

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

**Estudos de formulação, permeação cutânea e atividade anti-herpética de
formas farmacêuticas nanoemulsionadas contendo galato de pentila**

REGINA GENDZELEVSKI KELMANN

PORTO ALEGRE, 2012

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

Estudos de formulação, permeação cutânea e atividade anti-herpética de formas farmacêuticas nanoemulsionadas contendo galato de pentila

Tese de Doutorado apresentada por **Regina Gendzelevski Kelmann** como requisito para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Letícia Scherer Koester
Co-orientadora: Profa. Dra. Claudia Maria Oliveira Simões

Porto Alegre, 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17.09.2012 pela Banca examinadora constituída por:

Profa Dr. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. George González Ortega
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa Dr. Tania Mari Bellé Bresolin
Universidade do Vale do Itajaí

Kelmann, Regina Gendzelevski
Estudos de formulação, permeação cutânea e atividade anti-herpética de formas farmacêuticas nanoemulsionadas contendo galato de pentila / Regina Gendzelevski Kelmann. -- 2012.
164 f.

Orientadora: Letícia Scherer Koester.
Coorientadora: Claudia Maria Oliveira Simões.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Herpes. 2. Galato de pentila. 3. Nanoemulsões . 4. Hidrogéis. 5. Permeação cutânea. I. Koester, Letícia Scherer, orient. II. Simões, Claudia Maria Oliveira, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em parceria do o Laboratório de Virologia Aplicada de UFSC, com financiamento do CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.

*Dedico este trabalho a minha mãe
Maria Gendzelevski por sua
incansável força*

Agradecimentos

À Professora Dra. Letícia Scherer Koester, orientadora e amiga, por todo aprendizado nesses anos de convivência e pelo amadurecimento científico que pude adquirir, que agora me permitirá trilhar o meu próprio caminho com mais propriedade e segurança.

À Professora Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões pela co-orientação e por compartilhar um pouco de sua vasta experiência científica para a realização deste trabalho.

Ao Professor Helder Ferreira Teixeira por toda ajuda durante os períodos de licença-maternidade da Profa. Letícia e por todas as contribuições e sugestões sempre pertinentes.

Aos estimados professores e colegas e ex-colegas do LDG e agregados, em especial à Daiane de Oliveira Dias e Mariana Colombo que me ajudaram muito na execução dos experimentos nesses quatro anos e sempre terão um lugar muito especial no meu coração.

Aos amigos, mais do que colegas Cristiane, Débora, Juliana Bidone, Juliana Carini, Janine, Madson, Pedrinho, Samuel, “Sidóca” e Thiago Caon. Obrigada pela parceria!

À Simone G. Verza pela amizade e pelos conselhos nos momentos difíceis

À família Tatim, que me “adotou” e me apoiou neste último ano. Muito obrigada Diva, Itiberê, Tais e, em especial, ao Thiago pela (muita) paciência, companheirismo e amor.

O maior agradecimento é para minha família. À minha mãe, que está ao meu lado em todas as horas, me apoiando e incentivando a sempre seguir em frente. Ao meu pai que onde quer que esteja, tenho certeza está orgulhoso das minhas conquistas.

RESUMO

O galato de pentila (GP) é um composto fenólico semi-sintético derivado do ácido gálico. Estudos prévios demonstraram uma relevante atividade anti-herpética e sugerem que o GP é um composto promissor para o tratamento tópico do herpes labial. Porém, a baixa solubilidade do GP em meio aquoso acarreta dificuldades quanto a sua incorporação em formas farmacêuticas de uso tópico, problema que pode ser contornado pela sua veiculação em nanoemulsões. Entretanto, em função da natureza fluida desses sistemas, agentes gelificantes costumam ser adicionados com objetivo de ajustar sua viscosidade para valores compatíveis com a via de administração. Diante do exposto, a presente tese teve por objetivo investigar a veiculação do GP em nanoemulsões, com vistas ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica de uso tópico para o tratamento do herpes labial, ainda não relatada na literatura. Inicialmente foi desenvolvido e validado um método analítico para a quantificação do GP e adicionalmente foi realizada a identificação do principal produto de degradação. O método mostrou-se linear, preciso, exato, específico, robusto e capaz de separar o produto de degradação formado, identificado como ácido gálico. A segunda parte do trabalho descreve o desenvolvimento das formulações contendo 5 mg/mL de GP. Inicialmente foi selecionado o núcleo oleoso da fase interna das nanoemulsões, composto por uma mistura de óleo de rícino e triglicerídeos de cadeia média. A influência da adição de um co-tensoativo (polissorbato 80) e de um antioxidante (vitamina E) sobre as características físico-químicas, estabilidade e penetração cutânea foi avaliada. As nanoemulsões desenvolvidas apresentaram reduzido diâmetro de gotícula (<143 nm), baixa polidispersão ($<0,2$), elevado potencial zeta (> -51 mV), teor adequado (entre 90 e 110%) e elevada taxa de associação (> 99 %). As formulações permaneceram fisicamente estáveis durante 12 meses. Estudos de liberação demonstraram que as formulações apresentam uma liberação de até 63 % em 24 horas. A penetração cutânea foi superior na epiderme para as nanoemulsões tendo o polissorbato 80 como co-tensoativo. A avaliação da atividade anti-herpética demonstrou que a formulação contendo o polissorbato 80 e a vitamina E apresentou resultado similar ao GP isolado, enquanto as outras nanoemulsões apresentaram resultados de inibição da

infecção inferiores. A ultima parte da presente tese apresenta a avaliação da incorporação de dois agentes gelificantes (Aristoflex AVC[®] e quitosana) sobre as características da nanoemulsão mais promissora, com objetivo de ajustar a viscosidade do sistema para a aplicação tópica. A incorporação dos polímeros nas formulações não influenciou no teor inicial do GP (entre 94.4 % e 100.3 %). Foi observado um aumento significativo no tamanho de gotícula e índice de polidispersão com a incorporação da quitosana, que também levou a inversão dos valores de potencial zeta; o que não foi observado para o Aristoflex AVC[®]. Ambos hidrogéis não influenciaram a liberação do GP a partir das nanoemulsões. Durante o período de armazenamento foi observado um aumento no tamanho de gotícula e potencial zeta tanto para a quitosana como para o Aristoflex AVC[®]. Considerando os resultados da caracterização dos hidrogéis, o Aristoflex AVC[®] parece ser o agente gelificante mais adequado para a nanoemulsão proposta, pois apresentou melhor estabilidade e viscosidade, e possui penetração cutânea semelhante à da nanoemulsão sem incorporação dos polímeros.

Palavras-chave: galato de pentila, nanoemulsões de uso tópico, atividade antiviral

ABSTRACT

Formulation studies, skin penetration and anti-HSV-1 activity of Pentyl gallate nanoemulsions

Penty gallate (PG) is a semi-synthetic phenolic compound derived from gallic acid. Previous studies have demonstrated the antiherpetic activity of pentyl gallate (PG), a *n*-alkyl ester of acid gallic, suggesting that it could be regarded as a promising candidate for the development of a pharmaceutical dosage form for topical treatment of human herpes infection caused by Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1). Since PG is a poor water soluble substance, nanoemulsions seem to be an interesting pharmaceutical vehicle for PG topical delivery. However these systems present low viscosity and thickening agents are used to overcome this issue, which could hinder nanoemulsion topical application. Considering that, the aim of this study is to investigate the feasibility of developing topical nanoemulsions to deliver PG into the skin with the purpose of herpes labialis treatment. Firstly, a simple method for determination of PG by High performance liquid chromatography (HPLC) was validated. The method was linear, precise, accurate, specific, robust and able to separate the degradation product formed under alkaline condition, identified as gallic acid. These results indicate that the method is adequate for PG analysis. In a second part of this study, the development, characterization, *in vitro* release study, evaluation of skin distribution and anti-HSV-1 activity of nanoemulsions containing 5 mg mL⁻¹ of PG were performed. The influence of adding a hydrophilic emulsifier (polysorbate 80) and vitamin E as antioxidant agent were investigated. The developed nanoemulsions presented a nanometric particle size (<143 nm), low polydispersity index (<0,2), high zeta potential (> -51 mV), loading efficiency of 99% and suitable stability during 12 months. *In vitro* release study showed that all nanoemulsions presented up to 63 % of PG release within 24h. The presence of polysorbate 80 promoted an increase of PG retention in epidermis. From all developed nanoemulsions PG was able to penetrate across stratum corneum and reach deeper into the epidermis and dermis more efficiently from the nanoemulsion composed by castor oil and medium chain triglycerides, soybean

lecithin, polysorbate 80 and vitamin E. Its anti-HSV-1 activity was also comparable to that of PG as pure compound and more efficient comparing to the other developed nanoemulsions. The last part of this work, describes the development of nanoemulsion-loaded hydrogels. Aristoflex AVC[®] and chitosan were used as thickening agents. The developed formulations presented suitable PG content (from 94.4 % to 100.3 %), it was observed an increase of droplet size and polydispersity index and an inversion of zeta potential value when chitosan was incorporated. Both vehicles neither enhanced PG penetration nor delayed its release from the nanoemulsion. During the storage period, it was observed an increase of zeta potential and average droplet size for both hydrogels. Aristoflex AVC[®] seemed to be more interesting gelling agent because the thickened nanoemulsion presented better intrinsic stability, proper viscosity and spreadability. The skin retention was similar to non-thickened formulation.

Key-words: Pentyl gallate, antiherpetic activity, topical nanoemulsions, hydrogels

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Estrutura geral dos Herpesvirus	33
Figura 2: Ciclo de replicação viral dos herpesvírus	34
Figura 3. Estruturas químicas do ácido gálico e do galato de pentila	40
Figura 4. Fórmula estrutural do Aristoflex AVC [®]	50
Figura 5. Fórmula estrutural da quitosana.....	51

CAPÍTULO 2

Figure 1. Pentyl gallate chemical structure	73
Figure 2. Chromatogram of pentyl gallate in mobile phases without and with TFA.....	75
Figure 3. Chromatogram of pentyl gallate under alkaline condition	75
Figure 4. MS/MS of pentyl gallate in alkaline solution	76
Figure 5. Chromatograms of pentyl gallate nanoemulsion and a mixture of the excipients used in nanoemulsion	77
Figure 6. Chromatogram of ethyl, propyl and pentyl gallates solution.....	77

CAPÍTULO 3

Fig. 1: Solubility of pentyl gallate in oils and water	96
Fig 2. TEM analysis from developed nanoemulsions	100
Fig. 3: Results of nanoemulsions particle size, zeta potencial and pentyl gallate during the stability study.....	101
Fig. 4: In vitro release study of pentyl gallate from nanoemulsions	102
Fig. 5: Accumulation of pentyl gallate nanoemulsions in the skin layers.....	104

CAPÍTULO 4

Figure 1: Viscosity variation as function of shear rate of NE-loaded hydrogels	131
Figure 2: Rheological behavior of NE-loaded hydrogels and respective control formulations	131
Figure 3: Spreadability of NE-loaded hydrogels and controls	132
Figure 4: Pentyl gallate skin penetration profile from NE-loaded hydrogels ..	134

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1	
Tabela 1: Classificação dos herpesvírus	32

CAPÍTULO 2	
Table1. Stress conditions tested	74
Table 2. Intra- and inter-day precision	76
Table 3: Recovery studies of PG	76
Table 4. Robustness of HPLC method	77

CAPÍTULO 3	
Table 1: Composition of nanoemulsion formulations	91
Table 2: Physicochemical properties of nanoemulsions	99
Table 3: Anti-HSV-1 activity of pentyl gallate (PG) nanoemulsions	104

CAPÍTULO 4	
Table1: Composition of NE and NE-loaded hydrogels.....	123
Table 2: NE and NE-hydrogels physicochemical characterization.....	129

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	25
CAPÍTULO 1. Revisão da Literatura	
Herpes simples.....	31
Galatos	38
Permeação cutânea	41
Nanoemulsões.....	44
Hidrogéis	48
Referências	54
CAPÍTULO 2. Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade para o doseamento do galato de pentila	
Introdução.....	69
Artigo 1. A simple HPLC method for determination of pentyl gallate and identification of alkaline degradant	71
CAPÍTULO 3. Desenvolvimento, avaliação da penetração cutânea e atividade anti-HSV-1 de nanoemulsões contendo galato de pentila	
Introdução.....	81
Artigo 2. Nanoemulsions as vehicles for topical delivery of pentyl gallate: preparation, skin retention and in vitro anti-HSV-1 evaluation	83
CAPÍTULO 4. Estudo da incorporação de nanoemulsão contendo galato de pentila em hidrogéis	
Introdução.....	113
Artigo 3. Nanoemulsion-loaded hydrogels for topical administration of Pentyl Gallate	115
DISCUSSÃO GERAL	139
CONCLUSÕES	149
PERSPECTIVAS	153
REFERÊNCIAS	157

INTRODUÇÃO

Uma das principais razões para a falta de sucesso no desenvolvimento de novos fármacos antivirais é, principalmente, a natureza dos vírus, sendo totalmente dependentes dos processos metabólicos celulares para sua multiplicação e sobrevivência. Desta forma, agentes que inibem ou causam a morte de vírus, exibem também certo grau de toxicidade às células hospedeiras. O compromisso com a especificidade pelas células infectadas, a eficácia e um baixo nível de toxicidade são indispensáveis e, destes problemas, advém a escassez de medicamentos antivirais (VLIETINCK, 1997; WAGNER & HEWLETT, 1999).

Dentre os diversos vírus de importância clínica estão os herpesvirus tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2) cuja soroprevalência corresponde a 60-90% da população mundial (DE CLERCQ, 2001; BRADY & BERNSTEIN, 2004).

O fármaco de escolha para profilaxia e tratamento das infecções causadas pelos HSV-1 e HSV-2 é o aciclovir. Contudo, a disseminação das cepas resistentes principalmente em pacientes imunocomprometidos, e a decorrente progressão da doença fizeram com que as infecções herpéticas se tornassem um grave problema de saúde pública (FIELD, 2001; BRADY & BERNSTEIN, 2004). Diante disso, pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias anti-herpéticas se fazem necessárias, uma vez que é preciso o desenvolvimento de medicamentos que contenham fármacos com diferentes mecanismos de ação.

Nesse contexto, o grupo de pesquisa do Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina avaliou a atividade anti-herpética de uma série de compostos fenólicos, dentre eles alguns *n*-alquil ésteres derivados do ácido gálicos, denominados galatos, onde se estabeleceu uma série de relações estrutura-atividade para estas moléculas, em relação à ação anti-herpética frente ao HSV-1, assim como à sua ação antioxidante e genotoxicidade (SAVI et al., 2005). Um composto em especial se mostrou bastante promissor, o galato de pentila, cujo mecanismo de ação antiherpética frente ao HSV-1 como ao HSV-2 foi elucidado por Kratz e colaboradores (2008a; 2008b).

Embora o galato de pentila seja um composto com atividade antiviral promissora, a natureza intrínseca de sua molécula acarreta alguns problemas biofarmacêuticos, como a baixa solubilidade em meio aquoso (cadeia alquílica de cinco carbonos) e sua suscetibilidade à oxidação (presença de três hidroxilas feólicas livres). Assim, se faz necessária a utilização de estratégias farmacotécnicas para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de uso tópico veiculando esse composto, como a sua incorporação em nanoemulsões, que são utilizadas há mais de 30 anos como veículos para administração de fármacos (YU et al., 1993; NAKANO, 2000; ALMEIDA et al., 2008; MOU et al., 2008a). As nanoemulsões podem apresentar características que trazem vantagens para a administração tópica de fármacos, como um aumento da incorporação de fármacos lipofílicos, baixa irritação cutânea, potencial para hidratação da pele, aumento da permeação transdérmica e um maior tempo de permanência do fármaco na pele (ABOLMAALI et al., 2011).

A baixa viscosidade dos sistemas nanoemulsionados pode ser tornar um inconveniente ao paciente. Esse problema é frequentemente contornado pelo espessamento das formulações com a adição de agentes gelificantes (hidrogéis) (MOU et al., 2008b; OLIVEIRA et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Em função das diferentes características dos polímeros empregados para essa finalidade, e a interação com os fármacos veiculados, assim como os outros componentes da formulação, a escolha do agente gelificante mais adequado deve ser cuidadosamente realizada a fim de manter, ou melhorar as características iniciais da formulação.

Considerando as características físico-químicas do galato de pentila e as potencialidades dos sistemas nanoemulsionados para a administração tópica, o objetivo da presente tese de doutorado é investigar a veiculação dessa molécula em uma nanoemulsão visando ao tratamento tópico do herpes labial.

A tese de doutorado a ser apresentada neste manuscrito está estruturada em quatro capítulos:

- O primeiro capítulo apresenta a revisão do tema, resumizando os aspectos principais tratados ao longo do trabalho. Serão abordados os principais aspectos relacionados à evolução das lesões herpéticas e os tratamentos disponíveis, as atividades biológicas do ácido gálico e seus *n*-alquil ésteres, assim como as principais características do galato de pentila, a penetração cutânea de fármacos, as características das nanoemulsões e dos hidrogéis;
- O segundo capítulo descreve a validação de uma metodologia por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a quantificação do galato de pentila, assim como a identificação do seu principal produto de degradação;
- O terceiro capítulo aborda o desenvolvimento de nanoemulsões contendo galato de pentila, a estabilidade das formulações durante 12 meses, estudo de liberação em membrana de diálise, estudos de penetração cutânea e atividade anti-herpética *in vitro* das nanoemulsões desenvolvidas;
- No último capítulo foi investigado o efeito da incorporação de diferentes agentes gelificantes nas características reológicas das formulações, assim como nas suas características físico-químicas e penetração cutânea do galato de pentila.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

A presente tese de doutorado tem por objetivo principal o desenvolvimento tecnológico, a caracterização e avaliação a atividade anti-herpética de formas farmacêuticas nanoemulsionadas contendo galato de pentila.

Objetivos Específicos

- Preparar e caracterizar nanoemulsões pela técnica de emulsificação espontânea;
- Desenvolver e validar um método de doseamento indicativo de estabilidade do PG por CLAE;
- Avaliar a estabilidade das formulações desenvolvidas;
- Investigar o perfil de permeação cutâneo *in vitro* do galato de pentila a partir das nanoemulsões desenvolvidas;
- Avaliar a da atividade anti-herpética *in vitro* do galato de pentila associado às nanoemulsões, através do ensaio de placas de lise;
- Incorporar a formulação considerada mais promissora em hidrogéis de diferentes características físico-químicas;
- Avaliar a influência dos agentes gelificantes empregados nas características da nanoemulsão, na estabilidade e no perfil de penetração cutânea.

\

CAPÍTULO 1

Referencial teórico

HERPES SIMPLES

É creditado ao patologista Benjamin Lipschutz as primeiras descrições dos vírus herpes simples, apesar de existirem relatos de infecções herpéticas desde a Grécia Antiga. Somente em 1939, um herpesvírus foi primeiramente isolado a partir da saliva de crianças acometidas por gengivostomatite herpética (SHAFFER, 1987).

Existe aproximadamente uma centena de vírus da família *Herpesviridae* caracterizados (Tabela 1), sendo oito vírus herpéticos humanos encontrados em 3 sub-famílias: *Alphaherpesviridae*, que inclui os herpesvírus simples tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e o vírus varicela/zóster (VZV); a sub-família *Betaherpesviridae*, que inclui o citomegalovírus (CMV), o roseolovírus (HHV-6) e o herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7); e a sub-família *Gammaherpesviridae*, que inclui vírus Epstein-Barr (HHV-4) e o herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) (ROIZMAN & KNIPE, 2001; ICTV, 2009).

O HSV-1 é responsável por lesões periorais, enquanto o HSV-2 é característico de regiões genitais. O VZV provoca a varicela, principalmente em crianças, e, por re-infecção, pode ser a causa do surgimento de zoster. O HHV-4 está associado à mononucleose infecciosa, ao linfoma de Burkitt e ao carcinoma nasofaríngeo. O CMV pode provocar pneumonia, retinite e hepatite. Por sua vez, o HHV-6, que estabelece infecção latente em tecido linfoide, provoca o exantema súbito ou roséola, e está associado à esclerose múltipla. O HHV-7 não apresenta nenhuma associação à patologias até o presente momento. O HHV-8 está associado ao sarcoma de Kaposi, tumor frequentemente encontrado em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LUPI et al., 2000; STANBERRY, 2006)

Tabela 1: Classificação dos herpesvírus pertencentes à Família *Herpesviridae*.

Subfamília	Características	Gênero	Representantes	
			Nome comum	Nome oficial
<i>Alphaherpesvirinae</i>	Faixa variável de hospedeiros, ciclo reprodutivo relativamente curto, disseminação rápida em cultura de células, destruição irreversível das células infectadas e capacidade de estabelecer infecção latente, primariamente, mas não exclusivamente, em gânglios sensoriais	Simplexvirus	Herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1) Herpesvírus simplex tipo 2 (HSV-2)	Herpesvírus humano-1 Herpesvírus humano-2
		Varicellovirus	Vírus varicela zoster (VZV)	Herpesvírus humano-3
<i>Betaherpesvirinae</i>	Infectam uma faixa restrita de hospedeiros, possuindo um ciclo reprodutivo longo, e o progresso da infecção em células de cultura é lento. O vírus pode permanecer na forma latente em glândulas secretoras, células linforreticulares, rins e outros tecidos	Cytomegalovirus	Citomegalovirus (CMV)	Herpesvírus humano-5
		Roseolovirus	Roseolovírus (HHV-6) Herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7)	Herpesvírus humano-6 Herpesvírus humano-7
<i>Gammapherpesvirinae</i>	Limitada faixa de hospedeiros e, in vitro, todos se replicam em células linfoblásticas, sendo que alguns causam infecções com destruição irreversível em certos tipos de células fibroblásticas e epitelióides. Os vírus desse grupo são específicos para linfócitos T ou B. Na célula linfocitária, a infecção pode estabelecer-se como latente ou lítica, mas sem produção de uma progênie infecciosa. Com frequência, demonstra-se a presença do vírus latente no tecido linfóide.	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr (HHV-4)	Herpesvírus humano-4
		Rhadinovirus	Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8).	Herpesvírus humano-8

FONTE: LUPPI & PEREIRA JR, 2000; ICTV, 2009

Os representantes da família *Herpesviridae* são vírus com genomas de DNA, com cadeia dupla de grandes dimensões (contendo tipicamente 60 a 120 genes), sendo que, os diferentes tipos de herpesvírus partilham uma estrutura genômica e uma arquitetura, semelhantes (Figura 1). Estruturalmente, as partículas virais são constituídas por nucleóide (formado essencialmente pelo genoma e por proteínas) envolvido por um capsídeo icosaédrico (formada pelos capsômeros), tegumento de estrutura amorfa que liga a capsídeo ao invólucro e um envelope lipídico formado pela bicamada lipídica de natureza celular e glicoproteínas de origem viral (LUPI et al., 2000; MADIGAN et al., 2000)

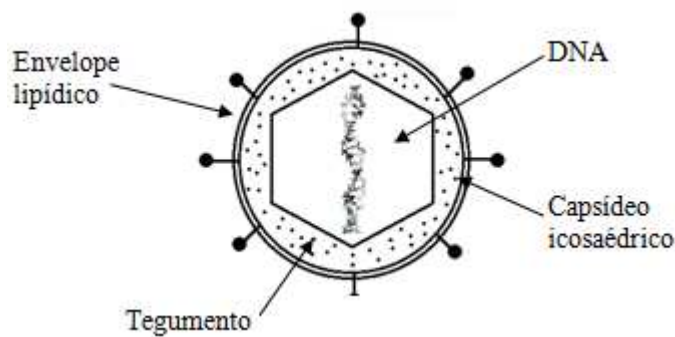


Figura 1. Estrutura geral dos Herpesvirus

A infecção primária ocorre através das superfícies das mucosas (oral, ocular ou genital) e a partir das soluções de continuidade da pele. Inicia-se com a junção de partículas virais aos receptores de glicoproteínas na superfície da célula hospedeira na epiderme (Figura 2). Após a ligação do receptor, a fusão do envelope viral com a membrana de uma vesícula endocítica leva à endocitose mediada pelo receptor do capsídeo. A cadeia do citoesqueleto, incluindo os componentes da dinactina e da dineína, é usada para transportar o capsídeo para os poros nucleares (DOHNER et al., 2002). O DNA é injetado dentro do núcleo, enquanto que o capsídeo vazio permanece do lado de fora. O vírus sofre, então, replicação nas células situadas na base do sítio de entrada, podendo ou não produzir lesões vesiculares. Após, o vírus dissemina-se para células nervosas adjacentes. Nos neurônios, o nucleocapsídeo é encaminhado para o núcleo, iniciando a infecção latente onde não é detectável nenhum vírus infeccioso. O

processo de latência não é ainda completamente compreendido (ROIZMAN & KNIPE, 2001; GOODMAN et al., 2008)

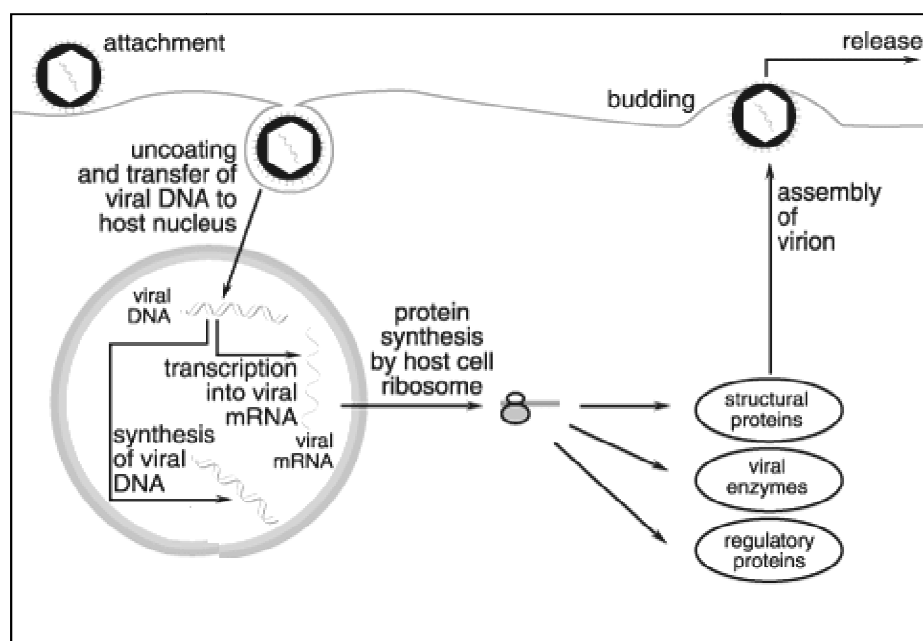


Figura 2: Ciclo de replicação viral dos herpesvírus (Fonte: GOODMAN et al., 2008)

A estratégia de replicação destes vírus envolve uma adaptação à resposta imune do hospedeiro, e acredita-se que a origem evolutiva destes vírus está associada à origem da memória imune (WAGNER & HEWLETT, 1999)

Os herpesvírus estabelecem uma infecção primária com sintomas subclínicos, que pode resultar numa resposta imunitária eficiente que impede uma nova infecção. Contudo, como há uma infecção latente, o vírus pode ser reativado por vários fatores: como uma excessiva exposição aos raios ultravioleta, endotoxinas, aglutininas, esteróides, co-carcinógenos químicos, outras infecções, estresse, febre, traumas e mudanças hormonais (LUPI et al., 2000; BRADY & BERNSTEIN, 2004).

O herpes simples é uma dermatose infecto-contagiosa crônica e recorrente, tendo como agentes etiológicos o HSV-1 ou HSV-2 (LUPI & PEREIRA JR, 2000). Estima-se que 85% da população mundial é portadora do HSV-1 sendo que, cerca de 10% desses pacientes têm manifestações recorrentes.

No Brasil, cerca de 94 % da população adulta é atingida pelo Herpes labial (SBD, 2011).

As manifestações clínicas primárias e recorrentes podem variar desde gengivomastites, faringotonsilites e herpes labial e/ou genital até queratoconjuntivites, encefalites e doença disseminada. O HSV-1 está associado a infecções orais, enquanto que o HSV-2 a infecções genitais. Contudo, ambos os vírus podem causar infecções clinicamente indistinguíveis em vários locais e podem permanecer latentes no gânglio sensorial, o qual pode ser reativado em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos. O HSV-2 apresenta uma grande tendência à recorrência, superior à observada na infecção herpética genital causada pelo HSV-1 (média < 1 episódio/ano). A infecção extragenital causada pelo HSV-1 apresenta mais episódios de recorrências do que a causada pelo HSV-2 (WHITLEY & ROIZMAN, 2001; BRADY & BERNSTEIN, 2004).

A manifestação clínica do herpes simples divide-se em três fases: prodrômica, clínica ativa e reparatória: A fase prodrômica ocorre até 24 horas antes da doença se manifestar e seus sintomas são: dor local, edema, prurido e ardência. Frequentemente o local apresenta-se eritematoso. Os sintomas do período prodrômico representam repercussões das alterações estruturais e funcionais dos filetes neurais e das células epiteliais locais nos primeiros momentos da replicação neural nos seus interiores. Na fase clínica ativa a pele peribucal e semimucosa labial apresenta-se eritematosa e hipertérmica com o aparecimento das primeiras pápulas, que evoluem rapidamente para vesículas agrupadas em forma de cachos repletas de um exsudato inflamatório seroso. Como manifestações clínicas, há dor e prurido. No interior das vesículas existem numerosos leucócitos polimorfonucleares e milhões de partículas virais, além de células epiteliais individualizadas ou em grupos, como células gigantes multinucleadas ou células de Tzanck. Durante a fase reparatória, as vesículas reduzem de volume e o exsudato seroso é reabsorvido. O local torna-se seco e recoberto por escamas e crostas amareladas e/ou escuras. Nessa fase, as lesões

apresentam um número muito reduzido de vírus, mas podem ser ainda contagiosas, especialmente porque aproximadamente 10% das pessoas ainda continuam liberando partículas virais mesmo depois das lesões resolvidas (LUPI & PEREIRA JR, 2000; CONSOLARO & CONSOLARO, 2009).

Terapia

O desenvolvimento da terapêutica antiviral contra os HSV iniciou-se na década de 1960 com a utilização de dois fármacos análogos de nucleosídeos do DNA: a idoxuridina cujo uso foi limitado à via tópica em função de sua toxicidade; e a vidarabina, ainda utilizada no tratamento da ceratoconjuntivite herpética, e responsável pela gama de fármacos antivirais que fazem parte da terapêutica atual no tratamento das infecções herpéticas (LUPI & PEREIRA JR, 2000). Em 1977, com a descoberta do aciclovir (ELION et al., 1977), um fármaco análogo acíclico do nucleosídeo 2'-deoxiguanosina que carece de uma 3'-hidroxila na cadeia lateral, altamente seletivo para os herpesvirus, deu-se início a uma nova fase na pesquisa de fármacos antivirais. O aciclovir apresentou-se como o fármaco mais efetivo e menos tóxico descoberto até então, o que fez com que ele se tornasse a base da terapia antiherpética (WHITLEY & ROIZMAN, 2001). Fármacos derivados do aciclovir foram posteriormente desenvolvidos, dentre eles destacam-se: o valaciclovir, o penciclovir, o fanciclovir e o cidofovir.

O aciclovir é administrado sob a forma de um pró-fármaco inativo com boa afinidade pelas células. Sua posterior conversão a um derivado fosforilado (monofosfato de aciclovir) é efetuada por uma enzima codificada pelo próprio vírus, a timidina quinase. O monofostato sofre fosforilação pelas enzimas celulares, transformando-se, finalmente, na forma trifosfato ativada. O trifosfato de aciclovir inibe competitivamente as DNA-polimerases virais (LUPI & PEREIRA JR, 2000; BRADY & BERNSTEIN, 2004; GOODMAN et al., 2008). O DNA humano tem afinidade dez vezes menor pelo aciclovir em comparação

com o herpesvírus, fato que também contribui para a segurança terapêutica e redução de efeitos colaterais (LUPI & PEREIRA JR, 2000)

O valaciclovir (éster L-valina do aciclovir) representa a evolução do aciclovir. Uma vez que sua biodisponibilidade é cerca de 50%, em relação a 15 % encontrada no aciclovir, o valaciclovir pode ser administrado com menor frequência, melhorando o esquema terapêutico e por consequência a adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, não é efetivo contra infecções resistentes ao aciclovir (BRADY & BERNSTEIN, 2004; DE CLERCQ, 2004).

O trifosfato de penciclovir é cerca de cem vezes menos potente na inibição da replicação viral do que o aciclovir trifosfatado, porém atinge maior concentração plasmática e tem maior tempo de meia-vida nas células infectadas pelo HSV (CIRELLI et al., 1996). O fanciclovir, éster diacetil do penciclovir, é bem absorvido no trato gastrointestinal (70%) e tem sua utilização aprovada para pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos (CIRELLI et al., 1996).

Cidofovir é um análogo nucleosídeo de citidina com atividade contra cepas resistentes ao aciclovir e com deficiência ou alteração da timidina quinase. Ele inibe a síntese do DNA viral ao interromper o alongamento da cadeia. O mecanismo de resistência à esse fármaco deve-se a mutações na DNA-polimerase viral (GOODMAN et al., 2008).

Os análogos dos nucleosídeos são os fármacos de escolha no tratamento das infecções herpéticas, mas existem outras medicações antivirais de uso corrente, dentre eles destaca-se o foscarnet (ácido fosfonofórmico trissódico), fármaco inibidor enzimático, eficaz no tratamento de cepas resistentes ao aciclovir que possuam mutações na timidina quinase. Porém assim como o cidofovir, não é eficaz para cepas portadoras da DNA polimerase, responsável por cerca da 10 % das resistências comprovadas ao aciclovir (GOODMAN et al., 2008). A L-lisina também tem se mostrado eficaz como coadjuvante no controle

das recorrências do herpes simples. Esta efetuará uma inibição competitiva com a arginina, aminoácido que é importante na replicação viral (LUPPI et al., 2000).

O progressivo aumento da resistência dos HSV aos ésteres do aciclovir e, mais recentemente, ao foscarnet em pacientes imunocomprometidos, tem estimulado a pesquisa de novos compostos com diferentes mecanismos de ação.

Produtos naturais têm sido utilizados como fonte de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças, mas o número de substâncias com ação antiviral ainda é escasso (CHATTOPADHYAY & NAIK, 2007).

Uma das estratégias na busca de novos fármacos antivirais derivados de produtos naturais é baseada no estudo de extratos de plantas medicinais. Recentemente, foi introduzido no mercado brasileiro um fitoterápico sob forma de gel-creme contendo extrato de *Uncaria tomentosa* para o tratamento do herpes labial (HERBARIUM, 2011).

Diversos constituintes isolados de diferentes espécies vegetais têm sido extensivamente estudados em relação ao seu potencial efeito terapêutico contra infecções virais, destacando-se polifenóis, terpenos, taninos e flavonóides (TAKECHI et al., 1985; KHAN et al., 2005; OKUDA, 2005; THOMPSON, 2006; ÖZÇELIK et al., 2011).

GALATOS

O ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico – Figura 3a) é um intermediário do metabolismo vegetal secundário. Pode ser obtido através da hidrólise ácida ou básica de taninos hidrolisáveis e, por ser um dos principais componentes destas moléculas, as suas propriedades biológicas e de seus análogos têm sido amplamente investigada (GRUNDHOFER et al., 2001; ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).

A primeira descrição de uma atividade farmacológica para o ácido gálico data de 1953, relatando uma atividade antimalárica deste composto e outras estruturas químicas similares (THOMPSON et al., 1953). Dentre as atividades farmacológicas estudadas, foram descritas as ações anticarcinogênica (PELLEGRINA et al., 2005; PARK et al., 2008; KAUR et al., 2009; LU et al., 2010), antioxidante (YEN et al., 2002; SAVI et al., 2005; LU et al., 2006; KIM, 2007), despigmentante (KIM, 2007), antialérgica (KIM et al., 2006) e antiviral (SAVI et al., 2005; CHOI et al., 2010; ÖZÇELIK et al., 2011)

Em sua função ácida, o ácido gálico permite a introdução dos mais variados substituintes, possibilitando, desta forma, a obtenção de inúmeros análogos ésteres com os mais distintos efeitos farmacológicos.

O termo galatos refere-se aos *n*-alquil ésteres do ácido gálico. Alterações químicas na molécula do ácido gálico podem modificar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, pois alteram a solubilidade, o coeficiente de partição (Log P) e o grau de ionização (pKa). Consequentemente, estas alterações podem afetar o efeito biológico, modificando a afinidade por alvos celulares e a difusão através das membranas lipídicas (ROSSO et al., 2006).

Os galatos são amplamente utilizados como aditivos antioxidantes em alimentos (VAN DER HEIJDEN et al., 1986). Além da atividade antioxidante (GUNCKEL et al., 1998; SAVI et al., 2005; ROSSO et al., 2006), outras atividades biológicas já foram descritas, como antifúngica (FUJITA & KUBO, 2002; KUBO et al., 2002b; LEAL et al., 2009), antibacteriana (BOYD & BEVERIDGE, 1981; KUBO et al., 2002a; SHIBATA et al., 2005), antiinflamatória (MURASE et al., 1999) e antiviral (KANE et al., 1988; CHÁVEZ et al., 2006; UOZAKI et al., 2007). A partir desses estudos, pode-se observar que o tamanho da cadeia alquílica interfere nas atividades biológicas, porém não existe um padrão para tal, sendo necessária a avaliação de cada caso.

O grupo de pesquisa do Laboratório de Virologia aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina avaliou a atividade antiviral de uma série de 16 galatos (SAVI et al., 2005). Dentre os que mostraram boa atividade antiviral e baixa citotoxicidade, se destaca o galato de pentila, cujo mecanismo de ação antiherpética (anti-HSV-1 e anti-HSV-2) foi estudado por Kratz e colaboradores (2008a,b). Foi observado que, tanto para o HSV-1 como para o HSV-2, a atividade do composto é exercida em múltiplos estágios da replicação viral, sobretudo através da redução da infectividade viral e inibição da adsorção e da penetração dos vírus nas células, mecanismo de ação diferente do aciclovir. Os autores sugerem que o galato de pentila é um promissor candidato o tratamento tópico das infecções pelos vírus herpes simples.

O galato de pentila, também conhecido como galato de amila, é um composto fenólico semi-sintético derivado do ácido gálico que contém uma cadeia alquílica de cinco carbonos esterificada em seu radical carboxílico. Dentre as características físico-químicas descritas na literatura, tem-se que o galato de pentila apresenta-se como um sólido incolor, de massa molecular 240,25 g/mol, com ponto de fusão entre 93-94 °C (SAVI et al., 2005) e Log P é 3,66.

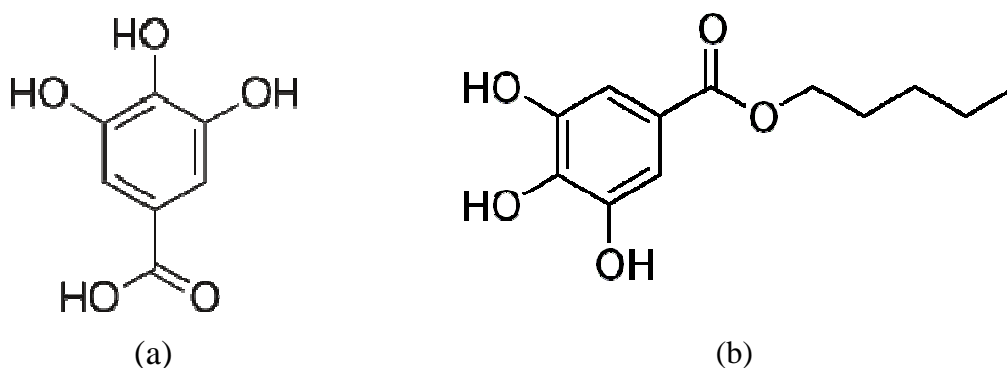


Figura 3. Estrutura química do ácido gálico (a) e do galato de pentila (b)

Embora o galato de pentila seja um composto com atividade anti-herpética promissora, características físico-químicas, como a baixa solubilidade em meio aquoso (cadeia alquílica de cinco carbonos) e suscetibilidade à oxidação

(presença de três hidroxilas), devem ser consideradas para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica adequada para a administração tópica.

PERMEAÇÃO CUTÂNEA

A penetração cutânea de um fármaco não depende apenas das propriedades físico-químicas deste, mas também do seu comportamento junto ao veículo farmacêutico e da condição da pele (KREILGAARD, 2002; ALLEN et al., 2005).

A pele é o mais extenso órgão do corpo humano, aproximadamente 5% do peso total e o principal meio de comunicação com o exterior. Constitui um limite anatômico e uma barreira de proteção contra agentes físicos, químicos e contra microorganismos (HADGRAFT, 2001).

A função de barreira da pele é composta por três distintas camadas: o estrato córneo, epiderme viável e derme (CHIEN, 1992). O estrato córneo, que é a camada mais externa da pele, composto por células queratinizadas e anucleadas, e por uma camada mais externa lipídica composta de ácidos graxos, triglicerídeos, ceras, colesterol, esqualeno, outros hidrocarbonetos e esteróides. O estrato córneo apresenta como papel fisiológico a hidratação cutânea e proteção (HADGRAFT, 2001). É uma região complexa e rica em lipídios, composta por regiões hidrofílicas e lipofílicas, tornando-se a principal barreira na absorção percutânea (GODIN & TOUITOU, 2007).

A penetração de fármacos através da pele, nas diferentes camadas, pode ser descrita pelas leis da difusão e a partição do fármaco na interface formada entre a formulação e a camada córnea, sendo esta um determinante físico dominante no controle da absorção (HADGRAFT & LANE, 2005).

A permeação percutânea de substâncias, em um sistema transdérmico, representa o caminho das camadas da pele até a corrente linfática e sanguínea, que transportarão a substância veiculada para os sítios alvo, de acordo com suas

respectivas afinidades. Para preparações de uso tópico, que visam apenas um efeito terapêutico local, embora seja importante que o fármaco penetre além da superfície, normalmente não se deseja que o medicamento atinja circulação sistêmica (ALLEN et al., 2005).

Como etapa de grande importância no desenvolvimento de uma formulação de uso tópico e transdérmico estão os ensaios de permeação e retenção cutânea que devem ser cuidadosamente realizados. Embora os modelos *in vivo* apresentem vantagens relativas aos estudos de biodisponibilidade, também possuem algumas limitações e desvantagens (utilização de grande número de animais vivos, diferenças de permeabilidade entre as espécies) o que tem impulsionado o desenvolvimento de metodologias *ex vivo* e *in vitro*, cujos resultados possam ser correlacionáveis com dados obtidos *in vivo* (RIVIERE & MONTEIRO-RIVIERE, 1991)

A utilização das células de difusão representa uma alternativa para estudos de permeação cutânea de fármacos e outras moléculas, pois permite a avaliação do metabolismo da pele, quando houver manutenção da viabilidade da mesma, como ocorre em modelos *ex vivo* ou em modelos *in vitro* através de células de difusão de fluxo contínuo. O modelo de difusão mais citado na literatura foi proposto por Franz (1975) conhecido por modelo de célula de Franz, também chamado de modelo estático, representa uma opção de ampla aplicabilidade para estudos de permeação *in vitro*. A utilização das células de difusão também permite calcular valores de fluxos e coeficientes de partição e de difusão de diferentes moléculas, além de se poder melhor controlar as variáveis experimentais (BARRY, 2001).

Membranas biológicas e sintéticas podem ser utilizadas nos estudos de permeação cutânea. As membranas biológicas podem ser obtidas a partir da pele animal ou humana, as mais utilizadas são provenientes da pele de suíno, ratos, camundongos e cobra, sendo que esta última mimetiza somente o estrato córneo (RIGG & BARRY, 1990). A pele de suíno tem sido amplamente utilizada em

função da sua similaridade estrutural e funcional com a pele humana (SEKKAT et al., 2002; JACOBI et al., 2007). Diversos estudos reportam que a permeação de fármacos é bastante similar entre a pele humana e a suína (SCHMOOK et al., 2001; CAON et al., 2010; BARTH et al., 2011; DE VARGAS et al., 2012; PEPE et al., 2012).

As membranas obtidas a partir da pele humana geralmente são indicadas para estudos finais, uma vez que apresentam como desvantagens a dificuldade de aquisição, constância e homogeneidade (HAIGH & SMITH, 1994). Dentre as membranas sintéticas, podem-se citar as membranas obtidas a partir de peles animais liofilizadas (de suínos e camundongos sem pêlos) e as que simulam a pele humana, obtidas a através de engenharia de tecidos (Graftskin LSE[®] - equivalente de pele humana viva/(Skinethic HRE[®] - epiderme humana reconstituída). A principal desvantagem das membranas produzidas a partir da engenharia de tecidos é o seu elevado custo, além do fato de que não mimetizam o efeito de barreira da pele humana.

Para a avaliação da permeação cutânea em célula de Franz (FRANZ, 1975), o doseamento da molécula em estudo é realizado no compartimento receptor da célula de difusão, que é preenchido com uma solução composta por tampão fosfato isotônico adicionado ou não de uma quantidade limitada de solvente orgânico ou tensoativos. A composição do meio receptor deve demonstrar ser capaz de manter a condição *sink* à temperatura de 32 °C ($\pm 0,5$) (FDA, 1997). Para o estudo de retenção cutânea, para a separação das diferentes camadas da pele devem ser realizados procedimentos específicos: o estrato córneo pode ser obtido pelo método de *tape-stripping* ou pela digestão enzimática das outras camadas da pele com tripsina (BASHIR et al., 2001). A epiderme geralmente pode ser separada da derme mergulhando-se a membrana em água à 60 °C durante um tempo determinado e a separação das camadas é feita com auxílio de um bisturi. A derme e a epiderme também podem ser separadas com a utilização de um dermatômetro.

NANOEMULSÕES

As emulsões farmacêuticas geralmente consistem na mistura de uma fase aquosa com óleos e/ou ceras (AULTON, 2007). Na terminologia das emulsões, a fase dispersa é conhecida como fase interna, e o meio dispersante como fase externa ou contínua. As emulsões que têm a fase externa aquosa são conhecidas como emulsões de óleo em água (O/A). Em contrapartida, as emulsões que têm fase interna aquosa e fase externa oleosa são denominadas água em óleo (A/O) (ALLEN et al., 2005).

As nanoemulsões podem ser definidas como uma dispersão nanométrica de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo. Apresentam-se como líquidos de aspecto leitoso, reduzido diâmetro de gotícula e baixa viscosidade, sendo que as substâncias veiculadas encontram-se preferencialmente dissolvidas, ou dispersas e/ou adsorvidas no núcleo oleoso (BENITA & LEVY, 1993; BOUCHEMAL et al., 2004).

A formação da nanoemulsão geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, para formar as fases aquosa, oleosa e interfacial inserindo, quando necessário, um co-tensoativo, cuja função é diminuir a tensão interfacial para valores abaixo dos limites proporcionados pelo agente emulsivo primário. É importante ressaltar que a orientação para sistemas O/A ou A/O é principalmente dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo (CUNHA JÚNIOR et al., 2003).

A seleção adequada do óleo utilizado como fase interna é o primeiro passo no desenvolvimento de uma nanoemulsão e a solubilidade do fármaco a ser incorporado é o parâmetro que rege essa escolha. Óleos tanto de origem natural como semi-sintéticos são empregados na preparação de nanoemulsões de uso tópico, em concentrações de variam entre 5% e 30% (BENITA & LEVY, 1993; JUMAA & MÜLLER, 1998; 2001).

Como dito anteriormente, a estabilização da interface óleo/água é feita com o emprego de tensoativos. Na seleção do tensoativo, o principal parâmetro a ser observado é a toxicidade. As lecitinas são amplamente empregadas para esse fim, em função de sua natureza anfótera e baixa toxicidade. Tensoativos não iônicos como os polissorbatos (Tweens[®]) e ésteres do polietilenoglicol também são utilizados, principalmente como co-tensoativos, pois esses compostos atuam na estabilização da interfase por impedimento estérico (BENITA & LEVY, 1993; CUNHA JÚNIOR et al., 2003). Abrol e colaboradores (2005) descreveram que o uso do Tween 80[®] associado com leticina de soja promove uma maior estabilização e redução do tamanho de gotícula numa nanoemulsão contendo o flavonóide silimarina.

A preparação de nanoemulsões pode ser realizada por diferentes métodos, e entre os mais citados estão: a homogeneização à alta pressão, microfluidização, ultra-sonicação e a emulsificação espontânea (TADROS et al., 2004; ALMEIDA et al., 2008). As técnicas homogeneização à alta pressão, microfluidização e ultra-sonicação são considerados métodos físicos, cujo processo de preparo das nanoemulsões passa primeiro pela obtenção de uma emulsão grosseira para posterior redução do tamanho das gotículas da fase interna. Essas técnicas são interessantes para produção em grande escala, mas requerem o emprego de equipamentos específicos.

A emulsificação espontânea se tornou interessante para estudos de formulação, pois é de fácil realização em escala laboratorial, não requer equipamentos sofisticados, não utiliza altas temperaturas, e leva à formação de gotículas de tamanho reduzido, possibilitando preparar nanoemulsões com propriedades similares às aquelas obtidas por métodos físicos (YU et al., 1993; BOUCHEMAL et al., 2004). Por esse método, a adição de uma solução solvente-óleo na fase aquosa resulta na emulsificação das nano-gotículas da fase oleosa, devido uma instabilidade interfacial, originada da rápida difusão do solvente através da interface diminuindo a tensão interfacial (BOUCHEMAL et al., 2004).

Propriedades físico-químicas das nanoemulsões, como diâmetro de partícula e carga de superfície podem exercer influência na velocidade e extensão da permeação na pele e na estabilidade do sistema.

As gotículas da fase interna das nanoemulsões possuem diâmetro médio entre 100 e 600 nm (SAKULKU et al., 2009; ALVES et al., 2007). O acompanhamento desse parâmetro é interessante para a verificação da estabilidade do sistema, pois, se existe um aumento do tamanho de gotícula ao longo do tempo, é um indicativo que há coalescência ou floculação no sistema, demonstrando a instabilidade da formulação (TADROS et al., 2004).

Os tensoativos estabilizam a interface da emulsão não apenas com a formação de uma barreira mecânica, mas também através da produção de uma carga elétrica de superfície, denominada potencial zeta, que tem a habilidade de produzir forças repulsivas entre as gotículas de óleo evitando a coalescência (BENITA & LEVY, 1993; YILMAZ & BORCHERT, 2005). Quanto maior a rede de cargas das gotículas, mais estável é a formulação. Valores em módulo superiores a 30 mV sugerem alto grau de estabilidade física (MUELLER, 1996).

Além dos parâmetros mencionados, existem outras características, como o teor do fármaco e presença de produtos de degradação, pH, viscosidade, eficiência de associação e ensaios de liberação, que são ser observados a fim de caracterizar o sistema e apresentar correlação com sua ação na pele.

As nanoemulsões têm sido consideradas como um potencial sistema para administração de moléculas de reduzida hidrossolubilidade (TROTTA, 1999; BABOOTA et al., 2007a; KELMANN et al., 2007; SHAFIQ et al., 2007; SHAKEEL et al., 2007; SHAKEEL et al., 2008a; ARAUJO et al., 2011).

Nanoemulsões de uso tópico

As nanoemulsões como veículos de administração tópica de fármacos são menos estudadas em relação aos lipossomas, nanocápsulas ou nanopartículas

lipídicas sólidas, porém, diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as nanoemulsões possuem excelentes propriedades de liberação dérmica e até mesmo transdérmica (KREILGAARD, 2002; BABOOTA et al., 2007b; SHAFIQ et al., 2007; SHAKEEL et al., 2008a; KONG et al., 2011). Suas vantagens podem incluir baixa irritação cutânea e elevada incorporação de fármacos (SOLANS et al., 2003). Também foi demonstrado que as nanoemulsões são capazes de promover uma maior permeação de diferentes fármacos em relação às formas farmacêuticas de uso tópico tradicionais (KTISTIS & NIOPAS, 1998; TROTTA, 1999), sendo que o núcleo destas pode representar um reservatório de liberação em suas camadas mais superficiais.

Dentre os fármacos incorporados em nanoemulsões com finalidade de aplicação tópica e transdérmica podemos destacar fármacos antiinflamatórios, como a nimesulida (ALVES et al., 2007), aceclofenaco (SHAKEEL et al., 2007), celecoxib (BABOOTA et al., 2007b; SHAKEEL et al., 2008b) e naproxeno (ÜSTÜNDAG OKUR et al., 2011); fármacos antitumorais, como o paclitaxel (KHANDAVILLI & PANCHAGNULA, 2007), tamoxifeno (PATHAN & SETTY, 2011) e o 5-acido aminovuleico (ZHANG et al., 2011); anestésicos, a exemplo da tetracaína (IZQUIERDO et al., 2007), antioxidantes, como o ácido hialurônico (KONG et al., 2011) e fármacos antihipertensivos, como o carvedilol (DIXIT et al., 2008; RIZWAN et al., 2010), ramipril (SHAFIQ et al., 2007; SHAFIQ & SHAKEEL, 2009) e anlodipino (KUMAR et al., 2009).

A incorporação de substâncias com atividade herpética também já foi descrita. Como exemplos têm-se a incorporação e permeação cutânea de quercetina e 3-O-metilquercetina (FASOLO et al., 2009) e penciclovir (ZHU et al., 2009). Substâncias sob patentes também estão sendo investigados como potenciais novos medicamentos para o tratamento do herpes simples (RAJPOOT et al.), nesse contexto destaca-se a NanoBio Corporation, da Universidade de Michigan, EUA, que desenvolveu um novo medicamento, sob a forma de nanoemulsão, denominado NB-001, para o tratamento do Herpes labial (HAMOUDA, 2008; JONES, 2008; 2009). Recentemente, foram publicados os

dados do estudo clínico realizado com 482 pacientes. Os autores reportam que o NB-001 reduz o tempo de cura das lesões e pode representar um tratamento tópico mais eficaz para o herpes simples (KIRCIK et al., 2012).

HIDROGÉIS

Os hidrogéis são matrizes poliméricas tridimensionais e hidrofílicas, capazes de incorporar grandes quantidades de água, na qual, porém, eles são insolúveis (PEPPAS, 1986). Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que quando dispersos em meio aquoso assumem conformação doadora de viscosidade à preparação (MAIA CAMPOS et al., 1999).

A consistência dos géis decorre do forte entrelaçamento da fase dispersa, que retém o meio de dispersão em sua rede. Devido ao alto grau de atração entre a fase dispersa e o meio aquoso essas preparações permanecem bem uniformes em repouso, havendo pouca sedimentação da fase dispersa (ALLEN et al., 2005).

Como as nanoemulsões apresentam-se como líquido leitoso, pouco viscoso, com baixa viscosidade (entre 1.1 a 2.5 cP) e fluxo newtoniano, seu uso tópico se torna desfavorável e pode ser um inconveniente ao paciente. Para adequar as formulações a essa finalidade, as nanoemulsões costumam ser espessadas com polímeros, com vistas a modificar suas propriedades reológicas, resultando em um sistema mais viscoso (MOU et al., 2008).

Poucos estudos avaliam a influencia da adição de agentes gelificantes na estabilidade e na penetração cutânea nas formas farmacêuticas. A incorporação de nanoemulsões em hidrogéis é reportada para a veiculação de a vitamina A, associada a óleos essenciais como o óleo de *Melaleuca alternifolia* (OLIVEIRA et al., 2011b) e óleo de semente de café (OLIVEIRA et al., 2011a), para fármacos como a betametasona (SHARMA et al., 2012), nimesulida (ALVES et al., 2005), clobetasol (FONTANA et al., 2009), genisteína (DE VARGAS et al., 2012) e a associação de cânfora, mentol e salicilato de metila (MOU et al., 2008).

Como demonstrado por Alves e cols. (2005), o tipo de polímero empregado na formulação do hidrogel pode influenciar no comportamento reológico e na penetração cutânea de um fármaco. A estabilidade física do produto também pode estar relacionada com o agente gelificante empregado (CORRÊA et al., 2005).

Os hidrogéis podem ser preparados a partir de polímeros sintéticos, como polímeros vinílicos (copolímeros do acetato de vinila, copovidona), baseados no ácido acrílico (acrilatos), derivados de éteres de celulose (metilcelulose, hidroxietilcelulose), polímeros carboxivinílicos (carbômeros) (ROWE et al., 2009) ou também podem ser utilizados polímeros de origem natural ou semi-sintética, como polissacarídeos e proteínas. Assim, existe uma ampla variedade de matérias-primas disponíveis para a preparação de hidrogéis e a seleção adequada para o desenvolvimento destas formulações baseia-se nos requisitos necessários para a estabilidade, liberação e eficácia do ativo que eventualmente será incorporado na preparação.

Diferentes polímeros utilizados no desenvolvimento de hidrogéis podem, de acordo com as características de seus grupos laterais, apresentar natureza iônica ou não-iônica. Nos hidrogéis não-iônicos, a força motriz para o intumescimento surge a partir da contribuição termodinâmica da mistura água-polímero para a energia livre total, associada com uma contribuição elástica do polímero. Já nos géis iônicos, o processo de intumescimento se deve às mencionadas contribuições, e também pelas interações entre o polímero carregado e os íons livres (MARK, 2007). As ionizações dos grupamentos como ácidos carboxílicos e sulfônico, ou grupamentos amina, tornam o polímero mais hidrofílico e assim levam a uma elevada captação de água (PEPPAS & KHARE, 1993).

As propriedades de intumescimento dos hidrogéis iônicos são únicas para cada composto devido à ionização dos grupamentos funcionais livres característicos de cada estrutura (PEPPAS & KHARE, 1993). Mudanças no pH,

força iônica, temperatura podem influenciar no grau de intumescimento de cada polímero, e essa característica pode ser utilizada na escolha de um determinado agente gelificante para aplicações específicas (PEPPAS & KHARE, 1993). Por esse motivo, os polímeros iônicos são os mais utilizados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos para uso tópico.

As redes iônicas dos hidrogéis podem ser classificadas em aniônicas, que contém porções carregadas negativamente e catiônicas, carregadas positivamente (PEPPAS et al., 2000). E a presença dos íons ao longo da cadeia polimérica gera efeitos distintos nas propriedades tanto em solução como no estado sólido das redes poliméricas.

Novos polímeros com diferentes características têm sido estudados como agentes gelificantes para formas farmacêuticas de uso tópico, a exemplo do Aristoflex AVC[®] (Figura 4), um co-polímero sintético de ácido sulfônico acrilildimetilaurato e vinilpirrolidona neutralizado com amônia, de característica aniônica. Este é utilizado como agente formador de gel em sistemas aquosos, bem como agente espessante em emulsões óleo/água. Os géis formulados com Aristoflex[®] AVC são cristalinos apresentando boas propriedades sensoriais e compatíveis com diversas substâncias, incluindo hidroxiácidos (LOFFLER et al., 2002).

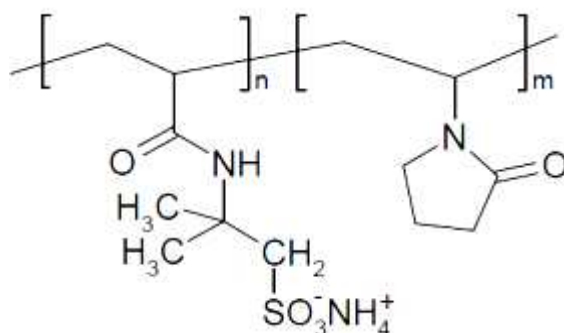


Figura 4. Fórmula estrutural do Aristoflex AVC[®]

Também se tem observado um interesse crescente em hidrogéis preparados a partir de polissacarídeos em função de uma série de características desses compostos que podem constituir vantagens no desenvolvimento de hidrogéis, como elevada hidrofília, a facilidade através da qual se consegue produzir hidrogéis a partir deles e a biocompatibilidade (COVIELLO et al., 2007). A quitosana (Figura 5) é um polissacarídeo obtido pela desacetilação alcalina da quitina, de característica catiônica, cujo apelo na utilização em produtos de uso tópico se dá pelo fato de que ela, em meio ácido atua como um polieletrólito de elevada densidade de carga positiva, devido à protonação dos grupos amina em grupos NH_3^+ , interagindo deste modo com moléculas de carga negativa (COSTA SILVA et al., 2006), como proteínas e lipídios, encontrados em abundância nas diferentes camadas da pele. Em consequência dessa característica, estudos descrevem que a quitosana pode aumentar a absorção de fármacos (OZCAN et al., 2009; ŞENYİĞİT et al., 2010; SHAH et al., 2012).

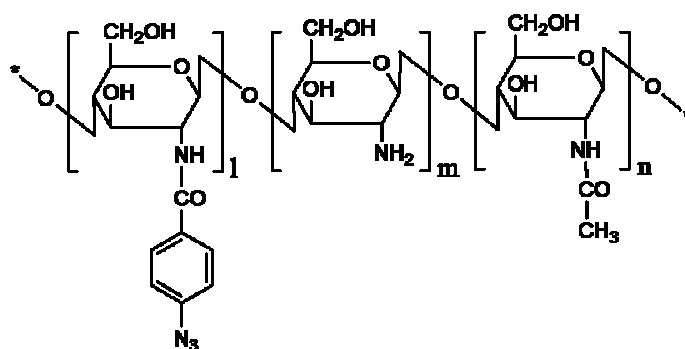


Figura 5. Fórmula estrutural da quitosana

No desenvolvimento de uma nova formulação destinada ao uso tópico, avaliação do seu comportamento reológico (condições de fluidez e de deformação da matéria) é necessária. A resistência ao fluxo e ao movimento é expressa através da viscosidade (AULTON, 2007). Quanto maior a viscosidade maior será essa resistência (MARTIN et al., 2011). Além da viscosidade, a reologia abrange outros parâmetros ligados à deformação da matéria, entre as

quais: extrusibilidade, compressibilidade, espalhabilidade, elasticidade e fluidez. Conhecer e controlar essas propriedades são importantes não só como critério de qualidade técnica, mas também como uma necessidade de preencher parâmetros de aceitabilidade por parte do paciente e aspectos de absorção e biodisponibilidade de um fármaco. Esses fatores também influenciam a correta seleção dos equipamentos utilizados no processo de produção (NETZ & ORTEGA, 2002; MARTIN et al., 2011).

A reologia classifica os materiais em duas categorias, em sistemas newtonianos e não-newtonianos, dependendo das suas propriedades de fluxo (ALLEN et al., 2005). O fluxo newtoniano apresenta uma viscosidade constante, independente da força aplicada para uma dada temperatura. O fluxo não-newtoniano é caracterizado pela alteração da viscosidade com o aumento de força aplicada.

Os materiais que apresentam um fluxo do tipo não-newtoniano dividem-se em três grupos, de acordo com o tipo de escoamento que apresentem quando submetidos a uma determinada força externa: plásticos, pseudo-plásticos e dilatantes.

O fluxo plástico não se inicia até que a força correspondente a um certo valor seja aplicada. Materiais plásticos também são conhecidos como corpos de Bingham, em homenagem a quem realizou grande parte dos primeiros estudos com tais materiais. Já os materiais pseudoplásticos apresentam fluxo quando uma força é aplicada. Este tipo de comportamento é fácil de ser encontrado em dispersões de colóides hidrofílicos, como nos polímeros formadores dos hidrogéis. Enquanto os materiais dilatantes são aqueles que tem o seu volume aumentado submetidos ao atrito, e a viscosidade aumenta com o aumento da velocidade cisalhamento (AULTON, 2007).

Alguns fluidos apresentam mudanças na viscosidade em função do tempo, sob condições constantes de tensão de corte, sendo classificados como fluidos com tixotropia e o fluidos com reopexia. Um fluido tixotrópico apresenta uma

diminuição da viscosidade aparente com o tempo de tensão, a uma velocidade/taxa de tensão constante. No caso dos fluidos reopéticos, ocorre o comportamento contrário.

O fluxo tixotrópico é vantajoso para formas farmacêuticas semi-sólidas, uma vez que se observa uma transformação gel-sol reversível. Quando em repouso, uma rede de gel se forma, fornecendo uma matriz rígida que estabiliza suspensões e géis. Quando submetida a uma força (pela agitação), a matriz relaxa e forma um sol que apresenta as características de uma forma farmacêutica líquida e de fácil administração (ALLEN et al., 2005; LEE et al., 2009)

REFERENCIAS

ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 8th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. xi, 738 p. ISBN 0781746124.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparation of submicron emulsions: Theoretical aspects about the methods employed today [Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade]. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, n. 1-2, p. 215-220, Aug 16 2007.

ALVES, P. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 12, p. 900-904, 2005.

ARAUJO, F. A.; KELMANN, R. G.; ARAUJO, B. V.; FINATTO, R. B.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. **European Journal Pharmaceutical Science**, v. 42, n. 3, p. 238-245, Feb 14 2011.

AULTON, M. E. **Pharmaceutics : the design and manufacture of medicines**. 3rd. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone, 2007. p.

BABOOTA, S.; AL-AZAKI, A.; KOHLI, K.; ALI, J.; DIXIT, N.; SHAKEEL, F. Development and evaluation of a microemulsion formulation for transdermal delivery of terbinafine. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 61, n. 4, p. 276-285, Jul-Aug 2007a.

BABOOTA, S.; SHAKEEL, F.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. **Acta Pharmaceutica**, v. 57, n. 3, p. 315-332, Sep 2007b.

BARRY, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 101-114, 2001.

BARTH, A. B.; PEREIRA, R. L.; DE VARGAS, B. A.; VOLPATO, N. M. A simple and rapid method to assess butenafine hydrochloride in skin samples and a comparative cutaneous retention study of two marketed formulations. **Biomedical Chromatography**, v. 25, n. 10, p. 1132-1137, 2011.

BASHIR, S. J.; CHEW, A.-L.; ANIGBOGU, A.; DREHER, F.; MAIBACH, H. I. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. **Skin Research and Technology**, v. 7, n. 1, p. 40-48, 2001.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 82, n. 11, p. 1069-1079, Nov 1993.

BOUCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, n. 1-2, p. 241-251, Aug 6 2004.

BOYD, L.; BEVERIDGE, E. G. Antimicrobial activity of some alkyl esters of gallic acid (3,4,5,-trihydroxybenzoic acid) against *Escherichia coli* NCTC 5933 with particular reference to n-propyl gallate. **Microbios**, v. 30, n. 120, p. 73-85, 1981.

BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Research**, v. 61, n. 2, p. 73-81, Feb 2004.

CAON, T.; COSTA, A. C.; DE OLIVEIRA, M. A.; MICKE, G. A.; SIMOES, C. M. Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 391, n. 1-2, p. 1-6, May 31 2010.

CHATTOPADHYAY, D.; NAIK, T. N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. **Mini Rev Med Chem**, v. 7, n. 3, p. 275-301, Mar 2007.

CHÁVEZ, J. H.; LEAL, P. C.; YUNES, R. A.; NUNES, R. J.; BARARDI, C. R. M.; PINTO, A. R.; SIMÕES, C. M. O.; ZANETTI, C. R. Evaluation of antiviral activity of phenolic compounds and derivatives against rabies virus. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 1-3, p. 53-59, 2006.

CHIEN, Y. W. **Novel drug delivery systems**. 2nd. New York: M. Dekker, 1992. vii, 797 p. ISBN 9780824785208 (alk. paper) 0824785207 (alk. paper).

CHOI, H. J.; SONG, J. H.; BHATT, L. R.; BAEK, S. H. Anti-human rhinovirus activity of gallic acid possessing antioxidant capacity. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 9, p. 1292-1296, 2010.

CIRELLI, R.; HERNE, K.; MCCRARY, M.; LEE, P.; TYRING, S. K. Famciclovir: review of clinical efficacy and safety. **Antiviral Research**, v. 29, n. 2-3, p. 141-151, Mar 1996.

CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M. F. Diagnóstico e tratamento do herpes simples recorrente peribucal e intrabucal na prática ortodôntica. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 14, n. 3, p. 16-25, 2009.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 73-78, 2005.

COSTA SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Chitosan: Hydrossoluble derivatives, pharmaceutical applications and recent advances. **Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C.; ALHAIQUE, F. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. **Journal of Controlled Release**, v. 119, n. 1, p. 5-24, 2007.

CUNHA JÚNIOR, A. D. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; ORÉFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 385-391, 2003.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 2, p. 115-133, 2004.

DE VARGAS, B.; NIA, A.; BIDONE, J.; OLIVEIRA, L. K.; KOESTER, L. S.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Development of Topical Hydrogels Containing Genistein-Loaded Nanoemulsions. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 330-336, 2012.

DIXIT, N.; KOHLI, K.; BABOOTA, S. Nanoemulsion system for the transdermal delivery of a poorly soluble cardiovascular drug. **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 46-55, Jan-Feb 2008.

DOHNER, K.; WOLFSTEIN, A.; PRANK, U.; ECHEVERRI, C.; DUJARDIN, D.; VALLEE, R.; SODEIK, B. Function of dynein and dynactin in herpes simplex virus capsid transport. **Molecular Biology of Cell**, v. 13, n. 8, p. 2795-2809, Aug 2002.

ELION, G. B.; FURMAN, P. A.; FYFE, J. A.; DE MIRANDA, P.; BEAUCHAMP, L.; SCHAEFFER, H. J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. **Proceedings of the National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 74, n. 12, p. 5716-5720, Dec 1977.

FASOLO, D.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Pharmazie**, v. 64, n. 11, p. 726-730, Nov 2009.

FDA, F. A. D. A. **Guidance for industry: SUPAC-SS Nonsterile Semisolid Dosage forms. Scaleup and Post approval changes: Chemistry, manufacturing and controls: in vitro release testing and in vivo Bioequivalence Documentation**. Rockville 1997.

FONTANA, M. C.; CORADINI, K.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 254-263, Jun 2009.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p. 190-195, Mar 1975.

FUJITA, K.; KUBO, I. Antifungal activity of octyl gallate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 193-201, Dec 15 2002.

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.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L. L. **Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics**. New York: McGraw-Hill Medical, 2008. ix, 1219 p. ISBN 9780071443432 (pbk. alk. paper) 0071443436.

GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins. **Phytochemistry**, v. 57, n. 6, p. 915-927, Jul 2001.

GUNCKEL, S.; SANTANDER, P.; CORDANO, G.; FERREIRA, J.; MUNOZ, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A. Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. **Chemico-Biological Interactions**, v. 114, n. 1-2, p. 45-59, Jul 3 1998.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 1-18, 2001.

HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Skin permeation: the years of enlightenment. **Intational Journal Pharmaceutics**, v. 305, n. 1-2, p. 2-12, Nov 23 2005.

HAIGH, J. M.; SMITH, E. W. The selection and use of natural and synthetic membranes for in vitro diffusion experiments. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 5-6, p. 311-330, 1994.

HAMOUDA, T. Development of a novel antiviral drug (NB-001) for topical application in humans. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 2, Supplement 2, p. AB96-AB96, 2008.

HERBARIUM. Imunomax. 2011. Disponível em: <
<http://www.herbarium.net/pt/ProfissionaisSaude/Produtos/GuiaProdutos.aspx?id=00272>. >. Acesso em: 01/06/2011.

ICTV. Master Species List. 2009. Disponível em: <
http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/1231.aspx >. Acesso em: 01/11/2011.

IZQUIERDO, P.; WIECHERS, J. W.; ESCRIBANO, E.; GARCIA-CELMA, M. J.; TADROS, T. F.; ESQUENA, J.; DEDEREN, J. C.; SOLANS, C. A study on the influence of emulsion droplet size on the skin penetration of tetracaine. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 20, n. 5, p. 263-270, 2007.

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.

JONES, T. Safety, tolerance, pharmacokinetics, and efficacy of topical nanoemulsion (NB-001) for the treatment of herpes labialis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 2, Supplement 2, p. AB93-AB93, 2008.

JONES, T. Investigator assessed time to healing in a randomized, double-blind, vehicle-controlled trial of a novel topical antiviral nanoemulsion (NB-001) for recurrent herpes labialis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 3, Supplement 1, p. AB119-AB119, 2009.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, n. 1-2, p. 81-89, 1998.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. Development of a Novel Parenteral Formulation for Tetrazepam Using a Lipid Emulsion. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 10, p. 1115-1121, 2001.

KANE, C.; MENNA, J.; SUNG, C.-C.; YEH, Y.-C. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus in vitro. II. Antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. **Bioscience Reports**, v. 8, n. 1, p. 95-102, February 1, 1988 1988.

KAUR, M.; VELMURUGAN, B.; RAJAMANICKAM, S.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Gallic Acid, an Active Constituent of Grape Seed Extract, Exhibits Anti-proliferative, Pro-apoptotic and Anti-tumorigenic Effects Against Prostate Carcinoma Xenograft Growth in Nude Mice. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 9, p. 2133-2140, 2009.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **Int J Pharm**, v. 342, n. 1-2, p. 231-239, Sep 5 2007.

KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, n. 2, p. 107-119, 2005.

KHANDAVILLI, S.; PANCHAGNULA, R. Nanoemulsions as versatile formulations for paclitaxel delivery: peroral and dermal delivery studies in rats. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 1, p. 154-162, Jan 2007.

KIM, S. H. , JUN C.D., SUK K, CHOI BJ, LIM H, PARK S, LEE SH, SHIN HY, KIM DK, SHIN TY. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicological Sciences**, v. 91, n. 1, p. 123-131, May 2006.

KIM, Y. J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 1052-1055, Jun 2007.

KIRCIK, L. JONES, T.M; JARRATT, M., FLACK, M.R., IJZERMAN, M., CIOTTI, S., SUTCLIFFE, J., BOIVIN, G., STANBERRY, L.R., BAKER, J.R. Treatment With a Novel Topical Nanoemulsion (NB-001) Speeds Time to Healing of Recurrent Cold Sores. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 11, n. 8, p. 970-977, Aug 2012.

KONG, M.; CHEN, X. G.; KWEON, D. K.; PARK, H. J. Investigations on skin permeation of hyaluronic acid based nanoemulsion as transdermal carrier. **Carbohydrate Polymers**, v. In Press, Corrected Proof, 2011.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. Supplement 1, p. S77-S98, 2002.

KTISTIS, G.; NIOPAS, I. A study on the in-vitro percutaneous absorption of propranolol from disperse systems. **Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 50, n. 4, p. 413-418, Apr 1998.

KUBO, I.; FUJITA, K.-I.; NIHEI, K.-I. Anti-Salmonella Activity of Alkyl Gallates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 23, p. 6692-6696, 2002a.

KUBO, I.; XIAO, P.; NIHEI, K.-I.; FUJITA, K.-I.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T. Molecular Design of Antifungal Agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 3992-3998, 2002b.

KUMAR, D.; AQIL, M.; RIZWAN, M.; SULTANA, Y.; ALI, M. Investigation of a nanoemulsion as vehicle for transdermal delivery of amlodipine. **Pharmazie**, v. 64, n. 2, p. 80-85, Feb 2009.

LEAL, P. C.; MASCARELLO, A.; DERITA, M.; ZULJAN, F.; NUNES, R. J.; ZACCHINO, S.; YUNES, R. A. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1793-1796, 2009.

LEE, C. H.; MOTURI, V.; LEE, Y. Thixotropic property in pharmaceutical formulations. **Journal of Control Release**, v. 136, n. 2, p. 88-98, Jun 5 2009.

LOFFLER, M.; MILLER, D.; HENNING, T. **Stabilizing O/W systems: polymeric sulfonic acid provides a gateway to new formulation platforms with exceptional aesthetic properties**. GMBH, C. Germany 2002.

LU, Y.; JIANG, F.; JIANG, H.; WU, K.; ZHENG, X.; CAI, Y.; KATAKOWSKI, M.; CHOPP, M.; TO, S.-S. T. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 641, n. 2-3, p. 102-107, 2010.

LU, Z.; NIE, G.; BELTON, P. S.; TANG, H.; ZHAO, B. Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v. 48, n. 4, p. 263-274, 2006.

LUPI, O.; DA SILVA, A. G.; PEREIRA JR, A. C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: 2000. 278

LUPI, O.; PEREIRA JR, A. C. Herpes simples. In: LUPI, O. D. S., A.G.; PEREIRA JR, A.C (Ed.). **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. p.43-70.

- LUPPI, O.; SILVA, A. G.; PEREIRA JÚNIOR, A. C. **Herpes: clínica, diagnóstico e tratamento**. 1. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 278
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 9th. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2000. xix, 991, 953 p. ISBN 0130819220.
- MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; BONTEMPO, E. M. B. G.; LEONARDI, G. R. **Formulário Dermocosmético**. São Paulo: Tecnopress Editora e Publicidade, 1999. 148
- MARK, H. F. **Encyclopedia of polymer science and technology**. Concise 3rd. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007. xxv, 1462 p. ISBN 0470046104 (cloth) 9780470046104 (cloth).
- MARTIN, A. N.; SINKO, P. J.; SINGH, Y. **Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences : physical chemical and biopharmaceutical principles in the pharmaceutical sciences**. 6th. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. viii, 659 p. ISBN 9780781797665 0781797667.
- MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1-2, p. 270-276, Apr 2 2008.
- MUELLER, R. H., Ed. **Zetapotential und Partikelladung in der Laborpraxis**. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesed. 1996.
- MURASE, T.; KUME, N.; HASE, T.; SHIBUYA, Y.; NISHIZAWA, Y.; TOKIMITSU, I.; KITA, T. Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF-kappaB and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 19, n. 6, p. 1412-1420, Jun 1999.
- NETZ, P.; ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2012-2031, 2005.
- OLIVEIRA, J. S.; AGUIAR, T. A.; MEZADRI, H.; SANTOS, O. D. H. Hydrogel-thickened nanoemulsion with green coffee seed oil for topical delivery of vitamin A. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 10, p. 1999, 2011a.

- OLIVEIRA, T. S.; AGUIAR, T. A.; MEZADRI, H.; SANTOS, O. D. H. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 60, p. 13014-13018, 2011b.
- OZCAN, I.; ABACI, O.; UZTAN, A. H.; AKSU, B.; BOYACIOGLU, H.; GUNERI, T.; OZER, O. Enhanced topical delivery of terbinafine hydrochloride with chitosan hydrogels. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 3, p. 1024-1031, 2009.
- ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; ORHAN, I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 4, p. 396-402, 2011.
- PARK, W.; CHANG, M. S.; KIM, H.; CHOI, H. Y.; YANG, W. M.; KIM, D. R.; PARK, E. H.; PARK, S. K. Cytotoxic effect of gallic acid on testicular cell lines with increasing H₂O₂ level in GC-1 spg cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 1, p. 159-163, 2008.
- PATHAN, I. B.; SETTY, C. M. Enhancement of Transdermal Delivery of Tamoxifen Citrate using Nanoemulsion Vehicle. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 1, p. 287-297, 2011.
- PELLEGRINA, C. D. et al. Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*. **Cancer Lett**, v. 226, n. 1, p. 17-25, Aug 8 2005.
- PEPE, D. et al. Decylglucoside-based microemulsions for cutaneous localization of lycopene and ascorbic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, n. 1-2, p. 420-428, 2012.
- PEPPAS, N. A. **Hydrogels in medicine and pharmacy**. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1986. ISBN 084935546X (v. 1).
- PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 50, n. 1, p. 27-46, Jul 2000.
- PEPPAS, N. A.; KHARE, A. R. Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 11, n. 1-2, p. 1-35, 1993.
- RAJPOOT, P.; PATHAK, K.; BALI, V. Therapeutic Applications of Nanoemulsion Based Drug Delivery Systems: A Review of Patents in Last Two Decades. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 5, n. 2, p. 163-172.

RIGG, P. C.; BARRY, B. W. Shed snake skin and hairless mouse skin as model membranes for human skin during permeation studies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 94, n. 2, p. 235-240, 1990.

RIVIERE, J. E.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A. The isolated perfused porcine skin flap as an in vitro model for percutaneous absorption and cutaneous toxicology. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 329-344, 1991.

RIZWAN, M.; AQIL, M.; AZEEM, A.; TALEGAONKAR, S.; SULTANA, Y.; ALI, A. Enhanced transdermal delivery of carvedilol using nanoemulsion as a vehicle. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 5, n. 5, p. 390-411, 2010/10/01 2010.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M. Herpes simplex viruses and their replication. In: KNIFE, D. M. H., P. M.; GRIFFIN, D.; LAMB, R.; MARTIN, M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S. (Ed.). **Fields' virology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.2399-2459. ISBN 0781718323.

ROSSO, R.; VIEIRA, T. O.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Relationship between the lipophilicity of gallic acid n-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 6409-6413, Sep 15 2006.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C.; AMERICAN PHARMACISTS ASSOCIATION. **Handbook of pharmaceutical excipients / edited by Raymond C. Rowe, Paul J. Sheskey, Marian E. Quinn**. 6th. London ; Chicago: APhA/Pharmaceutical Press ;, 2009. xxvii, 888 p. ISBN 9781582121352.

SAVI, L. A.; LEAL, P. C.; VIEIRA, T. O.; ROSSO, R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R.; SIMOES, C. M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005.

SBD. Manifestação de herpes ataca mais durante o verão. 2011. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/medicos/atualidade/Noticia.aspx?Cod_Noticia=674&Ano=2011>.

SCHMOOK, F. P.; MEINGASSNER, J. G.; BILLICH, A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 215, n. 1-2, p. 51-56, 2001.

SEKKAT, N.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Biophysical study of porcine ear skin in vitro and its comparison to human skin in vivo. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 11, p. 2376-2381, 2002.

ŞENYIĞIT, T.; SONVICO, F.; BARBIERI, S.; ÖZER, Ö.; SANTI, P.; COLOMBO, P. Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 3, p. 368-373, 2010.

SHAFER, W. G. **Tratado de Patologia Bucal**. 4. Rio de Janeiro: Interamericana, 1987. 837

SHAFIQ, S.; SHAKEEL, F. Effect of Labrasol on self-nanoemulsification efficiency of ramipril nanoemulsion. **Pharmazie**, v. 64, n. 12, p. 812-817, Dec 2009.

SHAFIQ, S.; SHAKEEL, F.; TALEGAONKAR, S.; AHMAD, F. J.; KHAR, R. K.; ALI, M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 227-243, 2007.

SHAH, P. P.; DESAI, P. R.; PATEL, A. R.; SINGH, M. S. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 33, n. 5, p. 1607-1617, 2012.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; AQIL, M.; SHAFIQ, S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 4, p. E104, 2007.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Celecoxib nanoemulsion: skin permeation mechanism and bioavailability assessment. **Journal of Drug Targeting**, v. 16, n. 10, p. 733-740, Dec 2008a.

SHAKEEL, F.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; ALI, J.; SHAFIQ, S. Skin permeation mechanism and bioavailability enhancement of celecoxib from transdermally applied nanoemulsion. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 6, p. 8, 2008b.

SHARMA, S.; KUMAR, A.; SAHNI, J. K.; ALI, J.; BABOOTA, S. Nanoemulsion Based Hydrogel Containing Omega 3 Fatty Acids as a Surrogate of Betamethasone Dipropionate for Topical Delivery. **Advanced Science Letters**, v. 6, n. 1, p. 221-231, 2012.

SHIBATA, H.; KONDO, K.; KATSUYAMA, R.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; MURAKAMI, K.; TAKAISHI, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant Staphylococcus

aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 549-555, Feb 2005.

SOLANS, C.; ESQUENA, J.; FORGIARINI, A. M.; USON, N.; MORALES, D.; IZQUIERDO, P. Nano-emulsions: Formation, properties and applications. **Adsorption and Aggregation of Surfactants in Solution**, v. 109, p. 525-554, 2003.

STANBERRY, L. R. **Understanding herpes**. Understanding health and sickness series. Jackson: University Press of Mississippi 2006.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TAKECHI, M.; TANAKA, Y.; TAKEHARA, M.; NONAKA, G.-I.; NISHIOKA, I. Structure and antiherpetic activity among the Tannins. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2245-2250, 1985.

THOMPSON, K. D. Herbal extracts and compounds active against herpes simplex virus. In: MAHMUD, T. H. K. e ARJUMAND, A. (Ed.). **Advances in Phytomedicine**: Elsevier, v. Volume 2, 2006. p.65-86. ISBN 1572-557X.

THOMPSON, P. E.; REINERTSON, J. W.; BAYLES, A.; MOORE, A. M. The curative action of antimalarial drugs against Plasmodium lophurae in chicks. **Journal of Infectious Diseases**, v. 92, n. 1, p. 40-51, Jan-Feb 1953.

TROTТА, M. Influence of phase transformation on indomethacin release from microemulsions. **Journal of Control Release**, v. 60, n. 2-3, p. 399-405, Aug 5 1999.

UOZAKI, M.; YAMASAKI, H.; KATSUYAMA, Y.; HIGUCHI, M.; HIGUTI, T.; KOYAMA, A. H. Antiviral effect of octyl gallate against DNA and RNA viruses. **Antiviral Research**, v. 73, n. 2, p. 85-91, 2007.

ÜSTÜNDAG OKUR, N.; APAYDIN, S.; KARABAY YAVASOGLU, N. Ü.; YAVASOGLU, A.; KARASULU, H. Y. Evaluation of skin permeation and anti-inflammatory and analgesic effects of new naproxen microemulsion formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. In Press, Uncorrected Proof, 2011.

VAN DER HEIJDEN, C. A.; JANSSEN, P. J.; STRIK, J. J. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10-11, p. 1067-1070, Oct-Nov 1986.

WAGNER, E. K.; HEWLETT, M. **Basic virology**. Malden, Mass.: Blackwell Science 1999.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **Lancet**, v. 357, n. 9267, p. 1513-1518, May 12 2001.

YEN, G.-C.; DUH, P.-D.; TSAI, H.-L. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307-313, 2002.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. H. Design of a phytosphingosine-containing, positively-charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 60, n. 1, p. 91-98, May 2005.

YU, W.; DO EGITO, E. S. T.; BARRATT, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, n. 2, p. 139-146, 1993.

ZHANG, L. W.; AL-SUWAYEH, S. A.; HUNG, C. F.; CHEN, C. C.; FANG, J. Y. Oil components modulate the skin delivery of 5-aminolevulinic acid and its ester prodrug from oil-in-water and water-in-oil nanoemulsions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 693-704, 2011.

ZHU, W.; GUO, C.; YU, A.; GAO, Y.; CAO, F.; ZHAI, G. Microemulsion-based hydrogel formulation of penciclovir for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 378, n. 1-2, p. 152-158, 2009.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: UFSC, E. U. U. E. D. (Ed.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R., 2003. p.577-614.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento de método indicativo de
estabilidade para o doseamento do galato
de pentila

Introdução

A validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelece, por estudos de laboratório, que as características de desempenho do método cumprem requisitos necessários para a aplicação analítica a que se destina. Desta forma, a validação assegura a credibilidade do método. Também é uma importante parte para o processo de registro de um novo fármaco (ERMER, 2001).

Diversas metodologias são descritas na literatura para a quantificação do ácido gálico e também para diferentes galatos, porém, ainda não há método analítico descrito para a determinação específica do galato de pentila.

Diante desses fatos, o presente capítulo tem por objetivo apresentar o desenvolvimento e a validação de um método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para a quantificação do galato de pentila.

Também será avaliada a estabilidade do composto frente a diversas condições de estresse, considerando a suscetibilidade do galato de pentila à hidrólise em função da natureza de sua estrutura química (éster). O principal produto de degradação formado será identificado.

A simple HPLC method for determination of pentyl
gallate and identification of alkaline degradant

*Artigo publicado no periódico "Latin American Journal of
Pharmacy"*

SUMMARY

Pentyl gallate (PG) is a gallic acid n-alkyl ester with a promising antiherpetic topical activity. No method for PG quantification is described in the literature. Therefore, the objective of this investigation is to develop and validate a simple method for determination of PG by High performance liquid chromatography (HPLC) considering its future application in therapy. A nanoemulsion was proposed as PG delivery system due to its low solubility that limits its delivery through the skin. Chromatographic separation was achieved on a C18 column with 50:49:1 (% v/v) methanol:water:trifluoroacetic acid (TFA) as mobile phase at a flow rate of 1.2 mL min⁻¹; detection at 275 nm. The method was validated for linearity, precision, accuracy, robustness and specificity. The degradant detected under alkaline condition was structurally characterized by Time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS). All results indicate the method is adequate for PG analysis.

KEY WORDS: HPLC, nanoemulsion, pentyl gallate.

CAPÍTULO 3

Desenvolvimento, avaliação da penetração cutânea e atividade anti-HSV-1 de nanoemulsões contendo galato de pentila

Introdução

O desenvolvimento de uma nanoemulsão requer uma escolha criteriosa de seus componentes. Dentre eles, a escolha adequada do óleo que irá compor a fase interna é de fundamental importância visando a uma maior incorporação do fármaco ou substância ativa. A escolha do sistema tensoativo adequado tem a mesma importância uma vez que, uma baixa tensão interfacial promove a melhor estabilização do sistema ao longo do tempo.

Quando se objetiva o desenvolvimento de uma formulação de uso tópico, por exemplo, para o tratamento do herpes simples, a penetração da molécula ativa, através da pele, deve ser estudada, uma vez que a mesma precisa vencer a função de barreira desse órgão, e penetrar até a camada basal da epiderme, onde ocorre a replicação viral.

A avaliação da atividade biológica do composto incorporado na forma farmacêutica complementa o estudo da formulação, já que a substância ativa deve manter ou mesmo ter sua atividade antiviral potencializada.

Nesse contexto, o presente capítulo tem por objetivo descrever o processo de desenvolvimento, caracterização, avaliação da penetração cutânea e da atividade anti-herpética de nanoemulsões contendo galato de pentila, na concentração de 5 mg/mL.

**Nanoemulsions as vehicles for topical delivery of
pentyl gallate: preparation, skin retention and in
vitro anti-HSV-1 evaluation**

*Artigo a ser submetido ao periódico “European Journal of
Pharmaceutcs and Biopharmaceutics”*

Nanoemulsions as vehicles for topical delivery of pentyl gallate: preparation, skin retention and *in vitro* anti-HSV-1 evaluation

Regina Gendzelevski Kelmann¹; Mariana Colombo¹; Sávia Caldeira de Araújo Lopes²; Ricardo José Nunes³; Helder Ferreira Teixeira¹; Caroline Rigotto⁴; Cláudia Maria Oliveira Simões⁴; Letícia Scherer Koester^{1*}

Abstract

Herpes labialis is a common infection of the skin, which causes mucocutaneous lesions and affects approximately 80% of the population worldwide. Current topical therapy for herpes labialis has limited efficacy. Previous studies have demonstrated the antiherpes activity of pentyl gallate (PG), a *n*-alkyl ester of acid gallic, suggesting that it could be regarded as a promising candidate for the development of a pharmaceutical dosage form for the topical treatment of human herpes infection caused by Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1). For this purpose, different oil/water nanoemulsion formulations containing 0.5% PG were prepared by spontaneous emulsification method. The nanoemulsions were characterized by measuring particle size and polydispersity index, zeta potential, loading efficiency and morphology. The *in vitro* PG distribution into porcine ear skin after topical application of these nanoemulsions was assessed, and the *in vitro* antiviral activity against HSV-1 was evaluated. The developed nanoemulsions presented a nanometric particle size, high zeta potential, loading efficiency of 99% and adequate stability during 12 months. PG skin retention was higher in stratum corneum layer. All formulations presented anti-HSV-1 activity. However, from all developed nanoemulsions PG was able to penetrate across stratum corneum and reach deeper into the dermis more efficiently in the nanoemulsion composed by castor oil and medium chain triglycerides, soybean lecithin, polysorbate 80 and vitamin E, and its anti-HSV-1 activity was comparable to that of PG as pure compound.

Key-words: anti HSV-1, pentyl gallate, nanoemulsion

CAPÍTULO 4

Estudo da incorporação de nanoemulsão
contendo galato de pentila em hidrogéis

Introdução

Como as nanoemulsões apresentam-se bastante fluidas, o emprego de estratégias destinadas a ajustar sua viscosidade para viabilizar sua aplicação tópica se fazem necessárias. A principal forma de aumentar a viscosidade desse tipo de forma farmacêutica é a incorporação de agentes gelificantes, que auxiliam no ajuste da viscosidade com o objetivo de otimizar a espalhabilidade e melhorar o tempo de contato da formulação com a pele, fatores que podem influenciar a ação terapêutica dos fármacos.

Diferentes agentes doadores de viscosidade podem ser empregados para espessar as nanoemulsões, e em função de suas características físico-químicas, a forma farmacêutica final será influenciada por essas características, que podem também levar a alterações nos perfis de penetração das substâncias ativas na pele.

Considerando isso, o presente capítulo tem por objetivo incorporar diferentes agentes doadores de viscosidade na nanoemulsão considerada mais promissora para veiculação do galato de pentila e avaliar as características físico-químicas, assim como o perfil de penetração cutânea dessas formulações.

Nanoemulsion-loaded hydrogels for topical administration of Pentyl Gallate

*Artigo a ser submetido ao periódico “International Journal of
Pharmaceutics”*

Nanoemulsion-loaded hydrogels for topical administration of Pentyl Gallate

Regina G. Kelmann¹, Mariana Colombo¹, Ricardo J. Nunes³; Cláudia M. O. Simões²;
Letícia S. Koester^{1*}

Abstract

The aim of this study is to describe the development of nanoemulsion-loaded hydrogels to deliver pentyl gallate (PG), a gallic acid n-alkyl ester, through the skin. PG is known as an antioxidant agent, however it seems to be a promising agent for herpis labialis treatment. Aristoflex AVC[®] and chitosan were used as gelling agents for the nanoemulsion thickening. The developed formulations presented suitable PG content (from 94.4 % to 100.3 %), droplet sizes at nanometer range (162 to 297 nm) and high zeta potentials. They exhibited a non-newtonian pseudoplastic behavior. Both vehicles neither enhanced PG penetration nor delayed its release from the nanoemulsion. NE-loaded hydrogels remained physically stable during 3 months of storage.

DISCUSSÃO GERAL

DISCUSSÃO GERAL

Os fármacos utilizados atualmente na terapêutica das infecções herpéticas não apresentam total eficácia para a eliminação dos vírus. O aparecimento de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis tornou o herpes simples um problema de saúde pública, que estimula estudos na busca de novos compostos, com diferentes mecanismos de ação que possam vir a se tornarem novos fármacos antivirais.

Dentre uma série de compostos derivados do ácido gálico avaliados recentemente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Virologia aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina, o galato de pentila (GP) parece ser um promissor candidato para o tratamento tópico das infecções herpéticas (KRATZ *et al.*, 2008a; KRATZ *et al.*, 2008b). Diante desse contexto, o estudo da veiculação desta molécula em uma forma farmacêutica adequada para sua finalidade terapêutica se tornou necessário.

Dentre as diferentes formas farmacêuticas a serem estudadas, as nanoemulsões parecem interessantes pelo fato de que estes sistemas podem incorporar uma elevada quantidade de fármaco e promover uma maior penetração deste nas camadas da pele (ABOLMAALI *et al.*, 2011).

Como ponto de partida para o desenvolvimento de uma nanoemulsão, está a avaliação da solubilidade do composto a ser incorporado em diferentes óleos que possam vir a compor o núcleo oleoso da formulação. A solubilidade do GP mostrou-se bastante elevada nos óleos testados, mesmo para o óleo de soja, em que foi menos solúvel (49,0 mg/g), comparada a outros compostos farmacologicamente ativos avaliados em outros estudos, como o diazepam (27,0 mg/g) (GAJEWSKA *et al.*, 2001), tetrazepam (45,0 mg/g) (JUMAA & MÜLLER, 2001) e carbamazepina (8,0 mg/g) (KELMANN *et al.*, 2007).

Alguns autores reportam que a mistura de óleos pode aumentar a solubilidade de fármacos (JUMAA & MÜLLER, 1998; 2001). Esse efeito foi observado para o galato de pentila, que teve sua solubilidade aumentada na

mistura (1:1) dos óleos nos quais foi mais solúvel, o óleo de rícino e o TCM. Desta forma, o núcleo oleoso selecionado para compor as nanoemulsões correspondeu a uma mistura desses dois óleos, que promoveu uma solubilidade de 150 mg de GP/g. Baseado nessa solubilidade elevada, porém sem atingir o limite de saturação do núcleo oleoso, a quantidade de GP proposta para a incorporação nas nanoemulsões foi e 5 mg/mL. Normalmente essa concentração não é alcançada com facilidade na incorporação de varias substâncias em sistemas nanoemulsionados: como a fisetina (RAGELLE *et al.*, 2012), clorambucil (GANTA *et al.*, 2008), carbamazepina (KELMANN *et al.*, 2007), diazepam (SZNITOWSKA *et al.*, 2001), paclitaxel (KAN *et al.*, 1999), entre outros.

Para a estabilização da nanoemulsão, o tensoativo selecionado foi a lecitina de soja, amplamente utilizada em sistemas nanoemulsionados há muitos anos (BENITA & LEVY, 1993; SANTOS-MAGALHAES *et al.*, 2000; DE CAMPOS *et al.*, 2012). Com a finalidade de se observar a necessidade da adição de um co-tensoativo, o polissorbato 80 foi adicionado ao delineamento experimental, assim como a vitamina E, que foi incluída com o objetivo de verificar a necessidade da adição de um componente antioxidante na formulação, uma vez que o GP é um *n*-alquil éster susceptível à hidrólise e oxidação. Assim, o delineamento experimental foi composto de quatro diferentes formulações, que foram preparadas pela técnica de emulsificação espontânea.

Para a análise do teor e da eficiência de associação do GP nas diferentes formulações durante o decorrer do trabalho, um método analítico por CLAE foi desenvolvido e validado conforme as diretrizes do ICH (ICH, 2005). O desenvolvimento desta metodologia analítica permitiu a avaliação do comportamento do galato de pentila frente à condições de estresse, onde foi observado que o composto é instável em meios alcalinos e oxidativos, e também permitiu a identificação do principal produto de degradação do GP, caracterizado como o ácido gálico.

Como não há nenhuma forma farmacêutica contendo GP disponível no mercado, foi escolhido o limite de doseamento preconizado por compêndio oficial para a maioria das formas farmacêuticas, isto é, entre 90 e 110% (BRASIL, 1988). Todas as formulações apresentaram teores entre essa faixa. Em relação à eficiência de associação, todas as formulações demonstraram que mais de 99% do composto está associado ao núcleo oleoso, sendo esse resultado esperado, em função da elevada solubilidade do composto no núcleo oleoso.

Em relação às características físicas, tamanho de gotícula e índice de polidispersidade, todas as formulações possuem reduzido diâmetro (<143 nm) e baixa polidispersão ($<0,2$). A avaliação morfológica das formulações por microscopia eletrônica de transmissão corrobora com os resultados de tamanho encontrados pela espectroscopia de correlação de fótons.

O potencial zeta apresentou-se elevado (em módulo) em todas as nanoemulsões desenvolvidas, principalmente em função da presença de fosfolípídeos presentes na lecitina de soja, garantindo a estabilidade do sistema (BENITA & LEVY, 1993). Nas formulações houve uma diferença significativa entre os valores de potencial zeta entre aquelas que possuem o polissorbato 80 em sua composição e às que possuem apenas lecitina de soja. Essa diferença porém, não é indicativo de instabilidade pois, o potencial zeta ainda se mantém elevado (-51 mV) e sabe-se que o polissorbato 80 atua também inibindo o agregamento das gotículas por impedimento estérico (LIM & KIM, 2002).

A estabilidade das nanoemulsões desenvolvidas foi acompanhada durante 12 meses, sob refrigeração (4 °C). As formulações permaneceram fisicamente estáveis durante todo o período de estudo, isto foi verificado pela manutenção do tamanho de gotícula e diminuição do índice de polidispersidade, apesar de uma significativa diminuição nos valores de potencial zeta, que ainda se mantiveram elevados (-40 mV). Foi observada uma redução do teor das nanoemulsões para valores um pouco abaixo dos limites estabelecidos.

Estudos de liberação *in vitro* têm como objetivo verificar a liberação do fármaco a partir da forma farmacêutica, uma vez que a formulação deve ser

estável, porém, deve permitir que o fármaco seja liberado para se difundir através da pele (DOH *et al.*, 2012). Em 24 h, a liberação máxima do GP foi de cerca de 63 %, e esse resultado provavelmente está relacionado com a alta afinidade do composto pelo núcleo oleoso.

Os fármacos anti-herpéticos devem atingir a camada basal da epiderme, local onde o vírus se propaga (VISALLI *et al.*, 1997). Devido a este fato, estudos de penetração cutânea se fazem necessários. Para as nanoemulsões desenvolvidas, os estudos de penetração cutânea evidenciaram que a solução utilizada como controle, assim como as formulações que sem a presença do polissorbato 80, apresentaram uma maior retenção do GP no estrato córneo, enquanto as nanoemulsões contendo o co-tensoativo apresentaram maior penetração na epiderme, camada de interesse, a maior quantidade de GP retida na derme também pode estar relacionada com a presença do polissorbato 80.

Na avaliação da atividade antiviral, as formulações F1, F2 e F3 apresentaram uma CI_{50} estatisticamente semelhante e, para a F4, o resultado foi estatisticamente semelhante ao composto puro. Indicando que a formulação F4 é a mais promissora neste aspecto. Cabe ressaltar que formulações preparadas sem a adição do galato de pentila não inibiram a infecção viral em nenhuma das concentrações testadas.

Diante dos resultados encontrados, pode-se observar que a adição da vitamina E não promoveu melhor estabilização da molécula nas formulações. A presença do polissorbato 80 promoveu uma maior penetração do GP na epiderme, e que com a associação da vitamina E, essa penetração foi ainda mais pronunciada. Assim, a formulação que reuniu as melhores características tanto físico-químicas, de estabilidade e atividade antiviral é a nanoemulsão F4, composta, além do núcleo oleoso, pela lecitina de soja como tensoativo, polissorbato 80 como co-tensoativo e a vitamina E como adjuvante.

Como as nanoemulsões são sistemas de baixa viscosidade, a sua incorporação em um veículo carreador que promova uma viscosidade e uma espalhabilidade adequadas, foi estudada no último capítulo da presente tese. Para

tal, foi investigada a incorporação da nanoemulsão F4 em dois diferentes hidrogéis de característica iônica. A escolha de um hidrogel como veículo se dá pelo fato de que o GP não deve apresentar maior afinidade pelo veículo do que à pele, e a incorporação da nanoemulsão em uma base hidrofílica, tende a evitar esse tipo de situação (ALVES *et al.*, 2005; MOU *et al.*, 2008).

Os polímeros utilizados neste estudo, Aristoflex AVC[®] e quitosana, foram selecionados em função de suas características físico-químicas. Ambos são agentes formadores de hidrogéis iônicos, carregados negativamente, no caso do Aristoflex AVC[®], e positivamente, no que se refere à quitosana.

A incorporação dos polímeros nas formulações não influenciou no teor inicial do PG na nanoemulsão, que se manteve dentro dos parâmetros estipulados. Entretanto, foi observado um aumento significativo no tamanho de gotícula com a incorporação da quitosana. Esse aumento pode ser resultado da agregação das partículas facilitada durante a inversão de cargas na superfície da gotícula, que inicialmente era negativa e foi modificada pela carga positiva dos grupamentos amino do polímero (SOUTO *et al.*, 2004). Cabe ressaltar que apesar do aumento do tamanho de gotícula, o índice de polidispersão se manteve ainda próximo de valores aceitáveis (0.3), porém demonstrando certa agregação das gotículas da fase interna. Quando utilizado o Aristoflex AVC[®] como agente gelificante, inicialmente não se observou alteração tanto no tamanho de gotícula como no índice de polidispersão. Apesar das diferenças observadas, em ambos hidrogéis o tamanho das gotículas ainda se manteve em escala nanométrica.

Como mencionado anteriormente, a adição da quitosana levou a uma inversão dos valores de potencial zeta, enquanto a adição do Aristoflex AVC[®], de característica aniônica, não influenciou esse parâmetro que foi semelhante ao valor inicial da nanoemulsão.

O pH das formulações diminuiu com a incorporação de ambos polímeros, porém os valores são compatíveis com o estrato córneo ($\text{pH} \cong 5.5$) e adequados para a estabilidade do GP ($\text{pH} < 7,0$).

O comportamento reológico das formulações foi estudado, uma vez que a viscosidade pode influenciar na liberação do GP a partir da forma farmacêutica. As características e a concentração de cada polímero promoveram hidrogéis de viscosidades diferentes, porém com mesmo comportamento reológico, ambos apresentaram-se como fluidos não-newtonianos e não tixotrópicos, apesar das viscosidades variarem de acordo com a força aplicada sobre eles.

Foi observado que a presença da nanoemulsão no hidrogel contendo Aristoflex AVC[®] não influenciou a viscosidade do sistema, enquanto no hidrogel composto por quitosana, a nanoemulsão promoveu um aumento da viscosidade em comparação ao hidrogel controle.

A espalhabilidade do hidrogel composto por quitosana, de viscosidade menor, foi maior do que o observado para as formulações contendo Aristoflex AVC[®], demonstrando a relação inversa entre esses dois parâmetros nas condições utilizadas no presente estudo. Em comparação com os respectivos controles, isto é, hidrogéis preparados sem a adição da nanoemulsão, não foram observadas diferenças de espalhabilidade, o que indica que a presença do sistema nanoemulsionado não influencia nesta característica.

A estabilidade intrínseca dos dois hidrogéis foi avaliada durante 24 h. Nenhum sinal de instabilidade física foi observado. Na realização do teste de centrifugação, observou-se um leve sinal de instabilidade relacionado com uma leve separação de fases. Apesar disso, durante 90 dias não se observou nenhum indicativo de instabilidade em ambas as formulações.

Em relação aos parâmetros físico-químicos, não houve diferenças nos teores de GP. Porém, foi observado um significativo aumento do tamanho de gotícula. Acredita-se que esse aumento aparentemente não está relacionado com o efeito de Ostwald rippenig, uma vez que o índice de polidispersão se manteve constante, indicando que o aumento no diâmetro das gotículas não se dá pela diferença de densidade das gotículas da fase interna, onde os glóbulos menores têm seu conteúdo envolvido pelos maiores (TADROS *et al.*, 2004).

A penetração cutânea do galato de pentila não foi influenciada pela presença dos polímeros. No hidrogel composto pelo Aristoflex AVC[®] foi observada uma maior retenção do GP no estrato córneo, porém não existiram diferenças na derme e na epiderme tanto para os dois hidrogéis como para a nanoemulsão utilizada como controle. Assim, a característica catiônica da quitosana não promoveu uma maior penetração do GP através da pele e a diferença na viscosidade das formulações também não representou influência.

CONCLUSÕES

A partir do conjunto de resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Um método por CLAE indicativo de estabilidade foi desenvolvido visando à determinação do galato de pentila nas formulações. O método mostrou ser específico, linear, exato, preciso e sensível para quantificação do galato de pentila (GP). Este também é adequado para a separação do composto de seu principal produto de degradação, o ácido gálico;
- Testes de degradação forçada identificaram que o GP degrada-se em meios alcalino e oxidativo;
- A elevada solubilidade do GP no núcleo oleoso selecionado, uma mistura de óleo de rícino e triglicerídeos de cadeia média, permitiu uma elevada incorporação do composto (5 mg/mL) nas nanoemulsões desenvolvidas;
- A preparação das nanoemulsões contendo galato de pentila pelo método de emulsificação espontânea mostrou-se viável;
- Foram obtidas nanoemulsão com reduzido tamanho de partícula, monodispersas, com elevada carga de superfície negativa, eficiência de encapsulação superior a 99% e estáveis fisicamente por 12 meses;
- A liberação do GP a partir das nanoemulsões desenvolvidas segue cinética que corresponde ao modelo de Higuchi e atinge uma liberação máxima em 24h de cerca de 63 %;
- Estudos de penetração *in vitro* evidenciaram que a utilização do polissorbato 80 e da vitamina E em conjunto promoveu uma maior penetração do galato de pentila na epiderme, e a presença do polissorbato

80 nas formulações promoveu uma maior penetração do galato de pentila na derme;

- A atividade anti-HSV-1 revelou que somente a formulação F4, composta por lecitina de soja, polissorbato 80 e vitamina E possuiu atividade estatisticamente equivalente a do composto puro. Esta formulação foi selecionada para a incorporação dos polímeros empregados para espessar as nanoemulsões;
- A utilização de dois tipos de polímeros iônicos (Aristoflex ACV e quitosana) não influenciou no teor das nanoemulsões, porém a utilização da quitosana alterou o tamanho de gotícula e o potencial zeta das formulações;
- Ambas formulações de hidrogéis permaneceram estáveis por 90 dias;
- As diferentes características dos polímeros não promoveram alterações na penetração do GP na epiderme e derme, apesar da formulação com Aristoflex AVC[®] apresentar uma maior quantidade de GP retida no estrato córneo;
- Por fim, a formulação que se apresentou mais promissora para a veiculação do GP é a que contém a nanoemulsão espessada com 2,0% de Aristoflex AVC[®].

PERSPECTIVAS

O conjunto de resultados obtidos abre perspectivas para a realização de trabalhos futuros que virão a complementar o que foi realizado até então. Dentre o que pode ser realizado, destaca-se:

- Realizar estudos de microscopia confocal para a visualização da penetração cutânea nas nanoemulsões, que serão marcadas com vermelho do Nilo;
- Realizar a avaliação histológica para observar alterações nas células epiteliais em o contato com as nanoemulsões;
- Avaliar a toxicidade dérmica do galato de pentila e da formulação mais promissora, conforme os parâmetros preconizados pelo guia OECD 402. O projeto foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da URI- Campus de Erechim;
- Avaliar a atividade antiviral *in vivo* da formulação selecionada;
- Investigar a viabilidade de produção das nanoemulsões pela técnica de homogeneização à alta pressão, e otimizar os parâmetros de processo, uma vez que esta técnica possui grande aplicabilidade industrial;
- Realizar otimizações da formulação com vistas ao desenvolvimento de um medicamento de uso tópico, tais como a adição de conservantes e outros adjuvantes que influenciam na estabilidade e aspectos sensoriais;
- Avaliar a estabilidade de longa duração da formulação de hidrogel otimizada.

REFERÊNCIAS

ABOLMAALI, S. S.; TAMADDON, A. M.; FARVADI, F. S.; DANESHAMUZ, S.; MOGHIMI, H. Pharmaceutical nanoemulsions and their potential topical and transdermal applications. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 139-150, 2011.

ALMEIDA, M. E.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Preparation of submicron emulsions: Theoretical aspects about the methods employed today [Preparação de emulsões submicrométricas: Aspectos teóricos sobre os métodos empregados na atualidade]. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 5, p. 780-788, 2008.

ALVES, P. M.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, n. 12, p. 900-904, Dec 2005.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: Comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p. 1069-1079, 1993.

BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. **Antiviral Res**, v. 61, n. 2, p. 73-81, Feb 2004.

BRASIL. **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. Parte 1 1988.

DE CAMPOS, V. E.; RICCI-JUNIOR, E.; MANSUR, C. R. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic drugs. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 12, n. 3, p. 2881-2890, Mar 2012.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. **J Clin Virol**, v. 22, n. 1, p. 73-89, Aug 2001.

FIELD, H. J. Herpes simplex virus antiviral drug resistance--current trends and future prospects. **J Clin Virol**, v. 21, n. 3, p. 261-269, Jun 2001.

GAJEWSKA, M.; SZNITOWSKA, M.; JANICKI, S. Diazepam submicron emulsions containing soya-bean oil and intended for oral or rectal delivery. **Pharmazie**, v. 56, n. 3, p. 220-222, Mar 2001.

GANTA, S.; PAXTON, J. W.; BAGULEY, B. C.; GARG, S. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of chlorambucil delivered in parenteral emulsion. **Int J Pharm**, v. 360, n. 1-2, p. 115-121, Aug 6 2008.

ICH, I. C. O. H. **Guidance for industry : Q2R1- Validation of Analytical procedure: Text and Methodology**. Guidance for industry. Rockville, MD: Center for Drug Evaluation and Research 2005.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. Development of a novel parenteral formulation for tetrazepam using a lipid emulsion. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 10, p. 1115-1121, 2001.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 163, n. 1-2, p. 81-89, 1998.

KAN, P.; CHEN, Z.-B.; LEE, C.-J.; CHU, I. M. Development of nonionic surfactant/phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 58, n. 3, p. 271-278, 1999.

KELMANN, R. G.; KUMINEK, G.; TEIXEIRA, H. F.; KOESTER, L. S. Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process. **Int J Pharm**, v. 342, n. 1-2, p. 231-239, Sep 5 2007.

KRATZ, J. M. *et al.* Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 437-442, Aug 2008a.

KRATZ, J. M.; ANDRIGHETTI-FROHNER, C. R.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; TRYBALA, E.; BERGSTROM, T.; BARARDI, C. R.; SIMOES, C. M. Evaluation of anti-HSV-2 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 5, p. 903-907, May 2008b.

LIM, S. J.; KIM, C. K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **Int J Pharm**, v. 243, n. 1-2, p. 135-146, Aug 28 2002.

LIU, W.; HU, M.; XUE, C.; XU, H.; YANG, X. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate. **Int J Pharm**, v. 364, n. 1, p. 135-141, Nov 19 2008.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, n. 1-2, p. 270-276, 2008a.

MOU, D.; CHEN, H.; DU, D.; MAO, C.; WAN, J.; XU, H.; YANG, X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. **Int J Pharm**, v. 353, n. 1-2, p. 270-276, Apr 2 2008b.

NAKANO, M. Places of emulsions in drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 45, n. 1, p. 1-4, Dec 6 2000.

OLIVEIRA, J. S.; AGUIAR, T. A.; MEZADRI, H.; SANTOS, O. D. H. Hydrogel-thickened nanoemulsion with green coffee seed oil for topical delivery of vitamin A. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 10, p. 1999, 2011.

RAGELLE, H.; CRAUSTE-MANCIET, S.; SEGUIN, J.; BROSSARD, D.; SCHERMAN, D.; ARNAUD, P.; CHABOT, G. G. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. **Int J Pharm**, v. 427, n. 2, p. 452-459, May 10 2012.

SANTOS-MAGALHAES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M.; CAETANO, M. N. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **Int J Pharm**, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, Nov 4 2000.

SAVI, L. A.; LEAL, P. C.; VIEIRA, T. O.; ROSSO, R.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R.; SIMOES, C. M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005.

SHARMA, S.; KUMAR, A.; SAHNI, J. K.; ALI, J.; BABOOTA, S. Nanoemulsion Based Hydrogel Containing Omega 3 Fatty Acids as a Surrogate of Betamethasone Dipropionate for Topical Delivery. **Advanced Science Letters**, v. 6, n. 1, p. 221-231, 2012.

SOUTO, E. B.; WISSING, S. A.; BARBOSA, C. M.; MÜLLER, R. H. Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 1, p. 83-90, 2004.

SZKITOWSKA, M.; GAJEWSKA, M.; JANICKI, S.; RADWANSKA, A.; LUKOWSKI, G. Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 52, n. 2, p. 159-163, Sep 2001.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 108-109, p. 303-318, May 20 2004.

VISALLI, R. J.; COURTNEY, R. J.; MEYERS, C. Infection and Replication of Herpes Simplex Virus Type 1 in an Organotypic Epithelial Culture System. **Virology**, v. 230, n. 2, p. 236-243, 1997.

VLIETINCK, A. J. D. B., T.; VANDEN BERGUE, D. A. Plant substances as antiviral agents. In: (Ed.). **Current organic chemistry**. Hilversum, The

Netherlands ; Miami, FL: Bentham Science Publishers, 1997. p.307-344. ISBN 1385-2728.

WAGNER, E. K.; HEWLETT, M. **Basic virology**. Malden, Mass.: Blackwell Science 1999.

YU, W.; DO EGITO, E. S. T.; BARRATT, G.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by a spontaneous emulsification process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 89, n. 2, p. 139-146, 1993.