

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
RAFAELA ZIELINSKI CAVALHEIRO DE MEIRA

INOVAÇÃO INCREMENTAL NO TRATAMENTO DE LESÕES HERPÉTICAS:
DESENVOLVIMENTO DE CREME CONTENDO PENCICLOVIR E LISINA

Guarapuava-PR

2020

RAFAELA ZIELINSKI CAVALHEIRO DE MEIRA

INOVAÇÃO INCREMENTAL NO TRATAMENTO DE LESÕES HERPÉTICAS:
DESENVOLVIMENTO DE CREME CONTENDO PENCICLOVIR E LISINA

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Desenvolvimento e Controle de Qualidade de Fármacos, Medicamentos e Correlatos, da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira

Coorientadora: Dr.^a Larissa Sakis Bernardi

Guarapuava-PR

2020



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

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



TERMO DE APROVAÇÃO

Rafaela Zielinski Cavalheiro de Meira.

Inovação Incremental no Tratamento de Lesões Herpéticas: Desenvolvimento de Creme Contendo Associação entre Penciclovir e Lisina.

Tese aprovada em 30 de setembro de 2020, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira,
Unicentro.
Presidente

Prof Dr. Emerson Carraro,
Unicentro.
Membro Titular

Prof.^a Dr.^a Ligia Carla Faccin Galhardi,
UEL.
Membro Titular

Prof. Dr. Marco Antônio Segatto Silva,
UFCS
Membro Titular

Prof. Dr. Liberato Brum Júnior,
Prati-Donaduzzi.
Membro Titular

ANEXO I

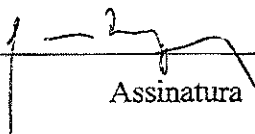
DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA
EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE**

Declaro que no dia 30/09/2020, às 08:00h horas participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de Tese (DISSERTAÇÃO/TESE) intitulada INOVAÇÃO NA PROFILAXIA E NO TRATAMENTO DE LESÕES HERPÉTICAS: ASSOCIAÇÃO ENTRE PENCICLOVIR E LISINA, do(a) candidato(a) Rafaela Zielinski Cavalheiro de Meira, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho do(a) candidato(a) quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que o(a) candidato(a) pode ser considerado(a): APROVADO.

Atenciosamente,


Assinatura

Nome: Liberato Brum Junior

Instituição: Prati Donaduzzi

Programa de Pós-Graduação (se for o caso):



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

ANEXO I

DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE

Declaro que no dia 30/09/2020, às 08:00 horas participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de **TESE** intitulada **INOVAÇÃO NA PROFILAXIA E NO TRATAMENTO DE LESÕES HERPÉTICAS: ASSOCIAÇÃO ENTRE PENCICLOVIR E LISINA**, do(a) candidato(a) **RAFAELA ZIELINSKI CAVALHEIRO DE MEIRA**, do Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho do(a) candidato(a) quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que o(a) candidato(a) pode ser considerado(a): **APROVADA** [APROVADO(A) OU REPROVADO(A)].

Atenciosamente,

Assinatura

Nome: Lígia Carla Faccin Galhardi

Instituição: Universidade Estadual de Londrina

Programa de Pós-Graduação (se for o caso): Microbiologia

ANEXO I

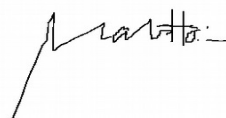
DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROPESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA
EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE**

Declaro que no dia **30/09/2020**, às **08:00** horas participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de TESE (DISSERTAÇÃO/TESE) intitulada **INOVAÇÃO NA PROFILAXIA E NO TRATAMENTO DE LESÕES HERPÉTICAS: ASSOCIAÇÃO ENTRE PENCICLOVIR E LISINA**, do(a) candidato(a) **RAFAELA ZIELINSKI CAVALHEIRO DE MEIRA**, do Programa de Pós-Graduação em **CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho do(a) candidato(a) quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que o(a) candidato(a) pode ser considerado(a): **APROVADA** [APROVADO(A) OU REPROVADO(A)].

Atenciosamente,



Assinatura

Nome: **MARCOS ANTONIO SEGATTO SILVA**

Instituição: **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Programa de Pós-Graduação (se for o caso): **FARMÁCIA**



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3.444, de 8 de agosto de 1997

ANEXO I

DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE

Declaro que no dia 30/09/2020, às 8:00 horas participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de tese intitulada Inovação na profilaxia e no tratamento de lesões herpéticas: associação entre penciclovir e lisina, do(a) candidato(a) Rafaela Zielinski Cavalheira de Meira, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho do(a) candidato(a) quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que o(a) candidato(a) pode ser considerado(a):
APROVADA.

Atenciosamente,

Assinatura

Nome: Emerson Carraro

Instituição: Unicentro

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas, associação ampla Unicentro-UEPG

ANEXO I

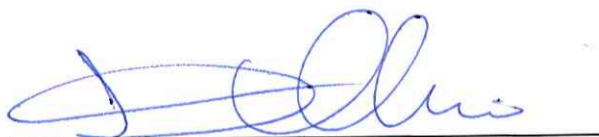
DA INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 1-PROESP/UNICENTRO, DE 29 DE MAIO DE 2020

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO À DISTÂNCIA EM BANCA
EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO OU TESE**

Declaro que no dia 30/09/2020, às 08:00 horas participei de forma síncrona remota com os demais membros que assinam a Ata física deste ato público, da banca de defesa de TESE (DISSERTAÇÃO/TESE) intitulada Inovação na Profilaxia e no Tratamento de Lesões Herpéticas: Associação entre Penciclovir e Lisina, do(a) candidato(a) Rafaela Zielinski Cavalheiro de Meira, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Considerando o trabalho avaliado e o desempenho do(a) candidato(a) quanto às arguições e os questionamentos dos membros da banca examinadora, ao preencher e assinar este documento declaro minha decisão de que o(a) candidato(a) pode ser considerado(a): APROVADO [APROVADO(A) OU REPROVADO(A)].

Atenciosamente,



Assinatura

Nome: Paulo Renato de Oliveira

Instituição: UNICENTRO

Programa de Pós-Graduação (se for o caso): Ciências Farmacêuticas

AGRADECIMENTOS

Toda honra e glória à Deus. Foi com Ele que cheguei até aqui!!!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNICENTRO e professores envolvidos, pela oportunidade que tenho vivenciado.

A CAPES/CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

Aos meus queridos professores, Paulo Renato de Oliveira (orientador) e Larissa Sakis Bernardi (co-orientadora), pela confiança no meu trabalho, pelo direcionamento que há tempos vêm me dando e pelo carinho com que tratam o lado pessoal e profissional que, nós alunos, trazemos até vocês!!! Saibam que são inspiração pra mim. Gratidão imensa!

Aos membros do Laboratório de Virologia da UEL, em nome da professora Lígia Carla Faccin Galhardi e da doutoranda Jéssica Wouk (UNICENTRO, em colaboração externa) por todo auxílio prestado em alguns dos experimentos descritos neste trabalho.

Aos professores Maurício Rigo (UNICENTRO), Fábio Seigi Murakami (UFPR) e Marcos Luciano Bruschi (UEM), bem como às suas equipes.

Aos Laboratório da Ambiotec e de Física Aplicada em Materiais da UNICENTRO, em nome de alunos e professores responsáveis.

À Dr.^a Cassiana Mendes, em nome do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (UFSC), pelo auxílio na realização de alguns experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Isa, Cami, Sarah, Débora, Samantha, Andressa, Rê, Gabi, Bê, Ju e Leti, um agradecimento cheio de carinho. Gratidão enorme a Jai, que muito me auxiliou.

Agradeço especialmente ao meu marido, aos meus pais e irmãos, bem como a toda nossa família por todo o apoio emocional e financeiro dedicado a esse sonho.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram com a realização deste trabalho...

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”
(Marthin Luther King)*

RESUMO

As infecções causadas pelo vírus herpes simplex (HSV) são muito comuns, apresentando grande importância médica e epidemiológica. Dentre as espécies virais, o HSV-1 apresenta maior soroprevalência, e é tipicamente transmitida durante a infância por meio da rota orofacial. O penciclovir está entre os fármacos mais utilizados para a profilaxia e tratamento tópico desta infecção. O número de medicamentos para o tratamento anti-herpético ainda é limitado, além da incidência aumentada da resistência viral aos existentes. Fármacos inovadores requerem muito investimento e muito tempo para entrar no mercado, então, uma nova estratégia está no refinamento de ativos já conhecidos e utilizados, seja em suas moléculas ou frente às formulações já comercializadas, a explorada inovação incremental. Atenção especial foi dada à lisina, um importante agente antiviral que vêm sendo indicado para a profilaxia e tratamento das lesões herpéticas, especialmente as orofaciais, por administração oral, juntamente aos fármacos clássicos. Estudos recentes idealizando o uso da lisina em formulações para este fim, associada ou não a outro ativo, são desconhecidos, fato que nos levou a considerar o desenvolvimento de um creme que associa penciclovir a lisina como uma possível fórmula inovadora. Análises in vitro dos ativos demonstraram ação antiviral sinérgica entre eles, com redução da IC50 dos fármacos quando em associação. Com esta constatação, seguiu-se com o desenvolvimento farmacotécnico da formulação, baseando-se no estudo de compatibilidade entre fármacos e excipientes, bem como em ensaios importantes na avaliação de propriedades do produto final. Os excipientes escolhidos para fazer parte da formulação foram a parafina, o lauril sulfato de sódio, o álcool cetosteárilico, o propilenoglicol e a vaselina líquida. O creme demonstrou comportamento pseudoplástico, característico de cremes farmacêuticos. Não houve crescimento de microorganismos nas análises microbiológicas, revelando sua qualidade e segurança diante da presença de um bom sistema conservante. Para a avaliação da estabilidade e também da permeação dos fármacos utilizando Célula de Franz, metodologias analíticas por HPLC foram desenvolvidas e validadas. A estabilidade do produto foi comprovada com a inalteração dos teores dos fármacos e o penciclovir demonstrou permear de igual modo em formulações com e sem a presença de lisina. A experimentação em modelo animal convergiu com os objetivos do trabalho, já que a formulação que associa esses dois ativos apresentou ação muito mais rápida do que os cremes que os apresentavam isolados. No terceiro dia de tratamento, o grupo

tratado com o creme proposto neste trabalho já se equiparou ao grupo controle negativo, enquanto que esse resultado só pode ser obtido no sétimo dia pelo grupo tratado com o creme que continha apenas o penciclovir. A formulação idealizada e desenvolvida: um creme, seguro e eficaz, contendo penciclovir e lisina, torna-se então, uma inovação incremental no tratamento das lesões herpéticas (número do processo do depósito de patente: BR 10 2020 014414 6).

Palavras-chaves: Penciclovir, Lisina, HSV-1, Inovação Incremental, Creme, Estudo de Compatibilidade.

ABSTRACT

Infections caused by the herpes simplex virus (HSV) are very common, with large medical and epidemiological importance. Among the viral species, HSV-1 has higher seroprevalence, and is typically transmitted during childhood through the orofacial route. Penciclovir is among the most used drugs for the prophylaxis and topical treatment of this infection. The number of drugs for anti-herpetic treatment is still limited, in addition to the increased incidence of viral resistance to existing ones. Innovative drugs require a lot of investment and a lot of time to enter the market, so a new strategy is in the refinement of already known and used assets, either in their molecules or in the face of already commercialized formulations, the explored incremental innovation. Special attention was given to lysine, an important antiviral agent that has been indicated for the prophylaxis and treatment of herpetic lesions, especially orofacial lesions, by oral administration, together with classic drugs. Recent studies idealizing the use of lysine in formulations for this purpose, associated or not with another active, are unknown, a fact that led us to consider the development of a cream that combines penciclovir with lysine as a possible innovative formula. In vitro analyzes of the assets showed synergistic antiviral action between them, with a reduction in the IC₅₀ of the drugs when combined. With this observation, it followed with the pharmacotechnical development of the formulation, based on the study of compatibility between drugs and excipients, as well as on important tests in the evaluation of properties of the final product. The excipients chosen to form part of the formulation were paraffin, sodium lauryl sulfate, ceto-stearyl alcohol, propylene glycol and liquid petroleum jelly. The cream showed pseudoplastic behavior, characteristic of pharmaceutical creams. There was no growth of microorganisms in microbiological analyzes, revealing their quality and safety in the presence of a good preservative system. For the evaluation of the stability and also of the permeation of the drugs using Franz Cell, analytical methodologies by HPLC were developed and validated. The stability of the product was proven with the unchanged drug contents and penciclovir has been shown to permeate equally in formulations with and without the presence of lysine. Animal model experimentation converged with the objectives of the study, since the formulation that combines these two actives showed much faster action than the creams that presented them alone. On the third day of treatment, the group treated with the cream proposed in this study has already matched the negative control group, whereas this result can only be obtained on the seventh day by the

group treated with the cream that contained only penciclovir. The idealized and developed formulation: a cream, safe and effective, containing penciclovir and lysine, then becomes an incremental innovation in the treatment of herpetic lesions (patent filing process number: BR 10 2020 014414 6).

Keywords: Penciclovir, Lysine, HSV-1, Incremental Innovation, Cream, Compatibility Study.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química do PCV.....	31
Figura 2: Mecanismo de ação do PCV. F: fosfato; MF: monofosfato; DP: difosfato; TP: trifosfato) (adaptado de DE CLERCQ, 2004a).	32
Figura 3: Estrutura química da LIS.....	34
Figura 4: Replicação do HSV (adaptada de LUSSIGNOL; ESCLATINE, 2017).....	38
Figura 5: Fatores que podem afetar a compatibilidade entre fármacos e excipientes (MATOS, 2013).	40
Figura 6: Representação dos tipos de emulsão. A. emulsão óleo em água; B. emulsão água em óleo; C. emulsão múltipla água/óleo/água; D. emulsão múltipla óleo/água/óleo (adaptado de AULTON, 2016).	42
Figura 7: Etapas para o desenvolvimento de metodologia analítica.	47
Figura 8: Etapas de execução do trabalho.	55
Figura 9: Esquema representativo do ensaio de citotoxicidade por MTT (imagem original retirada de http://www.directindustry.com).	58
Figura 10: Esquema representativo da avaliação da atividade antiviral por MTT (imagem original retirada de http://www.directindustry.com).	60
Figura 11: Esquema representativo da avaliação da atividade antiviral profilática da LIS por MTT (imagem original retirada de http://www.directindustry.com).	63
Figura 12: Triplicata do ensaio de permeabilidade <i>in vitro</i>	77
Figura 13: Curvas de DSC/TG da mistura PCV, LIS e PCV-LIS.	91
Figura 14: Análise experimental de DRXP de PCV, LIS e PCV-LIS.....	93
Figura 15: Espectro de FTIR do PCV.....	94
Figura 16: Espectro de FTIR da LIS.....	95
Figura 17: Espectro de FITR de PCV, LIS e PCV-LIS.....	96
Figura 18: Fotomicrografias de PCV, LIS e PCV-LIS obtidas por MEV (2880x).....	97
Figura 19: Curvas de DSC/TG de PCV-LIS, EDTA e EDTA-PCV-LIS, PROPIL e PROPIL-PCV-LIS e METIL e METIL-PCV-LIS.	99
Figura 20: Curvas de DSC/TG de PCV-LIS, BHT e BHT-PCV-LIS, PARAF e PARAF-PCV-LIS e LAURIL e LAURIL-PCV-LIS.	101
Figura 21: Curvas de DSC/TG de PCV-LIS, POLAWAX e POLAWAX-PCV-LIS e ALC CET e ALC CET-PCV-LIS.....	103

Figura 22: Curvas de DSC/TG de PCV-LIS, PROP GLI e PROP GLI-PCV-LIS e VAS LIQ e VAS LIQ-PCV-LIS.....	105
Figura 23: Áreas de espalhabilidade das formulações desenvolvidas (F1;F2;F3;F4) e das formulações referência de aciclovir (Zovirax [®]) e penciclovir (Penvir [®]).	107
Figura 24: Áreas de espalhabilidade da formulação F2 e da desenvolvida pelo método EHL.	108
Figura 25: Centrifugação das formulações F1; F2 F3; F4 e EHL.	109
Figura 26: Curvas de fluxo de viscosidade aparente vs. velocidade para creme desenvolvido sem EHL.....	110
Figura 27: Curvas de fluxo de viscosidade aparente vs. velocidade para o creme preparado conforme o método EHL.	110
Figura 28: Cromatogramas do estudo de degradação forçada do PCV em UV, T ^o , HCl 0,5M, NaOH 0,05M e H ₂ O ₂ 5 e 10%.	118
Figura 29: Cromatogramas do estudo de degradação forçada da LIS em UV, T ^o , HCl 2M, NaOH 0,25M e H ₂ O ₂ 5 e 10%.	120
Figura 30: Curva de linearidade do PCV em HPLC.	121
Figura 31: Curva de linearidade da LIS em HPLC.	122
Figura 32: Cromatogramas de A: metanol:água (20:80) e de B: PCV 10 µg mL ⁻¹	122
Figura 33: Cromatogramas de A: OPA-MPA e de B: LIS 10 µg mL ⁻¹	123
Figura 34: Efeitos não significativos na robustez da metodologia analítica por HPLC para PCV, com condições cromatográficas randomizadas.	127
Figura 35: Efeitos não significativos na robustez da metodologia analítica por HPLC para LIS, com condições cromatográficas randomizadas.	129
Figura 36: Lesões oriundas da infecção por HSV-1 e suas representações conforme o escore determinado por Cardozo et al. (2013).	135
Figura 37: Análise das lesões por dia de tratamento e por grupo tratado.	136
Figura 38: Etapas na síntese do composto que conjuga fulereno, aciclovir e lisina. .	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Soluções de trabalho de PCV e de LIS.	57
Tabela 2: Concentrações de PCV e de LIS inoculadas na microplaca para o ensaio de citotoxicidade.....	57
Tabela 3: Concentrações de PCV e de LIS inoculadas na microplaca para a avaliação da atividade antiviral.....	59
Tabela 4: Concentrações de LIS inoculadas na microplaca para a avaliação da atividade antiviral profilática.	62
Tabela 5: Constituição das formulações ensaiadas.	66
Tabela 6: Dimensões das células de Franz utilizadas nos experimentos de permeabilidade <i>in vitro</i>	77
Tabela 7: Desenho experimental do ensaio <i>in vivo</i>	80
Tabela 8: Classificação das lesões oriundas da infecção por HSV-1 conforme Cardozo et al. (2013).	80
Tabela 9: Ensaio de citotoxicidade do PCV.	82
Tabela 10: Ensaio de citotoxicidade da LIS.	83
Tabela 11: Ensaio de atividade antiviral do PCV contra o HSV-1.	83
Tabela 12: Ensaio de atividade antiviral da LIS contra o HSV-1.	84
Tabela 13: Ensaio de atividade antiviral sinérgica de PCV e de LIS contra o HSV-1..	85
Tabela 14: Ensaio de atividade antiviral profilática da LIS contra o HSV-1.....	86
Tabela 15: Excipientes presentes em formulações de cremes genéricos de aciclovir.	87
Tabela 16: Excipientes presentes em formulações de cremes similares de aciclovir.	89
Tabela 17: Excipientes presentes em formulações de cremes referência de aciclovir e de penciclovir.	90
Tabela 18: Temperatura do pico de PCV e LIS em várias misturas de fármacos-excipiente.	98
Tabela 19: Parâmetros reológicos para o modelo de Ostwald-de-Waele.	111
Tabela 20: Contagem em placas de microrganismos aeróbios, de fungos e patogênicos.....	112
Tabela 21: Contagem de microrganismos no Ensaio desafio do conservante.....	112
Tabela 22: Condições cromatográficas das metodologias analíticas correspondentes indicativas de estabilidade e para a análise de teor de PCV e de LIS.	115

Tabela 23: Teores encontrados no estudo de degradação forçada do PCV.....	117
Tabela 24: Teores encontrados no estudo de degradação forçada da LIS.....	119
Tabela 25: Precisão interdia e entre analistas da metodologia analítica por HPLC para PCV.....	124
Tabela 26: Precisão interdia e entre analistas da metodologia analítica por HPLC para LIS.....	125
Tabela 27: Exatidão da metodologia analítica por HPLC para PCV.....	125
Tabela 28: Exatidão da metodologia analítica por HPLC para LIS.....	126
Tabela 29: Robustez da metodologia analítica por HPLC para PCV, com condições cromatográficas randomizadas.	128
Tabela 30: Robustez da metodologia analítica por HPLC para LIS, com condições cromatográficas randomizadas.	130
Tabela 31: Análise do teor de PVC e LIS em formulações sujeitas a condições de estabilidade acelerada.	131
Tabela 32: Resultados do PCV no ensaio de permeação <i>in vitro</i>	132
Tabela 33: Resultados do PCV no ensaio de <i>Tape stripping</i>	133
Tabela 34: Resultados do PCV no ensaio de retenção cutânea.	134
Tabela 35: Avaliação estatística (Tukey) da evolução das lesões nos grupos.....	136

LISTA DE SIGLAS

Abs	Absorbância
A/O	Água/Óleo
A/O/A	Água/Óleo/Água
ALC CET	Álcool Cetoestearílico
ANOVA	Análise de Variância
BHT	Di-terc-butil metil fenol
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC	Controle de Célula
CV	Controle de Vírus
CC50	Concentração Citotóxica (50% de Inviabilidade Celular)
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPR	Desvio Padrão Relativo
DRXP	Difração de Raio-X de pó
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
F.A.	Fase Aquosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL	Fluorescência
F.O.	Fase Oleosa
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com transformada de Fourier
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSV	Vírus <i>Herpes simplex</i>
HSV-1	Vírus <i>Herpes simplex</i> tipo 1
HSV-2	Vírus <i>Herpes simplex</i> tipo 2
IC	Índice de Combinação
IC50	Concentração Inibitória (50% de Inibição na Atividade Viral)
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
LARIL	Lauril Sulfato de Sódio
LIS	Cloridrato de Lisina
LD	Limite de Detecção
LogP	Coeficiente de Partição

LQ	Limite de Quantificação
METIL	Metilparabeno
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MPA	2-mercaptoetanol
MTT	[3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo]
O/A	Óleo/Água
O/A/O	Óleo/Água/Óleo
OPA	Ortoftaldeído
OPA-MPA	Reagente de Derivatização
Pa	Pascal
Pa s ⁿ	Pascal segundo
PARAF	Parafina
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
PCV	Penciclovir
pH	Potencial Hidrogeniônico
pka	Coeficiente de Ionização
p/p	peso/peso
PROPIL	Propilparabeno
PROP GLI	Propilenoglicol
RNA	Ácido Ribonucleico
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
<i>Tendset</i>	Temperatura Final do Pico
TFA	Ácido Trifluoracético
TG	Termogravimetria
<i>Tpeak</i>	Temperatura do Pico
Tr	Tempo de Retenção
u.a.	Unidade de Absorbância
UEM	Universidade Estadual de Maringá
USP	<i>United States Pharmacopeial</i>
x g	Veze a gravidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3 REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1 Vírus <i>Herpes simplex</i>	29
3.2 Penciclovir	31
3.3 Lisina	34
3.4 Desenvolvimento da Formulação	35
3.4.1 Atividade dos Fármacos <i>in vitro</i>	37
3.4.2 Caracterização do Estado Sólido da Matéria-Prima e Estudo de Compatibilidade Fármacos-Excipientes	39
3.4.3 Formulação: Creme	42
3.4.4 Análise da Estabilidade, Comportamento Reológico e Características da Formulação	44
3.4.5 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica Indicativa de Estabilidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	46
3.4.6 Análise da Permeação dos Fármacos Presentes na Formulação	49
3.4.7 Análise <i>in vivo</i> da Eficácia da Formulação em Modelo Animal	50
4 MATERIAIS	52
4.1 Materiais, Substâncias e Reagentes	52
4.2 Equipamentos	53
5 MÉTODOS	55
5.1 Análise <i>in vitro</i> da Atividade Antiviral	56
5.1.1 Cultivo das Células Vero	56
5.1.2 Ensaio de Citotoxicidade por MTT para Avaliação de Viabilidade Celular	56
5.1.3 Atividade Antiviral por MTT (Triagem) após Infecção por HSV-1	59

5.1.3.1 Avaliação do Potencial Sinergismo Antiviral de PCV-LIS.....	61
5.1.3.2 Atividade Antiviral Profilática da LIS por MTT (Triagem) na Infecção por HSV-1.....	62
5.2 Seleção de Excipientes	63
5.3 Caracterização do Estado Sólido das Matérias-Primas	63
5.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)/Termogravimetria (TG)	63
5.3.2 Difração de Raios-X em Pó (DRXP).....	64
5.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Difusa (FTIR).....	64
5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	64
5.4 Estudo de Compatibilidade Fármacos-Excipientes	65
5.5 Desenvolvimento/Preparo do Creme	65
5.5.1 Espalhabilidade, pH e Teste da Centrífuga	68
5.5.2 Comportamento Reológico.....	68
5.5.3 Análise Microbiológica.....	69
5.6 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica Indicativa de Estabilidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	70
5.6.1 Desenvolvimento da Metodologia Analítica por HPLC	70
5.6.2 Validação da Metodologia Analítica por HPLC.....	72
5.6.2.1 Seletividade e Estudo de Degradação Forçada	72
5.6.2.2 Linearidade.....	73
5.6.2.3 Limites de Detecção e Quantificação	73
5.6.2.4 Precisão	74
5.6.2.5 Exatidão	74
5.6.2.6 Robustez e Estabilidade da Amostra	75
5.6.3 Análise da Estabilidade da Formulação	75
5.7 Análise da Permeação dos Fármacos Presentes na Formulação.....	76
5.7.1 Obtenção da Pele de Orelha de Porco.....	76

5.7.2 Ensaio de Permeação Cutânea.....	76
5.7.3 <i>Tape Stripping</i> e Ensaio de Retenção Cutânea	78
5.8 Análise <i>in vivo</i> da Eficácia da Formulação em Modelo Animal.....	79
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
6.1 Análise <i>in vitro</i> da Atividade Antiviral.....	82
6.1.1 Ensaio de Citotoxicidade por MTT para Avaliação de Viabilidade Celular	82
6.1.2 Atividade Antiviral por MTT (Triagem) após Infecção por HSV-1	83
6.1.2.1 Avaliação do Potencial Sinergismo Antiviral de PCV-LIS.....	84
6.1.2.2 Atividade Antiviral Profilática da LIS por MTT (Triagem) na Infecção por HSV-1.....	85
6.2 Seleção de Excipientes	87
6.3 Caracterização do Penciclovir, da Lisina e Estudo de Compatibilidade de sua Mistura Binária	90
6.4 Estudo de Compatibilidade em Misturas Ternárias Fármacos-Excipientes.....	97
6.5 Desenvolvimento/Preparo do Creme	106
6.5.1 Espalhabilidade, pH e Teste da Centrífuga	106
6.5.2 Comportamento Reológico.....	109
6.5.3 Análise Microbiológica.....	111
6.6 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica Indicativa de Estabilidade e para a Análise de Teor por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	113
6.6.1 Desenvolvimento da Metodologia Analítica.....	113
6.6.2 Validação da Metodologia Analítica	116
6.6.2.1 Seletividade e Estudo de Degradação Forçada	116
6.6.2.2 Linearidade.....	121
6.6.2.3 Limites de Detecção e Quantificação	123
6.6.2.4 Precisão	123
6.6.2.5 Exatidão	125
6.6.2.6 Robustez e Estabilidade da Amostra	126

6.6.3 Análise da Estabilidade da Formulação	130
6.7 Análise da Permeação dos Fármacos Presentes na Formulação.....	131
6.8 Análise <i>in vivo</i> da Eficácia da Formulação em Modelo Animal.....	134
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
8 SÍNTESE DE DERIVADO DE FULERENO COM ATIVIDADE ANTIVIRAL	140
ANEXOS	142
REFERÊNCIAS.....	145

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas pelo vírus *Herpes Simplex* atingem de 60 a 95% da população mundial. Ele é um DNA vírus de cadeia dupla, com caráter neurotrópico, apresentando capacidade de infectar o sistema nervoso autônomo e periférico, e causar danos, além de permanecer em estado latente nos gânglios trigeminais até que fatores externos e internos ao organismo possam reativá-lo, causando herpes recorrente. A amplitude da infecção está relacionada ao estado imunológico do hospedeiro (GOTTLIEB et al., 2018; KUMAR et al., 2016; STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007).

Dentre as suas variedades destacam-se os vírus *Herpes Simplex* tipo 1 e tipo 2, que se diferem especialmente pelos locais em que promovem a infecção. A variedade tipo 1 apresenta maior soroprevalência frente às demais e é tipicamente transmitida durante a infância por meio da rota orofacial. Fazem parte dos sinais e sintomas, a dor local, o desconforto, a desfiguração estética e até efeitos psicossociais (HORWITZ et al., 1999; KNIPE et al., 2007; LOOKER et al., 2015).

O penciclovir está entre os fármacos utilizados para a profilaxia e tratamento tópico das lesões de pele ocasionadas pelo vírus da herpes. Ele é um dos importantes análogos de nucleosídeos, que atuam inibindo a replicação viral por meio da ligação de sua forma fosfatada à DNA polimerase viral, inativando-a (DINIZ et al., 2018; SMITH; MORRONI; WILCOX, 2001).

Esse fármaco apresenta problemas quanto a sua biodisponibilidade, desta forma, sua administração oral é realizada por meio de um pró-fármaco, o fanciclovir, com doses elevadas, podendo levar a toxicidade e reações adversas (SWAMINATHAN et al., 2012; ZHANG et al., 2014). Alguns pacientes com infecção orofacial/labial recorrente não se qualificam para uma terapia contínua e sistêmica (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2004). A terapia tópica, nestes casos, é mais vantajosa, afinal elimina os efeitos colaterais que podem surgir com a via oral e os efeitos do metabolismo de primeira passagem, além de serem mais acessíveis do ponto de vista financeiro (HORWITZ et al., 1999; KARANDE; MITRAGOTRI, 2009).

O número de medicamentos para o tratamento herpético ainda é limitado, além de poder haver resistência viral aos existentes (GONZALEZ et al., 2018; SNOECK et al., 2017). Fármacos inovadores requerem muito investimento e muito tempo para entrar no mercado, afinal é essencial a comprovação de sua eficácia

clínica, bem como de sua segurança. Então, uma nova estratégia está no refinamento de ativos já conhecidos e utilizados, seja em suas moléculas ou frente às formulações já comercializadas (GARCÍA-SERRADILHA; RISCO; PACHECO, 2019; NOSENGO, 2016).

Esse trabalho consiste então, no desenvolvimento de uma nova formulação tópica contendo fármacos que promovam um efeito sinérgico na interrupção da replicação viral.

Atenção especial foi dada a lisina, um importante agente antiviral que vêm sendo indicado para a profilaxia e tratamento do herpes orofacial, por administração oral, juntamente aos fármacos clássicos (GABY, 2006; KAGAN, 1974).

A lisina é um dos aminoácidos essenciais para o nosso organismo (NELSON; COX, 2011). Seu mecanismo de ação diante do vírus da herpes consiste no efeito expressivo que apresenta na redução da replicação viral. Isso ocorre pelo fato de a lisina antagonizar os efeitos de outro aminoácido, a arginina, que é essencial na síntese proteica viral. Logo, a presença da lisina em uma formulação, tanto para profilaxia quanto para o tratamento das lesões ocasionadas pelo vírus, pode auxiliar no alcance de um balanço positivo de sua concentração na relação lisina/arginina (GABY, 2006; GRIFFITH; NORINS; KAGAN, 1978; TAGLIARI; KELMANN; DIEFENTHALER, 2012).

Esse potencial despertou interesse quanto ao alcance de novas estratégias direcionadas à terapia para herpes recorrente orofacial. Estudos recentes idealizando o uso da lisina em formulações para este fim, associada ou não a outro ativo, são desconhecidos. Fato este que nos levou a considerar o desenvolvimento de um creme contendo penciclovir em associação com lisina, uma possível inovação incremental no tratamento de lesões herpéticas.

Para o desenvolvimento adequado da formulação deve-se considerar as características físicas, químicas e biológicas de todos os componentes, levando-se em consideração a segurança e a eficácia do produto final (HALEEM et al., 2015). Na busca por um creme de excelência foram então realizadas revisão de literatura e planejamento relacionados à atividade dos fármacos *in vitro*, caracterização do estado sólido da matéria-prima e estudos de compatibilidade fármaco-excipientes, bem como análise da estabilidade, do comportamento reológico e das características da formulação, estudo da permeação dos fármacos presentes na

fórmula e desenvolvimento e validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade e também para a quantificação dos ativos.

Obter melhor compreensão em relação à análise da atividade dos fármacos *in vitro* é essencial, afinal faz-se necessária à seleção de um sistema adequado para que a replicação viral possa ser determinada e assim, o desempenho dos ativos possa ser avaliado (HU; HSIUNG, 1989).

Saber mais a respeito das técnicas de caracterização e das que auxiliam nos estudos de compatibilidade, por sua vez, possibilita caracterizar corretamente os ativos e eleger as ferramentas corretas para a avaliação das possíveis interações que podem vir a ocorrer entre os fármacos e os excipientes. Metodologias como as Análises Térmicas, Difração de Raio-X do Pó e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier são consideradas como requisitos nos estudos de pré-formulação, já que permitem prever a estabilidade, as propriedades químicas, a eficácia e também a segurança da fórmula desenvolvida (COSTA et al., 2016; STRENG, 1997).

Avaliar a estabilidade do produto formulado tem a intenção de colocá-lo em condições, das quais, ele possa vir a ser submetido, desde a sua fabricação até o seu prazo de validade, considerando inclusive o seu transporte, e então relacionar à sua capacidade de manter-se inalterado (BRASIL, 2004; BRASIL, 2019). Junto dessa análise, ter conhecimento sobre comportamento reológico de uma formulação também é essencial para o seu preparo, desenvolvimento e desempenho (AULTON, 2016). E tratando-se de um creme, é válido considerar a sua característica de espalhabilidade, que é pertinente à sua natureza organoléptica e está conexas à sua aplicação (GORE; PICARD; SAVARY, 2018).

Em soma às análises fundamentais no processo de desenvolvimento das formulações é indispensável citar o desenvolvimento e a validação de metodologia indicativa de estabilidade e de um método de quantificação para os fármacos em questão. Não há na literatura científica e nem em farmacopeias um mesmo método contemplando o penciclovir e a lisina com essas finalidades. Vale a ressaltar de que esses ensaios fazem parte das exigências de órgãos reguladores, mas antes a isso, que a qualidade das análises infere a do produto final (DOLAN; SNYDER, 2017; SHEETS, 2018).

Por fim, o conhecimento a respeito da permeação dos fármacos e em relação à sua eficácia em modelo animal completam os estudos frente ao desenvolvimento desta nova formulação.

No ensaio de permeação, em razão de questões éticas que modificaram a visão regulatória, testes em animais podem ser substituídos por estudos *in vitro*, utilizando a Célula de Franz, por exemplo. O desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de determinar a concentração dos ativos é inerente a esta técnica (RODRIGUES; OLIVEIRA, 2016).

Na avaliação da eficácia da formulação, utilizando experimentação animal, torna-se possível a apresentação de correspondência efetiva com o tratamento a ser realizado em humanos (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). Isto presume, de fato, o alcance dos objetivos delineados, que se resume na obtenção de uma formulação tópica de penciclovir em associação com lisina para o tratamento de lesões ocasionadas pelo vírus da herpes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Desenvolver uma formulação tópica de penciclovir em associação com lisina para o tratamento de lesões ocasionadas pelo vírus *Herpes Simplex*.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar as características físico-químicas das matérias-primas penciclovir e lisina, caracterizando-as e analisando a compatibilidade entre elas;
- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* frente ao HSV-1 dos ativos e o possível efeito sinérgico que eles podem apresentar;
- Investigar os excipientes que farão parte da formulação quanto à suas compatibilidades com os fármacos em estudo;
- Desenvolver formulações na forma de creme e avaliar parâmetros de qualidade;
- Desenvolver e validar metodologia analítica indicativa da estabilidade para determinação penciclovir e lisina por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliação *in vivo* do efeito terapêutico das formulações sobre o vírus *Herpes Simplex*;
- Avaliar a estabilidade acelerada das formulações desenvolvidas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Vírus *Herpes simplex*

As enfermidades causadas pelo vírus *Herpes simplex* (HSV) são conhecidas há pelo menos três mil anos, tendo sido feito por Hipócrates, o provável primeiro relato da infecção (CUMSTON, 1926; ROIZMAN; WHITLEY, 2001). Essas infecções estão entre as mais frequentes em humanos, acometendo de 60 a 95% da população mundial (JIANG et al., 2016; KRAWCZYK et al., 2017). São dois os seus principais tipos de vírus, HSV 1 e HSV 2, que variam em relação a gravidade e a região em que acometem o paciente, e também quanto a soroprevalência, estimada em cerca de 67% e 11%, respectivamente, em indivíduos de 0 a 49 anos. Destes, de 20 a 40% apresentarão sintomas recorrentes. Estudos de soroprevalência realizados no Brasil demonstram-se compatíveis com os resultados encontrados a nível mundial (CLEMENS; ANN, 2010; GOTTLIEB et al., 2018; HAIK; WEISSMAN; STAVROU, 2011; MADER et al., 2016).

O HSV é um DNA vírus de cadeia dupla, membro da família *Herpesviridae*. É envolto por um envelope que consiste de poliaminas, lipídeos e importantes glicoproteínas. Mutações genéticas, frente a essa composição podem ocorrer, e isso poderá conferir propriedades distintas aos vírus, modificando diversos fatores, como por exemplo, a sua neuroinvasividade (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Propriedades importantes controlam as etapas que configuram a infecção viral promovida pelo HSV, dentre elas está o fato de ser um vírus neurotrópico, com capacidade de adentrar o sistema nervoso autônomo e periférico, e permanecer em estado de latência. Isto ocorre após a infecção primária e faz com que o vírus permaneça em sua forma não replicativa nos gânglios trigeminais até que alguns fatores como estresse emocional, febre e exposição à luz ultravioleta, possam reativá-lo (KUMAR et al., 2016; WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Curiosamente, o nome da família deriva da palavra grega *herpein*, que significa rastejar, remetendo a essas infecções latentes e recorrentes (ROIZMAN; WHITLEY, 2001).

Geralmente assintomática, a amplitude da infecção primária causada pelo HSV é dependente do estado imunológico do hospedeiro, e o tipo de transmissão está relacionado ao tipo viral (HSV tipo 1 ou tipo 2). O HSV tipo 1 é tipicamente transmitido durante a infância por meio do contato direto do paciente com as

secreções do paciente infectado, enquanto o tipo 2 está vinculado aos casos de herpes genital, porém vale ressaltar que exceções têm sido relatadas (KNIPE et al., 2007; STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007). Em pacientes imunocomprometidos, infecções causadas por ambos os vírus podem levar a manifestações graves, estando associadas a altas taxas de mortalidade e sequelas neurológicas (ORZALLI, 2019). Nos demais pacientes, estudos têm até demonstrado relação entre a infecção viral e déficits cognitivos, devido a predileção do vírus pelo sistema nervoso (TUCKER; BERTKE, 2019).

O HSV tipo 1 é altamente infeccioso e como já descrito, apresenta uma soroprevalência extremamente relevante frente aos demais tipos. A infecção por ele ocasionada produz erupções líticas dolorosas, produtivas e esporádicas, além de mal-estar, febre, linfadenopatias de cabeça e pescoço, e em casos mais raros pode levar a quadros de encefalite e até óbito (HAIK; WEISSMAN; STAVROU, 2011; LOOKER et al., 2015). Esses sintomas remetem ao nome dado a desordem provocada por esse tipo viral, o herpes orofacial (SCULLY, 1989).

Comumente, o herpes orofacial recorrente em pessoas saudáveis, é manifestado pelo herpes labial, atingindo também as mucosas presentes na região da face. Essa condição pode trazer dor local, desconforto, desfiguração estética e até efeitos psicossociais, sintomas que podem persistir de 10 a 14 dias (HORWITZ et al., 1999). A transmissão pode ocorrer facilmente por meio do contato com as secreções, podendo então, ser evitada caso o tratamento seja rapidamente iniciado (ARDUINO; PORTER, 2006; WHITLEY; ROIZMAN, 2001).

Dentre os fármacos mais utilizados para a profilaxia e tratamento tópico do herpes orofacial, destacando a infecção nos lábios, estão o aciclovir e o penciclovir, fármacos análogos de nucleosídeos que inibem a replicação viral quando convertidos em monofosfato pela timidinaquinase dentro das células infectadas (DINIZ et al., 2018; RANG et al., 2007; SMITH; MORRONI; WILCOX, 2001).

Desde que esses fármacos foram descobertos muitos são os estudos para o desenvolvimento de análogos de nucleosídeos mais eficazes (SCHAEFFER et al., 1978; TIPPIE et al., 1984). Mesmo assim, ainda é limitado o número de medicamentos para o tratamento da infecção herpética, além de haver resistência viral aos existentes, por isso é muito importante o estudo a respeito de novas estratégias (GONZALEZ et al., 2018; SNOECK et al., 2017).

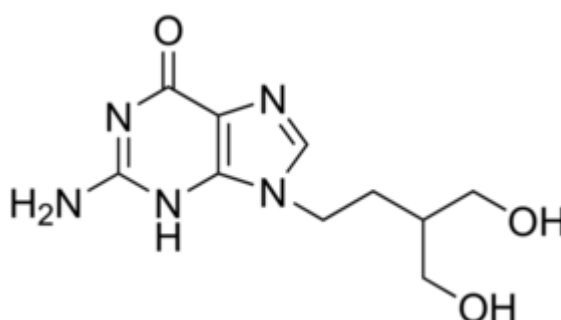
Agentes antivirais, como o aminoácido lisina, vêm sendo utilizados em associação aos fármacos clássicos no tratamento e na profilaxia do herpes orofacial (GABY, 2006; KAGAN, 1974; PEDRAZINI; ARAÚJO; MONTALLI, 2018). Esse trabalho consiste então, no lançamento de uma nova estratégia: o desenvolvimento de uma nova formulação contendo fármacos que promovam um efeito sinérgico na interrupção da replicação viral.

Seguem, na sequência, descrições e informações a respeito dos ativos de interesse neste trabalho.

3.2 Penciclovir

O penciclovir (PCV, 9-(4-hidroxi-3-hidroximetilbut-1-ilo), $C_{10}H_{15}N_5O_3$, Figura 1) é um análogo carbocíclico da guanossina, um dos clássicos análogos de nucleosídeos. Demonstra ser potente e efetivo na inibição da atividade dos vírus *Herpes simplex* tipo 1 e 2, *Varicella zoster*, *Espstein Barr* e *Citomegalovírus*. É amplamente indicado para o tratamento de herpes labial recorrente em crianças acima de 12 anos e em adultos (BOON et al., 2000; MONDAL, 2016; SPRUANCE et al., 1997; YU et al., 2010). Sua formulação referência no Brasil é chamado Penvir Labia[®], da empresa EMS Sigma Pharma Ltda (BRASIL, 2019).

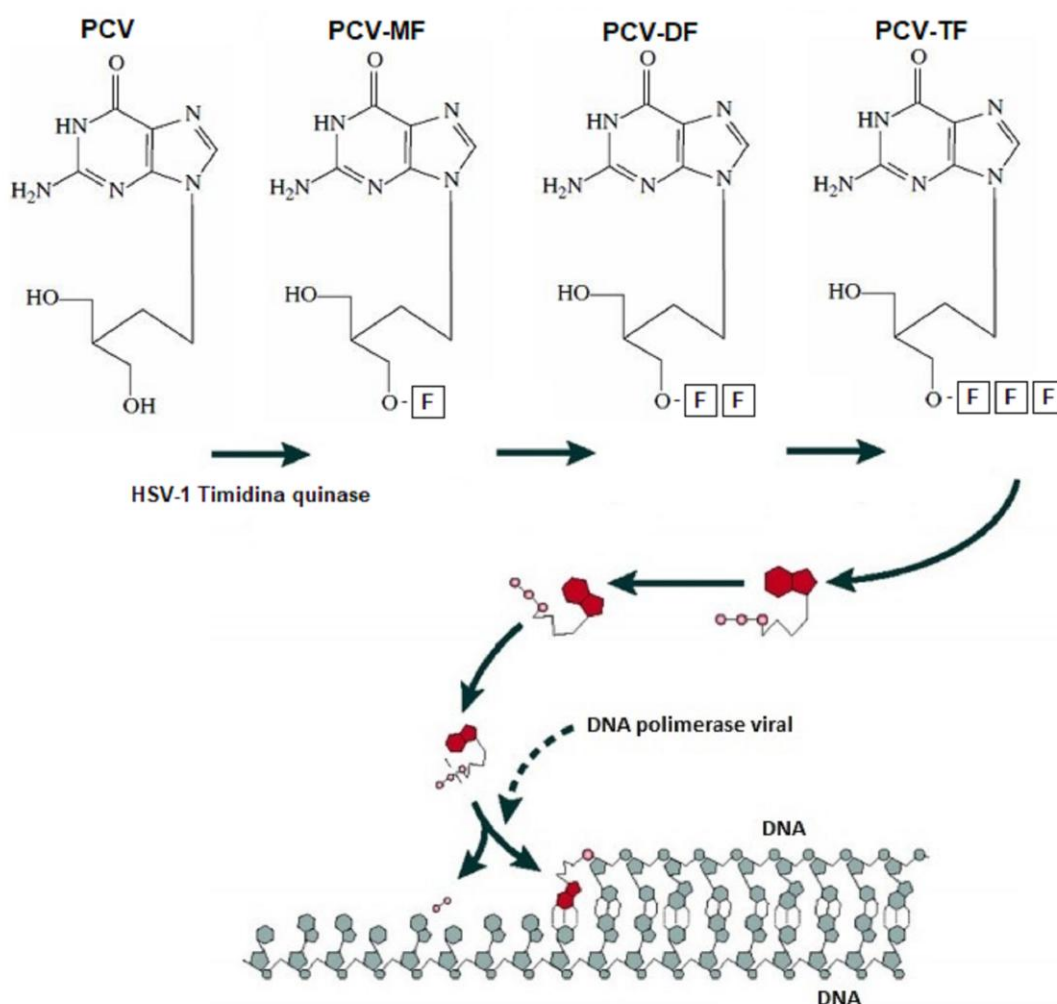
Figura 1: Estrutura química do PCV.



Esse potente e seletivo agente antiviral inibe a replicação dos vírus por meio da ação de sua forma trifosfatada. A enzima timidina quinase viral presente nas células infectadas utiliza o PCV como substrato e transforma-o em mono e trifosfato de PCV, a guanilato quinase realiza a transformação intermediária. O trifosfato de PCV então, liga-se a DNA polimerase viral, competindo com o 2'-desoxinucleotideo-5'-trifosfato (dNTP), o que impede a incorporação de novos nucleotídeos e inativa a

enzima. O resultado é o impedimento da replicação viral, mecanismo que pode ser observado na Figura 2 (HODGE, 1993; MONDAL, 2016; RABORN et al., 2002; RANG et al., 2007).

Figura 2: Mecanismo de ação do PCV. F: fosfato; MF: monofosfato; DP: difosfato; TP: trifosfato) (adaptado de DE CLERCQ, 2004a).



O PCV apresenta maior concentração intracelular, assegurando maiores vantagens em relação ao seu principal análogo, o aciclovir, mesmo sendo menos potente na inibição da DNA polimerase quando comparado a ele (KIM et al., 1999; THAPPA; NATH, 2009).

O PCV (CAS número: 39809-25-1) apresenta massa molar de $253,26 \text{ g mol}^{-1}$ e ponto de fusão de 278°C . Em relação à sua solubilidade, em água, o PCV tem solubilidade de $1,7 \text{ mg mL}^{-1}$, aumentando para 10 mg mL^{-1} em meio ácido (pH 2). É uma molécula anfótera com valores de pKa de 3,2 (básico) e 9,4 (ácido), sendo o

seu coeficiente de partição (LogP) em n-octanol/água (pH 7,5) de 0,024 (AHMED et al., 2004; MONDAL, 2016; PRASSE et al., 2010).

É um fármaco Classe III no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), caracterizando-se por apresentar alta solubilidade e baixa permeação, e por esse motivo, apresenta baixa biodisponibilidade (5 a 10%) frente à administração oral (NGUYEN et al., 2016; ZHU et al., 2008). Uma estratégia em relação a isso foi o desenvolvimento de um pró-fármaco do PCV, o famciclovir, uma molécula contendo os grupamentos acetil diéster e 6-desoxi junto ao ativo, que se torna eficientemente biodisponível (77% de PCV) por meio de desacetilação e oxidação enzimática logo após a administração oral (ZHANG et al., 2014). Na busca pela melhoria desse parâmetro fundamental é que a terapia tópica, incluindo cremes e géis, também se tornou um importante meio de carrear este fármaco (ZHU et al., 2008).

Pacientes saudáveis com a infecção orafacial/labial recorrente deveriam evitar terapia contínua e sistêmica para tratar a infecção herpética, uma vez que estariam mais expostos a efeitos colaterais. Porém, em razão da dor e do impacto psicológico que os sintomas trazem, eles necessitam de um meio eficaz de eliminá-los, o que também evidencia a importância da terapia tópica (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2004). Ela é então mais vantajosa nesses casos, pois sendo aplicada diretamente no local da manifestação infecciosa, elimina os efeitos colaterais que podem surgir com a administração oral e os efeitos do metabolismo de primeira passagem, e ainda torna-se mais acessível do ponto de vista financeiro (HORWITZ et al., 1999; KARANDE; MITRAGOTRI, 2009).

Devido às características das moléculas, o creme de PCV é considerado mais efetivo do que o creme de aciclovir. O tratamento para o herpes labial recorrente ou primário contendo este fármaco consiste do creme a 1% a cada duas horas por quatro dias, sendo a dose tópica máxima de PCV recomendada de $0,05 \text{ mg kg dia}^{-1}$ (LIN; TORRES; TYRING, 2003; MONDAL, 2016).

O maior desafio da terapia tópica reside na seleção de excipientes que auxiliem na permeação do fármaco, de modo que a formulação constitua um sistema transportador efetivo, mantendo níveis elevados do fármaco no local da infecção e controlando a sua liberação de forma sustentada (HORWITZ et al., 1999; KARANDE; MITRAGOTRI, 2009; MALLEFET et al., 2009).

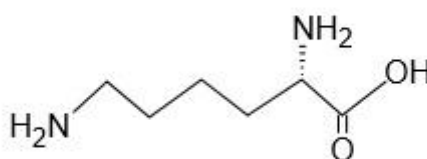
A resistência viral do HSV aos fármacos análogos de nucleosídeos, dentre eles o PCV, é outro desafio no desempenho das terapias, sejam elas tópicas ou

orais. Vale ressaltar que as mutações que ocorrem no gene que codifica a enzima timidina quinase, resultante à exposição prolongada ao PCV, são diferentes das que ocorrem quando a exposição é ao aciclovir, podendo gerar inclusive resistência múltipla (PIRET; BOIVIN, 2011; STRASFELD; CHOU, 2010). Diante do exposto, vale ressaltar a importância de ater-se ao desenvolvimento de estratégias novas capazes de minimizar o problema que envolve o tratamento dessa infecção endêmica (JIANG et al., 2016).

3.3 Lisina

A lisina (LIS, ácido 2,6-diaminocaprílico, $C_6H_{14}N_2O_2$, Figura 3) está entre os oito aminoácidos essenciais que não podem ser sintetizados pelo organismo. É uma molécula altamente hidrofílica, com grupamento positivo em sua cadeia lateral e faz-se presente em alimentos ricos em proteínas, como ovos, carne, soja, entre outros (NELSON; COX, 2011; SAHINER, 2019). Tem sido relacionada com efeitos no tratamento da osteoporose, de doenças cardiovasculares e neurovasculares, além da inibição da replicação viral do HSV tipo 1, sendo indicado para tratar e prevenir o herpes labial recorrente (FLODIN, 1997; KAGAN, 1974; SHIMOMURA et al., 2014).

Figura 3: Estrutura química da LIS.



Por ser extremamente instável sob condições normais, o aminoácido básico natural, a LIS, apresenta-se na forma de sais cristalinos de bases ácidas e básicas, geralmente em cloridrato de lisina (TAO et al., 2015). A formulação comercial referência da LIS no Brasil, desenvolvida para o tratamento e profilaxia do herpes, é encontrada em forma de cápsulas pelo nome de Resist[®], e é fabricada pela Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A. Recomenda-se a utilização de 31 mg kg dia⁻¹ de LIS, com doses máximas diárias de 3 g (FLODIN, 1997; MARCASON, 2003). Não há

formulação tópica deste ativo, enquanto agente antiviral, registrada no País (BRASIL, 2019).

O cloridrato de lisina (CAS número: 657-27-2, $C_6H_{14}N_2O_2.HCl$) apresenta massa molar de $182,65 \text{ g mol}^{-1}$. Tem seu ponto de fusão entre 264 e 265°C. É altamente solúvel em água (420 g L^{-1}) e insolúvel em etanol, etil éster, acetona e benzeno, com pKa básico de 2,18 e ácido de 8,95/10,53 (LIDE, 2007; O'NEIL, 2006; THURLKILL; GRIMSLEY; SCHOLTZ, 2006). Seu coeficiente de partição é -3,05 (HANSCH; LEO; HOEKMAN, 1995). Não há na literatura descrição referente à sua classificação no SCB, apenas a menção da LIS junto de outros fármacos na melhoria dos parâmetros que envolvem a farmacocinética (DERRY et al., 2013; MIRANDA, 2016).

O mecanismo de ação da LIS frente ao HSV tipo 1 consiste no seu efeito expressivo na redução da replicação viral. Isso ocorre pelo fato de a LIS antagonizar os efeitos de outro aminoácido, a arginina, que é essencial na síntese proteica do vírus. O antagonismo envolve vários mecanismos além da indução da enzima arginase, como a competição pelas proteínas carreadoras, pela absorção intestinal e pela reabsorção no túbulo renal, aumentando assim a excreção da arginina. Como profilaxia e tratamento do herpes labial recorrente deve haver então, um balanço positivo na concentração de lisina frente a relação lisina/arginina (FLODIN, 1997; GABY, 2006; GRIFFITH; NORINS; KAGAN, 1978; TAGLIARI; KELMANN; DIEFENTHALER, 2012).

Esse potencial despertou interesse quanto ao alcance de novas estratégias direcionadas à terapia para herpes recorrente labial, que acomete com alta frequência pacientes que apresentam HSV tipo 1 latente (CLEMENS; ANN, 2010). Estudos recentes idealizando o uso da LIS em formulações, associada ou não a outro ativo, são desconhecidos, fato que nos levou a considerar essa ideia como uma possível inovação.

3.4 Desenvolvimento da Formulação

O planejamento de fármacos para o tratamento do HSV fica geralmente em segundo plano frente ao tratamento de infecções virais consideradas mais graves, isto porque esse processo infeccioso em pessoas saudáveis, na maioria dos casos, resulta em doença autolimitada, caracterizando-se por ser de longa duração e

doloroso, além de afetar a imagem pessoal. Uma problemática mais tolerada frente às hepatites e à síndrome da imunodeficiência adquirida, como exemplo, mas que não pode deixar de ser evidenciada, já que afeta a qualidade de vida de inúmeros pacientes (DE CLERCQ; HERDEWIJN, 2002; LOPES et al., 2018).

O desenvolvimento de novos compostos antivirais evolui por meio de uma maior compreensão do ciclo viral, mas ainda segue a passos lentos. Isso ocorre também porque todo o processo acerca da descoberta de um fármaco inovador pode levar vários anos (em média 14 anos), afinal é essencial a comprovação de sua eficácia clínica, bem como de sua segurança, e isso leva tempo, investimento alto e muito estudo. Sendo assim, o desenvolvimento de novas formulações contendo fármacos já conhecidos e o refinamento das já existentes, destacam-se como importantes estratégias (GARCÍA-SERRADILHA; RISCO; PACHECO, 2019; NOSENGO, 2016).

Segundo Nosengo (2016), há um aumento significativo de publicações referentes a modificações de fármacos e formulações já existentes, e até revistas dedicadas a esse tipo de publicação, como por exemplo, a *Drug Repurposing, Rescue and Repositioning*, ressaltando ainda mais a importância que deve ser dada a essa tática terapêutica.

Neste contexto destacamos o conceito de inovação incremental, que se caracteriza pela incorporação de melhorias a produtos e a processos existentes, seja em características inerentes a eles, composição ou até mesmo custo, de forma a otimizar a sua performance. Este é um recurso muito explorado pela indústria farmacêutica na busca por melhorias frente a estabilidade, a biodisponibilidade, ao perfil segurança, bem como em relação a ação do fármaco/medicamento, isto tudo através de inovações direcionadas, como por exemplo, a modificações na forma farmacêutica (CAPANEMA, 2006; LOURENÇO et al., 2020; TIRONI; CRUZ, 2008).

Inúmeras são as limitações farmacocinéticas relacionadas aos fármacos já existentes, como problemas relacionados à solubilidade, permeação, tempo de meia-vida, todos prejudicando a sua biodisponibilidade (HORWITZ et al., 1999). Em razão disto, as doses administradas na terapia oral são altas, sendo que a exposição contínua pode levar a resistência viral e a efeitos sistêmicos, evidenciados com o surgimento de nefropatia reversível, distúrbios gastrintestinais, erupção cutânea,

encefalopatia, dentre outros. Neste contexto é que a terapia tópica tem se destacado (DE CLERCQ, 2004b; KARANDE; MITRAGOTRI, 2009; LOPES et al., 2018).

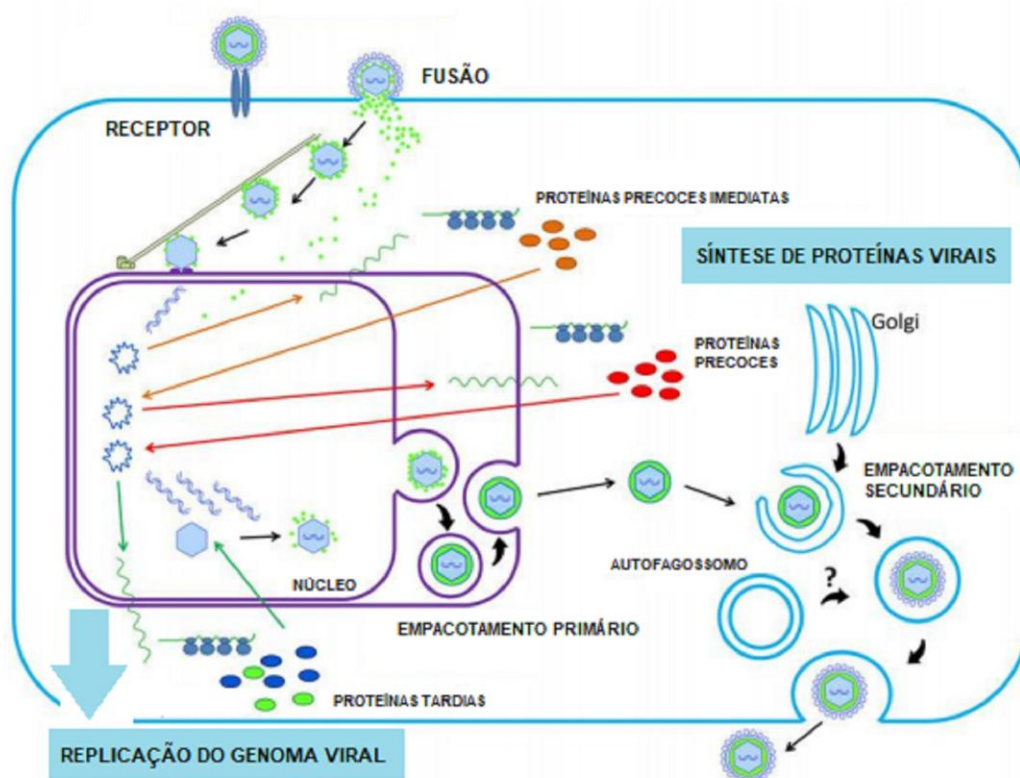
Um destaque ainda maior é dado para formulações contendo produtos combinados, de modo que a eficiência do produto final seja aperfeiçoada, melhorando a relação custo-benefício do mesmo (KAVANAGH et al., 2018), proposta desta pesquisa.

O desenvolvimento ideal de uma formulação deve considerar as características físicas, químicas e biológicas de todos os componentes, levando-se em consideração a segurança e a eficácia do produto final. Muitos são os parâmetros a serem observados, sendo eles destacados em guias internacionais que direcionam os estudos relacionados à eficácia e também à segurança do medicamento (AULTON, 2005; HALEEM et al., 2015). Dentre todos eles, daremos atenção especial nesta pesquisa à atividade dos fármacos *in vitro*, à caracterização do estado sólido da matéria-prima e estudos de compatibilidade fármaco-excipiente, à análise da estabilidade, do comportamento reológico e das características da formulação, ao estudo da permeação dos fármacos no produto final, e ainda ao desenvolvimento e validação de metodologia analítica indicativa de estabilidade e para a quantificação dos ativos na fórmula, importante também para a análise *in vitro* de permeação dos ativos. O ensaio *in vivo*, demonstrando sua efetiva ação, concluirá a experimentação.

3.4.1 Atividade dos Fármacos *in vitro*

A replicação viral de HSV inicia-se com a entrada do vírus na célula hospedeira e então, em sua membrana nuclear. Resumidamente, é neste momento que o seu genoma será replicado, formando novas partículas virais. Haverá ainda, a tradução do RNAm em proteínas não estruturais em interface com o hospedeiro (precoces imediatas), não estruturais relacionados com a replicação (precoces) e ainda, de proteínas estruturais (tardias). Logo após, há o empacotamento de seu material genético em capsídeos. Os vírus envelopados apresentam além do invólucro proteico do capsídeo, um envelope lipídico advindo da membrana da célula em que estão abrigados (RUMLOVA; RUMLOVA, 2018). A Figura 4 pode representar o processo de replicação descrito acima.

Figura 4: Replicação do HSV (adaptada de LUSSIGNOL; ESCLATINE, 2017).



O HSV é um vírus envelopado de dupla fita de DNA, com massa molecular de aproximadamente 150 kbp. Seu invólucro lipídico é constituído de 11 glicoproteínas virais que dão início à infecção por adsorção (JONES, 1998; RECHENCHOSKI et al., 2017).

A avaliação da atividade de agentes antivirais difere de um vírus para outro, por isso é necessária a seleção de um sistema adequado em que a sua replicação possa ser medida, seja por meio de DNA, RNA ou de seus produtos e constituintes (HU; HSIUNG, 1989).

As metodologias mais utilizadas para avaliar a suscetibilidade do HSV aos fármacos são Teste de Triagem por MTT que utiliza um reagente (MTT – [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) para avaliar a viabilidade celular por meio de sua atividade metabólica, e o de Redução de Placa. Eles são utilizados para aferir a eficiência viral na indução do efeito citopático e da lise celular em diferentes concentrações do ativo (HU; HSIUNG, 1989; KINCHINGTON; SCHINASI, 2000).

Muitas foram as modificações quanto às preparações de células e meios utilizados no Ensaio de Redução de Placa desde a primeira vez em que foi descrito por Dulbecco, mesmo assim ele ainda continua a destacar-se por ser um método de

simples aplicação e ainda por revelar dados sobre a atividade do agente antiviral (DULBECCO, 1952; JUAREZ et al., 2013).

O Ensaio por MTT, resumidamente, utiliza de um corante amarelo, solúvel em água, que sendo absorvido pelas células viáveis, é reduzido por enzimas mitocondriais, convertendo-se em cristais azuis que podem ser determinados por meio da espectrofotometria. Esse ensaio tem sido utilizado tanto para determinar a citotoxicidade dos compostos (CC50), quanto para avaliar a atividade antiviral dos mesmos (IC50) (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991).

Por destacar-se como um método simples, sensível e objetivo para estabelecer tanto a citotoxicidade quanto a atividade antiviral de substâncias é que o ensaio por MTT foi o selecionado para a análise de atividade sinérgica dos agentes antivirais mencionados nesse trabalho (KINCHINGTON; SCHINASI, 2000).

3.4.2 Caracterização do Estado Sólido da Matéria-Prima e Estudo de Compatibilidade Fármacos-Excipientes

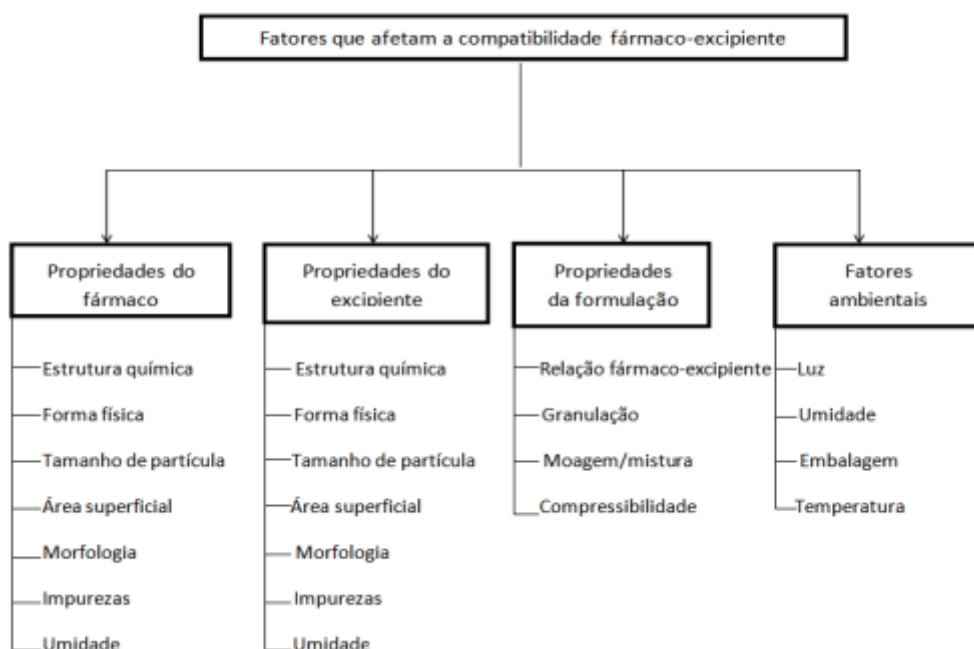
A caracterização físico-química de um fármaco é pré-requisito regulatório e científico tanto para a sua padronização quanto para o desenvolvimento de formas farmacêuticas. Ela é extremamente importante, pois determinará a estrutura e as propriedades do composto, comprovando ou prevendo o seu comportamento frente a condições ainda não relatadas. Diversas são as técnicas para esta finalidade e para outros estudos relacionados às propriedades da matéria (BERNARDI et al., 2009; STRENG, 1997).

A variabilidade das propriedades dos excipientes utilizados no desenvolvimento de uma formulação, tanto em relação a diferentes materiais como a diferentes fabricantes, pode afetar o processamento, a fabricação e também o desempenho do produto, de modo que a caracterização e o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente se tornam essenciais no processo (MORETON, 2009; ZARMPPI et al., 2017).

Nas análises de pré-formulação, o estudo de compatibilidade avalia diversos fatores intrínsecos das moléculas (Figura 5) e permite prever a estabilidade, as propriedades químicas, a eficácia e também a segurança da formulação, evidenciando possíveis interações entre fármacos e excipientes. Entre as técnicas

utilizadas para esse fim estão as análises térmicas (COSTA et al., 2016; CUNHA-FILHO; MARTÍNEZ-PACHECO; LANDÍN, 2007; FORD; TIMMINS, 1989).

Figura 5: Fatores que podem afetar a compatibilidade entre fármacos e excipientes (MATOS, 2013).



Análises térmicas são técnicas que medem as propriedades físicas de uma substância em função da temperatura, dentro de um programa de temperatura controlada, sendo aplicadas na área farmacêutica desde 1970. Dentre as principais estão a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e a Termogravimetria (TG) (COSTA et al., 2016; GIRON, 1998, 2002; SUN et al., 2017).

A DSC caracteriza-se por ser uma metodologia que avalia interações físico-química entre os componentes da formulação, levando à escolha adequada dos mesmos. Por meio de mudanças nos eventos das curvas ou variações nas entalpias de transição correspondentes, essa análise avalia a mudança de fase dos materiais, podendo rastrear rapidamente potenciais incompatibilidades (GIRON, 1998; IONASHIRO, 2004; SINGH, 2013).

A análise de TG é apropriada para se obter parâmetros cinéticos químicos, sendo capaz de fornecer dados sobre a decomposição, evaporação ou fusão da substância, diante de mudanças de temperatura, observadas por meio de

informações quantitativas de perda de massa em atmosfera controlada (COSTA et al., 2016; EL-GAMEL; HAWASH; FAHMEY, 2012; IONASHIRO, 2004).

DSC e TG são complementares na investigação da incompatibilidade fármaco-excipiente, já que a primeira fornece resultados a respeito da variação de energia térmica, de forma a possibilitar a determinação da temperatura de fusão e de cristalização dos compostos, por exemplo, e a seguinte sobre as variações na massa, levando a importantes considerações sobre a relação existente entre a necessidade calórica dependente da temperatura e as reações que a envolvem. Caso sejam observadas possíveis interações, aconselha-se associar essas técnicas a outras ferramentas, como Difração de Raios X em Pó (DRXP) e Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), para então poder obter a confirmação (EL-GAMEL; HAWASH; FAHMEY, 2012; GAO et al., 2014). Neste contexto, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) também é uma ferramenta a ser acrescentada (DUARTE et al., 2003).

A DRXP é uma ferramenta não destrutiva e rápida, utilizada na medição e caracterização de estruturas cristalográficas, capaz de fornecer informações de polimorfos, estado de solvatação e grau de cristalinidade. É importante na detecção de incompatibilidades química por meio do aparecimento de picos de difração únicos e incompatibilidade física na observação de mudanças na natureza da substância (amorfo/cristalino) (CHADHA; BHANDARI, 2014; PHADNIS; CAVATUR; SURYANARAYANAN, 1997).

A análise em FTIR fornece informações de alta qualidade a respeito de grupos funcionais e moleculares. É capaz de avaliar a questão da incompatibilidade entre compostos devido às mudanças de bandas presentes no espectro, única para cada substância (CHADHA; BHANDARI, 2014; PELUSI et al., 2016).

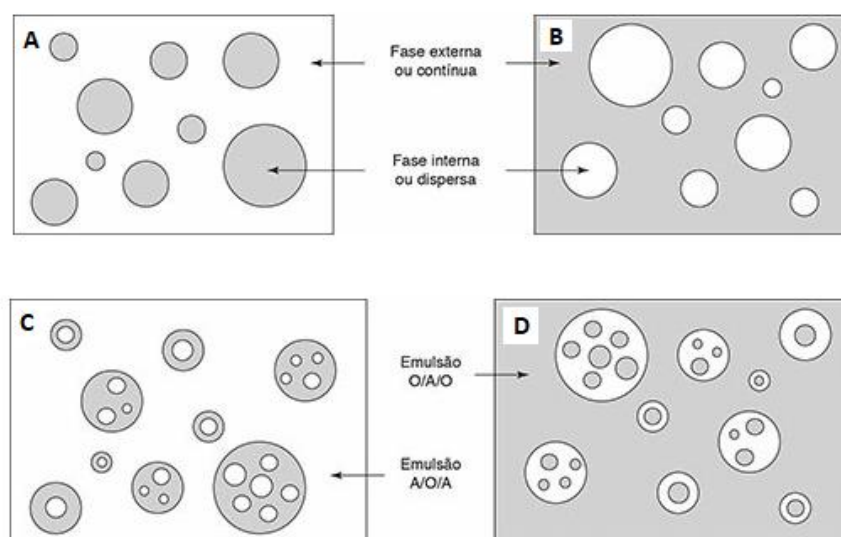
Para a ideal caracterização de materiais e estudos envolvendo suas compatibilidades, técnicas adicionais como a MEV são relevantes, já que essa ferramenta permite, por meio da microscopia eletrônica de varredura, a observação de estruturas de superfície a partir da irradiação de um feixe fino de elétrons sobre a amostra, identificando possíveis alterações morfológicas quando há mistura de compostos (MARINI et al., 2003).

As análises para caracterização e estudo de compatibilidade fármaco-excipiente para o desenvolvimento de uma nova formulação foram as descritas nesse tópico.

3.4.3 Formulação: Creme

O creme tem sido aplicado em diversas áreas, como na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e de tintas, por exemplo (FARJAMI; ASHKAN, 2019). Caracterizado como uma emulsão, ele é um sistema composto pela mistura de dois líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis, convencionalmente chamados de óleo (O) e água (A) em razão de sua polaridade. Eles passam então, a corresponder a duas fases, a dispersa que é distribuída uniformemente na forma de gotículas ao longo da outra, a contínua. As emulsões óleo em água (O/A) apresentam o óleo como fase dispersa e a água como fase contínua, o contrário ocorre com as que são água em óleo (A/O), podendo haver também a formação de emulsões múltiplas, sendo esses sistemas estabilizados com a adição de agentes emulsificantes ou tensoativos (Figura 6). O tipo de emulsão é dependente de vários fatores, como a forma de preparo, os volumes de cada fase e ainda a natureza do componente estabilizador (AULTON, 2016; TADROS, 2013).

Figura 6: Representação dos tipos de emulsão. A. emulsão óleo em água; B. emulsão água em óleo; C. emulsão múltipla água/óleo/água; D. emulsão múltipla óleo/água/óleo (adaptado de AULTON, 2016).



Os tensoativos são substâncias que diminuem a tensão superficial/interfacial, influenciando na superfície de contato entre os dois líquidos, por meio da formação de um filme interfacial, por isso, a escolha adequada desses componentes é

essencial para a estabilidade da formulação. São moléculas anfifílicas caracterizadas por possuírem ambas as regiões hidrofílica e hidrofóbica em sua estrutura, e podem ser classificados em aniônicos, catiônicos, não iônicos e anfotéricos (AULTON, 2016).

Quando há incorporação de uma mistura de emulsificantes à fórmula, as emulsões tornam-se mais estáveis, a partir da formação de filmes interfaciais mais rígidos. A seleção desses componentes em uma mistura pode ser realizada por meio do sistema HLB (BLH: balanço lipofílico-hidrofílico), que os classifica em função de sua polaridade relativa e ainda direciona-os às suas finalidades. Esse método auxilia na produção de emulsões fisicamente mais estáveis, bem como no cálculo da quantidade relativa de emulsificantes na fórmula, mas apresenta dentre suas limitações o fato de não considerar a temperatura, a presença de outros excipientes e as possíveis interações químicas entre os componentes (AULTON, 2016; BOYD; PARKINSON; SHERMAN, 1972).

O creme O/A, enquanto emulsão dermatológica, é distribuído pela pele como um filme fino e à medida que seus componentes aquosos evaporam, esse filme pode vir a saturar, permitindo uma maior atividade termodinâmica e conseqüentemente, maior do fármaco. É destaque como forma farmacêutica porque além de melhorar a biodisponibilidade de muito fármacos, ainda reduz os efeitos sistêmicos (AULTON, 2016; KARANDE; MITRAGOTRI, 2009).

Por serem sistemas termodinamicamente instáveis, mesmo contendo tensoativos, as emulsões podem sofrer importantes e indesejáveis processos físico-químicos, como a cremagem, a floculação, a coalescência, o amadurecimento de Ostwald e a inversão de fases, ressaltando que os mesmos não são independentes, e que um pode levar a outro. Diante disso, faz-se importante reforçar que escolha correta dos componentes que farão parte do sistema requer muita atenção (AULTON, 2016; FARJAMI; ASHKAN, 2019; NEUMANN; SCHAAF; KARBSTEIN, 2018).

Um ponto importante a ser evidenciado é o fato de que a lisina, um dos agentes antivirais a ser utilizado na formulação, tem sido recentemente relatada como estabilizadora de emulsões por meio da redução da repulsão eletrostática que promove, e conseqüentemente, por intermédio da diminuição da tensão superficial entre os componentes imiscíveis ou com baixa miscibilidade. Com isso é possível destacar o seu efeito tanto na estabilidade da formulação quanto na atividade anti-

herpética sinérgica aos demais fármacos selecionados nesse estudo (PAULA; DELCHEVA; BEATTIE, 2018; ZHU et al., 2019).

Visando maior estabilidade da formulação, não só frente à validade do produto, mas também em relação à sua segurança e eficácia é que diversas análises físico-químicas devem ser realizadas durante o seu desenvolvimento, em todas as suas etapas (FARJAMI; ASHKAN, 2019; TADROS, 2013).

3.4.4 Análise da Estabilidade, Comportamento Reológico e Características da Formulação

A estabilidade de um creme é observada por meio da capacidade que a formulação apresenta de se manter inalterada frente à dispersão de suas gotículas na fase contínua, mantendo assim a aparência, a cor, o odor, o pH, o tamanho das gotículas, o teor dos princípios ativos e a consistência inicial, bem como o seu potencial de conservação frente à alterações microbiológicas (AULTON, 2016; TADROS, 2013).

O estudo de estabilidade tem a intenção de expor o produto formulado a condições em que ele possa ser submetido, desde a sua fabricação até o seu prazo de validade, considerando inclusive, o seu transporte. Ele auxilia na otimização da formulação, na escolha do material de acondicionamento e ainda a estimar o prazo de validade (BRASIL, 2004, 2005; SULTANA; MOHAMMED, 2017).

No estudo de estabilidade acelerado a formulação é exposta a condições mais críticas, com extremos de temperatura previamente definidos em um período de exposição e amostragem estabelecidos. Avalia-se então, alguns parâmetros físico-químicos anteriormente citados (BRASIL, 2004, 2005; SULTANA; MOHAMMED, 2017).

Um simples e importante teste para avaliar a estabilidade de uma fórmula é o de centrifugação, que pode avaliar o processo de separação em uma condição forçada. Outro é a análise do tamanho das gotículas, utilizando microscopia óptica, um método direto para estimar este parâmetro e então evidenciar instabilidades como a coalescência e/ou o amadurecimento de Ostwald, que causam aumento no tamanho da fase dispersa. O pH também é uma medida a ser considerada, assim como o potencial de conservação microbiológico, que deve comprovar se o sistema

conservante selecionado é adequado (AULTON, 2016; BRASIL, 2004; SULTANA; MOHAMMED, 2017).

Ensaio que avalie o teor dos ativos presentes na formulação devem ser explorados, de modo a garantir a eficiência e a segurança da formulação. Caso não haja metodologia validada para esta finalidade, a mesma deve ser desenvolvida e validada por meio do direcionamento de guias nacionais e internacionais, de modo a garantir a qualidade das análises por meio de resultados confiáveis (BRASIL, 2004; SHABIR, 2003; SULTANA; MOHAMMED, 2017).

O conhecimento do comportamento reológico de uma formulação também é essencial para o seu preparo, desenvolvimento, desempenho, bem como, para a avaliação de sua estabilidade, analisando efeitos como a separação de fases, por exemplo. A reologia é a ciência que estuda as características de um material frente à sua deformação e escoamento e inúmeros são os fatores que podem influenciar esse parâmetro, como interações moleculares e coloidais, natureza dos excipientes, processo para obtenção do creme e ainda, condições de armazenamento (AULTON, 2016; TATAR; SUMNU; SAHIN, 2016).

Os fundamentos da viscosidade foram atribuídos aos estudos de Newton, que foi o primeiro a relacionar a velocidade de fluxo à tensão aplicada. A maioria dos fluídos farmacêuticos, dentre eles as emulsões, não obedecem a Lei de Newton (os chamados fluídos não newtonianos), já que a viscosidade pode ser variável frente à velocidade de cisalhamento. Neste caso, a avaliação do comportamento reológico deve ser realizada com um instrumento que tragam resultados válidos, como o reômetro, capaz de fixar a velocidade ou então, a tensão de cisalhamento, e assim mensurar a resultante de uma dessas duas variáveis (AULTON, 2016; DERKACH, 2009).

A espalhabilidade é uma característica significativa e igualmente as anteriores, deve ser observada durante o desenvolvimento da formulação tópica, já que é pertinente à natureza organoléptica do creme, estando intimamente conexa a sua aplicação. Ela pode ser definida como a capacidade de uma fórmula semi-sólida dispersar-se sobre uma superfície em um determinado período de tempo, sendo os ensaios referentes a esse parâmetro realizados em função de um peso aplicado. A escolha de componentes com baixo peso molecular e/ou baixa viscosidade irão transferir melhores propriedades de espalhamento (BORGHETTI; KNORST, 2006; GORE; PICARD; SAVARY, 2018).

Todos esses fatores devem ser avaliados para a garantia de um produto final adequado, que se apresente eficiente e seguro.

3.4.5 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica Indicativa de Estabilidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é resumidamente uma técnica físico-química de separação que particiona substâncias presentes em uma mistura por meio de duas fases, uma estacionária e outra móvel, sendo essa partição dependente da afinidade química que apresentam com cada uma delas. O primeiro trabalho evidenciando esse método foi realizado por Michael Tswett, um botânico russo-italiano. Dentre as diferentes condições para essa técnica está a cromatografia a líquido, que necessita da solubilidade das amostras na fase móvel e de uma possível interação com a fase estacionária. Um dos formatos mais utilizados na cromatografia moderna é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (em inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) (CIOLA, 1998; RATHORE; JOSHI, 2018).

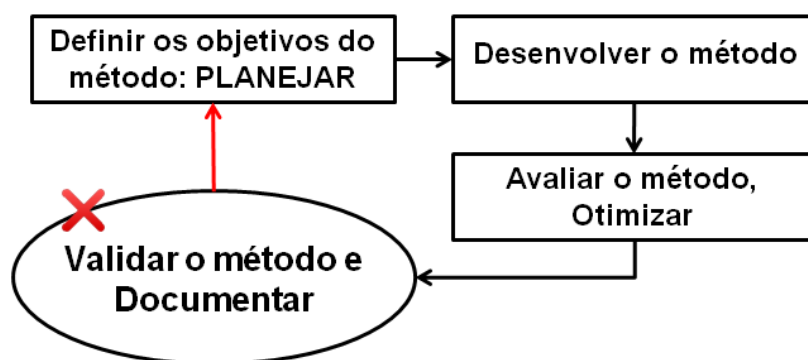
A HPLC é uma ferramenta analítica amplamente empregada na indústria farmacêutica, desde a pesquisa de um novo fármaco até o controle de qualidade, estudo de estabilidade e análise do comportamento *in vitro* e *in vivo* do produto final. Muitas são as metodologias existentes destinadas a diversos ativos e formulações, mas há a necessidade de desenvolver e validar novas delas quando se trata de novos fármacos e/ou novas fórmulas. Esse desenvolvimento é desafiado pelo ritmo acelerado da pesquisa farmacêutica, afinal trata-se de um processo dependente de infinitas variáveis, que exige tempo e profissionais qualificados (CIOLA, 1998; MATTREY et al., 2017; RASMUSSEN et al., 2005).

Dentre os diversos parâmetros a serem ajustados durante uma separação por HPLC estão a polaridade da fase móvel, sua vazão, pH e composição, as características da fase estacionária, temperatura da coluna cromatográfica, tipo de detector e infinitas configurações. Para dar início a um desenvolvimento de metodologia analítica, a partir de tantas condições a serem ensaiadas, revisar a literatura científica, considerar métodos internos já existentes ou presentes em compêndios oficiais, e conhecer devidamente a molécula de interesse são primordiais, devendo compor o primeiro passo a ser dado. Geralmente, quando se realiza esse estudo, as informações escolhidas como ponto de partida são, a

natureza da coluna, o solvente e o pH utilizado na fase móvel (DOLAN; SNYDER, 2017; SAHU et al., 2018).

Além da etapa citada acima, um desenvolvimento ideal deve compreender a definição dos objetivos do método, o desenvolvimento inicial do mesmo, o seu ajuste e otimização, considerando importantes parâmetros de eficiência, e por fim, a validação da metodologia analítica, com posterior documentação do processo. Se a última etapa não for alcançada, deve-se retornar ao planejamento do desenvolvimento (DOLAN; SNYDER, 2017; RASMUSSEN et al., 2005). A Figura 7 resume estas etapas em um esquema.

Figura 7: Etapas para o desenvolvimento de metodologia analítica.



A validação da metodologia analítica desenvolvida é responsável por comprovar por meio de análise estatística adequada que os dados a serem produzidos a partir de sua utilização serão confiáveis e consistentes quanto à aplicação a que se destinam. Vale ressaltar que a qualidade das análises estará estreitamente relacionada com a qualidade do produto final (SHEETS, 2018).

Na indústria farmacêutica sugere-se que a validação de metodologia por HPLC seja direcionada e assegurada pelas diretrizes dos seguintes órgãos regulamentadores: International Conference on Harmonization (ICH), *Food and Drugs Administration* (FDA) e *United States Pharmacopeial* (USP) (SHABIR, 2003). As exigências da entidade brasileira, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), são baseadas nessas regulamentações mundiais (BRASIL, 2017).

Os parâmetros avaliados durante a validação analítica são a seletividade, a linearidade, os limites de detecção e de quantificação, a precisão, a exatidão e a

robustez. Seus ensaios devem ser compatíveis com o objetivo da metodologia desenvolvida para que seja possível obter validade científica, para tanto um protocolo de validação devidamente planejado deve ser traçado (DOLAN; SNYDER, 2017; SHEETS, 2018).

A seletividade, anteriormente designada especificidade, avalia a capacidade que o método apresenta de detectar a substância de estudo frente ao seu produto de degradação ou a outros compostos presentes em uma matriz (BRASIL, 2017).

A linearidade é um parâmetro que determina se há relação proporcional entre a resposta e a concentração do analito, dentro de um intervalo especificado. Os valores limites para detecção e quantificação são derivados dessa análise, e correspondem à menor concentração em que o fármaco é capaz de ser detectado e à menor quantidade em que pode ser quantificado, respectivamente (BRASIL, 2017).

Outro parâmetro a ser mencionado é a exatidão, que afere quão próximos estão os resultados encontrados do valor teórico, tido como verdadeiro. A precisão, por sua vez, avalia essa proximidade entre os resultados obtidos de uma série de medidas, e é realizada de três maneiras, por meio da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade, amostras em uma mesma análise, em análises ocorrida em dias diferentes e preparadas por diferentes analistas, e naquelas executadas em diferentes laboratórios (BRASIL, 2017).

Por fim, para observar a capacidade do método em suportar a pequenas variações, como no pH da fase móvel e leves alterações no seu fluxo, por exemplo, é que a robustez é realizada (BRASIL, 2017).

Juntamente as análises desses parâmetros, a adequação do sistema deve ser constatada. Difundido em inglês, o *System Suitability*, assegura que o equipamento, o software e as amostras estejam operando de forma satisfatória (BRASIL, 2017; SHEETS, 2018).

Métodos indicativos de estabilidade, também denominado métodos para produtos de degradação, devem ser objetos de estudo diante do desenvolvimento de uma nova molécula ou mesmo formulação. É uma exigência dos órgãos reguladores, pois metodologias validadas para esse fim auxiliam no processo de assegurar a eficácia e a segurança do medicamento, já que há uma grande preocupação frente à estabilidade química das moléculas farmacêuticas. Os ensaios são realizados após uma degradação forçada do composto em estudo que simulam

alguns dos processos pelos quais o fármaco pode vir a passar em seu tempo de prateleira como hidrólises ácida e básica, oxidação, bem como degradações fotolíticas e térmicas (BLESSY et al., 2014; BRASIL, 2015; ICH, 2006).

Os guias desenvolvidos pelas agências reguladoras não oferecem detalhes de como esses estudos devem ser realizados, apenas direcionam. Dessa forma, vale reiterar que a revisão da literatura científica é essencial para o desenvolvimento dessa metodologia, e que o bom senso do pesquisador deve ser utilizado diante do conhecimento sobre a substância de interesse (BLESSY et al., 2014).

Idealmente os produtos de degradação encontrados devem ser identificados, e isso se torna possível com a combinação de diversas técnicas analíticas, como exemplo, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) (GALMIER et al., 2005; ICH, 2006).

Neste trabalho, o penciclovir foi utilizado em uma formulação associado a lisina, e não há na literatura científica e nem em farmacopeias uma mesma metodologia capaz de avaliá-los. Para tanto, faz-se necessário o desenvolvimento e a validação de metodologia analítica capaz de avaliar o teor e os possíveis produtos de degradação desses fármacos no produto final.

3.4.6 Análise da Permeação dos Fármacos Presentes na Formulação

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem as funções de regular a temperatura corporal, de manter o balanço eletrolítico, e de proteger o organismo de traumas físicos, de agentes químicos, de microorganismos e da radiação ultravioleta. A sua camada mais externa, o estrato córneo é quem determina essa ação protetora, de barreira, sendo ela qualificada de acordo com a sua composição físico-química, que muda de um indivíduo para o outro. Esse é o maior obstáculo para a transdérmica de fármacos (TROMMER; NEUBERT, 2006; ZHOU et al., 2019).

Formulações tópicos são então desenvolvidas com a finalidade de permear essa barreira, alcançando a epiderme e a derme. Idealiza-se com elas obter ação local, sendo uma maneira de fácil administração, não invasiva e de boa adesão do paciente. Diversos são os mecanismos utilizados para otimizar a permeação dos fármacos presentes nas fórmulas, e entre eles está o emprego de excipientes que

potencializem essa penetração por conta de sua natureza química, como é o caso do propilenoglicol (TROMMER; NEUBERT, 2006).

Diante do exposto e destacando questões importantes quanto à segurança e aspectos terapêuticos, é de relevância conhecer o comportamento da formulação frente a sua percutânea. Para a realização de ensaios que determinem esse parâmetro, testes em animais podem ser substituídos por estudos *in vitro*, em razão de questões éticas que modificaram a visão regulatória. As entidades internacionais não padronizaram, formalmente, esses experimentos, mas destacam que ensaios *in vitro*, se realizados de maneira adequada, podem ser utilizados para prever a permeação *in vitro*. O desenvolvimento de uma metodologia analítica capaz de determinar a concentração dos ativos é inerente a esta técnica (RODRIGUES; OLIVEIRA, 2016).

A maioria dos estudos, já descritos, envolvendo a análise da permeação de produtos químicos presentes em uma fórmula foi determinada através de experimentos com células de difusão, como a Célula de Difusão de Franz, um ensaio *in vitro* que avalia a permeação percutânea em sistema estático ou de fluxo contínuo. O princípio desta técnica consiste na análise do comportamento de liberação da substância em estudo, utilizando uma membrana entre duas câmaras, uma doadora, na qual o fármaco será depositado, e outra receptora, para onde o ativo será carregado. Condições como a característica da membrana, a temperatura, a agitação e a dose do fármaco devem ser controladas para a obtenção de uma avaliação adequada (FRANZ, 1975; KARADZOVSKA et al., 2013; RODRIGUES; OLIVEIRA, 2016).

3.4.7 Análise *in vivo* da Eficácia da Formulação em Modelo Animal

Os princípios do uso de animais como modelo de estudo frente à fisiologia humana foram descritos por Claude Bernard ainda no século XIX. Ainda nesse período e em razão desta correlação, é que a experimentação animal tornou-se uma importante metodologia científica, sendo considerada uma ferramenta utilizada com a finalidade de avaliar hipóteses, teorias já conhecidas ou mesmo efeitos desconhecidos de infinitas substâncias, composições, comportamentos, dentre diversas outras questões do meio científico (FAGUNDES; TAHA, 2004; FRAJBLAT; AMARAL; RIVERA, 2008).

O modelo animal a ser selecionado para o desenvolvimento de um estudo está condicionado aos objetivos do trabalho, à maneira que será conduzido e às normas éticas. Essas condições devem compor um projeto de pesquisa a ser avaliado por um comitê, conforme princípios e diretrizes relacionadas à Lei Arouca (nº 11.794/08) (FAGUNDES; TAHA, 2004).

A possibilidade de correlacionar os efeitos observados no modelo animal pela administração de determinados fármacos, bem como de suas formulações, aos efeitos que viriam a ocorrer nos seres humanos, fez com que ele fosse cada vez mais utilizado na pesquisa envolvendo produtos farmacêuticos, tornando capaz a predição da eficácia e da segurança dos mesmos (DOKE; DHAWALE, 2015; PAIXÃO, 2001). Essa afirmativa também é válida às formas farmacêuticas tópicas, que apresentam a vantagem da redução de efeitos sistêmicos e da facilidade na administração. Assim como as demais vias, relacionadas ao tratamento de diferentes afecções, elas também requerem a escolha de uma metodologia adequada e embasada cientificamente para que assim, a correlação citada inicialmente possa existir (SILVA et al., 2010).

Atualmente, a substituição de ensaios *in vivo* por ensaios *in vitro* tem sido amplamente defendida sob o ponto de vista de proteção animal *versus* evolução tecnológica. Porém, sabe-se que esse será um processo lento e gradual, e em muitas situações de difícil sucessão, em razão da complexidade que os sistemas *in vivo* representam no meio científico (DOKE; DHAWALE, 2015; ROBERFROID, 1994).

Dentre as espécies utilizadas nos ensaios *in vivo* em modelo animal estão os camundongos. Este animal é capaz de representar modelos experimentais de diversas condições patológicas humanas, além de apresentar as vantagens de ser pequeno, muito prolífero, ter período de gestação curto, ser de fácil domesticação e manutenção. Juntamente de outras espécies, os estudos realizados com eles permitem que possa haver efetiva investigação tanto para métodos preventivos quanto para o tratamento de doenças (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Os camundongos constituem o modelo animal adotado neste trabalho que avalia a eficácia da formulação desenvolvida.

4 MATERIAIS

4.1 Materiais, Substâncias e Reagentes

- 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA)
- Acetonitrila grau HPLC (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil)
- Acetato de Sódio (Biotec, Paraná, Brasil)
- Ácido Bórico (Synth, São Paulo, Brasil)
- Ácido Trifluoracético (Biotec, Paraná, Brasil)
- Álcool Cetoestearílico (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil)
- Ácido Clorídrico (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brazil)
- Álcool Isopropílico (Anidrol, São Paulo)
- BHT (Synth, São Paulo, Brasil)
- Cloridrato de Lisina (Infinity Pharma, São Paulo, Brasil)
- DMSO (Synth, São Paulo, Brasil)
- EDTA (Anidrol, São Paulo)
- Filtros de Seringa PTFE 0,45 µm (Allcrom, São Paulo, Brasil)
- Fosfato de Amônio (Neon, São Paulo, Brasil)
- Fosfato de Sódio (Neon, São Paulo, Brasil)
- Frasco plástico (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha)
- Hidróxido de Sódio (Biotec, Paraná, Brasil)
- Lauril Sulfato de Sódio (Anidrol, São Paulo)
- Metanol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)
- Metilparabeno (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil)
- MTT (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA)
- Ortoftaldeído (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA)
- Parafina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)
- Penciclovir (doação EMS Sigma Pharma, São Paulo, Brasil)
- Polawax (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil)
- Propilenoglicol (Synth, São Paulo, Brasil)
- Propilparabeno (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil)
- Triton 100X (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA)
- Vaselina líquida (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil)

Células, Vírus, Meio de Cultura e Animais:

- Anfotericina B (Meizler Biopharma S/A, São Paulo, Brasil)
- Camundongos Linhagem BALB/c (Biotério UEM, Maringá, PR, Brasil)
- Células Vero (ATCC CCL-81, células renais de macaco verde africano - cedidas pelo LITDFC/DCBS/UEM, Maringá, PR, Brasil)
- Estreptomicina (Gibco BRL, Massachusetts, EUA)
- Glutamina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA)
- Meio Dulbecco's modified Eagle's – DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco BRL, Massachusetts, EUA)
- Penicilina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA)
- Ração NUVILAB CR-1 (Quimtia, Paraná, Brasil)
- Vírus *Herpes simplex* tipo 1 (HSV-1) sensível ao aciclovir (KOS) (ATCC VR-1493, cedido pelo LITDFC/DCBS/UEM, Maringá, PR)

4.2 Equipamentos

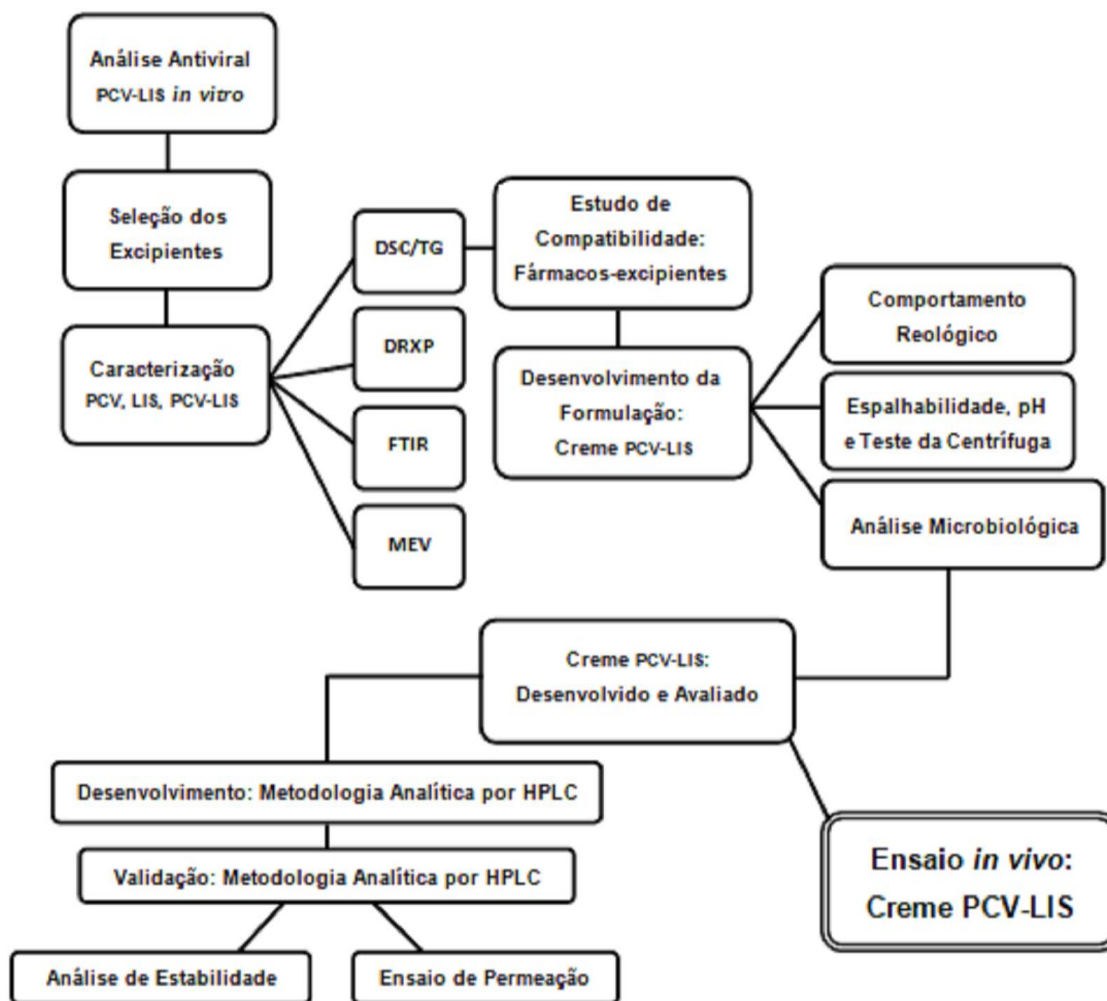
- Agitador Vortex[®] (Quimis, São Paulo, Brasil)
- Autoclave vertical (Phoenix Lufenco, São Paulo, Brasil)
- Balança analítica Shimadzu AUX220[®] (Shimadzu, Kyoto, Japão)
- Banho-maria (SPLabor, São Paulo, Brasil)
- Cabina de fluxo laminar (Vecoflow, São Paulo, Brasil)
- Calorímetro SDT-Q600[®] (TA Instruments, Tokyo, Japão)
- Centrífuga Centribio (Biomex Biotecnologia, São Paulo, Brasil)
- Coluna cromatográfica Luna[®] C18 (Phenomenex, Califórnia, EUA)
- Coluna cromatográfica Synergi[®] C18 (Phenomenex, Califórnia, EUA)
- Coluna cromatográfica Shimadzu Shim-Pack[®] C18 (Shimadzu, Kyoto, Japão)
- Chapa de agitação magnética (Fisatom Brasil)
- Cromatógrafo LC-20AT[®] (Shimadzu, Kyoto, Japão)
- Difratômetro de raios X de pó D2 Phaser[®] (Bruker, Massachusetts, EUA)
- Espectrofotômetro FTIR Frontier[®] (Perkin Elmer, Massachusetts, EUA)
- Espectrofotômetro Leitor de Microplacas ELX 800[®] (Biotek, Vermont, EUA)
- Incubadora de CO₂ (Sanyo Trading, New York, EUA)
- Microscópio XDS-1B[®] (Hexasystems Group, São Paulo, Brasil)

- Microscópio eletrônico de varredura VEGA 3 SB[®] (Tescan, Libušina třída, Brno, República Tcheca)
- Pré-coluna cromatográfica Phenomenex[®] SecurityGuard C18 (Phenomenex, Califórnia, EUA)
- pHmetro Edge (Hanna, Carrollton, Texas, EUA)
- Pipetadores semi-automáticos (Gilson, Wisconsin, EUA)
- Viscosímetro Brookfield DV-II+Pro[®] (Brookfield Engineering Laboratories, Massachusetts, EUA)
- Sistema de purificação Milli-Q[®] (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Alemanha).

5 MÉTODOS

Para facilitar a visualização das diferentes etapas de execução do trabalho, a metodologia está apresentada na forma de fluxograma, na Figura 8.

Figura 8: Etapas de execução do trabalho.



5.1 Análise *in vitro* da Atividade Antiviral

5.1.1 Cultivo das Células Vero

As células Vero (ATCC CCL-81, células renais de macaco verde africano), cultivadas em meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina e tratado com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de estreptomicina, 100 UI mL^{-1} de penicilina e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de anfotericina B, foram tripsinizadas por meio do seguinte procedimento:

1. Retirou-se o meio da garrafa em que as células encontram-se;
2. Adicionou-se 12 mL de tripsina para promover o desprendimento das células;
3. Removeu-se o excesso e adicionou-se 8 mL de meio DMEM.

Desta forma, uma gota dessa suspensão de células foi adicionada a cada um dos 96 poços de cada microplaca utilizada para os experimentos. A microplaca foi incubada a 37°C em 5% de CO₂, onde permaneceu por 24h, para então, ser utilizada. Antes da utilização, a proliferação das células foi observada no microscópio, e a confluência constatada foi de 80%.

Observação:

Os materiais utilizados foram anteriormente esterilizados com calor úmido em autoclave, através do alcance de altas temperaturas sob condição de alta pressão. Os procedimentos foram realizados em fluxo laminar devidamente esterilizado: álcool 70% na bancada, 15 minutos de luz UV e álcool 70% antes e durante o processo.

5.1.2 Ensaio de Citotoxicidade por MTT para Avaliação de Viabilidade Celular

Para o preparo das soluções de trabalho dos agentes antivirais, 4 mg de cada um deles foram dissolvidos nos diluentes descritos na Tabela 1, alcançando suas respectivas concentrações. Ambas as soluções foram agitadas com o auxílio de um agitador (Vortex®).

Tabela 1: Soluções de trabalho de PCV e de LIS.

Agente Antiviral	Diluyente	Concentração (mg mL ⁻¹)
PCV	200 µL de DMSO _(estérel) + 900 µL de água _(injetável)	3,6
LIS	1000 µL de meio	4

À cada poço da microplaca preparada conforme o item 5.1.1, 100 µL de PCV e de LIS (em quadruplicata) em concentrações demonstradas na Tabela 2, alcançadas por meio de diluições seriadas feitas em meio, foram adicionadas às células.

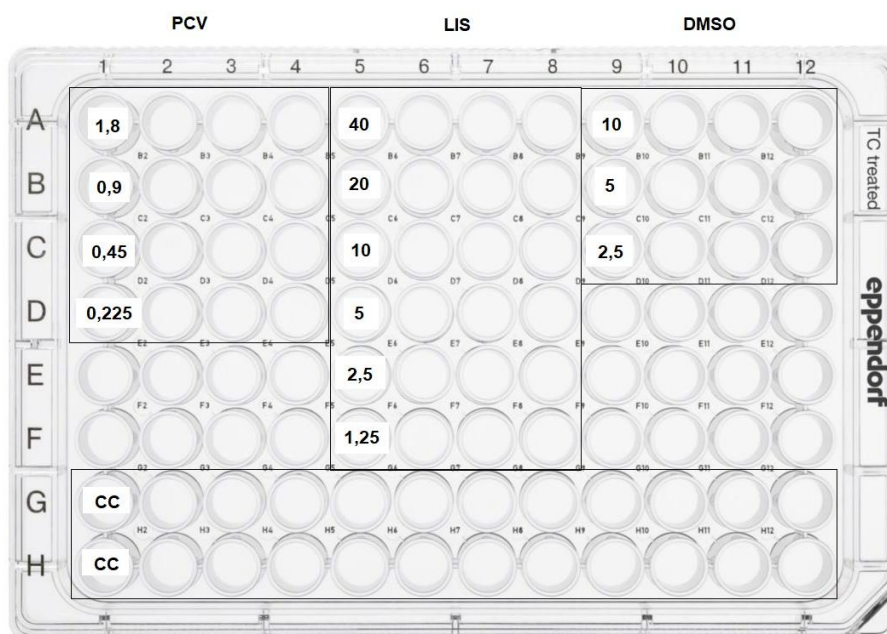
Tabela 2: Concentrações de PCV e de LIS inoculadas na microplaca para o ensaio de citotoxicidade.

Agente Antiviral	Concentrações Inoculadas (mg mL ⁻¹)
PCV	1,8; 0,9; 0,45; 0,225*
LIS	40; 20; 10; 5; 2,5; 1,25*

*concentrações escolhidas após ensaios prévios

Em razão das concentrações ensaiadas para o PCV, que apresentou DMSO_(estérel) em sua solução, a citotoxicidade do DMSO_(estérel) a 10, 5 e 2,5% também foi investigada, 100 µL de cada concentração foi inoculado em quadruplicata nos poços destinados a esse ensaio. O Controle de Célula (CC) foi realizado inoculando 100 µL de meio de manutenção em cada poço (duas linhas da microplaca). As diluições e o esquema do experimento estão representados na Figura 9.

Figura 9: Esquema representativo do ensaio de citotoxicidade por MTT (imagem original retirada de <http://www.directindustry.com>).



Após inoculação dos fármacos e diluente, a microplaca foi incubada por 72h em incubadora de CO₂ a 37°C.

Os passos seguintes, depois de transcorrido esse período, foram a análise microscópica da microplaca registradas por meio de fotografias, com posterior revelação de viabilidade celular utilizando o reagente MTT, por meio do seguinte procedimento:

1. Os poços foram homogeneizados com a solução anteriormente inoculada na placa por 3 vezes, com o auxílio de uma pipeta semi-automática. Após a terceira vez, descartou-se o conteúdo presente na ponteira e o excesso também foi retirado;
2. 10 µL do reagente MTT foram adicionados aos poços e a microplaca foi incubada em CO₂ a 5% a 37°C novamente, desta vez, por no mínimo, 2 horas;
3. Após esse período, adicionou-se 90 µL do solubilizador de MTT (solução composta de: triton 100X, álcool isopropílico, ácido clorídrico) aos poços e então, a microplaca foi levada para agitação mecânica por 15 min;
4. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro em 570 e em 690 nm.

Observação:

A PBS (solução salina tamponada de fosfato), utilizada para tornar incolores as soluções dos compostos inoculados nas células, não foi necessária, pois não houve alterações de cor nos poços.

A porcentagem de células viáveis para cada concentração foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = (\text{Abs } 570 - \text{Abs } 690 / \text{Abs CC}) * 100$$

A % de morte celular é calculada diminuindo o valor encontrado com a equação acima de 100.

A análise de Concentração Citotóxica (CC50), concentração capaz de inviabilizar mais de 50% das células presentes nos poços, foi calculada por meio da análise de regressão linear e do coeficiente de determinação (r^2), que deveria ser maior ou igual a 0,98 para três pontos que abrangessem a CC50. A equação resultante pôde então fornecer o valor real da CC50 de cada substância.

5.1.3 Atividade Antiviral por MTT (Triagem) após Infecção por HSV-1

A solução de trabalho utilizada para a avaliação de atividade antiviral dos fármacos selecionados para essa pesquisa foi preparada conforme o procedimento descrito no item 5.1.2, PCV com concentração inicial de 3,6 mg mL⁻¹ e LIS de 4 mg mL⁻¹.

Aos poços da microplaca preparada conforme o item 5.1.1, foram inoculados 100 µL de PCV e de LIS (em quadruplicata) em concentrações resultantes de diluições seriadas feitas em meio demonstradas na Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações de PCV e de LIS inoculadas na microplaca para a avaliação da atividade antiviral.

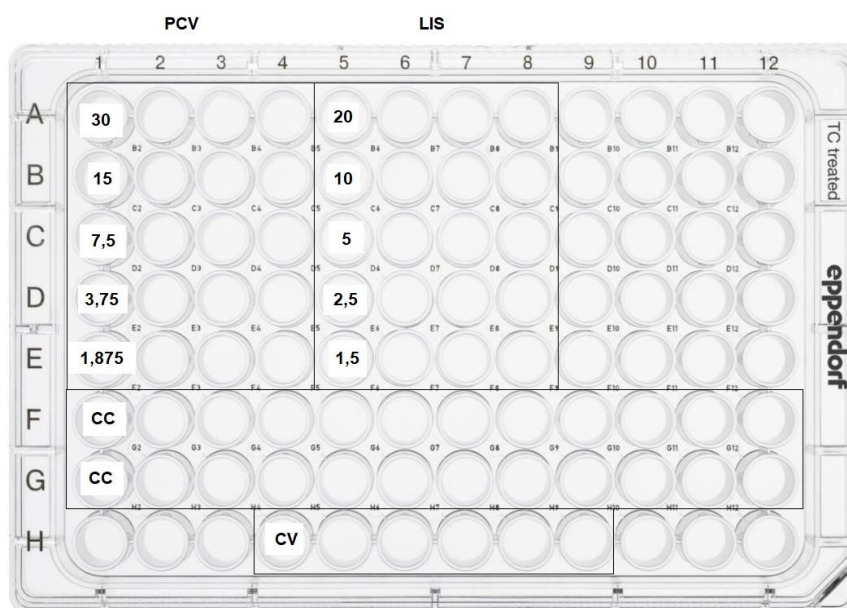
Agente Antiviral	Concentrações Inoculadas
PCV	30; 15; 7,5; 3,75; 1,875* µg mL ⁻¹
LIS	20; 10; 5; 2,5; 1,25* mg mL ⁻¹

*concentrações escolhidas após ensaios prévios

O inóculo viral de HSV-1 KOS (ATCC VR-1493, cepa isolada originalmente de uma lesão labial de Kendall O. Smith), diluído inicialmente a $10^{-2} \mu\text{g mL}^{-1}$, atingiu diluição final de $10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ quando adicionado às soluções de cada concentração das substâncias em estudo (diluições seriadas).

O Controle de Célula (CC) foi realizado inoculando 100 μL de meio nos poços sem as substâncias (duas linhas da microplaca), e o Controle de Vírus (CV) foi feito inoculando em sextuplicata a mesma quantidade de vírus a $10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ em cada poço ausente dos fármacos e destinado para essa finalidade. As inoculações para a Avaliação da Atividade Antiviral estão esquematizadas na Figura 10.

Figura 10: Esquema representativo da avaliação da atividade antiviral por MTT (imagem original retirada de <http://www.directindustry.com>).



Após incubação da microplaca por 72h, deu-se prosseguimento com a revelação do ensaio utilizando o reagente MTT, procedimento descrito no fim do item 5.1.2.

A porcentagem de inibição viral para cada concentração foi determinada por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição Viral} = \frac{(\text{Abs}_{\text{teste}} - \text{Abs}_{\text{cv}})}{(\text{Abs}_{\text{cc}} - \text{Abs}_{\text{cv}})} * 100$$

$\text{Abs}_{\text{teste}} = \text{Abs}_{570} - \text{Abs}_{690}$ (substâncias inoculadas)

A análise de Concentração Inibitória (IC50), concentração capaz de inibir em mais de 50% a ação viral, foi calculada por meio da análise do coeficiente de determinação (r^2), que deveria ser maior ou igual a 0,98 para três pontos que abrangessem a IC50. A equação resultante pôde então fornecer o valor real da IC50 de cada substância.

5.1.3.1 Avaliação do Potencial Sinergismo Antiviral de PCV-LIS

O ensaio foi realizado conforme proposto por Gong et al (2004), com algumas adaptações. Quatro concentrações foram testadas associando os agentes virais: 0,25*IC50 PCV e 0,25*CC50 LIS; 0,50*IC50 PCV e 0,50*CC50 LIS; 1*IC50 PCV e 1*CC50 LIS; 2*IC50 PCV e 2*CC50 LIS. As substâncias em solução, nas diferentes concentrações, foram inoculadas juntamente ao vírus, que apresentou diluição final de $10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$.

A microplaca, preparada conforme item 5.1.1, depois de inoculada, foi levada a incubação por 72h em incubadora de CO₂ a 37°C. Após esse período, a avaliação e registro microscópico, deu-se a revelação do teste utilizando o reagente MTT, procedimento descrito no fim do item 5.1.2.

Os cálculos de inibição viral e de IC50 foram semelhantes aos descritos no item 5.1.3. Para avaliação do efeito sinérgico, os resultados obtidos foram base para novos cálculos, utilizando a seguinte fórmula que determina o Índice de Combinação (IC):

$$\text{IC} = (C_{\text{PCV}}/\text{IC50}_{\text{PCV}}) + (C_{\text{LIS}}/\text{CC50}_{\text{LIS}})$$

C = Concentração das substâncias no teste

Valores de IC menores que 1 indicam sinergismo, iguais a 1 aditividade e maior que 1 antagonismo (GONG et al., 2004).

5.1.3.2 Atividade Antiviral Profilática da LIS por MTT (Triagem) na Infecção por HSV-1

Para o preparo da solução de trabalho utilizada neste ensaio, 10 mg de LIS foram diluídas, com o auxílio de um agitador (Vortex®), em 1000 µL de meio, alcançando a concentração final de 10 mL⁻¹.

Aos poços da microplaca preparada conforme o item 5.1.1, foram inoculados 100 µL de LIS (em quadruplicata) em concentrações resultantes de diluições seriadas feitas em meio demonstradas na Tabela 4.

Tabela 4: Concentrações de LIS inoculadas na microplaca para a avaliação da atividade antiviral profilática.

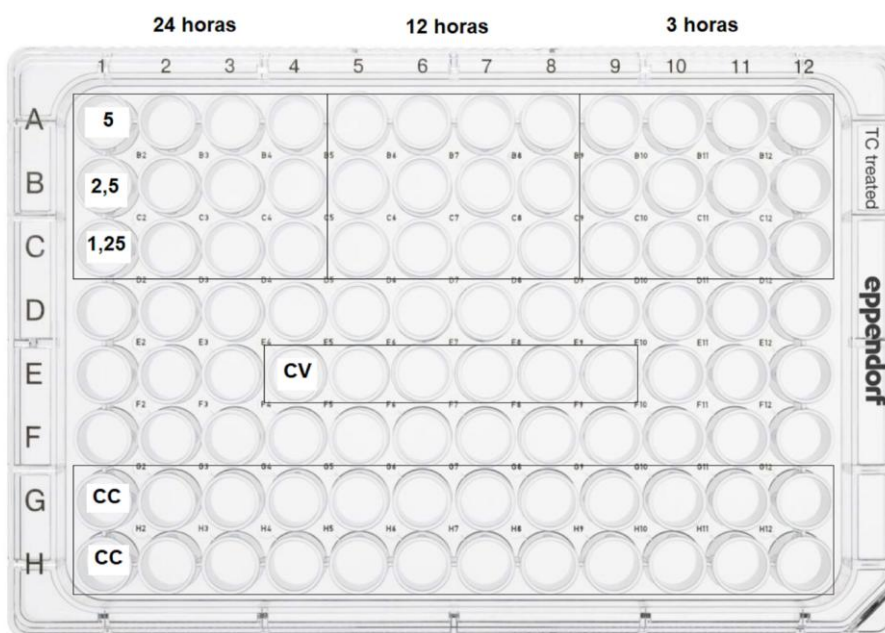
Agente Antiviral	Concentrações Inoculadas
LIS	5; 2,5; 1,25* mg mL ⁻¹

*concentrações escolhidas após ensaios prévios

Essas inoculações antecederam em 24, 14 e 3 horas a adição do inóculo da cepa viral de HSV-1 KOS na concentração final de 10⁻³ µg mL⁻¹.

O Controle de Célula (CC) e o Controle de Vírus (CV), a incubação e a revelação da placa, bem como os cálculos foram realizados como a metodologia descrita em 5.1.3. As inoculações para a Avaliação da Atividade Antiviral Profilática estão esquematizadas na Figura 11.

Figura 11: Esquema representativo da avaliação da atividade antiviral profilática da LIS por MTT (imagem original retirada de <http://www.directindustry.com>).



5.2 Seleção de Excipientes

Para iniciar o desenvolvimento da nova formulação, creme óleo/água (O/A) contendo PCV e LIS, realizou-se análise qualitativa das formulações de penciclovir e aciclovir disponíveis no mercado brasileiro, sendo fórmulas genéricas, similares e de referência. Os excipientes inicialmente selecionados foram os mais citados nas bulas das formulações investigadas.

5.3 Caracterização do Estado Sólido das Matérias-Primas

5.3.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)/Termogravimetria (TG)

PCV puro, LIS pura e os excipientes utilizados no desenvolvimento da formulação: EDTA, álcool cetoestearílico (ALC CET), lauril sulfato de sódio (LAURIL), BHT, vaselina líquida (VAS LIQ), metilparabeno (METIL), parafina (PARAF), POLAWAX, propilenoglicol (PROP GLI) e propilparabeno (PROPIL), foram analisados individualmente e também após a mistura ternária fármacos-excipiente (1:1:1, p/p/p) por DSC/TG (SDT-Q600[®], TA Instruments), para avaliar a compatibilidade entre eles. As amostras foram analisadas em um cadinho de

alumina aberto, pesando cerca de 4 mg de amostra. A faixa de temperatura utilizada foi de 20-400 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio (100 mL min⁻¹).

5.3.2 Difração de Raios-X em Pó (DRXP)

A análise de DRXP (D2 Phaser[®], Bruker) foi realizada para obter os dados relacionados à cristalinidade na faixa de 6-40° (2θ) com tempo de passo de 1s e incremento de 0,05°, em um difratômetro com tubo de CuKα. As amostras analisadas incluíram fármacos puros (PCV e LIS) e sua mistura na proporção 1:1 (p/p). Para evitar problemas de orientação preferencial, as amostras foram cuidadosamente colocadas sobre o porta-amostra e mantidas a 5 rpm durante as análises.

5.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier por Reflexão Difusa (FTIR)

O espectro de FTIR (Frontier[®], Perkin Elmer) adquirido para os fármacos puros (PCV e LIS) e também para a mistura dos dois na proporção de 1:1 (p/p) foram obtidos dentro da faixa de varredura de 4000-600 cm⁻¹, com média de mais de 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm⁻¹. Um espectro de fundo (branco) foi realizado. A informação espectral foi obtida utilizando a reflexão difusa, a partir da incidência e reflexão do pó (quantidade suficiente para completar o disco de suporte da amostra).

5.3.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As fotomicrografias dos fármacos puros (PCV e LIS) e a mistura de ambos na proporção de 1:1 (p/p) foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (VEGA 3 SB[®], Tescan) com detector de elétrons secundários do tipo Everhart-Thornley, para alto vácuo, com grade frontal de potencial positivo e um filamento de 30kV. As amostras foram montadas em suporte de alumínio e fixadas em fita adesiva de carbono dupla face.

5.4 Estudo de Compatibilidade Fármacos-Excipientes

PCV e LIS foram analisados separadamente e em uma mistura binária, cuja proporção foi de 1:1 (p/p) utilizando todas as técnicas descritas anteriormente (item 5.2).

Para a análise de compatibilidade do PCV:LIS com os excipientes, um sistema ternário com quantidades relativas de 1:1:1 (p/p/p) foi escolhido. A compatibilidade deste sistema ternário foi realizada por DSC e TG, conforme descrito anteriormente (item 5.3.1).

Para os sistemas binário e ternário, 10 mg de cada substância a ser incluída nas misturas planejadas foram pesados e colocados em um pequeno frasco de plástico. Posteriormente, os componentes foram misturados com o auxílio de um agitador Vortex[®] por 1 minuto a 2500 rpm. Esta metodologia de mistura demonstra resultados mais satisfatórios, promovendo a homogeneidade do conteúdo a ser pesado e mantendo a substância de partida fisicamente inalterada, como demonstrado por Gomes et al. (2018).

5.5 Desenvolvimento/Preparo do Creme

A partir da seleção dos excipientes e estudo de compatibilidade entre os selecionados e os fármacos, quatro foram as formulações ensaiadas (F1; F2; F3; F4). A constituição de cada uma delas está presente na Tabela 5.

Tabela 5: Constituição das formulações ensaiadas.

Composição	F1	F2	F3	F4
Fase Aquosa				
PROP GLI	20 g	20 g	20 g	20 g
Água Destilada	q.s.p 50 g	q.s.p 50 g	q.s.p 50 g	q.s.p 50 g
EDTA	-	-	0,05 g	0,1 g
METIL	-	-	0,05 g	0,05 g
Fase Oleosa				
ALC CET	2,5 g	4 g	-	-
LAURIL	0,15 g	0,15 g	-	-
PARAFF	2 g	3 g	-	-
VAS LIQ	7,5 g	7,5 g	1,5 g	2 g
POLAWAX	-	-	6 g	8 g
PROPIL	-	-	0,025 g	0,025 g
BHT	-	-	0,1 g	0,1 g
Princípios Ativos				
PCV	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
LIS	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g

O preparo do creme foi realizado segundo Ferreira, Brandão e Silva e Ribeiro (2010).

Para a obtenção das emulsões/cremes seguiu-se o procedimento a seguir:

- Em dois béqueres distintos, pesou-se os ingredientes da fase aquosa e oleosa;
- Os béqueres foram colocados em banho-maria na temperatura de 70°C;
- Bastões de vidro foram utilizados na agitação lenta dos ingredientes em cada fase, até a completa dissolução;
- Quando as fases chegaram à temperatura de 70°C verteu-se lentamente e sob agitação constante, a fase aquosa sob a oleosa;
- A formulação foi retirada do aquecimento e colocada sob agitação

constante até seu resfriamento e conseqüente formação do creme;

- A incorporação dos princípios ativos na formulação foi a etapa final. O PCV foi previamente solubilizado em propilenoglicol e a LIS em água. A agitação para completa homogeneização dos componentes foi mantida ao adicioná-los à fórmula base. A massa final foi ajustada com água destilada.

Uma das fórmulas obteve melhor desempenho em relação às suas características físico-químicas e a ela aplicamos o método EHL, que nos auxilia na adição da quantidade exata de surfactantes que devem ser adicionados ao creme para a garantia de sua estabilidade (BOYD; PARKINSON; SHERMAN, 1972; LEE et al., 2013). Seguem os passos do cálculo realizado:

1. Avaliou-se a % total da Fase Oleosa (F.O.) e a proporção de cada componente que dela faz parte;
2. Multiplicou-se a quantidade proporcional dos componentes aos seus respectivos EHLs (valores determinados experimentalmente e citados na literatura) (ICI AMERICAS INC., 1980; MYERS, 2006; NOLLET et al., 2019). Somados, esses valores determinam o EHL requerido para a formulação;
3. Com esse dado, a equação abaixo é utilizada para determinar a quantidade de cada surfactante na formulação:

$$A \cdot EHL_A + B \cdot EHL_B = EHL_{\text{requerido}}$$

Sendo $A + B = 1$, A e B = surfactantes

Dessa forma, a avaliação da formulação escolhida deu-se com uma fórmula feita com as quantidades de surfactantes sugeridas na Tabela 5 e também com uma fórmula contendo as quantidades obtidas por meio dos cálculos de EHL, que revelaram serem necessários 3,55 g de álcool cetoestárico e 0,6 g de lauril sulfato de sódio. A espalhabilidade, o pH e a estabilidade, por meio do teste da centrífuga, bem como a análise do perfil reológico foram realizados para comparação.

5.5.1 Espalhabilidade, pH e Teste da Centrífuga

A espalhabilidade das formulações foi determinada em triplicata, adicionando 0,1g de creme entre duas placas de vidros horizontais (12 cm por 12 cm) a temperatura de 25°C. Pesos de 400, 600, 800, 1000 e 1200 g, foram colocados, a cada três minutos, na placa superior, promovendo o espalhamento do produto. Esse parâmetro foi mensurado como extensibilidade, em milímetros quadrados. Metodologia adaptada de Borguetti & Knorst (2006). Os cremes referência do aciclovir (Zovirax[®]) e do penciclovir (Penvir[®]) também foram avaliados. Efetuou-se, a partir dos resultados encontrados, a análise de variância e a comparação das médias pelo Teste de Tukey.

O pH foi medido utilizando um medidor de pH elétrico imediatamente após a preparação de cada formulação.

O teste da centrífuga, para avaliar as amostras quanto à separação de fases, foi feito adicionando as amostras em um tubo tipo falcon, levando-as para centrifugação a 1600 x g (centrífuga com 16 cm de raio) ou 3000 rpm, por 15 minutos.

Esses ensaios foram realizados para as quatro formulações que não consideravam os valores de tensoativos previstos pelo método do EHL, e também para a que considerava.

5.5.2 Comportamento Reológico

O comportamento reológico dos cremes farmacêuticos (um creme sem considerar o EHL no seu desenvolvimento e outro considerando o cálculo do EHL) foram estudados a temperaturas de 20°C. As medições reológicas foram feitas utilizando um viscosímetro (Brookfield DV-II+Pro[®], Brookfield Engineering Laboratories) e os testes foram realizados em béquer de 50 mL usando o fuso número 4.

O tempo de execução para cada ensaio foi ajustado para seis minutos. Os três minutos iniciais tiveram variação na velocidade de maneira crescente até o valor máximo de 30 rpm. Aí então, a velocidade passou a variar de forma decrescente durante os três minutos finais, até o valor mínimo, próximo a 0 rpm.

Na corrida tanto a montante como a jusante foram obtidos a partir de 14 dados de viscosidade aparente *versus* velocidade em rpm, resultando em um total de 28, indicando a viscosidade aparente média para cada um. Os dados de viscosidade aparente *versus* velocidade foram convertidos em tensão de cisalhamento e taxa de deformação de acordo com a metodologia de Pierce (PIERCE, 1971).

As curvas de taxa de cisalhamento *versus* tensão de cisalhamento foram ajustadas pelo modelo de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência), modelo simples que descreve comportamento não-newtoniano.

$$\text{Modelo reológico de Ostwald-de-Waele: } \tau = K.(\dot{\gamma})^n$$

Onde:

τ = tensão de cisalhamento (Pa);

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento (s^{-1});

K = índice de consistência (Pa s^n);

n = índice de comportamento do fluxo (sem dimensão).

Os resultados da aptidão foram expressos pelo teste do qui-quadrado (X^2), que expressa a diferença entre os valores preditos pelo modelo e os valores experimentais. Quanto maior o valor do qui-quadrado, maior é a discrepância entre o observado e o previsto. Portanto, o modelo mais adequado é aquele com valores baixos de X^2 .

O creme escolhido diante dos resultados seguiu para a análise microbiológica.

5.5.3 Análise Microbiológica

Os ensaios analíticos empregados, baseados na Farmacopéia Americana, foram (USP, 2003; BRASIL, 2010):

- Contagem em placas de microrganismos aeróbios e de fungos:

Alíquota de 10 g da amostra foi transferida para 90 mL de meio caldo caseína de soja estéril (5 diluições 10^{-1} foram realizadas). Para as contagens de microrganismos aeróbios viáveis e de fungos totais foram empregados, respectivamente, meios ágar caseína de soja e ágar Sabouraud dextrose. Para 15 mL de meio/ágar adicionou-se 1 mL da última diluição da amostra em uma placa

esterilizada, que após esse procedimento foi incubada por 72h à 35°C/por 7 dias à 25°C.

- Pesquisa dos microrganismos patogênicos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp* e *Staphylococcus aureus*:

Em meio de cultura caldo caseína de soja e meio caldo lactosado transferiu-se 1 g da formulação, incubando-se por 24 a 48 h. Após, com a alça, as amostras foram transferidas por meio de estrias de esgotamento para as placas contendo meio ágar Vogel-Johnson e ágar manitol. Para a pesquisa, a presença de cada microorganismo foi confirmada com procedimentos específicos a eles.

- Ensaio desafio do conservante (Challenge test):

Quantidade de 20 g do creme foi inoculada com 0,2 mL da suspensão microbiana. Os frascos com as amostras inoculadas foram mantidos a 25°C. A contagem da carga de microbiana foi realizada até 28 dias após a inoculação. Os resultados foram comparados com limites estabelecidos para avaliar a eficácia do sistema conservante presente no produto. As características físico-químicas do produto foram observadas.

O experimento contou com a utilização da estrutura da Universidade Federal do Paraná, em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Murakami e sua equipe.

5.6 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica Indicativa de Estabilidade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

5.6.1 Desenvolvimento da Metodologia Analítica por HPLC

O desenvolvimento da metodologia analítica indicativa de estabilidade e para análise de teor de PCV e LIS foi iniciado com revisão bibliográfica, que passou a ser de caráter contínuo, sendo possível levantar dados característicos do fármaco, como sua estrutura molecular, solubilidade, constante de ionização (pKa), ponto de fusão, dentre outras informações físico-químicas já citadas no referencial teórico, além é claro, de metodologias analíticas por HPLC para ambos os agentes antivirais. Diversos métodos foram testados e também modificados durante o desenvolvimento, servindo de base para o desenvolvimento (CHONG et al., 2009; DAO; JIAO; ZHONG, 2008; HAYAT et al., 2014; LEE; SEO; LEE, 2007; LIMAM; MEDIMAGH; HELLAL, 2016; WU et al., 2016).

Testes com as variáveis presentes no sistema cromatográfico foram realizados, iniciando com o fluxo das fases móveis, ensaiadas em 0,8 e 1 mL min⁻¹ e com o volume de injeção, ensaiados em 10 e 20 µL.

Os detectores de Fluorescência (FL) e o de Arranjo de Diodos (DAD) foram utilizados nos ensaios, variando os comprimentos para ambos e em relação aos compostos estudados (excitação/emissão PCV: 260/380 nm e excitação/emissão LIS: 345/450 nm – fixos: PCV 254 nm e LIS 227 nm).

As análises englobaram a avaliação da influência da temperatura do forno, onde a coluna foi mantida, levantando resultados à 30 °C e também sem o controle da temperatura.

As fases móveis testadas foram acetonitrila:acetato de sódio (5 mM, pH 3) em diversas proporções, gradiente de metanol:água acidificada (0,08% de TFA, pH 2,30-2,35), gradiente de metanol:água, metanol:fosfato de amônio (pH 3,1) na proporção de 30:70, respectivamente, e gradiente de metanol/acetonitrila:fosfato de sódio (10 mM, pH 8). As fases móveis foram previamente filtradas a vácuo em membrana acetato de celulose de poro 0,45 µm. O tempo de corrida inicial para as corridas foi de 20 minutos.

Três colunas cromatográficas de fase reversa puderam ser testadas: a Phenomenex[®] Luna C18 (150 mm x 4,60 mm, 5 µm), a Phenomenex[®] Synergi C18 (150 mm x 4,60 mm, 5 µm) e a Shimadzu Shim-Pack[®] C18 (150 mm x 3,9 mm, 4 µm). Todas foram utilizadas acopladas a uma pré-coluna: Phenomenex[®] SecurityGuard C18.

Diversas concentrações dos compostos avaliados foram testadas, a fim de que as intensidades visualizadas nos cromatogramas por meio dos picos direcionassem a escolha daquela que representaria o 100% dos ativos nas análises da validação.

O PCV foi solubilizado e diluído nas fases móveis testadas e a LIS foi solubilizada em água ultrapura e diluída em reagente de derivatização 1 minutos antes de ser injetada (OPA-MPA).

Esse reagente foi preparado da seguinte maneira (WU et al., 2016):

- 3,56 mg de ortoftaldeído (OPA) foram dissolvidos em 500 µL de metanol;
- A essa solução foram adicionados 2,1 mL de tampão borato (200mM, pH 9,9)* e 5 µL de 2-mercaptoetanol (MPA).

*Preparo do Tampão Borato (200 mM, pH 9,9):

Em um balão volumétrico de 50 mL foram transferidos 620 mg de ácido bórico. Diluiu-se o conteúdo com 20 mL de água ultrapura e então, completou-se o menisco com o mesmo diluente. O pH foi ajustado para 9,9 com Hidróxido de Sódio 2 M.

As amostras e os reagentes foram previamente filtrados em filtros de seringa (PTFE, 045 µm) antes de serem diluídos.

Ensaio preliminares dos compostos em exposição a soluções ácidas, básicas e oxidativas, à temperatura, à luz UV e luz dia foram realizados, de modo a confirmar a existência de resolução adequada entre os possíveis picos que surgiriam.

5.6.2 Validação da Metodologia Analítica por HPLC

As metodologias analíticas foram validadas por meio da análise dos parâmetros exigidos pelos órgãos reguladores (ICH, FDA e ANVISA): seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Juntamente com a seletividade, o ICH determina o estudo da degradação forçada, para determinar a capacidade do método frente aos possíveis produtos de degradação (BRASIL, 2017; FDA, 2015; ICH, 2005).

Anterior à análise de cada parâmetro realizou-se o *System Suitability* com injeção dos padrões, confirmando a adequabilidade do sistema.

5.6.2.1 Seletividade e Estudo de Degradação Forçada

A seletividade foi realizada com o intuito de comprovar a capacidade do método em determinar o PCV e a LIS em meio à outros compostos, mesmo que próximos de suas características, como seus produtos de degradação (ICH, 2005). A análise de produtos de degradação de novos medicamentos, por meio de método indicativo de estabilidade é componente chave nas orientações divulgadas pelo ICH. O método totalmente validado pode fornecer dados para auxiliar na identificação de possíveis produtos e vias de degradação, bem como estudos de estabilidade de medicamentos, garantindo a quantificação do ativo em meio a esses produtos de degradação (HALEEM et al., 2015; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

No presente estudo, soluções padrões ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) de cada um dos ativos e do conteúdo extraído do creme foram submetidas à degradação forçada em meio ácido (0,5 M de HCl a 25°C com leitura imediata para o PCV e 2M durante 24 horas para LIS), básico (0,05 M de NaOH a 25°C para o PCV e 0,25M a 25°C para LIS, ambos com leitura imediata), oxidativo (5 e 10% de H_2O_2 a 25°C , durante 8 horas para o PCV e durante 24 horas para LIS), térmico (80°C durante 4 dias) e fotolítico (luz UV com intensidade de $360 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, com alíquotas sendo retiradas diariamente). Após estes procedimentos, as amostras foram diluídas em fase móvel (PCV) e em OPA-MPA (LIS) para uma concentração final de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Uma solução do conteúdo extraído do creme base (exposto e não exposto às condições supracitadas) também foi injetado para a determinação da interferência dos excipientes. Detector de DAD foi utilizado para provar que os picos detectados foram espectralmente puros (BRASIL, 2015).

5.6.2.2 Linearidade

Este parâmetro foi realizado para demonstrar a proporcionalidade existente entre os resultados e a concentração do fármaco na amostra (BRASIL, 2017; ICH, 2005). Para determinar a linearidade, três curvas de calibração para cada ativo, cada qual com a análise de cinco concentrações de DAPA ($1, 5, 10, 25$ e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram construídas. As diluições foram realizadas a partir de uma solução padrão de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PCV em fase móvel e de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de LIS em OPA-MPA.

5.6.2.3 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção e o limite de quantificação estão relacionados com a concentração mais baixa em que um analito pode ser detectado e quantificado, respectivamente, com precisão e exatidão aceitáveis no último caso (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

Estes parâmetros foram determinados por meio da inclinação da curva e do desvio padrão obtidos a partir das médias dos interceptos das curvas, feitas em triplicatas na avaliação da linearidade, utilizando um modelo de regressão linear, de acordo com as equações propostas pelo ICH (equações a seguir, sendo LD correspondente ao limite de detecção e o LQ ao limite de quantificação) (ICH, 2005):

$$LD = (DP*3)/\text{Inclinação da Curva}$$

$$LQ = (DP*10)/\text{Inclinação da Curva}$$

DP = Desvio padrão do intercepto

Os valores calculados foram confirmados experimentalmente.

5.6.2.4 Precisão

A extração dos ativos dos cremes foi realizada pesando-se 125 mg da formulação em béquer, adicionando 25 mL de água ultrapura e uma pequena barra magnética. O conjunto foi levado a um agitador magnético por 30 minutos. Após esse período de extração a amostra foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado e a solução restante, filtrada.

Os ensaios para analisar a precisão do método foram realizados por meio da avaliação de seis amostras de PCV e de seis amostras de LIS, respectivamente dissolvidas em água ultrapura, com concentração inicial de 50 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sendo o PCV diluído em fase móvel e a LIS em OPA-MPA, até chegarem a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e então submetidas às mesmas condições cromatográficas, procedimento correspondente a repetibilidade. A precisão intermediária foi determinada em dois dias diferentes (interdia), bem como por outros três analistas (entre analistas). Os resultados encontrados foram comparados estatisticamente entre si e com os padrões dos fármacos nas mesmas concentrações, e não poderiam apresentar DPR acima de 2% entre as análises (BRASIL, 2017).

5.6.2.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela recuperação dos ativos adicionados no creme base extraído (da mesma maneira como é realizado com as amostras contendo os ativos). As análises foram realizadas com concentrações previamente determinadas de 8, 10 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, correspondente a 80, 100 e 120% da concentração definida como 100% para a validação da metodologia, respectivamente. As diluições foram realizadas em fase móvel (PCV) e em OPA-MPA (LIS), e a exatidão foi avaliada em

triplicata, sendo expressa em termos de porcentagem de recuperação, segundo a seguinte equação (BRASIL, 2017; ICH, 2005):

$$\text{Exatidão} = (\text{Média das Concentrações Experimentais}/\text{Concentração Teórica}) * 100$$

5.6.2.6 Robustez e Estabilidade da Amostra

O estudo da robustez é crítico na avaliação do desempenho do método frente a pequenas alterações operacionais, não devendo haver alterações consideráveis do teor declarado da amostra analisada nas condições cromatográficas em validação (BRASIL, 2017; ICH, 2005). A análise para esse parâmetro foi realizado por meio de mudança nas condições inerentes ao método desenvolvido, tais como fluxo, composição da fase móvel e tempo de extração da amostra (creme).

O guia do FDA para procedimentos e métodos analíticos para validação de fármacos e produtos biológicos recomenda que seja feita uma abordagem sistemática para o estudo de robustez, a fim de que se entenda o efeito das pequenas mudanças em um procedimento analítico (FDA, 2015). Desse modo, foi realizado um desenho experimental do tipo Box-Behnken (Statistic® versão 8 do software). Os resultados foram analisados estatisticamente (ANOVA).

A estabilidade da amostra foi realizada para demonstrar a integridade da amostra no período de 24 horas. A variação do resultado em relação ao teor declarado pela amostra recém-preparada e analisada deve estar entre 98 e 102% para ser considerada estável (ICH, 2005).

5.6.3 Análise da Estabilidade da Formulação

No estudo de estabilidade acelerada, as amostras do creme desenvolvido em diferentes dias foram armazenadas a temperaturas e condições de umidades relativas indicadas pelo ICH. Para altas temperaturas, as amostras foram mantidas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ com umidade relativa de $75 \pm 5\%$ por 6 meses. Para temperaturas mais amenas, as amostras foram submetidas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com $60 \pm 5\%$ de umidade relativa pelo mesmo período. Temperaturas mais baixas também foram avaliadas com as amostras sendo submetidas a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ com $60 \pm 5\%$ de umidade relativa (BRASIL, 2004, 2005; ICH, 2003). Após esse período, o teor dos ativos nas

formulações e os possíveis produtos de degradação foram avaliados com a metodologia analítica desenvolvida e validada para este fim. Os cremes estavam acondicionados em frascos de vidro âmbar.

5.7 Análise da Permeação dos Fármacos Presentes na Formulação

Este experimento foi realizado nas estruturas da Universidade Estadual de Maringá (UEM), com o auxílio da equipe do Prof. Dr. Marcos Luciano Bruschi e com equipamentos por eles validados.

5.7.1 Obtenção da Pele de Orelha de Porco

O material *ex vivo* utilizado no ensaio de permeabilidade dos ativos na formulação foi a orelha de porco. Elas foram obtidas de um matadouro local, situado na cidade de Guarapuava/PR. Logo após a retirada, elas foram lavadas com água à temperatura ambiente e então, imediatamente congeladas. O tempo máximo entre a retirada desses materiais e o manuseio foi de 7 dias.

No dia do experimento, as orelhas foram naturalmente descongeladas e novamente lavadas havendo a retirada do excesso de pelos com uma tesoura. As peças selecionadas foram as que apresentavam partes íntegras, livres de lesões ou manchas.

A derme e a epiderme foram extraídas cuidadosamente por dissecação com o auxílio de uma pinça atômica, bisturi e tesoura. O isopor foi utilizado como superfície de apoio. Após a extração as amostras foram novamente congeladas em papel alumínio, passando a apresentar a validade de 2 meses.

5.7.2 Ensaio de Permeação Cutânea

As células de Franz foram posicionadas em agitadores magnéticos e também para o recebimento do banho termostatizado à 37°C. O tampão PBS pH 7,4 fez o preenchimento do compartimento receptor, de modo a apresentar esta função, e junto a ele adicionou-se uma barra magnética. A pele foi disposta em cada uma das células, com a epiderme voltada para o compartimento doador (em contato com a formulação). As conexões foram ajustadas para que não houvesse perda de material

através dos orifícios. A Figura 12 ilustra o experimento e a Tabela 6 especifica as dimensões exatas das células utilizadas.

Figura 12: Triplicata do ensaio de permeabilidade *in vitro*.



Tabela 6: Dimensões das células de Franz utilizadas nos experimentos de permeabilidade *in vitro*.

Formulação	Célula de Franz	Volume (mL)	Diâmetro (cm)
PCV-LIS	1	13,4	1,030
	2	13,4	1,290
	3	13,0	1,175
PCV	4	12,6	1,200
	5	12,9	1,290
	6	12,7	1,185

Duas foram as formulações testadas, uma apresentando apenas o PCV e a outra o PCV em associação à LIS, cada uma delas em triplicata. Vale ressaltar que a comparação entre estas fórmulas visava auxiliar na elucidação do fato de a lisina apresentar ação antiviral juntamente ao penciclovir, e não apenas farmacotécnica.

As concentrações a serem testadas e adicionadas ao compartimento doador foram definidas a partir dos resultados dos limites de quantificação obtidos da metodologia analítica desenvolvida e validada neste trabalho. Foi transferido a esse compartimento então, aproximadamente 1 g de cada formulação em um volume de aproximadamente 15 mL de solução receptora, resultando na concentração inicial de

0,67 mg mL⁻¹ de PCV e 3,33 mg mL⁻¹ de LIS. Essa transferência foi realizada com o auxílio de seringas.

A solução receptora referente a cada formulação permaneceu sob constante agitação e nos tempos pré-determinados (30 min, 1, 2, 4, 6, 8 e 24h) 500 µL foram coletados, sendo imediatamente repostos com tampão PBS.

Os dados foram obtidos através de metodologia analítica de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência e utilizados em cálculos que consideram as dimensões dos aparatos.

A concentração encontrada a partir da área observada no cromatograma permitiu que a quantidade do ativo em g fosse declarada (considerando o volume da célula). Essa quantidade pôde ser corrigida seguindo a quantidade exata de formulação adicionada ao ensaio, o que tornou possível a determinação do teor real (%) e ainda a quantidade de fármaco permeado por cm². Os dados foram analisados por ANOVA seguidos do Teste t.

5.7.3 *Tape Stripping* e Ensaio de Retenção Cutânea

O *Tape Stripping* é uma técnica caracterizada por avaliar a quantidade de ativo que permaneceu no estrato córneo (LOFFLER; DREHER; MAIBACH, 2004). Ela foi realizada para ambas as formulações após a última coleta, retirando a pele da célula de Franz e o excesso de creme da epiderme com o auxílio de um bastão de vidro (padronização). A partir disso, pressionou-se com o polegar uma fita adesiva (marca 3M) contra a pele por 40 vezes. Essa mesma fita foi cuidadosamente recortada nos limites de contato com a pele e disposta em um béquer de 10 mL. A esse material foram adicionados 5 mL de metanol, aplicando-se ultrassom por 5 minutos. Após esse tempo, a solução obtida foi transferida a um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o menisco.

Após o *Tape Stripping* procedeu-se com o ensaio de retenção cutânea, que avalia quanto do fármaco ficou retido na derme e epiderme (AKOMEAH et al., 2004), ponto estratégico de ação da formulação desenvolvida neste trabalho. O processo para este teste inicia-se recortando a pele, de modo que permaneça apenas o círculo de contato com os compartimentos. Com essa porção retirada, recortes menores dessa pele foram feitos para que houvesse aumento da superfície de contato. Esses recortes foram colocados em um béquer de 10 mL e a eles foram

adicionados 5 mL de metanol. O material foi então levado ao ultrassom por 5 minutos. A solução obtida foi transferida a um balão volumétrico de 10 mL, sendo o menisco completado.

Ambos os ensaios baseiam-se nos dados cromatográficos obtidos, uma vez que a área do cromatograma reflete à concentração alcançada. Esta concentração é revelada em % retida, na fita para o *Tape Stripping* e na pele para o ensaio de retenção, considerando a quantidade exata em μg de ativo presente na porção de amostra ensaiada. A análise estatística utilizou ANOVA seguida do Teste t.

5.8 Análise *in vivo* da Eficácia da Formulação em Modelo Animal

A análise da eficácia da formulação foi desenvolvida nas estruturas da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em colaboração com a Prof. Dr.^a Ligia Carla Faccin Galhardi e sua equipe. O projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética/UEL: protocolo 10752.2019.81 (Anexo 1).

Os camundongos utilizados no experimento foram da linhagem BALB/c, todos machos e apresentando de 20 a 25 dias. Adquiridos no biotério da UEM, eles passaram 2 dias para ambientalização no biotério da UEL após o seu transporte. Passado este período, deu-se início aos procedimentos a que seriam expostos: tricotomia, escarificação, inoculação da cepa viral de HSV-1 KOS ($10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$) e tratamento (CARDOZO et al., 2013; GONSHO et al., 1990). Vale ressaltar que todas as condições foram homogêneas aos animais, respeitando a temperatura, ruídos, luminosidade, manutenção de suas caixas, alimentação/hidratação, bem como, os profissionais que o manusearam.

Todos os compostos foram avaliados previamente em células Vero (*in vitro*), pelo ensaio de MTT.

Inicialmente, os animais foram pesados e então, anestesiados com xilazina/ketamina (100 mg Kg^{-1}) via intraperitoneal. Após a verificação de anestesia, os pelos da região lombar foram retirados e a pele foi escarificada com o auxílio de uma agulha de calibre 27. Nesta mesma região, inoculou-se de 10 μL de vírus. O tratamento tópico feito no local da lesão foi iniciado poucas horas após esses procedimentos, e estendeu-se por 8 dias, sendo realizado 3 vezes por dia.

Os animais foram alocados, de forma homogênea, em 6 diferentes grupos de tratamento, cada qual com 5 animais, conforme demonstrado na Tabela 7. Um grupo

sofreu apenas a escarificação (Apenas escarificado), outro grupo foi escarificado, recebeu a carga viral, porém não foi tratado (CV), e os demais grupos foram escarificados, tiveram o vírus inoculado e foram tratados. Neste último caso, os tratamentos envolveram: a formulação sem os ativos (CV + Form. Base), as formulações com os ativos isolados (CV + Form. PCV; CV + Form. LIS) e a formulação com os ativos associados (CV + Form. PCV-LIS).

Tabela 7: Desenho experimental do ensaio *in vivo*.

Grupos	Tratamento
Apenas escarificado/Controle negativo	-
CV/Controle positivo	-
CV + Form. Base	Formulação sem compostos
CV + Form. PCV	Formulação com PCV
CV + Form. LIS	Formulação com LIS
CV + Form. PCV-LIS	Formulação com PCV + LIS

As alterações foram observadas diariamente de acordo com o desenvolvimento das lesões na pele, sendo classificadas conforme Cardozo et al. (2013), escore representado na Tabela 8. Médias destes resultados foram determinadas para cada dia e em cada grupo, e então avaliou-se estatisticamente a diferença obtida entre os tratamentos (ANOVA; Teste de Tukey).

Tabela 8: Classificação das lesões oriundas da infecção por HSV-1 conforme Cardozo et al. (2013).

Escore	Característica
0	Sem lesão
1	Vesícula
2	Erosão e/ou ulceração
3	Lesão leve do tipo zoster
4	Lesão moderada do tipo zoster
5	Lesão severa do tipo zoster e morte

Ao final do experimento, os camundongos de cada grupo foram pesados para avaliação de qualquer anormalidade e sacrificados, por meio de injeção de ketamina (229 mg Kg^{-1}) via intraperitoneal (GOLDENTHAL, 1971).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise *in vitro* da Atividade Antiviral

6.1.1 Ensaio de Citotoxicidade por MTT para Avaliação de Viabilidade Celular

Os ensaios de citotoxicidade foram iniciados com a análise de um dos solventes utilizados na dissolução do PCV, o DMSO. Os resultados indicaram que concentrações de até 10% de DMSO não seriam tóxicas às células. Utilização de concentração semelhante é descrita por Prayong, Barusrux & Weerapreeyakul (2008), que relatam não exceder 1% de DMSO (v/v) nas amostras inoculadas nas culturas de células.

A análise de citotoxicidade do PCV indicou CC50 em 1,16 mg mL⁻¹, utilizando a fórmula de ajuste que considerou os valores em negrito, indicados na Tabela 9, para ser calculada.

Tabela 9: Ensaio de citotoxicidade do PCV.

Concentração PCV (mg mL ⁻¹)	Morte Celular (%)	DPR (%)	Equação de Ajuste
1,8	67,32	34,43	$r^2 = 0,9779$
0,9	39,94	23,02	
0,45	23,88	13,54	$y = -21,718.x + 87,149$
0,225	-4,75		

Obs.: Valores negativos indicam 0 e acima de 100, 100; (n=4).

O CC50 da LIS indicou concentração de 5,13 mg mL⁻¹, utilizando a fórmula de ajuste que também considerou os valores em negrito, indicados na Tabela 10, para ser calculada.

Tabela 10: Ensaio de citotoxicidade da LIS.

Concentração LIS (mg mL ⁻¹)	Morte Celular (%)	DPR (%)	Equação de Ajuste
40	87,99		$r^2 = 0,9753$
20	90,20		
10	89,22	7,42	
5	45,75	29,38	$y = -34,069.x + 120,15$
2,5	21,08	48,31	
1,25	19,61		

Obs.: Valores negativos indicam 0 e acima de 100, 100; (n=4).

Valores de $r^2 \geq 0,98$ foram considerados em razão de existir maior variação inerente aos ensaios com células e microorganismos. O capítulo 1223 da Farmacopeia Americana, que se refere à validação de metodologias microbiológicas, considera valores de $r^2 \geq 0,95$ suficientes para que existam correlações apropriadas (USP, 2009).

6.1.2 Atividade Antiviral por MTT (Triagem) após Infecção por HSV-1

A análise de atividade antiviral do PCV revelou inibição viral em 2,69 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta concentração de IC50 é resultante dos cálculos realizados com a equação de ajuste, obtida pelos valores em negrito na Tabela 11. Essa concentração ativa contra o vírus faz-se bem distante da CC50 anteriormente descrita, 1,16 mg mL⁻¹.

Tabela 11: Ensaio de atividade antiviral do PCV contra o HSV-1.

Concentração PCV ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Inibição Viral (%)	DPR (%)	Equação de Ajuste
30	88,95		$r^2 = 0,9876$
15	100,00		
7,5	128,68	6,25	
3,75	70,93	11,12	$y = -48,353.x + 173,9$
1,857	31,98	6,55	

Obs.: Valores negativos indicam 0 e acima de 100, 100; (n=4).

No ensaio que determina a atividade antiviral da LIS, exibida na Tabela 12, ela demonstra não apresentar ação sobre o vírus. Contudo, o ensaio de atividade antiviral *in vitro* desse ativo encontrado na literatura e descrito por Griffith, DeLong & Nelson (1981), relaciona a atividade contra o vírus a determinadas concentrações de arginina, realçando e afirmando essa relação.

Tabela 12: Ensaio de atividade antiviral da LIS contra o HSV-1.

Concentração LIS (mg mL ⁻¹)	Inibição Viral (%)	Equação de Ajuste
20	-1,76	-
10	0,00	
5	5,27	
2,5	2,34	-
1,25	1,56	

Obs.: Valores negativos indicam 0 e acima de 100, 100; (n=4).

Um estudo recente *in vivo* que acompanhou pacientes por oito anos revelou que a lisina pode ser administrada oralmente na profilaxia da infecção viral, e não só no tratamento (PEDRAZINI; ARAÚJO; MONTALLI, 2018). Por esse motivo, o estudo *in vitro* de forma profilática também foi realizado, e consta no subitem 6.1.2.2.

6.1.2.1 Avaliação do Potencial Sinergismo Antiviral de PCV-LIS

Com os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e de atividade antiviral de cada um dos ativos, seguiu-se para a avaliação de um possível sinergismo entre eles. Para tanto, os cálculos que determinaram as concentrações a serem utilizadas neste estudo necessitavam dos valores de IC50 de cada dos ativos. Como o IC50 da lisina não profilática não havia sido encontrado, o valor de CC50 da mesma foi utilizado para a avaliação desta atividade. As concentrações inoculadas às células, dos ativos em uma mesma solução, referentes às proporções estudadas estão contidas na Tabela 13. As porcentagens de inibição viral e a equação de ajuste, resultante dos valores em negrito, também estão descritas.

Tabela 13: Ensaio de atividade antiviral sinérgica de PCV e de LIS contra o HSV-1.

Proporções	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Inibição Viral (%)	DPR (%)	Equação de Ajuste
	PCV	LIS			
0,25	0,67	1282,5	27,34	34,88	$r^2 = 0,9921$
0,50	1,34	2565	68,66	36,69	
1,00	2,69	5130	98,92	31,44	$y = -35,791.x + 136,56$
2,00	5,38	10260	-0,23		

Obs.: Valores negativos indicam 0 e acima de 100, 100; (n=4).

As concentrações de IC50 de PCV e de LIS, quando presentes na mesma solução inoculada, foram de 1,06 e 1975 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Esses valores foram então, divididos pelos IC50/CC50 iniciais relacionados ao PCV e a LIS. O valor de Índice de Combinação encontrado nesta relação foi de 0,77 (<1), indicando que há sinergismo na ação antiviral dessas duas moléculas.

Esses resultados convergem com o interesse descrito nesse trabalho, ou seja, no desenvolvimento de um creme, que combinando duas moléculas já conhecidas para o tratamento do herpes, possa apresentar uma formulação otimizada, com possível ação mais rápida e com menores concentrações de análogo de nucleosídeo, reduzindo ainda mais os seus potenciais efeitos sistêmicos, já minimizados com a terapia tópica.

6.1.2.2 Atividade Antiviral Profilática da LIS por MTT (Triagem) na Infecção por HSV-1

O ensaio *in vitro* que avaliou a ação profilática da lisina revelou que quando inoculada três horas antes da cepa viral ela apresenta IC50 em 2,38 mg mL^{-1} , como pode ser visualizado na Tabela 14.

Tabela 14: Ensaio de atividade antiviral profilática da LIS contra o HSV-1.

Tempo de Exposição (h)	Concentração LIS (mg mL ⁻¹)	Inibição Viral (%)	DPR (%)	Equação de Ajuste
	5	28,10		$r^2 = 0,9906$
24	2,5	41,67		
	1,25	36,43		
	5	17,83		
14	2,5	12,07		$y = -19,574x + 88,501$
	1,25	24,81		
	5	67,83	24,52	
3	2,5	51,55	12,40	
	1,25	28,68	35,38	

Obs.: Valores negativos indicam 0 e acima de 100, 100; (n=4).

Os resultados encontrados convergem com a ação sinérgica que a LIS possui quando administrada junto ao PCV, visto que a IC50 da LIS em associação, de 1,98 mg mL⁻¹, foi próxima do valor encontrado no ensaio profilático.

Maiores concentrações de lisina frente à presença de arginina nas análises *in vitro* demonstram suprimir a replicação do HSV-1 (THOMASY; MAGGS, 2016). Sugere-se, frente à esta constatação, que houve balanço positivo de lisina frente à arginina nos ensaios realizados, considerando a presença inicial de ambos os aminoácidos na cultura de células utilizadas. Outro aspecto a ser pontuado tratando-se deste resultado *in vitro*, de forma a associar ao potencial sinérgico, é o fato de que aminoácidos carregados positivamente, como a lisina, podem ser relacionados à regulação da atividade bioquímica de proteínas celulares, afetando vias de sinalização, expressão gênica, reparos de DNA de fita dupla, dentre outros mecanismos importantes em processos infecciosos (LOBODA et al., 2019).

6.2 Seleção de Excipientes

A análise das formulações existentes no mercado nacional (Tabelas 15, 16 e 17) revelou os seguintes excipientes a serem utilizados como ponto de partida para o preparo da formulação: EDTA, álcool cetosteárico, lauril sulfato de sódio, BHT, vaselina líquida, metilparabeno, parafina, polawax, propilenoglicol e propilparabeno. Eles foram finalmente definidos a partir dos dados obtidos com a caracterização físico-química e com os estudos de compatibilidade, presentes no tópico posterior.

Tabela 15: Excipientes presentes em formulações de cremes genéricos de aciclovir.

Excipientes	Empresas														
	Aché	Belfar	Biosintética	Blau	Cifarma	Cristália	Geolab	Medley	Merk	Multilab	Pharlab	Prati	Donaduzzi	Sandoz	União Química
Acetato de Cetila					x						x				
Ácido Clorídrico						x									
Água Purificada	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				x
Álcool															
Cetoesteárico		x	x	x	x		x	x	x	x		x			
Álcool															
Cetoesteárico							x	x		x					
Etoxilado															
Álcool Etílico					x						x				
Álcool de Lanolina					x										
Álcool de Lanolina															
Acetilado		x			x						x				
Cera															
Autoemulsificante	x	x				x					x				x
Cetete					x										
Cetomacrogol									x						
Clorocresol									x						
Diazolidinil Uréia										x					
Dimeticona	x								x						
Edetato Disódico					x	x			x		x				
Estearato de Sorbitana								x							

Tabela 16: Excipientes presentes em formulações de cremes similares de aciclovir.

Excipientes	Medicamentos										
	Aciclomed	Aciclor	Acivirax	Antivirax	Ezopen	Hecivir	Herpesil	Herpfar	Hervirax	Uni-Vir	Zelnin
Água purificada	x	x	x	x		x		x	x	x	x
Acetato de Cetila			x						x		
Álcool		x	x	x				x		x	x
Cetoestearílico											
Álcool											
Cetoestearílico				x				x			
Etoxilado											
Álcool											
Diclorobenzílico						x					
Álcool de Lanolina											
Acetilado									x		
Álcool etílico			x			x			x		
Borato de sódio						x		x			
Bronopol						x					
Butil-hidroxitolueno						x					
Cera Emulsificante											
Aniônica	x					x			x	x	
Cetoestearil											
Sulfato de Sódio		x									
Cetete			x								
Citrato de Sódio				x							
Dimeticona											x
Estearato de sorbitana								x			
Éter monoestearil			x	x							x
Edetato Dissódico									x		
Lanolina Anidra									x		
Lauril Sulfato de Sódio						x					
Macrogol 400					x	x	x				
Macrogol 4000					x	x	x				
Metabissulfito de sódio		x									
Metilparabeno	x	x	x	x					x	x	
Petrolato branco	x	x						x			x
Petrolato líquido			x					x	x		x
Polietilenoglicol									x		x
Propilenoglicol		x	x	x		x		x	x		x
Propilparabeno			x	x					x	x	
Oleato de Decila				x							
Sulfito de Sódio						x					
Simeticona				x							x
Vaselina Branca										x	
Água purificada	x	x	x	x		x		x	x	x	x

Tabela 17: Excipientes presentes em formulações de cremes referência de aciclovir e de penciclovir.

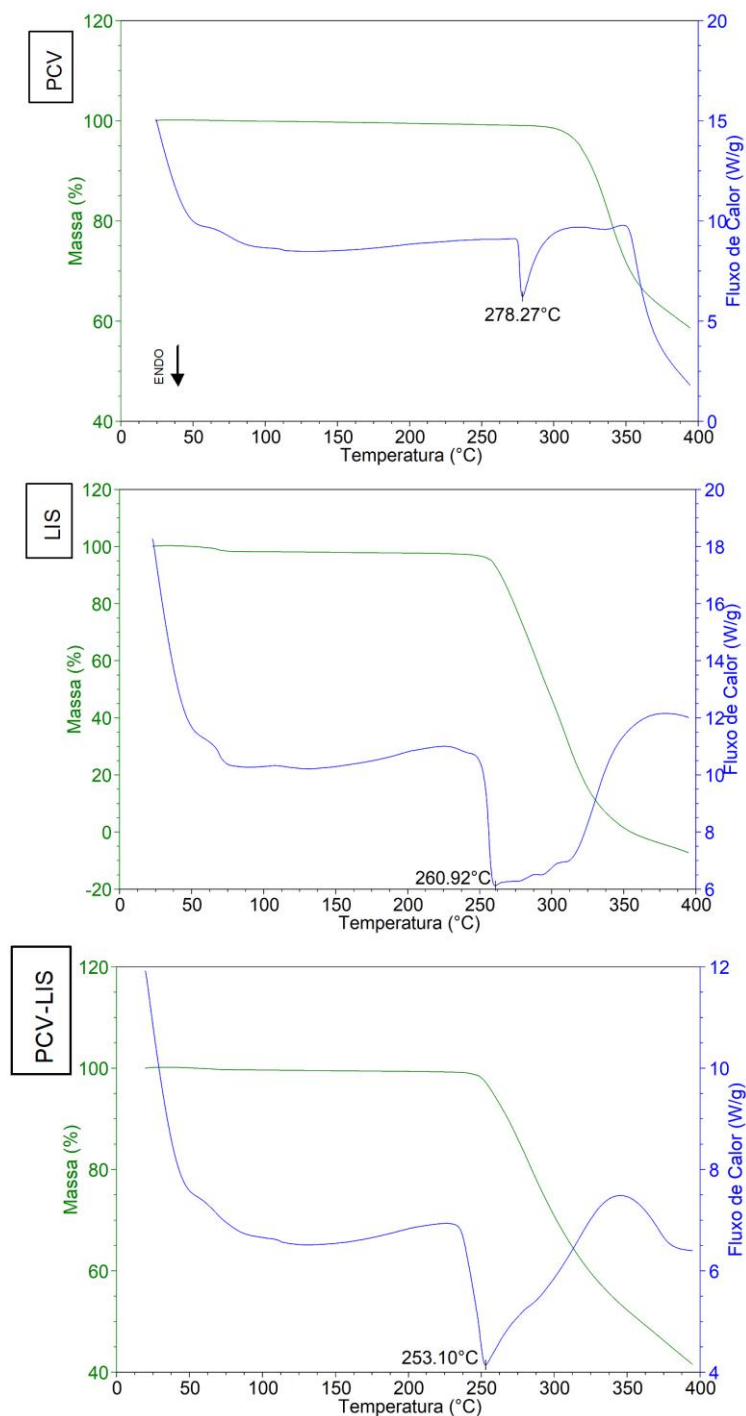
ZOVIRAX GlaxoSmithKline (Aciclovir)						
Excipientes	Água Purificada	Álcool Cetoestearílico	Lauril éter sulfato de Sódio	Polaxâmer	Propilenoglicol	Vaselina Líquida
PENVIR LÁBIA EMS (Penciclovir)						
Excipientes	Água Purificada	Álcool Cetoestearílico	Álcool cetoestearílico etoxilado	Oleato de decila	Lauril Sulfato de Sódio	Edetato Dissódico
	Citrato de Sódio Dihidratado		Propilenoglicol	Metilparabeno	Propilparabeno	Simeticona

6.3 Caracterização do Penciclovir, da Lisina e Estudo de Compatibilidade de sua Mistura Binária

A curva de DSC/TG do PCV (Figura 13) apresentou um pico endotérmico acentuado em 278°C, o qual indica a sua temperatura de fusão (AHMED et al., 2004). Em 350°C revela um pico exotérmico e pouco antes disso, perto de 300°C inicia-se sua degradação. A curva DSC/TG da LIS (Figura 13), por sua vez, mostrou um pico endotérmico em 261 °C, relacionado à sua temperatura de fusão, e um pico exotérmico em 350 °C, concordando com os resultados encontrados por Aydin et al (2011). A sua degradação começa logo após o intervalo de temperatura em que este fármaco se funde.

O PCV apresentou variação de entalpia de 175,2 J g⁻¹, valores que não puderam ser calculados com precisão para a LIS e para a mistura binária de fármacos devido aos eventos irregulares encontrados.

Figura 13: Curvas de DSC/TG da mistura PCV, LIS e PCV-LIS.

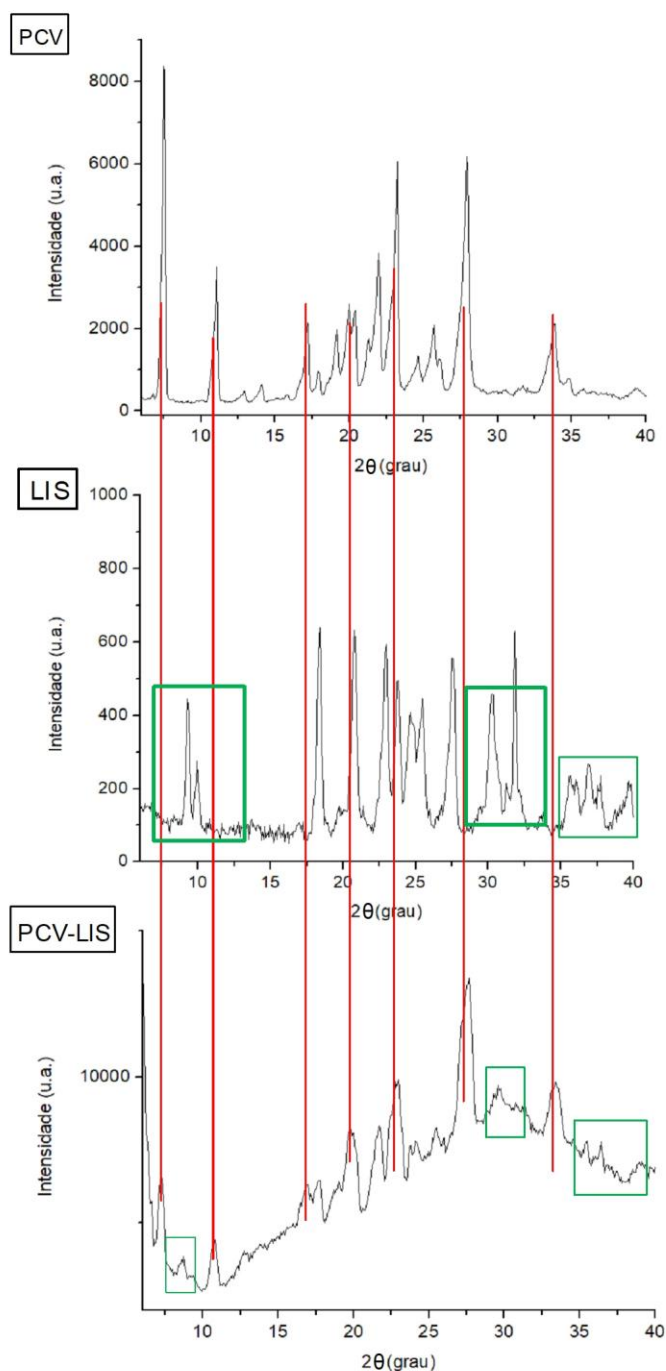


Os resultados obtidos pela análise de DSC da mistura física binária de PCV e LIS (Figura 13) revelaram um evento endotérmico em 253°C. Considerando as informações relatadas por Kasten et al. (2017), que observaram uma redução no ponto de fusão da lisina quando em combinação com outro fármaco, sugere-se que

isso também ocorreu nas análises feitas neste estudo, e ainda que o PCV pode ter sido dissolvido na lisina fundida.

Os resultados das análises complementares são iniciados pelo difratograma do PCV (Figura 14), que demonstra seus picos de difração nos ângulos de 8°, 11°, 17°, 24°, 28° e 34°, corroborando com as informações apontadas na literatura que o configuram como um sistema cristalino ortorrômbico (AHMED et al., 2004; HARNDEN et al., 1990). O difratograma LIS, também presente na Figura 14, apresenta picos cristalográficos a 10°, 17°, 21° e nas bandas de 25°, 31° e 39°. São picos de menor intensidade em relação aos do PCV, mas em ângulos semelhantes aos descritos por Batista e Kasten et al., pertencentes a um sistema cristalográfico monoclinico, com quatro moléculas por célula unitária (BATISTA, 2016; KASTEN et al., 2017). Vale ressaltar que o fato de a molécula ser extremamente higroscópica pode trazer pequenas diferenças entre as análises encontradas na literatura (WILLIAMS; HUGHES; HARRIS, 2015).

Figura 14: Análise experimental de DRXP de PCV, LIS e PCV-LIS.

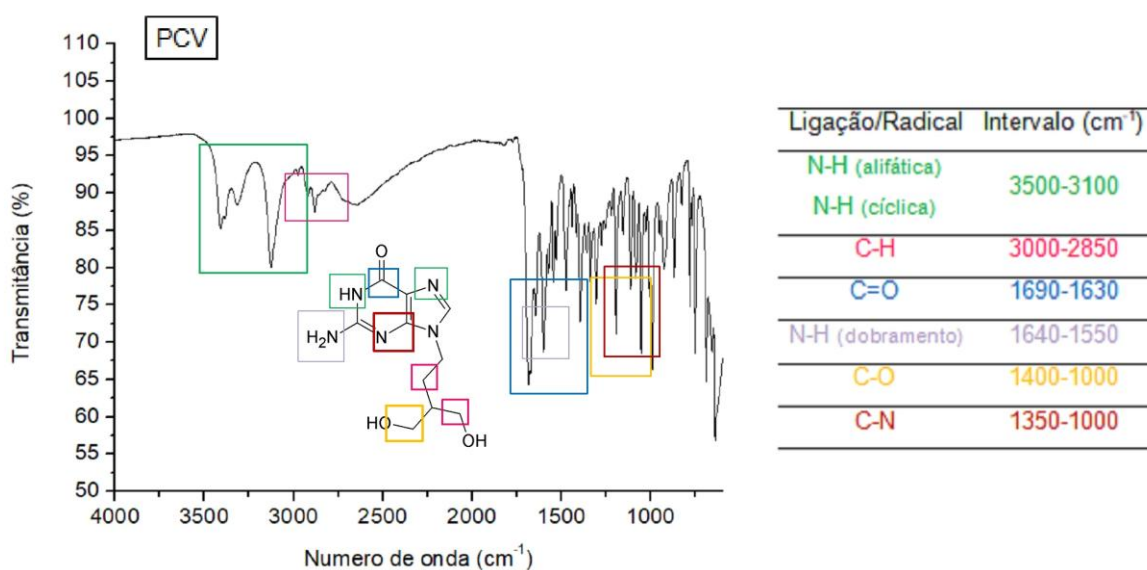


O DSC/TG avaliou que havia interação entre PCV e LIS, mas a temperaturas muito mais altas do que a temperatura ambiente, um caso distante do real. Os padrões de XRPD obtidos para os fármacos separados e para a mistura física de ambos (Figura 14) demonstram que, sem a influência da temperatura, a interação não ocorre, pois no difratograma da mistura os principais picos cristalográficos do PCV são mantidos (linhas em vermelho), como é o caso dos picos LIS (quadrados verdes, estando alguns picos sobrepostos pela baixa intensidade que apresentam),

demonstrando que a identidade de cada um dos compostos foi mantida, que é uma das principais características da técnica (PHADNIS; CAVATUR; SURYANARAYANAN, 1997).

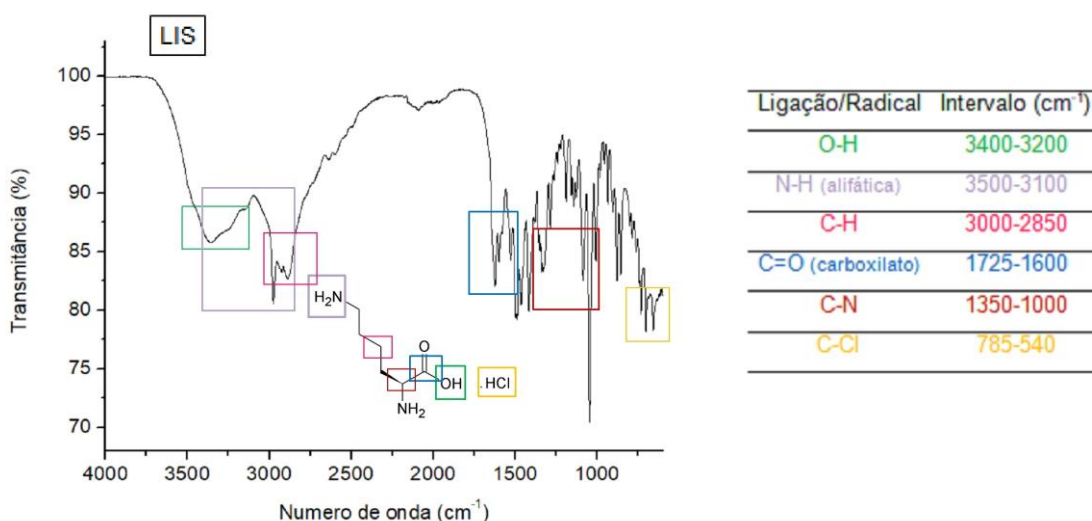
O PCV é composto por vários grupos funcionais que podem ser evidenciados na análise do FTIR, a partir do espectro obtido (Figura 15). Bandas na região de absorção de 3400 cm^{-1} são observadas pela presença da amina alifática. Em 3313 e 3126 cm^{-1} , as vibrações de estiramento das ligações N-H são reveladas por meio de bandas, assim como ocorre em 2885 cm^{-1} , referindo-se às vibrações de desenho simétrico do grupamento CH_2 . A vibração observada por meio da banda de absorção a 1683 cm^{-1} corresponde ao $\text{C}=\text{O}$ da amida presente na molécula. Vibrações de estiramento são visualizadas em 1381 , 1310 e 1176 cm^{-1} , sugerindo a sobreposição de ligações C-O e C-N, esta última relacionada a amidas e aminas. Na região de absorção de 848 cm^{-1} , dobras fora do plano relacionadas à ligação C-H são observadas (BARBOSA, 2007). O espectro está de acordo com dados já expostos na literatura (GAROUFIS et al., 2001). Análogos de nucleosídeos possuem regiões de vibração em comum, dessa forma demonstram os resultados de FTIR do aciclovir descritos por Akimsheva et al. (2019), corroborando com as vibrações de trechos de PCV relacionados aos grupos funcionais característicos de ambas, como aminas e amidas cíclicas.

Figura 15: Espectro de FTIR do PCV.



O espectro da LIS, evidenciado na Figura 16, é caracterizado por absorção em 3366 cm^{-1} , correspondendo à vibração de estiramento da água presente, devido à alta higroscopicidade da molécula. Em 3087 cm^{-1} existe um ombro relacionado às vibrações de estiramento das ligações C-H, cujas ligações apresentam bandas sobrepostas àquelas evidenciadas pelas vibrações das ligações N-H do grupamento NH_2 . Na região de absorção que varia de 3000 a 2800 cm^{-1} , possíveis deformações angulares entre 2200 e 1900 cm^{-1} também se relacionam ao NH_2 . A absorção ocorrendo em 1624 cm^{-1} refere-se às vibrações de estiramento da ligação C=O. A banda existente em 1425 cm^{-1} pode ser atribuída às vibrações simétricas do grupo carboxilato. Em 1045 cm^{-1} existe uma banda expressiva direcionada às vibrações da ligação C-N. As deformações das vibrações do grupo carboxilato são determinadas por meio das bandas de absorção a 735 , 705 e 663 cm^{-1} , sobrepondo-se aos registros de absorção do H ligado ao Cl (BARBOSA, 2007). Esses resultados se assemelham aos encontrados na literatura (AYDIN et al., 2011; PETROSYAN; GHAZARYAN, 2009).

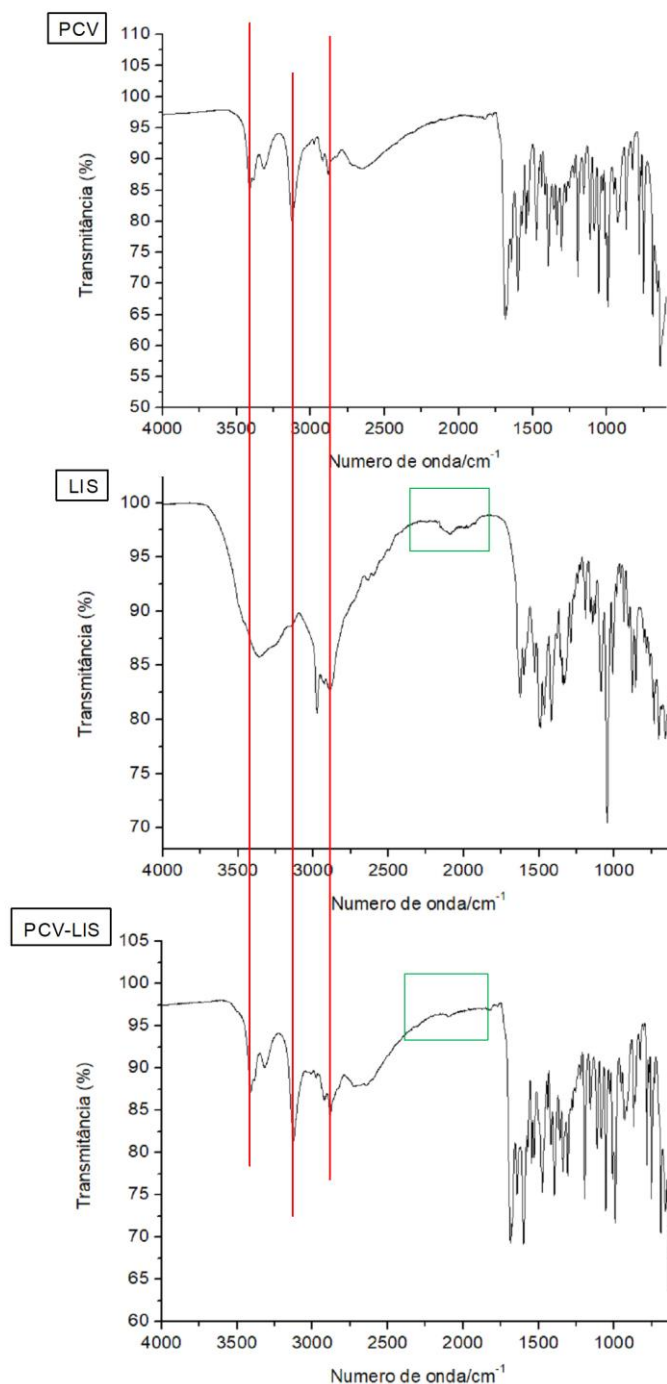
Figura 16: Espectro de FTIR da LIS.



O espectro de FTIR da mistura física de PCV e LIS (Figura 17), representando outra técnica que avalia a compatibilidade sem envolver a temperatura, não mostrou interação entre os fármacos. Isto pode ser observado na persistência das bandas de absorção representativas de cada fármaco no espectro da mistura. Mesmo havendo sobreposições de alguns deles devido a aglomerados similares, a inalteração das bandas de absorção em regiões específicas para cada

um deles pode ser observada na Figura 17 (PCV - linhas vermelhas; LIS - quadrado verde).

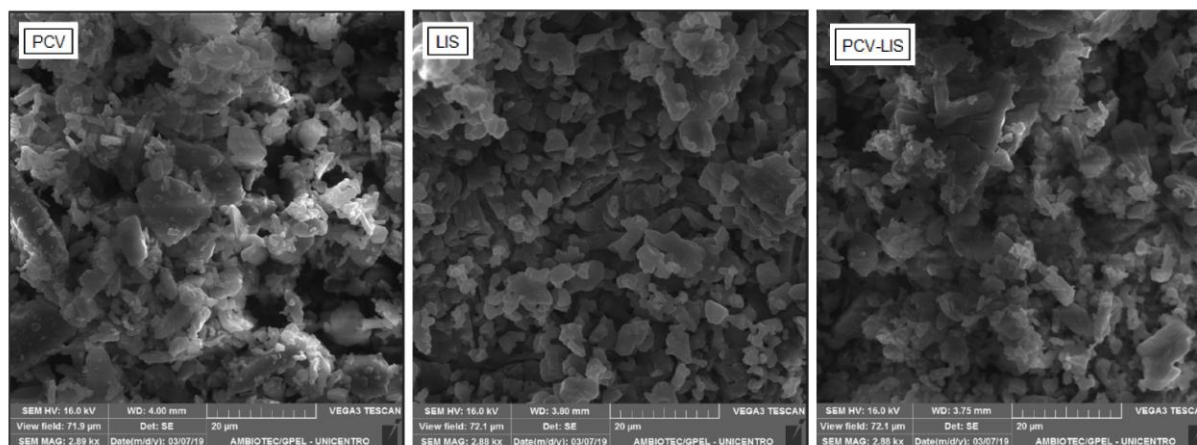
Figura 17: Espectro de FITR de PCV, LIS e PCV-LIS.



As fotomicrografias de PCV, LIS e PCV-LIS foram obtidas com ampliação de 2880x. Na Figura 18, as estruturas dos fármacos puros, observadas em PCV e LIS, não apresentaram alterações quando presentes na mistura de ambas (PCV-LIS).

Como ferramenta complementar na análise de compatibilidade, reforça-se, então, a inexistência de interação entre os fármacos como uma mistura física, sem interferência da temperatura.

Figura 18: Fotomicrografias de PCV, LIS e PCV-LIS obtidas por MEV (2880x).



Com os fármacos caracterizados é possível entender os resultados obtidos na análise de compatibilidade, antes que este estudo seja estendido à compatibilidade entre os fármacos e os excipientes. Vale ressaltar que a sugestão de que o PCV seria dissolvido na lisina fundida não determina incompatibilidade, uma vez que essa temperatura não é atingida durante o processo e nem mesmo durante o armazenamento da formulação desenvolvida. Esta informação pode ser reafirmada em análises complementares que não fazem uso da temperatura.

6.4 Estudo de Compatibilidade em Misturas Ternárias Fármacos-Excipientes

Para os ensaios de compatibilidade, os excipientes presentes na maioria das formulações comerciais de aciclovir e penciclovir foram selecionados, considerando suas funções nas formulações e suas concentrações, bem como a disponibilidade de aquisição.

A temperatura de fusão (T_{peak}) de cada um dos fármacos, suas misturas binárias e as misturas ternárias fármaco-excipiente está resumida na Tabela 18. Como descrito por Bruni et al., tanto misturas binárias quanto ternárias são capazes de fornecer resultados confiáveis, mesmo em técnicas mais sensíveis, como a DSC. A opção pela análise ternária está relacionada aos resultados encontrados na

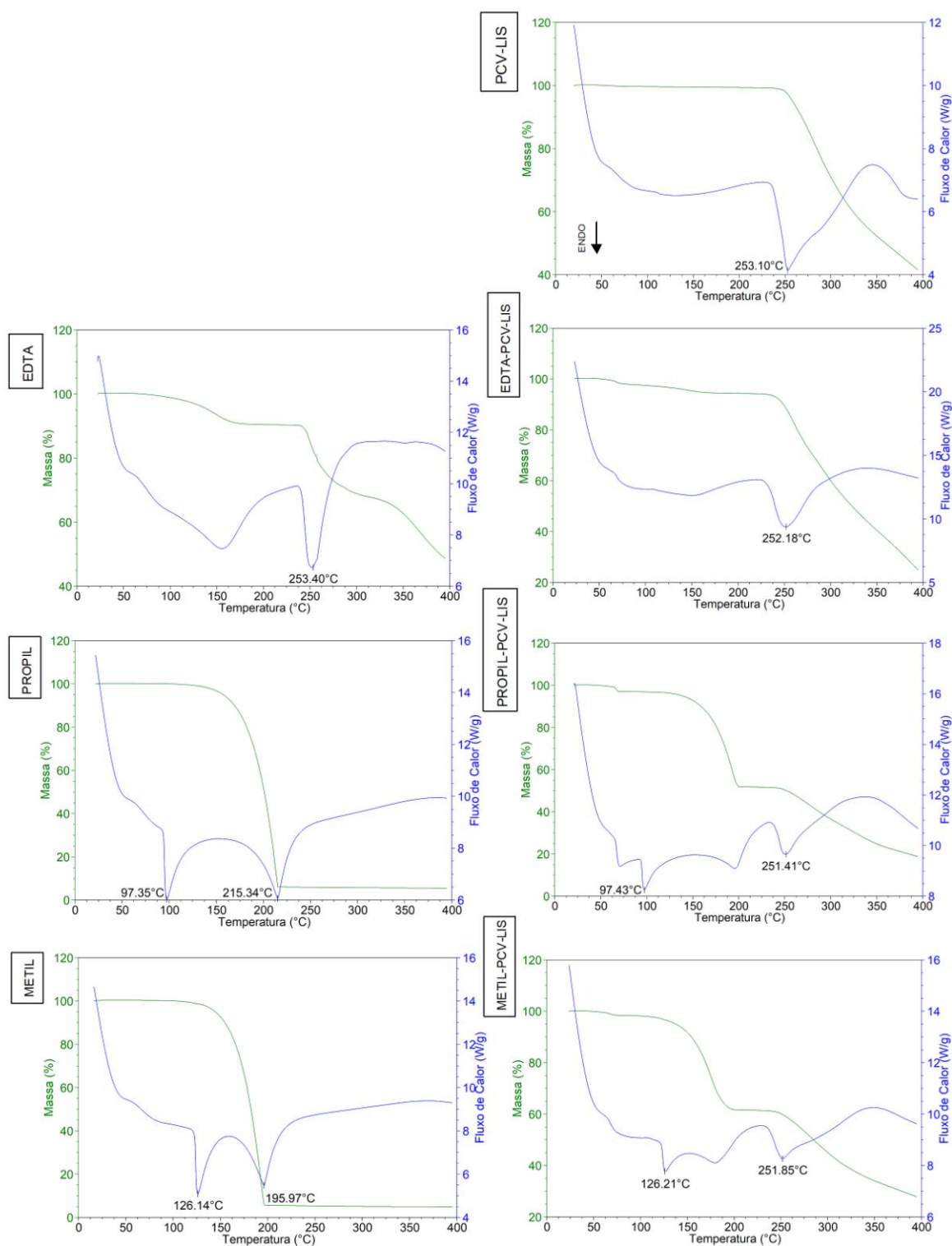
análise dos fármacos, que indicou mudanças nos eventos quando comparados aos ativos puros (BRUNI et al., 2010).

Tabela 18: Temperatura do pico de PCV e LIS em várias misturas de fármacos-excipientes.

Amostra	Proporção (fármaco-fármaco ou fármacos:excipiente)	T_{peak} °C
PCV	-	278,27
LIS	-	260,92
PCV-LIS	1:1	253,10
EDTA-PCV-LIS	1:1:1	252,18
PROPIL-PCV-LIS	1:1:1	251,41
METIL-PCV-LIS	1:1:1	251,85
BHT-PCV-LIS	1:1:1	251,76
PARAF-PCV-LIS	1:1:1	252,86
LAURIL-PCV-LIS	1:1:1	253,37
POLAWAX-PCV-LIS	1:1:1	252,67
ALC CET-PCV-LIS	1:1:1	222,74
PROP GLI-PCV-LIS	1:1:1	253,85
VAS LIQ-PCV-LIS	1:1:1	257,62

O EDTA é um agente quelante amplamente utilizado em preparações tópicas para auxiliar na promoção da estabilidade da formulação, uma vez que atua sequestrando os íons presentes no sistema disperso. Na Figura 19, EDTA-PCV-LIS, observa-se que o ponto de fusão do EDTA, evidenciado no evento em 253 °C, em concordância com o encontrado na literatura científica, permaneceu inalterado na presença dos fármacos (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Os eventos que determinam as fusões dos fármacos e do EDTA, quando em mistura são sobrepostos, e apresentam degradação proeminente logo em seguida. Essas informações sugerem que não há interação entre esses excipientes e os medicamentos em estudo.

Figura 19: Curvas de DSC/TG de PCV-LIS, EDTA e EDTA-PCV-LIS, PROPIL e PROPIL-PCV-LIS e METIL e METIL-PCV-LIS.



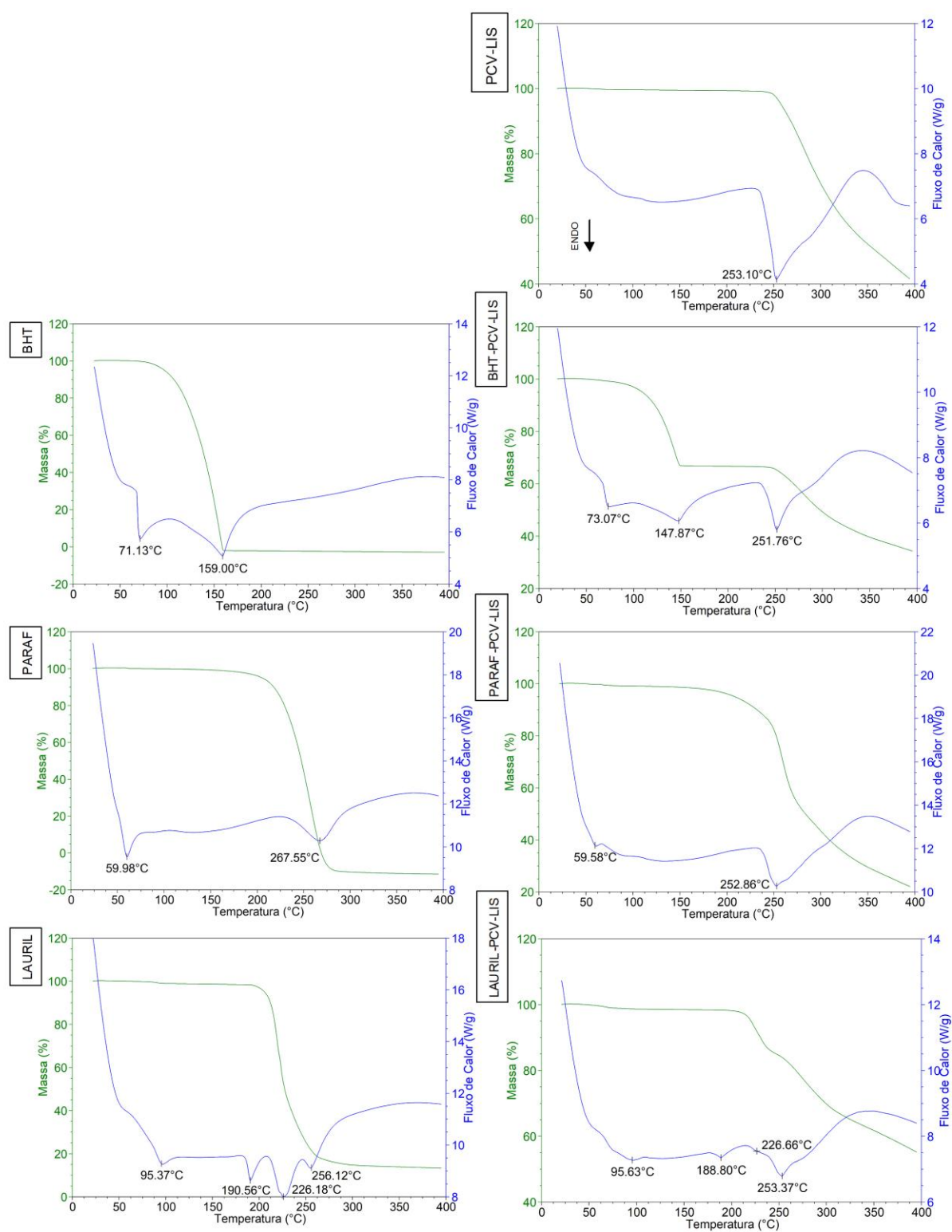
O propilparabeno é usado como conservante e atua em uma ampla faixa de pH (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Como pode ser visto na Figura 19, a curva de DSC/TG representando a mistura PROPIL-PCV-LIS demonstra não modificar os

eventos que caracterizam a mistura que continha apenas com os fármacos, mantendo o ponto de fusão a 253°C e o início da degradação na sequência. Ainda nesta figura, em PROPIL-PCV-LIS, o propilparabeno em mistura revelou diferentes eventos quando comparado à análise de sua forma pura, preservando o pico que determina seu ponto de fusão em 97°C, dados que estão de acordo com o seu perfil térmico presente na literatura (NETO; NOVÁK; MATOS, 2009). Nesta mesma observação vale ressaltar que há mudanças no início de sua degradação, que passa a iniciar-se em 70 °C, logo após o aparecimento de um pico endotérmico. Isso nos leva a acreditar que existe interação fármaco-excipientes, de modo que as mudanças estão relacionadas ao PROPIL e não aos ativos.

Entre os outros excipientes avaliados está o metilparabeno, outro conservante importante adicionado às formulações. Em sua mistura com PCV e LIS, pode-se observar na Figura 19, a partir da curva de DSC/TG, que não há alteração do seu ponto de fusão, confirmado na literatura em 126°C (GELBRICH et al., 2013; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Há uma alteração em um dos eventos endotérmicos evidenciados na análise do componente puro associado à degradação precoce (63°C), sugerindo uma possível interação, entretanto, não houve alteração no evento de determinação do fármaco (PCV-LIS), uma vez que o pico endotérmico a 253°C persistiu.

O BHT possui função antioxidante em produtos farmacêuticos. Na curva de DSC que representa o ensaio do componente puro (Figura 20), seu ponto de fusão pode ser observado em 71°C, dentro da faixa encontrada em outros trabalhos científicos (MOYANO; BROUSSALIS; SEGALL, 2010; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A curva de DSC/TG obtida pela mistura dos fármacos com este excipiente sugere que não há interação entre eles, afinal o ponto de fusão da mistura de PCV-LIS não muda e nem mesmo o início de sua degradação, mantendo-se também o perfil térmico do BHT.

Figura 20: Curvas de DSC/TG de PCV-LIS, BHT e BHT-PCV-LIS, PARAF e PARAF-PCV-LIS e LAURIL e LAURIL-PCV-LIS.



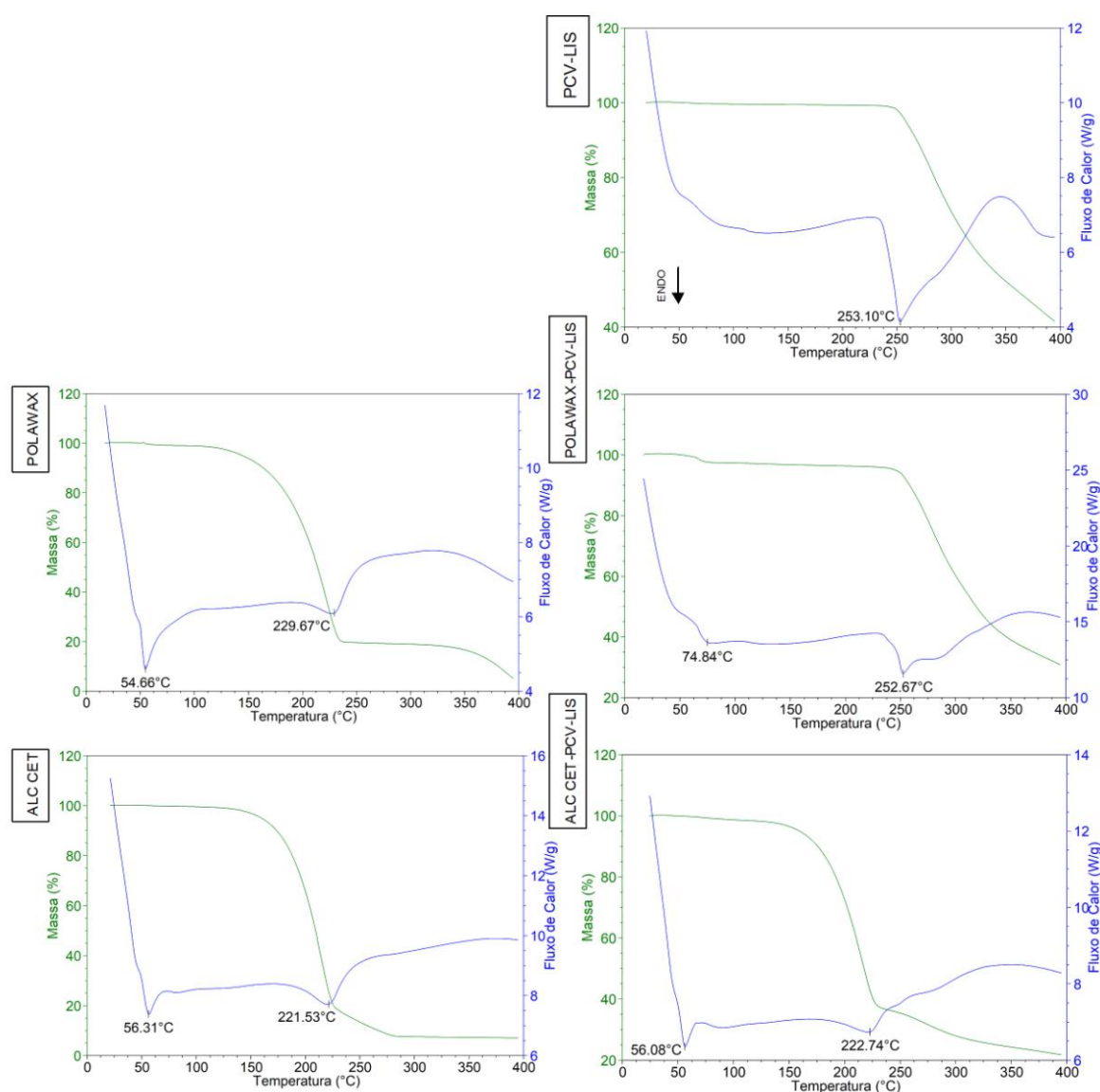
A parafina é um excipiente inerte no estado sólido, doador de viscosidade e é amplamente utilizada em formulações farmacêuticas tópicas. Tem um ponto de

fusão entre 50 e 61°C, confirmado em um pico endotérmico encontrado na análise DSC/TG de sua forma pura (PARAF) e começa a se degradar a 268°C, como pode ser visto na Figura 20 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Na mistura (PARAF-PCV-LIS) é possível observar nesta mesma figura, que o pico endotérmico referente à PCV-LIS é mantido, que o mesmo ocorre com o ponto de fusão da parafina e que ambos começam a degradar no início da fusão da combinação de fármacos (perto de 253°C). Estes resultados sugerem que não há interação entre fármacos e excipiente, sendo considerado um possível componente da formulação.

Caracterizado como um surfactante aniônico, o lauril sulfato de sódio é usado em uma ampla gama de produtos farmacêuticos. O comportamento térmico de sua análise pode ser visualizado na Figura 20 e está de acordo com o observado por outros autores (OLIVEIRA; YOSHIDA; SILVA, 2014; REDDY; SIVARAMAKRISHNA; SWAMY, 2017). Na análise de DSC/TG do LAURIL misturado com os fármacos, é possível observar a possível manutenção do evento endotérmico de PCV-LIS e o início de suas degradações, indicando que não há interação entre o excipiente e os mesmos.

A cera autoemulsificante não iônica, POLAWAX, possui função tensoativa, como o próprio nome já diz, também solubilizante, e pode atuar como um doador de viscosidade, sendo muito utilizado na preparação de emulsões O/A. Na faixa de 50-55°C, seu ponto de fusão é encontrado, um valor confirmado na curva DSC/TG do POLAWAX puro, observado na Figura 21 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Na mistura com PCV-LIS, o comportamento térmico dos fármacos permaneceu inalterado, com ponto de fusão e início de degradação em 253°C. O ponto de fusão do excipiente na mistura apresentou alteração (evento em 75°C), sendo perceptível que degradação mais representativa ocorreu em conjunto com o início da degradação dos fármacos. Moyano et al. (2010) encontraram resultados divergentes, com redução no ponto de fusão da cera e alargamento do evento correspondente ao ativo por eles estudado, quando misturados.

Figura 21: Curvas de DSC/TG de PCV-LIS, POLAWAX e POLAWAX-PCV-LIS e ALC CET e ALC CET-PCV-LIS.

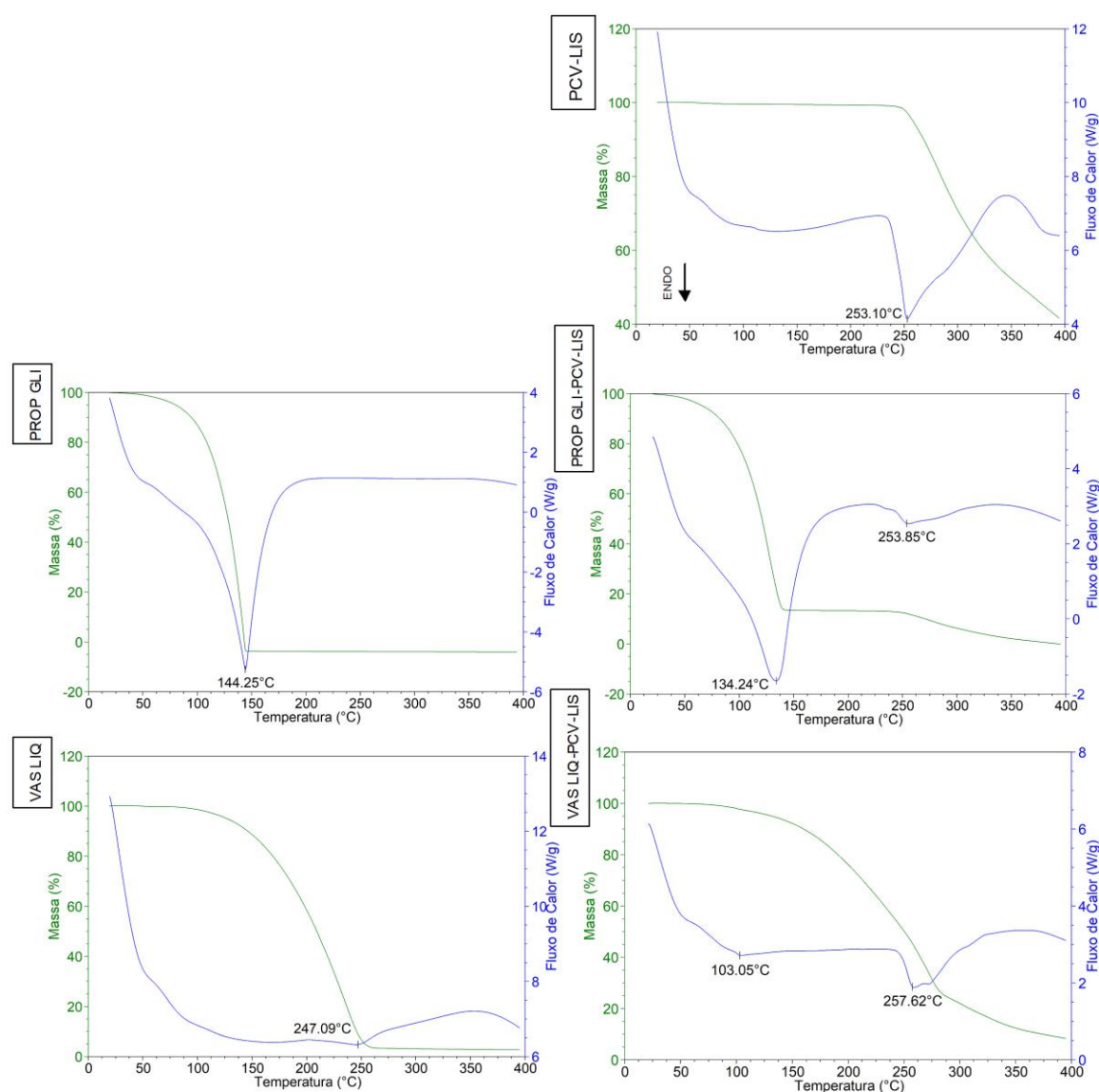


O álcool cetosteárico consiste na mistura de álcoois estearílicos e cetílicos, e atua como um doador de viscosidade e também como surfactante em emulsões O/A. Seu ponto de fusão está na faixa de 49 a 56°C, revelado no evento endotérmico em 56°C, mostrado na Figura 21, tanto em sua análise DSC/TG pura quanto na mistura (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Na mesma figura, mas observando as curvas DSC/TG da mistura ALC CET-PCV-LIS, pode-se observar o desaparecimento do pico de fusão dos fármacos e o início da degradação de todos eles em aproximadamente 141°C (curva de TG, em verde), o que caracteriza a solubilização total dos mesmos no excipiente fundido. Esse comportamento térmico

assemelha-se ao descrito por outros autores em relação à mistura de ALC CET com outras substâncias ativas, e indica uma forte interação, mas não necessariamente corresponde a uma incompatibilidade (LIRA et al., 2007; NETO; NOVÁK; MATOS, 2009; WONG; GILLIGAN; PO, 1992).

O propilenoglicol apresenta funções como solvente, umectante e conservante, tanto em formulações parenterais como não parenterais (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Além disso, esse excipiente tem a capacidade de melhorar a absorção do fármaco e é amplamente utilizado em formulações tópicas (WILLIAMS; BARRY, 2004). Sua caracterização é determinada por um evento evidente a 144°C, perfil semelhante ao encontrado por Batista (2015), e pode ser visualizado na Figura 22, na curva DSC/TG PROP GLI. Quando em associação com PCV-LIS ocorre um decréscimo de 10°C no evento supracitado, com maior perda de massa e manutenção do evento característico dos fármacos em 253°C. Ocorrência semelhante foi percebida na citação anterior, sendo uma possível explicação, o fato de o propilenoglicol ter alta miscibilidade e viscosidade, tornando-se responsável pela solubilização dos fármacos, explícita no avanço de seu ponto de fusão, com subsequente perda significativa de massa.

Figura 22: Curvas de DSC/TG de PCV-LIS, PROP GLI e PROP GLI-PCV-LIS e VAS LIQ e VAS LIQ-PCV-LIS.



Também conhecida como óleo mineral, a parafina líquida é especialmente usada em formulações tópicas, geralmente em emulsões de O/A (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). Seu perfil térmico é exibido na curva de DSC/TG VAS LIQ (Figura 22), com um evento notório a 247°C, perfil semelhante ao encontrado na literatura. Na mistura VAS LIQ-PCV-LIS, há um evento próximo a 258 °C, adjacente ao demonstrado na mistura binária de PCV-LIS (253 °C), com deslocamento na temperatura em que a degradação é mais proeminente. Esta pequena mudança na temperatura de fusão dos fármacos quando misturados a VAS LIQ também foi observada por Neto et al. (2009), neste caso na mistura VAS LIQ:prednicarbato.

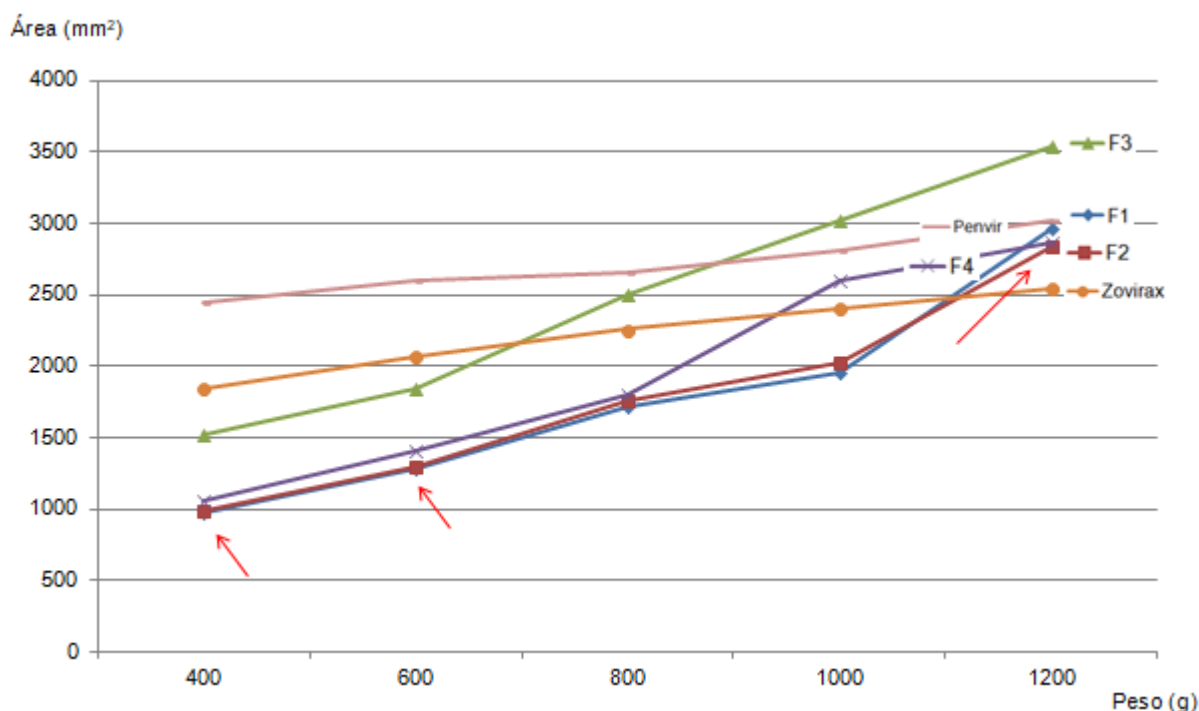
A seleção dos excipientes é um passo fundamental na aquisição de um produto farmacêutico, sendo necessários estudos sobre suas compatibilidades com os fármacos envolvidos, justificando a escolha adequada desses componentes (NARANG et al., 2015). A partir das informações coletadas dos testes de compatibilidade entre os fármacos e excipientes, bem como dos resultados de desempenho das fórmulas obtidas (item 6.4.1), os excipientes apropriados foram selecionados de acordo com a função que exercem e os que se tornaram parte da formulação foram parafina, lauril sulfato de sódio, álcool cetosteárico, propilenoglicol e vaselina líquida.

6.5 Desenvolvimento/Preparo do Creme

6.5.1 Espalhabilidade, pH e Teste da Centrífuga

As características de espalhabilidade de um creme são importantes tanto do ponto de vista sensorial, como em relação à eficácia, fato que nos levou a considerar esse parâmetro nas análises (ISAAC et al., 2008). Os resultados para o teste de espalhabilidade estão representados na Figura 23. Nela constam setas vermelhas indicando três pontos em que não há distinção estatística dos valores encontrados.

Figura 23: Áreas de espalhabilidade das formulações desenvolvidas (F1;F2;F3;F4) e das formulações referência de aciclovir (Zovirax[®]) e penciclovir (Penvir[®]).



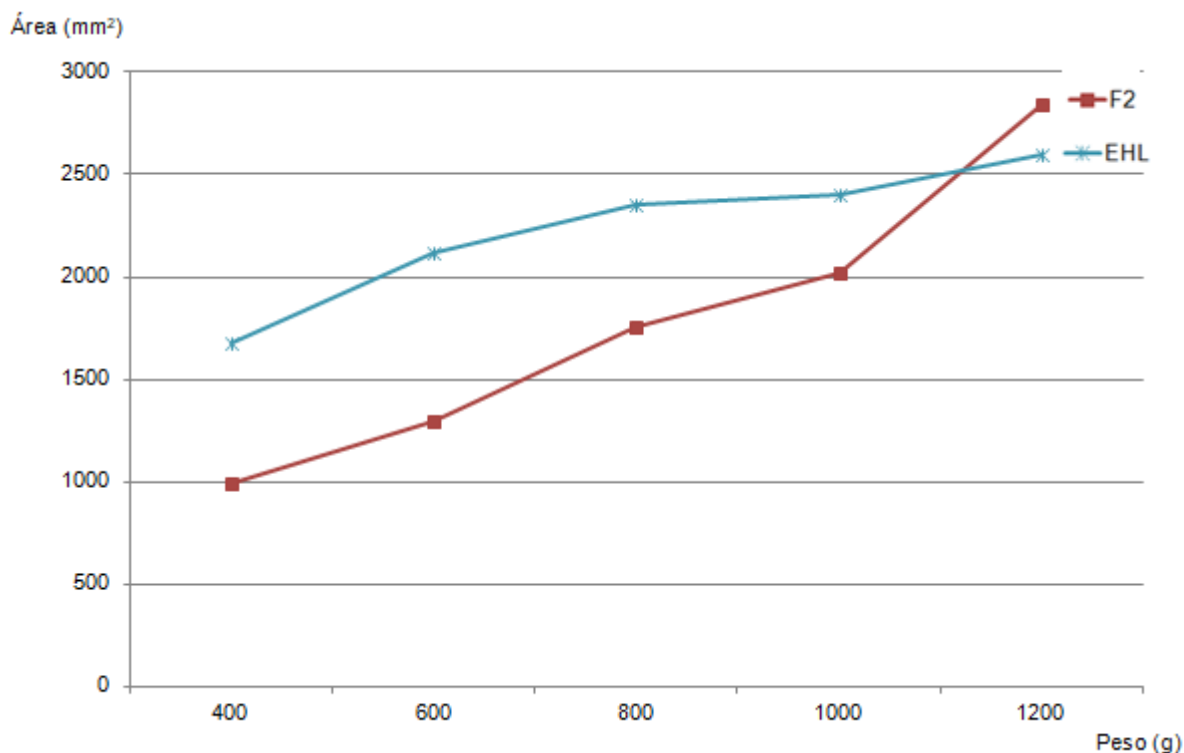
Nos primeiros dois pontos (pesos 400 e 600 g), a formulação F1 não se distinguiu estatisticamente da F2 quanto à sua espalhabilidade. Essa diferença observada frente aos demais pode ser explicada em razão dos diferentes doadores de viscosidades presentes em suas composições. No último ponto (peso de 1200 g), F2 não foi diferente de F4.

Todas as formulações apresentaram bons perfis de espalhabilidade quando submetidas a uma força de ação sobre elas, porém eles foram diferentes dos cremes de referência. A formulação F2 apresentou resultado intermediário a eles no ponto final. No ponto 4 (peso de 1000 g) a F3 e a F4 apresentaram maior espalhabilidade quando comparado com a F2. Esta característica auxiliou na escolha da F2 para seguir na comparação com o creme que considerou a quantidade de tensoativo pelo método de EHL, isto porque uma maior espalhabilidade pode estar condicionada a uma menor estabilidade, visto que o aumento da viscosidade colabora com essa questão (AULTON, 2016).

Como pode ser observado na Figura 24, o creme que considerou a quantidade de tensoativo pelo método de EHL apresentou espalhabilidade maior nos

primeiros pontos quando comparado com a formulação F2, mas menor no último ponto.

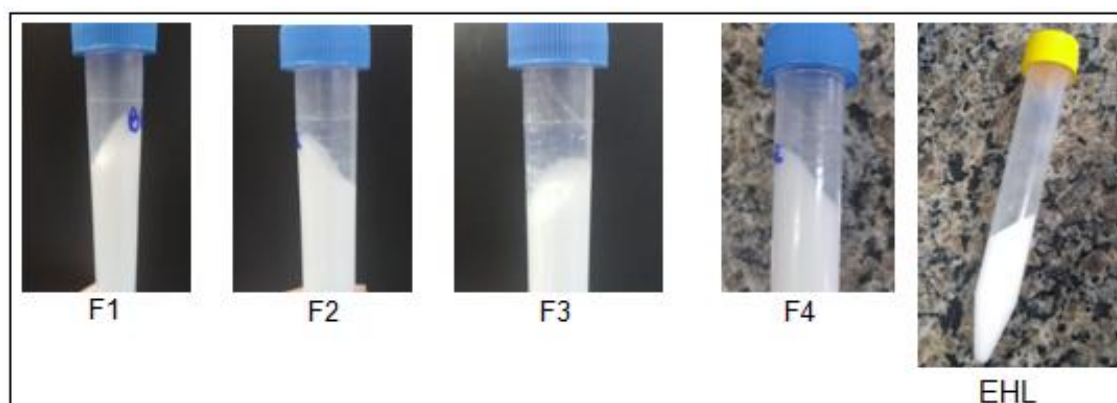
Figura 24: Áreas de espalhabilidade da formulação F2 e da desenvolvida pelo método EHL.



O pH final das formulações F1, F2, F3 e F4 foram respectivamente 6,7; 6,8; 6,5 e 6,5, e para a formulação EHL foi de 6,7. Alterações químicas, estabilidade da formulação, degradação e permeação do fármaco no local alvo da pele estão intrinsecamente relacionados ao pH da fórmula. O valor adequado para formulações tópicas é de 5,5 a 7,0 (AULTON, 2016; TADROS, 2013).

O resultado da centrifugação das formulações está exposto na Figura 25. Pode-se observar que não houve sedimentação ou separação de fases, demonstrando que as concentrações de tensoativos e/ou agentes emulsificantes estão nas concentrações adequadas para as formulações, sugerindo boa estabilidade (BELTRAMI et al., 2018).

Figura 25: Centrifugação das formulações F1; F2 F3; F4 e EHL.



A formulação F2 foi a escolhida diante dos ensaios de compatibilidade anteriormente descritos, já que os parâmetros descritos neste item não apontaram diferenças relevantes. Esta fórmula foi levada aos testes posteriores juntamente à fórmula relacionada ao método de EHL.

6.5.2 Comportamento Reológico

Não foram observadas alterações significativas a partir do viés da curva de vazão de 0 a 30 rpm e da tendência de queda da curva para velocidade de 30 a 0 rpm. Assim, foram considerados os valores médios dos parâmetros reológicos.

A viscosidade aparente diminuiu com o aumento da velocidade, o que é característico do comportamento pseudoplástico para ambos os cremes farmacêuticos (Figuras 26 e 27), com pouca variação para velocidades superiores a 10 rpm no creme farmacêutico preparado conforme o método EHL, ou 6 rpm no creme farmacêutico que não considerou o EHL no preparo (F2). Existe uma tendência para um valor constante de viscosidade aparente com velocidade crescente que sugere um comportamento assintótico, típico de fluidos pseudoplásticos ou de diluição por cisalhamento.

O creme farmacêutico que considera o EHL apresentou viscosidade aparente entre 400 e 2500 mPas, enquanto que o outro o creme apresentou valores entre 2200 e 10000 mPas. Para as taxas de deformação estudadas, os cremes não apresentaram tixotropia.

Figura 26: Curvas de fluxo de viscosidade aparente vs. velocidade para creme desenvolvido sem EHL.

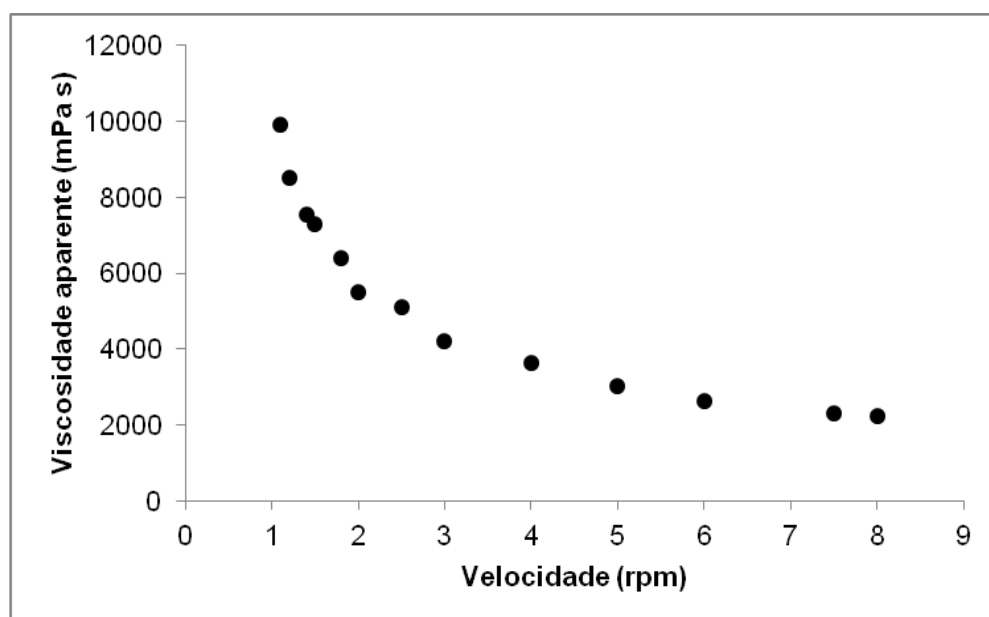
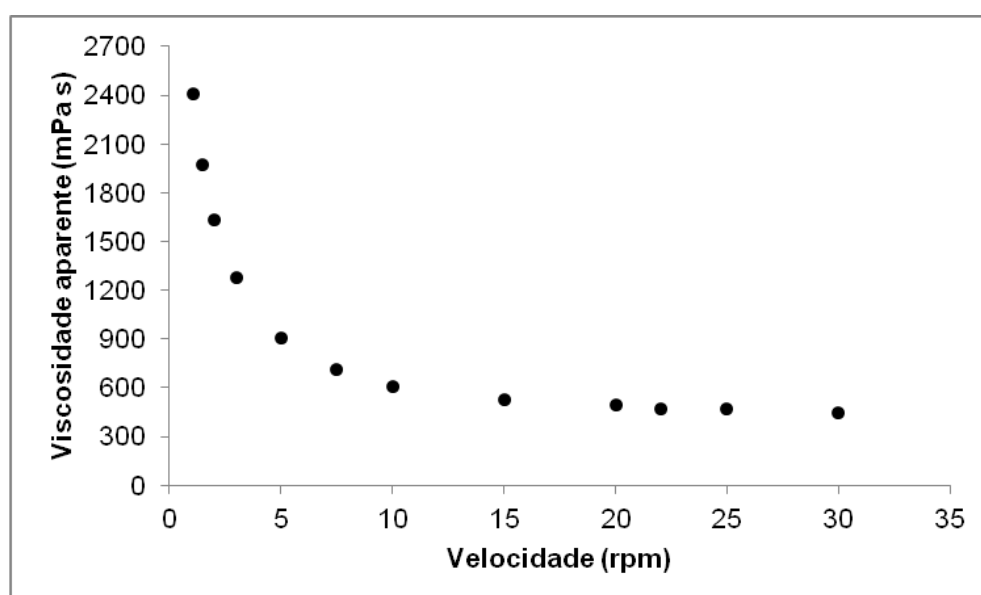


Figura 27: Curvas de fluxo de viscosidade aparente vs. velocidade para o creme preparado conforme o método EHL.



Na Tabela 19 são apresentados os valores dos parâmetros obtidos a partir dos ajustes dos dados experimentais das curvas de fluxo (tensão de cisalhamento *versus* taxa de cisalhamento) para ambos os cremes farmacêuticos, descritos pelo modelo de Ostwald-de-Waelle.

Tabela 19: Parâmetros reológicos para o modelo de Ostwald-de-Waele.

Cremes	K (Pa s ⁿ)	n	X ² (qui-quadrado)
sem EHL	2.273	0.686	0,0825
EHL	0,716	0.702	0,0235

O modelo de Ostwald-de-Waele apresentou um bom ajuste dos dados experimentais para os dois cremes estudados, uma vez que os valores do qui-quadrado foram muito baixos. Para os cremes farmacêuticos foram obtidos índices de comportamento (n) <1, indicando o comportamento pseudoplástico dos cremes.

O creme que considerou o EHL no preparo, ou seja, que continha a quantidade de tensoativo expressa por esse método, apresentou menor viscosidade. No item 6.4.1 apresentou maior espalhabilidade nos primeiros pontos avaliados, comportamento que pode ser relacionado à essa menor viscosidade. Considerando que a estabilidade de uma formulação é mantida com o aumento da viscosidade da fase contínua, o creme de escolha para seguir com as análises foi então, o que não considerou o método EHL (AULTON, 2016).

Essa escolha não tem a intenção de invalidar o método EHL há muito tempo já utilizado na literatura, e as diferenças encontradas podem ser justificadas pelo fato de um dos ativos, a lisina, ter ganho destaque também como estabilizador de emulsões. Esse fato sugere que o creme formulado seja ainda mais estável do que o esperado (PAULA; DELCHEVA; BEATTIE, 2018; ZHU et al., 2019).

6.5.3 Análise Microbiológica

A contagem total de bactérias mesófilas e a de fungos demonstrou estar dentro do limite máximo especificado, de 10³ UFC g⁻¹ e 10² UFC g⁻¹, respectivamente (BRASIL, 2010). O crescimento de microorganismos patogênicos não foi constatado. Os resultados podem ser observados na Tabela 20.

Tabela 20: Contagem em placas de microrganismos aeróbios, de fungos e patogênicos.

Análises	Contagem (UFC g ⁻¹)	Limite máximo especificado
Contagem Total de Bactérias Mesófilas	<10 UFC/g	10 ³ UFC/g
Contagem de Fungos	<10 UFC/g	10 ² UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausência/g
<i>Salmonella</i>	Ausência	Ausência/g
Enterobactérias	Ausência	Ausência/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência/g

No Ensaio desafio do conservante, em que ocorre a inoculação de carga microbiana, observou-se a redução no crescimento dos microrganismos (Tabela 21), não havendo então, aumento no número de UFC inoculadas em mais do que 0,5 log₁₀, como preconizado pela Farmacopeia Brasileira, de forma a alcançar os limites estabelecidos (UFC g⁻¹ <10) (BRASIL, 2010; BRASIL, 2019).

Tabela 21: Contagem de microrganismos no Ensaio desafio do conservante.

		Microrganismos (UFC g ⁻¹)				
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
Inóculo (UFC mL ⁻¹)		5,0 10 ⁶	6,1 10 ⁶	5,3 10 ⁶	6,2 10 ⁶	5,5 10 ⁶
Tempo (dias)	0	4,0 10 ⁵	3,0 10 ⁵	3,7 10 ⁵	4,5 10 ⁵	5,0 10 ⁵
	7	2,0 10 ²	1,5 10 ²	1,0 10 ²	1,0 10 ²	2,0 10 ³
	14	<10	<10	<10	<10	<10
	28	<10	<10	<10	<10	<10

Com esses resultados é possível afirmar que a quantidade e a escolha dos conservantes na formulação estão adequadas, o que garante a ela qualidade e segurança.

6.6 Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica Indicativa de Estabilidade e para a Análise de Teor por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

6.6.1 Desenvolvimento da Metodologia Analítica

Nas metodologias indicadas por Chong et al. e Lee, Seo & Lee (2007), os ensaios revelaram o PCV em tempos de retenção (T_r) que variavam de 3 a 9 minutos (conforme havia alteração na proporção dos componentes da fase móvel), com simetria de pico adequada ($>2,0$). Por haver proximidade com a metodologia a ser investigada para análise da LIS em PDA (descrita por Hayat et al.), houveram tentativas de encontrá-la junto ao PCV, mas não houve êxito (HAYAT et al., 2014). Esta metodologia descrita para LIS, utilizando gradiente de metanol e água, foi então testada para PCV e para LIS na busca por revelá-los em uma mesma metodologia. O PCV então pôde ser observado, mas a LIS não.

As metodologias investigadas passaram então para a detecção em fluorescência, já que alguns artigos assim traziam, tanto para PCV quanto para LIS (DAO; JIAO; ZHONG, 2008; LIMAM; MEDIMAGH; HELLAL, 2016). Como eles apresentam comprimentos de onda de excitação e emissão diferentes isso foi considerado e também testado. O PCV pôde ser identificado, mas a LIS novamente não era revelada.

Diante desse problema, a possibilidade de adquirir as substâncias presentes em um reagente de derivatização descrito em um artigo que analisava aminoácidos por HPLC em PDA, foi avaliada (WU et al., 2016). Pelo fato de a LIS ser muito hidrofílica e as colunas cromatográficas disponíveis serem hidrofóbicas, fazia-se necessário que um reagente de derivatização, o OPA-MPA, fosse utilizado para que houvesse a formação de um aduto hidrofóbico na molécula, para que assim a LIS interagisse de alguma forma com a coluna (PAVAN, 2015).

Ao haver essa derivatização da LIS, a metodologia que indicava a utilização de metanol e água foi inicialmente testada, e a LIS pôde então ser revelada. Quando o PCV foi associado à leitura, com diluições no mesmo reagente de derivatização, houve degradação deste composto. A diluição do PCV na fase móvel e a sua revelação na mesma metodologia empregada à LIS não demonstrou resultados satisfatórios, já que ele saia junto do volume morto. Sendo importante ressaltar que as proporções iniciais de metanol:água determinadas para LIS (50:50) não poderiam

ser modificadas, pois também prejudicava o aparecimento do pico correspondente à ela.

A partir dessas constatações optou-se por realizar a revelação desses compostos em corridas cromatográficas diferentes, mas em metodologias correspondentes, ou seja, em condições praticamente iguais, distinguindo-se uma da outra por uma corrida ser composta pelo gradiente de metanol e água (LIS) e pela outra ocorrer de forma isocrática, utilizando os mesmos reagentes na fase móvel (PCV). A escolha da fase móvel contendo metanol e água apresenta a vantagem de utilizar um solvente de baixo custo e biodegradável.

Em ambas as metodologias, o fluxo de 1 mL min^{-1} associado à um volume de injeção de $10 \text{ }\mu\text{L}$, com forno desligado, demonstraram picos cromatográficos com melhor simetria (acima de 1,5) e tempos de retenção afastados do volume morto (T_r em torno de $= 2,7_{\text{PCV}}$ e $7,5_{\text{LIS}}$). Os melhores resultados frente a esses mesmos parâmetros também foram alcançados utilizando a coluna Phenomenex[®] Luna C18, a concentração de trabalho de $10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (100%) e as proporções dos componentes da fase móvel descritas na Tabela 22, que acompanha as condições cromatográficas definidas.

Os comprimentos de onda foram definidos utilizando o detector PDA, acoplado ao equipamento.

Tabela 22: Condições cromatográficas das metodologias analíticas correspondentes indicativas de estabilidade e para a análise de teor de PCV e de LIS.

PARÂMETROS				
Coluna Cromatográfica	Phenomenex® Luna C18			
Temperatura do Forno	Forno desligado			
Volume de Injeção	10 µL			
Vazão da Fase Móvel	1 mL/min			
Solventes da Fase Móvel	Metanol:Água			
Detector	PDA			
	PCV		LIS	
Eluição da Fase Móvel	Isocrática		Gradiente	
Comprimento de Onda	254 nm		227 nm	
Solução de Diluição (%:%)	Metanol:Água (20:80)		OPA-MPA	
Tempo de Corrida	4 minutos		11 minutos	
		Tempo (min)	Metanol	Água
		0-2	50	50
Proporção de Solventes da Fase Móvel (%:%)	Metanol:Água (20:80)	2-4	50	50
		4-6	70	30
		6-8	80	20
		8-11	50	50
Tempo de Retenção em Soluções Padrão (min)	2,7		7,8	

Os teste frente às diferentes proporções no gradiente da LIS foram realizados e demonstraram não haver diferença no Tr desse ativo quando havia aumento de metanol já no início da análise. Alguns casos demonstraram inclusive diminuição na simetria de pico, por isso optou-se por manter a metodologia, que se difere da encontrada na literatura em razão da proporção de fase móvel utilizada, do tempo de corrida, bem como da aquisição dos dados da LIS, destacado por ser menor, além é claro, de poder ser uma metodologia aplicada à análise de teor de um creme (HAYAT et al., 2014).

Ensaio para determinar o tempo de exposição da LIS ao reagente de derivatização antes de a amostra ser injetada também foram realizados, obtendo-se áreas que melhor corresponderam-se entre si quando essa reação era feita 1 minuto antes da injeção.

As análises de PCV e LIS não foram possíveis em uma mesma metodologia e em uma mesma corrida cromatográfica. Um dos motivos está no fato de ser necessária a derivatização pré-coluna da LIS, que não compreende o comportamento do PCV. Porém, as metodologias são correspondentes e há facilidade em realizar análises de parâmetros de um deles com posteriores análises de parâmetros do outro, levando em torno de 10 minutos apenas para a estabilização do sistema. Fato este, que nos leva a descrever os resultados dos parâmetros validados de PCV e LIS nos mesmos itens.

6.6.2 Validação da Metodologia Analítica

Essas metodologias analíticas indicativas de estabilidade e para avaliação de teor em produto farmacêutico, no caso um creme, neste trabalho desenvolvidas e a partir dos próximos itens, validadas, não são encontradas na literatura científica, já que nem mesmo a associação destes fármacos é encontrada no mercado farmacêutico. Para tanto, vale ressaltar que esse importante passo a ser acompanhado atendeu a todas às exigências dos órgãos regulamentadores, subdivididos nos parâmetros subsequentes (BRASIL, 2017; FDA, 2015; ICH, 2005).

6.6.2.1 Seletividade e Estudo de Degradação Forçada

O estudo de degradação forçada do PCV foi importante na compreensão do seu comportamento frente a condições mais severas, além de auxiliar na comprovação de que o método é seletivo à molécula em questão, já que o detecta e o quantifica em meio a possíveis produtos de degradação, tanto em relação ao princípio ativo puro quanto em meio à uma formulação farmacêutica, no caso, um creme.

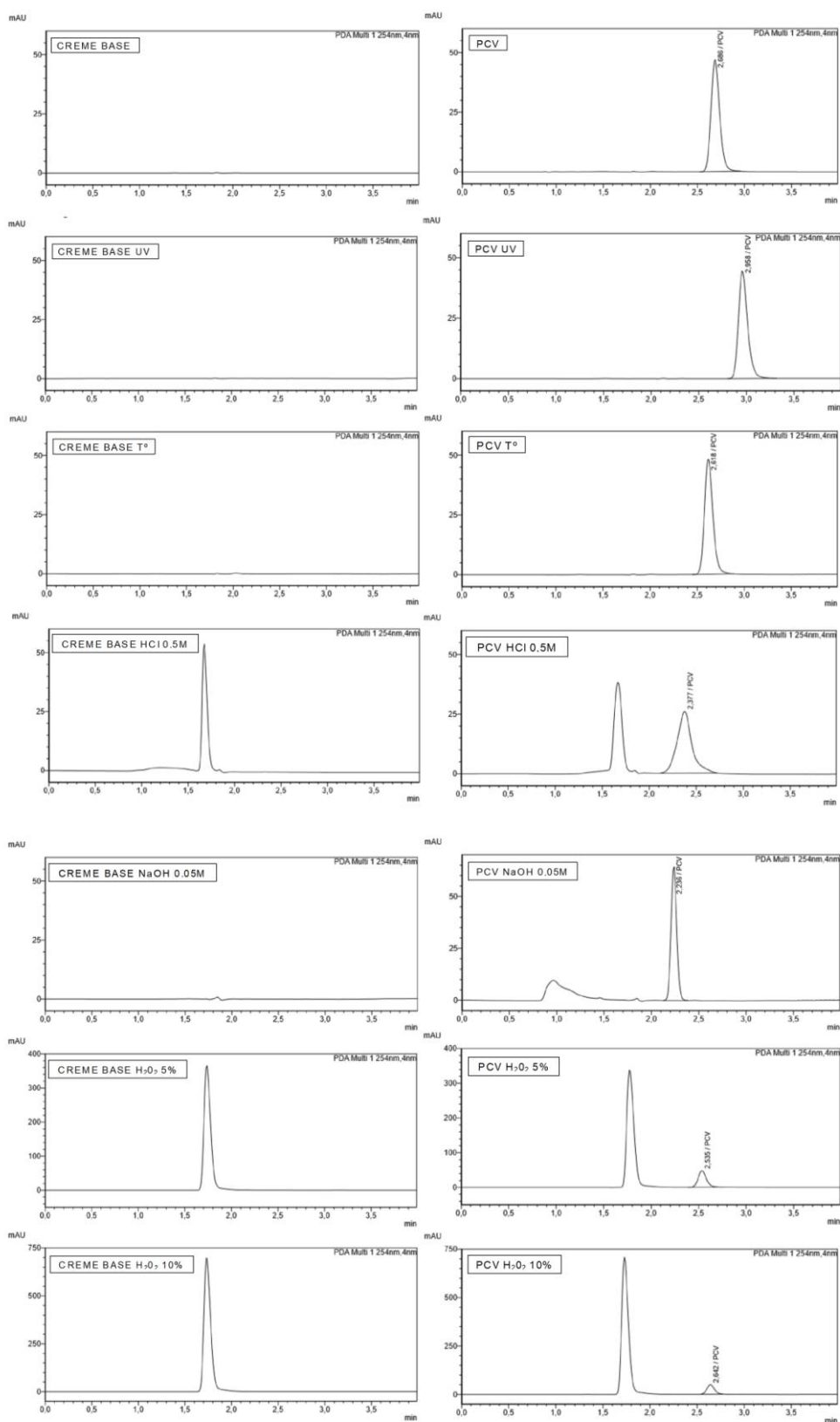
O PCV demonstrou ser foto e termoestável, contudo, sofre degradação moderada em meio oxidativo (em contato com H₂O₂ 10% por 8 horas, houve redução de aproximadamente 10% no teor). Degradações mais severas foram observadas em meios ácidos e básicos, os quais, mesmo adicionados de forma

imediate e em pequena concentração ao ativo demonstraram promover perda considerável no seu teor já nos primeiros instantes. Esses dados podem ser observados relacionando a Tabela 23 aos cromatogramas presentes na Figura 28. Comportamento semelhante foi relatado por Kumar et al., em uma metodologia direcionada ao famciclovir, o pró-fármaco do penciclovir (KUMAR et al., 2012). Não foram observados produtos de degradação na corrida cromatográfica, mostrando-se puro o pico de PCV em todas as análises.

Tabela 23: Teores encontrados no estudo de degradação forçada do PCV.

Amostra (PCV)	Teor (%)	Tr (min)
UV (4 dias)	99,23	2,96
T ^o (4 dias)	100,33	2,62
HCl 0,5M (imediate)	93,88	2,38
NaOH 0,05M (imediate)	89,93	2,24
H ₂ O ₂ 5% (8h)	95,03	2,54
H ₂ O ₂ 10% (8h)	89,61	2,64

Figura 28: Cromatogramas do estudo de degradação forçada do PCV em UV, T⁰, HCl 0,5M, NaOH 0,05M e H₂O₂ 5 e 10%.



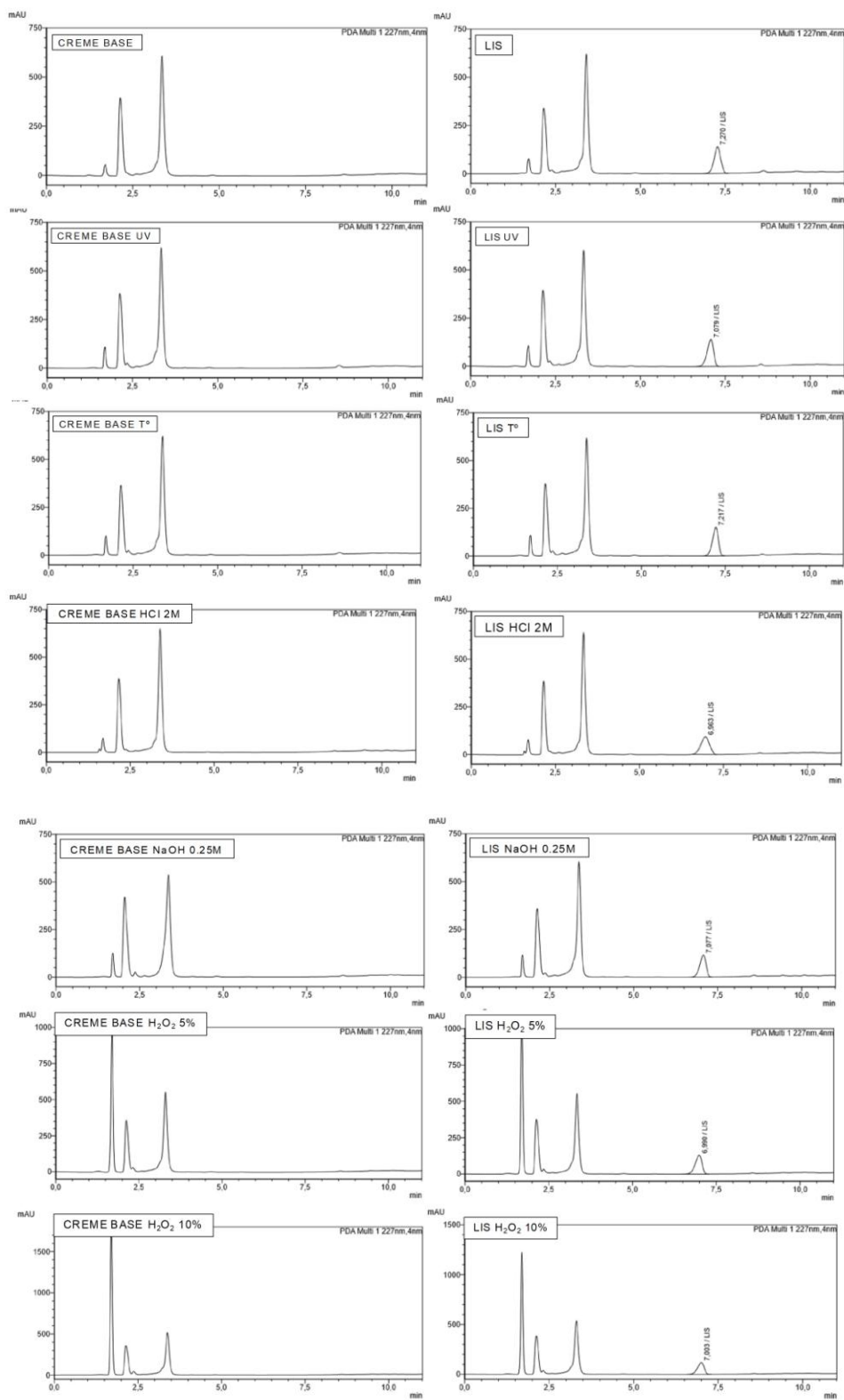
O estudo de degradação forçada da LIS auxiliou na compreensão do seu comportamento frente às condições a que foi exposta. Com essas análises o método demonstrou ser seletivo à lisina mesmo em meio à produtos de degradação, neste trabalho não detectados/observados, e em meio aos excipientes presentes na formulação desenvolvida.

A LIS demonstrou, assim como o PCV, ser foto e termoestável. Considerando a amostra exposta em H₂O₂ 5% por 24h, pode-se afirmar que a LIS também tem estabilidade oxidativa. Ela revelou sofrer degradação ácida moderada, com comportamento oposto à exposição básica, a qual promoveu mesmo em baixa concentração (NaOH 0,25M) e com contato imediato a LIS, redução no teor de 19% nos instantes da exposição. Essas informações podem ser melhor observadas fazendo uma relação com os dados da Tabela 24 e com os cromatogramas presentes na Figura 29. A pureza de pico da LIS foi indicada em todas as análises.

Tabela 24: Teores encontrados no estudo de degradação forçada da LIS.

Amostra (LIS)	Teor (%)	Tr (min)
UV (4 dias)	100,35	7,10
T ^o (4 dias)	99,04	7,22
HCl 2M (24h)	89,61	6,96
NaOH 0,25M (imediato)	81,00	7,01
H ₂ O ₂ 5% (24h)	98,21	7,00
H ₂ O ₂ 10% (24h)	88,18	7,00

Figura 29: Cromatogramas do estudo de degradação forçada da LIS em UV, T°, HCl 2M, NaOH 0,25M e H₂O₂ 5 e 10%.



6.6.2.2 Linearidade

A curva de calibração foi construída para determinar a faixa de linearidade das metodologias (Figuras 30 e 31).

O método para o PCV provou ser linear entre 1 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de determinação de $r^2 = 1$ ($y = 29522x - 1014,8$; onde, y representa a área do pico absoluto e x a concentração). Para a LIS o método mostrou ser linear também entre 1 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de determinação de $r^2 = 0,9999$ ($y = 183076x + 37805$, seguindo as considerações já citadas).

A ANOVA foi realizada, demonstrando regressão linear significativa ($p < 0,05$) e desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$), validando este parâmetro. Os resíduos para ambos os ensaios foram heterogêneos, não apontando erros específicos.

Figura 30: Curva de linearidade do PCV em HPLC.

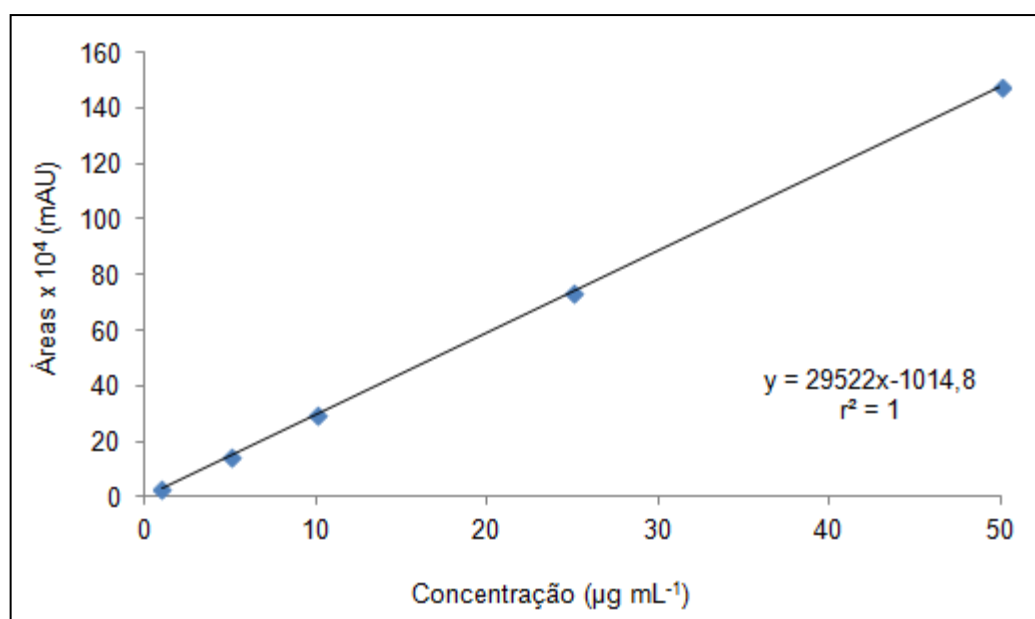
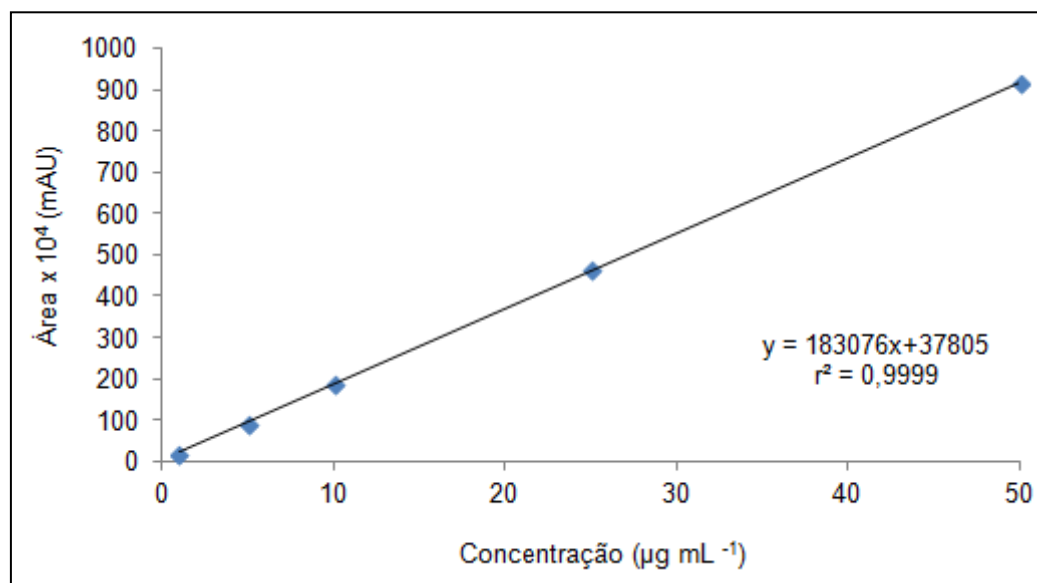


Figura 31: Curva de linearidade da LIS em HPLC.



Os cromatogramas que indicam os padrões de PCV e de LIS a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e os cromatogramas de suas respectivas soluções diluentes, metanol:água (20:80) e OPA-MPA, podem ser visualizados nas Figuras 32 e 33.

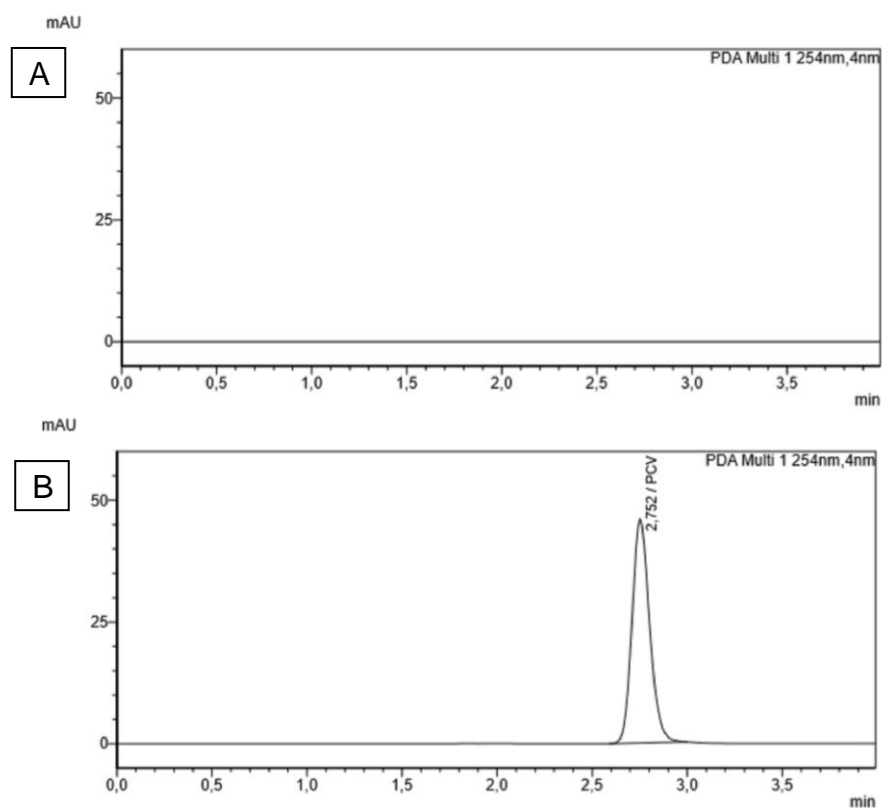
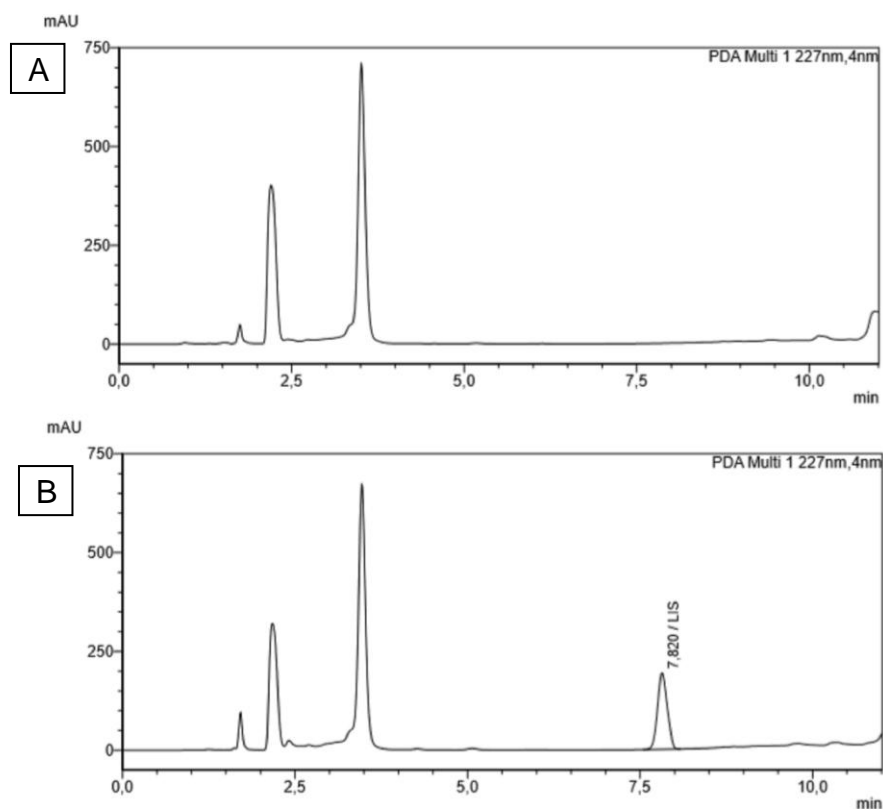
Figura 32: Cromatogramas de A: metanol:água (20:80) e de B: PCV $10 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 33: Cromatogramas de A: OPA-MPA e de B: LIS 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

6.6.2.3 Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação calculados para o PCV foram de 0,05 e 0,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para a LIS foram de 0,30 e 0,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores foram confirmados experimentalmente.

Os limites referentes à lisina demonstram que esse método é muito mais sensível do que a metodologia que se faz presente na literatura (HAYAT et al., 2014), cujos limites de detecção e quantificação são respectivamente, 1,55 e 5,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

6.6.2.4 Precisão

No ensaio de repetibilidade do PCV realizado com seis amostras igualmente preparadas, o DPR foi de 0,30%, como pode ser observado na Tabela 25. Na precisão interdia, representando três diferentes dias de análise, o DPR foi de 0,14% e na precisão entre analistas, de 0,91%. O método mostrou-se preciso, com valores

de DPR abaixo de 2%, enquadrados nas exigências feitas pelo ICH, e teores entre 95 a 105%, com média de 101,72% (ICH, 2005).

Tabela 25: Precisão interdia e entre analistas da metodologia analítica por HPLC para PCV.

Amostras	Repetibilidade (n=6)		Dias	Interdia (n=3)		Analistas	Entre analistas (n=3)	
	Teor ^a (%)	DPR (%)		Teor ^a (%)	DPR (%)		Teor ^a (%)	DPR (%)
1	101,40 (± 0,34)		1	100,26 (± 0,74)		A	101,76 (± 1,02)	
2	101,76 (± 0,49)							
3	102,11 (± 0,22)	0,30	2	100,01 (± 0,87)	0,14	B	101,12 (± 0,72)	0,91
4	101,89 (± 0,38)							
5	101,33 (± 0,78)		3	100,02 (± 0,59)		C	99,95 (± 0,76)	
6	101,86 (± 0,76)							

^a Média das triplicatas e o respectivo DPR.

A LIS, por sua vez, apresentou DPR de 0,46% no ensaio de repetibilidade realizado com seis amostras igualmente preparadas. Como pode ser observado na Tabela 26, na precisão interdia, representando três diferentes dias de análise, o DPR foi de 0,18% e na precisão entre analistas, de 1,42%. O método mostrou-se preciso, com valores de DPR abaixo de 2%, enquadrados nas exigências feitas pelo ICH, e teores entre 95 a 105%, com média de 99,79% (ICH, 2005). A média das áreas obtidas a partir de três corridas cromatográficas consecutivas de cada amostra não foi realizada, pois em função do OPA-MPA a amostra não apresentava estabilidade. Seu tempo de retenção teve pequenas modificações (7,69 minutos) quando comparamos a análise do padrão à análise da amostra, e isso deve-se a interação com o reagente de derivatização.

Tabela 26: Precisão interdia e entre analistas da metodologia analítica por HPLC para LIS.

Amostras	Repetibilidade (n=6)		Dias	Interdia (n=3)		Analistas	Entre analistas (n=3)	
	Teor (%)	DPR (%)		Teor (%)	DPR (%)		Teor (%)	DPR (%)
1	100,16		1	101,04		A	98,49	
2	98,97			101,19	0,18		B	99,69
3	99,64	0,46	2	100,82		C	101,31	
4	99,97			101,19	0,18		99,69	1,42
5	99,76		3	100,82			101,31	
6	100,23			101,19	0,18		99,69	1,42

6.6.2.5 Exatidão

O método demonstrou-se exato para o PCV dentro do intervalo de interesse (8, 10 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, representando 80, 100, 120%, respectivamente) com recuperação do princípio ativo frente aos excipientes adicionados de 80,35, 99,32 e 120,35%, com DPR de 0,13, 0,19 e 0,14%, respectivos aos níveis de concentrações citados (Tabela 27).

Tabela 27: Exatidão da metodologia analítica por HPLC para PCV.

Análise	80% (8 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	100% (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	120% (12 $\mu\text{g mL}^{-1}$)
1 ^a	80,27	99,29	120,54
2 ^a	80,32	99,52	120,24
3 ^a	80,47	99,14	120,26
DPR (%)	0,13	0,19	0,14
Recuperação (%)	80,35	99,32	120,35

Para a LIS o método demonstrou ser exato na faixa de 8, 10 e 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, concentrações relacionadas de forma respectiva a 80, 100 e 120% do ativo em questão. A recuperação do mesmo em meio aos excipientes foi de 81,31, 101,03 e 120,34%, com DPR de 1,70, 0,38 e 0,84% associados às concentrações ordenadamente citadas. Os dados podem ser melhor visualizados na Tabela 28.

Tabela 28: Exatidão da metodologia analítica por HPLC para LIS.

Análise	80% (8 µg mL ⁻¹)	100% (10 µg mL ⁻¹)	120% (12 µg mL ⁻¹)
1 ^a	80,14	101,34	121,32
2 ^a	82,23	101,15	119,30
3 ^a	80,96	100,60	120,39
DPR (%)	1,70	0,38	0,84
Recuperação (%)	81,31	101,03	120,34

Os desvios apresentaram-se em acordo às exigências, todos menores que 2% (ICH, 2005).

6.6.2.6 Robustez e Estabilidade da Amostra

Baseando-se no desenho experimental fornecido pelo Box-Behnken (3/1/15), as diversas análises de variações randomizadas demonstraram que as metodologias correspondentes foram robustas. Vale ressaltar que este é um modelo que utiliza valores de máximo e mínimo combinados junto ao ponto central, associado à ANOVA, para a análise dos dados e validação do modelo. Tem sido umas das ferramentas de planejamento experimental amplamente incorporada em diversas áreas (FERREIRA et al., 2007; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

Para o PCV, não houve alterações significativas ($p > 0,05$) frente às análises que alteravam simultaneamente a proporção da fase móvel para $\pm 2\%$, o fluxo para $\pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de extração da amostra para ± 5 minutos. Os efeitos podem ser observados no Diagrama de Pareto (Figura 34). Os teores, entre 98 e 102%, podem ser observados na Tabela 29. A assimetria de pico observada nos cromatogramas manteve-se abaixo de 2,0 e os tempos de retenção variaram conforme o fluxo e proporção de solvente orgânico na fase móvel.

Figura 34: Efeitos não significativos na robustez da metodologia analítica por HPLC para PCV, com condições cromatográficas randomizadas.

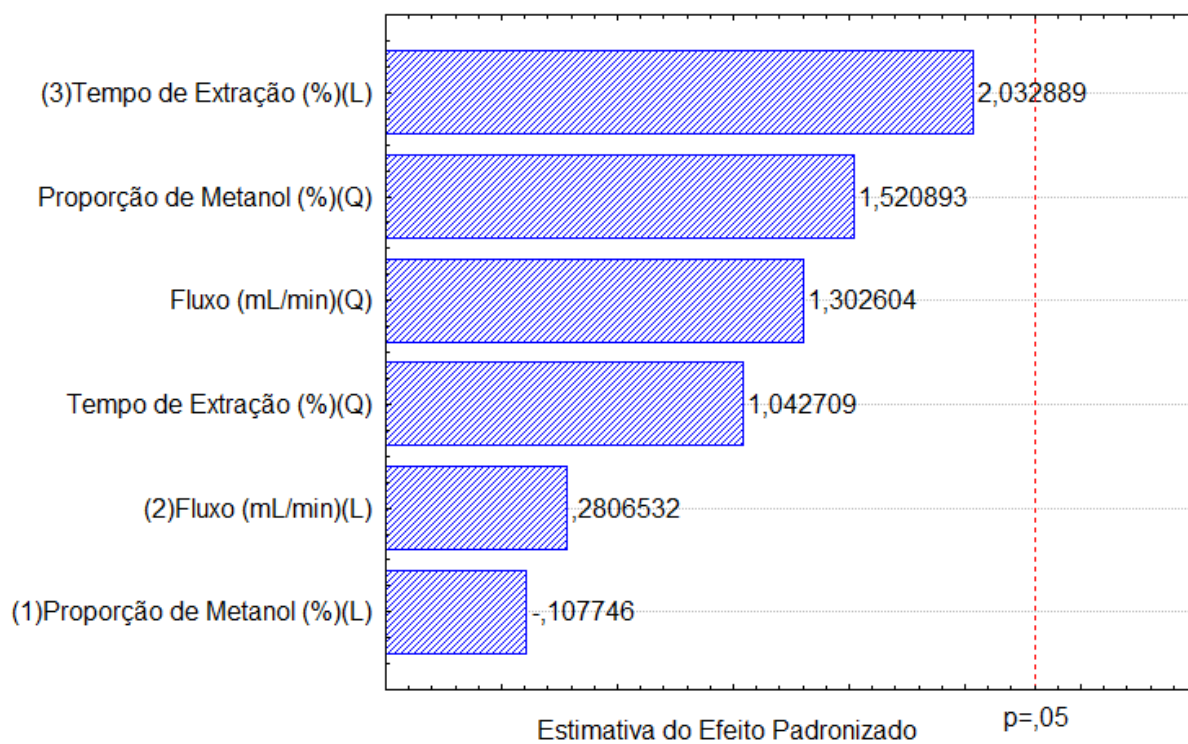


Tabela 29: Robustez da metodologia analítica por HPLC para PCV, com condições cromatográficas randomizadas.

Proporção de Metanol na Fase Móvel (%)	Fluxo da Fase Móvel (mL min ⁻¹)	Tempo de Extração da Amostra (min)	Teor (%)
18	0,9	30	100,19
18	1,1	30	99,93
20	1,0	30	100,63
22	1,0	25	98,70
20	1,0	30	100,76
20	0,9	35	99,61
22	1,0	35	101,51
20	1,1	35	100,34
20	1,1	25	100,19
22	0,9	30	99,62
20	0,9	25	100,21
18	1,0	35	101,04
22	1,1	30	99,81
18	1,0	25	98,73
20	1,0	30	101,85

Associado com os ensaios de robustez a amostra de PCV provou ser estável nas primeiras 48 h, apresentando 99,73% de teor e não ultrapassando o limite de 2% para mais ou para menos exigido para a conclusão de mais essa etapa (ICH, 2005).

No ensaio de robustez, como já destacado no início deste item, a LIS também não revelou alterações significativas ($p > 0,05$) frente às análises que alteravam simultaneamente a proporção da fase móvel para $\pm 2\%$, o fluxo para $\pm 0,1 \text{ mL min}^{-1}$ e tempo de extração da amostra para ± 5 minutos. Os efeitos podem ser observados no Diagrama de Pareto (Figura 35). Os teores, entre 98 e 102%, podem ser observados na Tabela 30. A simetria de pico observada nos cromatogramas manteve-se acima de 2,0 e os tempos de retenção variaram conforme o fluxo e proporção de solvente orgânico na fase móvel.

Figura 35: Efeitos não significativos na robustez da metodologia analítica por HPLC para LIS, com condições cromatográficas randomizadas.

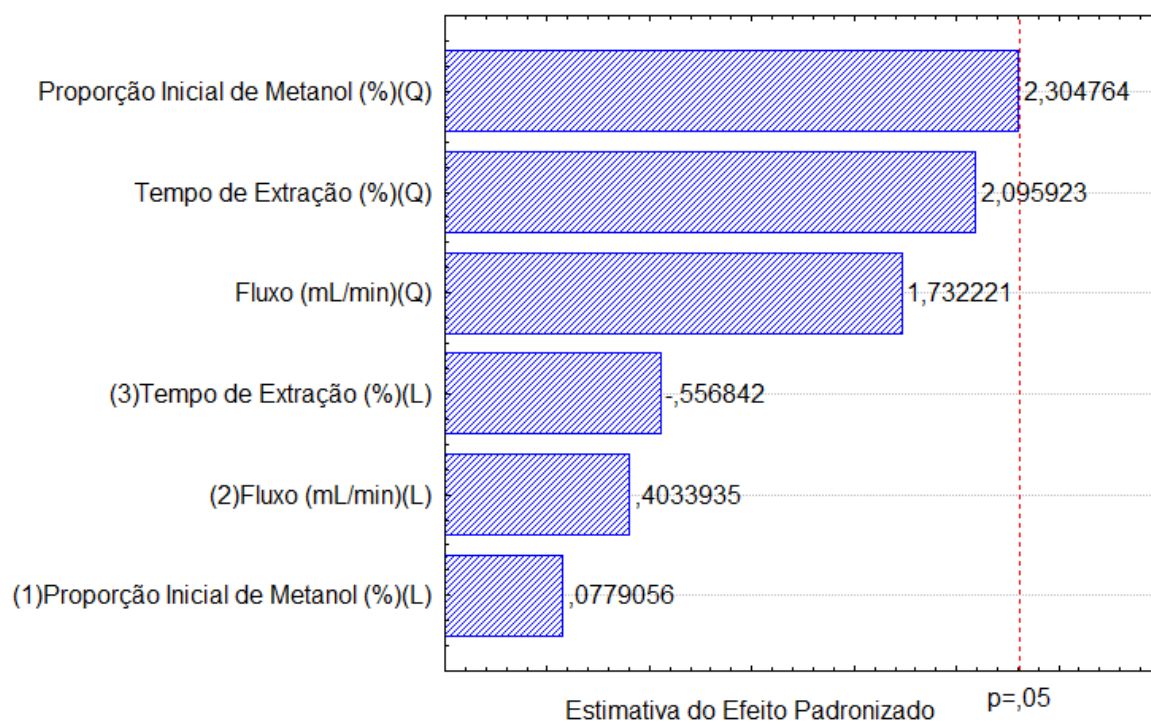


Tabela 30: Robustez da metodologia analítica por HPLC para LIS, com condições cromatográficas randomizadas.

Proporção Inicial de Metanol na Fase Móvel* (%)	Fluxo da Fase Móvel (mL min ⁻¹)	Tempo de Extração da Amostra (min)	Teor (%)
48	0,9	30	100,32
48	1,1	30	99,80
50	1,0	30	101,96
52	1,0	25	99,84
50	1,0	30	100,77
50	0,9	35	99,89
52	1,0	35	100,14
50	1,1	35	99,87
50	1,1	25	100,55
50	0,9	30	99,72
50	0,9	25	100,39
48	1,0	35	100,12
52	1,1	30	100,66
48	1,0	25	100,03
50	1,0	30	100,66

*As proporções também foram ajustadas para cada ponto do gradiente.

A amostra já diluída de LIS não apresenta estabilidade, com redução gradual da área do pico cromatográfico em análises sucessivas. Isto deve-se à interação da molécula ao reagente, e é justificável frente as condições já previstas e determinadas no desenvolvimento da metodologia (injeção da amostra em 1 minuto após a diluição).

6.6.3 Análise da Estabilidade da Formulação

Transcorrido o prazo de seis meses em que as formulações estiveram sob as condições determinadas para este estudo, procedeu-se com a avaliação do teor dos ativos nelas contidos. Como demonstrado na Tabela 31, foi possível constatar que tanto o penciclovir quanto a lisina permaneceram estáveis. Além disso, nem a cor e nem o odor das formulações mudaram ao longo desse período e possíveis produtos

de degradação não foram encontrados, reafirmando a qualidade e a segurança do produto produzido.

Tabela 31: Análise do teor de PVC e LIS em formulações sujeitas a condições de estabilidade acelerada.

Condições	Teor PCV \pm DPR (%)		Teor LIS \pm DPR (%)	
	Mês 0	Mês 6	Mês 0	Mês 6
5 \pm 2°C (60 \pm 5% UR)	100,24 \pm 0,55	98,60 \pm 0,39	99,76 \pm 0,37	97,91 \pm 1,01
25 \pm 2°C (60 \pm 5% UR)	100,24 \pm 0,55	98,53 \pm 0,50	99,76 \pm 0,37	98,69 \pm 0,94
40 \pm 2°C (75 \pm 5% UR)	100,24 \pm 0,55	97,84 \pm 1,08	99,76 \pm 0,37	97,72 \pm 1,21

*UR: Umidade Relativa; n=3.

6.7 Análise da Permeação dos Fármacos Presentes na Formulação

Neste ensaio de permeação de fármacos *in vitro* utilizou-se a pele do porco por ser considerado o melhor modelo, principalmente por possuir características histológicas e fisiológicas muito semelhantes à pele humana (PAGLIARA et al., 1999).

Apenas a metodologia desenvolvida e validada para o PCV pôde ser utilizada neste teste, isto porque a metodologia da LIS teve a sua seletividade comprometida em razão do processo de derivatização. Porém, a obtenção dos resultados apenas para o PCV já auxiliaria na compreensão da influência da presença da LIS na formulação, que deveria ser vista, principalmente, em função de sua atividade antiviral.

Os resultados do PCV no ensaio de permeação demonstraram baixa capacidade de permear a estrutura cutânea, uma vez que em 24 horas a formulação PCV-LIS havia permeado apenas 1,88 \pm 0,21% [12,14 ($\mu\text{g cm}^2$)⁻¹] e a formulação PCV apenas 1,02 \pm 0,12% [6,82 ($\mu\text{g cm}^2$)⁻¹] em relação à quantidade depositada no compartimento doador. A Tabela 32 demonstra os resultados que permitiram esta avaliação. Eles expressam apenas a coleta de 24 horas, já que as demais não apresentaram concentração suficiente para serem quantificadas.

Tabela 32: Resultados do PCV no ensaio de permeação *in vitro*.

Formulação PCV-LIS				
Número da Célula	1	2	3	Média
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,11	0,91	1,18	
PCV na amostra (g)	$1,32 \cdot 10^{-5}$	$1,06^{-5}$	$1,35^{-5}$	
PCV por área ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹	15,81	8,14	12,46	12,14 ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹
Teor (%)	2,00	1,64	2,02	1,88 \pm 0,21%
Formulação PCV				
Número da Célula	4	5	6	Média
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,55	0,63	0,70	
PCV na amostra (g)	$7,05 \cdot 10^{-6}$	$7,84^{-6}$	$9,08 \cdot 10^{-6}$	
PCV por área ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹	6,24	6,00	8,24	6,82 ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹
Teor (%)	0,89	1,05	1,13	1,02 \pm 0,12%

As duas formulações, apesar de se apresentarem diferentes estatisticamente, revelam baixo teor frente à permeabilidade, e este fato indica que a formulação desenvolvida nessa pesquisa contempla a ação proposta, uma terapia tópica de baixa ou nenhuma absorção sistêmica.

Os dados do ensaio de *Tape stripping* revelaram maiores concentrações de PCV retidas no estrato córneo quando comparados com a permeação do ativo, como pode ser observado na Tabela 33. O *Tape stripping* da formulação PCV-LIS demonstrou maior retenção do que a formulação contendo apenas PCV. Esse resultado não garante menor permeação da primeira fórmula frente à segunda, já que o resultado encontrado no teste anterior seria contrário a esta constatação, porém, ele nos auxilia a entender alguns aspectos da formulação e coloca em questões alguns fatores do ensaio, como o acúmulo de creme no estrato córneo em relação à espessura de creme aplicado.

Tabela 33: Resultados do PCV no ensaio de *Tape stripping*.

Formulação PCV-LIS				
Número da Célula	1	2	3	Média
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	55,50	50,66	44,19	
PCV por área ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹	66,65	38,78	40,77	48,73 ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹
% de PCV retido	6,27	5,82	5,04	5,71 \pm 0,62%
Formulação PCV				
Número da Célula	1	2	3	Média
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	35,17	36,53	33,15	
PCV por área ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹	31,11	27,96	30,07	29,71 ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹
% de PCV retido	3,47	3,76	3,22	3,49 \pm 0,27%

Atenção especial deve ser dada aos resultados do PCV no ensaio de retenção cutânea, já que neste teste avalia-se a quantidade de ativo no local em que fármaco deverá agir (derme e epiderme) (AKOMEAH et al., 2004). Observando a Tabela 34 é possível constatar que ambas as formulações apresentam maior porcentagem de teor retido ($4,47 \pm 0,61\%$ e $3,67 \pm 0,59\%$) quando se compara com os teores observados na permeação do fármaco em 24 horas de ensaio. Essa informação sugere que a formulação desenvolvida tem a capacidade de alcançar o seu local de ação e que isto colabora com a sua eficácia clínica, além de certificar mais uma vez a escolha dos excipientes que a integram.

Outro ponto importante a ser destacado é o fato de que as formulações apresentaram o mesmo comportamento neste teste (são estatisticamente iguais), o que leva a concluir, diante de bons resultados clínicos, que a LIS não tem ação meramente farmacotécnica no creme, auxiliando na permeação do penciclovir apenas, mas que tem ação antiviral e assim, atua como adjuvante ativo dessa fórmula inovadora.

Tabela 34: Resultados do PCV no ensaio de retenção cutânea.

Formulação PCV-LIS				
Número da Célula	1	2	3	Média
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	45,23	38,43	34,17	
PCV por área ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹	54,31	29,42	31,53	38,42 ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹
% de PCV retido	5,11	4,41	3,90	4,47 \pm 0,61%
Formulação PCV				
Número da Célula	1	2	3	Média
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	42,56	36,75	31,17	
PCV por área ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹	37,65	28,13	28,28	31,35 ($\mu\text{g cm}^2$) ⁻¹
% de PCV retido	4,20	3,78	3,03	3,67 \pm 0,59%

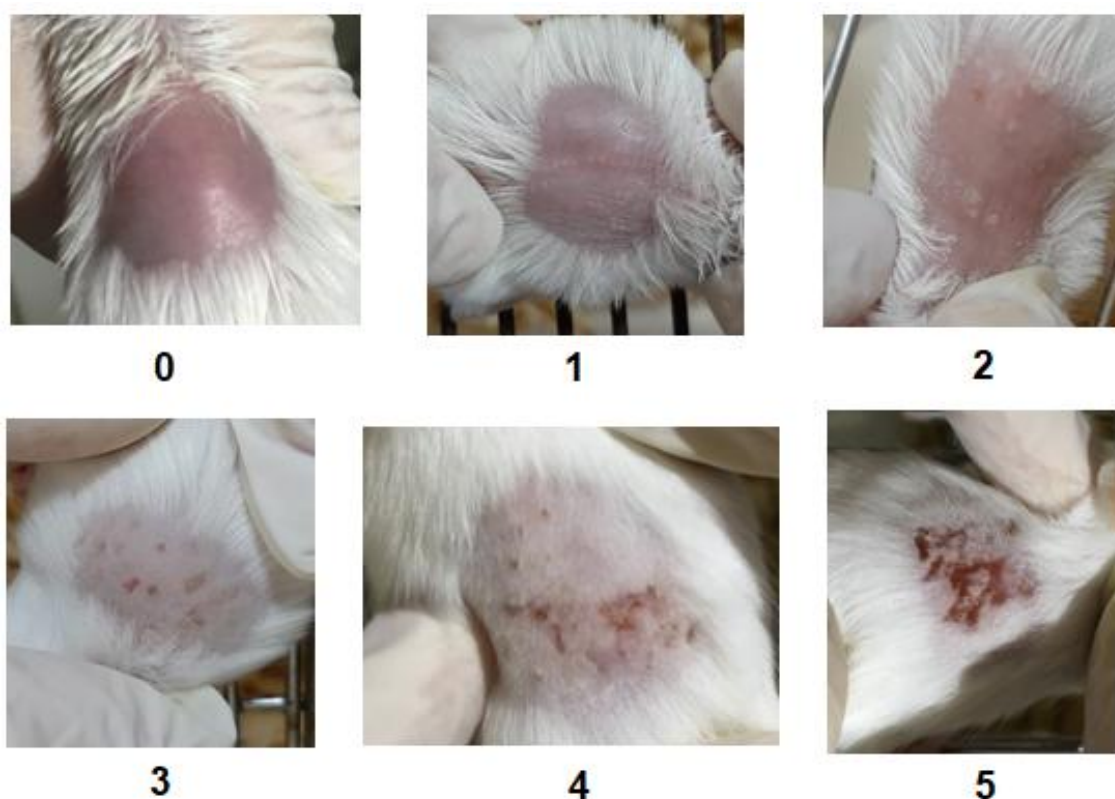
Por ser um estudo que necessita na maioria das vezes, apenas de resultados comparativos, os resultados da análise da permeação dos fármacos presentes na formulação colaboram muito com a elucidação de questões inerentes à fórmula (WESTER; MAIBACH, 1990).

6.8 Análise *in vivo* da Eficácia da Formulação em Modelo Animal

Através de ensaios de MTT, os compostos não demonstraram citotoxicidade nas concentrações que foram testadas *in vivo*.

A avaliação da evolução das lesões presentes nos animais seguiram o escore determinado por Cardozo et al. (2013). A Figura 36 é composta por imagens obtidas durante o experimento relatado neste tópico.

Figura 36: Lesões oriundas da infecção por HSV-1 e suas representações conforme o escore determinado por Cardozo et al. (2013).



No segundo dia de tratamento um animal pertencente ao grupo tratado com a formulação base (CV + formulação base) morreu. Ele tinha menor peso em relação aos demais. Vale ressaltar que não houve modificação relevante no peso dos animais entre o primeiro e o último dia de experimentação.

Os resultados encontrados nos 8 dias de tratamento evidenciaram que os animais tratados com a formulação idealizada neste trabalho (CV + Form. PCV-LIS) tiveram menor evolução em suas lesões frente aos demais tratamentos, equiparando-se ao grupo controle negativo (Apenas escarificado) já no terceiro dia do tratamento (círculo vermelho na Figura 37). Essa evidência e as pontuadas adiante podem ser melhor visualizadas na Figura 37, com o auxílio da Tabela 35.

Figura 37: Análise das lesões por dia de tratamento e por grupo tratado.

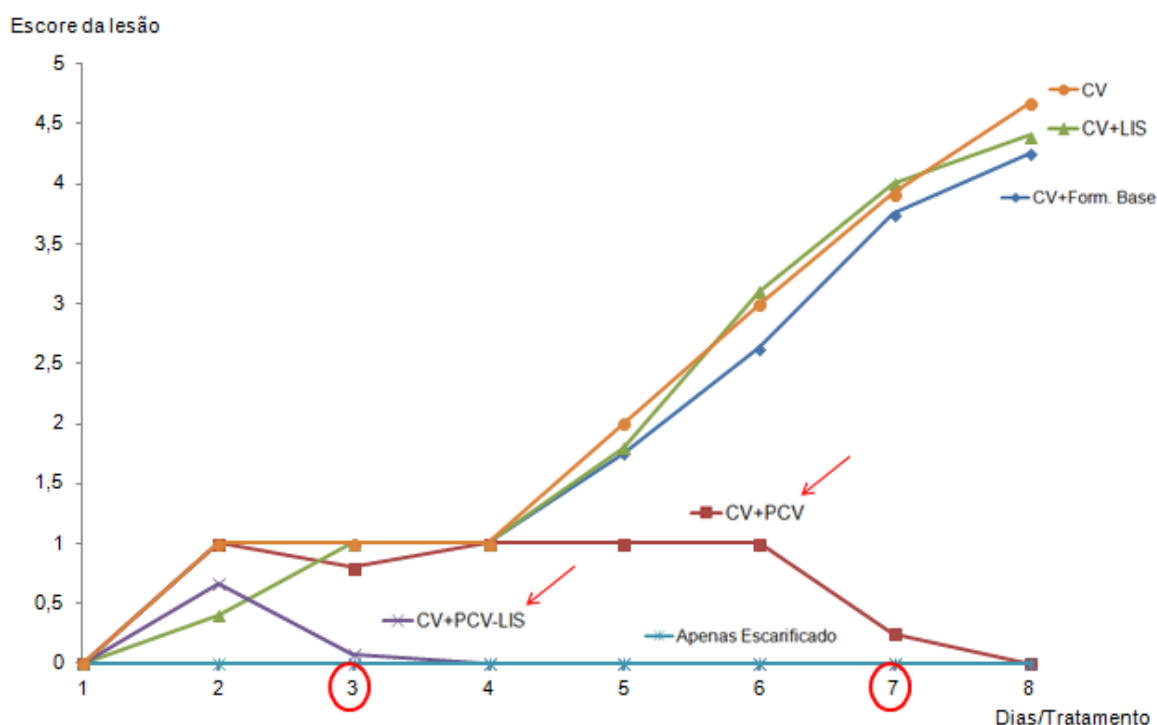


Tabela 35: Avaliação estatística (Tukey) da evolução das lesões nos grupos.

Grupos	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia	8º dia
Apenas escarificado	a	a	a	a	a	a	a
CV	b	b	b	b	b	b	b
CV + Form. Base	b	b	b	b	b	b	b
CV + Form. PCV	b	b	b	c	b	a	a
CV + Form. LIS	a,b	b	b	b	b	b	b
CV + Form. PCV-LIS	b	a	a	a	a	a	a

*Letras iguais correspondem à médias dos escores iguais.

O grupo tratado com a formulação contendo PCV (CV + Form. PCV), por sua vez, equiparou-se ao grupo controle negativo apenas no sétimo dia (círculo vermelho na Figura 37).

Os grupos citados nos dois parágrafos acima estão em destaque (setas vermelhas) na Figura 37 em razão de declararmos, frente à esses resultados, que o creme que contém os fármacos associados apresenta ação 50% mais rápida quando comparado com o creme constituído apenas do análogo de nucleosídeo. Essa importante constatação valida os ensaios *in vitro*, neste trabalho

demonstrados, provando haver ação sinérgica do PCV e da LIS, e ainda converge com o objetivo principal do estudo, que é o desenvolvimento de uma formulação que os associe, de forma a trazer melhores resultados clínicos para pacientes com lesões oriundas do vírus da herpes.

Como pode ser visualizado na Tabela 35, os animais tratados com a formulação composta pela LIS, grupo CV + Form. LIS, demonstraram resultados semelhantes ao do animal não tratado (CV, controle positivo) ou tratado apenas com a formulação base (CV + Form. Base). Os ensaios *in vitro* também realizados pelo grupo de trabalho, apresentaram dados afins, uma vez que na triagem por MTT da LIS sem associação ao PCV não foi possível obter o IC50. O ensaio *in vitro* profilático é que permitiu a obtenção desta informação.

Sugere-se, a partir destas constatações, que o efeito sinérgico de PCV-LIS, agora observado no grupo tratado com a formulação que contém os fármacos em associação, apresente ação direta do PCV na replicação viral e indireta da LIS, no antagonismo à arginina, aminoácido importante na replicação viral. Outras ações da LIS, como a interferência na regulação da atividade bioquímica de proteínas celulares, podem também apresentar interferência, porém eles não foram investigados neste trabalho (LOBODA et al., 2019).

Como o tempo e o investimento para o desenvolvimento de novas moléculas com ação antiviral são demasiados, resultados como esses revelam a importância de formulações contendo produtos combinados e já em uso, visto que o produto final passa a ser aperfeiçoado e a sua relação custo-benefício torna-se otimizada (KAVANAGH et al., 2018; NOSENGO, 2016).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos do esperado efeito sinérgico *in vitro* que o penciclovir e a lisina desempenham sobre a inibição da atividade viral do HSV-1 apresentaram resultados positivos que direcionaram a pesquisa para o desenvolvimento de uma formulação que os contenham em associação.

Diante dos problemas que o penciclovir apresenta frente à sua biodisponibilidade e avaliando as vantagens da terapia tópica em relação à administração oral desses fármacos é que o creme foi a fórmula escolhida para carrear esses agentes antivirais.

Escolher adequadamente os excipientes que fariam parte dessa formulação, por meio da caracterização do estado sólido da matéria-prima e do estudo de compatibilidade, foi uma etapa importante no que se refere a qualidade do produto final, tanto quanto a sua estabilidade, bem como para com a sua segurança e eficácia, consequentes a esse primeiro parâmetro.

Para confirmar quão estável é o produto formulado, além de ensaios já inerentes ao desenvolvimento da formulação, como perfil reológico, pH, espalhabilidade e análise microbiológica, o estudo de estabilidade acelerado possibilitou a comprovação dessa questão. Para que essa análise pudesse ter sido realizada, metodologias analíticas por HPLC foram desenvolvidas e validadas com sucesso. Estas metodologias também auxiliaram na determinação da do penciclovir *in vitro*, utilizando Célula de Franz, permitindo que fosse possível prever que a permeação do penciclovir é independente da presença da lisina, realçando a sua ação antiviral junto dele, e não apenas farmacotécnica.

A experimentação em modelo animal, por fim, validou todos os demais experimentos e convergiu com a ideia proposta nesta pesquisa, uma vez que o creme que apresentava a associação entre os ativos revelou envolver a lesão originada pelo HSV-1 em menor tempo do que as demais formulações testadas, incluindo as que os apresentava de forma isolada, contribuindo com um tratamento mais rápido bem como com a possibilidade profilática.

A formulação idealizada e desenvolvida: um creme contendo penciclovir em associação com a lisina é uma nova estratégia no tratamento das lesões ocasionadas pelo vírus da herpes. Trata-se ainda de uma inovação incremental com

ensaios que embasam a sua inclusão no mercado farmacêutico e a sua utilização clínica.

Apostar na estratégia do refinamento de ativos já conhecidos e utilizados, seja em suas moléculas ou frente às formulações já comercializadas, faz-se importante em meio às dificuldades encontradas em relação ao investimento alto e ao tempo acerca de todo o processo de descoberta frente a uma molécula inovadora.

Esse trabalho contribuiu e vem contribuindo com a formação científica e acadêmica de alunos de graduação e também de pós-graduação por meio da execução prática das técnicas/procedimentos e estudos de fundamentação teórica.

A patente referente à formulação desenvolvida foi depositada e apresenta o seguinte Número do Processo: BR 10 2020 014414 6 (ANEXO 2). Um artigo referente ao estudo de compatibilidade entre fármacos e excipientes intitulado: “Solid-State Characterization and Compatibility Studies of Penciclovir, Lysine Hydrochloride, and Pharmaceutical Excipients”, foi publicado na revista *Materials* (ANEXO 3).

As perspectivas diante do trabalho exposto concentram-se na publicação de mais um artigo na *International Journal of Pharmaceutics*, e também no aceite da patente depositada, a fim de que possa haver inserção desta inovação no mercado farmacêutico.

8 SÍNTESE DE DERIVADO DE FULERENO COM ATIVIDADE ANTIVIRAL

Diante da pesquisa em relação a agentes antivirais, clássicos ou não, a atividade antiviral do fulereno (C_{60}), um dos importantes alótropos do carbono, desperta interesse.

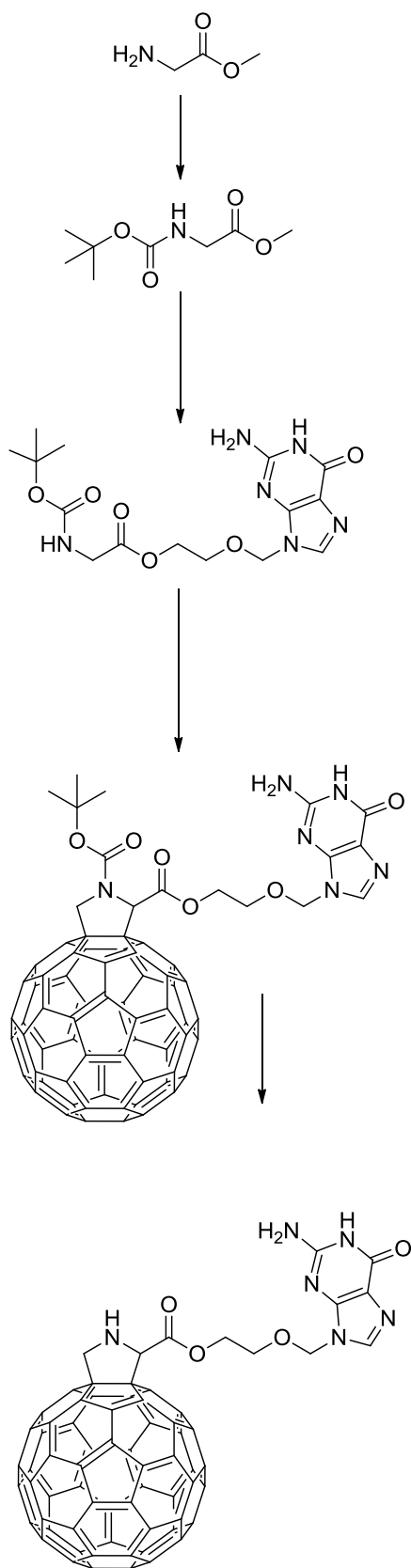
Diversos autores destacam a atividade anti-HSV de compostos à base de fulereno, inclusive conjugados a aminoácidos. Alguns deles trabalham ainda na melhoria de alguns parâmetros, como de sua solubilidade, para que essa ação possa ser eficiente (FEDOROVA et al., 2012; LIALINA; NOSIK; KONDRASHINA, 2016; ZARUBAEV et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa idealizou então, a síntese de um composto conjugando fulereno, aciclovir e glicina. Para tanto, buscamos colaboração com outro grupo de pesquisa, na Univesidade Federal de Santa Maria (UFSM).

A princípio, planejamos iniciar a síntese protegendo o grupamento amina do aminoácido com o grupo protetor Boc. Uma vez protegido, o conjugado passaria por uma reação para que o aciclovir pudesse ser incorporado. Com aciclovir associado à glicina, iniciariamos a reação de conjugação deles ao fulereno. E então, um processo marcaria o desprotegimento do grupamento inicial. A Figura 38 esquematiza os passos planejados para a síntese do composto, que caso tivesse sido alcançado, teria a sua atividade antiviral *in vitro* avaliada.


Cada reação, evidenciando o produto final, exige tempo, inúmeros reagentes e instrumentação adequada. Infelizmente, não havia disponibilidade de maior permanência na localidade, nem instrumentação e reagentes para que a continuidade fosse dada na UNICENTRO. O grupo colaborador comprometeu-se com a sequência de novos testes, mas não houve êxito nessa colaboração.

Figura 38: Etapas na síntese do composto que conjuga fulereno, aciclovir e lisina.



ANEXOS

Anexo 1

 UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 91/2019 Londrina, 12 de julho de 2019.

Prezado (a) professor (a),

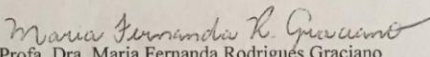
Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "**Desenvolvimento e avaliação da ação de formulações contendo aciclovir e penciclovir em associação à lisina contra herpesvírus, *in vivo***" protocolo CEUA nº 10752.2019.81 sob a responsabilidade de **Ligia Carla Faccin Galhardi**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **12/07/2019**.

Este projeto tem por objetivo avaliar o efeito antiviral, *in vivo*, de formulações farmacêuticas contendo aciclovir associado à lisina e penciclovir associado à lisina na replicação do vírus herpes simplex (HSV). Grau de invasividade: 3.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	10/08/2019 a 10/08/2020
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogênico BALB/c
Nº de animais	68
Peso/ Idade	14-20 g (20-25 dias)
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá
Amostras a serem coletadas	-

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,


Prof. Dr. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). **Ligia Carla Faccin Galhardi**
Responsável pelo projeto
Departamento de Microbiologia/CCB
C/C para a Chefia do Depto. de Microbiologia/CCB
C/C para a Direção de Centro do CCB

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

Anexo 2



15/07/2020 870200087887
11:40
29409161916135055

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 014414 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 77902914000172

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Pres. Zacarias, 875, Bairro Santa Cruz

Cidade: Guarapuava

Estado: PR

CEP: 85010-990

País: Brasil

Telefone: (42) 36243328

Fax: (42) 3629 8144

Email: claudia@unicentro.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 15/07/2020 às 11:40, Petição 870200087887

Anexo 3



Article

Solid-State Characterization and Compatibility Studies of Penciclovir, Lysine Hydrochloride, and Pharmaceutical Excipients

Rafaela Z. C. Meira ¹, Isabela F. B. Biscaia ¹ , Camila Nogueira ¹, Fabio S. Murakami ², Larissa S. Bernardi ¹ and Paulo R. Oliveira ^{1,*} 

¹ Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmacy, Universidade Estadual do Centro-Oeste/UNICENTRO, Guarapuava, PR 85040-080, Brazil

² Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, Curitiba, PR 80210-170, Brazil

* Correspondence: proliveira@unicentro.br

Received: 20 August 2019; Accepted: 24 September 2019; Published: 27 September 2019



Abstract: The physical and chemical characterization of the solid-state properties of drugs and excipients is fundamental for planning new formulations and developing new strategies for the treatment of diseases. Techniques such as differential scanning calorimetry, thermogravimetry, X-ray powder diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy are among the most commonly used techniques for these purposes. Penciclovir and lysine are individually used to treat the herpes virus. As such, the development of a formulation containing both drugs may have therapeutic potential. Solid-state characterization showed that both penciclovir and lysine were crystalline materials with melting points at 278.27 °C and 260.91 °C, respectively. Compatibility studies of penciclovir and lysine indicated a possible interaction between these substances, as evidenced by a single melting point at 253.10 °C. The compatibility of several excipients, including ethylenediaminetetraacetic acid, cetostearyl alcohol, sodium lauryl sulphate, di-tert-butyl methyl phenol, liquid petrolatum, methylparaben, nonionic wax, paraffin, propylene glycol, and propylparaben, was evaluated in ternary (penciclovir-lysine-excipient) mixtures (1:1:1, w/w/w) to determine the optimal formulation. The developed formulation was stable under accelerated and ambient conditions, which demonstrated that the interaction between penciclovir and lysine was suitable for the development of a formulation containing both drugs.

Keywords: penciclovir; lysine; compatibility; characterization; excipients; differential scanning calorimetry; thermogravimetry

REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; BARRY, B. W.; WILLIAMS, A. C.; DAVIS, A. F. Penciclovir Solubility in Eudragit Films: A Comparison of X-ray, Thermal, Microscopic and Release Rate Techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 5, p. 945–956, 2004.
- AKIMSHEVA, E. Y.; DOLININA, E. S.; PARFENYUK, E. V. Interactions of Sol-Gel Encapsulated Acyclovir with Silica Matrix. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 178, n. February, p. 103–110, 2019.
- AKOMEAH, F.; NAZIR, T; MARTIN, G. P. BROWN, M. B. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. **Eur. J. Pharm Sci**, v. 21, p. 337-345, 2004.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Oral and Perioral Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Infection: Review of its Management. **Oral Diseases**, v. 12, n. 3, p. 254–270, 2006.
- AULTON, M. E. **Aulton - Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2^a ed. São Paulo, SP: Artmed, 2005.
- AULTON, M. E. **Aulton - Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4^a ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2016.
- AYDIN, M., KARTAL, Z., OSMANOGLU, S., HALIM, B. M., TOPKAYA, R. EPR and FT-IR Spectroscopic Studies of L-Lysine Monohydrochloride and L-Glutamic Acid Hydrochloride Powders. **Journal of Molecular Structure**, v. 994, n. 1–3, p. 150–154, 2011.
- BARBOSA, L. C. DE A. **Infrared Spectroscopy in the Characterization of Organic Compounds**. Viçosa, MG, Brazil: UFV, 2007.
- BATISTA, J. C. **Study of the Vibrational and Structural Properties of Crystals L-Lysine Dihydrate Monohydrochloride and DL-Lysine Monohydrochloride**. Federal University of Ceara, 2016.
- BATISTA, R. S. DE A. **Development of Analytical Methodology for Analysis of Thermal Stability of Formulation Retinoic Acid Cream**. State University of Paraíba, 2015.
- BELTRAMI, M. C.; BASSO, R.; SILVA, SEGATTO.; CARDOSO, S.; STULZER, H, K. Acelerated Stability Study Os Manipulated Emulsions With Antiviral Aciclovir. **Visão Acadêmica Curitiba**, v. 9, n. 2, 2018.
- BERNARDI, L. S.; OLIVEIRA, P. R.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S.;

BORGMANN, S. H. M.; CARDOSO, S. G. Characterization of Venlafaxine Hydrochloride and Compatibility Studies with Pharmaceutical Excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 729–733, 2009.

BLESSY, M.; PATEL, RUCHI D.; PRAJAPATI, P. N.; AGRAWAL, Y. K. Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs - A Review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.

BOON, R. et al. BOOM, R.; GOODMAN, J. J.; MARTINEZ, J.; MARKS, G. L.; GAMBLE, M.; WELCH, C. Penciclovir Cream for the Treatment of Herpes Simplex Labialis. A Randomized, Multicenter, Double-blind, placebo-controlled trial. Topical Penciclovir Collaborative Study Group. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 76–90, 2000.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e Avaliação da Estabilidade Física de Loções O/A Contendo Filtros Solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 4, p. 531–537, 2006.

BOYD, J.; PARKINSON, C.; SHERMAN, P. Factors Affecting Emulsion Stability, and the HLB Concept. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 41, n. 2, p. 359–370, 1972.

BRASIL. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2010. 546 p.

BRASIL. ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 6ª ed. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2019. 443-448 p.

BRASIL. ANVISA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. 1, 2004.

BRASIL. ANVISA. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2005.

BRASIL. ANVISA. RDC nº 53, de 4 de Dezembro de 2015 - Guia para a Notificação, Identificação e Qualificação de Produtos de Degradação em Medicamentos com Substâncias Ativas Sintéticas e Semissintéticas, Classificados como Novos, Genéricos e Similares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2015.

BRASIL. ANVISA. RDC nº. 166, de 25 de Julho de 2017 - Guia para Validação de Métodos Analíticos e outras Providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2017.

BRASIL. ANVISA. RDC nº. 318, de 06 de Novembro de 2019 - Estabelece os critérios para a realização de Estudos de Estabilidade de insumos farmacêuticos

ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 2019.

BRASIL. **Lista de Medicamentos Referência - ANVISA**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/medicamentos/produtos/medicamentos-de-referencia/lista>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

BRUNI, G., BRUNI, G., BERBENNI, V., MILANESE, C., GIRELLA, A., MARINI, A. Drug-Excipient Compatibility Studies in Binary and Ternary Mixtures by Physico-Chemical Techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 193–201, 2010.

CAPANEMA, L. X. L. A Indústria Farmacêutica Brasileira e a Atuação do BNDES. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.23, 2006. p. 193-216.

CARDOZO, F. T.; LARSEN, I. V.; CARBALLO, E. V.; JOSE, G.; STERN, R. A.; BRUMMEL, R. C.; CAMELINI, C. M.; ROSSI, M. J.; SIMÕES, C. M.; 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, p. 2541-2549, 2013.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening — Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 82–97, 2014.

CHONG, D. Y., JOHNSON, M. W., HUYNTH, T. H., HALL, E. F., COMER, G. M., FISH, D. N. Vitreous Penetration of Orally Administered Famciclovir. **American Journal de Ophthamology**, v. 148, n. 1, p. 38–42, 2009. CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: O camundongo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 1(28), 11-23, 2007.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: O camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 1(28), 11-23, 2007.

CIOLA, R. **Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. São Paulo, SP: Edgard Blucher, 1998.

CLEMENS, C.; ANN, S. Soroprevalência de Anticorpos Contra Vírus Herpes Simples 1-2 no Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726–734, 2010.

COSTA, J. S.; VIÇOSA, A. L.; OLIVEIRA, D. L.; MATOS, A. P. S.; HOLANDINO, C.; BONIATTI, J.; PITALUGA, A.; SEICEIRA, R. C. Compatibility study between diazepam and tablet excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.

127, n. 2, p. 1675–1682, 2016.

CUMSTON, C. G. The History of Herpes from the Earliest Times to the Nineteenth Century. **Ann Med Hist**, v. 8, p. 284–291, 1926.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDÍN, M. Compatibility of the antitumoral β -lapachone with different solid dosage forms excipients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 4, p. 590–598, 2007.

DAO, Y. JUN; JIAO, Z.; ZHONG, M. KANG. Simultaneous Determination of Aciclovir, Ganciclovir, and Penciclovir in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Journal of Chromatography B**, v. 867, n. 2, p. 270–276, 2008.

DE CLERCQ, E. Antiviral Drugs in Current Clinical Use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 2, p. 115–133, 2004a.

DE CLERCQ, E. Antivirals and Antiviral Strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 704–720, 2004b.

DE CLERCQ, E.; HERDEWIJN, P. Strategies in the Design of Antiviral Drugs. **Nature Reviews**, v. 1, n. January, p. 13–25, 2002.

DERKACH, S. R. Rheology of Emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 151, n. 0, p. 1–23, 2009.

DERRY, S.; WIFFEN, P. J.; IRESON-PAINE, J.; STRAUBE, S.; MOORE, A. R. Faster, Higher, Stronger? Evidence for Formulation and Efficacy for Ibuprofen in Acute Pain. **Pain**, v. 155, n. 1, p. 14–21, 2013.

DINIZ, R. S.; LAGO, A. D. N.; GONÇALVES, L. M.; FERREIRA, O. C.; FURTADO, G. S. Resolution of herpes simplex in the nose wing region using photodynamic therapy and photobiomodulation. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 237–239, 2018.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, p. 223–229, 2015.

DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R. **Method Development in Liquid Chromatography**. 2^a ed. Atlanta, GA: Elsevier, 2017. v. 1

DUARTE, L.; JUCHEM, P.; PULZ, G.; BRUM, T.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISCHER, A.; ACAUAN, R. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: Exemplos Brasileiros. **Pesquisas em Geociências**, v. 30, p. 3–15, 2003.

DULBECCO, R. Virus, Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single

Particles of an Animal. v. 38, p. 747–752, 1952.

EL-GAMEL, N. E. A.; HAWASH, M. F.; FAHMEY, M. A. Structure characterization and spectroscopic investigation of ciprofloxacin drug. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 108, n. 1, p. 253–262, 2012.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: Critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**, 1(19), 59-65, 2004.

FARJAMI, T.; ASHKAN, M. An Overview on Preparation of Emulsion-filled Gels and Emulsion Particulategels. **Trends in Food Science & Technology**, v. 86, p. 85–94, 2019.

FDA. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. **Guidance for Industry**, p. 15, 2015.

FEDOROVA, N. E., KLIMOVA, R. R., TULENEV, Y. A., CHICHEV, E. V., KORNEV, A. B., TROSHIN, T. A., KUSHCH, A. A. Carboxylic Fullerene C60 Derivatives: Efficient Microbicides Against Herpes Simplex Virus and Cytomegalovirus Infections in vitro. **Mendeleev Communications**, v. 22, n. 5, p. 254–256, 2012.

FERREIRA, A. O.; BRANDÃO, M. F.; SILVA, M. A. D. C. G. **Guia Prático para Farmácia de Manipulação**. 2ª ed. ed. Juiz de Fora, MG, Brasil: Ortofarma, 2002.

FERREIRA, S.L.C., BRUNS, R.E., SILVA, E.G.P., SANTOS, W.N.L., QUINTELLA, C.M., DAVID, J.M., ANDRADE, J.B., BREITKRETZ, M.C., JARDIM, I.C.S.F., NETO, B.B. Statistical Designs and Response Surface Techniques for the Optimization of Chromatographic Systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2–14, 2007.

FLODIN, N. W. The Metabolic Roles, Pharmacology, and Toxicology of Lysine. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 7–21, 1997.

FORD, J. L.; TIMMINS, P. **Pharmaceutical Thermal Analysis**. Chichester, England: Ellis Horwood Limited, 1989.

FRAJBLAT, M.; AMARAL, V.L.L.; RIVERA, E.A.B. Ciência em animais de laboratório. **Cienc. Cult.**, São Paulo, 2(60), 44-46, 2008.

FRANZ, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190–195, 1975.

GABY, A. R. Natural Remedies for Herpes Simplex. **Alternative Medicine Review**, v. 11, n. 2, p. 93–101, 2006.

GALMIER, M. J.; BOUCHON, B.; MADELMONT, J. C.; MERCIER, F.; PILOTAZ, F.; LARTIGUE, C. Identification of Degradation Products of Diclofenac by Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical**

Analysis, v. 38, n. 4, p. 790–796, 2005.

GAO, R.; SUN, B. W.; LIN, J.; GAO, X. L. Compatibility of medroxyprogesterone acetate and pharmaceutical excipients through thermal and spectroscopy techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 117, n. 2, p. 731–739, 2014.

GARCÍA-SERRADILHA, M.; RISCO, C.; PACHECO, B. Drug Repurposing for New, Efficient, Broad Spectrum Antivirals. **Virus Research**, v. 264, p. 22–31, 2019.

GAROUFIS, A., KARIDINI, K., HADJILADIS, N., KASSELOURI S., KOBE, J. Synthesis, Characterization and Antiviral Properties of Pd(II) Complexes with Penciclovir. **Metal-Based Drugs**, v. 8, n. 1, p. 57–63, 2001.

GELBRICH, T., BRAUN, D. E., ELLERN, A., GRIESSER, U. J. Four Polymorphs of Methylparaben: Structural Relationships and Relative Energy Differences. **Crystal Growth and Design**, v. 13, n. 3, p. 1206–1217, 2013.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 1. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 191–199, 1998.

GIRON, D. Applications of Thermal Analysis and Coupled Techniques in Pharmaceutical Industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 335–357, 2002.

GOLDENTHAL, E.I.; *Toxicology and Applied Pharmacology*, 18, 185-207, 1971.

GOMES, E. C. DE L., CARVALHO, I. E., FIALHO, S. L., BARBOSA, J., YOSHIDA, M. I. CUNHA JÚNIOR, A. S. Mixing Method Influence on Compatibility and Polymorphism Studies by DSC and Statistical Analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 131, n. 3, p. 2123–2128, 2018.

GONSHO, A.; IMANIDIS, G.; VOGT, P.; KERN, E. R.; TSUGE, H.; SU, M. H.; CHOI, S. H.; HIGUCHI, W. I. Controlled (trans) Dermal Delivery of an Antiviral Agent (acyclovir). I: An in vivo Animal Model for Efficacy Evaluation in Cutaneous HSV-1 Infections. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 65, n. 3, p. 183-194, 1990.

GONG, Y., RAJ, K. M., LUSCOMBE, C. A., GADAWSKI, I., TAM, T., CHU, J., GIBSON, D., CARLSON, R., SACKS, S. L. The Synergistic Effects of Betulin with Acyclovir Against Herpes Simplex Viruses. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 127–130, 2004.

GONZALEZ, M. M.; CABRERIZO, F. M.; BAIKER, A.; ERRA-BALSELLS, R.; OSTERMAN, A.; NITSCHKO, H.; VIZOSO-PINTO, M. G. β -Carboline Derivatives as

Novel Antivirals for Herpes Simplex Virus. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 4, p. 459–468, 2018.

GORE, E.; PICARD, C.; SAVARY, G. Spreading Behavior of Cosmetic Emulsions: Impact of the Oil Phase. **Biotribology**, v. 16, p. 17–24, 2018.

GOTTILIEB, S. L.; GIERSING, B. K.; HICKLING, J.; JONESM R.; DEAL, C.; KASLOW, D. C. Meeting report: Initial World Health Organization consultation on herpes simplex virus (HSV) vaccine preferred product characteristics, March 2017. **Vaccine**, n. March, 2018.

GRIFFITH, R. S.; DELONG, D. C.; NELSON, J. D. **Relation of Arginine-Lysine Antagonism to Herpes Simplex Growth in Tissue Culture Chemotherapy**, 1981.

GRIFFITH, R. S.; NORINS, A. L.; KAGAN, C. A Multicentered Study of Lysine Therapy in Herpes Simplex Infection. **Dermatologica**, v. 156, p. 257–267, 1978.

HAIK, J.; WEISSMAN, O.; STAVROU, D. Is Prophylactic Acyclovir Treatment Warranted for Prevention of Herpes Simplex Virus Infections in Facial Burns? A Review of the Literature. **Journal of Burn Care & Research**, v. 32 (3), p. 358–362, 2011.

HALEEM, R. M.; SALEM, M. Y.; FATAHALLAH, F. A.; ABDELFATTAH, L. E. Quality in the Pharmaceutical Industry - A Literature Review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 5, p. 463–469, 2015.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. **Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants**. Washington, DC: American Chemical Society, 1995.

HARDEN, M. R., JARVEST, R. L., SLAWIN A. M. Z., WILLIAMS, D. J. Crystal and Molecular Structures of the Antiviral Acyclonucleoside 9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)butyl]guanine (brl 39123, Penciclovir) and its Prodrug 9-[4-acetoxy-3-(acetoxymethyl)butyl]-2-aminopurine (brl 42810, Famciclovir). **Nucleosides and Nucleotides**, v. 9, n. 4, p. 499–513, 1990.

HAYAT, A., JAHANGIR, T. M., KHUHAWAR, M. Y., ALAMGIR, M., SIDDIQUI, A. J., MUSHARRAF, S. G. Simultaneous HPLC Determination of Gamma Amino Butyric Acid (GABA) and Lysine in Selected Pakistani Rice Varieties by Pre-Column Derivatization with 2-Hydroxynaphthaldehyde. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 2, p. 356–360, 2014.

HODGE, R. A. V. Famciclovir and Penciclovir. The Mode of Action of Famciclovir Including Its Conversion to Penciclovir. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 4, n. 2, p. 67–84, 1993.

- HORWITZ, E.; PISANTY, S.; CZERNINSKI, R.; HEISER, M.; ELIAY, E.; TOUITOU, E. A clinical Evaluation of a Novel Liposomal Carrier for Acyclovir in the Topical Treatment of Recurrent Herpes Labialis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 87, n. 6, p. 700–705, 1999.
- HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of New Antiviral Agents: I. In vitro Perspectives. **Antiviral Research**, v. 11, n. 5–6, p. 217–232, 1989.
- ICH. Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1A (R2). **Harmonised Tripartite Guideline**, v. 4, 2003.
- ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). **Harmonised Tripartite Guideline**, v. 4, p. 13, 2005.
- ICH. Impurities in New Drug Substances Q3A (R2). **Harmonised Tripartite Guideline**, v. 4, p. 15, 2006.
- ICI AMERICAS INC. **The HLB System**. New Jersey, USA: ICI Americas Inc., 1980.
- IONASHIRO, M. **Giolito - Fundamentals of Thermogravimetry, Differential Thermal Analysis and Differential Exploratory Calorimetry**. São Paulo, SP: Giz Editorial, 2004.
- ISAAC, V. L. B., CEFALI, L. C., CHIARI, B. G., OLIVEIRA, C. C. L. G., SALGADO, H. R. N., CORRÊA, M. A. Protocolo para Ensaio Físico-Químicos de Estabilidade de Fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.
- JIANG, Y. C.; FENG, H.; LIN, Y. C.; GUO, X. R. New Strategies Against Drug Resistance to Herpes Simplex Virus. **International Journal of Oral Science**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2016.
- JONES, P. S. Strategies for Antiviral Drug Discovery. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 9, n. 4, p. 283–302, 1998.
- JUAREZ, D.; LONG, K. C.; AGUILAR, P.; KOCHER, T. J.; HALSEY, E. S. Assessment of Plaque Assay Methods for Alphaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 187, n. 1, p. 185–189, 2013.
- KAGAN, C. Lysine Therapy for Herpes Simplex. **Lancet**, v. 1, p. 137, 1974.
- KARAGEORGOU, E.; SAMANIDOU, V. Youden Test Application in Robustness Assays During Method Validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 131–139, 2014.
- KARANDE, P.; MITRAGOTRI, S. Enhancement of Transdermal Drug delivery via Synergistic Action of Chemicals. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**,

v. 1788, n. 11, p. 2362–2373, 2009.

KARADZOVSKA, D.; BROOKS, J. D.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; RIVIERE, J. E. Predicting skin Permeability from Complex Vehicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 265–277, 2013.

KASTEN, G., NOURI, K., RADES, T., LOBMANN, K. Performance Comparison Between Crystalline and Co-Amorphous Salts of Indomethacin-Lysine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 533, n. 1, p. 138–144, 2017.

KAVANAGH, O. N.; ALBADARIN, A. B.; CROKER, D. M.; HEALY, A. M.; WALKER, G. M. Maximising Success in Multidrug Formulation Development: A Review. **Journal of Controlled Release**, v. 283, p. 1–19, 2018.

KIM, Y.-W.; KIM, T.-S.; KIM, D.-K.; MIN, D.-S.; HWANG, Y.-Y.; CHOI, W.-S.; UM, K. A.; CHANG, K.; CHO, Y.-B.; KIM, K. H.; IM, G.-J.; JUNG, I.; KIM, J.-S.; LEE, N. Synthesis and Evaluation of 2-Amino-9-(3-hydroxymethyl-4-alkoxycarbonyloxybut-1-yl)purines as Potential Prodrugs of Penciclovir. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1715–1725, 1999.

KINCHINGTON, D.; SCHINASI, R. F. **Antivirals Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2000.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B. **Fields Virology**. 5^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

KRAWCZYK, A.; STICH, L.; AUFDERHORST, U.; HEILINGLOH, C. S.; DRANER, C.; ZINSER, E.; STEINKASSERER, A.; ZAJA, M.; MUHLS-ZURBES, P. A New Promising Candidate to Overcome Drug Resistant Herpes Simplex Virus Infections. **Antiviral Research**, v. 149, p. 202–210, 2017.

KUMAR, M. N., REDDY, V. K., SHARMA, H. K., MASTANAIAH, T. Simple and Reliable Stability Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Assay of Famciclovir in Famciclovir Drug Substance. **Pelagia Research Library**, v. 3, n. 2, p. 450–457, 2012.

KUMAR, S. P.; CHANDYM M. L.; SHANAVAS, M.; KHAN, S.; SURESH, K. V. Pathogenesis and Life Cycle of Herpes Simplex Virus Infection-Stages of Primary, Latency and Recurrence. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v. 28, n. 4, p. 350–353, 2016.

LEE, H. W.; SEO, J. H.; LEE, K. T. Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the

Determination of Penciclovir in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. **Journal of Chromatography B**, v. 852, n. 1–2, p. 382–388, 2007.

LEE, S. M., LIU, K. H., LIU, Y. Y., CHANG, Y. P., LIN, C. C., CHEN, Y. S. Chitosonic® Acid as a Novel Cosmetic Ingredient: Evaluation of its Antimicrobial, Antioxidant and Hydration Activities. **Materials**, v. 6, n. 4, p. 1391–1402, 2013.

LIALINA, I.; NOSIK, N. N.; KONDRASHINA, N. G. Antiherpetic Activity of Two Fullerene Derivates in vitro and in vivo. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 53S, p. 82, 2016.

LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. 88. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2007.

LIMAM, I.; MEDIMAGH, R.; HELLAL, F. Determination of Amino Acids in Tunisian Animal Feedstuffs by HPLC-FLD. **Eurasian Journal of Analytical Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 211–224, 2016.

LIN, P.; TORRES, G.; TYRING, S. K. Changing Paradigms in Dermatology: Antivirals in Dermatology. **Clinics in Dermatology**, v. 21, n. 5, p. 426–446, 2003.

LIRA, A. M., ARAÚJO, A. A. S., BASÍLIO, I. D. J., SANTOS, B. L. L., SANTANA, D. P. Compatibility Studies of Lapachol with Pharmaceutical Excipients for the Development of Topical Formulations. **Thermochimica Acta**, v. 457, n. 1–2, p. 1–6, 2007.

LOBODA, A. P.; SOOND, S. M.; PIACENTINI, M.; BARLEV, N. Lysine-Specific Post-Translational Modifications of Proteins in the Life Cycle of Viruses. **Cell Cycle**, v. 18, n. 17, 2019.

LOFFLER, R.; DREHER, F.; MAIBACH, H. I. Stratum Corneum Adhesive Tape Stripping: Influence of Anatomical Site, Application Pressure, Duration and Removal. **Br J. Dermatol**, v. 151, p. 746-752, 2004.

LOOKER, K. L.; MARGARET, A. S.; MAY, M. T.; TURNER, K. M. E.; VICKERMAN, P.; GOTTLIEB, S. L.; NEWMAN, L. M. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1–17, 2015.

LOPES, C. M.; SILVA, J.; REAL OLIVEIRA, M. E. C. D.; LÚCIO, M. Lipid-based Colloidal Carriers for Topical Application of Antiviral Drugs. In: **Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications**. Atlanta, GA: Elsevier, 2018. p. 565–622.

LOURENÇO, A. L.; LIRA, L. M.; CARVALHO, D. P., MELO, P. A.; CLÁUDIO-DA-

SILVA, T. S. Gestão das Inovações Incrementais, o Caso Omeprazola. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 1000-1004, 2010.

LUSSIGNOL, M.; ESCLATINE, A. Herpesvirus and Autophagy: "All Right, Everybody Be Cool, This Is a Robbery!" **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 372, 2017.

MADER, J.; GALLO, A.; SCHOMMARTZ, T.; HANDKE, W.; NAGEL, C.-H. Calcium Spirulan Derived from *Spirulina platensis* Inhibits Herpes Simplex Virus 1 Attachment to Human Keratinocytes and Protects Against Herpes Labialis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 137, p. 197–203, 2016.

MALLEFET, P.; BADER, M.; PONARD, G.; SCHAFFRIK, M.; HASLER-NGUYEN, N.; SHELTON, D. Evaluation of the in Vitro Skin Permeation of Antiviral Drugs from Penciclovir 1% Cream and Acyclovir 5% Cream Used to Treat Herpes Simplex Virus Infection. **BMC Dermatology**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2009.

MARCASON, W. Will Taking the Amino Acid Supplement Lysine Prevent or Treat the Herpes Simplex virus? **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 3, p. 351, 2003.

MARINI, A.; BERBENNI, V.; PEGORETTI, M.; BRUNI, G.; COFRANCESCIM P.; SINISTRI, C.; VILLA, M. Drug-excipient Compatibility Studies by Physico-Chemical Techniques: The Case of Atenolol. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 73, n. 2, p. 547–561, 2003.

MATOS, A. **Estudos de Compatibilidade Fármaco-Excipiente e sua Importância no Desenvolvimento de Formulações Farmacêuticas**. Fundação Oswaldo Cruz - Farmanguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 2013.

MATTREY, F. T.; MAKAROV, A. A.; REGALADO, E. L.; BERNARDONI, F.; FIGUS, M.; HICKS, M. B.; ZHENG, J.; WANG, L.; SCHAFER, W.; ANTOUNUCCI, V.; HAMILTON, S. E.; ZAWATZKY, K.; WELCH, C. J. Current Challenges and Future Prospects in Chromatographic Methoddevelopment for Pharmaceutical Research. **Trends in Analytical Chemistry**, p. 36–46, 2017.

MIRANDA, A. C. M. **Desenvolvimento de Sistemas Gastrorretentivos do tipo Dome Matrix Contendo Benznidazol e Estratégias para Melhoria da Solubilidade Aquosa e Redução da Toxicidade**. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, SC, 2016.

MONDAL, D. Penciclovir. In: **Reference Module in Biomedical Sciences**. Atlanta, GA: Elsevier, 2016. p. 1–4.

MORETON, C. **Functionality and Performance of Excipients in a Quality-by-**

Design World. Indianapolis, IN: Russell, 2009.

MOYANO, M. A.; BROUSSALIS, A. M.; SEGALL, A. I. Thermal Analysis of Lipoic Acid and Evaluation of the Compatibility with Excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 2, p. 631–637, 2010.

MYERS, D. Emulsions. In: **Surfactant Science and Technology**. 3^a ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2006. p. 280–322.

NARANG, A. S., YAMNIUK, A., ZHANG, L., COMEZOGU, S. N., BINDRA, D. S., VARIA, S. A., SOYLE, M., BADAWEY, S. **Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery**. New Jersey, USA: Springer, 2015. v. 1.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica do Lehninger**. 5^a ed. Porto Alegre, RS: Editora Artmed, 2011.

NETO, H. S.; NOVÁK, C.; MATOS, J. R. Thermal Analysis and Compatibility Studies of Prednicarbate with Excipients used in Semi Solid Pharmaceutical Form. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 1, p. 367–374, 2009.

NEUMANN, S. M.; SCHAAF, U. S. VAN DER; KARBSTEIN, H. P. Investigations on the Relationship Between Interfacial and Single Droplet Experiments to Describe Instability Mechanisms in Double Emulsion. **Colloids and Surfaces A**, v. 553, p. 464–471, 2018.

NGUYEN, P.; GUPTA, S. V.; GUPTA, D.; YU, M.; DAVE, V. S. Current and Evolving Approaches for Improving the Oral Permeability of BCS Class III or Analogous Molecules. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 43, n. 2, p. 177–189, 2016.

NOLLET, M., BOULGHOBRA, H., CALLIGARO, E., RODIER, J. D. An Efficient Method to Determine the Hydrophile-Lipophile Balance of Surfactants Using the Phase Inversion Temperature Deviation of CiE_n-octane/Water Emulsions. **International Journal of Cosmetic Science**, 2019.

NOSENGO, N. New Tricks for Old Drugs. **Nature**, v. 534, p. 314–316, 2016.

O'NEIL, M. J. **The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals**. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., 2006.

OLIVEIRA, M. A. DE; YOSHIDA, M. I.; SILVA, D. C. G. M. DA. Quality Evaluation of Pharmaceutical Formulations Containing Hydrochlorothiazide. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16824–16836, 2014.

ORZALLI, M. H. Human Skin Explants Recapitulate Key Features of HSV-1 Infections. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 3, p. 519–521, 2019.

PAGLIARA, A.; REIST, M.; GEINOZ, S.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B. Evaluation and Prediction of drug permeation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 1339-1357, 1999.

PAIXÃO, R. L. **Experimentação Animal: razões e emoções para uma ética**. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ, 2001, p. 189.

PAULA, F. M.; DELCHEVA, I.; BEATTIE, D. A. Multi-Modal Stabilisation of Emulsions Using a Combination of Hydrophilic particles and an Amino Acid. **Colloids and Surfaces A**, p. 765–773, 2018.

PAVAN, A. R. **Síntese, Caracterização e Avaliação Biológica de Quelatos Metálicos Contendo Ligantes de Origem Natural**. Univesidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.

PEDRAZINI, M. C.; ARAÚJO, V. C.; MONTALLI, V. A. M. The Effect of L-Lysine in Recurrent Herpes Labialis: Pilot Study with a 8-year Follow Up. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 66, n. 3, p. 245–249, 2018.

PELUSI, A.; HANAWA, Y.; ARAIE, H.; SUZIKI, I.; GIORDANO, M.; SHIRAIWA, Y. Rapid detection and Quantification of Haptophyte Alkenones by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). **Algal Research**, v. 19, p. 48–56, 2016.

PETROSYAN, A. M.; GHAZARYAN, V. V. Vibrational Spectra of L-Lysine Monohydrochloride Dihydrate and its Two Anhydrous Forms. **Journal of Molecular Structure**, v. 917, n. 1, p. 56–62, 2009.

PHADNIS, N. V.; CAVATUR, R. K.; SURYANARAYANAN, R. Identification of Drugs in Pharmaceutical Dosage Forms by X-ray Powder Diffractometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 7, p. 929–943, 1997.

PIERCE, P. E. Measurement of rheology of thixotropic organic coatings and resins with the Brookfield Viscosimeter. **Journal of Paint Technology**, v. 43, n. 557, p. 35, 1971.

PIRET, J.; BOIVIN, G. Resistance of Herpes Simplex Viruses to Nucleoside Analogues: Mechanisms, Prevalence and Management. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 459–472, 2011.

PRASSE, C.; SCHLUSENER, M. P.; SHULZ, R.; TERNES, T. A. Antiviral Drugs in Wastewater and Surface Waters: A New Pharmaceutical Class of Environmental Relevance? **Environ. Sci. Technol.**, v. 44, n. 5, p. 1728–1735, 2010.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic Activity

Screening of Some Indigenous Thai Plants. **Fitoterapia**, v. 79, n. 7–8, p. 598–601, 2008.

RABORN, G. W.; MARTEL, A. Y.; LASSONDE, M.; LEWIS, M. A. O.; BOON, R.; SPRUANCE, S. L. Effective Treatment of Herpes Simplex Labialis with Penciclovir Cream: Combined Results of Two Trials. **Journal of the American Dental Association**, v. 133, n. 3, p. 303–309, 2002.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale - Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RASMUSSEN, H. T.; LI, W.; REDLICH, D.; JIMIDAR, M. I. Hplc Method Development. In: AHUJA, S.; DONG, M. W. (Eds.). **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC**. Atlanta, GA: Elsevier, 2005. v. 6p. 145–190.

RATHORE, A. S.; JOSHI, S. **Process Analysis: High Performance Liquid Chromatography**. 3. ed. Atlanta, GA: Elsevier, 2018.

RECHENCHOSKI, D. Z.; FACCIN-GALHARDI, L. C.; LINHARES, R. E. C.; NOZAWA, C. Herpesvirus: An Underestimated Virus. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 2, p. 151–156, 2017.

REDDY, S. T.; SIVARAMAKRISHNA, D.; SWAMY, M. J. **Physicochemical Characterization of Lauryl Glycinate-Dodecyl Sulfate Equimolar Complex: A Base-Triggerable Catanionic Liposomal System**. Elsevier B.V., 2017. v. 516

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**. 2^a ed. ed. São Paulo, SP, Brasil: Pharmabooks, 2010.

ROBERFROID, M. Alternatives in safety testing: progress or uselessness? **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 22: 438-444, 1994.

RODRIGUES, F.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Cell-based in Vitro Models for Dermal Permeability Studies. In: **Concepts and Models for Drug Permeability Studies: Cell and Tissue based In Vitro Culture Models**. 1. ed. Atlanta, GA: Elsevier Ltd, 2016. p. 155–167.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. The Nine Ages of Herpes Simplex Virus. **Herpes : the journal of the IHMF**, v. 8, n. 1, p. 23–7, 2001.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6^a ed. Grayslake, US: Pharmaceutical Press, 2009.

RUMLOVA, M.; RUMML, T. In vitro Methods for testing antiviral drugs. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 557–576, 2018.

SAHINER, N. Single Step Poly(L-Lysine) Microgel Aynthesis, Characterization and

- Biocompatibility Tests. **Psychological Bulletin**, v. 126, n. 1, p. 21, 2019.
- SAHU, P. K.; RAMISETTI, N. R.; CECCHI, T.; SWAIN, S.; PATRO, C. S.; PANDA, J. An Overview of Experimental Designs in HPLC Method Development and Validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 590–611, 2018.
- SCHAEFFER, H. J.; BEAUCHAMP, L.; MIRANDA, P.; BAUER, D. J.; COLLINS, P. 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine Activity Against Viruses of the Herpes Group. **Nature**, v. 272, n. 5654, p. 583–585, 1978.
- SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. Penciclovir Cream - Improved Topical Treatment for Herpes Simplex Infections. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 17, n. 5, p. 214–218, 2004.
- SCULLY, C. Orofacial Herpes Simplex Virus Infections: Current Concepts in the Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment, and Disorders in Which the Virus may be Implicated. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 68, n. 6, p. 701–710, 1989.
- SHABIR, G. A. Validation of High-Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis Understanding the Differences and Similarities Between Validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Confe. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, 2003.
- SHEETS, R. Lot Release, Analytics and Analytical Validation. In: **Fundamentals of Biologicals Regulation**. Atlanta, GA: Elsevier, 2018. p. 257–275.
- SHIMOMURA, A.; NAKANO, C.; ISHINOMOTO, T.; KUSUNOKI, Y.; MORI, D.; MATSUI, I.; TAKEHANA, K.; HAMANO, T.; FUJII, N.; NAKANO, T.; INOUE, K.; RAKUGI, H.; ISAKA, Y.; OBI, Y.; TAKABATAKE, Y.; TSUBAKIHARA, Y.; KATOU, Y. Dietary L-Lysine Prevents Arterial Calcification in Adenine-Induced Uremic Rats. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 25, n. 9, p. 1954–1965, 2014.
- SILVA, J. A.; APOLINÁRIO, A. C.; SOUZA, M. S. R.; DAMASCENO, B. P. G. L.; MEDEIROS, A. C. D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 3, p. 125-131, 2010.
- SINGH, A. V. A DSC study of some biomaterials relevant to pharmaceutical industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 112, n. 2, p. 791–793, 2013.
- SMITH, R. L.; MORRONI, J.; WILCOX, C. L. Lack of effect of treatment with penciclovir or acyclovir on the establishment of latent HSV-1 in primary sensory

- neurons in culture. **Antiviral Research**, v. 52, n. 1, p. 19–24, 2001.
- SNOECK, R.; BOUTILLEAU, D.; CROWLEY, B.; GILLEMOT, S.; PIORKOWSKA, R.; BIBBY, D. F.; FROBERT, E.; MBISA, J. L.; AFSHAR, B.; MORFIN, F.; ANDRE, G.; OHEMENG-KUMI, N. A European Multi-centre External Quality Assessment (EQA) Study on Phenotypic and Genotypic Methods used for Herpes Simplex Virus (HSV) Drug Resistance Testing. **Journal of Clinical Virology**, v. 96, n. March, p. 89–93, 2017.
- SPRUANCE, S. L.; REA, T. L.; THOMING, C.; TUCKER, R.; SALTZMAN, R.; BOO, R. Penciclovir Cream for the Treatment of Herpes Simplex Labialis. **Journal of the American Medical Association**, v. 277, n. 17, p. 1374–1379, 1997.
- STEINER, I.; KENNEDY, P. G. E.; PACHNER, A. R. The Neurotropic Herpes Viruses: Herpes Simplex and Varicella-Zoster. **Lancet Neurology**, v. 6, n. 11, p. 1015–1028, 2007.
- STRASFELD, L.; CHOU, S. Antiviral Drug Resistance: Mechanisms and Clinical Implications. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 413–437, 2010.
- STRENG, W. H. Physical Chemical Characterization of Drug Substances. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 10, p. 415–426, 1997.
- SULTANA, S.; MOHAMMED, S. A Review on Stability Studies of Pharmaceutical Products. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, v. 2, n. 3, p. 67–75, 2017.
- SUN, B.-W.; FU, Y.; CHEN, L.; DING, T.; ZHAI, L.-H. Compatibility study of rivaroxaban and its pharmaceutical excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 130, n. 3, p. 1569–1573, 2017.
- SWAMINATHAN, S.; CAVALI, R.; LEMBO, D.; TROTTA, F.; DONALISIO, M.; PASTERO, L.; CIVRA, A.; AQUILANO, D. Encapsulation of Acyclovir in New Carboxylated Cyclodextrin-based Nanosponges Improves the Agent's Antiviral Efficacy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, n. 1–2, p. 262–272, 2012.
- TADROS, T. Encyclopedia of Colloid and Interface Science. In: **Encyclopedia of Colloid and Interface Science**. Berkshire, UK: Springer-Verlag, 2013. p. 363–455.
- TAGLIARI, N. A. B.; KELMANN, R. G.; DIEFENTHALER, H. Aspectos Terapêuticos Das Infecções Causadas Pelo Vírus Herpes Simples Tipo 1. **Perspectiva**, v. 36, p. 191–201, 2012.
- TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of Tetrazolium (MTT)

- Colorimetric Assay for the Screening of Anti-Herpes Simplex Virus Compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, n. 1–2, p. 61–71, 1991.
- TAO, M.; ZHU, M.; WU, C.; HE, Z. Degradation Kinetic Study of Lysine in Lysine Hydrochloride Solutions for Injection by Determining its Main Degradation Product. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2015.
- TATAR, B. C.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Rheology of Emulsions. In: **Advances in Food Rheology and Its Applications**. Sawston, UK: Woodhead, 2016. p. 437–457.
- THAPPA, D. M.; NATH, A. K. Newer Trends in the Management of Genital Herpes. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 75, n. 6, p. 566, 2009.
- THOMASY, S. M.; MAGGS, D. J. A Review of Antiviral Drugs and Other Compounds with Activity Against Feline Herpesvirus Type 1. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 24, n.1, 2015.
- THURLKILL, R. L.; GRIMSLEY, G. R.; SCHOLTZ, J. M. pK Values of the Ionizable Groups of Proteins. **Protein Science**, p. 1214–1218, 2006.
- TIPPIE, M. A.; MARTIN, J. C.; SMEE, D. F.; MATTHEW, T. R.; VERHEYDEN, J. P. H. Antiherpes Simplex Virus Activity of 9-[4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)-1-butyl] guanine. **Nucleosides and Nucleotides**, v. 3, n. 5, p. 525–535, 1984.
- TIRONI, L. F.; CRUZ, B. O. Inovação Incremental ou Radical: Há Motivos para Diferenciar? Uma abordagem com Dados da PINTEC*. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**. Governo Federal, Rio de Janeiro, 2008. p. 8-9.
- TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. A Review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, n. 2, p. 106–121, 2006.
- TUCKER, J. D.; BERTKE, A. S. Assessment of Cognitive Impairment in HSV-1 Positive Schizophrenia and Bipolar Patients: Systematic Review and Meta-analysis. **Schizophrenia Research**, p. 1–8, 2019.
- USP. **UNITED STATES OF PHARMACOPEIA**. 26. ed. Rockville, USA: United States Pharmacopeial Convention, 2003.
- USP. **UNITED STATES OF PHARMACOPEIA**. USP 32 – National Formulary 27, Rockville, USA: United States Pharmacopeial Convention, 2009. 731 p.
- WESTER, C. R.; MAIBACH, H. L. *In vitro* Testing of Topical Pharmaceutical Formulations. In: OSBORNE, D. W.; AMAMNN, A. H. Topical **Drug Delivery Formulation**, Marcel Dekker, New York, p. 213-220, 1990.

- WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes Simplex Virus Infections. **Lancet**, v. 357, p. 1513–1518, 2001.
- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration Enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 603–618, 2004.
- WILLIAMS, P. A.; HUGHES, C. E.; HARRIS, K. D. M. L-Lysine: Exploiting Powder X-Ray Diffraction to Complete the Set of Crystal Structures of the 20 Directly Encoded Proteinogenic Amino Acids. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 13, p. 3973–3977, 2015.
- WONG, L. P.; GILLIGAN, C. A.; PO, A. L. W. Preparation and Characterisation of Sustained-Release Ibuprofen-Cetostearyl Alcohol Spheres. v. 85, p. 95–114, 1992.
- WU, J. L., YU, S. Y., WU, S. H., BAO, A. M. A sensitive and Practical RP-HPLC-FLD for Determination of the Low neuroactive Amino Acid Levels in Body Fluids and its Application in Depression. **Neuroscience Letters**, v. 616, p. 32–37, 2016.
- YU, A.; GUO, C.; ZHOU, Y.; CAO, F.; ZHU, W.; SUN, M.; ZHAI, G. Skin irritation and the Inhibition Effect on HSV-1 in vivo of Penciclovir-loaded Microemulsion. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 10, p. 1305–1309, 2010.
- ZARMPPI, P.; FLANAGAN, T.; MEEHAN, E.; MANN, J.; FOTAKI, N. Biopharmaceutical aspects and implications of excipient variability in drug product performance. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 111, p. 1–15, 2017.
- ZARUBAEV, V., SLITA, A., RASNETSOV, L., ANFIMOV, P. A Novel Fullerene-Based Antiviral Active Against Herpes Simplex Virus In vitro and In vivo. **Antiviral Research**, v. 86, n. 1, p. A70, 2010.
- ZHANG, Y.; GAO, Y.; WEN, X.; MA, H. Current Prodrug Strategies for Improving Oral Absorption of Nucleoside Analogues. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 2, p. 65–74, 2014.
- ZHOU, X.; HAO, Y.; YUAN, L.; PRADHAN, S.; SHRESTHA, K.; PRADHAN, O.; LIU, H.; LI, W. Nano-Formulations for Transdermal Drug Delivery: A Review. **Chinese Chemical Letters**, v. 29, p. 1713–1724, 2019.
- ZHU, W.; YU, A.; WANG, W.; DONG, R.; WU, J.; ZHAI, G. Formulation Design of Microemulsion for Dermal Delivery of Penciclovir. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 360, n. 1–2, p. 184–190, 2008.
- ZHU, X.; LI, L.; LI, S.; NING, C.; ZHOU, C. L-Arginine/L-Lysine Improves Emulsion Stability of Chicken Sausage by Increasing Electrostatic Repulsion of Emulsion

Droplet and Decreasing the Interfacial Tension of Soybean Oil-Water. **Food Hydrocolloids**, v. 89, n. May 2018, p. 492–502, 2019.