN, GAD & JULIEN, 2014).

5.1.10 Ensaio de bioadesão in vitro

O termo bioadesão é usado para descrever a capacidade das macromoléculas (polímeros), sejam elas de origem natural, semissintéticas ou sintéticas, aderirem a tecidos biológicos. Esse processo ocorre apenas na presença de água (LONGER AND ROBINSON, 1986; BODDÉ AND LEIDEN, 1990; BLANCO-FUENTE et al., 1996). A bioadesão é utilizada como estratégia no desenvolvimento de composições de uso tópico para aumentar o tempo de permanência de um medicamento no local de aplicação e em consequência, o número de doses pode ser reduzido (VILLANOVA et al., 2010).

Na literatura diversos mecanismos foram sugeridos para explicar a bioadesão de polímeros, dentre elas: (I) teoria da adsorção devido as interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas devido ao alto número de carboxilas, (II) mecanismos eletrostáticos decorrentes da interação polímero-tecido (III) por difusão das cadeias poliméricas para as cadeias de mucina, ou todos os mecanismos agindo em conjunto para proporcionar a bioadesão (BASSI DA SILVA et al., 2017). Reinhart e Peppas 1984, relataram que o coeficiente de difusão depende do peso molecular da cadeia do polímero (BLANCO-FUENTE et al., 1996; SHAIKH et al., 2011) .

Os polímeros utilizados nas composições são de conhecida capacidade adesiva, (VILLANOVA et al., 2010). O HPMC não tem ainda bem esclarecido seu mecanismo de adesão, mas devido ao seu peso molecular tem alta capacidade de intumescimento pela formação das ligações de hidrogênio, crucial para a bioadesão. Enquanto, o policarbofil é um polímero aniônico e por isso, age provavelmente por interações eletrostáticas (SALAMANT-MILLER, CHITTCHANG & JOHNSTON, 2005; SILVA et al., 2002). Sendo assim, é importante que a adição dos fármacos não atrapalhe a propriedade bioadesiva da matriz.

A **Tabela 11** mostra os valores de trabalho de adesão para FI, F1 e F1T. Quando houve a incorporação dos fármacos em FI, o trabalho de bioadesão melhorou significativamente para F1 ($p<0,0005$) e F1T ($p<0,005$), uma hipótese é que os anestésicos diminuam a interação entre os componentes da composição, permitindo maior interação com o tecido.

Tabela 11: Trabalho de bioadesão para FI, F1 e F1T.

	Trabalho de bioadesão (N.mm ou µJ) ± DP
FInerte	0,463 ± 0,121
F1	1,005 ± 0,112
F1T	0,893 ± 0,130

ANOVA p< 0,0005 para FI e F1 e p<0,005 para FI e F1T, n=5.
FInerte (FI): Formulação sem fármacos; **F1:** Formulação 1;
F1T: formulação 1 + 1%Transcutol®.

5.1.11 Avaliação da citotoxicidade dos fármacos em células Vero

As células selecionadas para a realização deste ensaio foram as Vero. São células epiteliais, provenientes de uma linhagem de células obtidas a partir de células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), por serem susceptíveis à infecção pelo vírus HSV-1. A **Tabela 12** mostra a citotoxicidade dos fármacos (HAS, 2000).

Tabela 12: Citotoxicidade da prilocaína e lidocaína em células Vero.

	CC_{50} (µg/ml) ± DP	**CC_{50} (µM) ± DP**
Prilocaína	167,6 ± 13,5	760,8 ± 61,3
Lidocaína	175,9 ± 23,1	750,7 ± 98,7

CC_{50}: Concentração capaz de destruir 50% da monocamada de células Vero.
Número de experimentos independentes (realizados em triplicata): 03.
Resultados expressos em média e desvio padrão.

Embora a citotoxicidade dos anestésicos locais da classe das amidas já seja bem estabelecida na literatura (MOORE & HERSH, 2010), esses resultados mostraram que os fármacos são seguros para a aplicação em células epiteliais, uma vez que, é necessária alta dose dos mesmos para atingir a CC_{50} e, assim foi possível prosseguir com os testes de inibição da multiplicação viral (COS et al, 2006).

5.1.12 Avaliação in vitro da inibição da multiplicação viral (HSV-1) pelos fármacos

5.1.12.1 Avaliação da atividade antiviral

Não houve atividade antiviral dos fármacos em células Vero nas condições em que foram realizados os experimentos **(Tabela 13).** Esse resultado leva a suspeita de que, possivelmente, a atividade antiviral dos anestésicos, ou seja, a ação sobre o vírus após a infecção da célula hospedeira esteja relacionada com as células neuronais, ou seja, células excitáveis, uma vez que, é conhecido que após a infecção primária, o HSV-1, por ser um vírus com características neurotrópicas, se aloja no SNC (sistema nervoso central), onde permanece em latência, sendo reativado em condições específicas de estresse e/ou condições climáticas que levarão a depressão no sistema imunológico reativando o vírus (QUINLIVAN & BREUER, 2006). Sugerindo, por tanto, que o mecanismo de polarização-despolarização das células neuronais esteja envolvido no processo de contaminação da célula pelo vírion, estando, dessa forma, atrelado ao mecanismo de ação dos anestésicos em herpes.

Tabela 13: Atividade antiviral da prilocaína e lidocaína pelo método do MTT em células Vero.

	EC_{50} (µg/ml)	**EC_{50} (µM)**
Prilocaína	>100	>454,2
Lidocaína	>100	>425,7

$EC_{50:}$ concentração efetiva para qual 50% das células respondem ao fármaco. Número de experimentos independentes (realizados em triplicata): 03

5.1.12.2 Avaliação da atividade virucida

A **Tabela 14** expressa os resultados em proteção da infecção em relação a atividade virucida para a prilocaína e lidocaína. Para as concentrações testadas neste estudo, em média apenas 17% das células foram infectadas. Por isso, o valor de EC50 (concentração efetiva para qual 50% das células respondem ao fármaco) deverá estar abaixo de 6,25 µg/mL para ambos os anestésicos.

Tabela 14: Atividade virucida expressa em porcentagem de proteção da infecção para prilocaína e lidocaína.

Concentração (µg/mL) de ativo	Prilocaína	Desvio Padrão	Lidocaína	Desvio Padrão
100	89%	0,0524	80%	0,0072
50	84%	0,1628	83%	0,1003
25	78%	0,0541	86%	0,0577
12,5	73%	0,0228	85%	0,1527
6,25	83%	0,1396	83%	0,0453

Número de experimentos independentes (realizados em triplicata): 02. Resultados expressos em média e desvio padrão.

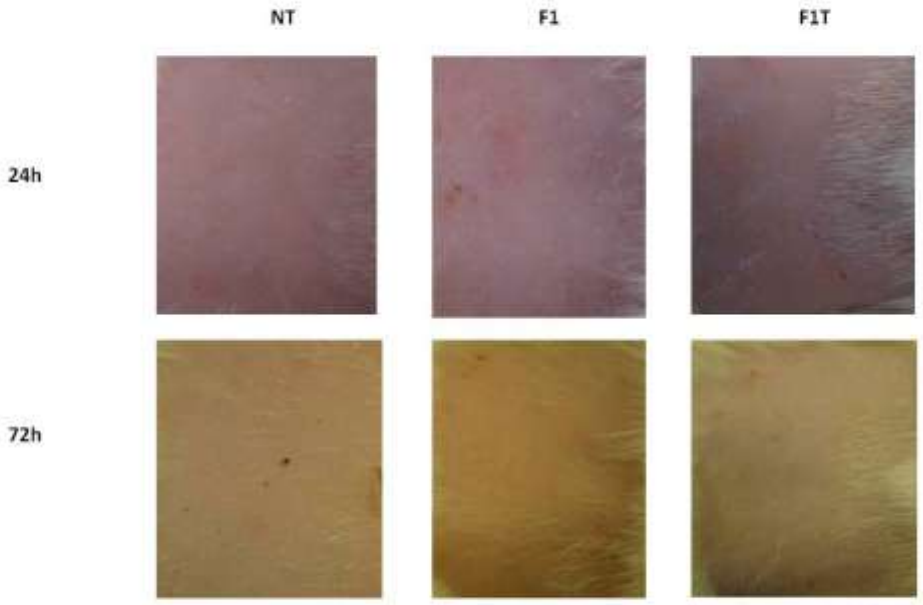
Ainda que o mecanismo de ação dos anestésicos em herpes não esteja estabelecido, há uma premissa de que sua a ação em herpes esteja diretamente ligada a partícula viral, ou seja, antes que haja a infecção das células. Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e ao serem impedidos de entrar na célula, tornam-se inativos. Sendo assim, sugere-se que quando o tratamento é aplicado na fase onde as vesículas herpéticas ainda não se romperam ou logo após o seu rompimento, haverá a prevenção da disseminação da doença, uma vez que, no conteúdo das vesículas existem milhões de partículas virais, que por sua vez, serão inativadas (CONSOLARO & CONSOLARO, 2009).

5.1.13 Avaliação biológica in vivo

5.1.13.1 Avaliação do potencial de irritação dérmica in vivo

O teste de irritação dérmica mostrou que os fármacos e os componentes das formulações não são irritantes ao exame macroscópico. Não houve aparecimento de edema e nem outro sinal de irritação dérmica **(Figura 28)**. Os testes histológicos serão realizados em outro momento para posterior comprovação desse comportamento.

Figura 28: Análise macroscópica dos animais (n=10) após a retirada das composições.



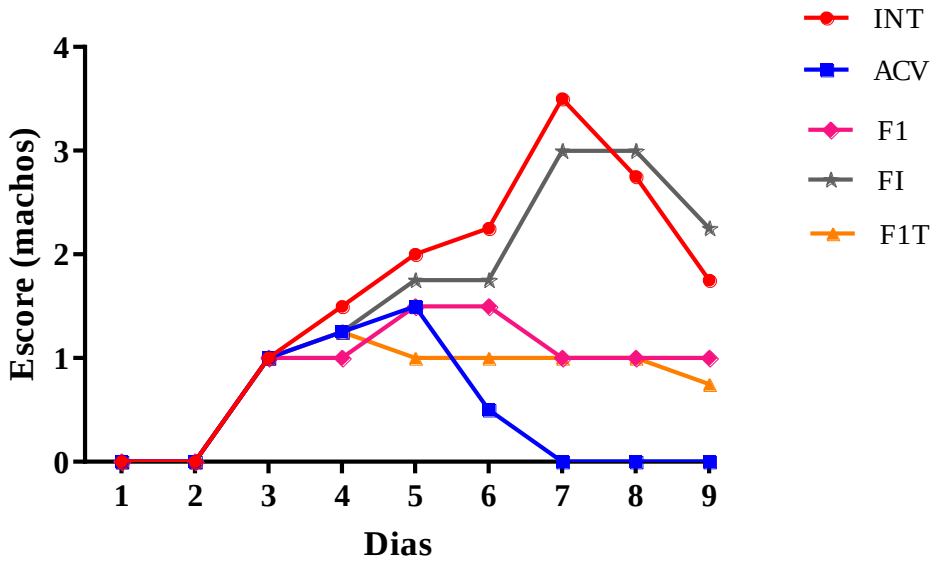
Arquivo do grupo de pesquisa.

5.1.14 Avaliação da eficácia terapêutica in vivo

O tratamento foi iniciado ao final do terceiro dia de infecção. Os animais tiveram o peso monitorado a cada 2 dias. Todos os grupos tratados foram comparados aos animais infectados e não tratados. Não houve diferença estatística no peso dos animais em nenhum dos tratamentos testados.

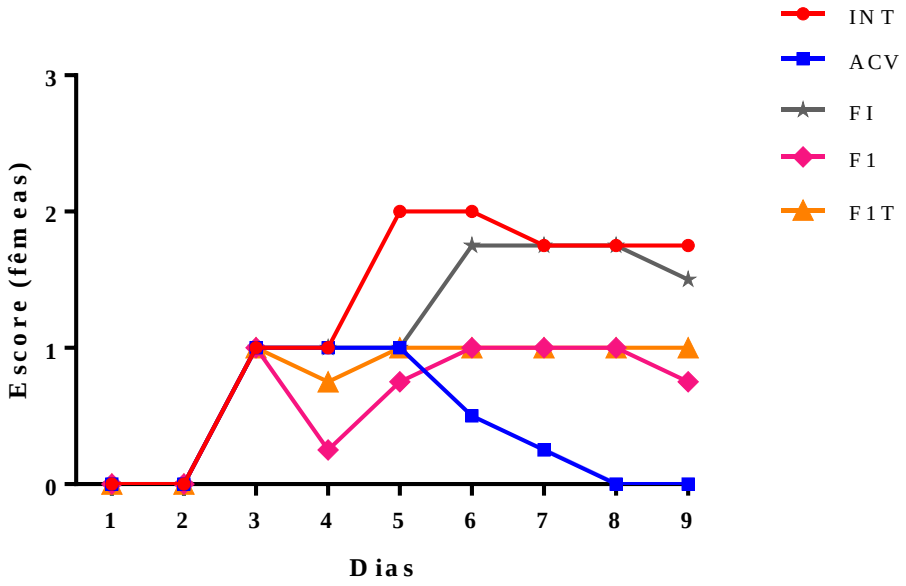
Para os machos, o tratamento com F1T foi significativo nos dias 5 ($p<0,05$), 6 ($p<0,005$), 7 e 8 ($p<0,0005$) e 9 ($p<0,05$). Para F1 o tratamento foi significativo nos dias 7 e 8 ($p<0,0005$). O aciclovir demonstrou diferença significativa na infecção do sexto ao nono ($p<0,0005$) dia de infecção. Para FI, não houve diferença significativa. O pico da infecção, de acordo com o gráfico de escore das lesões **(Figura 29)** aconteceu no sétimo dia de infecção.

Figura 29: Evolução diária (machos) com o escore das lesões durante o teste de eficácia terapêutica.



Para as fêmeas, o tratamento com F1 foi significativo nos dias 5 ($p<0,005$), 6 e 9 ($p<0,05$). Para F1T houve significância no tratamento nos dias 5 e 6 ($p<0,05$). Para o aciclovir, o tratamento foi significativo do quinto ($p<0,05$) ao nono dia ($p<0,0005$). O pico da infecção teve início no quinto dia e se manteve até o sexto dia **(Figura 30).**

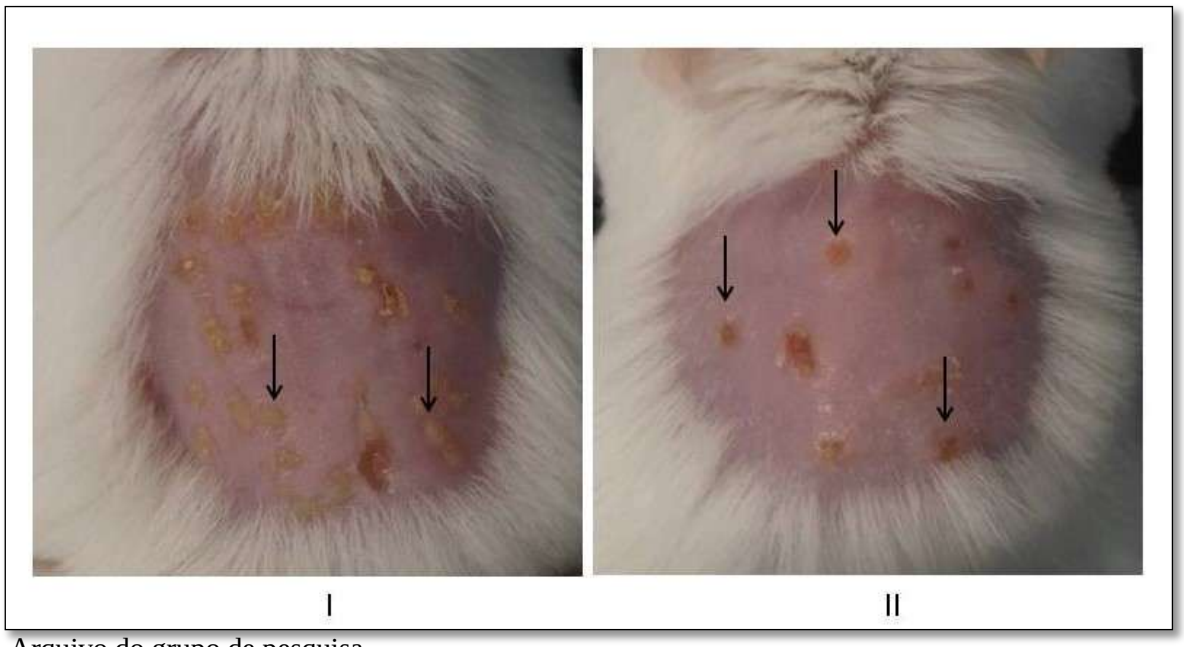
Figura 30: Evolução diária (fêmeas) com o escore das lesões durante o teste de eficácia terapêutica.



Durante o teste de eficácia, os animais foram fotografados diariamente para ilustrar a evolução das lesões conforme o tratamento utilizado. Na **Figura 31I** é possível observar as

vesículas fechadas da infecção. Enquanto na **Figura 31II**, a lesão em processo de cicatrização com a formação de crosta.

Figura 31: (I) Vesículas fechadas **(II)** Lesões em processo de cicatrização após o rompimento das vesículas.



Arquivo do grupo de pesquisa.

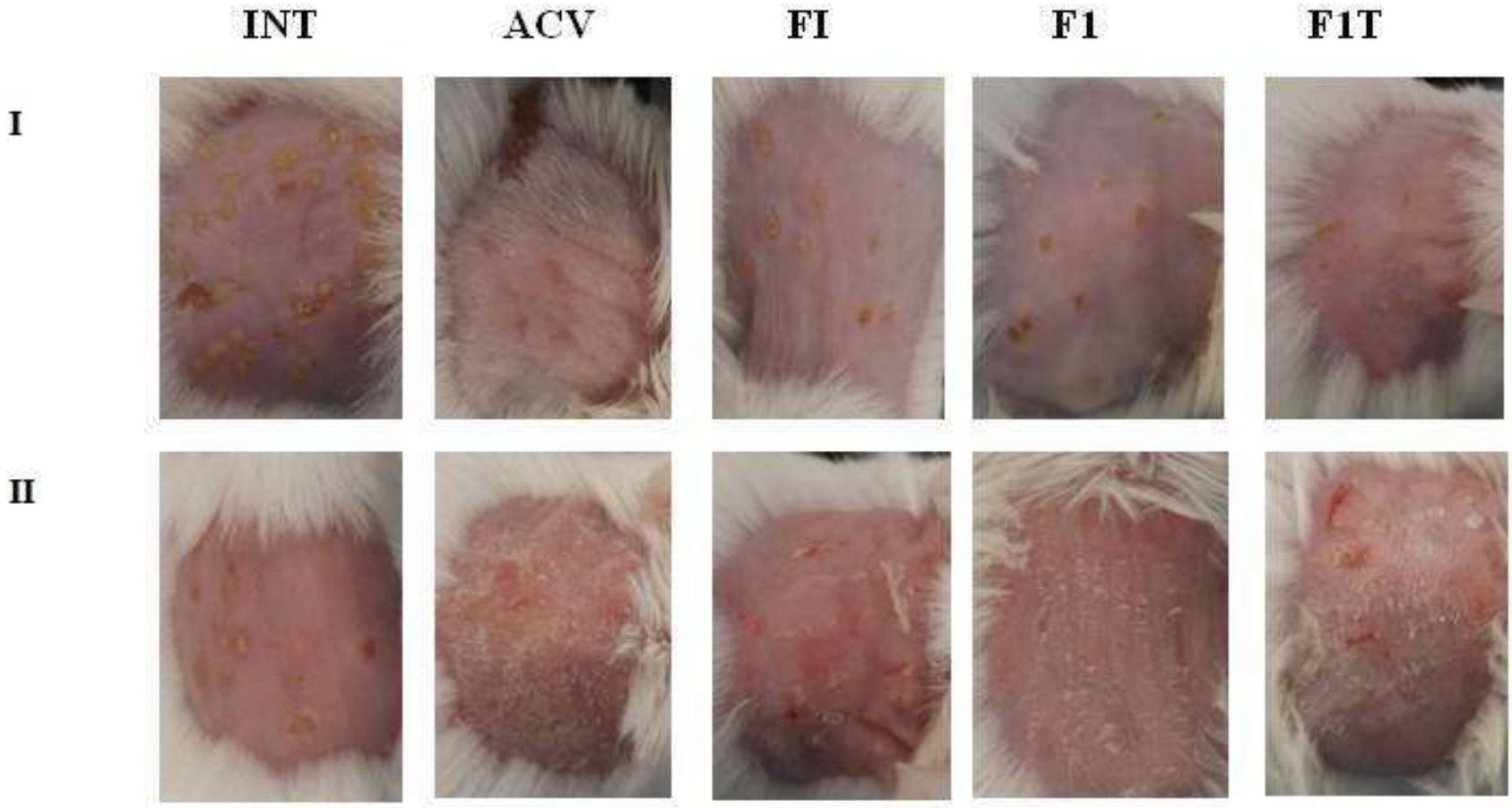
A **Figura 32** evidencia a evolução das lesões nos dias de pico da infecção, assim, é possível concluir que os anestésicos foram capazes de regredir as lesões causadas pelo HSV-1. Interessante ressaltar que, embora os animais tratados com ACV tenham tido grande melhora nos sintomas, o tratamento foi feito com outra posologia, totalizando mais de 10 aplicações por animal, enquanto que para F1 e FT foram feitas apenas 3 em menor período de tempo, que após 24 horas foram somente observados e já não recebiam mais o tratamento.

Ainda na **Figura 32**, é possível observar que a infecção nas fêmeas foi menos agressiva, uma vez que, as lesões se apresentaram em menor tamanho, com número reduzido de vesículas contendo partículas virais. Uma hipótese é a proteção hormonal das fêmeas. HAN et al., (2001) fez um estudo comparativo entre as infecções por HSV-1 em machos e fêmeas, nessa ocasião, os machos também tiveram infecções mais agressivas. Dessa forma, os hormônios femininos devem modular a resposta imune e por isso, interferir no processo de infecção e manifestação da doença.

Não obstante está o efeito de FI no tratamento, onde ainda que não tenha havido diferença significativa no escore das lesões, é notável a diferença no número de vesículas

quando este tratamento foi utilizado. Tendo, portanto, confirmada a suposição de que a proteção à lesão é essencial ao tratamento.

Figura 32: Lesões no dia de pico da infecção, **(I)** machos, **(II)** fêmeas.



6 CONCLUSÕES

Esses resultados, tomados em conjunto, permitem concluir que, ainda que novos estudos sejam necessários para o melhor entendimento do mecanismo de ação dos anestésicos contra o HSV-1, a formulação proposta é um tratamento eficaz para o herpes simples labial, um vez que, houve inibição da multiplicação viral, com proteção a infecção de aproximadamente 80% para a PRILO e LIDO nas concentrações testadas até o momento para o teste de atividade virucida. Sendo assim, os anestésicos podem diminuir o tempo de tratamento, uma vez que, possivelmente, agem anteriormente a entrada do vírion na célula.

Ademais, a formulação foi desenvolvida e caracterizada apresentando uniformidade de conteúdo e bioadesão, é capaz de secar em aproximadamente 20 minutos após a aplicação na pele, apresentando um aspecto final discreto, essencial para atender aos requisitos cosméticos.

Em relação aos experimentos de permeação passiva in vitro, as quantidades de PRILO e LIDO no líquido receptor não ultrapassaram os níveis tóxicos para nenhum dos fármacos, garantindo dose segura de acordo com os valores preconizados pela literatura, garantindo a ação tópica dos fármacos mediante aplicação na pele. A adição do Transcutol® como promotor de absorção melhorou a permeação dos anestésicos na pele.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessária ao desenvolvimento de medicamentos. **Brasília**, 31 de janeiro de 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC 166:** Validação de métodos analíticos. **Brasília**, 25 de julho de 2017.

AKHTAR, J., SHUKLA, D.Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes. **FEBS J.,** December ; 276(24): 7228–7236. 2009.

AZAMBUJA T.W.F., BERCINI F., FURLANETTO T.W. Herpes Simples: revisão de literatura. **R. Fac. Odonto.**, Porto Alegre. v.45, n.2, p.43-46, 12, 2004.

BASSI DA SILVA, J.; FERREIRA, S. B. S.; DE FREITAS, O.; BRUSCHI, M. L.. A critical review about methodologies for the analysis of mucoadhesive properties of drug delivery systems. **Drug Development And Industrial Pharmacy**, v. 43, p. 1-67, 2017.

BLANCO-FUENTE, S.; ANGUIANO-IGEA, S.; OTERO-ESPINAR, F.J.; BLANCO-MÉNDEZ, J. In vitro bioadhesion of carbopol hydrogels. Intern. **J. of Pharmaceutics**. 142, p.169-174. 1996.

BÁTAI I.; KERÉNYI, M.; TEKERES, M. The impact of drugs used in anaesthesia on bacteria. **European Journal of Anaesthesiology,** 16, 425-440, 1999.

BELSHE RB, LEONE PA, BERNSTEIN DI, WALD A, LEVIN MJ. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. **N Engl J Med** 366: 34–43. 2012.

BISCOPING J., BACHMANN-MENNENGA M.B. Local anesthetics from ester to isomer. **Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**, 35:285–92. 2000.

BODDÉ, H.E. AND LEIDEN, N.L. Principles of bioadhesion. In: **Gurny, R. and Junginger, H.E. (Eds.), Bioadhesion Possibilities and Future Trends**. 1990.

BRADY, R.C.; BERNSTEIN, D.I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, 61, 73–81, 2004.

BRUSCHI, M. L. Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)** – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

BRUSCHI, M.L. ; FREITAS, O. Oral bioadhesive drug delivery systems. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 31, 293-310, 2005.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M.P.D.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p 2074-2089, 2007.

CARDOZO, F. T. G. S.; LARSEN, I. V.; CARBALLO, E. V.; JOSE, G.; STERN, R. A.; BRUMMEL, R. C.; CAMELINI, C. M.; ROSSI, M. J.; SIMÕES, C. M. O.; BRANDT, C. R. *In vivo* anti-herpes simplex virus activity of a sulfated derivate of *Agaricus brasiliensis* mycelial polysaccharide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, 2013.

CARVALHO, J. C. A. Farmacologia dos Anestésicos Locais. **Revista Brasileira de Anestesiologia** 75. Vol. 44 : Nº 1, Janeiro - Fevereiro, 1994.

CASSUTO, J. Topical local anaesthetics and herpes simplex. **Lancet**, 1:100-101, 1989.

CASSUTO, J.; SINCLAIR, R.; BONDEROVIC, M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, 50, 265-282, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL and PREVENTION. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 51, 1-78, 2002.

CHATTOPADHYAY, D.; CHAWLA-SARKAR, M.; CHATERJEE, T.; DEY, R. S.; BAG, P.; CHAKRABORTI, S.; KHAN, M. T. H. Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of natural products. **New Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 348-368, 2009.

CHISHOLM, C; LOPEZ, L. Cutaneous Infections caused by Herpesviridae: a Review. **Arch Pathol Lab Med,** V.135, 2011.

CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M.F.M-O. Herpes Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, 14, 2009.

COS, P; VLIETINCK, A.J.; BERGHE D.V.; MAES, L. Review: Anti-infective potencial of natural products: How to developed a stronger in vitro ‘ proof-of-concept’. **Journal of Ethnopharmacology**. V.106, pag 290-302, 2006.

CUBAYACHI, C. Desenvolvimento de sistemas semissólidos mucoadesivos para liberação de anestésico e aplicação de iontoforese na cavidade bucal. **Dissertação de Mestrado.** 90f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.

DE AMICI, D.; RAMAIOLI, F.; CERIANA, P.; PERCIVALLE, E. Antiviral activity of local anaesthetic agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 37, 635, 1996.

DRÉNO B.; MALKIN, J.E.; SAIAG, P.; BATUJI-GARIN, S. Patients' profile, burden of disease and quality of life in recurrent herpes labialis: a survey conducted in USA and France. **Journal of the European Academy of Dermatology**, 26,1458-1460, 2012.

EKBLAD, M.; ADAMIAK, B.; BERGSTROM, T.; JOHNSTONE, K. D.; KAROLI, T.; LIU, L.; FERRO, V.; TRIBALA, E. A highly lipophilic sulphate tetrasaccharide glycoside relater to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against Herpes simplex virus. **Antiviral Research**, 86, 196-203, 2010.

EL HAYDERI L, RATY L, FAILLA V, CAUCANAS M, PAUROBALLY D, NIKKELS AF. Severe herpes simplex virus type-I infections after dental procedures. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. Jan 1;16 (1):e15-8, 2011.

FIALA S., BROWN B, M. B.; STUART A. J. Dynamic in-situ eutectic formation for topical drug delivery. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**; v 63: 1428–1436, 2010.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today,** v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FONSECA BAL. Clínica e tratamento das infecções pelos vírus herpes simplex tipo 1 e 2. **Medicina, Ribeirão Preto**, 32: 147-153, abr./jun. 1999.

HAS, V.R. Análise do comportamento de células Vero em géis de colágeno tipo I utilizando a técnica de cultivo em sanduíche. **Dissertação de mestrado**. Campinas, SP, 2000.

JACKSON T., MCLURE H.A. Pharmacology of local anesthetics. **Ophthalmol Clin N Am**.;19:155–61. 2006.

JEFFREY L. WRIGHT, MARCEL E. DURIEUX,. DANJA S. GROVES. A brief review of innovative uses for local anesthetics. **Current Opinion in Anaesthesiology**, 21:651–656, 2008.

JOHNSON, S.M.; JOHN, B.E.S.; DINE, A. P. Local Anesthetics as Antimicrobial Agents: A Review. **Surgical Infections,** 9, 205-213, 2008.

JOHNSTON C, KOELLE DM, WALD A. Current status and prospects for development of an HSV vaccine.**Vaccine** 32: 1553–1560. 2014

JONES, D. Dynamic mechanical analysis of polymeric systems of pharmaceutical and biomedical significance. **Intern. Journal of Pharmaceutics**. V. 179, p. 167-179. 1999.

JONES, D.S, BROWN, A.F., WOOLFSOM, A.D. Rheological characterization of bioadhesive, antimicrobial, semisolid designed for the treatment of periodontal diseases: transient and dynamic viscoelastic and continuous shear analysis. **J. Pharm. Sci,** Nova Yorque, v 90, n.12, 2001.

KARANDE P., JAIN, A., MITRAGOTRI, S. Relationships between skin's electrical impedance and permeability in the presence of chemical enhancers. **J. Control Release**., v. 110, n. 2. P-307-313, 2006.

KHEMIS, A.; DUTEIL, L.; COUDERT, A.C.; TILLET, Y.; DEREURE, O.; ORTONNE, J.P. Evaluation of the efficacy and safety of a CS20® protective barrier gel containing OGT compared with topical aciclovir and placebo on functional and objective symptoms of labial herpes recurrences: a randomized clinical trial. **Journal of the European Academy of Dermatology,** 26, 1240-1246, 2012.

KIMBERLIN, D.W. **Advances in the treatment of neonatal herpes simplex infections**. **Rev. Med. Virol.,**11, pp.157-163. 2001.

KUTCHAI, H.; GEDDIS, L.M. Inhibition of the Na,K-ATPase of canine renal medulla by several local anesthetics. **Pharmacological Research**, 43, 399-403, 2001.

LASFARGUES, M. CAO, H., GENG, Q., DING, Y. Rheological Analysis of Binary Eutectic Mixture of Sodium and Potassium Nitrate and the Effect of Low Concentration CuO Nanoparticle Addition to Its Viscosity. **Materials**, *8*, 5194-5204, **2015.**

LONGER, M.A. AND ROBINSON, J.R., Fundamental aspects of bioadhesion. **Pharmacy Int.**, 114-117. 1986.

LOOKER KJ, MAGARET AS, MAY MT, TURNER KME, VICKERMAN P, GOTTLIEB SL, NEWMAN L.M. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012.**Plos ONE 10**(10), 2015.

MALAMED, S. F. **Manual de anestesia local**. 5. ed. São Paulo: Elsevier. 2004.

MALKIN, A. Ya. Fundamental topies in theology: **Rheology Fundamentals.** Ontario ChemTee Publishing, 1994.

MAROTTI, J., ARANHA, A.C.C., EDUARDO, C.P., RIBEIRO, M.S.Treatment of herpes labialis through photodynamic therapy. **REV ASSOC PAUL CIR DENT**;62(5):370-3, 2008.

MASHRU, R.C; SUTARIYA, V.B.; SANKALIA, M.G.; PARIKH, P.P. Development and Evaluation of Fast-Dissolving Film of Salbutamol Sulphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.31, p.25–34, 2005.

MARTIN, A.; BUSTAMENTE, P., CHUN, A.H.C. Physical Pharmacy. **London: Lea & Febiger,** 4 ed., 622p. 1993.

MEDEIROS, A.C.D, SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R., DAMASCENO, B.P.G.L.Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada.**v. 31, n.3 p. 125-131, 2010.

MEDLEY. ACICLOVIR Creme Dermatológico. Disponível online: HTTP://www.medley.com.br/Download/Force/79. Acesso em: 18/12/2017.

MOORE, P.A. & HERSH, E.V. Local Anesthetics: Pharmacology and Toxicity. **Dent Clin N Am.** v. 54 p. 587–599. 2010.

MORFIN F., THOUVENOT, D.,. Review: Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. **Journal of Clinical Virology** v. 26 p.29-37, 2003.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NICOLL, M.P., PROENÇA, J.T., EFSTATHIOU, S. The molecular basis of herpes simplex virus latency**.** FEMS Microbiol Rev**.** May; 36(3): 684–705. 2012

NICOLA, A.V., HOU, J., MAJOR, E.O., STRAUS, S.E. Herpes Simplex Virus Type 1 Enters Human Epidermal Keratinocytes but nor neurons, via a pH-dependent Endocytic Pathway**. J. of Virology**, p.7609-7616. 06, 2005.

NICOLA, A.V., McELOY, A.M., STRAUS, S.E. Roles for endocytosis and Low pH in Herpes Simplex Virus Entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary. **J. Virology**. Vol. 77 n. 9 5324-5332. 2003.

HAN, X.; LUNDBERG, P.; TANAMACHI, B.; OPENSHAW, H.; LONGMATE, J. CANTIN, E. Gender Influences Herpes Simplex Virus Type 1 Infection in Normal and Gamma Interferon-Mutant Mice. **Journal of Virology.** P. 3048-3052. Vol. 75. N°6, **2001.**

OLIVEIRA, R.C.S. Desenvolvimento, Formulação e Avaliação de Sistemas de Libertação Transdérmica Incorporando Sistemas Ternários de Complexação (Fármaco/Ciclodextrina/Polímero). **Tese de doutorado**.Universidade do Porto; 2008.

PAIVA L., CAVALCANTI A. Anestésicos locais em odontologia: Uma revisão de literatura**. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa**, **11** (2): 35-42, 2005.

POLAT, B.E., HART, D., LANGER, R., BLANKSCHTEIN, D. Ultrasound-mediated transdermal drug delivery: Mechanisms, scope and emerging trends. **J. Control Release,** v. 152, n 3,p-330-348, 2011.

POSTE, G.; REEVE, P. Increased mobility and redistribution of concanavalin A receptors on cells infected with Newcastle disease virus. **Nature**, 247, 469–471, 1974.

QUINLIVAN, M., BREUER, J. Molecular studies of Varicella zoster virus. **Reviews in Medical Virology**. v 16: p. 225–250, 2006.

ROSSMURPHY, S.B. & MCEVOY, H. Fundamentals of Hydrogels and Gelation. **Br Polym J.** v. 18, n-1, p 2-7, 1986.

SALAMANT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v.57, p; 1666-1691. 2005.

SHAIKH, R.; SINGH, T.R.R; GARLAND, M.J; WOOFSON A.D.; DONNELLY, R.F. Mucoadehesive drug delivery systems. **J. Pharm. Bioallied Sci.** Jan-Mar, 3(1) p. 89-100. 2011.

SHUKLA, D., SPEAR, P. G. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry.**J. Clin. Investig**.**108:**503-510. 2001.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídios e proteínas: I. Estratégias gerais para aumento da biodisponibilidade oral. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 38, n. 2, abr./jun., 2002.

SPRUANCE, S.L.; KRIESEL, J.D. Treatment of herpes simplex labialis. **Herpes,** v. 9, p. 64-69, 2002.

SOBANKO, J.F, MILLER, C.J., ALSTER, T.S. Topical Anesthetics for Dermatologic Procedures: A review. **Dermatol Surg.** May;38(5):709-21. 2012.

SULLIVAN JR. D. W., GAD, S. C., JULIEN M. Review of the nonclinical safety of Transcutol®, a highly purified form of diethylene glycol monoethyl ether (DEGEE) used as a pharmaceutical excipient. **Food and Chemical Toxicology** 72 40–50, 2014.

TIWARI V., OH M., KOVACS M., SHUKLA, S.Y., VALYI-NAGY, T., SHUKLA, D. Role for nectin-1 in herpes simplex virus 1 entry and spread in human retinal pigment epithelial cells**. FEBS J**., 275 (21). 2008.

USP XXX. United States Pharmacopeia, 30 ed., **United States Pharmacopeial Convention:** Rockville,MD, 2007.

VILLANOVA, J. C. O. & ORÉFICE, R.L.; Aplicações farmacêuticas de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 20, nº 1, p. 51-64, 2010.

WILDY P. Herpes: history and classification. In: KAPLANAS, ed. **The herpesviruses**. Academic Press, New York, p. 1-25,1973.

WOOLFSON AD, MALCOLM RK, CAMPBELL K, JONES DS, RUSSELL JA Rheological, mechanical and membrane penetration properties of novel dual drug systems for percutaneous delivery. **J Control Release** 67:395–408. 2000.

YANAGI, K.; HARADA, S. Destabilization of herpes simplex virus type 1 virions by local anesthetics, alkaline pH, and calcium depletion. **Archives of Virology**,v. 108,p. 51-59, 1989.

YORK, P. Delineamento de formas farmacêuticas. In: AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2° ed., Porto Alegre: : Artmed, cap 1, p. 24, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1. Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa Humana

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da eficácia de composição semissólida precursora de filme formado in situ contendo anestésico tópico local para tratamento de pacientes com Herpes simplex

Pesquisador: Vinícius Pedrazzi
Área Temática:
Versão: 8
CAAE: 45356915.6.0000.5419
Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.441.476

Apresentação do Projeto:
O pesquisador inseriu o nome da aluna de IC na Plataforma Brasil.

Objetivo da Pesquisa:
Emenda.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Os pesquisadores adequaram todas as solicitações do CEP da FORP/USP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Adequado.

Recomendações:
Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:
Conforme deliberado no CEP, assim que o nome da aluna de IC estivesse na Plataforma Brasil, a Emenda poderia ser aprovada ad-referendum

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_942052_E2.pdf	05/12/2017 12:52:40		Aceito
Brochura Pesquisa	Gel_Filme_Herpes_2.pdf	05/12/2017 12:48:52	Vinícius Pedrazzi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_nova_outubro.pdf	30/10/2017 10:09:39	Vinícius Pedrazzi	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Emenda_2017.pdf	25/10/2017 07:29:22	Vinícius Pedrazzi	Aceito
Brochura Pesquisa	Gel_Filme_Herpes_2017.pdf	25/10/2017 07:28:27	Vinícius Pedrazzi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Gel_Herpes_Emenda.pdf	14/06/2017 15:32:52	Vinícius Pedrazzi	Aceito
Outros	relatorio_parcial.pdf	27/09/2016 09:23:01	Vinícius Pedrazzi	Aceito
Outros	Autorização infraestrutura uso clínica.pdf	21/05/2015 15:02:35		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Gel_Anestésico_Herpes_13_05_15.pdf	14/05/2015 11:30:04		Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

RIBEIRAO PRETO, 15 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

ANEXO 2. Aprovação Comitê de Ética Animal (CEUA)

Comissão de Ética no Uso de Animais
da
Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE COMPOSIÇÃO PRECURSORA DE FILMES FORMADOS IN SITU CONTENDO ANESTÉSICO TÓPICO LOCAL PARA TRATAMENTO DO HERPES", protocolada sob o CEUA nº 4800161216, sob a responsabilidade de **Tania Ueda Nakamura** *e equipe; Erica Benassi Zanqueta; Larissa Machado Valone; Osvaldo de Freitas; Vinícius Pedrazzi; Maíra Peres Ferreira; Amanda Cristina Funari Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 10/04/2017.

We certify that the proposal "DEVELOPMENT AND EVALUATION OF PRECURSORY COMPOSITION OF FILMS FORMED IN SITU CONTAINING ANESTHETIC LOCAL TOPIC FOR TREATMENT OF HERPES SIMPLEX.", utilizing 100 Isogenics mice (males and females), 80 Isogenic rats (males and females), protocol number CEUA 4800161216, under the responsibility of **Tania Ueda Nakamura** *and team; Erica Benassi Zanqueta; Larissa Machado Valone; Osvaldo de Freitas; Vinícius Pedrazzi; Maíra Peres Ferreira; Amanda Cristina Funari Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 04/10/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 03/2017 a 02/2019 Área: Dbs-Ciências Básicas da Saúde

Origem:	Biotério Central da UEM						
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	4 a 5 semanas	N:	100
Linhagem:	Balb-c			Peso:	15 a 20 g		
Origem:	Biotério Central da UEM						
Espécie:	Ratos isogênicos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	4 a 5 semanas	N:	80
Linhagem:	Wistar			Peso:	150 a 200 g		

Local do experimento: - Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (Bloco B-08); Universidade Estadual de Maringá: laboratório experimental in vivo (sala 001); laboratório de atividade antiviral (sala 002); laboratório de cultura de células (sala 003); - Laboratório de Desenvolvimento Farmacocinético (Bloco N) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: sala 14; - Laboratório de histotécnica animal (bloco H79) - Universidade Estadual de Maringá.

Maringá, 24 de janeiro de 2018

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Claudemir Martins Soares
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Av. Colombo, 5790, UEM-PPG, sala 4. CEP: 87020-900, Maringá-PR - tel: 55 (44) 3011-4444
Horário de atendimento: 2ª a 5ª, manhã e tarde. 6ª feira: somente tarde : e-mail: ceea@uem.br
CEUA N 4800161216