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

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

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

Silva, Amanda Cristina Funari.

Desenvolvimento e avaliação de composições 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

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. A forma semissólida facilita a aplicação, 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 foram desenvolvidas e avaliadas (F1 e F1T). Para quantificação dos fármacos a partir da formulação, um método analítico 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 adição do promotor de absorção aumentou a concentração dos fármacos no líquido receptor, no experimento de permeação passiva in vitro. As análises reológicas de cisalhamento contínuo e oscilatório classificaram as formulações como fluídos newtonianos e a F1T apresentou maior estruturação em relação a F1. As formulações não apresentaram irritação dérmica ao exame macroscópico. O teste in vivo de eficácia comprovou a capacidade 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.

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. The semisolid composition improves application and 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 labialis herpes. For quantified drugs in compositions an analytical method was revalidated with satisfactory parameters, as well the recovery of drug on porcine skin. The addition of absorption promoter results in more drugs in receptor medium. Rheological analyses shown the compositions are newtonians fluids and F1T has more cohesion than F1. None composition shown dermal irritation in macroscopical examination. The in vivo efficacy study prove 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.....	4
Figura 2: Sistema esquemático do ciclo de vida do HSV.	5
Figura 3: Manifestações clínicas presentes no período prodrômico.	6
Figura 4: Manifestação clínica no período clinicamente ativo.	7
Figura 5: Processo de cicatrização de lesão herpética.....	8
Figura 6: Estrutura da pele.	10
Figura 7: Vias de permeação de substâncias na pele.	11
Figura 8: Célula de difusão vertical encamisada; A: saída de água; B: entrada de água; C: coleta de alíquotas.	Erro! Indicador não definido.
Figura 9: Fragmento de pele dermatomizada após a retirada da formulação remanescente.	Erro! Indicador não definido.
Figura 10: Representação esquemática do método de <i>tape stripping</i> . Erro! Indicador não definido.	
Figura 11: (I) Aparato para a realização do experimento; (II) Experimento em execução. Erro! Indicador não definido.	
Figura 12: Redução enzimática do MTT a formazan em células metabolicamente ativas. O formazan é detectado a 570 nm.	Erro! Indicador não definido.
Figura 13: Cromatogramas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 14: Curvas analíticas dos fármacos em fase móvel e meio de liberação. Erro! Indicador não definido.	
Figura 15: Curvas analíticas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 16: Gráficos de distribuição dos resíduos em função da resposta analítica.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 17: Estruturas químicas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 18: Perfil de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos a partir formulação (F1), em solução salina, pH=7,0 a 25°C.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 19: Perfil de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos a partir de F1 em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37°C ± 2°C.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 20: Comparação entre perfis de liberação <i>in vitro</i> dos fármacos a partir da formulação (F1) e da formulação contendo promotor de absorção, em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37°C.	Erro! Indicador não definido.

Figura 21: Comparação entre perfis de liberação *in vitro* dos fármacos a partir da formulação (F1) e da formulação contendo promotor de absorção, em solução salina, pH=7,0, com temperatura controlada a 37°C, durante 24h.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 22: (I) Formulação semissólida (F1) t=0, (II) Formulação após aplicação de F1 t=60 min.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 23: Quantidade (mg) dos fármacos remanescentes**Erro! Indicador não definido.**

Figura 24: (I) Concentração dos fármacos quantificados no líquido receptor; (II) Concentração dos fármacos retidos na pele ao final de 1h de experimento.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 25: (I) Quantidade de fármaco remanescente e quantificada no EC e pele.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 26: Reograma de fluxo das formulações a 25°C.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 27: Reogramas para as formulações F1, FL, FP e F1**Erro! Indicador não definido.**

Figura 28: Reograma para a F1T.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 29: Análise macroscópica dos animais (n=10) após a retirada das composições.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 30: Evolução diária (machos) com o escore das lesões durante o teste de eficácia terapêutica.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 31: Evolução diária (fêmeas) com o escore das lesões durante o teste de eficácia terapêutica.....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 32: (I) Vesículas fechadas (II) Lesões em processo de cicatrização após o rompimento das vesículas.**Erro! Indicador não definido.**

Figura 33: Lesões no dia de pico da infecção, (I) machos, (II) fêmeas.....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das formulações semissólidas.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2: Análise estatística da Regressão Linear.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3: Teste de Grubbs para o fator resposta da curva de calibração em relação à detecção de *outliers*.**Erro! Indicador não definido.**

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

Tabela 5: Dados de exatidão do método analítico.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 6: Parâmetros avaliados para determinação da robustez do método analítico.**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 7: Dados de Robustez dos parâmetros temperatura, pH tampão, vazão fase móvel, lote da coluna e composição da fase móvel.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 8: Recuperação dos fármacos a partir da pele dermatomizada**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 9: Solubilidade (mg/mL) dos fármacos, nas formas base nos diferentes meios, à temperatura ambiente**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 10: Índice de consistência (κ) índice de comportamento de fluxo (n).**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 11: Trabalho de bioadesão para FI, F1 e F1T.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 12: Citotoxicidade dos fármacos em células Vero**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 13: Atividade antiviral dos fármacos pelo método do MTT em células Vero**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 14: Atividade virucida expressa em porcentagem de proteção da infecção....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACV	Aciclovir
ANOVA	Análise de variância
ATPase	Enzima adenosinatrifosfatase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
EC	Etrato Córneo
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
HSV	Herpes simplex vírus
INT	Infectados e não tratados
LogP	Logaritmo do Coeficiente de Partição
ME	Mistura Eutética
OMS	Organização Mundial de Saúde
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.....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3 OBJETIVO.....	Erro! Indicador não definido.
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido.
Materiais	Erro! Indicador não definido.
4.1.1 Pele suína.....	Erro! Indicador não definido.
4.1.2 Solução para ensaios de liberação e permeação in vitro.....	Erro! Indicador não definido.
Métodos	Erro! Indicador não definido.
4.1.3 Quantificação simultânea dos fármacos.....	Erro! Indicador não definido.
4.1.4 Estudo de solubilidade dos fármacos	Erro! Indicador não definido.
4.1.5 Desenvolvimento de composições	Erro! Indicador não definido.
4.1.6 Teor dos fármacos na composição	Erro! Indicador não definido.
4.1.7 Avaliação in vitro do perfil de liberação dos fármacos a partir das formulações.....	Erro! Indicador não definido.
Erro! Indicador não definido.	
4.1.8 Avaliação in situ	Erro! Indicador não definido.
4.1.9 Estudos de permeação passiva dos fármacos.....	Erro! Indicador não definido.
4.1.10 Ensaio de bioadesão in vitro	Erro! Indicador não definido.
4.1.11 Análises Reológicas	Erro! Indicador não definido.
4.1.12 Avaliação biológica in vitro.....	Erro! Indicador não definido.
Cultura de células, vírus	Erro! Indicador não definido.
Atividade antiviral	Erro! Indicador não definido.
Atividade virucida	Erro! Indicador não definido.
4.1.13 Avaliação biológica <i>in vivo</i>	Erro! Indicador não definido.
Animais.....	Erro! Indicador não definido.
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	
Erro! Indicador não definido.	
5.1.1 Quantificação simultânea dos fármacos.....	Erro! Indicador não definido.
Seletividade	Erro! Indicador não definido.
Linearidade	Erro! Indicador não definido.

Precisão.....	Erro! Indicador não definido.
Exatidão	Erro! Indicador não definido.
Limite de Detecção e Limite de Quantificação	Erro! Indicador não definido.
Robustez	Erro! Indicador não definido.
Recuperação a partir da pele suína	Erro! Indicador não definido.
5.1.2 Estudo de solubilidade dos fármacos	Erro! Indicador não definido.
5.1.3 Desenvolvimento de formulações.....	Erro! Indicador não definido.
5.1.4 Teor dos fármacos na composição	Erro! Indicador não definido.
5.1.5 Avaliação in vitro do perfil de liberação dos fármacos a partir da composição.....	Erro! Indicador não definido.
5.1.6 Avaliação da composição in situ.....	Erro! Indicador não definido.
5.1.7 Experimentos in vitro de permeação passiva dos fármacos.....	Erro! Indicador não definido.
5.1.8 Análises Reológicas	Erro! Indicador não definido.
5.1.9 Ensaio de bioadesão in vitro	Erro! Indicador não definido.
5.1.10 Avaliação da citotoxicidade dos fármacos em células Vero.....	Erro! Indicador não definido.
5.1.11 Avaliação in vitro da inibição da multiplicação viral (HSV-1) pelos fármacos.....	Erro! Indicador não definido.
5.1.12 Avaliação biológica in vivo	Erro! Indicador não definido.
5.1.13 Avaliação da eficácia terapêutica in vivo	Erro! Indicador não definido.
6 CONCLUSÕES.....	12
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

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-1 e 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 (THOUVENOT & MORFIN, 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.

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, o 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 trigeminal (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 sintomatologia 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, conhecida como 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.

Além do herpes labial e genital, as infecções por HSV-1 podem causar outras complicações, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou recém-nascidos. Nos Estados Unidos, as infecções oculares por HSV são a causa mais comum de perda da córnea (BRADY & BERNSTEIN, 2004). Infecções no SNC causadas por HSV-1 causam danos cognitivos graves aos pacientes (KENNEDY et al., 2002). Em recém-nascidos, 60-70% das infecções por HSV são causadas pelo tipo 2, acontecem geralmente no parto e possuem alta taxa de mortalidade se não forem imediatamente tratadas (KIMBERLIN, 2001).

Há vários agentes antivirais que são ativos contra o vírus do herpes, entre outros aciclovir, famciclovir, idoxuridina, vidarabina, foscarnet, valaciclovir, e interferon alfa. Entretanto, a maioria dos tratamentos disponíveis somente acelera a remissão das lesões e sintomas associados.

O aciclovir (2-amino-1,9-diidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purina-6-ona) é um nucleosídeo 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 nucleosídeos 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).

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 hidrofília, quando incorporados em formulações destinadas à permeação pela via cutânea, terão dificuldade em penetrar o estrato córneo. Enquanto, se apresentar elevada lipofília, 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 CONCLUSÕES

Esses resultados, tomados em conjunto, permitem concluir que, ainda que novos estudos sejam necessários para o melhor entendimento do mecanismo de ação dos fármacos contra o HSV-1, a formulação proposta é um tratamento eficaz para o herpes simples labial, uma vez que, houve inibição da multiplicação viral, com proteção a infecção de aproximadamente 80% nas concentrações testadas até o momento para o teste de atividade virucida. Sendo assim, os fármacos 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, apresentando um aspecto final discreto, essencial para atender aos requisitos cosméticos.

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

4 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. **Anesthesiol 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, 2011

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

KENNEDY, P. G. E.; CHAUDHURI, A. Herpes simplex encephalitis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 73, p. 237-238, 2002.

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.

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 topics in rheology: **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.; BUSTAMANTE, 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](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 not 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.

OLIVEIRA, R.C.S. Desenvolvimento, Formulação e Avaliação de Sistemas de Liberação 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. Mucoadhesive 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.

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**. 2º ed., Porto Alegre