

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO/RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE
FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS COMERCIAIS CONTENDO ACICLOVIR E
ESTUDO DE SUA RELAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO ANTIVIRAL EFETIVA**

Rafaela Martins Sponchiado

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO/RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE
FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS COMERCIAIS CONTENDO ACICLOVIR E
ESTUDO DE SUA RELAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO ANTIVIRAL EFETIVA**

Dissertação apresentada por **Rafaela
Martins Sponchiado** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Nadia M Volpato

Porto Alegre, 2015

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.03.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Cristiane de Bona da Silva

Prof. Dr. Ruy Beck

Profa. Dr. Cássia Virginia Garcia

CIP - Catalogação na Publicação

Sponchiado, Rafaela
AVALIAÇÃO DA PERMEACÃO/RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO
DE FORMULAÇÕES SEMISSÓLIDAS COMERCIAIS CONTENDO
ACICLOVIR E ESTUDO DE SUA RELAÇÃO COM A CONCENTRAÇÃO
ANTIVIRAL EFETIVA / Rafaela Sponchiado. -- 2015.
97 f.

Orientadora: Nadia Maria Volpato.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Permeação cutânea. 2. Aciclovir. 3. Efeito
antiviral. I. Maria Volpato, Nadia , orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (402,403) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Nádia Maria Volpato, pela orientação e dedicação oferecida no desenvolvimento deste trabalho, pelo exemplo de profissional e pela confiança sempre depositada em mim.

À Prof. Dra. Bibiana de Araújo, pelo auxílio prestado no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos professores Dra. Elfrides E. S. Schapoval pelo exemplo de vida e de profissionalismo, Dra Cássia Garcia, Dr. Martn Steppe e Dr. Tércio Oppe.

Aos colegas do LEPCQ: Lívia, Joanna, Nathalie, Camila, Mariana, Rúbia e Jaison. Em especial a Letícia, amiga e colega, pelas conversas, discussões pertinentes sobre o trabalho realizado, trocas de ideias nos momentos de desânimo e pela amizade construída nesses dois anos; Às bolsistas Sarah, Natalia, Marina.

Aos funcionários do Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico (LCQFar): Lorena e Letícia. E por toda a estrutura que possibilitou a realização desse projeto.

Ao meu noivo, Idamir Mascarello Junior pelo amor, incentivo, compreensão e apoio na realização deste sonho. Te amo!

A minha família, que sempre incentivou meus estudos, se não fosse pelo incentivo deles neste momento não estaria aqui. Sou grata pela dedicação ao longo desses anos de vida, e por acreditarem no meu potencial. Amo vocês! A família do meu noivo, Dona Maria e Seu Idamir, pelo carinho, respeito e amizade.

As minhas amigas de coração que mesmo longe estão sempre perto, Marina Bordin, Julia Matté e Andrea Tomelero, obrigada pelo carinho, amizade sempre

da mesma maneira quando nos encontramos, sabem o quão especial são para mim.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia – UFRGS pela oportunidade de crescimento profissional. Aos professores do PPGCF pelas disciplinas e atenção disponibilizada e os funcionários dessa instituição;

RESUMO

Avaliar a permeação/retenção cutânea de formulações semissólidas em pele animal pode ser útil para complementar a equivalência farmacêutica destes produtos. O aciclovir (ACV) é um fármaco derivado da guanósina, com alta especificidade para o vírus herpes, disponível no mercado nacional sob forma de creme dermatológico de vários fabricantes. O objetivo do trabalho foi a avaliação da permeação/retenção cutânea *in vitro* de formulações comerciais contendo ACV (referência, genérico e similar – dois lotes de cada), com determinação da concentração do fármaco no tecido cutâneo, nas duas principais camadas, para correlacionar com a concentração antiviral efetiva. Os estudos foram conduzidos utilizando células de Franz e pele suína. Primeiramente, foi validado o método analítico para a quantificação do fármaco nas formulações e, principalmente, nas camadas da pele suína. As análises foram conduzidas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência, com coluna C8, detecção em 254 nm e fase móvel constituída de uma mistura de água:metanol (95:5, v/v). A metodologia analítica demonstrou ter adequada sensibilidade (LQ 0,38 µg/mL), especificidade e recuperação do fármaco a partir das matrizes biológicas na faixa de 85 – 102%. Quanto ao estudo de retenção cutânea *in vitro*, o produto genérico, do primeiro lote analisado forneceu quantidade de fármaco na pele ($1,56 \pm 0,65$ µg de ACV/mg de tecido) que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao referência e similar ($0,85 \pm 0,40$ e $0,88 \pm 0,43$ µg/mg, respectivamente), enquanto que no segundo lote todos os produtos apresentaram similaridade de penetração ($p > 0,05$) (referência - $0,74 \pm 0,45$; genérico - $1,25 \pm 0,90$ e similar - $1,23 \pm 0,85$ µg/mg). Para compreender se estes resultados e sua variabilidade poderiam trazer comprometimento ao efeito terapêutico, foi realizada uma simulação empregando um modelo de efeito inibitório para replicação viral. Com esta avaliação pode-se verificar que os produtos analisados ofereceriam efeito antiviral desejado no tecido cutâneo, mesmo em contato com cepas de Herpes simples de IC_{50} elevado.

Palavras-chave: aciclovir, permeação/retenção cutânea, efeito antiviral.

ABSTRACT

Evaluate the permeation/retention of semisolid formulations in animal skin could be useful to supplement the pharmaceutical equivalence of these products. Acyclovir (ACV) is a guanosine derivative drug with high specificity for the herpes virus. The objective was to evaluate the skin *in vitro* permeation/retention of commercial formulations containing ACV (reference, generic and similar - two batches each) with determination of drug concentration in the skin tissue in different layers to correlate with effective antiviral concentration. Studies were conducted using Franz cells and porcine skin. Was validated analytical method for quantification of the drug in the formulations and layers of pig skin. Tests were conducted in high performance liquid chromatograph, equipped with C8 column, UV detection at 254 nm and the mobile phase consisted of a mixture of water: methanol (95:5, v/v). The analytical methodology has demonstrated good sensitivity (LOQ 0.38 mg/mL), and specific, with drug recovery from biological matrices in the range of 85-102%. As for the study of skin retention *in vitro*, the generic product (1.56 ± 0.65 ACV/mg of tissue), the first batch analysis showed a significant difference from the reference and similar (0.85 ± 0.40 and 0.88 ± 0.43 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively), while in the second batch all products showed similar penetration (reference - 0.74 ± 0.45 ; generic - 1.25 ± 0.90 and similar - 1.23 ± 0.85 $\mu\text{g}/\text{mg}$). To understand whether this difference could bring change in therapeutic effect, a simulation was performed using an inhibitory effect model for viral replication. With the simulation study, it may be suggested that the formulations analyzed would provide wanted antiviral effect even in contact with Herpes simplex strains of high IC_{50} .

Keywords: acyclovir, permeation, antiviral effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ACV.

Figura 2. Mecanismo de ação do Aciclovir.

Figura 3. Estrutura básica da pele (adaptado de AZULAYa & AZULAYb, 2006).

Figura 4. Rotas de permeação de fármacos através do estrato córneo. Adaptado de MOSER, *et al.*, 2001.

Figura 5. Célula de difusão de Franz. Fonte: Adaptação do manual da célula – Hanson Research Corp (SR = solução receptora).

Figura 6. Equações para determinar o limite de detecção (A) e quantificação (B) segundo RE 899, 2003. DPa é o desvio padrão intercepto médio da curva padrão e o IC é a inclinação da curva padrão. Esses foram obtidos através da curva média dos três dias de análise.

Figura 7. Montagem da célula de Franz para estudo de permeação/retenção cutânea.

Figura 8. Reograma da viscosidade versus taxa de cisalhamento, referente às amostras de ACV analisadas (R, G e S) (A). Decaimento do produto G e S aproximado (B).

Figura 9. Especificidade do método cromatográfico para análise de ACV nas camadas da pele. A) Epiderme; B) Derme. A linha preta representa o branco e a linha vermelha o ACV na concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$, eluindo no tempo de retenção de 7,8 minutos.

Figura 10. Perfil da pureza do pico do ACV em solução (contendo componentes da matriz.) na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Utilizando CLAE Shimadzu 20A, equipado com Coluna 8 (250 x 4,6 mm).

Figura 11. Representação gráfica da curva analítica de ACV na faixa de concentração de 0,5 – 25 $\mu\text{g/mL}$ quantificados por CLAE Shimadzu 20A, equipado com Coluna 8 (250 x 4,6 mm).

Figura 12. Gráfico dos resíduos da curva analítica de ACV por CLAE, onde a “variável X 1” corresponde a concentração na faixa de 0,5 – 25 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 13. Quantidade retida de ACV nas camadas da pele suína referente ao primeiro lote dos produtos referência (R), genérico (G) e similar (S), expressa em $\mu\text{g/mg}$. Cada símbolo corresponde a um valor determinado e o traço horizontal corresponde a média ($n = 15$).

Figura 14. Quantidade retida de ACV nas camadas da pele referentes ao segundo lote dos produtos, expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$. Cada símbolo corresponde a um valor determinado e o traço horizontal corresponde a média ($n = 15$).

Figura 15. Quantidade retida de ACV do medicamento referência (A), genérico (B) e similar (C) somando as camadas da pele representativas para os dois lotes analisados.

Figura 16. Cromatogramas representativos da permeação/retenção cutânea do ACV após 8h de contanto com o produto comercial (primeiro lote). Referência epiderme (R-E); Referência derme (R-D); Genérico epiderme (G-E); Genérico derme (G-D); Similar epiderme (S-E); Similar derme (S-D).

Figura 17. Cromatogramas representativos da permeação/retenção cutânea do ACV após 8h de contanto com o produto comercial (segundo lote). Referência epiderme (R-E); Referência derme (R-D); Genérico epiderme (G-E); Genérico derme (G-D); Similar epiderme (S-E); Similar derme (S-D).

Figura 18. Gráfico representativo da simulação do efeito inibitório para o ACV em relação às concentrações encontradas na pele no estudo de penetração cutânea obtido para produto S. A linha pontilhada indica 50% da inibição viral para $\text{IC}_{50} = 0,850 \mu\text{g}/\text{mL}$.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição qualitativa de creme de aciclovir 5% selecionados. (água e o ACV são constituintes de todas as formulações não apresentados na tabela).

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas na validação do método por LC-UV para determinação de ACV.

Tabela 3. Resultados referentes ao doseamento do ACV e medição de pH.

Tabela 4. Coeficiente de determinação referentes aos modelos que descrevem os comportamento não-newtonianos das especialidades farmacêuticas estudadas.

Tabela 5. Parâmetros de conformidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados (SHABIR, 2003; BRASIL, 2012).

Tabela 6. Teste da análise da variância (ANOVA) para ajuste do modelo linear.

Tabela 7. Exatidão e precisão para o método bioanalítico para quantificação do ACV.

Tabela 8. Comparação múltipla pelo procedimento de Tukey-Kramer realizado posteriormente a ANOVA entre os dois lotes dos três produtos para as quantidades de ACV nas duas camadas da pele.

Tabela 9. Média e desvio padrão (DP) referente ao estudo de permeação/retenção em pele suína.

Tabela 10. Média e desvio padrão dos pesos das camadas da pele no estudo de permeação cutânea (n=30).

Tabela 11. Valores de inclinação, valor-p para o intercepto e coeficiente de determinação (r^2) para cada dia de permeação cutânea referente ao primeiro lote.

Tabela 12. Valores de inclinação, valor-p para o intercepto e coeficiente de determinação (r^2) para cada dia de permeação cutânea referente ao segundo lote.

Tabela 13. Valores de IC_{50} do ACV encontrados na literatura para diferentes cepas de HSV-1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3.1 Herpes vírus.....	27
3.2 Antivirais – Aciclovir.....	28
3.3 A Pele.....	30
3.4 Permeação Cutânea.....	33
3.5 Métodos <i>in vitro</i> para avaliação da absorção cutânea.....	35
3.6 Equivalência Farmacêutica de produtos tópicos.....	38
3.7 Validação de Metodologias Analíticas.....	40
3.8 Índices farmacocinético/farmacodinâmico (PK/PD).....	41
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	43
4.1 MATERIAL.....	45
4.1.1 Seleção de produtos farmacêuticos presente no mercado.....	45
4.1.2 Equipamentos e acessórios.....	46
4.1.3 Reagentes e substância química de referência.....	46
4.2 MÉTODOS.....	47
4.2.1 Caracterização do creme dermatológico contendo Aciclovir 5%.....	47
4.2.1.1 Determinação do pH das formulações semissólidas.....	47
4.2.1.2 Doseamento das formulações contendo Aciclovir.....	47
4.2.1.3 Comportamento reológico das formulações semissólidas.....	47
4.2.2 Condições cromatográficas.....	48
4.2.3 Obtenção e preparo da pele suína e de suas principais camadas.....	49
4.2.3.1 Obtenção e preparo.....	49
4.2.3.2 Separação das camadas da pele e contaminação das matrizes com ACV.....	50
4.2.3.3 Extração de Aciclovir (ACV) das camadas da pele.....	50

4.2.4 Validação bioanalítica do método de análise quantitativa de ACV aplicado ao estudo de penetração/retenção cutânea por CLAE-UV.....	51
4.2.5 Estudo de permeação cutânea <i>in vitro</i> de formulações semissólidas contendo ACV.....	53
4.2.6 Estudo farmacodinâmico – Simulação do efeito inibitório viral do Aciclovir nas camadas da pele.....	55
4.2.7 Descarte de resíduos.....	56
4.2.8 Análise estatística.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Caracterização das formulações semissólidas obtidas no mercado nacional.....	59
5.2 Validação bioanalítica do método de análise quantitativa de Aciclovir.....	62
5.3 Permeação/retenção de Aciclovir nas diferentes camadas da pele avaliadas através de experimento <i>in vitro</i>	67
5.4 Estudo farmacodinâmico – Simulação do efeito inibitório viral do Aciclovir nas camadas da pele.....	77
5.5 Considerações finais.....	79
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS.....	87

Produtos terapêuticos de aplicação cutânea são geralmente bem aceitos pelos pacientes, pois oferecem maior comodidade e facilidade de aplicação. Mesmo constituindo uma barreira física, a pele tem sido amplamente utilizada para liberação cutânea de fármacos (WAGNER *et al.*, 2001; BOLZINGER *et al.*, 2012). A pele é o órgão mais extenso do corpo humano, atua como barreira contra ataques físicos, químicos e microbiológicos. Além disso, mantêm a temperatura corporal, impede a perda de água, defesa, reparação e apresenta função sensorial (calor, frio, pressão, dor e tato) (HADCRAFT, 2001; WHO, 2006; GRAFOURIAN *et al.*, 2010).

O termo global, absorção dérmica, descreve a passagem de compostos a partir da superfície externa da pele, tanto para o próprio tecido cutâneo como para a circulação sistêmica. Esse processo pode ser dividido em três etapas: *penetração*, entrada de uma substância através da camada mais externa da pele, *permeação*, que é a penetração da substância da camada mais externa para a segunda camada, e *absorção*, etapa que conduz a substância para entrada na circulação sistêmica (OECD, 2004; SCCP, 2006; WHO, 2006; BOLZINGER *et al.*, 2012).

Métodos *in vitro* são considerados técnicas valiosas para determinar a penetração e permeação cutânea de produtos tópicos, pois por meio deles podem-se compreender os processos que ocorrem desde a aplicação do produto na pele, liberação do fármaco da forma farmacêutica, absorção e retenção (CAMPOS, 1994; NOKHODCHI *et al.*, 2003). Para um grande número de compostos esta metodologia demonstra proporcionar uma boa predição da absorção dérmica *in vivo* (OECD, 2004). Segundo o Scientific Committee on Consumer Products (SCCP, 2006), o método *in vitro* mais utilizado é o sistema de difusão por meio da célula vertical bicompartimental de Franz, pela qual pode ser empregada pele humana, artificial ou também pele dissecada de ratos, camundongos, coelhos, porcos, cães e macacos (AULTON, 2005).

A infecção causada pelo vírus *Herpes simplex* (HSV) atinge mais de 80% da população, sendo que 45% desta apresenta infecção recorrente (HASLER-NGUYEN *et al.*, 2009). Uma das características das infecções pelo vírus da herpes é a capacidade de estabelecer recorrências ao longo da vida, caracterizadas por grande período de latência seguindo de reativação (FIELD e HODGE, 2013). A descoberta do aciclovir (ACV), em 1977, representou um

marco na terapia antiviral. Este fármaco mostrou-se eficaz contra HSV e o vírus Varicela-Zoster (VZV), e, até hoje, é a medicação de escolha para o tratamento destas patologias (FIELD e HODGE, 2013).

Entretanto, para um melhor efeito nas afecções cutâneas herpéticas, os medicamentos antivirais devem atingir concentrações terapêuticas nas células basais da epiderme, a qual é a porta inicial para a propagação do vírus. Conseqüentemente, a penetração do ativo na pele é um dos fatores mais críticos para a terapia bem sucedida (HASLER-NGUYEN *et al.*, 2009).

Estudos de correlação farmacocinética/farmacodinâmica (PK/PD) são utilizados para realizar uma simulação e previsão do efeito terapêutico e, também, para otimizar a posologia de diversos fármacos. Normalmente para anti-infecciosos, são empregados parâmetros farmacocinéticos (área sob a curva e concentração máxima) e um parâmetro microbiológico (concentração inibitória mínima – MIC ou concentração média efetiva – IC₅₀) (MOUTON *et al.*, 2002).

No Brasil, para medicamento de uso tópico, não destinado a efeito sistêmico, deve ser demonstrada a equivalência farmacêutica, ou seja, o genérico deve apresentar o mesmo fármaco, na mesma concentração, em relação ao medicamento referência e excipientes de mesma função, em concentrações compatíveis (BRASIL, 2011). Entretanto, na regulamentação para alterações pós-registro (BRASIL, 2009), foi anunciado interesse da autoridade regulatória em solicitar estudos *in vitro* de permeação cutânea, cuja implementação depende ainda de normatização específica.

2.1 Objetivo geral

Verificar o quanto a determinação *in vitro* de permeação/retenção cutânea de um fármaco modelo de ação antiviral (aciclovir - ACV), proveniente de formulações comerciais diferentes ou semelhantes entre si quanto a composição, pode indicar a manutenção ou não da atividade do fármaco relacionando a sua concentração no tecido cutâneo em diferentes camadas com a concentração antiviral efetiva.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar produtos dermatológicos comerciais contendo ACV, através de ensaios físico-químicos e de análise crítica da composição qualitativa declarada das formulações selecionadas;
- Validar metodologia analítica por CLAE para quantificação do fármaco nas diferentes camadas do modelo de pele animal (suína) empregado, de acordo com a RDC 27/2012 e a guia internacional (FDA, 2001);
- Otimizar e validar técnica de extração do ACV das camadas da pele animal;
- Realizar estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro*, quantificando o fármaco nas duas principais camadas da pele (epiderme e derme);
- Relacionar as concentrações teciduais encontradas com a concentração necessária para a atividade antiviral.

3.1 Herpes vírus

Herpes simples é uma moléstia infecciosa de etiologia viral, tendo o Herpes Simplex vírus (HSV) como agente etiológico. Segundo Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2003, estimou-se que 536 milhões era o número total de pessoas entre 15 e 49 anos infectadas pelo vírus HSV-2, a nível mundial, enquanto que o número de novos casos foi de 23,6 milhões. Estudos mostram que cerca de 60% a 95% da população mundial possui anticorpos séricos contra pelo menos uma das cepas de um dos vírus HSV (LUPI, 2000; YEUNG-YUE *et al.*, 2002; LOOKER, GARNETT e SCHMID, 2008; PENELLO, 2010).

Os vírus HSV pertencem à família Herpesviridae e à subfamília Alphaherpesviridae. Possuem grandes dimensões (150-250 nm) e apresentam quatro componentes básicos: a membrana lipídica mais externa (envelope), o capsídeo icosaédrico que envolve a estrutura helicoidal de DNA em dupla hélice, que por sua vez é circundada por uma substância amorfa (tegumento). Compreendem dois sorotipos, o HSV do tipo-1 (HSV-1) e o HSV do tipo-2 (HSV-2) (LUPI, 2000).

O HSV-1 é tipicamente contraído na infância e na adolescência, por contato direto pela via oral e, quando sintomático, é caracterizado por lesões orolabiais ou faciais na superfície cutânea das mucosas, podendo permanecer de 10 a 14 dias. Enquanto que o HSV-2 causa lesões genitais, ocorrendo em adolescentes e adultos sexualmente ativos. A transmissão do vírus pode ocorrer também através de pessoas assintomáticas além daquelas sintomáticas (GOLD e COREY, 1987; FARHAT e CLEMENS, 2010).

O vírus HSV tem a propriedade de infectar as células de forma latente, permanecendo a partícula viral nessas células em estado de latência por toda a vida do indivíduo, sem nunca ocasionar doença ou sintomas clínicos relacionados à infecção viral, porém pode contribuir para a propagação da doença. O HSV recorrente afeta 20% a 40% da população em algum momento da vida (SPRUANCE *et al.*, 1977; FIELD e HODGE, 2013).

Na última década, a incidência e a severidade das infecções causadas pelo HSV apresentou um elevado crescimento, em decorrência do aumento do número de pacientes imunocomprometidos, quimioterapias, transplantes e a

síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (SNOECK, 2000; JALON *et al.*, 2001). As infecções por HSV são frequentemente benignas, porém quando presente em pacientes imunocomprometidos, as lesões podem perdurar por mais de 30 dias, causando lesões necróticas extensas e disseminar visceralmente (GOLD e COREY, 1987; FONSECA, 1999).

3.2 Antivirais - Aciclovir

O aciclovir (2-amino-1,9-diidro-9-[(2-hidroxietoxi)metil]-6H-purina-6-ona) apresenta-se sob a forma de um pó cristalino branco, muito pouco solúvel em água, insolúvel em álcool e ligeiramente solúvel em solução de HCl 0,1 mo/L. É uma molécula hidrofílica e anfótera, isto é, a molécula possui dos grupos ionizáveis (ácido e básico). Um pKa ácido (9,3) referente ao oxigênio ligado ao anel pirimídico e um pKa básico (2,3) referente a desprotonação do anel imidazólico. Possui massa molecular de 225,21 g/mol e fórmula molecular $C_8H_{11}N_5O_3$, com a estrutura química representada na Figura 1. É comercializado na forma de comprimidos com dose de 200 mg do fármaco e creme contendo 50 mg/g (VOLPATO, SANTI e COLOMBO, 1995; HUIDOBRO, RUPEREZ e BARBAS, 2005; UNITED STATES PHARMACOPEIA 30 NF/25, 2007).

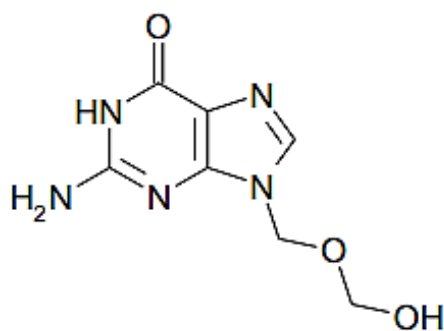


Figura 1. Estrutura química do ACV.

A era do tratamento antiviral seletivo e eficaz começou com o aciclovir (ACV) (RANG *et al.*, 2007). O ACV é considerado o fármaco mais efetivo contra os

vírus da herpes na atualidade, sendo o tratamento de escolha para as infecções causadas pelo HSV, devido a sua alta seletividade pelo vírus herpético e baixa citotoxicidade às células do hospedeiro (COLLINS e ELLIS, 1999).

O ACV é um fármaco análogo acíclico de nucleosídeo purínico, o qual atua por competição com nucleosídeos naturais (endógenos) pela incorporação ao DNA viral, isto torna impossível o alongamento da cadeia de DNA, impedindo a replicação viral, (BARRECA *et al.*, 2003; AHSP, 2007). O ACV comporta-se como um pró-fármaco, sendo a forma ativa o trifosfato, (figura 2). O ACV é fosforilado em seu composto ativo através de enzimas virais. O aciclovir-trifosfato compete com o 2'-desoxinucleotídeo-5'-trifosfato (dNTPs) pela polimerase viral, sendo ele próprio incorporado à cadeia de DNA viral em formação, ocupando o lugar do nucleotídeo. A ausência do grupo 3'-hidroxila na estrutura do ACV, impede a incorporação de novos nucleotídeos necessários ao alongamento da cadeia de DNA viral. Desta forma, o ACV-TP atua como um inibidor competitivo (LUPI, 2000). Este apresenta uma potência 30 vezes maior contra o vírus da herpes em comparação com a enzima do hospedeiro (RANG *et al.*, 2007).

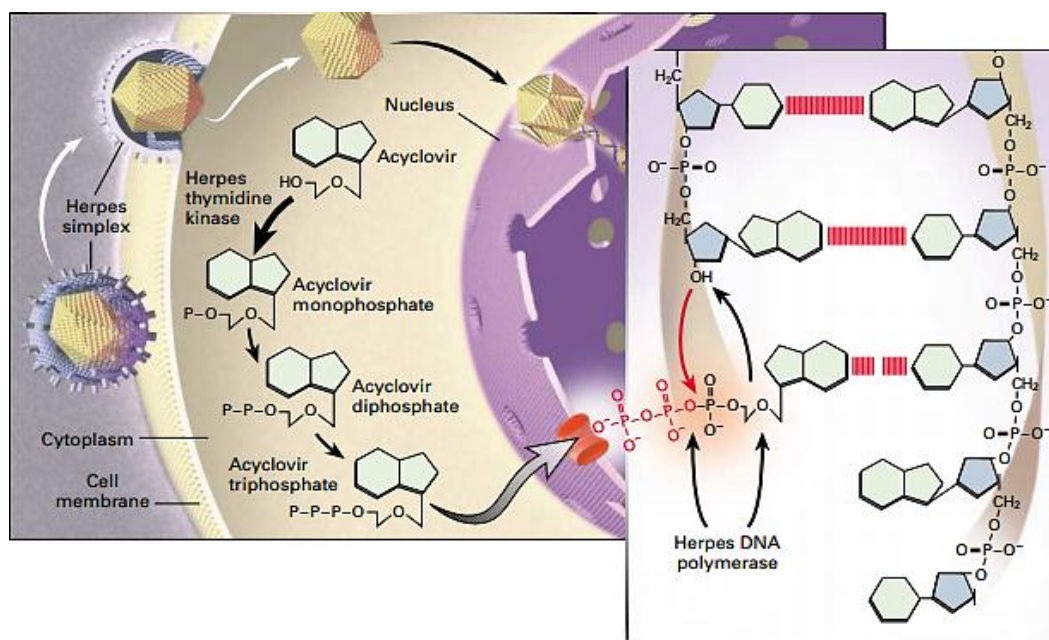


Figura 2. Mecanismo de ação do Aciclovir (HENRY; BALFOUR, 1999).

O ACV é administrado via oral e apresenta alta especificidade para o vírus herpes simples e varicela zoster. Esse vírus pode causar herpes labial,

conjuntivite, úlceras bucais, infecções genitais, herpes zoster. Pode ser administrado oralmente, intravenosamente ou topicamente. Quando administrado por via oral, somente 20% da dose é absorvida e o pico das concentrações plasmáticas é atingido em 1-2 horas (RANG *et al.*, 2007). A administração por via oral requer doses repetidas devido à baixa absorção intestinal (15 a 30%); em contra partida, na terapia tópica podem ser administradas doses pequenas de ACV, sendo que a aplicação é diretamente no local da lesão, eliminando, assim, os efeitos adversos associados com a administração oral (HORWITZ *et al.*, 1999).

Há muito vem sendo empregado na forma de creme a 5% para o tratamento de herpes simples labial. A posologia indicada para administração tópica é aplicar 5 vezes ao dia, em intervalos de, aproximadamente, 4 horas. Deve ser aplicado sobre as lesões existentes ou lesões emergentes tão logo quanto possível, no início da infecção. É especialmente importante iniciar o tratamento de episódios recorrentes durante o período prodromico ou aos primeiros sinais de lesão (GLAXOSMITHKLINE, 2002).

3.3 A Pele

A pele que cobre o corpo humano compreende uma área de cerca de 2 m², pesando, em um adulto, por volta de 4 kg. É considerado o órgão mais complexo do organismo, sendo o maior do corpo humano, compreendendo 5% do peso total. Atua principalmente como barreira de retenção de água e contra penetração de agentes externos (HADGRAFT, 2001; BOLZINGER *et al.*, 2012). Além disso, possui seu próprio metabolismo e contribui para o equilíbrio do organismo (WHO, 2006; BOLZINGER *et al.*, 2012).

Do ponto de vista anatômico, a pele possui diversas camadas histológicas, mas, em geral, a pele humana é composta por três camadas principais (Figura 3) que diferem em suas composições e estruturas: a epiderme - celular estratificada e avascular, localizada na superfície; a derme - subjacente formada por tecido conjuntivo na camada média, e a hipoderme constituída de tecido conjuntivo adiposo e com vários órgãos anexados, como folículos pilosos, glândulas

sudoríparas e sebáceas (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010; WHO, 2006).

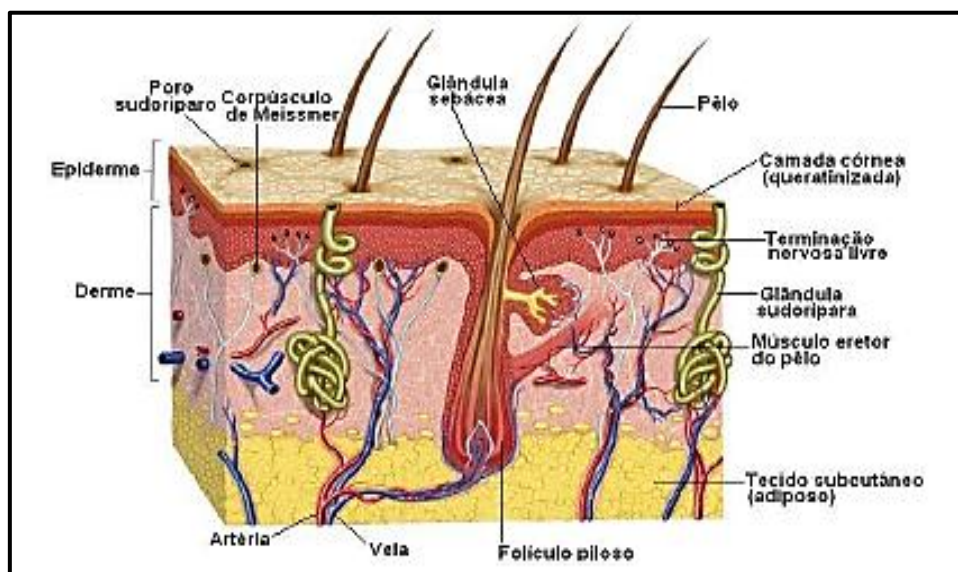


Figura 3. Estrutura básica da pele (adaptado de AZULAYa; AZULAYb, 2006).

O estrato córneo é uma camada hidrofóbica (13% de água) composta por células mortas. A superfície da pele é recoberta por um filme de material emulsificado composto de uma mistura complexa de sebo, suor e células epidérmicas. Essa estrutura é renovada constantemente, portanto, mantém a eficácia da proteção frente entrada de substâncias estranhas. Constitui uma das principais barreiras para a penetração de fármacos aplicados topicamente, devido à sua estrutura bastante compacta, elevada organização estrutural e hidrofobicidade Estruturalmente o estrato córneo é um tecido composto por células queratinizadas achatadas com uma densidade de $1,55 \text{ g/cm}^3$. Devido sua natureza densa, os valores de coeficientes de difusão neste tecido são de mil ou mais vezes menores do que em qualquer outro tecido da pele, resultando em grande resistência e impermeabilidade. A velocidade de movimentação de um fármaco através desta camada depende da concentração do fármaco no veículo, de sua solubilidade aquosa e do coeficiente de partição óleo/água entre o estrato córneo e o veículo (MOSER *et al.*, 2001; AULTON, 2005; ALLEN, POPOVICH e ANSEL, 2007; LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010 BOLZINGER *et al.*, 2012) A mucosa de revestimento dos lábios é constituída de epitélio não

queratinizado, sendo mais permeável do que as regiões queratinizadas (GANEM-QUINTANAR, FALSON-RIEG e BURI, 1997).

A epiderme consiste em uma complexa estrutura constituída de diferentes camadas formadas pelos queratinócitos, células epiteliais estratificadas, que sofrem diferenciação à medida que vão da camada basal até a superfície da pele, quando descamam em numerosas camadas de células queratinizadas, anucleadas e sem organelas chamadas de corneócitos, a fim de promover efeito barreira entre a interface ambiente-organismo. É subdivida em camada basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, camada lúcida e estrato córneo. Varia em espessura, oscilando desde 0,8 mm nas palmas das mãos e sola dos pés até 0,006 mm nas pálpebras. Nos estudos de permeação cutânea, a epiderme é a camada da pele que mais merece atenção (MOSER *et al.*, 2001; RIBEIRO, 2010).

A derme consiste em uma matriz de tecido conectivo de 3 a 5 mm de espessura. Contêm capilares, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos, nervos e terminações nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos. Consiste essencialmente em cerca de 80% de proteína em uma matriz de mucopolissacarídeos. Necessita de suprimento sanguíneo para transportar nutrientes, remover produtos de metabolização, regular a temperatura e a pressão (LACHMAN, LIEBERMAN e KANIG, 2010; RIBEIRO, 2010).

No tratamento de patologias da pele, o fármaco contido na forma farmacêutica aplicada deve ser capaz de penetrar e ficar retido na pele por um determinado tempo. A penetração do fármaco da pele depende de um grande número de fatores, incluindo as propriedades físico-químicas do fármaco, as características do veículo farmacêutico e as condições da pele em que será aplicado o produto (ALLEN, POPOVICH e ANSEL, 2007).

A pele tem sido muito utilizada para a liberação cutânea e percutânea de fármacos, mesmo constituindo uma barreira física, e isto é devido a diversas vantagens como, possibilidade de terapia local, diminuição dos efeitos adversos e anulação do efeito de primeira passagem na terapia sistêmica (WAGNER *et al.*, 2001; HENNING, SCHAEFER e NEUMANN, 2009).

3.4 Permeação cutânea

Permeação cutânea é a passagem de uma substância através da pele, chegando até suas camadas mais profundas, inclusive circulação sanguínea. Para produtos dermatológicos o sítio de ação está localizado em uma das camadas da pele, portanto, a determinação da quantidade de fármaco capaz de chegar à circulação não tem influência direta no efeito farmacológico (BEMVINDO, 2006).

A permeação através da pele se inicia pela transferência do fármaco da superfície da pele para o interior do estrato córneo (EC). As partículas do fármaco inicialmente precisam estar solubilizadas para que então possam sofrer partição e se difundir passivamente para a interface veículo/estrato córneo. Esta é a etapa limitante do processo, que ocorre devido à diferença de concentração. O fármaco pode atravessar a epiderme, chegar à derme e ser absorvido pelos vasos sanguíneos (GHAFOURIAN, 2010).

Como os lipídeos da pele são organizados em estruturas lamelares, moléculas de água podem ser incorporadas nas regiões interlamelares, entre os principais grupos hidrofílicos dos lipídeos. Como resultando desta estrutura, domínios hidrofílicos alternam-se com outros lipofílicos, formando-se, assim, caminhos para que os fármacos penetrem no EC (STORPIRTIS *et al.*, 2009).

O transporte através do EC é essencialmente por difusão passiva, a qual é definida como a transferência espontânea de um componente de uma região com alto potencial químico, para uma região com potencial mais baixo, sendo o gradiente de concentração a força condutora neste processo (AULTON, 2005).

Existem três rotas para o transporte de fármacos através da pele: a via transcelular, onde a molécula atravessa a membrana das células e encontra, no seu interior, um meio mais hidrofílico; a via intercelular, onde a molécula passa somente pela matriz lipídica sem penetrar nas células, e pelos apêndices (Figura 4) (MOSER *et al.*, 2001; SIQUEIRA, 2008; JEPPI *et al.*, 2013). A permeação através das vias intercelular e anexos cutâneos é dependente da afinidade dos compostos com o ambiente lipídico.

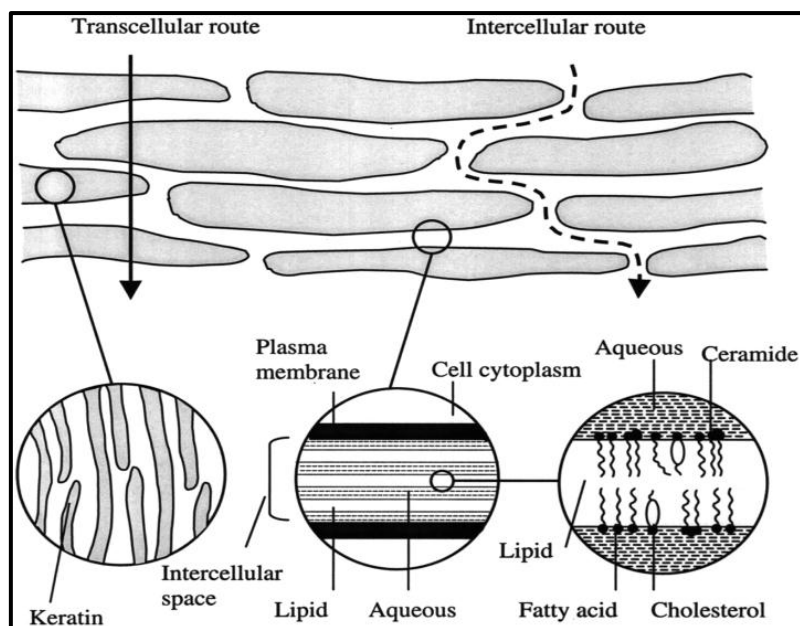


Figura 4. Rotas de permeação de fármacos através do estrato córneo. (MOSER *et al.*, 2001).

A etapa conhecida como liberação *in vitro* de formulações tópicas não depende somente da estrutura química e das propriedades do fármaco, mas também do veículo utilizado e do modo de preparação da formulação. Após a liberação pela formulação, a penetração através do EC irá determinar a disponibilidade local do fármaco. A determinação da quantidade de fármaco que chega ao local de ação é outra medida importante que pode prever a eficácia do produto tópico. A quantidade necessária para desencadear o efeito farmacológico dependerá da eficácia intrínseca do fármaco (BEMVINDO, 2006; GRAFOURIAN, 2010).

Geralmente a área-alvo, na maioria das perturbações dermatológicas, reside na epiderme viável ou parte superior da derme, isto requer penetração na pele por difusão ou absorção cutânea (LACHMAN, LIBERMAN e KANIG, 2010).

A quantidade de fármaco que pode ser transportado através da pele vai depender da capacidade da molécula para permear o tecido a uma velocidade em uma quantidade suficiente para atingir uma concentração eficaz no tecido biológico. Vários fatores são envolvidos neste, processo como espessura, temperatura, grau de hidratação, limpeza da pele, fluxo sanguíneo, concentração de lipídios, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, raça,

pH na superfície da pele, integridade do estrato córneo, propriedades físico-químicas do fármaco, coeficiente de partição da substância entre o veículo e o estrato córneo e as características do veículo da formulação (SAINO, 2010; SILVA *et al.*, 2010).

A pele pode ter sua permeabilidade alterada devido a fatores biológicos, como, o estado da pele (patologias), idade, fluxo sanguíneo e o metabolismo. (AULTON, 2005). A presença de enzimas na pele pode provocar alterações na estrutura das moléculas e alterar a biodisponibilidade tópica (NAIR *et al.*, 2013).

As propriedades ideais requeridas para uma molécula penetrar no estrato córneo são: baixa massa molecular (inferior a 600 Da), solubilidade água-óleo adequada, coeficiente de partição equilibrado e baixo ponto de fusão que se correlaciona com uma solubilidade ideal (AULTON, 2005).

3.5 Métodos *In Vitro* para avaliação de absorção percutânea

Segundo a World Health Organization (WHO, 2006), estudos de absorção cutânea *in vitro* estão sendo cada vez mais submetidos para fins de registro de produtos químicos e cosméticos. Muitos artigos publicados comparam resultados *in vivo* e *in vitro*, e estudos *in vitro* que seguem as diretrizes da Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) demonstram que esses testes proporcionam uma boa previsão de absorção cutânea.

O método *in vitro* mais utilizado atualmente e aceito pelos guias internacionais é o método de permeação cutânea utilizando células de difusão vertical de Franz (CDV), por apresentar grande reprodutibilidade (OECD, 2004; SARTORELLI *et al.*, 2000). O Food and Drug Administration (FDA) recomenda CDV empregando membrana sintética, para avaliar as alterações scale-up e pós-aprovação em formulações tópicas (U.S.FDA/CDER, 1997). Esse sistema possui dois compartimentos, um contendo o fármaco (compartimento doador) e outro contendo a solução receptora, na qual o fármaco deve ser solúvel, e de onde amostras são retiradas periodicamente para medir a taxa de permeação. Os compartimentos são separados por uma membrana natural ou sintética (FRIEND, 1992; KARADZOVSKA *et al.*, 2013).

A membrana é adicionada no compartimento doador, acima desta é colocado um anel de teflon de 150 mm de diâmetro interno, que é preenchido pela formulação semissólida a ser analisada, esta é ocluída por um disco de acrílico e o sistema é fechado com uma garra metálica. O compartimento receptor é mantido sob agitação. A cada tempo de coleta, amostras são coletadas do braço de amostragem e solução receptora repostada pelo braço para reposição, a fim de manter uma interface de membrana constante. (Figura 5).

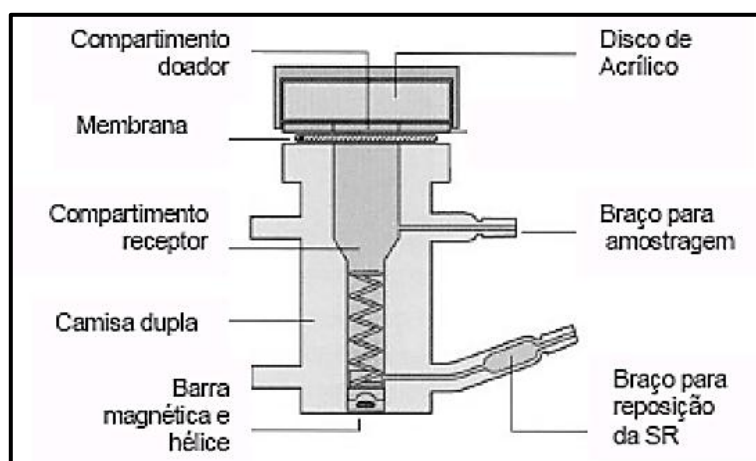


Figura 5. Célula de difusão vertical de Franz. Fonte: Adaptação do manual da célula – Henson Research Corp (SR = solução receptora)

Quando é utilizado um sistema *in vitro* para avaliar a absorção cutânea devem-se considerar seis pontos principais: tipo de célula, fonte de pele, viabilidade, preparação, composição de fluido receptor e apuração de resultados (POET e MCDUGAL, 2002).

O tecido humano seria a membrana preferível para o estudo de permeação e penetração de fármacos através da pele, em estudos realizados em laboratório. No entanto apresenta problemas como baixa disponibilidade e também questões éticas. Essas limitam seu uso e fazem com que se busquem alternativas para sua substituição (GODIN e TOUITOU, 2007).

Segundo Jacobi (2007), é preferível utilizar pele de porco ao invés de pele de outros animais (macaco, rato, coelho, gato, cavalo e cachorro) em estudos de permeação cutânea *in vitro*. O tecido suíno mostra semelhanças e poucas diferenças na estrutura comparando com a pele humana.

Barbero e Frasch (2009) realizaram um estudo para comparar a permeabilidade da pele humana e pele suína. Analisaram permeações cutâneas de 26 diferentes compostos químicos, o coeficiente de correlação encontrado entre as peles foi de 0,88 sendo este similar ao estudo realizado por outros pesquisadores. Esse dado indica que a pele suína é excelente substituta da pele humana.

Outro dado analisado por Barbero e Frasch (2009) foi a variabilidade intra pele humana e suína. A variabilidade para a pele humana foi de 23%, enquanto que para a pele suína foi 12%. Comparando a variação inter pele humana e suína apresentou 13%. Esses dados indicam, em geral, que a pele suína, além de substituta para a pele humana, apresenta menor variabilidade do que a esta.

Outra característica da pele que pode influenciar a permeação é a espessura. Estudos demonstram que uma espessura mais fina favorece um maior fluxo, enquanto que uma espessura mais grossa resulta numa maior quantidade de fármaco retida na pele (SAMARAS, RIVIERE e GHAFOURIAN, 2012).

A aplicação da técnica de liberação *in vitro* de produtos semissólidos é muito discutida por diversos autores para o controle de qualidade. Sugere-se que é uma técnica adequada para o monitoramento da uniformidade entre os lotes, podendo ser útil, também, no desenvolvimento galênico e otimização de formulações semissólidas (VAN BUSKIRK, 1994).

Normalmente, a permeação de substâncias ativas é insuficiente, sendo necessária a otimização da formulação para promover o aumento da penetração tópica na pele. Por esse motivo, substâncias denominadas promotores de permeação têm sido empregadas.

Promotores de permeação são compostos reconhecidos por modificar a fluidez dos lipídeos do estrato córneo. Seu efeito sobre a taxa de permeação pode ser muito grande, mesmo em fármacos que apresentam dificuldade de permeação através de pele (BOLZINGER *et al.*, 2012). São várias as substâncias citadas como promotores de permeação, como, azona, sulfóxidos e similares químicos, álcoois, ácido graxos, tensoativos, água, pirrolidonas e ureia (HADGRAFT, 2005; CHORILLI *et al.*, 2007; WILLIAMS e BARRY, 2012).

Algumas das características desejadas para os promotores de permeação são: não devem ser tóxicos ou provocar irritação e alergia; devem agir de modo a permitir que o agente terapêutico adira à pele; devem permitir que as

propriedades de barreira da pele retornem rapidamente e completamente quando forem removidos; devem ser compatíveis com o fármaco. Os mecanismos propostos de ação destes são reduzir a resistência do EC devido à alteração de suas propriedades físico-químicas; alterar a hidratação do EC; alterar a estrutura lipídica dos canais intercelulares pela desnaturação ou ação de solventes e mecanismos de transporte dos princípios ativos ionizáveis (ANSEL, POPOVICH e ALLEN, 2000; HADGRAFT, 2005; CHORILLI *et al.*, 2007; WILLIAMS e BARRY, 2012).

O modo de ação dos promotores de permeação em geral é complexo. Benson (2005) menciona que estas substâncias tem a capacidade de aumentar a permeabilidade de fármacos pelo desordenamento ou fluidificação da estrutura do EC ou por interação com a queratina da pele.

O propilenoglicol (propano-1,2-diol), é o glicol mais usado em produtos de aplicação tópica em preparações para a pele desde 1932, tanto como um co-solvente para materiais pouco solúveis e também para melhorar a permeabilidade do fármaco através da pele a partir de preparações tópicas (RAFEIRO, 2013). Quando o propilenoglicol foi utilizado em combinação com a azona, grandes quantidades de glicol entraram no tecido, o que promoveu a difusão intracelular de fármaco (PHILLIPS e MICHNIAK, 1995). Em estudo de permeação cutânea realizado por BENVINDO (2006), foi sugerido que a presença de propilenoglicol seria o responsável pela maior penetração do nitrato de miconazol nas camadas da pele.

3.6 Equivalência farmacêutica de produtos tópicos

Equivalentes farmacêuticos são medicamentos que contêm o mesmo fármaco, isto é, mesmo sal ou éster da mesma molécula terapeuticamente ativa, na mesma quantidade e forma farmacêutica, podendo ou não conter excipientes idênticos. Devem cumprir com as mesmas especificações atualizadas da Farmacopeia Brasileira e, na ausência destas, com as de outros códigos autorizados pela legislação vigente ou, ainda, com outros padrões aplicáveis de qualidade (BRASIL, 2003).

Equivalentes terapêuticos são quando dois medicamentos são considerados farmacêuticamente equivalentes e, após administração na mesma dose molar, seus efeitos em relação à eficácia e segurança são essencialmente os mesmos, o que se avalia por meio de estudos de bioequivalência apropriados, ensaios farmacodinâmicos, ensaios clínicos ou estudos *in vitro* (BRASIL, 2003).

No Brasil, medicamentos de uso tópico, não destinados a efeito sistêmico são dispensados de estudos de bioequivalência para registro de medicamento genérico, apenas deve ser demonstrada a equivalência farmacêutica (BRASIL, 2003; BRASIL, 2010; BRASIL, 2011).

Nos Estados Unidos, são necessários estudos clínicos para registro de medicamento genérico, já para mudança pós-registro é necessário o ensaio de liberação *in vitro* utilizando membrana sintética, sendo que o objetivo principal do teste de liberação é avaliar o desempenho da formulação e não mimetizar comportamento *in vivo* (U.S. FDA/CDER, 1997; SHAH, 2001).

A RDC 48 de 2009, que trata sobre a realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação e cancelamento pós-registro de medicamentos, publicada pela Agência Nacional De Vigilância Sanitária – ANVISA - institui que devem ser apresentados resultados comparativos entre a taxa de permeação cutânea da condição anteriormente registrada e da nova condição. Isto deve ser realizado quando ocorrer mudança de local de fabricação, processo produtivo, excipientes, rota de síntese do fármaco e nova concentração. É a primeira vez que tais estudos estão sendo cobrados como testes fundamentais no controle de qualidade de produtos de uso tópico (BRASIL, 2009).

A implementação de método *in vitro* para avaliação do desempenho de formas farmacêuticas de aplicação na pele é de grande importância, não somente para prever a penetração/permeação do fármaco nas camadas da pele, mas também pode constituir uma ferramenta valiosa para a comparação de produto genérico com o referência. Alguns autores também apontam sua validade no controle de variações dos lotes fabricados em escala industrial (SHAH, 1991; DE PAULA, MARTINS e BENTLEY, 2008). Indiscutivelmente, os estudos sobre a penetração/permeação cutânea são importantes para a otimização e desenvolvimento de formas farmacêuticas semissólidas. Através deles é possível obter dados que possibilitam um maior entendimento do que

ocorre desde a aplicação na pele, liberação do fármaco da forma farmacêutica, retenção e absorção percutânea.

Formulações de uso tópico são principalmente destinadas a fornecer concentração terapêutica eficaz de fármaco no local de aplicação (NAIR *et al.*, 2013). Atualmente, para a realização da quantificação de substâncias nas camadas da pele, tem sido preferido o método *in vitro* ao *in vivo*, pelo fato de apresentar menores problemas éticos, melhor reprodutibilidade dos resultados, possibilidade de variação de parâmetros e baixo custo (SELZER *et al.*, 2013)

3.7 Validação de metodologias analíticas

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação. O objetivo de uma validação é demonstrar que o método de análise do fármaco é apropriado à finalidade pretendida e deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas (RIBANI *et al.*, 2004; PALIOSA, 2012).

Uma orientação para a validação de métodos cromatográficos para a quantificação de compostos endógenos ou exógenos em matrizes biológicas é disponibilizada pelas agências reguladoras através de guias para validação de métodos bioanalíticos, as quais são documentos que recomendam uma linha a ser seguida, e são, portanto, flexíveis para permitir que os analistas possam adaptá-las de acordo com a situação (RIBANI *et al.*, 2004). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012, que dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, em substituição a RE 899 de 2003, que se trata de uma guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua a separação, a identificação e a quantificação dos compostos químicos. A cromatografia é um método físico-

químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição dos analitos em duas fases, que estão em contato íntimo, uma das quais estacionária, enquanto a outra movimenta-se em uma direção definida (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

A determinação de analitos em matrizes biológicas é sujeita a tantas variáveis que o método analítico não está realmente validado até que seja aplicado com sucesso em pelo menos um estudo (CAUSON, 1997). Devido à presença da matriz biológica, a variabilidade nesses ensaios é superior aos métodos analíticos físico-químicos e isto pode ser observada pela mais ampla faixa de aceitação dos resultados determinado pela legislação vigente (BRASIL, 2012).

3.8 Índices farmacocinético/farmacodinâmicos (PK/PD)

Farmacodinâmica (PD) é o estudo que estabelece uma relação entre a concentração do fármaco no receptor do órgão alvo e a intensidade do efeito farmacológico. Enquanto que farmacocinética (PK) é um estudo matemático do tempo transcorrido para absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos fármacos no organismo (KNOW, 2001; SINKO, 2008).

O estudo da relação PK/PD fornece informações clinicamente relevantes entre a farmacocinética e o efeito farmacológico da molécula em estudo (EMEA, 2000). Estes auxiliam na determinação da posologia dos fármacos e previsão de efeito farmacológico, através da combinação de parâmetros farmacocinéticos e as propriedades farmacodinâmicas (CSAJKA e VEROTTA, 2006).

Na área dos anti-infecciosos, o estudo dos índices PK/PD é pretendido para normalizar a exposição ao fármaco e a susceptibilidade do agente patógeno clinicamente relevante. No desenvolvimento de medicamentos, uma vez identificados e validados, esses estudos podem ser usados para otimizar o regime de dosagem terapêutica (SCHMIDT *et al.*, 2008).

Os índices PK/PD empregados para antifúngicos se assemelham aos aplicados a análise de antimicrobianos. Os principais parâmetros farmacodinâmicos utilizados são: concentração inibitória mínima (MIC), que reflete a menor concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento viral

visível e a concentração média efetiva (IC_{50}), que indica a concentração necessária para atingir 50% da atividade antiviral (ARAÚJO, 2008). Os parâmetros farmacodinâmicos podem ser quantificados *in vivo*, embora sejam mais frequentemente medidos *in vitro*. No caso de agentes antivirais, estes estudos são conduzidos utilizando células Vero, as quais são originadas de rins de macacos africanos. Essas células são mantidas em placas e infectadas com concentrações conhecidas de vírus. Após um determinado tempo em contato, as células são tratadas com o fármaco em estudo e essas são fixadas para contagem em placas virais. O título do vírus é determinado de acordo com o número de placas virais (unidade formadora de placa/mL) (COSTA, 2007; CAVALLI *et al.*, 2009).

Os modelos farmacodinâmicos mais utilizados para descrever a relação concentração versus efeito do fármaco são os modelos E_{max} e E_{max} – sigmoidal. O modelo de E_{max} descreve uma relação hiperbólica entre concentração-efeito, onde não se observa efeito na ausência de fármaco e um efeito máximo quando as concentrações tendem ao infinito (Equação 1). Enquanto que o modelo E_{max} – sigmoidal, sendo uma variação do primeiro, é utilizado quando a curva concentração-efeito não pode ser descrita de forma hiperbólica simples (Equação 2) (MOUTON *et al.*, 2005).

$$E = \frac{E_{max} \cdot C}{EC_{50} + C} \quad (1)$$

$$E = \frac{E_{max} \cdot C^s}{EC_{50}^s + C^s} \quad (2)$$

Onde E é o efeito farmacológico do fármaco; E_{max} é o efeito farmacológico máximo obtido pelo fármaco; C é a concentração do fármaco; EC_{50} é a concentração onde 50% do efeito máximo é medido; 's' é o fator de Hill (reflete o número de moléculas do fármaco que se liga a cada molécula do receptor), parâmetro que define a forma sigmoidal da relação efeito-concentração (MOUNTON *et al.*, 2005).

4.1 MATERIAL

4.1.1 Seleção dos produtos farmacêuticos presentes no mercado

Para a seleção dos cremes dermatológicos, genérico e similar, foram analisadas marcas de cremes contendo ACV 5% disponíveis no mercado brasileiro em relação aos seus excipientes, sendo estes comparados com o medicamento referência (Zovirax®). Na Tabela 1, é apresentada a composição qualitativa dos produtos escolhidos disponíveis nos estabelecimentos comerciais, sendo que estes foram classificados de acordo com sua ação/função na formulação.

- **REFERÊNCIA (R):** Zovirax® Medicamento Referência Nacional conforme Lei 9.787/99. Fabricados por Glaxo SmithKline Farmacêutica Ltda. Bisnagas com 10 g de creme contendo 5% de aciclovir adquiridas no mercado nacional. Lotes:
SD0225V (lote 1). Fabricação: 04/2013. Validade: 04/2016.
TA0160V (lote 2). Fabricação: 01/2014. Validade: 01/2017.
- **GENÉRICO (G):** Aciclovir 5%. Medicamento Genérico conforme Lei 9.787/99. Fabricado por Prati-Donaduzzi. Bisnagas com 10 g de creme contendo 5% de aciclovir adquiridas no mercado nacional. Lotes:
L13I644 (lote 1). Fabricação: 09/2013. Validade: 09/2015.
L14H74 (lote 2). Fabricação: 08/2014. Validade: 08/2016.
- **SIMILAR (S):** Aciclomed®. Medicamento Similar. Fabricado por Cimed Indústria Farmacêutica Ltda. Bisnagas com 10 g de creme contendo 5% de aciclovir adquiridas no mercado nacional. Lotes:
L1305246 (lote 1). Fabricação: 06/2013. Validade: 06/2016.
L1305507 (lote 2). Fabricação: 06/2013. Validade: 06/2016.

Tabela 1. Composição qualitativa dos cremes de aciclovir 5% selecionados (a água e o ACV são constituintes de todas as formulações não apresentados na tabela).

Fabricante (Produto)	Conservante	Emulsificante	Veículo lipofílico/emoliente	Promotor de absorção/veículo
Glaxo SmithKline (Referência)	-	Álcool cetosteárilico, polaxamer407, lauril Sulfato de sódio	Vaselina, parafina líquida.	Propilenoglicol
Prati-Donaduzzi (Genérico)	Propilparabeno Metilparabeno	Álcool cetosteárilico, lauril Sulfato de sódio	Petrolato líquido.	Propilenoglicol
Cimed (Similar)	Propilparabeno Metilparabeno	Cera emulsionante	Petrolato amarelo	-

4.1.2 Equipamentos e Acessórios

- Agitador de tubos (Vortex). CERTOMAT MV;
- Balança analítica. AND (HM-202)
- Células de difusão tipo Franz. HANSON RESEARCH CORP. Orifício com 150 mm de diâmetro, resultando em 1,76 cm² de área, 7 mL de capacidade;
- Pipetas automáticas de 20, 200, 1000 µL e 10 mL. BRAND;
- Agitador magnético. IKA LABORTECHNIK;
- Potenciômetro. HANNA.
- Banho de ultrassom. UNIQUE;
- Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). SCHMADZU;
- Viscosímetro rotacional. BROOKFIELD;
- Unidade descartável filtrante 0,45 µm de poro. MILLIPORE.

4.1.3 Reagentes e substâncias químicas de referências

- Metanol para CLAE. VETEC;
- Acetonitrila para CLAE. VETEC;
- Água mili-Q. MILLIPORE;
- Fosfato de potássio monobásico. NUCLEAR;

- Hidróxido de sódio. NUCLEAR;
- Padrão de Aciclovir da Farmacopeia Brasileira.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização dos cremes dermatológicos contendo Aciclovir 5%

4.2.1.1 Determinação do pH das formulações semissólidas

Para a determinação do pH das formulações semissólidas comerciais, utilizou-se um potenciômetro calibrado com solução tampão pH 4,01 e 6,86. As leituras foram realizadas nas amostras a 10% (p/v) dispersas em água.

4.2.1.2 Doseamento das formulações contendo Aciclovir

Para a determinação do teor de ACV presente nos cremes adquiridos, amostras de cada uma das especialidades farmacêuticas descritas na Tabela 1 foram preparadas conforme apresentado a seguir: uma quantidade da formulação creme, equivalente a 10 mg de ACV foi previamente pesada, colocada em balão de 100 mL deixada em placa agitadora com 10mL de hidróxido de sódio 0,1M durante 30 minutos. Após, a completa dispersão do creme, o volume foi completado com água. Após, foi realizada a filtração com papel filtro e uma alíquota de 1,0 mL foi transferida para balão volumétrico de 10 mL, obtendo a concentração final de 10 µg/mL. Por fim, as amostras foram filtradas com membrana de polissulfona com tamanho do poro de 0,45 µm e analisadas por CLAE.

4.2.1.3 Comportamento reológico das formulações semissólidas

As análises reológicas foram realizadas a 25 ± 1 °C empregando um viscosímetro rotacional (modelo LVDV II + Pro, Brookfield, EUA) equipada com spindle SC4-25 e um adaptador para pequenas amostras. Dez pontos diferentes foram medidos com intervalo de taxa de cisalhamento de $0,05 \text{ s}^{-1}$, em triplicata.

A fim de estabelecer o comportamento reológico, os resultados foram tratados com o software Rheocalc (versão V3.1-1, Brookfield, EUA), onde foram utilizados os seguintes modelos de fluxo: Modelo de Casson (Equação 1), a lei das potências (Equação 2), e modelo Herschel-Bulkley (Equação 3).

$$\tau = \tau_0^{0.5} + \eta^{0.5} \dot{\gamma}^{0.5} \quad (1)$$

$$\tau = \kappa \dot{\gamma}^{0.5} \quad (2)$$

$$\tau = \tau_0 + \kappa \dot{\gamma}^{0.5} \quad (3)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento, τ_0 é a tensão de cedência, η é a viscosidade, κ é o índice de consistência, e $\dot{\gamma}$ é a velocidade de cisalhamento. O modelo com maior coeficiente de correlação foi considerado o de escolha para descrever o comportamento das formulações semissólidas.

4.2.2 Condições Cromatográficas

Durante o desenvolvimento do método por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação do ACV foram testados diferentes sistemas. Foram averiguadas as condições empregadas para análise de outros fármacos da mesma categoria, como, por exemplo, o penciclovir, que apresenta grande semelhança estrutural em relação ao ACV (MEIRA, 2013). O método de escolha foi determinado através da avaliação dos parâmetros cromatográficos ideais (tempo de retenção, assimetria, fator de retenção, repetibilidade de injeções e pratos teóricos).

Para a realização das análises, utilizou-se cromatógrafo a líquido, marca SHIMADZU, modelo 20A, equipado com bomba de fluxo LC20AT, injetor automático SIL-20A/C, desgaseificador DGU-20A5, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, forno CTO-20A/C e controlador CBM-20A

As condições cromatográficas empregadas para a realização da análise quantitativa por CLAE estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições cromatográficas utilizadas na validação do método por LC-UV para determinação de ACV.

Parâmetro	Descrição
Coluna	Phenomenex® C8 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm de diâmetro das partículas)
Fase Móvel	Água:metanol (95:5)
Volume de Injeção	50 µL
Vazão	1,0 mL/minuto
Detecção	Quantificação em 254 nm,
Temperatura do forno	25°C

Os seguintes parâmetros de desempenho analítico foram avaliados a fim de garantir os resultados obtidos pelo método de LC-UV para a quantificação do ACV: especificidade, linearidade, efeito matriz, efeito residual, exatidão, precisão, limite de quantificação e de detecção (BRASIL, 2012; ICH, 2005).

4.2.3 Obtenção e preparo da pele suína e de suas principais camadas

4.2.3.1 Obtenção e preparo

Orelhas de suínos foram obtidas da Cooperativa dos Suinocultores do Caí Superior (Harmonia, RS), estabelecimento devidamente fiscalizado pelo Ministério da Agricultura. Os animais eram abatidos durante o sexto e sétimo mês de vida e pesavam em torno de 110 kg. Inicialmente, as orelhas foram lavadas com água corrente e após a pele da parte externa da orelha era descolada com auxílio de bisturi, e cortada em pedaços de acordo com o teste a ser realizado, embaladas em filme de polietileno e papel alumínio e os segmentos foram armazenados em freezer (-20°C) por não mais que um mês. Para a validação das condições de extração, foram cortados segmentos circulares de 1,5 cm de diâmetro (1,77 cm²) com cuidado de não utilizar as partes com vasos sanguíneos e marcações.

4.2.3.2 Separação das camadas da pele e contaminação das matrizes com ACV

Para a separação da epiderme e derme, os segmentos de pele foram imersos em água 60°C por 45 segundos, de acordo com a metodologia clássica de separação descrita por Kligman e Christophers (1963), e logo após a epiderme foi separada da derme, cuidadosamente, com auxílio de bisturi. A derme foi seccionada em pequenas partes com tesoura e as camadas assim separadas foram transferidas para tubos de ensaio. A separação foi conduzida com pele recém descongelada para a validação do método de extração do ACV das camadas. Em um teste preliminar, derme e epiderme foram adicionadas a 50 µL de uma solução contendo concentração conhecida de ACV em água e mantidas em repouso durante 2 horas.

4.2.3.3 Extração de aciclovir (ACV) das camadas da pele

Em um trabalho realizado pelo grupo de pesquisa demonstrou-se que o melhor resultado para extração de penciclovir das camadas cutâneas, o qual apresenta estrutura semelhante ao ACV, é a água devido a melhor recuperação do fármaco das matrizes da pele e também a semelhança de polaridade com a fase móvel (MEIRA, 2013). Por este motivo utilizou-se a água como solvente extrator.

O ciclo de extração do ACV das camadas da pele foi realizado adicionando-se 4 mL de água a cada tubo de ensaio que continha a matriz biológica e levando-se ao ultrassom por 40 minutos. Após, os tubos de ensaio foram submetidos a centrifuga para separação do material biológico e do sobrenadante. Ao final deste procedimento, a solução extratora foi filtrada através de membrana de 0,45 µm para vials apropriados ao cromatógrafo e então levadas ao equipamento para quantificação de ACV.

4.2.4 Validação do método bioanalítico por CLAE-UV para a quantificação de ACV aplicado ao estudo de penetração cutânea

Os seguintes parâmetros de desempenho analítico foram avaliados:

- **Seletividade:** importante parâmetro a ser avaliado para garantir a habilidade do método bioanalítico em diferenciar o analito na presença de outros componentes da amostra, da matriz, compostos endógenos ou fármacos coadministrados, os quais a presença é esperada (FDA, 2001; CASSIANO *et al.*, 2009). Segundo a resolução 27/2012, que trata sobre validação de métodos bioanalíticos, as respostas de picos interferentes próximo ao tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras do limite inferior de quantificação. Foi verificada também a pureza do pico, a qual é indicativa de que o sinal cromatográfico é atribuído a um só componente. Amostras de epiderme e derme sem adição de fármaco e sem contato com as formulações foram submetidas ao processo de extração descrito no item 4.2.3.4 e as soluções resultantes analisadas por CLAE.
- **Efeito Matriz:** este efeito ocorre quando substâncias inerentes à matriz biológica coeluem com os compostos de interesse. Segundo a RDC 27/2012, para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado (FMN) que é calculado através da divisão da resposta do analito em matriz pela resposta do analito em solução (4 mL de água e 50 µL de solução contendo 1 mg/mL de ACV). O desvio padrão relativo (DPR) de 6 respostas avaliadas deve ser inferior a 15%. Foi realizada com orelhas de animais distintos, separadas e adicionado 50 µL de solução contendo 1 mg/mL de ACV, adicionou-se 4 mL de água e procedeu-se o processo de extração.
- **Efeito Residual (Carry over):** é o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito causado por eventual contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente. Foram analisado três injeções da mesma amostra branco (solvente extrator com matriz, sem fármaco), sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma amostra contendo matriz biológica e ACV na maior concentração da curva padrão (25 µg/mL).

- **Linearidade:** estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área do sinal cromatográfico) e a concentração do analito, sendo que deve demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para isto foram preparadas três curvas padrão, em três dias consecutivos, cada uma com 8 níveis de concentração. Duas soluções estoque de ACV de 100 µg/mL e 25 µg/mL em água com matriz biológica, foram preparadas e a partir destas, diluições realizadas de modo a obter as concentrações de 0,5; 2,5; 5; 10; 12,5; 15; 20 e 25 µg/mL. As áreas dos picos foram plotadas contra a respectiva concentração de ACV para obter a curva analítica. Os resultados foram submetidos à análise de regressão linear que foi calculada pelo método dos mínimos quadrados e à análise de variância para conformidade do modelo linear e, também, foi realizada a avaliação da significância do intercepto.

- **Exatidão (recuperação)** é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Representa a concordância entre os resultados obtidos pelo método e os valores nominais, aceitos como referência. Para a determinação da exatidão (recuperação) do ensaio, amostras de derme e epiderme, devidamente separadas, foram fortificadas com 50 µL de ACV em três níveis de concentração conhecidas, baixo, médio e alto, que correspondem, após adição do solvente extrator, à concentração final, tanto para derme como para epiderme, de 0,5; 12,5 e 25 µg/mL. Foram deixadas em contato por duas horas para impregnação do ACV nas camadas de pele. Após, adicionou-se 4 mL de água e procedeu-se a extração. Cada nível foi preparado em triplicata, em dois dias diferentes.

- **Precisão:** é a proximidade dos resultados obtidos por repetidas aferições de múltiplas alíquotas de uma única fonte de matriz. A precisão foi realizada conjuntamente com o ensaio de exatidão, analisando-se os resultados obtidos a partir de, no mínimo, seis determinações, as quais contemplaram a faixa de trabalho, em três concentrações, baixa, média e alta (0,5; 12,5 e 25 µg/mL, respectivamente). Foi calculada a precisão intra-dia e inter-dia.

• **Limite de quantificação e limite de detecção:** O limite de detecção (LQ) é a menor concentração de um analito que o método analítico consegue diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. Enquanto que o limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração do analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantitativamente determinado com valores aceitáveis de precisão e exatidão (BRASIL, 2003; CASSIANO, *et al.*, 2009). O LQ e LD foram estimados com base nos parâmetros das curvas obtidas e confirmados experimentalmente nas concentrações de 0,3; 0,4 e 0,5 µg/mL (Figura 6) (BRASIL, 2003).

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (A) \qquad LD = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (B)$$

Figura 6. Equações para determinar o limite de detecção (A) e quantificação (B) segundo RE 899, 2003. DP_a é o desvio padrão do intercepto da curva padrão e o IC é a inclinação da curva padrão. Esses foram obtidos através da curva média dos três dias de análise.

4.2.5 Estudo de permeação/retenção cutânea *in vitro* de formulações semissólidas contendo ACV

Os estudos de permeação/retenção *in vitro* foram conduzidos em Células de Difusão Vertical de Franz, possuindo um compartimento receptor com capacidade de 7 mL e uma área de difusão de 1,77 cm². Os cortes de pele suína foram circulares e no tamanho da circunferência externa da célula para melhor adesão.

Segundo recomendações do FDA (U.S. FDA/CDER, 1997), tampão aquoso pode ser utilizado como meio receptor em estudos de liberação *in vitro*, quando o fármaco for solúvel em água. A solubilidade do ACV em água é de 1,3 mg/mL. Cabe apontar que a cada hora, por ocasião da amostragem, um mL de meio receptor novo era renovado no compartimento inferior da célula e, considerando o fato de que a pele não é uma membrana inerte e limita a passagem do fármaco para o receptor, a condição sink fica assegurada. Desta

forma, o meio receptor utilizado foi tampão fosfato pH 7,4. Antes da utilização o meio foi filtrado (0,45 μm) e desgaseificado para evitar a formação de bolhas na parte inferior da pele.

Após descongelamento, segmentos de pele foram dispostos na célula, com o estrato córneo (EC) faceando o compartimento doador e derme em contato com a solução receptora, evitando a formação de bolhas. Acima da membrana foi colocado um anel de teflon, de 150 mm de diâmetro interno, que teve seu orifício totalmente preenchido pela formulação em estudo, resultando em, aproximadamente, 400 mg de creme equivalente a 20 mg de ACV. A formulação foi ocluída por disco de acrílico e o sistema foi fechado com uma garra metálica. A pele suína foi mantida em contato com a solução receptora, tampão fosfato pH 7,4, em temperatura de 32 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$), por um período de 8 horas, sendo o compartimento inferior constantemente agitado por uma barra magnética de 5 mm acoplada a uma pequena hélice de inox (Figura 7).

Avaliou-se a penetração de ACV, a partir de três formulações comerciais adquiridas no mercado local denominadas, referência (R), genérico (G) e similar (S) de dois lotes diferentes, totalizando seis amostras.



Figura 7. Montagem da célula de Franz para estudo de permeação/retenção cutânea

Amostras de 1 mL da solução receptora foram coletadas nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas após aplicação da formulação, sendo repostos igual volume de

nova solução, mantendo-se, desta maneira, o volume constante no compartimento receptor. Totalizou-se 5 pontos de monitoramento da eventual permeação do fármaco através da pele, e foram submetidas à análise por CLAE, de acordo com as condições estabelecidas. Os estudos foram feitos em três dias diferentes (n=5 cada dia), e um controle negativo (sem formulação) para todas as especialidades farmacêuticas (R, G e S), dos dois lotes estudados.

Após as 8 horas de ensaio, as células foram desmontadas e a pele do compartimento doador removida. A formulação foi removida com auxílio de algodão umedecido. A epiderme foi separada da derme, mecanicamente, com auxílio de bisturi, após, foi pesada e acondicionada em tubo de ensaio para posterior ensaio de extração, utilizando-se 4 mL de solvente extrator, água. A derme foi picotada, pesada e acondicionada em tubo de ensaio contendo 4 mL de solvente extrator. Procedeu-se a extração conforme validado e descrito no item 4.2.3.3. Após, as amostras foram filtradas (0,45 μ m) e analisadas por método analítico previamente descrito. A cada dia de análise foi realizada uma curva padrão.

Para garantir que toda a quantidade de ACV estava sendo extraída, uma segunda extração foi realizada imediatamente após a primeira, no final do procedimento. Essa conduta foi adotada, pois na validação a impregnação do fármaco no tecido pode não resultar no mesmo estado na matriz que se apresenta na permeação. Quando mais que 10% da quantidade determinada na primeira extração, em ambas as camadas da pele, fosse quantificada na segunda extração, esta era contabilizada.

Os resultados foram obtidos e analisados em termos de quantidade de fármaco retido em cada camada por peso de pele, isto é em μ g de ACV por mg de pele. Quando detectada quantidade de ativo permeada os resultados são apresentados em μ g de ACV por cm^2 de pele.

4.2.6 Estudo farmacodinâmico - Simulação do efeito inibitório viral do ACV nas camadas da pele

A comparação dos efeitos esperados para as faixas de concentração encontradas nos ensaios de permeação *in vitro* do ACV em formulações dos

medicamentos referência, genérico e similar foram realizadas através de simulação com auxílio de um programa de computador específico (Scientist®), empregando-se um modelo de efeito inibitório para o ACV e os valores de concentração inibitória para 50% da replicação viral, descritos para diferentes cepas na literatura (JALÓN et al., 2003; GONG et al., 2004; SUZUKI, OKUDA e SHIRAKI, 2005; CAVALLI et al., 2009). O modelo utilizado é descrito pela equação abaixo:

$$E = E_0 - \frac{(I_{m\acute{a}x} \cdot C)}{(IC_{50} + C)}$$

Onde E é o valor do efeito esperado, E_0 é o valor do efeito na ausência da inibição gerada pelo fármaco, $I_{m\acute{a}x}$ é a inibição máxima gerada pelo fármaco (no caso a inibição da replicação viral causada pelo ACV), C é a concentração de ACV disponível para exercer o efeito e IC_{50} é a concentração necessária para gerar metade do efeito inibitório máximo (GABRIELSSON e WEINER, 2006).

4.2.7 Descarte de resíduos

Todos os resíduos químicos, bem como aqueles oriundos de material biológico, foram segregados, acondicionados e identificados segundo normas do plano de Gerenciamento de Resíduos implementado pela Resolução COSAT 01/07.

4.2.8 Análise estatística

Para análise dos resultados obtidos no estudo de permeação/retenção cutânea foi realizado ANOVA de uma via que permite análise de amostras múltiplas. Em seguida, para os dados que demonstraram resultados com diferenças significantes, foi realizado o teste de Tukey para comparação de médias. Os valores foram analisados utilizando os *softwares* Instat® e Sigmastat®.

5.1 Caracterização das formulações semissólidas obtidas do mercado nacional

Os produtos comerciais semissólidos contendo ACV foram selecionados com o objetivo de encontrar duas formulações com composições muito semelhantes e uma composição diferente. Desta forma, o produto R e o G selecionados apresentam excipientes com características próximas, e principalmente com a presença de propilenoglicol, o qual dependendo da concentração utilizada pode favorecer a permeação do fármaco. Em contrapartida, o medicamento S não continha em sua formulação este excipiente, portanto poderíamos encontrar diferentes concentrações de fármaco permeado/retido.

A determinação quantitativa de ACV nas formulações semissólidas comerciais é muito importante do ponto de vista físico-químico, e por meio desta análise, pode-se verificar se o teor de fármaco presente no creme encontra-se dentro da faixa exigida (90-110%). O doseamento foi realizado em triplicada e todas as amostras ficaram dentro da faixa determinada pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição (Tabela 3).

O potencial hidrogeniônico (pH) é um índice que indica a acidez, neutralidade ou alcalinidade de um meio qualquer, onde o valor do pH está diretamente relacionado com a quantidade de íons hidrogênio. A pele humana apresenta um pH levemente ácido (4,6 - 5,8), atuando na proteção contra bactérias e fungos. Portanto, formulações de uso tópico devem apresentar pH neutro ou ligeiramente ácido, onde o pH não deve ultrapassar 7,5, pois podem provocar alterações no pH da pele, permitindo a exposição desta a agentes sensibilizantes (BARATA, 1995; LEONARDI, GASPAR e CAMPOS, 2002). Na tabela 3 se encontra os resultados referente ao pH das formulações estudadas, observa-se que todas se encontram abaixo do limite acima citado, portanto são considerados produtos adequados para uso tópico. A diferença de pH entre o medicamento de referência e similar pode estar relacionada com os excipientes usados e com as diferentes concentrações destes, as quais não são informadas na bula do produto e, também, com a procedência das matérias-primas utilizadas na fabricação dos medicamentos.

Tabela 3. Resultados referentes ao doseamento de ACV e medição de pH nas formulações semissólidas selecionadas.

Lote	Amostras	Teor \pm DPR (%) *	DPR (%)	pH *
1	R	103,80	1,4	7,2
	G	106,77	0,8	7,1
	S	109,19	0,5	6,6
2	R	104,73	1,2	7,0
	G	106,62	1,0	7,2
	S	102,56	1,5	6,5

*Análises realizadas em triplicata

A reologia consiste no estudo do escoamento ou deformação de um material quando submetido a uma tensão. A compreensão do comportamento reológico auxilia no processo de desenvolvimento de um produto da área farmacêutica, para o entendimento da espalhabilidade, viscosidade, elasticidade e fluidez. Essas propriedades devem ser consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Além disso, a otimização das características reologias é fundamental, pois está associada à absorção e biodisponibilidade de um fármaco (ALLEN *et al.*, 2007; LACHMAN, *et al.*, 2010; NETZ, ORTEGA, 2002).

Os materiais, de acordo com suas características reológicas e propriedades de fluxo, são classificados em newtonianos e não-newtonianos. Os newtonianos são aqueles em que a viscosidade não é afetada por mudanças da taxa de cisalhamento. Os não-newtonianos podem ainda ser divididos em pseudoplásticos, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e sua estrutura é recuperada quando a taxa de cisalhamento retorna a zero; dilatante, em que a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento; e plástica onde o valor de cedência é caracterizado pela tensão de cisalhamento mínima necessária para produzir o escoamento. As formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, apresentam fluxo não Newtoniano (ANSEL, 2000; SCHRAMM, 2006).

Para formulações semissólidas, o fluxo pseudoplástico é o mais comum e o ideal. Neste não se verifica uma relação linear direta entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento (LACHMAN *et al.*, 2010).

Os reogramas (Figura 8) das formulações semissólidas contendo ACV demonstraram um decaimento da viscosidade quando submetido a uma força de

cisalhamento. O produto R apresentou maior decaimento comparando com o G e S, os quais a partir de $0,6 \text{ s}^{-1}$ se tornaram constantes.

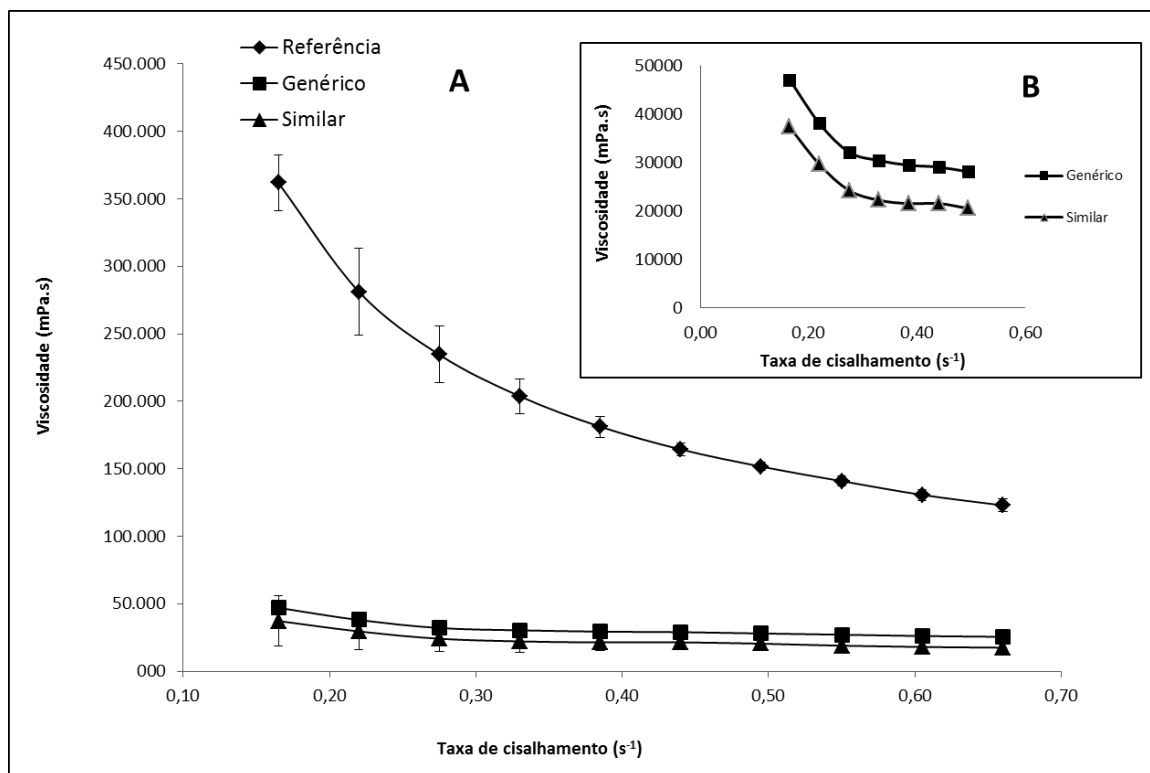


Figura 8. Reograma da viscosidade versus taxa de cisalhamento, referente às amostras de ACV analisadas (R, G e S) (A). Decaimento do produto G e S aproximado (B).

Modelos matemáticos são propostos para determinar os diferentes tipos de comportamento não-Newtoniano. Esses são descritos frequentemente pelos modelos: Herschel-Bulkley, Casson, Ostwald-de-Waele (lei das potências), Bingham e Mizrahi-Berk.

A decisão do modelo mais adequado deve ser realizada com base em parâmetros estatísticos. O melhor ajuste é analisado com base nos parâmetros de r^2 . Quanto menor valor de r^2 maior a distância dos pontos experimentais ao modelo ajustado. Portanto o modelo que melhor se ajusta é aquele que apresentar valor de r^2 mais próximo a 1 (GALLO, 2013).

Como apresentado na tabela 4 o modelo de Casson foi o que melhor se ajustou ($>0,99$) entre os modelos matemáticos, para descrever o comportamento reológico das amostras. Portanto as amostras analisadas contendo ACV (R, G e

S) apresentam comportamento não-newtonianos pseudoplástico, com diminuição da viscosidade quando aumenta a taxa de cisalhamento.

Tabela 4. Coeficientes de determinação (valores médios \pm desvio padrão) de três determinações referentes aos modelos que descrevem os comportamento não-newtonianos das especialidades farmacêuticas estudadas.

Especialidade Farmacêutica	Herschel-Bulkley	Casson	Lei da Potência (Ostwald-de-Waele)
R	0,9843 \pm 0,0059	0,9947 \pm 0,0031	0,9820 \pm 0,0096
G	0,9823 \pm 0,0032	0,9907 \pm 0,0064	0,9637 \pm 0,0038
S	0,9707 \pm 0,0023	0,9893 \pm 0,0047	0,9540 \pm 0,005

5.2 Validação bioanalítica do método de análise para quantificação do ACV

Previamente às análises das amostras por CLAE, realizou-se a conformidade do sistema que avaliou fator de retenção (k'), pratos teóricos (N), assimetria (TF) e repetibilidade das áreas dos picos. Estes testes são usados para verificar se a resolução e a repetibilidade do sistema são adequadas para a análise que será realizada, e garantir a confiabilidade e qualidade dos dados obtidos (Tabela 5) (SHABIR, 2003).

Tabela 5. Parâmetros de conformidade do sistema obtidos experimentalmente e os recomendados (SHABIR, 2003; BRASIL, 2012).

Parâmetro	Recomendação	Valor experimental*
Fator de retenção (k')	O pico deve estar bem separado dos outros picos e do pico não retido $k > 2$	2,12
Repetibilidade das injeções	Análise das áreas dos picos. DPR $< 15\%$ para $n > 5$	5%
Assimetria (TF)	TF < 2 . Picos muito assimétricos afetam a quantificação	1,22
Pratos teóricos (N)	Em geral deve ser maior que 2000 para CLAE	6000 - 3000

*Média de 6 determinações.

As condições analíticas utilizadas permitiram a resolução adequada do sinal do ACV em solução com a presença de matriz biológica, ainda com a constatação de um interferente da matriz biológica. Segundo a RDC 27/2012 a

presença de um sinal cromatográfico na análise da amostra branco que coincida com o tempo de retenção do analito de interesse, não deve se apresentar maior que 20% do limite inferior de quantificação. Com isto, na menor concentração, o interferente apresentou 2,95% de sinal na epiderme e 11,75% na derme em relação à área do fármaco em análise na concentração de 0,5 µg/mL (Figura 9). Foram realizadas diversas tentativas de alteração da fase móvel para eliminação total do interferente da matriz biológica. Foram realizadas alterações nas concentrações de metanol e água, porém não se obteve sucesso. Outra alternativa seria utilizar eluição em gradiente, porém não apresentou reprodutibilidade.

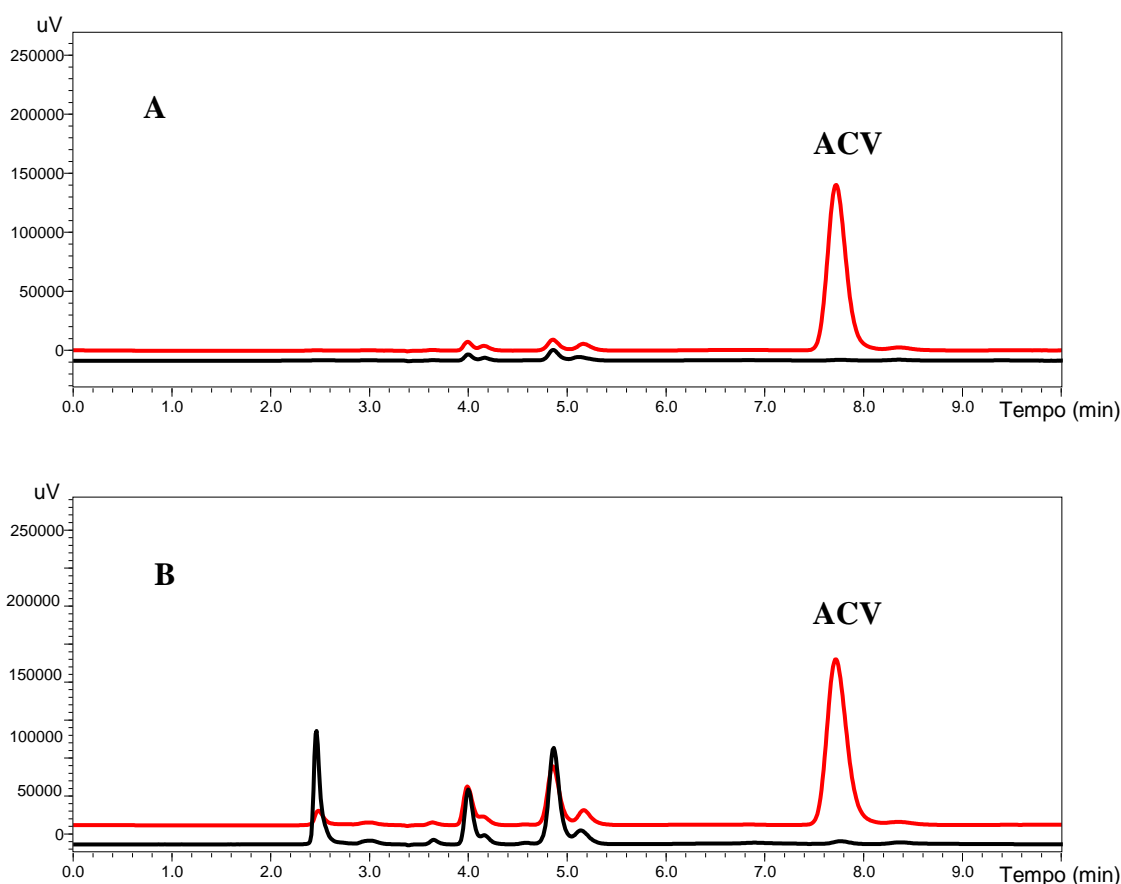


Figura 9. Especificidade do método cromatográfico para análise de ACV nas camadas da pele. A) Epiderme; B) Derme. A linha preta representa o branco (matriz biológica) e a linha vermelha solução de ACV na concentração 12,5 µg/mL, eluindo no tempo de retenção de 7,8 minutos.

Também foi realizada a análise da pureza do pico, a qual é projetada para detectar a presença de impureza que coelui com o analito (CASSIANO *et al.*,

2009). A avaliação da pureza do pico, a qual é feita pela comparação de espectros gravados com detector de arranjo de diodos durante o registro do sinal cromatográfico, foi realizada para confirmar que, mesmo com a presença do interferente no branco da matriz, o equipamento não identificou impureza no pico, como mostra a Figura 10. O valor do índice de pureza total do sinal de ACV foi 1,0, isso determina pureza ideal do sinal cromatográfico.

Esse interferente também foi avaliado pelo fator de matriz normalizado (FMN) e o valor encontrado foi 14%, considerado adequado para métodos bioanalíticos (BRASIL, 2009).

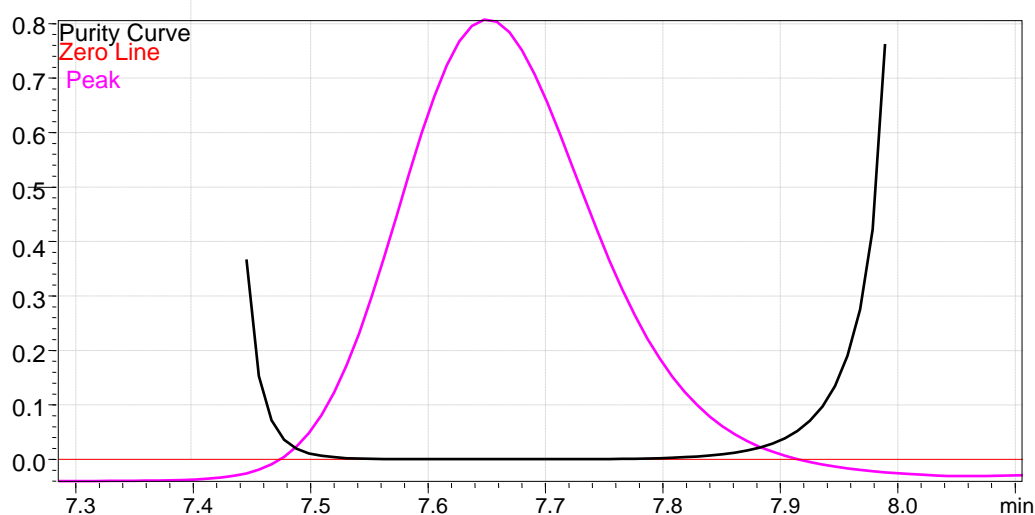


Figura 10. Perfil da pureza do pico do ACV em solução (contendo componentes da matriz.) na concentração de 10 µg/mL. Utilizando CLAE Shimadzu 20A, equipado com Coluna 8 (250 x 4,6 mm).

O método apresentou satisfatória linearidade na faixa de concentração de 0,5 – 25 µg/mL, nos três dias de análise. A representação gráfica da curva padrão de ACV nos diferentes dias encontra-se na Figura 11. A equação média obtida foi $y = 153656x + 33034$ e o coeficiente de determinação (r^2) igual a 0,9999. Isto demonstra a forte relação entre a concentração de ACV e a resposta do equipamento.

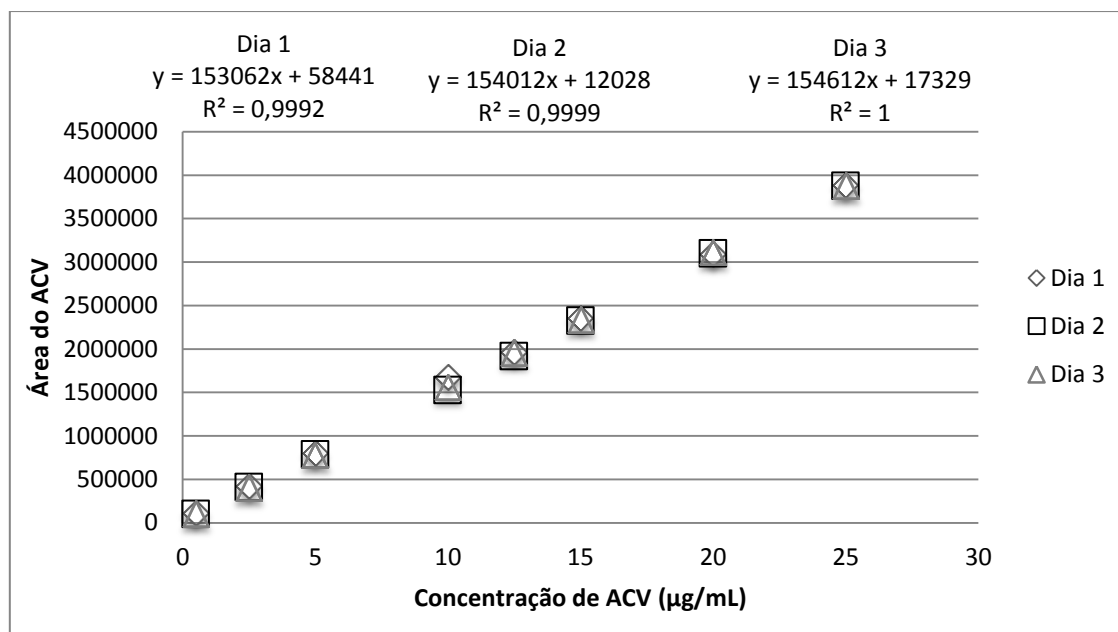


Figura 11. Representação gráfica da curva analítica de ACV na faixa de concentração de 0,5 – 25 µg/mL quantificados por CLAE Shimadzu 20A, equipado com Coluna 8 (250 x 4,6 mm)

A análise dos resíduos (Figura 12) um apresenta valor, na concentração de 10µg/mL, com desvio em relação à reta calculada, porém este não afetou a linearidade do método, sendo mantido na avaliação global

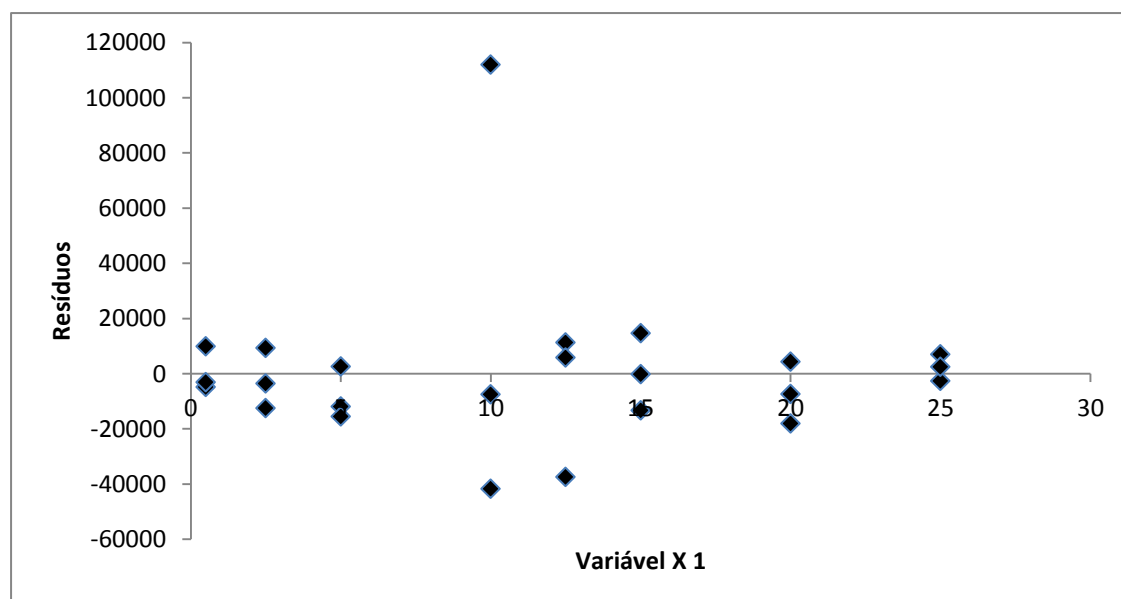


Figura 12. Gráfico dos resíduos da curva analítica de ACV por CLAE, onde a “variável X 1” corresponde a concentração na faixa de 0,5 – 25 µg/mL.

A análise estatística realizada por meio da ANOVA para verificar a linearidade do método esta demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Análise da variância (ANOVA) para ajuste do modelo linear da curva de concentração por CLAE.

Fontes de variações	GL	SQ	Variância	Fcal	F tab
Entre doses	7	$3,66 \cdot 10^{13}$	$5,22 \cdot 10^{12}$	5325,76	
Regressão linear	1	$3,66 \cdot 10^{13}$	$3,66 \cdot 10^{13}$	37278,19 ¹	8,53
Desvio linearidade	6	$2,06 \cdot 10^9$	$3,43 \cdot 10^8$	0,350 ²	4,20
Dentro	16	$1,57 \cdot 10^{10}$	$9,81 \cdot 10^8$		
Total	23	$3,66 \cdot 10^{10}$			

¹Significativo para $\alpha=0,05$

²Não significativo para $\alpha=0,05$

A partir dos dados fornecidos pela análise de variância (ANOVA) pode-se afirmar que a regressão foi significativa ($F_{\text{calculado}} = 37278,19 > F_{\text{crítico}} = 8,53$) sem desvio de linearidade ($F_{\text{calculado}} = 0,350 < F_{\text{crítico}} = 4,20$).

A análise da regressão linear mostrou intercepto estatisticamente não diferente de zero para os três dias de análise, com nível de significância de 5%.

Os limites de detecção e de quantificação foram 0,11 e 0,36 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, quando estimados por meio da equação que utiliza o desvio padrão do intercepto e a inclinação, a partir das curvas padrão (BRASIL, 2003). Estes resultados foram analisado experimentalmente por meio da análise da precisão de 5 injeções na concentração de 0,3; 0,4 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$, e apresentaram DPR de 0,77%, 1,26% e 2,20%, respectivamente. Estes resultados demonstram que o limite proposto é preciso e sensível.

A precisão do método foi apresentada em termos de repetibilidade de concentração recuperada de ACV presente na matriz biológica. Na Tabela 7 estão dispostos os dados obtidos para a recuperação de ACV a partir de camadas da pele (epiderme e derme) e os valores de desvio padrão relativos (DPR) para a repetibilidade (intra-dia) e precisão intermédia para cada nível de ACV adicionado às matrizes. Os dados de recuperação média foram de 92,74% para a epiderme e 90,65% para a derme e todos os níveis estão de acordo com as recomendações na literatura para métodos bioanalíticos (80 - 120%). No que se refere à precisão, os valores de desvio padrão relativo (DPR) estão na faixa de 4,36% – 6,77%, sendo considerados aceitáveis para método bioanalítico

(<15%) e indicando, também, adequabilidade do processo de extração e quantificação do ACV nas principais camadas da pele.

Tabela 7. Exatidão e precisão para o método bioanalítico para quantificação do ACV.

Camadas da pele	Níveis	Dia 1		Dia 2		
		Concentração observada	DPR (%) intra-dia	Concentração observada \pm DP	DPR (%) intra-dia	DPR (%) inter-dia
Epiderme	Baixo	0,42 \pm 0,02	4,92	0,43 \pm 0,02	4,65	4,36
	Intermediário	11,82 \pm 0,9	7,54	12,83 \pm 0,05	0,36	6,41
	Alto	22,41 \pm 1,50	6,72	24,46 \pm 0,24	0,99	6,32
Derme	Baixo	0,47 \pm 0,01	3,27	0,48 \pm 0,04	7,94	5,6
	Intermediário	10,95 \pm 1,2	10,33	11,35 \pm 0,16	1,38	6,77
	Alto	22,15 \pm 2,0	9,05	21,96 \pm 0,70	3,17	6,10

Assim, a validação do método bioanalítico por CLAE, com a utilização de coluna de fase reversa (C8) e detector (UV/DAD) que permitiu a análise qualitativa e quantitativa do ACV de maneira rápida e eficiente. Na análise da matriz biológica, o método mostrou-se reprodutível, sendo capaz de quantificar o fármaco retido no tecido cutâneo, fornecendo, assim, informações relevantes.

5.3 Permeação/retenção de ACV nas diferentes camadas da pele avaliadas através de experimento *in vitro*

A penetração de substâncias na pele depende, principalmente, de suas propriedades físico-químicas, do seu comportamento quando colocado em um sistema farmacêutico apropriado e, finalmente, da pele (CHORILLI *et al.*, 2007).

Para que o ACV tenha sua adequada efetividade, é necessário que este atinja concentrações terapêuticas nas células da camada basal da epiderme, pois é o local inicial para a propagação do vírus. Conseqüentemente, a penetração do fármaco na pele é o fator mais crítico para o sucesso da terapia

antiviral com o uso de formulações tópicas para tratamento de herpes labial (HASLER-NGUYEN *et al.*, 2009).

Embora a pele humana seja a ideal para testes de permeação cutânea, o uso é muito limitado, por isto são necessários modelos alternativos. A pele suína é considerada a melhor alternativa para a realização de permeação cutânea *in vitro*, uma vez que as características morfológicas e permeação são semelhantes com a pele humana (HUONG *et al.*, 2009; SAINO, 2010)

Os resultados da quantidade acumulada de ACV nas camadas da pele, ao final de 8 horas, para os três produtos no estudo de permeação/retenção cutânea estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

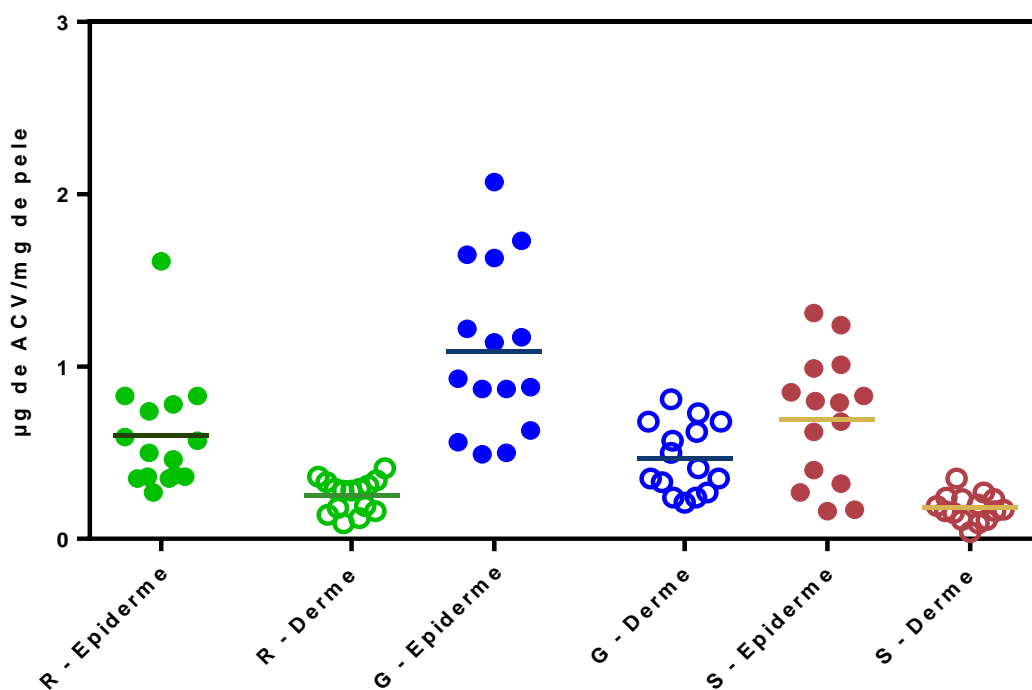


Figura 13. Quantidade retida de ACV nas camadas da pele suína referente ao primeiro lote dos produtos referência (R), genérico (G) e similar (S), expressa em µg/mg. Cada símbolo corresponde a um valor determinado e o traço horizontal corresponde a média (n = 15).

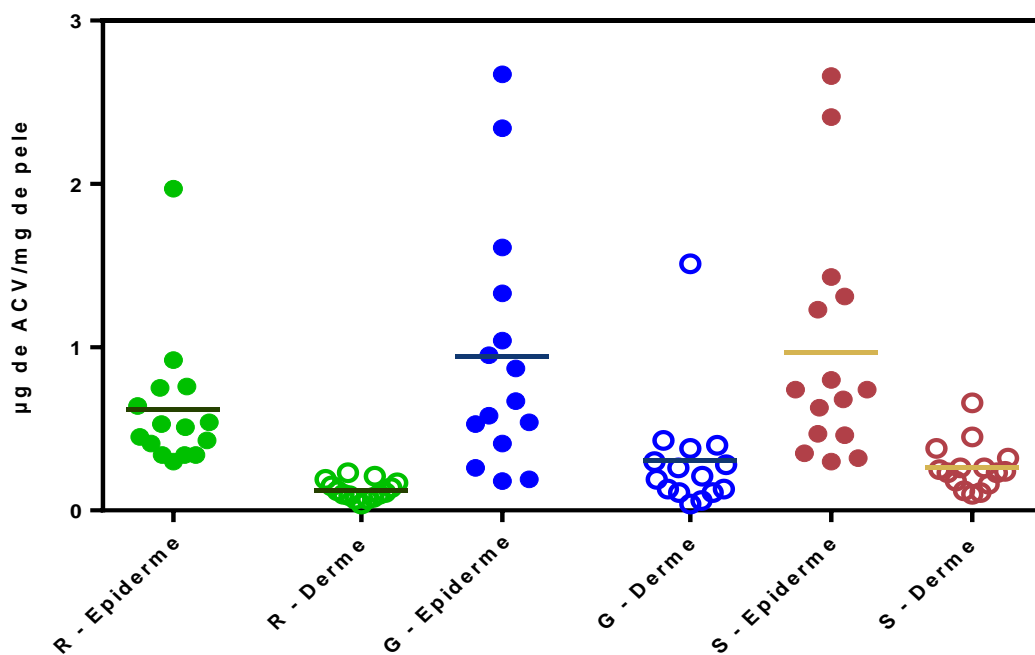


Figura 14. Quantidade retida de ACV nas camadas da pele suína referente ao segundo lote dos produtos referência (R), genérico (G) e similar (S), expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$. Cada símbolo corresponde a um valor determinado e o traço horizontal corresponde a média ($n = 15$).

Analisando a Figura 13, é possível observar, no geral, uma maior quantidade de ACV é obtida na epiderme do que na derme, sendo relevante para o efeito farmacológico do ACV contra o vírus. As quantidades de ACV retidas na epiderme e na derme do produto R e S foram consideravelmente inferiores à obtida com o produto G. O teste estatístico ANOVA com um fator foi realizado para comparação dos três produtos. Caso o resultado diferisse estatisticamente, seria aplicado o teste de Tukey, com o qual é possível identificar quais as populações diferentes entre si, mantendo controlado o nível de significância do teste. Realizando estas análises, foi confirmado que os resultados obtidos para o produto G são significativamente diferentes dos obtidos para os produtos R e S ($p < 0,05$).

Segundo a legislação vigente, o produto genérico deve conter o mesmo princípio ativo, na mesma dose, forma farmacêutica e apresentar excipientes de mesma função. Deve apresentar a mesma segurança que o produto referência no país podendo, com este, ser intercambiável. A intercambiabilidade, ou seja, a segura substituição do medicamento de referência pelo seu genérico é

assegurada por testes de bioequivalência/biodisponibilidade, quando aplicável. Já os medicamentos de uso tópico, não destinados a uso sistêmico, que contêm o mesmo fármaco, na mesma concentração que o referência e excipientes bem estabelecidos para a forma farmacêutica utilizada, são considerados bioisentos.

Consultando a RDC 58/2014, que trata sobre a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência, publicada pela ANVISA recentemente, constatou-se que o produto similar utilizado neste trabalho foi inserido na lista de medicamentos intercambiáveis, portanto pode ser oferecido em substituição ao referência assim como é o genérico. Para isso, os detentores de registros de medicamentos similares são obrigados a realizar estudos comparativos com o medicamento de referência, tais como, equivalência farmacêutica, perfil de dissolução e bioequivalência/biodisponibilidade relativa, se aplicável ao fármaco e forma farmacêutica. Os fundamentos científicos que conduziram à publicação da intercambialidade entre o medicamento S e o R não são de domínio público, mas os resultados obtidos neste estudo corroboram com a formalização da intercambialidade entre S e R. Tal fato não era propriamente esperado no delineamento inicial do trabalho, tendo em vista a composição qualitativa dos produtos.

A principal diferença entre as formulações R, G e S é a presença de propilenoglicol (PG) nas formulações R e G. Esse excipiente pode apresentar mais de uma função, além de veículo na formulação, pode ter ação como promotor de penetração nas doses usualmente utilizadas em produtos dermatológicos (TROTTEY *et al.*, 2004). O mecanismo da ação proposto seria a sua entrada no EC e aumento da solubilidade do penetrante, com consequente aumento do fluxo da passagem através do tecido (MOSER *et al.*, 2001). Uma vez que a quantidade deste excipiente presente no produto não é informada na bula, é possível que a diferente quantidade existente explique a maior concentração de ACV encontrada, do produto G, nas camadas da pele (WILLIAMS e BARRY, 2012).

Outra diferença que pode ser considerada é que as formulações R e G contêm em suas formulações lauril sulfato de sódio, o qual é um tensoativo aniônico. O mecanismo de ação ainda não se encontra totalmente esclarecido, no entanto, apresenta interações tanto com as queratinas, como com os lípidos intercelulares e também promove a alteração da conformação em hélice das

proteínas do estrato córneo, favorecendo a absorção de fármacos (NOKHODCHI *et al.*, 2003; RAFEIRO, 2013). Conseqüentemente, essa característica será diferente de uma formulação para outra, dependendo da concentração utilizada deste excipiente.

A viscosidade parece não ter uma analogia direta com a permeação/retenção dos produtos analisados. Nagelreiter, Kratochvilova e Valenta (2015) comentam, em um estudo, que o comportamento reológico parece ter pouca influência sobre a penetração do fármaco na pele, e o que influencia sua entrega para as camadas cutâneas é a característica da base do creme.

Por outro lado, quando realizado teste estatístico para o segundo lote (Figura 14), todas as formulações analisadas não apresentaram diferença significativa para a retenção de ACV nas camadas da pele (epiderme $p=0,962$; derme $p=0,109$).

O primeiro lote apresentou diferença significativa, enquanto o segundo não apresentou, sendo que essa diferença pode ser indicativa da não perfeita homogeneidade entre os lotes fabricados. Formas farmacêuticas semissólidas são formulações complexas e suas propriedades físico-químicas, de liberação e penetração dependem de vários fatores. No processo de fabricação de semissólidos, os pontos críticos são a separação inicial de um sistema de uma fase em duas fases e o momento em que o componente ativo é adicionado. Qualquer alteração em um desses processos pode alterar as propriedades termodinâmicas da formulação, resultando em uma permeação e liberação diferenciada (U.S.FDA/CDER, 1997).

Quando realizada análise estatística entre os lotes de mesma especialidade, foi observado que a formulação R apresentou retenção de ACV igual na epiderme e diferente na derme. Este fato ocorreu igualmente para o produto G (epiderme: $p=0,539$ e derme: $p=0,009$). Enquanto que para o produto S, comparando os dois lotes, a quantidade retida na epiderme ($p=0,206$) foi considerada igual, assim como na derme ($p=0,06$). Quando somadas as concentrações retidas nas duas camadas, o teste estatístico mostrou que não há diferença significativa entre os lotes dos produtos de mesma especialidade farmacêutica (Figuras 15). E, por fim, procedendo uma avaliação global, isto é, comparação entre os dois lotes dos três produtos selecionados, observou-se

diferença significativa apenas entre o produto R lote dois (R2) e o produto G lote um (G1). Embora na realizada separadamente para cada camada, identificou-se outras diferenças significativas entre os lotes estudados como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8: Comparação múltipla pelo procedimento de Tukey-Kramer realizado posteriormente à ANOVA entre os dois lotes dos três produtos para as quantidades de ACV nas duas camadas da pele.

Comparação múltipla – via Tukey-Kramer	Valor de p para Epiderme	Valor de p para Derme
R1 x G1	p<0,01**	p<0,01**
R1 x S1	p>0,05	p>0,05
R1 x R2	p>0,05	p>0,05
R1 x G2	p<0,05*	p>0,05
R1 x S2	p<0,05*	p>0,05
G1 x S1	p<0,05*	p<0,01**
G1 x R2	p>0,05	p<0,01**
G1 x G2	p>0,05	p<0,01**
G1 x S2	p>0,05	p<0,01**
S1 x R2	p>0,05	p>0,05
S1 x G2	p>0,05	p>0,05
S1 x S2	p>0,05	p>0,05
R2 x G2	p>0,05	p<0,05*
R2 x S2	p>0,05	p>0,05
G2 x S2	p>0,05	p>0,05

**diferença significativa para $\alpha = 0,01$

* diferença significativa para $\alpha = 0,05$

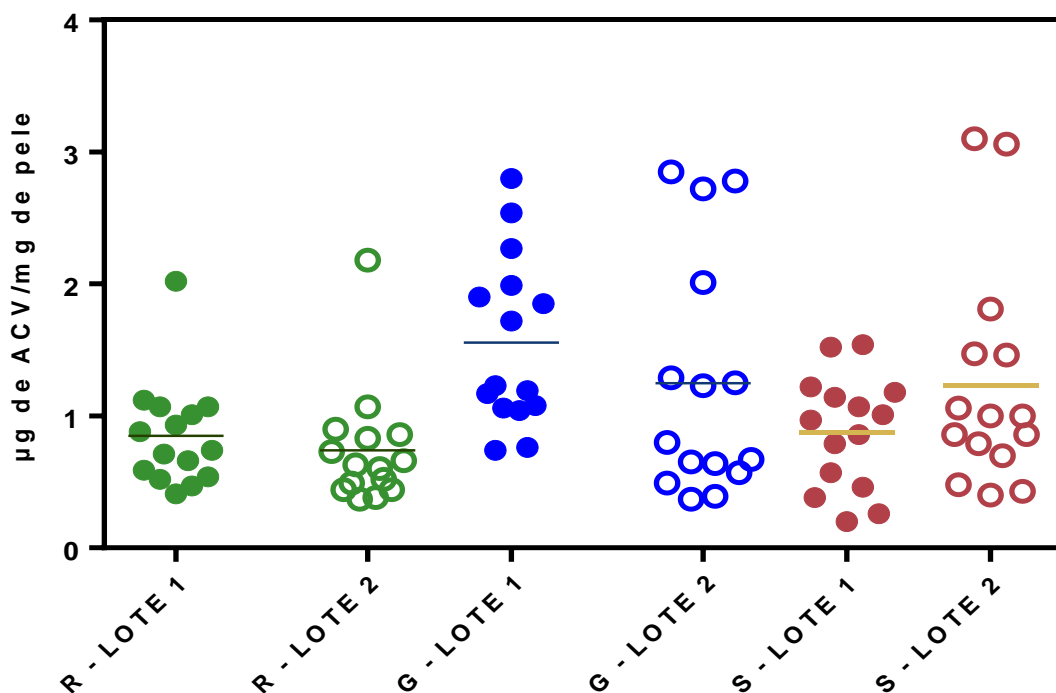


Figura 15. Quantidade retida de ACV do medicamento referência (R), genérico (G) e similar (S) somando as concentrações encontradas nas camadas da pele (epiderme+derme) para os dois lotes analisados.

Vale notar que nos experimentos realizados foram obtidos valores de desvio padrões (DP) elevados, que podem ser explicados pela variabilidade inerente do estudo, associada as características próprias do tecido cutâneo (pele suína) – variabilidade inter-individual entre os animais, crescimento, sexo, espessura da pele (Tabela 9) (GODIN e TOUITOU, 2007).

Tabela 9. Média e desvio padrão (DP) das 15 determinações referente ao estudo de permeação/retenção em pele suína para cada lote analisado

Especialidade Farmacêutica	Lote	Camadas da pele	Média ($\mu\text{g}/\text{mg}$)*	Desvio Padrão – DP ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
R	1	Epiderme	0,60	0,34
		Derme	0,25	0,10
	2	Epiderme	0,62	0,42
		Derme	0,12	0,06
G	1	Epiderme	1,09	0,49
		Derme	0,47	0,20
	2	Epiderme	0,94	0,76
		Derme	0,30	0,36
S	1	Epiderme	0,70	0,37
		Derme	0,18	0,08
	2	Epiderme	0,97	0,73
		Derme	0,26	0,15

*n=15

No que se refere às massas de epiderme e derme obtidas, durante todo o trabalho, estas indicam que o método de separação das camadas foi razoavelmente uniforme (Tabela 10) A variabilidade encontrada é referente à diferença de espessura de cada segmento de pele proveniente de diferentes animais, associada ao procedimento de separação das camadas.

Tabela 10. Média e desvio padrão dos pesos das camadas da pele para as 15 determinações no estudo de permeação/retenção cutânea (n=30) para cada lote analisado.

Especialidade Farmacêutica	Camadas da Pele	Média (mg)	Desvio Padrão – DP (mg)	Desvio Padrão Relativo – DPR (%)
R	Epiderme	21,7	5,9	27,3
	Derme	94,4	25,7	27,2
G	Epiderme	21,6	5,5	25,5
	Derme	84,5	22,2	26,3
S	Epiderme	23,2	8,4	22,0
	Derme	96,9	22,0	22,7
Média geral	Epiderme	22,2	6,7	30,2
	Derme	92,0	23,7	25,8

Como para cada dia de análise foi realizada uma curva padrão, os valores p do intercepto, a inclinação e o r^2 , estão dispostos nas Tabelas 11 e 12. Os interceptos de todos os dias de análise apresentaram valor-p maior que 0,05, ou

seja, foram considerados não significativos. Por este motivo, a equação da reta foi obtida com origem igual à zero para a análise dos resultados de área.

Tabela 11. Valores de inclinação, valor-p para o intercepto e coeficiente de determinação (r^2) para cada dia de permeação/retenção realizada, referente ao primeiro lote dos produtos.

Especialidades Farmacêuticas	Dia	Inclinação	Valor-P intercepto	r^2
R	1	170384	0,09	0,9997
	2	160255	0,18	0,9999
	3	157999	0,37	1,0
G	1	160734	0,15	0,9999
	2	160597	0,44	1,0
	3	161701	0,63	0,9973
S	1	156509	0,72	1,0
	2	147816	0,33	0,9949
	3	166878	0,75	0,9998

Tabela 12. Valores de inclinação, valor-p para o intercepto e coeficiente de determinação (r^2) para cada dia de permeação/retenção cutânea realizada, referente ao segundo lote dos produtos.

Especialidades Farmacêuticas	Dia	Inclinação	Valor-P intercepto	r^2
R	1	157627	0,68	0,9995
	2	158481	0,13	1,0
	3	160795	0,34	0,9999
G	1	157946	0,21	0,9999
	2	163831	0,84	0,9997
	3	156567	0,35	1,0
S	1	158320	0,32	1,0
	2	164942	0,17	0,9951
	3	160962	0,70	0,9999

Nas Figuras 15 e 16, estão apresentados os cromatogramas representativos das análises de ACV nas matrizes cutâneas (epiderme e derme) para todos os produtos farmacêuticos avaliados. Os picos apresentaram pratos teóricos (>2000) e fator cauda ($<2,0$) adequados até o final do estudo.

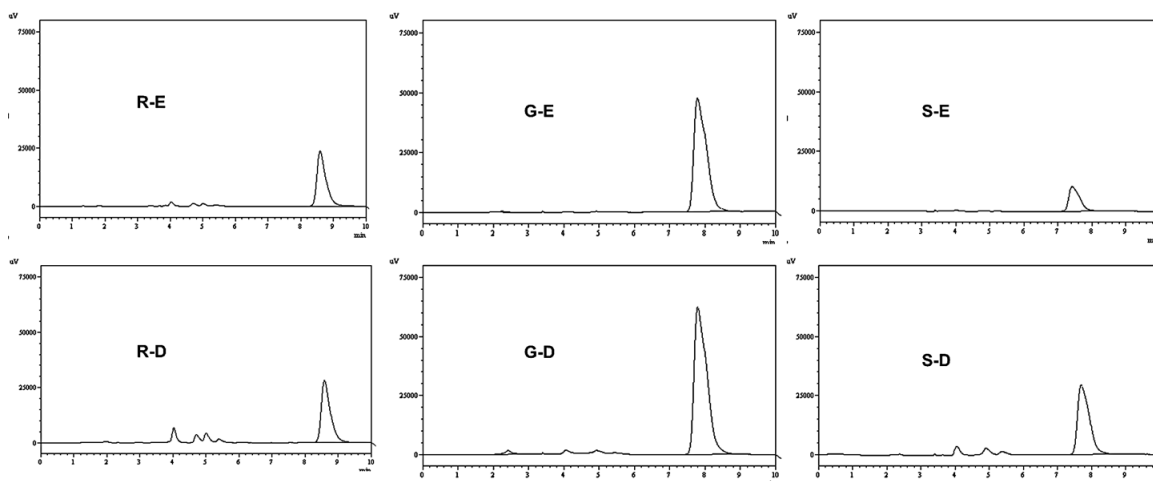


Figura 16. Cromatogramas representativos da permeação/retenção cutânea do ACV após 8h de contanto com o produto comercial (primeiro lote). Referência epiderme (R-E); Referência derme (R-D); Genérico epiderme (G-E); Genérico derme (G-D); Similar epiderme (S-E); Similar derme (S-D).

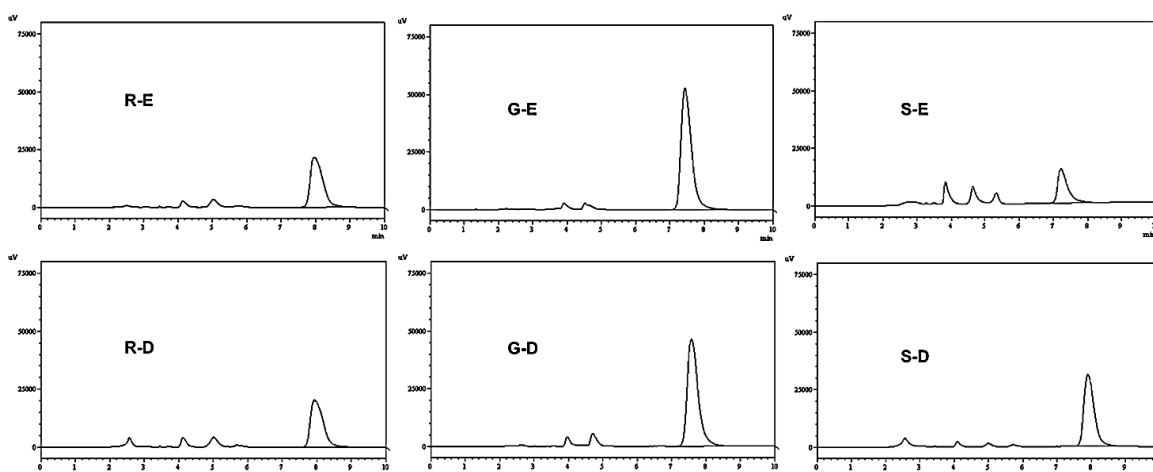


Figura 17. Cromatogramas representativos da permeação/retenção cutânea do ACV após 8h de contanto com o produto comercial (segundo lote). Referência epiderme (R-E); Referência derme (R-D); Genérico epiderme (G-E); Genérico derme (G-D); Similar epiderme (S-E); Similar derme (S-D).

Quando avaliada a permeação cutânea do ACV através da pele suína, não foram observadas, no tempo de estudo, quantidades detectáveis de ACV na solução receptora. Hasler-Nguyen e colaboradores (2009) sustentam que o ACV apresenta uma região hidrofóbica, e essa pode interagir com a estrutura hidrofóbica do EC prejudicando a permeação do fármaco. Pouca quantidade de ACV alcançou à derme e a difusão para a solução receptora não ocorreu em quantidades mensuráveis, durante o tempo de 8 horas. É possível que seja por estas particularidades que não foi detectada a presença de ACV no meio

receptor. Esse resultado corrobora com a liberação do ACV somente no tecido cutâneo, onde é desejado para tratamento efetivo antiviral, evitando, assim, atingir via sistêmica e causar efeitos adversos.

5.4 Estudo Farmacodinâmico – Simulação do efeito inibitório viral do Aciclovir nas camadas da pele.

O uso intenso de medicamentos antivirais conduziu ao desenvolvimento de cepas resistentes do vírus herpes simples, as quais estão comumente disseminadas, agravando-se ainda mais o problema de saúde em pessoas imunocomprometidas (SNOECK, 2000).

Como citado anteriormente, o ACV é um fármaco acíclico da guanosina, utilizado como antiviral por ser capaz de inibir a atividade da DNA polimerase viral, apresentando atividade contra o vírus herpes simplex HSV-1 e 2 (RANG *et al.*, 2007). Com isto, é esperada uma relação entre exposição e efeito, sendo que quanto melhor for a exposição frente ao fármaco maior deverá ser o efeito inibitório antiviral obtido.

Foram encontrados na literatura diferentes valores de inibição da replicação viral *in vitro* e *in vivo* do vírus Herpes HSV-1, cujos valores de IC₅₀ em ensaios de redução da atividade viral em placa utilizando células Vero, mostraram distintos padrões que puderam ser classificados em baixa, média e alta potência, mostrando que essa é uma característica da interação fármaco-vírus (espécie-específica).

Dados da literatura (HASLER-NGUYEN *et al.*, 2009; JALÓN *et al.*, 2003) indicam que as concentrações alcançadas na região da interface entre a epiderme e a derme são as mais relevantes em relação aos efeitos observados. Assim, nesse estudo, foram avaliadas as concentrações alcançadas por formulações de ACV nesses dois locais distintos e posteriormente somadas, no intuito de avaliar o impacto dessas concentrações na inibição da replicação viral (dinâmica).

Para a obtenção das curvas dose-resposta foram empregados três valores de IC₅₀: 0,049; 0,265 e 0,850 µg/mL; baixo, médio e alto, respectivamente, encontrados na literatura, os quais estão presentes na Tabela

13. Os valores baixo e médio adotados correspondem à média aritmética das concentrações (em $\mu\text{g/mL}$) apresentadas na Tabela 12.

Tabela 13. Valores de IC_{50} do ACV encontrados na literatura para diferentes cepas de HSV-1.

IC_{50} ACV	IC_{50} ACV ($\mu\text{g/mL}$) ¹	Técnica de análise	Referência
1,3 μM	0,293 ^(M)	-	Drug Bank
0,16 μM	0,036 ^(B)	Ensaio de redução viral em placa	Cavalli <i>et al</i> , 2009
0,85 $\mu\text{g/mL}$	0,850 ^(A)	Ensaio de redução viral em placa	Suzuki, Okuda e Shiraki 2005
1,06 μM	0,238 ^(M)	Ensaio de redução viral em placa	Jalón <i>et al</i> 2003
0,28 μM	0,063 ^(B)	Ensaio de redução viral em placa	Gong <i>et al.</i> , 2004

(A): valor alto de IC_{50} ; (M) valor médio de IC_{50} ; (B) valor baixo de IC_{50} .

1: calculados para padronizar a unidade em $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados mostraram que as concentrações de ACV alcançadas na pele total, para todas as especialidades farmacêuticas estudadas e os dois lotes analisados apresentariam efeito antiviral muito superior a 50% de inibição. Com isto, pode-se considerar que os produtos estudados são capazes de fornecer ACV no tecido cutâneo em quantidades que superam o IC_{50} da replicação viral, mesmo frente a cepas que apresentam IC_{50} elevado. Na figura 18, está apresentado o gráfico obtido aplicando a equação descrita no item 4.2.6 para as concentrações de ACV na pele alcançadas a partir da formulação S. Pode-se observar o alcance de 99-100% de efeito inibitório para toda a faixa de concentração de fármaco no tecido cutâneo ($\mu\text{g/g}$), empregando IC_{50} de 0,850 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações teciduais de ACV, neste caso, foram expressas em $\mu\text{g/g}$ para emprego na equação mencionada, tendo em vista que os valores de IC_{50} foram normalizados para $\mu\text{g/mL}$. Esta conduta presumiu a densidade cutânea igual à unidade, o que, mesmo não sendo expressa absolutamente real, não compromete a avaliação, considerando a diferença entre o parâmetro de inibição (IC_{50}) e os resultados experimentais de fármaco no tecido cutâneo.

Portanto, acredita-se que os medicamentos disponíveis hoje no mercado brasileiro, apresentam adequado efeito terapêutico contra o vírus da herpes, sendo capazes de eliminar o vírus e reduzir os sintomas (prurido, ardor e rubor) causados por este.

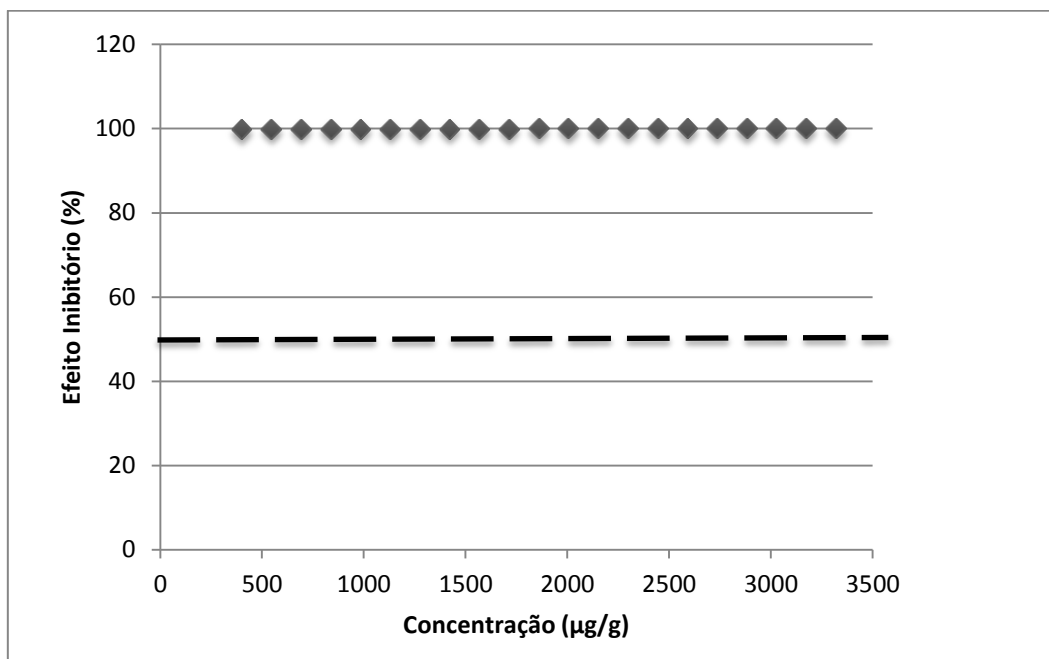


Figura 18. Gráfico representativo da simulação do efeito inibitório para o ACV em relação às concentrações encontradas na pele no estudo de penetração cutânea obtido para produto S. A linha pontilhada indica 50% da inibição viral para $IC_{50} = 0,850 \mu\text{g/mL}$.

5.5 Considerações finais

A compreensão da permeação/retenção de produtos semissólidos através da pele é importante para o desenvolvimento de novos produtos, para a avaliação das características dos excipientes e também identificar o desempenho que eles terão na formulação (veículo, promotor de permeação).

Foram selecionados três produtos comerciais disponíveis no mercado brasileiro contendo ACV 5%. Foi realizada a avaliação da composição qualitativa entre as formulações para que o produto referência e genérico fossem muito semelhantes e estes diferentes do similar, buscando, assim, confrontar a permeação/retenção do fármaco no tecido cutâneo e avaliar se diferentes excipientes alterariam esta característica dos produtos.

A ausência da informação da proporção quantitativa dos excipientes gera algumas suposições. A presença do propilenoglicol na formulação G pode estar

em concentração diferente do que na R, promovendo, assim diferenciada penetração do fármaco nas camadas da pele.

No estudo de permeação/penetração, o produto G do primeiro lote analisado, mostrou-se estatisticamente diferente dos produtos R e S. Essa diferença pode ser atribuída a problemas na homogeneidade, fabricação das preparações semissólidas ou presença de promotores de permeação (propilenoglicol) em concentrações diferenciadas. Enquanto que no segundo lote analisado todos os produtos apresentaram similar retenção de ACV nas camadas da pele suína.

No período de estudo de 8 horas não houve permeação considerável, uma vez que não foi detectado ACV no fluído receptor, apenas foi quantificado o fármaco nas camadas da pele, proveniente dos três produtos.

Finalmente, foi realizado estudo farmacodinâmico, através de uma simulação computacional, para relacionar as concentrações encontradas nas camadas da pele com a concentração efetiva contra o vírus Herpes simples. A simulação demonstrou que todas as especialidades farmacêuticas estudadas apresentaram efeito terapêutico muito superior a 50% de inibição viral, demonstrando assim que estes medicamentos, disponíveis no mercado brasileiro apresentariam adequada atividade antiviral contra o vírus da herpes.

Segundo a RDC 37/11, medicamentos de aplicação tópica, não destinados a efeitos sistêmicos, que contenham o mesmo fármaco, na mesma concentração em relação ao medicamento de referência (equivalentes farmacêuticos) e excipientes de mesma função que aqueles presentes no medicamento comparador são dispensados de estudos de bioequivalência no Brasil, sendo necessário apenas avaliar o potencial impacto sobre a segurança e eficácia do medicamento.

Entretanto, quando houve a publicação da RDC 48/2009, foi indicada que as indústrias farmacêuticas deveriam apresentar resultados entre a taxa de permeação cutânea da condição anteriormente registrada e da nova condição, quando ocorrer alteração ou inclusão do local de fabricação, alteração no processo de produção, alteração de equipamento com diferente desempenho ou principio de funcionamento, excipientes, rota de síntese e nova concentração do fármaco. Algumas dessas exigências podem de certa forma, ser consideradas equivocadas, como para alteração do local de fabricação, a qual não deveria

implicar em comprometimento da qualidade do produto final de forma a exigir a realização de teste de permeação cutânea. A citada RDC ainda está vigente, mas a norma específica que regulamentaria o teste não foi publicada até o momento, evidenciando uma correção de rumo por parte da entidade regulatória.

O FDA recomenda testes de liberação *in vitro*, os quais utilizam membrana sintética para estudar a difusão do fármaco para o meio receptor, a fim de comprovar a equivalência entre lotes de produtos sob mudanças específicas, como mudança de equipamento, fornecedor da matéria primas, e outras menores alterações pós-registro (U.S.FDA/CDER, 1997). O objetivo do teste não é mimetizar o comportamento *in vivo*, e sim avaliar as características físico-químicas da formulação.

As exigências estabelecidas pelo FDA apresentam mais coerências do que as anunciadas pela ANVISA em 2009, pelo fato de que o estudo de permeação/retenção cutânea *ex-vivo* pode não fornecer informações relevantes para pequenas alterações pós-registro, mas apresentar grande importância no desenvolvimento de medicamentos semissólidos com o objetivo de definir a formulação em estudo.

- Na caracterização dos cremes dermatológicos contendo ACV adquiridos no mercado nacional, estes apresentaram teor dentro dos limites aceitáveis exigidos pelos órgãos regulatórios, valores de pH adequados para uso tópico e viscosidade não-newtoniana, comportamento de fluxo pseudoplástico, considerada ideal para produtos de uso dermatológico,
- A metodologia analítica validada para a quantificação de ACV em amostras de pele de orelha suína demonstrou ter adequada sensibilidade, especificidade e recuperação do fármaco a partir das matrizes biológicas epiderme e derme.
- A realização do estudo de permeação/retenção *in vitro* em pele suína mostrou-se adequado para prever a concentração de ACV nas camadas da pele (epiderme e derme).
- De forma geral, no primeiro lote, o produto G foi o que apresentou maiores quantidades de ACV nas camadas da pele, em relação ao produto R e S. Já no segundo lote, todos os produtos apresentaram similaridade de retenção. Quando realizada a comparação entre os lotes de mesma especialidade, observou-se que as formulações R e G apresentaram retenção de ACV igual na epiderme e diferentes na derme. Enquanto que para o produto S a quantidade retida na epiderme e na derme foi considerada igual. Quando somadas as concentrações retidas nas duas camadas, a análise estatística mostrou que não há diferença significativa entre os lotes de mesma especialidade.
- O estudo de simulação do efeito terapêutico aponta que os produtos estudados ofereceriam efeito antiviral desejado mesmo em contato com cepas de Herpes simples de IC_{50} elevado.
- Os resultados obtidos neste estudo indicam que o teste de permeação/retenção exigido pela ANVISA para alterações pós-registro apresenta limitações para detectar pequenas alterações na formulação, devido sua variabilidade inerente.

ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, C.H. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8ª Ed. Artmed: Porto Alegre, 2007.

American Society of Health-System Pharmacist (AHSP). **Drug Information Essencials**. Point-of-Care Drug Information for Health Care Professionals, 2007.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR., L.V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000.

ARAÚJO, B. V. **Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica do antifúngico Voriconazol**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005

AZULAYa, R. D.; AZULAYb, D. R. **Dermatologia**. 4ª Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.

BARATA F.A.E. **A Cosmetologia: princípios básicos**. 1. ed. São Paulo: TecnoPress, 1995.

BARBERO, A.M.; FRASCH, H.F. Pig and guinea pig skin as surrogates for human *in vitro* penetration studies: A quantitative review. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 1, p. 1–13, 2009.

BARRECA, M.L.; CHIMIRRI A., CLERCQ E.D., LUCA L.D., MONFORTE A.M.; MONFORTE P.; RAO A., ZAPPALÀ M. Anti-HIV agents: desing and Discovery of new potent RT inhibitors. **Il Farmaco**, v. 58, n. 3, p. 259-263, 2003.

BEMVINDO, C.S. Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

BENSON, A.E.H. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. **Current Drug Delivery**, v. 2, n. 1, p. 23-33, 2005.

BOLZINGER, M.A; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through the skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº. 135 de maio de 2003. Regulamento técnico para medicamentos genéricos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF; 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº. 899 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF; 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.º 48 de 6 de outubro de 2009. Realização de alteração, inclusão, suspensão, reativação, e cancelamento pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF; 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.º 37 de 03 de agosto de 2011. Guia para isenção e substituição de estudos de biodisponibilidade relativa/bioequivalência. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF; 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Poder Executivo, de 22 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 58, de 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre as medidas a serem adotadas junto à Anvisa pelos titulares de registro de medicamentos para a intercambialidade de medicamentos similares com o medicamento de referência. **Diário Oficial da União**, Brasília, Poder executivo, 2014

CAMPOS, P. M. B. G. **Bases dermocosméticas: Cosmiatria e Medicina Estética**, v. 2, p. 32-35, 1994.

CASSIANO, M.N.; BARREIRO, C.J.; MARTINS, R.R.J.; OLIVEIRA, V.R.; CASS, B.Q. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, p. 1021-1030, 2009.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CAVALLI, R., DONALISIO, M., CIVRA, A., FERRUTI, P., RANUCCI, E., TROTTA, F., LEMBO, D. Enhanced antiviral activity of Acyclovir loaded into β -cyclodextrin-poly (4-cryloylmorpholine) conjugate nanoparticles. **Journal of controlled release**, v. 137, n. 2, p. 116-122, 2009.

CDER/FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, C.A.; RODRIGUES, A.,C; SALGADO, H.R.N. Aspectos gerais em sistema transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 1, p. 7-13, 2007.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006

COLLINS, P; ELLIS, N. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. **Journal of medical virology**, v. 41, n. S1, p. 58-66, 1993.

COSTA, N.M. Estudo do Mecanismo de Ação de Derivados Aminoálcoois e de Derivados do Sistema Tienopiridina na Replicação *in vitro* do Vírus Herpes Simples Tipo 1. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

CSAJKA, C; VEROTTA, D. Pharmacokinetic–pharmacodynamic modelling: history and perspectives. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 33, n. 3, p. 227-279, 2006

DA SILVA, A.G. Propriedades gerais dos herpes virus. In: LUPI, O; DA SILVA, A.G; PEREIRA JR, A.C.(Org). Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

DE PAULA, D., MARTINS, C.A., BENTLEY, M.V.L.B. Development and validation of HPLC method for imiquimod determination in skin penetration studies. **Biomedical Chromatography**, v. 22, n. 12, p. 1416-1423, 2008.

DRUGBANK. ACYCLOVIR. Disponível em:
[http://http://www.drugbank.ca/drugs/DB00787](http://www.drugbank.ca/drugs/DB00787) Acessado em 10/10/2014.

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) – Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP). Points to consider on pharmacokinetics and pharmacodynamics in the development of antibacterial medicinal products. London, UK; 2000.

FARHAT, C.K., CLEMENS, S.A.N. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726-734, 2010.

FIELD, H. J.; HODGE, R. A. V. Recent Developments in Anti-herpesvirus drugs. **British Medical Bulletin**, v. 106, n. 1, p. 213-249, 2013.

FONSECA B. A. L, Clínica e Tratamento das Infecções Pelos Vírus Herpes Símples tipo 1 e 2. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 32, n. 2, p. 147-153, 1999.

FRIEND D. R. *In vitro* skin permeation techniques. **Journal of Controlled Release**, v. 18, n. 3, p. 235-248, 1992.

GABRIELSSON, J.;WEINER, D. Pharmacokinetic & pharmacodynamic data analysis: concepts and applications. 4^a ed. Apotekarsocieteten: Stockholm, 2006.

GALLO, J.M.A.S. **Avaliação do comportamento reológico e das propriedades sensoriais de molhos comerciais para salada tratados por irradiação**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear). Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GANEM-QUINTANAR, A.; FALSON-RIEG, F.; BURI, P. Contribution of lipid components to the permeability barrier of oral mucosa. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 44, n. 2, p. 107-120, 1997.

GHAFOURIAN, T.; SAMARAS, E. G.; BROOKS, J. D.; RIVIERE, J. E. Modeling the effect of mixture components on permeation through skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 398, n. 1, p. 28-32, 2010.

GLAXOSMITHKLINE. Aciclovir. Rio de Janeiro, 2002. Bula.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 11, p. 1152-1161, 2007.

GOLD, D.; COREY, L. Acyclovir prophylaxis for herpes simplex virus infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 31, n. 3, p. 361-367, 1987.

GONG, Y., RAJ, K. M., LUSCOMBE, C. A., GADAWSKI, I., TAM, T., CHU, J., GIBSON, D; CARLSON, D, SACKS, S. L. The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viroses. **Antiviral Research**, v. 64, n. 2, p. 127–130, 2004.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 1-18, 2001.

HASLER-NGUYEN, N.; SHELTON, D.; PONARD, G.; BADER, M.; SCHAFFRIK, M.; MALLEFET, P. 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.

HENNING, A.; SCHAEFER, U.F.; NEUMANN, D. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 324–331, 2009.

HENRY, H.; BALFOUR, J.R. Antiviral drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 16, p. 1255-1268, 1999.

HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL. **Manual de Cosmetologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Revinter, p.353, 1999.

HORWITZ, E.; PISANTY, S.; CZERNINSKI, R.; HELSER, M.; ELIAV, 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**, v. 87, n. 6, p. 700–705, 1999.

HUIDOBRO, A. L.; RUPEREZ, F.J.; BARBAS, C. LC methods for acyclovir and related impurities determination. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, n. 4, p. 687-694, 2005.

HUONG, S. P., FOURNERON, J. D., REYNIER, J. P., ANDRIEU, V. Use of various models for in vitro percutaneous absorption studies of ultraviolet filters. **Skin Research and Technology**, v. 15, n. 3, p. 253-261, 2009.

ICH, Steering Committee. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of analytical procedures: Text and Methodology. **Q2 (R1)**, v. 1, 2005.

JACOBI, U.; KAISER, M.; TOLL, R.; MANGELSDORF, S.; AUDRING, H.; OTBERG, N.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Porcine ear skin: an *in vitro* model for human skin. **Skin Research and Technology**, v. 13, n. 1, p. 19–24, 2007.

JALÓN, E. G.; BLANCO-PRÍETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 1, p. 191-197, 2001.

JALÓN, E.G.; BLANCO-PRÍETO, M.J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, n. 2, p. 183–187, 2003.

JEPPE, O. G.; DANCİK, Y.; ANISSIMOV, Y. G.; ROBERTS, M. S. Modeling the human skin barrier – Towards a better understanding of dermal absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 152-168, 2013.

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.

KNOW, Y. **Handbook of essential pharmacokinetics, pharmacodynamics and drug metabolism of industrial scientists**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001.

KLIGMAN, B. G.; CHRISTOPHERS, E. Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. **Archives on Dermatology**, v. 8, n. 6, p. 702-705, 1963.

LACHMAN, L., LIEBERMAN, H.A., KANIG, J.L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. 2ª. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gualbenkian, 2010.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E, ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 77, p. 563-569, 2002.

LOOKER, K.J.; GARNETT, G.P.; SCHMID, G.P. An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, n. 10, p. 805-812, 2008.

LUPI, O.; PEREIRA A.C. HERPES SIMPLES. IN: LUPI O; SILVA A.G; PEREIRA, A.C. **Herpes: Clínica, Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

MEIRA, A.S. Avaliação de condições experimentais de estudos *in vitro* de permeação/retenção cutânea empregando pele suína para creme comercial e nanoemulsão contendo penciclovir. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

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

MOUTON, J. W.; DUDLEY, N.; CARS, O.; DERENDORT, H.; DRUSANO, L. Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, p. 355-358, 2002.

NAIR, A.; JACOB, S.; AL-DHUBIAB, B.; ATTIMARAD, M.; HARSHA, S. Basic considerations in the dermatokinetics of topical formulations. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 423-434, 2013.

NAGELREITER, C.; KRATOCHVILOVA, E.; VALENTA, C. Dilution of semi-solid creams: Influence of various production parameters on rheological properties and skin penetration. **International journal of pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 429-438, 2015.

NETZ, P.A; ORTEGA, G. G. Fundamentos de fisico-quimica. Porto Alegre: Artmed, 2002.

NOKHODCHI, A.; SHOKRI, J.; DASHBOLAGHI, A.; HASSAN-ZADEH, D.; GHAFOURIAN, T.; BARZEGAR-JALALI, M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 359-369, 2003.

OECD, OECD Guidance Document for the Conduct of Skin absorption studies, OECD Series on Testing and Assessment 28, 2004.

PALIOSA, P. Validação de método analítico para quantificação de doripenem por eletroforese capilar e estudo da estabilidade por eletroforese capilar e ensaio microbiológico. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

PENELLO, A.M. Herpes genital. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 2, p. 64-72, 2010.

PHILLIPS, C. A., MICHNIAK, B. B. Transdermal delivery of drug with differing lipophilicities using azone analogs a dermal penetration enhancers. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 84, n. 12, p. 1427-1433, 1995.

POET, T.S. MCDOUGAL, J.N. Skin absorption and human risk assessment. **Chemico-Biological Interactions**, v. 140, n. 1, p. 19–34, 2002.

RAFEIRO, D.F.B. Novas estratégias de promoção de permeação transdérmica. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Lusófona, Lisboa, 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, C.J., **Cosmetologia aplicada à dermoestética**. 2^a ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

SAINO, V., MONTI, D., BURGALASSI, S., TAMPUCCI, S., PALMA, S., ALLEMANDI, D., CHETONI, P. Optimization of skin permeation and distribution of ibuprofen by using nanostructures (coagels) based on alkyl vitamin C derivatives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 3, p. 443-449, 2010.

SAMARAS, E.G.; RIVIERE, J.E.; GHAFOURIAN, T. The effect of formulations and experimental conditions on *in vitro* human skin permeation—Data from updated EDETOX database. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1, p. 280– 291, 2012.

SARTORELLI, P.; ANDERSEN, H. R.; ANGERER, J.; CORISH, J.; DREXLER, H.; GÖEN, T.; GRIFFIN, P.; HOTCHKISS, S. A. M.; LARESE, F.; MONTOMOLI, L.; PERKINS, J.; SCHMELZ, M.; VAN DE SANDT, J.; WILLIAMS, F. Percutaneous penetration studies for risk assessment. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 133-152, 2000.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria. Fundamentos Teóricos e Práticos**. São Paulo: Artiliber, 2006.

SCHMIDT, S., BARBOUR, A., SAHRE, M., RAND, K. H., DERENDORF, H. PK/PD: new insights for antibacterial and antiviral applications. **Current Opinion In Pharmacology**, v. 8, n. 5, p. 549-556, 2008.

Scientific Committee On Consumer Products (SCCP). Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. European Commission. 2006.

SELZER, D.; ABDEL-MOTTALEB, M.M.A.; HAHN, T.; SCHAEFER, U.F.; NEUMANN, D. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 2, p. 278-94, 2013.

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 Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHAH, V. P., FLYNN, G. L., GUY, R. H., MAIBACH, H. I., SCHAEFER, H., SKELLY, J. P., WESTER, R. *In vivo* percutaneous penetration / absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 74, n. 8, p. 1-8, 1991

SHAH, V. P. Progress in methodologies for evaluation bioequivalence of topical formulations. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 2, n. 5, p. 1-10, 2001.

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.

SINKO, P. J. **Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

SIQUEIRA, N. M. **Desenvolvimento tecnológico e avaliação da penetração cutânea de benzofenona-3 a partir de nanocápsulas revestidas com quitosana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SNOECK, R. Antiviral therapy research of herpes simplex. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 2, p.157-159, 2000.

SPRUANCE, S.L.; OVERALL, J.C.; KERN, E.E.; KREUGER, G.G.; PLIAM, V.; MILLER, W. The natural history of recurrent herpes simplex labialis: implications for antiviral therapy. **The New England Journal of Medicine**, v. 297, n. 2, p. 69-75, 1977.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SUZUKI, M.; OKUDA, T.; SHIRAKI, K. Synergistic antiviral activity of acyclovir and vidarabine against herpes simplex virus types 1 and 2 and varicella-zoster vírus. **Antiviral Research**, v. 72, p. 157-161, 2006.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V.M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v. 56, n. 1, p. 7–21, 1998.

TROTTET, L., MERLY, C., MIRZA, M., HADGRAFT, J., & DAVIS, A. F. Effect of finite doses of propylene glycol on enhancement of in vitro percutaneous permeation of loperamide hydrochloride. **International journal of pharmaceuticals**, v. 274, n. 1, p. 213-219, 2004.

U.S.FDA/CDER. Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation, 1997.

U.S.FDA/CDER. Topical dermatological drug product NDAs and ANDAs – *in vivo* bioavailability, bioequivalence, *in vitro* release, and associated studies, 1998.

VAN BUSKIRK, G.A. *et al.* Workshop Report: Scale up of liquid and semi-solid disperse systems. **Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 8, p. 1216-1220, 1994.

VOLPATO, N.M., SANTI, P., COLOMBO, P. Iontophoresis enhances the transport of acyclovir through nude mouse skin by electrorepulsion and electroosmosis. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 11, p. 1623-1627, 1995.

YEUNG-YUE K. B., BRENTJENS M. H., LEE P. C., TYRING S. K., Herpes simplex viruses 1 and 2. **Dermatologic clinics**, v. 20, n. 2, p. 249-266, 2002.

WAGNER, H.; KOSTKA, K. H.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v. 75, n. 3, p. 283–295, 2001.

WILLIAMS, A.C.; BARRY, B.W. Penetration enhancers. **Advances Drug Delivery Review**, v. 64. p. 128-137, 2012.

WHO (World Health Organisation) KIELHORN, J., MELCHING-KOLLMU, S., MANGELSDORF, I. Dermal Absorption. WHO / IPCS Environmental Health Criteria, Draft February, 2006.