

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL/MG

ANA CRISTINA DE MORAIS VIEIRA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS) COMO SISTEMAS
DE LIBERAÇÃO DE ACICLOVIR PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE
HERPES SIMPLES**

Alfenas

2012

ANA CRISTINA DE MORAIS VIEIRA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS) COMO SISTEMAS
DE LIBERAÇÃO DE ACICLOVIR PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE
HERPES SIMPLES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gislaine Ribeiro Pereira.

Alfenas

2012

Vieira, Ana Cristina de Moraes.

Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) como sistemas de de liberação de Aciclovir para o tratamento tópico de Herpes simples. - 2012.

41 f. -

Orientadora: Gislaine Ribeiro Pereira.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2012.

Bibliografia.

1. Nanopartículas. 2. Aciclovir. 3. Absorção Cutânea. I. Pereira, Gislaine Ribeiro. II. Título.

CDD: 615

ANA CRISTINA DE MORAIS VIEIRA

**NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS) COMO SISTEMAS
DE LIBERAÇÃO DE ACICLOVIR PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE
HERPES SIMPLES**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Avaliação físico-química e microbiológica de fármacos e medicamentos.

Aprovada em:

Prof.^a Dr.^a: Magali Benjamim de Araújo

Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (Unifal - MG)

Prof.^a Dr.^a: Renata Fonseca Vianna Lopez

Assinatura: _____

Instituição: Universidade de São Paulo (USP - SP)

Prof.^a Dr.^a: Gislaíne Ribeiro Pereira

Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (Unifal - MG)

Dedico à minha mãe, pelo amor em me proporcionar a realização deste trabalho e ao meu noivo Walbio, amigo e companheiro sempre presente em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu santo Anjo da Guarda, por sempre iluminarem meu caminho e minhas decisões.

Ao meu afilhado Lucas, presente de Deus, minha avó (*in memoriam*), meus irmãos e toda minha família, pela paciência, apoio, carinho e ensinamentos de uma vida. Amo muito todos vocês.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade de aprimoramento profissional e concessão de bolsa institucional.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Gislaine Ribeiro Pereira pela orientação, ajuda e conhecimentos transmitidos durante esses anos.

Às amigas de república Larissa, Lívia, Maria Rita e Sarah pela companhia, amizade, carinho e por terem me proporcionado dias incríveis em Alfenas.

Às amigas Ana Carolina, Eloísa, Heliara, Isabel Cristina e Miliane por me acolherem com enorme carinho em sua república durante minhas longas e intermináveis estadias em Ribeirão Preto.

À todos os meus amigos, em especial Heloize e Hermano, pela ajuda e momentos de alegria proporcionados.

Aos colegas do mestrado pela amizade e colaboração durante esses anos.

Aos funcionários da Coordenação de pós-graduação pela atenção, paciência e competência nos serviços prestados.

Aos funcionários do Núcleo Controle de Qualidade, pela colaboração, suporte técnico e bons momentos proporcionados

À Prof^a. Dr^a. Renata Fonseca Vianna Lopez, pelo enorme apoio e colaboração durante a realização deste trabalho, sua contribuição foi muito valiosa. Aos colegas do laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em sistemas de liberação pelo apoio nos experimentos, em especial à Karina, não só pela ajuda, mas também pelos conselhos e apoio nos momentos difíceis. A Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela parceria e concessão de recursos para a execução desse projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa e auxílio financeiro a este projeto.

RESUMO

O aciclovir, nucleosídeo sintético análogo da 2'-desoxiguanosina, é um dos mais efetivos e seletivos fármacos antivirais. No entanto, tem sido sugerido que a terapia tópica com aciclovir possui baixa eficácia devido a uma falta de penetração de quantidades suficientes do fármaco até a camada basal da epiderme, local de instalação do vírus herpes simples. As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas de liberação de fármacos que reúnem as principais vantagens encontradas nos sistemas lipossomais e nas micro e nanopartículas poliméricas. Diversas propriedades como adesão ao estrato córneo, formação de filme oclusivo, aumento da hidratação e da penetração cutânea de ativos tornam esse sistema extremamente promissor para a liberação tópica de fármacos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar NLS contendo o fármaco antiviral aciclovir, além de avaliar o potencial deste sistema carreador para a liberação tópica. NLS-neutras e NLS-negativas, preparadas através do método da microemulsão, apresentaram diâmetro médio de $285,33 \pm 40,22$ nm e $220,75 \pm 12,84$ nm, bem como potenciais zeta de $6,68 \pm 15,27$ mV e $-42,02 \pm 7,04$ mV, respectivamente. Os estudos de permeação cutânea *in vitro* apresentaram uma permeação de ACV, através da pele de orelha de porco em 24 horas, significativamente maior a partir das NLS-negativas do que a partir do controle e das NLS-neutras. Além disso, os ensaios de retenção cutânea *in vitro* revelaram também, uma quantidade de ACV depositada no estrato córneo e na epiderme viável, significativamente maior na pele tratada com NLS-negativas do que nas peles tratadas com o controle e NLS- neutras. Portanto, pode ser concluído que as NLS-negativas representam um promissor sistema de liberação tópica para o tratamento das lesões cutâneas causadas pelo vírus do herpes simples.

Palavras-chave: Nanopartículas lipídicas sólidas. Aciclovir. Penetração cutânea.

ABSTRACT

Acyclovir, a synthetic analogue of 2'- deoxyguanosine, is one of the most effective and selective agents against viruses of the Herpes group. Nevertheless, it has been suggested that the topical therapy with acyclovir has low efficacy due to the lack of penetration of a sufficient amount of drug to the basal epidermis, target site of herpes simplex virus. Solid lipid nanoparticles (SLN) represent an alternative carrier system to traditional colloidal carriers, such as emulsions, liposomes and polymeric micro- and nanoparticles. Several properties such as adhesion to the stratum corneum, occlusive film formation and increase in hydration as well as in percutaneous penetration of active drugs make this system highly promising for the topical delivery. The aim of the present study was to develop and to characterize acyclovir loaded SLN, as well as to evaluate the potential of this carrier system for topical delivery. Neutral-SLN and negative-SLN, prepared by the microemulsion method, showed average diameters of 285.33 ± 40.22 nm and 220.75 ± 12.84 nm, as well as zeta potentials of 6.68 ± 15.27 mV and -42.02 ± 7.04 mV, respectively. The *in vitro* percutaneous permeation studies showed a significantly higher amount of ACV, permeated through the pig-ear skin in 24 hours, from negative-SLN than neutral-SLN. Moreover, the skin uptake behavior revealed a significantly higher amount of ACV deposited in stratum corneum and viable epidermis after treating with the negative-SLN. Therefore, it can be concluded from our study that negative-SLN may be a promising carrier for topical delivery of ACV.

Keywords: Solid lipid nanoparticles. Acyclovir. Skin penetration.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	09
1.1	HERPES SIMPLES E SEU TRATAMENTO	10
1.2	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS)	13
1.2.1	Caracterização das NLS	20
1.2.1.1	Tamanho de Partícula e potencial zeta	20
1.2.1.2	Grau de cristalinidade e modificações lipídicas	21
1.2.1.3	Co-existência de outras estruturas colidais	21
1.3	ENSAIOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO	22
2	OBJETIVO	23
3	RESULTADOS	24
	REFERÊNCIAS	25
3.1	ARTIGO	28

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O vírus do herpes simples (HSV) é responsável por provocar infecções contagiosas e recorrentes no homem, podendo levar a potenciais complicações no caso indivíduos imunocomprometidos. O aciclovir, nucleosídeo sintético análogo da 2'-desoxiguanosina, é um dos mais efetivos e seletivos fármacos antivirais. Este fármaco é particularmente ativo contra as lesões orofaciais e genitais, provocadas pelo HSV-1 e HSV-2 respectivamente, que são infecções virais de comum prevalência na população. A administração do aciclovir pode ser feita via oral, parenteral e tópica.

A terapia tópica apresenta inúmeros benefícios, como a ausência de efeitos colaterais sistêmicos e a maior biodisponibilidade local do fármaco. No entanto, ainda é um desafio, devido às dificuldades em controlar a liberação e a quantidade de fármaco que alcança as diferentes camadas da pele. No caso do tratamento tópico com aciclovir, tem sido relatada uma baixa eficácia terapêutica devido a uma ineficiente penetração do fármaco até a camada basal da epiderme, local de instalação do HSV. Com isso, torna-se necessário a reaplicação das formulações diversas vezes, podendo resultar em irritação local. Inúmeras estratégias têm sido estudadas no sentido de otimizar a terapia tópica, aumentando a penetração cutânea dos fármacos, dentre elas podemos destacar o emprego dos promotores de absorção cutânea, métodos físicos como a iontoforese, as micro e nanopartículas poliméricas, dentre outros.

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas de liberação de fármacos, compostos por partículas de tamanho nanométrico, cuja matriz é formada por lipídeos sólidos. As NLS foram descobertas no início dos anos 90 como um sistema de liberação alternativo às emulsões e lipossomas, devido à instabilidade dos mesmos, e às partículas poliméricas, devido à toxicidade dos solventes orgânicos utilizados na produção destas. Dentre as inúmeras vantagens que este sistema apresenta, destaca-se a possibilidade de uma liberação controlada e alvo-específica dos fármacos incorporados em sua matriz, bem como o aumento da estabilidade química destes fármacos. Além disso, as NLS são carreadores que apresentam grande potencial para aumentar a penetração cutânea de fármacos devido às suas propriedades de adesividade e oclusão, que promove o aumento da hidratação da pele e desestruturação do estrato córneo. Sendo assim, com base

nessas evidências, as NLS constituem um sistema de liberação interessante para ser avaliado quanto a administração tópica do aciclovir.

1.1 HERPES SIMPLES E SEU TRATAMENTO

Herpes é o nome dado a uma família de vírus que possui como maiores patógenos ao ser humano o vírus do herpes simples tipo 1 (HSV-1) e o vírus do herpes simples tipo 2 (HSV-2). O HSV-1 está normalmente associado a infecções orofaciais e encefalites, ao passo que o HSV-2 é responsável por infecções genitais, podendo ser transmitido de mães infectadas aos neonatos. Ambos os vírus provocam infecção latente em neurônios sensoriais, podendo ocasionalmente ser reativados provocando lesões. Muitos fatores podem desencadear a reativação viral, como estresse físico e emocional, febre, luz ultravioleta e danos teciduais (WHITLEY, ROIZMAN, 2001).

Doenças associadas ao HSV estão entre as infecções mais disseminadas, afetando aproximadamente 60-95% dos adultos, sendo o HSV-1 responsável pela maior parte dos casos (OHANA et al., 2000; BRADY, 2004). Ao longo das últimas décadas pôde-se observar um grande aumento, tanto na incidência quanto na gravidade, das infecções causadas pelo HSV devido ao crescente número de pacientes imunodeprimidos, provocados por agressivos tratamentos de quimioterapia, pela expansão nos transplantes de órgãos e uma maior incidência de infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (JALÓN et al., 2003).

O aciclovir (figura 1), nucleosídeo sintético análogo da 2'-desoxiguanosina, é um dos mais efetivos e seletivos fármacos antivirais, podendo ser administrado via tópica, oral e parenteral. Possui atividade eficaz contra o HSV-1 e HSV-2 e Varicella Zoster vírus (VZV), em menor intensidade possui também ação contra o vírus Epstein-Barr e Citomegalovírus. O aciclovir foi o fármaco que deu início à farmacoterapia antiviral seletiva, sendo utilizado como terapia padrão para o tratamento do herpes simples desde 1981 (O'BRIEN, CAMOPLI-RICHARDS, 1989; RICHARDS et al., 1983; WEBER, CINATL, 1996; TROTTED et al, 2005).

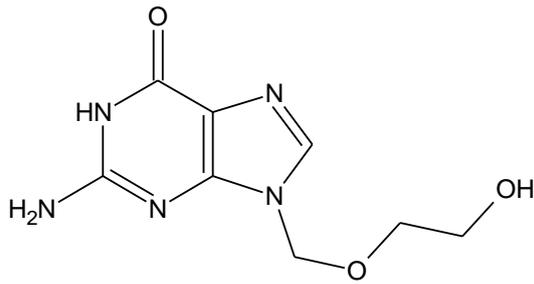


Figura 1: Fórmula estrutural do aciclovir.

O aciclovir apresenta-se sob a forma de um pó cristalino branco, pouco solúvel em água, muito pouco solúvel em etanol e solúvel em soluções diluídas de ácidos minerais e hidróxidos alcalinos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002). É um fármaco de natureza hidrofílica e anfótera, contendo dois grupos ionizáveis. Os valores das constantes de dissociação (pKa) são $2,55 \pm 0,10$ para protonação e $9,35 \pm 0,20$ para a desprotonação. Em relação ao coeficiente de partição óleo/água (log-P), seu valor corresponde a $-1,481 (\pm 0,460)$.

Para exercer sua ação antiviral, o aciclovir deve ser transformado em trifosfato de aciclovir. Inicialmente ele é convertido em monofosfato por ação de uma timidina cinase produzida nas células infectadas. Em seguida, as enzimas celulares adicionam fosfatos para formar difosfato e trifosfato de aciclovir. O trifosfato de aciclovir inibe a síntese do DNA viral, competindo com o trifosfato de desoxiguanosina, como substrato para a DNA polimerase viral. Quando o aciclovir é inserido no DNA viral em replicação, sua síntese é impedida (SILVA, 2006).

Quando administrado por via oral é parcialmente absorvido no trato gastrointestinal, apenas 20% da dose são absorvidos e as concentrações plasmáticas máximas são atingidas em 1-2 h, sendo necessário sua administração várias vezes ao dia. Apesar da baixa biodisponibilidade oral (10-20%), suas concentrações plasmáticas excedem muito a concentração inibitória ($0,1 \mu\text{M}$ e $0,4 \mu\text{M}$ para os tipos 1 e 2 do HSV respectivamente) com administração de 200 mg do fármaco em adultos. Os efeitos adversos do aciclovir incluem cefaléia e náuseas, podendo ocorrer, raramente, encefalopatia (SILVA, 2006).

O aciclovir mostrou ser clinicamente eficaz no tratamento das lesões cutâneas, principalmente as labiais, provocadas pelo HSV-1, que possui como local de instalação a camada basal da epiderme (JÁLON et al, 2003). O tratamento tópico

das lesões cutâneas geralmente é realizado administrando-se creme contendo 5% de aciclovir cinco vezes ao dia. Porém, devido à sua baixa permeabilidade, o aciclovir é lentamente e pouco absorvido quando administrado em formas farmacêuticas de uso tópico (JAIN et al, 2005). Sendo assim, tem sido sugerido que a terapia tópica com aciclovir possui baixa eficácia devido a uma falta de penetração de quantidades suficientes do fármaco na epiderme basal (VOLPATO, SANTI, COLOMBO, 1995).

A via de administração tópica possui inúmeras vantagens, como ação direcionada do fármaco, aumento da biodisponibilidade local e ausência de efeitos colaterais sistêmicos. No entanto, para uma terapia tópica eficaz, são necessárias concentrações adequadas do fármaco na epiderme basal, local de instalação do vírus, por um período prolongado (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT, KORTING, 2007; LEWIS, 1990). Porém, como a pele é uma barreira natural para a penetração de substâncias, dificilmente um fármaco administrado topicamente, sem uma formulação adequada, atingirá as camadas mais profundas em concentrações suficientes para um tratamento adequado (TAVEIRA, 2009).

Existem inúmeras estratégias estudadas e descritas na literatura para aumentar a penetração e permeação cutânea de fármacos, e, algumas delas têm sido propostas no sentido de melhorar a terapia tópica de aciclovir, como o emprego de promotores de absorção cutânea, métodos físicos como a iontoforese e emprego de pró-fármacos (AFOUNA et al, 2003; VOLPATO, SANTI, COLOMBO, 1995; VOLPATO et al, 1998; BANDO et al, 1996). Tais técnicas, na maioria das vezes, são responsáveis por um aumento na permeação cutânea, o que é muito interessante para uma administração transdérmica. Porém, para a terapia tópica, existe outro desafio que é controlar a liberação e a quantidade de fármaco que alcança as diferentes camadas da pele e fazer com que o fármaco permaneça nestas camadas mantendo sua ação, com uma mínima taxa de permeação. Desta forma, otimiza-se a terapia tópica aumentando a biodisponibilidade local do fármaco, diminuindo a dose administrada e conseqüentemente os efeitos colaterais, e aumentando o intervalo de dose. Os sistemas de liberação nos quais o fármaco fica compartimentalizado, como as nanopartículas, cumprem melhor este papel no sentido de serem capazes de formar reservatório do fármaco controlando sua liberação, além disso, estes sistemas também têm demonstrado a peculiaridade de reduzir ou suprimir a permeação cutânea (liberação transdérmica) e aumentar a penetração para as

camadas da pele (liberação dérmica) (JENNING et al, 2000; JALÓN et al, 2001; ALVAREZ- ROMÁN et al., 2004; LOMBARDI BORGIA et al, 2005; CHEN et al, 2006; LIU et al, 2007).

Jalón et al (2001) desenvolveram micropartículas poliméricas contendo aciclovir e avaliaram seu efeito na permeação e retenção cutânea *in vitro* deste fármaco, utilizando uma suspensão de aciclovir como controle. Os autores observaram que após 6 e 24 horas de experimento a quantidade de fármaco presente na epiderme basal foi similar para as duas formulações. No entanto, após 88 horas, foi observado uma quantidade muito superior de fármaco depositada na epiderme basal a partir do tratamento com as micropartículas, quando comparado com o controle. Além disso, também em 88 horas, a quantidade de fármaco presente na solução receptora foi significativamente menor para as micropartículas, sugerindo, portanto, que este tipo de carreador pode melhorar a terapia tópica com aciclovir. Em um estudo posterior, os autores (JALON et al, 2003) avaliaram a atividade anti-viral das micropartículas contendo aciclovir empregando-se cultura de células. Eles observaram uma maior atividade anti-viral do aciclovir quando o mesmo se encontra associado às micropartículas, este aumento foi ainda mais evidente após 96 horas de incubação das células, provavelmente devido à liberação sustentada proporcionada pelas micropartículas.

1.2 NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS (NLS)

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) são sistemas de liberação de fármacos compostos, como o próprio nome diz, por partículas de tamanho nanométrico, cuja matriz é formada por lipídeos sólidos (figura 2A). As NLS foram desenvolvidas no início dos anos 90 como um sistema carreador alternativo às emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas, pois reúnem em sua estrutura as principais vantagens encontradas nesses sistemas. Similar às nanopartículas poliméricas, sua matriz sólida protege os fármacos encapsulados contra degradação química, além de modular sua velocidade de liberação. E, da mesma forma que as emulsões e lipossomas, são compostas por substâncias fisiologicamente bem toleradas que já possuem aprovação para aplicação farmacológica em seres humanos (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000; MEHNERT, MADER, 2001). As NLS são produzidas substituindo-se o lipídio líquido (óleo) de uma emulsão óleo em água

(o/a) por um lipídio sólido ou uma mistura de lipídios sólidos, resultando em uma matriz lipídica sólida tanto à temperatura ambiente quanto à temperatura corporal (figura 2B) (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009).

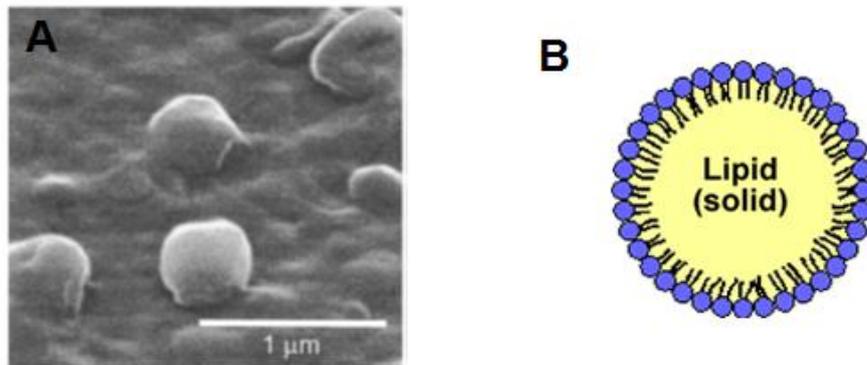


Figura 2A: Micrografia de NLS formada de compritol e poloxamer 188 possuindo diâmetro de 400 nm. (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000 p. 162). Figura 2B: Representação da estrutura geral de uma NLS (MARCATO, DURÁN, 2007).

Existem vários métodos descritos na literatura para a produção de NLS, sendo os principais: homogeneização em alta pressão, método da microemulsão, emulsificação e evaporação de solvente, emulsificação e difusão de solvente, método da emulsão múltipla, inversão de fases e ultrasonificação. Dentre eles, podemos destacar o processo de homogeneização em alta pressão por possuir inúmeras vantagens quando comparado aos demais métodos, como por exemplo, boa capacidade de produção industrial, fácil scale-up, curto tempo de produção e a não utilização de solventes orgânicos (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009). Existem disponíveis comercialmente inúmeros homogeneizadores de alta pressão, de vários tamanhos, preços e com diferentes capacidades de produção, podendo operar tanto a frio quanto a quente. Este método, sem dúvida alguma, pode ser considerado o mais viável industrialmente (MEHNERT, MADER, 2001). Uma abordagem alternativa e também muito utilizada é a produção de NLS através do método da microemulsão, desenvolvido por Gasco e colaboradores (1993), que consiste em verter uma microemulsão ainda quente em água gelada sob vigorosa agitação. Para formar uma microemulsão com lipídios sólidos à temperatura ambiente é necessário que ela seja produzida em uma temperatura acima do ponto de fusão destes lipídios. Para tanto os lipídios são fundidos, e uma mistura de água,

tensoativos e co-tensoativos, aquecida à mesma temperatura, é adicionada sobre agitação aos lipídios fundidos, levando à formação de uma microemulsão transparente e termodinamicamente estável. Esta microemulsão então é adicionada em água gelada (2-3°C) sob agitação levando à precipitação das partículas lipídicas (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000).

Diversos fármacos e substâncias ativas têm sido incorporados na matriz lipídica das NLS, e um importante ponto a ser julgado na adequabilidade do sistema carreador é sua capacidade de carga ou *loading capacity*, geralmente expressa em porcentagem do fármaco encapsulado em relação à quantidade de lipídio empregado. Um dos maiores problemas relacionado às NLS é sua freqüentemente baixa capacidade de carga, que está limitada a cerca de 10% da quantidade total de lipídios, levando a cerca de 1% da dispersão total, para que sejam asseguradas as condições de estabilidade do sistema. Os principais fatores que determinam a capacidade de carga do fármaco no lipídio são: (i) solubilidade do fármaco no lipídio fundido; (ii) miscibilidade do fármaco fundido e do lipídio fundido; (iii) estrutura física e química da matriz lipídica sólida; (iv) estado polimórfico do material lipídico. Outra importante característica a ser avaliada é a eficiência de encapsulação do fármaco na matriz lipídica sólida (EE%), que representa a quantidade de fármaco que realmente ficou associada às NLS com relação ao total de fármaco presente na formulação. Sendo assim, ambos os parâmetros físico-químicos das substâncias ativas e dos lipídios devem ser levados em consideração. Por exemplo, enquanto a prednisolona ($\log P$ 1,50) é encapsulada em uma taxa de 50-56% usando o processo de homogeneização a quente, o glicocorticoide prednicarbato ($\log P$ 4,02) é quase completamente associado à matriz lipídica das NLS. Desta forma, quanto maior for a lipofilicidade do fármaco, ou seja, quanto maior for o valor do $\log P$, maior será a EE% deste fármaco na matriz lipídica (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000; SCHÄFER-KORTING, MEHNERT, KORTING, 2007).

Outro grande problema freqüentemente associado a este tipo de sistema é sua instabilidade por longos períodos de tempo. Durante a produção das NLS, os lipídios são recristalizados, pelo menos parcialmente, em formas instáveis de maior energia (α ou β'). Com isso, são formadas imperfeições na matriz lipídica que permitem a acomodação das moléculas do fármaco. Porém, durante o período de estocagem, esses lipídios podem ser convertidos em formas de menor energia (β), mais estáveis e altamente organizadas. Essa reorganização da matriz lipídica

diminui o número de imperfeições presentes na estrutura cristalina levando a expulsão do fármaco aprisionado em seu interior (figura 3) (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000; PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009).

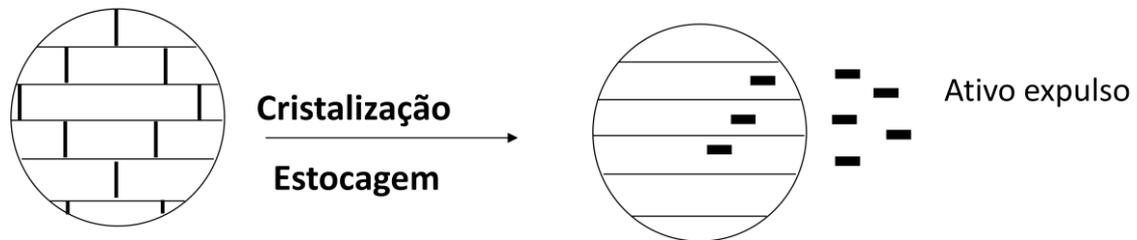


Figura 3: Expulsão do fármaco do interior da matriz lipídica devido à formação de formas mais estáveis e de menor energia (β) (MÜLLER, RADTKE, WISSING, 2002, p. S146)

A fim de tentar superar as principais limitações associadas às NLS foi desenvolvida uma segunda geração na tecnologia de partículas lipídicas, chamada de CLN (carreadores lipídicos nanoestruturados), na qual as partículas são produzidas por uma mistura de lipídios líquidos e sólidos, preservando, portanto, a solidez característica da matriz (figura 4). Os CLN possuem uma maior capacidade de carga quando comparados com as NLS devido à redução da cristalinidade do núcleo lipídico, além disso, os componentes ativos podem ser dissolvidos nos nanocompartimentos de óleo localizados no interior da matriz sólida. É importante ressaltar, que este sistema também é capaz de evitar ou minimizar a expulsão dos ativos incorporados na matriz durante o período de armazenagem (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009).

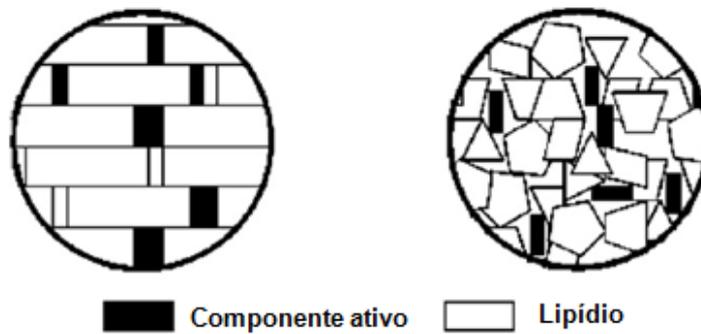


Figura 4: Estrutura cristalina organizada das NLS (esquerda), e matriz sólida dos CLN com várias imperfeições (direita) (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009, p. 171).

É importante ressaltar que a forma como o fármaco é incorporado nas NLS interfere diretamente em seu perfil de liberação. São conhecidos três modelos de incorporação de fármacos (figura 5), (i) o modelo da matriz homogênea ou solução sólida, neste modelo o fármaco se encontra molecularmente disperso na matriz lipídica, as partículas deste tipo são geralmente obtidas por processos de homogeneização a frio, sem o uso de tensoativos, ou então, usando tensoativos que não são capazes de solubilizar o fármaco. (ii) modelo da parede rica em ativo, neste modelo as partículas são geralmente produzidas pelo processo de homogeneização a quente. Isso ocorre devido aos efeitos de particionamento do fármaco entre a fase lipídica líquida e a fase aquosa (figura 6). Durante o processo de produção das partículas o fármaco se particiona da fase lipídica líquida para a fase aquosa, quanto mais hidrossolúvel for o fármaco, maior será a quantidade de fármaco particionado para a fase aquosa. Mas, durante o resfriamento, a solubilidade do fármaco na fase aquosa diminui, ocorrendo seu reparticionamento para a fase oleosa. Porém, a solidificação do núcleo da partícula inicia-se quando é atingida a temperatura de recristalização do lipídio, então, quando o fármaco se reparticiona para a fase lipídica, o núcleo já não se encontra mais disponível para a acomodação das moléculas do fármaco, que fica então concentrado em sua parede ainda líquida. (iii) modelo do núcleo rico em ativo, partículas com este modelo ocorrem quando o fármaco é adicionado ao lipídio líquido no ponto de saturação ou próximo dele. O resfriamento do sistema leva a uma supersaturação do fármaco, e sua cristalização inicia antes da cristalização do lipídio (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000).

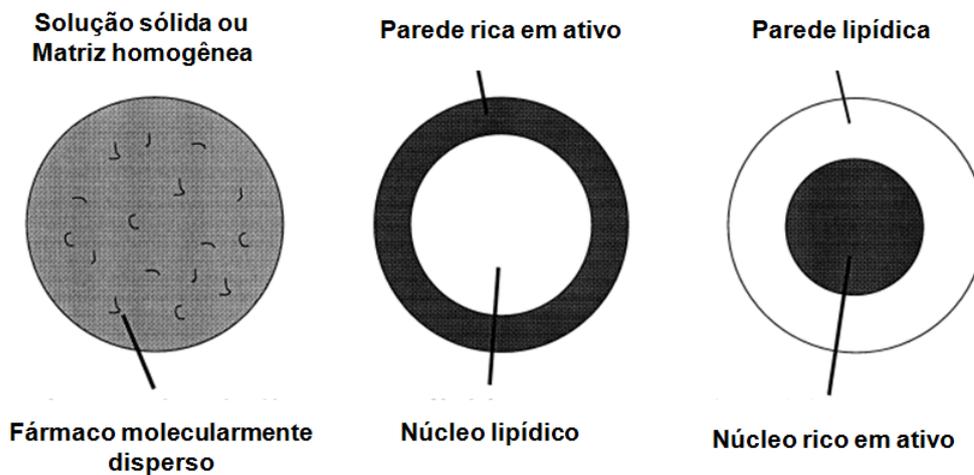


Figura 5: Os três modelos de incorporação de fármacos nas NLS (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000, p. 167)

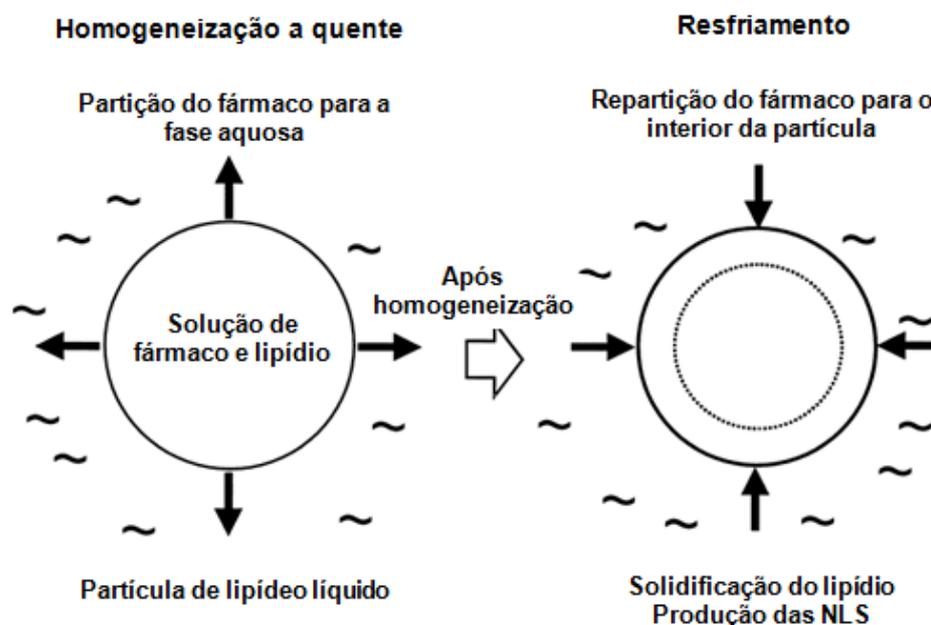


Figura 6: Efeitos de particionamento do fármaco durante a produção das NLS pela técnica de homogeneização a quente (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000, p. 166).

As NLS têm sido investigadas para os mais diferentes tipos de aplicações, por exemplo, para administração oral, parenteral, dérmica, ocular e pulmonar. Entretanto, desde a última década, elas têm sido intensamente estudadas para a aplicação dérmica, tanto para o uso cosmético quanto farmacêutico (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009).

Após a evaporação da água das dispersões de NLS aplicadas sobre a pele,

as partículas formam uma camada adesiva capaz de ocluir a superfície da pele (figura 7). Esse efeito de oclusão promove um aumento da hidratação do estrato córneo desestruturando a forte junção existente entre os corneócitos, isto facilita, portanto, a penetração dos fármacos e ativos cosméticos até as camadas mais profundas da pele (SCHÄFER-KORTING, MEHNERT, KORTING, 2007). De fato, a adesividade e oclusão são propriedades características de partículas muito pequenas. Um exemplo prático do cotidiano que pode ser aplicado é o açúcar de confeiteiro que se adere muito melhor aos pães e doces que o açúcar cristal (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000). Estudos realizados apontam que os efeitos oclusivos estão fortemente relacionados com o tamanho das partículas. As nanopartículas têm demonstrado um efeito oclusivo 15 vezes maior que as micropartículas, e, partículas menores que 400 nm, contendo pelo menos 35% de lipídios com alta cristalinidade, têm demonstrado um efeito mais potente (DE VRINGER, 1992, 1999; WISSING, LIPPACHER, MÜLLER, 2001; WISSING, MÜLLER, 2002). Além disso, o tamanho nanométrico assegura um contato íntimo com o estrato córneo, podendo aumentar a quantidade de fármaco que penetra nas camadas da pele, melhorando sua biodisponibilidade local (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009).

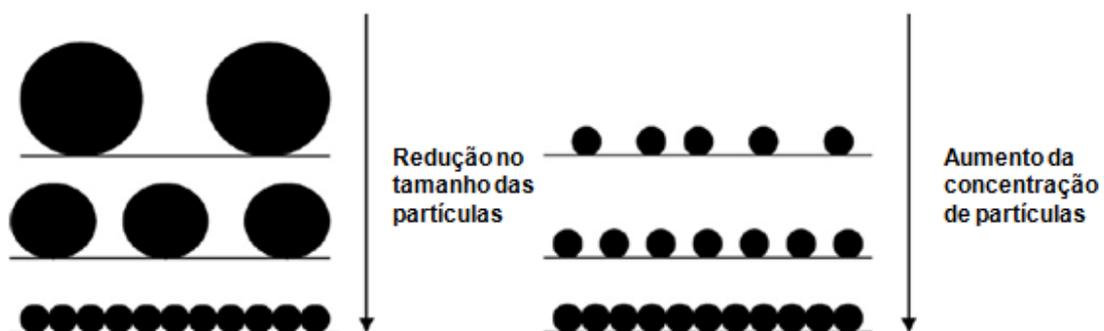


Figura 7: Fatores que afetam o efeito de oclusão: Para uma mesma quantidade de lipídios, a redução do tamanho da partícula leva a um aumento no número de partículas tornando o filme mais denso (esquerda), Para um dado tamanho de partículas, aumentando-se a concentração de lipídios o número de partículas aumenta, levando a um aumento na espessura do filme oclusivo (direita) (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009, p. 173).

As NLS têm sido investigadas para melhorar o tratamento tópico de inúmeras doenças cutâneas, tais como eczema atópico, psoríase, acne, micoses e

inflamações (PARDEIKE, HOMMOSS, MÜLLER, 2009). De fato, alguns autores têm demonstrado o enorme potencial que as NLS possuem para melhorar a administração tópica de fármacos. Maia et al (2000) observaram um aumento na absorção cutânea de glicocorticóides através do emprego das NLS e Mei et al (2003) constataram um aumento na disponibilidade local de tripolide, um antiinflamatório tópico, quando encapsulado em NLS.

Em um recente trabalho, Puglia et al (2008) observaram que as NLS diminuíram a permeação cutânea de cetoprofeno e naproxeno, fato que foi explicado pela retenção do fármaco na camada superior da pele, confirmado por estudos de retenção utilizando a técnica de tape-stripping e por estudos de atividade antiinflamatória *in vivo*. Tais resultados confirmaram a hipótese de que as NLS estariam reduzindo o fluxo através da pele e criando um reservatório do fármaco capaz de prolongar sua ação. Resultados similares já haviam sido descritos por Jennings et al (2000) para a vitamina A e por Liu et al (2007) para isotretinoína, ambas encapsuladas em NLS.

Estes resultados confirmam o potencial que as NLS apresentam como carreadores para a administração tópica de fármacos fornecendo evidências de que elas são capazes de vetorizar e prolongar a liberação das substâncias para liberação dérmica.

1.2.1 Caracterização das NLS

Uma adequada caracterização da dispersão resultante é um pré-requisito para o controle de qualidade do produto. A caracterização das NLS ainda é um desafio devido ao pequeno tamanho das partículas e a complexidade do sistema, que também inclui fenômeno dinâmico. Os principais parâmetros que devem ser avaliados são: (i) tamanho da partícula e potencial zeta, (ii) grau de cristalinidade e modificações dos lipídios, e (iii) coexistência de outras estruturas coloidais, pois, os mesmos interferem diretamente na estabilidade do sistema (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000; MEHNERT, MADER, 2001).

1.2.1.1 Tamanho da partícula e potencial zeta

A espectroscopia de foto-correlação e a difração a laser são as mais

poderosas técnicas usadas rotineiramente para este tipo de análise, porém técnicas adicionais também podem ser empregadas. Como dito anteriormente, o tamanho das partículas está intimamente relacionado com suas propriedades de adesividade e oclusão, daí a importância de se fazer este controle. O tamanho das NLS pode ser afetado por inúmeros parâmetros, como a composição da formulação, método de produção e condições estabelecidas para a produção, por exemplo, temperatura, tempo, dentre outros (UNER, 2006). Outro importante estudo de caracterização é a medida do potencial zeta, pois ele nos permite fazer uma previsão sobre a estabilidade da dispersão durante o período de estocagem. De forma geral, é menos provável que ocorra a agregação das partículas quando elas possuem um alto potencial zeta, devido à repulsão eletrostática. Entretanto, esta regra não pode ser estritamente utilizada quando o sistema possui estabilizantes estéricos adicionais (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000; MEHNERT, MADER, 2001).

1.2.1.2 Grau de cristalinidade e modificações lipídicas

Especial atenção deve ser dada a este estudo devido a forte correlação existente com a incorporação do fármaco e seu perfil de liberação. Como dito anteriormente, a estabilidade termodinâmica das modificações lipídicas e a organização do matriz sólida refletem diretamente na diminuição da quantidade de fármaco incorporada. A principal técnica utilizada para fazer este tipo de análise é a calorimetria diferencial exploratória (DSC), que investiga o comportamento de fusão e recristalização de materiais cristalinos como as NLS (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000; MEHNERT, MADER, 2001).

1.2.1.3 Co-existência de outras estruturas coloidais

A co-existência de estruturas coloidais adicionais no sistema, como por exemplo, micelas, lipossomas, e nanopartículas de fármacos, pode ser detectada através de técnicas de ressonância magnética (RMN), constituindo uma poderosa ferramenta para investigar fenômeno dinâmico e também os nanocompartimentos nas dispersões lipídicas coloidais (MÜLLER, MADER, GOHLA, 2000; MEHNERT, MADER, 2001).

1.3 ENSAIOS DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO

A eficácia dos produtos para tratamento da pele é medida através de testes clínicos, um processo caro e demorado. Geralmente, é possível substituir alguns testes clínicos, durante o desenvolvimento de produtos, por testes laboratoriais que se relacionam com resultados clínicos. Para o tratamento ser efetivo, suficiente quantidade da substância ativa deve alcançar seu sítio de ação dentro da pele. Sendo assim, os estudos de retenção e permeação cutânea *in vitro*, são extremamente úteis para fazer uma triagem dos componentes e comparar diferentes formulações (ZATZ, J. L., 1993).

A absorção das substâncias na pele geralmente é medida através de técnicas *in vitro* por causa da simplicidade das condições experimentais. Podemos retirar amostras imediatamente abaixo da pele em células de difusão, enquanto os processos *in vivo* exigem técnicas relativamente trabalhosas de amostragem em sangue, urina e fezes para analisar a taxa de permeação. Os experimentos *in vitro* são realizados utilizando células de difusão. Existem vários modelos disponíveis que devem ser escolhidos de acordo com o tipo de experimento que se deseja. Alguns parâmetros devem ser otimizados para a execução dos testes *in vitro*, como: (i) preparo da pele, que pode variar de acordo com o tipo de pele selecionada para o teste. Geralmente é utilizada pele da parte externa da orelha de porco, de camundongo ou humana. (ii) escolha do meio receptor, muito importante quando se deseja criar condições *in vitro* semelhantes às *in vivo*, geralmente são utilizadas soluções salinas ou tampão isotônico. A solução receptora também deve ser capaz de manter as condições sink do sistema. (iii) manutenção de uma adequada agitação da solução receptora, importante principalmente nos casos onde são utilizadas substâncias insolúveis em água e (iv) manutenção da temperatura fisiológica, visto que a difusão das moléculas através da pele pode variar com a temperatura. Geralmente esses estudos são conduzidos em uma faixa de temperatura de 22°C a 37°C (ZATZ, J. L., 1993).

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento e caracterização de NLS contendo o fármaco antiviral aciclovir como sistemas de liberação tópica, a fim de aumentar a quantidade de fármaco na epiderme basal, local de instalação do HSV. Para esta proposta, a quantidade de fármaco acumulada em diferentes camadas da pele foi determinada e comparada com um controle através de estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro*.

3 RESULTADOS

Como descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de um volume contendo: uma revisão e discussão ampla da literatura, seguida de artigos científicos referentes aos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa. Para tanto foi redigido um artigo que se encontra em fase de submissão.

3.1 ARTIGO

O artigo consiste no desenvolvimento, caracterização e avaliação de nanopartículas lipídicas sólidas como sistemas de liberação tópica de aciclovir para o tratamento das infecções cutâneas causadas pelo vírus do herpes simples. O artigo foi submetido para a revista *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* e encontra-se em fase de avaliação pelos revisores.

REFERÊNCIAS

- AFOUNA, M. I. et al. Effect of Azone upon the in vivo antiviral efficacy of cidofovir or acyclovir topical formulations in treatment/prevention of cutaneous HSV-1 infections and its correlation with skin target site free drug concentration in hairless mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 253, n. 1-2, p. 159-168, 2003
- ALVAREZ-ROMÁN, R. H. et al. Enhancement of topical delivery from biodegradable nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 1818-1825, 2004.
- BANDO, H. et al. Analysis of in vitro skin penetration of acyclovir prodrugs based on a diffusion model with a metabolic process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 135, p. 91-102, 1996.
- BRADY, R. Bernstein D. Treatment of herpes simplex infections. **Antiviral Research**, v. 61, p. 73-81, 2004.
- CHEN, H. et al. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 296-306, 2006.
- DE VRINGER, T. **European Patent**, EP 91200664, 1992.
- DE VRINGER, T. **Topical preparation containing a suspension of solid lipid particles**. USA patent 91-200, 664, 1999.
- GASCO, M. R. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. **United States Patent**, USS 188837, 1993.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 4 fascículo, parte 2, p. 172 – 172.2
- JAIN, S. K. Design and development of multivesicular liposomal depot delivery system for controlled systemic delivery of acyclovir sodium. **American Association of Pharmaceutical Scientists PharmSciTech**, v. 6, p. 35-41, 2005.
- JALÓN, E. G. et al. Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers. **Journal of Controlled Release** v. 75, p. 191–197, 2001.
- JALÓN, E. G. et al. Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 183-187, 2003.
- JENNING, V. et al. Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p. 211-218, 2000.
- LEWIS, D. H. Controlled Release of bioactive agents from lactide/glycolid polymers, in: M. Chasin. R. Lauger (Eds), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*,

Marcel Dekker, New York, p. 1-41, 1990.

LIU, J. et al. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targetin for topical delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 191-195, 2007.

LOMBARDI BORGIA, S. et al. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parelectric spectroscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 110, p. 151-163, 2005.

MAIA, C. S.; MEHNERT, W.; SCHAFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p. 165-167, 2000.

MARCATO, P. D., DURÁN, N. Nanopartículas lipídicas sólidas: preparação, caracterização e aplicação. Curso Nanobio - parte 7. Instituto de Química, Unicamp, 2007. Disponível em: <<http://www.nanobiotec.iqm.unicamp.br/download/CURSO-NANOBIO-PARTE-7-2007.ppt>>. Acesso em: 10 dez. 2010.

MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.

MEI, Z. et al. Solid lipid nanoparticles and microemulsion for topical delivery of trptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 189-196, 2003.

MÜLLER, R. H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, n. 1, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NCL) in cosmetic and dermatological preparations, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54 Suppl. 1, p. S131-S155, 2002.

O'BRIEN, J. J.; CAMOPLI-RICHARDS, D. M. Acyclovir: an updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 37, p. 49-59, 1989.

OHANA, B. et al. Novel approach for specific detection of herpes simplex virus type 1 and 2 antibodies and immunoglobulin G and M antibodies. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 904-908, 2000.

PARDEIKE, J., HOMMOSS, A., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 366, p. 170-184, 2009.

PUGLIA, C. et al. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 357, p. 295-304, 2008.

RICHARDS, D. M. et al. Acyclovir. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 26, p. 378-438, 1983.

SCHÄFER-KORTING, M., MEHNERT, W., KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 427-443, 2007.

SILVA, P. Farmacologia. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

TAVEIRA, S. F. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) como carreadores de fármacos para o tratamento tópico do câncer de pele. 2009. 141f. **Tese de Doutorado** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2009.

TROTTEY, L. et al. Are all aciclovir cream formulations bioequivalent? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 304, p. 63-71, 2005.

UNER, M. Preparation, characterization and physic-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. **Pharmazie**, v. 61, n. 5, p.375-386, 2006.

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

WEBER B.; CINATL, J. Antiviral therapy of herpes simplex virus infection: recent developments. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 6, p. 112-126, 1996.

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

WISSING, S. A., LIPPACHER, A., MÜLLER, R. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Cosmetic Science**, v. 52, p. 313-324, 2001.

WISSING, S. A., MÜLLER, R. H. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 377-379, 2002.

ZATZ, J. L., **Skin Permeation: Fundamentals and application**. Wheaton: Allure Publishing Corporation, 1993.

Solid lipid nanoparticles as acyclovir delivery systems for topical treatment of herpes simplex virus infections

Ana Cristina de M. Vieira¹, Brenda P. Rosa¹, Magali B. Araújo¹, Karina Dias², Joel G. Souza², Renata F. V. Lopez², Gislaine R. Pereira^{1*}

¹ Department of Food and Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

² Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Av. do Café s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Corresponding author: *Gislaine Ribeiro Pereira*

School of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000, Alfenas, MG, Brazil

e-mail: gislaine.pereira@unifal-mg.edu.br

Phone: +55 (35) 3299-1337

Fax: + 55 (35) 3299- 1350

Abstract

In this study, acyclovir (ACV) loaded solid lipid nanoparticles (SLN) were studied with special attention to the transport of the drug across the skin *in vitro* to evaluate the potential of this carrier system for topical delivery. SLN prepared by the microemulsion (ME) method were characterized by measuring particle size, zeta potential, polydispersity and entrapment efficiency. To assess the advantages of this carrier system in topical administration of ACV, the retention and permeation across pig ear skin were determined. The studies showed a significantly higher amount of ACV, permeated through the pig-ear skin in 24 hours, from negative-SLN than neutral-SLN and control. Moreover, the skin uptake behavior revealed a significantly higher amount of ACV deposited in stratum corneum and viable epidermis after treating with the negative-SLN. Therefore, it can be concluded from our study that negative-SLN may be a promising carrier for topical delivery of ACV.

Keywords: Solid lipid nanoparticles; acyclovir; skin penetration; topical delivery; herpes simplex virus.

1. Introduction

Herpes is the name given to a family of viruses of which herpes simplex virus 1 and herpes simplex virus 2 (HSV-1 and HSV-2) are the most serious human pathogens. HSV-1 is normally associated with orofacial infections and encephalitis, whereas HSV-2 usually causes genital infections and can be transmitted from infected mothers to neonates [1]. Over the past decade, the incidence and severity of infections caused by HSV have increased due to the growth in number of immunocompromised patients, produced by aggressive chemotherapy regimens, expanded organ transplantation and a greater occurrence of human immunodeficiency virus infections [2].

Acyclovir (ACV), a synthetic analogue of 2'- deoxyguanosine, is one of the most effective and selective agents against viruses of the Herpes group [3]. Since 1981, the standard therapy of herpes simplex virus infections has been based on this drug [4]. ACV shows an antiviral effect on HSV-1, HSV-2 and *Varicella Zoster* (VZV) virus by interfering with DNA synthesis and inhibiting viral replication [5]. ACV has shown to be clinically effective in the treatment of HSV-1 cutaneous infections, whose target site is the basal epidermis [2].

Topical treatment of skin diseases is very attractive, since systemic load of active pharmaceutical ingredients and thus also systemic side effects are reduced as compared to parenteral or oral drug administration [6]. Therefore, many attempts have been done to deliver ACV topically to the treatment of HSV-1 cutaneous infections [7, 8, 9, 10]. Nevertheless, it has been suggested that the topical therapy with ACV has low efficacy due to the lack of penetration of a sufficient amount of drug to the target site [8]. Indeed, the topical administration of drugs is still a challenge in pharmaceuticals as well as drug delivery, due to the difficulties in controlling and, not less important, determining the exact amount of drug that reaches the different skin layers [6]. To overcome these problems, the development of drug delivery systems, which could control ACV delivery and increase its amount in the target site, is a promising strategy.

Solid lipid nanoparticles (SLN) is one of this promising delivery systems. SLN were developed at the beginning of the 1990s as an alternative carrier system to emulsions, liposomes and polymeric nanoparticles [11]. Similar to liposomes and emulsions, SLN are formed by physiologically well tolerated lipids, and similar to

polymeric nanoparticles, the solid matrix protects the active ingredients against chemical degradation and allows sustained drug release [12].

It has been proposed that following the evaporation of water from the lipid nanodispersion applied to the skin surface, an adhesive layer occluding the skin surface is formed. Then hydration of the stratum corneum may increase and then, by reducing corneocyte packing and widening of the inter-corneocytes gaps, can facilitate drug penetration into deeper skin strata [6]. Moreover, the SLN small size ensures a close contact with the stratum corneum and can increase the amount of drug penetrated into the skin [13].

Lipid nanoparticles have been therefore investigated to improve the treatment of skin diseases such as atopic eczema, psoriasis, acne, skin mycosis and inflammations [13]. In view of this, exploring the potential of SLN for improving the topical delivery of ACV is worthwhile.

In this context, the aim of this work was to develop, characterize and evaluate the potential of SLN as a carrier of acyclovir for topical delivery. It is intended to increase the amount of drug in the basal epidermis, the site of Herpes simplex infections. For this purpose, the amount of ACV accumulated in the different layers of porcine skin was determined and compared with a control.

Two types of SLN, a negative and a neutral one were developed because it has been shown that positive nanoparticles may permeate the skin more than negative and neutral ones [14, 15]. Because the aim of this work is the topical treatment of ACV, it is important to maintain the drug in the skin with a minimum permeation to the systemic circulation. Therefore, neutral and negative charged SLN were studied in an attempt to verify the influence of nanoparticle surface charge in ACV skin delivery.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lecithin (soybean lecithin at 99% of phosphatidylcholine) was supplied by Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Stearic acid (95%), sodium taurodeoxycholate (97%), poloxamer 407 (Pluronic F 68) and cetylpyridinium chloride (CPC) were purchased from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). Acyclovir was obtained from Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd. All the other chemicals and solvents

were equal to or higher than analytical grade. The purified water used to prepare SLN or mobile phase was purified by a Mili-Q-plus System (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of SLN

The SLN were prepared by the microemulsion (ME) method developed by Gasco and co-workers, which entails dispersing an oil-in-water microemulsion in cold water under mechanical stirring [16, 17]. Two types of particles have been developed, one containing anionic surfactants (SLN-1) and another containing cationic surfactants (SLN-2). The formulation of SLN-1 contained stearic acid (21%) as internal phase, soybean lecithin (10,5%) as surfactant, sodium taurodeoxycholate (2,6%) as co-surfactant, purified water (65,4%) as continuous phase and acyclovir (0,5%). Whereas SLN-2 contained stearic acid (37,5%) as internal phase, poloxamer (23,7%) as surfactant, cetylpyridinium chloride (7,9%) as co-surfactant, purified water (30,0%) as continuous phase and acyclovir (0,9%). It is important to highlight that SLN containing no acyclovir were also prepared. The SLN were prepared according to the following procedure: briefly, the lipid phase and the surfactant/co-surfactant were melted at 90°C. After melting the compounds the lipid phase was maintained at 80°C. Then, acyclovir was added. In order to obtain the microemulsion, water heated at the same temperature was added to this mixture. Hot microemulsion was further dispersed in cold water (2-5°C) at a ratio of 1:20 under vigorous stirring for 10 min at 17,500 rpm to obtain SLN dispersions. Only SLN-2 dispersions were filtered through a 1.2 µm filter.

2.2.2. Characterization of SLN

2.2.2.1. Particle size and zeta potential

The mean particle size (z-average), polydispersity index (PDI) and zeta potential were measured by photon correlation spectroscopy (PCS) using a Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern instruments Ltd., UK) with a 50 mV laser. The measurements were performed at 25°C and fixed angle of 173.0°. The samples of SLN were diluted in purified water at a ratio of 1:100. Each value was the mean of at least three measurements. Zeta potentials were measured in folded capillary cells,

with the same dilution.

2.2.2.2 Drug entrapment efficiency (EE%)

The entrapment efficiency, which corresponds to the percentage of acyclovir encapsulated within and absorbed on the particles, was determined by ultrafiltration method using centrifugal filter tubes (Amicon[®] Ultra-4, Millipore, Ireland) with a 100 kDa molecular weight cut-off. Thus, 1 mL of SLN dispersion was transferred to the upper chamber of the centrifugal filter tubes, which were centrifuged at 5500 g for 40 minutes. The filtrate was diluted appropriately in purified water and the content of acyclovir was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The total drug in SLN dispersion was obtained by dissolving an aliquot in ethanol at a ratio of 1:7, followed by drying in air flow and appropriate dilution in purified water. Like the filtrate, the amount of acyclovir was also determined by HPLC. The entrapment efficiency was calculated through the following equation:

$$EE\% = [(W_{\text{total drug}} - W_{\text{free drug}})/W_{\text{total drug}}] \times 100$$

Where “ $W_{\text{total drug}}$ ” is the amount of total drug in the whole SLN dispersion and the “ $W_{\text{free drug}}$ ” is the amount of free drug detected in the filtrate of SLN dispersion.

2.2.3 *In vitro* percutaneous permeation

2.2.3.1. Skin preparation

Fresh pig-ears were collected immediately after the slaughter of the animals and kept at 4°C while transported to the laboratory. The ears were washed with water, dried with soft tissue paper and then, the skins were carefully removed using a scalpel. After that, the skins were kept at -80°C and dermatomed (700 µm) before use.

2.2.3.2. *In vitro* permeation study

In vitro percutaneous permeation studies were performed using Franz-type diffusion cells (Microette Apparatus, Hanson Research, Chatsworth, USA) and pig-ear skin. In donor compartment the skin samples were mounted carefully with the stratum corneum (SC) side up, then, 250 µL of the SLN dispersions (containing

approximately 100 µg of acyclovir) were applied on the skin surface. Water solution containing the same amount of acyclovir was used as the control. The receiving compartment (7 mL) was filled with the phosphate buffer saline at pH 7.4 to ensure sink condition. Samples from the receiving solution (1 mL) were collected from the Franz cells in the following time intervals: 6, 12, 18 and 24 hours. The diffusion cells were maintained at (37 ± 0.5) °C, with a stirring at 500 rpm throughout the experiment.

2.2.3.3. Determination of drug content in stratum corneum and viable epidermis

The drug amount uptaken in SC and viable epidermis was determined 24 hours after the *in vitro* permeation studies (section 2.2.3.2). The excessive formulation was removed and the skin samples were rinsed with purified water to eliminate the acyclovir remained on the surface. The SC layer was removed by “tape stripping” technique using an adhesive tape (10 tape pieces) and the remaining skin was cut into small pieces [18, 19]. Then, 5.0 mL of phosphate buffer saline was added to the samples, followed by homogenization for 2 minutes and ultrasonication in an ultrasound bath for 30 minutes. The tapes containing SC were homogenized using a vortex whereas the epidermis was homogenized using a tissue homeneizer (Ultra Turrax, AT15, IKA-Werke, Germany). The drug extracted was analyzed by HPLC. The extraction process was validated, with an average of 95.0% (± 0.94) and 93.0% (± 0.60) of ACV extract from SC and epidermis, respectively (n=4).

2.2.4. Acyclovir quantification

Assay methods using HPLC were developed for assessment of acyclovir from SLN formulations, receiver solution and treated skin. The developed methods were validated in terms of linearity, quantification limit, within-day and day-to-day precision.

The chromatographic conditions for the quantification of acyclovir from SLN formulations comprised a reversed-phase C18 column (Synergi 4 µm Hydro-RP, 150 x 4.6 mm, Phenomenex, USA) with a mobile phase of ammonium acetate buffer (at pH 4.0): acetonitrile (97:3). The flow rate was 1.0 ml/min, the temperature was set in 25°C and UV detection was used at 254 nm. The quantification of acyclovir from receiver solution and treated skin was performed using these same chromatographic conditions however the mobile phase was comprised of ammonium acetate buffer

(at pH 4.0): acetonitrile (99:1) to ensure the selectivity of the method.

2.3. Statistical analysis

All statistical data were expressed as mean and standard deviation, and the differences were analyzed using the Tukey test with $p < 0.05$ as the minimal level of significance.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of SLN

3.1.1. Particle size and zeta potential

An adequate characterization of the resulting dispersion is a prerequisite for the product's quality control. The particle size of lipid nanoparticles appears to be strongly related to the occlusive effect; nanoparticles showed to be 15-fold more occlusive than microparticles, and particles smaller than 400 nm were more favorable [20]. On the other hand, the measurement of the zeta potential allows predictions about the storage stability of colloidal dispersion. In general, particle aggregation is less likely to occur for charged particles (high zeta potential) due to electric repulsion [11].

Table 1 shows the mean particle size (z-average), polydispersity index and zeta potential, measured by PCS for all formulations on the day of their production. SLN-1 and SLN-2 had average diameters in nanometer range (< 300 nm) and polydispersity index close to 0.3 and 0.4 respectively. The size distributions of SLN were monomodal, i.e. only one population of SLN seems to be formed [21]. However, the particles were not completely monodisperse because the size distribution was broad with a Pdl close to 0.3 and 0.4, for SLN-1 and SLN-2 respectively. This large Pdl may not be a disadvantage for SLN considering the proposed mechanism of action. Specifically, the broad size distribution may favor the formation of a tight adhesive lipid layer over skin surface that favors occlusion and, consequently, ACV skin penetration.

The zeta potentials of the ACV loaded SLN-1 and SLN-2 were -38.80 (3.47) and 6.68 (15.27), respectively, thus, from now on, they will be called negative-SLN (Neg-SLN) and neutral-SLN (N-SLN), respectively. Only the Neg-SLN possessed a

zeta potential in range required for adequate stabilization (higher than $|30,0 \text{ mV}|$). The zeta potential of N-SLN presented too low for a solely electrostatic stabilization, however, the poloxamer provides steric stabilization for the system.

Table 1: Average diameter (z-average), polydispersity index (Pdl) and zeta potential of several formulations measured by PCS on the day of preparation (n=3).

Lipid Carrier	z-average (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)
Unloaded Neg-SLN	188.67 ± 17.62	0.27 ± 0.03	-40.37 ± 15.60
Loaded Neg-SLN	215.67 ± 9.61	0.37 ± 0.04	-38.80 ± 3.47
Unloaded N-SLN	261.33 ± 34.02	0.42 ± 0.11	11.97 ± 10.69
Loaded N-SLN	285.33 ± 40.22	0.43 ± 0.02	6.68 ± 15.27

3.1.2. Drug entrapment efficiency (EE%)

The entrapment efficiency of ACV in SLN were 7.4% and 8.6% for the Neg-SLN and N-SLN respectively. This was attributed to extremely hydrophilic characteristics of the acyclovir ($\log P -1.481 \pm 0.460$), that hinder the incorporation into lipid matrix since a prerequisite to obtain a high EE% in SLN is a sufficiently high solubility of the drug in the melted lipid. It was observed by Mühlen and Mehnert [22] that the prednisolone ($\log P 1.50$) was loaded at a rate of about 50–56% while Santos Maia et al [23] observed that the lipophilic glucocorticoid diester prednicarbate ($\log P 4.02$) was almost completely associated to SLN.

3.2. *In vitro* permeation study and skin uptake behavior

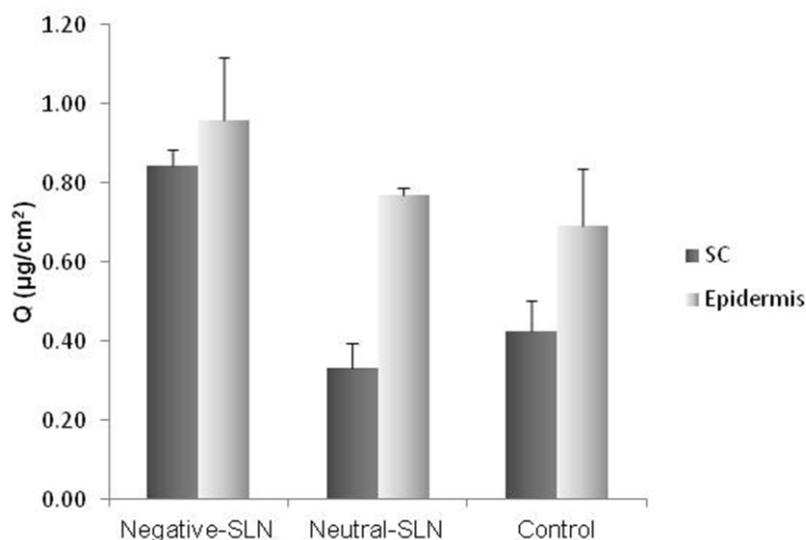
The *in vitro* percutaneous permeation studies revealed a significantly higher amount of ACV permeated from the Neg-SLN ($Q = 4.74 \mu/\text{cm}^2$) than from the N-SLN ($Q = 0.58 \mu/\text{cm}^2$) and the control ($Q = 0.48 \mu/\text{cm}^2$) ($p < 0,05$) after 24 h (Table 2). In other words, the cumulative amount of ACV permeated through the skin from Neg-SLN was almost 10-fold higher than that of N-SLN and control. Detectable amounts of ACV were found in the receiving solution after 6 h of experiment with Neg-SLN, whereas detectable amounts of ACV were found only after 24 h of experiment with the neutral-SLN and the control.

Table 2: Cumulative amounts of permeated ACV (Q) in 24 hours (n=4).

Formulation	Q (μ/cm^2)
Negative-SLN	4.74 (± 0.59)
Neutral-SLN	0.58 (± 0.16)
Control	0.48 (± 0.16)

Currently, it is proposed that SLN improve drugs skin penetration due to the occlusion caused by the lipid film formed over the skin by the nanometer sized particles [6]. However, SLN developed have a similar nano-size and Pdl. Therefore, differences in ACV skin permeation must be related not only to the occlusion effect but also to SLN composition and surface charge. In this way, surfactants and co-surfactants present in the SLN composition may have a role in ACV skin penetration. It has been reported that nonionic surfactants, such as the poloxamer present in the composition of the N-SLN, do not compromise the skin barrier function [24, 25, 26]. Nonetheless, some phospholipids, such as the lecithin present in the Neg-SLN may mix with skin lipids, disturbing the SC barrier and increasing drug penetration [27, 28, 29]. Indeed, SLN containing lecithin increased significantly ACV permeation. Therefore, SLN composition seems to be one of the responsible for the improvement of ACV skin penetration from the negatively-charged SLN.

For the HSV-1 cutaneous infections treatment, the ACV uptake in the viable epidermis is more important than skin permeation through the skin. In agreement with figure 1, the skin uptake behavior revealed a significantly higher amount of ACV in SC and viable epidermis after treatment with Neg-SLN than with N-SLN and control ($p < 0,05$).



* Teste tukey < 0,5

Figure 1: ACV in the stratum corneum (SC) and viable epidermis after 24 h of treatment with the negative-SLN, neutral-SLN and control.

The high amount of ACV found in the viable epidermis after the treatment with the negative-SLN is highly desirable for the improvement of the topical therapy of HSV cutaneous infections, whose target site is the basal epidermis.

Other studies have shown an increase in the retention of ACV on the skin using mainly iontophoresis as a technique to increase the release of drugs into the skin [9, 30, 31]. However, iontophoresis, compared to the SLN system developed in this work, has the disadvantage of being a physical technique that requires the application of external electric current. Additionally, it has been observed by Jalon et al [7] that polymeric microparticles loaded with ACV were also able to increase the ACV retention in the basal epidermis, but only after 88 hours of treatment. Within 24 hours, the amount of drug in the basal epidermis was similar to control (suspension ACV), which according the authors, could be explained by the controlled release of drugs produced by microparticles, which represents a good delivery system to retard the release rate of ACV into the skin. Thus, the fact that Neg-SLN promotes a more rapid permeation of ACV (Table 2) can lead to a more rapid onset of drug at the target site. Therefore, this new formulation presents a promising alternative for the topical treatment of infections caused by HSV, since it is able to promote high drug concentrations in the basal epidermis in a rapid and prolonged period of time, which

is needed to increase the effectiveness of this drug.

4. Conclusion

In summary, the Neg-SLN significantly increased the permeation and the skin retention of ACV. Furthermore, the Neg-SLN presented an average diameter and zeta potential compatible with topical application. Finally, this study provides evidence that the developed Neg-SLN represent a promising ACV delivery system for topical treatment using an inexpensive, quick, safe and simple method of administration.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support of UNIFAL-MG (Universidade Federal de Alfenas), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

References

- [1] R. J. Whitley, B. Roizman, Herpes simplex virus infections, *The Lancet* 357 (2001) 1513-1518.
- [2] E. G. Jalón, M. J. Blanco-Príeto, P. Ygartua, S. Santoyo, Increased efficacy of acyclovir-loaded microparticles against herpes simplex virus type 1 in cell culture, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 183-187.
- [3] D. I. Dorsky, C. S. Crumpacker, Drugs five years later: acyclovir, *Ann. Intern. Med.* 107 (1987) 859-874.
- [4] B. Weber, J. Cinatl, Antiviral therapy of herpes simplex virus infection: recent developments, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 6 (1996) 112-126.
- [5] J. J. O'Brien, D. M. Camopli-Richards, Acyclovir: an updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy, *Drugs* 37 (1989) 49-59.

- [6] M. Schäfer-Korting, W. Mehnert, H. Korting, Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 427-443.
- [7] E. G. Jalón, M. J. Blanco-Príeto, P. Ygartua, S. Santoyo, Topical application of acyclovir-loaded microparticles: quantification of the drug in porcine skin layers, *J. Control. Release* 75 (2001) 191-197.
- [8] N. M. Volpato, P. Santi, P. Colombo, Iontophoresis enhances the transport of acyclovir through nude mouse skin by electrorepulsion and electroosmosis, *Pharm. Res.* 12 (1995) 1623-1627.
- [9] N. M. Volpato, S. Nicoli, C. Laureri, P. Colombo, P. Santi, In vitro acyclovir distribution in human skin layers after transdermal iontophoresis, *J. Control. Release* 50 (1998) 291-296.
- [10] H. Bando, M. Sahashi, T. Takagi, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida, Analysis of in vitro skin penetration of acyclovir prodrugs based on a diffusion model with a metabolic process, *Int. J. Pharm.* 135 (1996) 91-102.
- [11] R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50 (2000) 161-177.
- [12] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54 suppl.1 (2002) S131-S155.
- [13] J. Pardeike, A. Hommoss, R. H. Müller, Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products, *Int. J. Pharm.* 366 (2009) 170-184.
- [14] R. F. V. Lopez, J. E. Seto, D. Blankschtein, R. Langer, Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of

ultrasound and sodium lauryl sulfate, *Biomaterials*, 32 (2011) 933-941.

[15] J. P. Ryman-Rasmussen, J. E. Riviere, N. A. Monteiro-Riviere, Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties, *Toxicol. Sci.* 91 (2006) 159-65.

[16] M. R. Gasco, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, United States Patent, USS 188837 (1993).

[17] F. Marquele-Oliveira, D. C. A. Santana, S. F. Taveira, D. M. Vermeulen, A. R. M. Oliveira, R. S. Silva, R. F. V. Lopez, Development of nitrosyl ruthenium complex-loaded lipid carriers for topical administration: improvement in skin stability and in nitric oxide release by visible light irradiation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 843-851.

[18] H. Herai, T. Gratieri, J. A. Thomazine, M. V. L. B. Bentley, R. F. V. Lopez, Doxorubicin skin penetration from monoolein-containing propylene glycol formulation, *Int. J. Pharm.* 329 (2007) 88-93.

[19] S. F. Taveira, A. Nomizo, R. F. V. Lopez, Effect of the iontophoresis of chitosan gel on doxorubicin skin penetration and cytotoxicity, *J. Control. Release.* 134 (2009) 35-40.

[20] S. A. Wissing, R. H. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLN) - a novel carrier for UV blockers, *Pharmazie* 56 (2001) 783-786.

[21] G. M. Gelfuso, T. Gratieri, P. S. Simão, L. A. P. de Freitas, R. F. V. Lopez, Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate, *Journal of Microencapsulation*, 28 (2011) 650-658.

[22] A. Mühlen, W. Mehnert, Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles, *Pharmazie* 53 (1998) 552-555.

[23] C. Santos Maia, W. Mehnert, M. Schaller, H. Korting, A. Gysler, A. Haberland, M.

Schäfer-Korting, Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use, *J. Drug Target.* 10 (2002) 489-495.

[24] M. Gloor, How do dermatological vehicles influence the horny layer? *Skin Pharmacol. Physiol.* 17 (2004) 267-273.

[25] A. C. Williams, B. W. Barry, Penetration enhancers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 603-618.

[26] L. Lehmann, S. Keipert, M. Gloor, Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52 (2001) 129-136.

[27] G. M. El Maghraby, B. W. Barry, A. C. Williams, Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 203-222.

[28] Y. Yokomizo, H. Sagitani, The effects of phospholipids on the percutaneous penetration of indomethacin through the dorsal skin of guinea pig in vitro. 2. The effects of the hydrophobic group in phospholipids and a comparison with general enhancers, *J. Control. Release* 42 (1996) 37-46.

[29] S. Zellmer, W. Pfeil, J. Lasch, Interaction of phosphatidylcholine liposomes with the human stratum corneum, *Biochim. Biophys. Acta* 1237 (1995) 176-182.

[30] C. Shukla, P. Friden, R. Juluru, G. Stagni, In vivo quantification of acyclovir exposure in the dermis following iontophoresis of semisolid formulations, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 917-925.

[31] S. Siddoju, V. Sachdeva, P. M. Friden, Y. Y. Yu, A. K. Banga, Acyclovir skin depot characterization following in vivo iontophoretic delivery, *Skin Research and Technology* 17 (2011) 234-244.