



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO
CUTÂNEA *IN VITRO* DE PREPARAÇÕES TÓPICAS DO CIDOFOVIR**

Elayne Karine Souto de Melo

Recife - PE

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Dissertação de Mestrado

CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO E PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE PREPARAÇÕES TÓPICAS DO CIDOFOVIR

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Elayne Karine Souto de Melo

Orientador: Prof. Dr. Davi Pereira de Santana

Co-orientadora: Profa. Dra. Leila Bastos Leal

Recife - PE

2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Liliâne Baltar, CRB4-506

M528c Melo, Elayne Karine Souto de.
Caracterização e estudos de liberação e premeação cutânea *in vitro*
de preparações tópicas do cidofovir / Elayne Karine Souto de Melo. –
Recife: O autor, 2012.
121 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Davi Pereira Santana.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2012.
Inclui bibliografia e apêndice.

1. Papiloma vírus humano. 2. Condiloma. 3. Gel. 4. Creme. I.
Santana, Davi Pereira (Orientador). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-138)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Recife, 28 fevereiro de 2012.

Defesa de Dissertação de Mestrado de **Elayne Karine Souto de Melo**, defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 28 de fevereiro de 2012 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores doutores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Davi Pereira de Santana do Depto. de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Danilo César Galindo Bedor do Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético-NUDFAC, da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

Assinatura: _____

SEGUNDA EXAMINADORA EXTERNA: Ana Amélia Moreira Lira do Depto. de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Sergipe-UFSE.

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Reitor

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice – Reitor

Silvio Romero de Barros Marques

Diretor de Ciências da Saúde – CCS

José Thadeu Pinheiro

Vice – Diretor do Centro de Ciências da Saúde - CCS

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Dalci José Brondanni

Vice – Chefe do Departamento de Ciências Farmacêuticas

Antonio Rodolfo de Faria

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Nereide Stela Santos Magalhães

Vice - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Ana Cristina Lima Leite

Aos meus pais, Valdereis e Moura e ao meu amado Fernando, com muito amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida e por renovar as minhas forças a cada novo dia e a minha mãezinha do céu pelas bênçãos que me concede.

Aos meus pais, Valdereis e Moura, pela pessoa que hoje eu sou, por todo amor, dedicação, por me ensinarem a correr em busca dos meus sonhos!! Amo muito vocês! Vocês são meu porto seguro! Aos meus irmãos Erika e Mourinha e aos meus sobrinhos Maria e Henrique que me fazem ver a vida com mais cor, sabedoria e de uma maneira tão singela. Obrigada pela família linda e unida que formamos.

Ao meu marido, Fernando, maior incentivador nessa jornada! Sempre ao meu lado em todas as horas. Que sempre torceu por mim desde a seleção do mestrado e me fez levantar a cabeça e acreditar quando pensei que não conseguiria. Obrigada por todo apoio, compreensão e amor. Te amo muito!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Davi Pereira de Santana, por me acolher no NUDFAC, pela orientação, confiança e apoio. A minha co-orientadora Profa. Dra. Leila Bastos Leal pela orientação, apoio, confiança, paciência desde o projeto colutório (hehehe) e pela amizade!

Às queridas flores e amigas Noely, Maria Alice e Giovana!!! Também a Carol (com C), Karol (com K) e Gustavo, pela amizade e pela ajuda! Vocês foram essenciais a realização desse projeto!!!

Ao Prof. e amigo André Luís (UFPI) pela inesgotável disposição em ajudar, pela contribuição, incentivo.

À Prof. Dra. Ana Amélia Lira (UFS) pelo treinamento de permeação cutânea e pela colaboração no projeto enviado ao CEPA.

Ao Prof. Dr. Josemir Belo (Dermatologia HC/UFPE) pelo interesse na avaliação clínica das preparações de cidofovir.

Aos queridos André, Adriane e Nessa que sempre torceram por mim e aos amigos Tereza Raquel e Valderes pelo incentivo e amizade.

À todos da Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade (FECDA), em especial a Ellison e a Cris, pela torcida, pelo apoio e amizade! E a Nilson e Eduardo pela ajuda na aquisição das orelhas de porco para o treinamento de permeação.

Agradeço a todos do NUDFAC, pela torcida! Principalmente a Danilo, Carlos Eduardo e Thayse pela amizade e contribuições durante os ensaios analíticos. Aprendi muito com vocês. E a Sárdon, claro, o Google do Nudfac.

Agradeço a Marlene e Gevânio pela incansável colaboração durante a caracterização do fármaco.

À Bruno, Aíla e Júnior Ceará do LAFEPE durante os ensaios realizados no LAFEPE. Muito obrigada!

À Zênia Maciel pelas dúvidas também na parte analítica e a Felipe Bonifácio pela colaboração durante as análises no HPLC no IMIP.

À Profa. Miriam e a Nathália do LPTX - UFPE, pela doação da pele de cobra utilizada nos estudos de permeação cutânea.

Aos professores Lamartine (UFPE), Mônica (UFPE), José Alexsandro (UEPB) e a Lourenço (LTM) pela colaboração na análise térmica.

Ao Prof. Eduardo e Elaine (DQF – UFPE) pela microscopia eletrônica de varredura, aos técnicos da Central Analítica do DQF pelos ensaios de RMN e Espectroscopia no IV, a Prof. Nereide (UFPE) a Júlia e Edwin do CETENE pelas análises de tamanho de partícula e maldi, à João Carlos e Tarsila (DF – UFPE) pelo ensaio de difração de raios-x. A BS inovação Farmacêutica e NCQMC pelas doações de água Milli-Q.

Aos colegas, professores, ex-funcionários e funcionários da Pós Graduação Margareth, Rosa, Jane, Mayra e Nerylin.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste projeto, agradeço de coração.

“Continue a nadar, continue a nadar, a nadar, a nadar...”

Dory, a “peixinha” mais sábia do oceano.

RESUMO

As verrugas genitais são lesões epiteliais induzidas pelo Papillomavirus Humano (HPV) cujas técnicas atualmente utilizadas para seu tratamento são dolorosas e com recidivas que costumam acontecer em curto espaço de tempo. Uma alternativa para o tratamento poderia ser a aplicação local do cidofovir. O cidofovir é um fármaco antiviral pertencente à classe dos análogos nucleosídicos, com amplo espectro contra DNA vírus que foi autorizado em 1996 pela FDA para o tratamento de retinite por citomegalovírus. No entanto, inúmeros estudos “off-label” relatam a eficácia deste fármaco aplicado por via tópica e intralesional para o tratamento de lesões causadas pelo HPV utilizando preparações manipuladas em farmácias hospitalares. Tendo em vista que não existe padronização de concentração de cidofovir e ou tipo de veículo utilizado, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química do fármaco e, a partir de formas farmacêuticas semi-sólidas padronizadas, realizar estudos de liberação e permeação cutânea utilizando a pele de cobra da espécie jiboia (*Boa constrictor*). Para a caracterização físico-química do insumo farmacêutico ativo foram realizadas técnicas de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de Infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-x, análise térmica, teor do fármaco e umidade. As formulações desenvolvidas (E = emulsão, G = gel de carbopol, GP = gel carbopol com propilenoglicol 5%, GE = gel de carbopol com etanol 5%) foram avaliadas através da determinação do pH, viscosidade e espalhabilidade. Testes de centrifugação e aferição do tamanho de gotículas foram também realizados para a preparação emulsionada. Duas técnicas de quantificação do fármaco foram desenvolvidas e validadas conforme a RE 899/2003 da Anvisa, sendo uma por espectrofotometria de ultravioleta, e a outra técnica por cromatografia líquida de alta eficiência. Nos estudos de liberação *in vitro*, foi observado que a viscosidade foi o fator determinante na difusão do fármaco, sendo evidenciado um perfil de liberação superior para a emulsão. Além disso, verificou-se que todas as preparações seguiram o modelo cinético de Higuchi, indicando que os sistemas são controlados por difusão. Já no ensaio de permeação cutânea *in vitro*, verificou-se que a quantidade de fármaco permeada foi maior também para a emulsão, apresentando esta um perfil consoante com sua cinética de liberação. Considerando as formulações gelificadas, foi verificado que as concentrações dos promotores de permeação avaliados, a saber, propilenoglicol e

etanol, não influenciaram de forma significativa a permeação do cidofovir através do modelo de biomembrana empregado.

PALAVRAS CHAVES: Papiloma vírus humano, condiloma, gel, creme.

ABSTRACT

Genital warts are epithelial lesions induced by Human Papillomavirus (HPV) whose techniques currently used for treatment are painful and with relapses that usually happen in a short time. An alternative for the treatment could be the local application of cidofovir. Cidofovir is an antiviral drug that belongs to the class of nucleoside analogues with broad spectrum against DNA virus that was authorized in 1996 by the FDA for the treatment of cytomegalovirus retinitis. However, several studies off-label reported the efficacy of this drug applied topically and intralesionally to treat lesions caused by HPV using preparations manipulated in hospital pharmacies. Given that there is no standardization and concentration of cidofovir or type of vehicle used, the objective of this work was the physical-chemical characterization of the drug, and from standardized semi-solid dosage forms, to realize studies of release and skin permeation using the snake skin of the species Jibóia (*Boa constrictor*). For the physico-chemical characterization of the active pharmaceutical ingredient techniques were carried out nuclear magnetic resonance, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, x-ray diffraction, thermal analysis, and moisture content of the drug. Formulations developed (E = emulsion, G = carbopol gel, PG = propylene glycol carbopol gel with 5% GE = carbopol gel with 5% ethanol) were evaluated according to the pH, viscosity, spreadability, centrifugation test and the measuring the droplet size for the emulsified preparation. Two techniques for quantification of the drug have been developed and validated according to RE 899/2003 of ANVISA, with an ultraviolet spectrophotometry, and another technique for high performance liquid chromatography. *In vitro* release studies, it was observed that the viscosity is the determining factor in the spread of the drug release, evidencing a higher release profile for the emulsion formulation consisting of lower viscosity. Furthermore, it was found that all these preparations follow the Higuchi kinetic's model, indicating that the systems are controlled by diffusion. With respect to the study of skin permeation *in vitro*, it was found that the amount of permeated drug was higher for the emulsion, with a permeation profile depending on the kinetics release. Whereas the formulations gelled, it was found that the concentration of permeation enhancers evaluated, namely propylene glycol and ethanol did not affect significantly the cidofovir permeation through the model of biomembrane employed.

KEYWORDS: Human papilloma virus, warts, gel, cream.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Estrutura viral do HPV.....	33
Figura 2 - Lesões clínicas condilomatosas vulvar, perineal, perianal (A) e peniana (B) provocadas pelo HPV.....	36
Figura 3 - Representação da estrutura da pele.....	38
Figura 4 - Representação da epiderme.....	39
Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de permeação pelo estrato córneo.....	41
Figura 6 – Gráfico da quantidade de massa difundida através de uma membrana versus tempo.....	44
Figura 7 – Representação esquemática da célula de difusão de Franz.....	45
Figura 8 - Fotografia da muda da pele de cobra <i>Boa constrictor</i>	47
Figura 9 - Estrutura química do cidofovir.....	50

CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CIDOFOVIR

Figura 1 – Estrutura química do cidofovir.....	65
Figura 2 – Cromatograma representativo do cidofovir.....	69
Figura 3 – Curva da regressão linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.....	70
Figura 4 – Infravermelho do cidofovir.....	74
Figura 5 – Difratoograma do cidofovir.....	75
Figura 6 – Morfologia dos cristais de CDV nas magnificações: 60x, 120x e 200x, respectivamente.....	76
Figura 7 – Curva termogravimétrica (TG/DTG) do cidofovir.....	76
Figura 8 – Curva DTA do cidofovir.....	77

CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO/ PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE PREPARAÇÕES TÓPICAS DE CIDOFOVIR

Figura 1 – Microfotografia da emulsão.....	89
Figura 2 – Reogramas da Formulação G.....	91

Figura 3 - Reogramas da Formulação GP.....	91
Figura 4 - Reogramas da Formulação GE.....	92
Figura 5 - Reogramas da Formulação E.....	92
Figura 6 – Gráfico das espalhabilidades das preparações.....	93
Figura 7 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> das formulações estudadas.....	96
Figura 8 – Perfil de permeação cutânea <i>in vitro</i> através de biomembrana.....	98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Semelhança entre o estrato córneo humano e pele de cobra.....	46
Tabela 2 - Estudos clínicos utilizando cidofovir tópico para o tratamento de pacientes portadores do HPV.....	54

CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CIDOFOVIR

Tabela 1 - Resultado da Linearidade – 3 curvas autênticas.....	70
Tabela 2 – Resultado da análise de variação para linearidade.....	70
Tabela 3 – Resultado do teste de robustez para os parâmetros avaliados: temperatura e fluxo.....	71
Tabela 4 – Teste t de Student – Robustez.....	71
Tabela 5 – Resultados obtidos no teste de repetitividade.....	71
Tabela 6 - Resultados da Precisão Intermediária em dias diferentes com dois analistas.....	72
Tabela 7 – Resultado da Análise de variância para a Precisão intermediária.....	72
Tabela 8 – Resultados da exatidão.....	73

CAPÍTULO III – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO/ PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE PREPARAÇÕES TÓPICAS DE CIDOFOVIR

Tabela 1 – Composição e percentuais das formulações gelificadas e emulsionada.....	85
Tabela 2 – Viscosidade aparente das preparações (n=3).....	93
Tabela 3 – Repetitividade e Precisão intermediária entre analistas e dias diferentes.....	94
Tabela 4 – Resultados da exatidão.....	95
Tabela 5 – Coeficientes de correlação das formulações estudadas nas cinéticas de liberação.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDV – Cidofovir
HPMPC – ((S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina)
HPV – Papiloma vírus humano
DNA - Ácido desoxirribonucléico
HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida
FDA – Food and Drug Administration
EMA – European Medicines Agency
RE – Resolução
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
OMS – Organização Mundial de Saúde
F. BRAS – Farmacopéia Brasileira
USP – The United States Pharmacopeia
IFA – Insumo farmacêutico ativo
RPM – rotações por minuto
DRX – Difração de raios-x
CLAE-UV – Cromatografia Líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta
IV – infravermelho
UV – ultravioleta
VIS - visível
DMSO – dimetilsulfóxido
D₂O – Água deuterada
BHT – butilhidroxitolueno
EDTA – ácido etilendiaminotetracético
QSP – quantidade suficiente para
E – emulsão
G – gel carbopol
GP - gel carbopol com propilenoglicol
GE – gel carbopol com etanol
S – solução aquosa de cidofovir
TG – Termogravimetria
DTA – Análise térmica diferencial
DTG – Termogravimetria derivada

RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de prótons
RMN ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de carbono
WD – distância de trabalho
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
DP – desvio padrão
CV – coeficiente de variação
ANOVA – análise de variância
RRP – papilomatose respiratória recorrente
KBr – brometo de potássio
LCR – região de controle
L – lag time
O. E – óxido de etileno
O/A – óleo em água
A/O – água em óleo
A/O/A – água em óleo em água
O/A/O – óleo em água em óleo
V.O – via oral
S.C – via subcutânea
I. V – via intravenosa

LISTA DE SÍMBOLOS

μg – micrograma

μL – microlitro

μm - micrometro

L – litro

mL - mililitro

mg – miligrama

g – grama

kg - quilograma

nm - nanômetro

mm – milímetro

cm – centímetro

h – hora

min - minuto

% - porcentagem

M – molar

T - temperatura

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

N/m^2 – Newton por metro quadrado

Pa.s – Pascal segundo

Log – logaritmo

kV – quilovolt

mA – miliamper

pH – potencial hidrogeniônico

i.e – isto é

Log P – coeficiente de partição

J – fluxo

m – massa acumulada de fármaco

∇c - gradiente de concentração

C_0 – constante de concentração do fármaco na solução doadora

K – coeficiente de partição

h – espessura da membrana

v – volume

GL – Gay Lussac

ppm – parte por milhão

Ei – espalhabilidades

d – diâmetro

SUMÁRIO

1 Introdução.....	25
1.1 Referências bibliográficas.....	27
2 Objetivos.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos específicos.....	30
3 Capítulo I. Revisão de Literatura.....	32
3.1 Papilomavirus humano.....	32
3.1.1 Estrutura viral.....	32
3.1.2 Dados epidemiológicos.....	33
3.1.3 Transmissão.....	34
3.1.4 Ciclo viral.....	34
3.1.5 Manifestações do vírus.....	35
3.1.5.1 Câncer de colo de útero.....	35
3.1.5.2 Condilomas.....	36
3.1.6 Prevenção.....	37
3.1.7 Tratamento.....	37
3.2 A pele.....	38
3.2.1 Penetração cutânea de fármacos.....	40
3.2.1.1 Vias de penetração de fármacos.....	40
3.2.1.2 Promotores de permeação cutânea.....	42
3.2.1.3 Estudos de permeação cutânea.....	43
3.2.1.3.1 Métodos <i>in vitro</i> de avaliação da permeação cutânea.....	44
3.3 Formas farmacêuticas tópicas: gel e emulsão.....	47
3.3.1 Géis.....	48
3.3.2 Emulsões.....	49
3.4 Cidofovir.....	50
3.4.1 Aspectos gerais.....	50
3.4.2 Farmacodinâmica.....	51
3.4.3 Farmacocinética.....	51
3.4.4 Efeitos adversos.....	52
3.4.5 Avaliação clínica.....	53
3.5 Referências Bibliográficas.....	57
4 Capítulo II. Caracterização físico-química do cidofovir.....	64

4.1	Introdução.....	65
4.2	Materiais e métodos.....	66
4.2.1	Teste de teor por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV) e validação.....	66
4.2.2	Faixa de fusão.....	67
4.2.3	Espectroscopia na região do infravermelho.....	67
4.2.4	Ressonância magnética nuclear.....	67
4.2.5	Perfil difratométrico.....	67
4.2.6	Microscopia eletrônica de varredura.....	67
4.2.7	Caracterização térmica.....	68
4.2.8	Teor de umidade.....	68
4.2.9	Estudo de solubilidade.....	68
4.3	Resultados e discussão.....	68
4.3.1	Teste de teor por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE-UV) e validação.....	68
4.3.2	Faixa de fusão.....	73
4.3.3	Espectroscopia na região do infravermelho.....	73
4.3.4	Ressonância magnética nuclear.....	74
4.3.5	Perfil difratométrico.....	75
4.3.6	Microscopia eletrônica de varredura.....	75
4.3.7	Caracterização térmica.....	76
4.3.8	Teor de umidade.....	78
4.3.9	Estudo de solubilidade.....	78
4.4	Conclusão.....	78
4.5	Referências bibliográficas.....	79
5	Capítulos III – Caracterização físico-químicas e estudos de liberação/ permeação cutânea <i>in vitro</i> de preparações tópicas do cidofovir.....	82
5.1	Introdução.....	82
5.2	Materiais e métodos.....	84
5.2.1	Obtenção de preparações gelificadas e emulsionada do cidofovir e avaliação das características físico-químicas.....	84
5.2.1.1	Características organolépticas.....	85
5.2.1.2	Teste de resistência à centrifugação.....	85
5.2.1.3	Análise do tamanho das gotículas da emulsão.....	85

5.2.1.4 Determinação do pH.....	86
5.2.1.5 Ensaios de reologia e viscosidade.....	86
5.2.1.6 Determinação da espalhabilidade.....	86
5.2.2 Estudo de liberação e permeação <i>in vitro</i> em modelo de biomembrana alternativo.....	87
5.2.2.1 Quantificação do cidofovir proveniente do ensaio de liberação.....	88
5.2.2.2 Condições cromatográficas para quantificação do cidofovir em amostras oriundas do ensaio de permeação cutânea.....	88
5.3 Resultados e discussão.....	88
5.3.1 Avaliação das características físico-químicas.....	88
5.3.1.1 Características organolépticas.....	88
5.3.1.2 Resistência da emulsão à centrifugação.....	89
5.3.1.3 Análise do tamanho das gotículas da emulsão.....	89
5.3.1.4 Determinação do pH.....	90
5.3.1.5 Ensaios de reologia, viscosidade e espalhabilidade.....	90
5.3.2 Validação de método analítico para quantificação do cidofovir nas cinéticas de liberação <i>in vitro</i>	93
5.3.3 Estudo de liberação e permeação <i>in vitro</i>	95
5.4 Conclusão.....	99
5.5 Referências bibliográficas.....	100
6 Conclusões.....	106
7 Apêndice.....	108

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Dentre os vírus causadores de doenças sexualmente transmissíveis, o Papillomavirus humano (HPV) se destaca devido a sua elevada taxa de incidência e as conseqüências decorrentes da infecção. O HPV está intimamente associado ao desenvolvimento do câncer de colo de útero e ao surgimento de lesões verrucosas na pele como as verrugas anogenitais.

As diferentes formas de manifestação do HPV estão relacionadas ao tipo do vírus contraído. Existem mais de cem tipos de HPV, sendo os tipos 6 e 11 responsáveis por 90% das verrugas genitais (BELLO, ENABOR, ADEWOLE, 2011).

As verrugas genitais ou condiloma acuminado são lesões cutâneo-mucosas benignas que acometem a região anogenital (CARVALHO et al, 2010). Embora muitas vezes assintomáticas, podem causar prurido, ardor, leucorréia e até mesmo sangramento (CARVALHO, QUINTANA, 2008). Além dos sintomas físicos, podem provocar desconforto estético devido ao crescimento progressivo das lesões (SAMPAIO NETO, 2001).

Diversos fatores podem ser atribuídos ao aparecimento do condiloma, p. ex, tabagismo, fatores hormonais e outras infecções conjuntas (SAMPAIO NETO, 2001). O sistema imunológico do paciente é determinante para o desenvolvimento das verrugas, visto que podem regredir espontaneamente em indivíduos saudáveis ou persistirem e tornarem-se numerosas em pessoas imunodeprimidas, como os portadores do vírus HIV e aqueles sob ação de agentes imunossupressores (TANNUS et al, 2008).

Os tratamentos atualmente disponíveis consistem em cauterizações químicas com ácido tricloroacético, podofilina, podofilotoxina, imunoterapia com uso de Imiquimod e interferons, cauterizações a laser ou a frio ou as verrugas podem ser removidas cirurgicamente (NADAL et al, 2004). Todavia, essas técnicas são muitas vezes dolorosas e com altas taxas de recidivas.

Considerando que não há um tratamento ideal, diversos estudos apontam o cidofovir tópico como uma alternativa às terapias convencionais (MUÑOZ et al, 2010; MARIÑO et al, 2007; GEERINCK et al, 2001; BONATTI et al, 2007; TRISTAM, FIANDER, 2005; STRAGIER et al, 2002).

O cidofovir é um fármaco antiviral pertencente à classe dos análogos nucleosídicos que possui amplo espectro contra DNA vírus, dentre eles os Papilomavírus. Sua ação se dá através da inibição da síntese de DNA polimerase, enzima essencial à replicação viral, além de induzir a apoptose de células infectadas pelo vírus (DE CLERCQ, 2002, 2007).

As pesquisas que avaliam a resposta terapêutica do cidofovir tópico tratam-se de estudos “off-label”, pois não há um medicamento destinado a uso tópico à base de cidofovir, sendo o mesmo incorporado em preparações extemporâneas (cremes, pomadas e géis) obtidas a partir da solução para perfusão Vistide® (Gilead Sciences).

Este trabalho propõe o estudo de caracterização físico-química e avaliação da liberação e permeação cutânea *in vitro* das formas farmacêuticas gel e emulsão contendo o cidofovir. A incorporação do fármaco foi feita a partir do insumo farmacêutico ativo adquirido no mercado (BoyleChem, lote BC20100625).

Esta dissertação está dividida em três capítulos.

O primeiro capítulo é constituído da revisão de literatura, contendo informações sobre o vírus HPV, a pele humana, as formas farmacêuticas gel e creme e sobre o cidofovir.

No capítulo 2 são apresentadas as técnicas que foram utilizadas para identificar e caracterizar o insumo farmacêutico ativo em questão com seus respectivos resultados.

O terceiro capítulo é dedicado as formulações gelificadas e emulsionadas a base do cidofovir e aos ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro* através da pele de cobra *Boa constrictor*.

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLO, F. A.; ENABOR, O. O.; ADEWOLE, I. F. Human Papilloma virus vaccination for control of cervical cancer: a challenge for developing countries. **African Journal of Reproductive Health**, v. 15, n. 1, p. 25-30, mar, 2011.

BONATTI, H.; AIGNER, F.; DE CLERCQ, E., et al. Local administration of cidofovir for human papilloma virus associated skin lesions in transplant recipients. **Transplant International**, v. 20, p. 238-246, 2007.

CARVALHO, B. R.; QUINTANA, S. M. Condiloma: um desafio secular. **Prática Hospitalar**, ano 10, n. 56, mar/abr, p. 145-148, 2008.

CARVALHO, B. R.; QUINTANA, S. M.; DUARTE, G.; et al. Tratamento do condiloma vulvar. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 20, p. 458-461, 2010.

DE CLERCQ, E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. **Antiviral Research**, v. 55, p. 1-13, 2002.

DE CLERCQ, E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. **Antiviral Research**, v. 75, p. 1-13, 2007.

GEERINCK, K.; LUKITO, G.; SNOECK, R., et al. A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream. **Journal of Medical Virology**, v. 61, p. 543-549, 2001.

MARIÑO, A. T.; GONZÁLEZ, J. R. C.; BOBO, M. T. I.; RODRÍGUEZ, F. A. Cidofovir topico para el tratamiento de verrugas plantares. In: **ESCP Symposium on Clinical Pharmacy**, n. 36, Estambul: 2007, p. 48-49.

MUÑOZ, R. M.; PRADO, E.; CISNEROS, J. M.; BAUTISTA, F. J., et al. Gel de cidofovir al 1% en lesiones por papilomavirus en una paciente con inmunodeficiencia congênita. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, p. 209-210, 2010.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R.; HORTA, S. H. C.; CALORE, E. E.; Sistematização do atendimento dos portadores de infecção perianal pelo Papilomavirus humano (HPV). **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 24, n. 4, p. 322-328, 2004.

SAMPAIO NETO, L. F.; RAMALHO, M. V.; CAMPOS JÚNIOR, M. S.; NOVO, N. F.; MENEGOCI, J. C. Estudo comparativo do tratamento da condilomatose vulvar em mulheres HIV+ e HIV-. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 13, n. 6, p. 8-11, 2001.

STRAGIER, I.; SNOECK, R.; DE CLERCQ, E.; VAN DEN OORD, J. J.; VAN RANST, M.; DE GREEF, H. Local Treatment of HPV-Induced Skin Lesions by Cidofovir. **Journal of Medical Virology**, v. 67, p. 241-245, 2002.

TANNUS, B. G.; CAVALIN, L. C.; SATO, M. S.; BRENNER F. M. Dermatologia comparativa: verrugas virais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 1, p.93-94, 2008.

TRISTAM, A.; FIANDER, A. Clinical responses to Cidofovir applied topically to women with high grade vulval intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 99, p. 652-655, 2005.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e realizar estudos de liberação e permeação cutânea *in vitro* de formas farmacêuticas gelificadas e emulsionada contendo cidofovir.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar e caracterizar físico-quimicamente o insumo farmacêutico ativo cidofovir através de ensaios de teor, RMN, MEV, difração de raios-x, solubilidade, espectroscopia no infravermelho, teor de umidade e análise térmica.
- ✓ Caracterizar as formulações através de parâmetros de viscosidade, reologia, espalhabilidade, microscopia óptica, resistência à centrifugação, determinação de pH;
- ✓ Realizar estudo de liberação e permeação cutânea *in vitro* utilizando a pele de cobra *Boa constrictor* como modelo de biomembrana.

Capítulo I
Revisão de Literatura

3 CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Papilomavírus humano

O Papilomavírus humano (HPV) configura uma das principais doenças sexualmente transmissíveis (NOGUERES, 2010). Uma atenção individualizada é requerida a esse vírus devido às implicações que essa infecção pode causar como os condilomas anogenitais e o câncer de colo de útero.

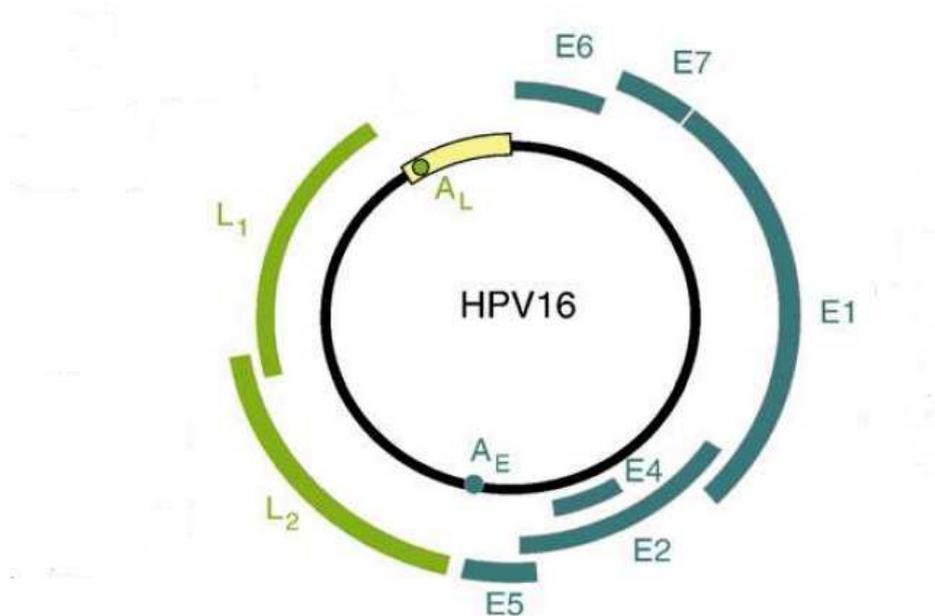
Os condilomas anogenitais, são lesões verrucosas clinicamente aparentes que causam desconforto físico e estético ao paciente, além de gerar estresse psicológico. Atualmente, os tratamentos disponíveis possuem limitações práticas e não são sempre bem sucedidos. Contudo, é importante que pesquisas sejam desenvolvidas a fim de se obter um tratamento eficaz (LACEY, 2011).

3.1.1 Estrutura viral

O HPV pertencente à família Papillomaviridae. Trata-se de um vírus arredondado, não envelopado, não cultivável, formado por dupla fita circular de DNA, com aproximadamente 8.000 pares de bases (CÂMARA et al., 2003). Possui 55 nm de diâmetro e um capsídeo com arranjo icosaédrico composto por 72 capsômeros (CASTRO et al., 2004). O vírion, ou seja, a forma infectiva do vírus, é constituído pelo capsídeo e pelo genoma viral.

O genoma do HPV é composto por uma pequena região de controle (LCR), onde se inicia a replicação do DNA e que regula a transcrição e a replicação, por uma região precoce (*early region*) com seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) responsáveis pela replicação viral e pela região tardia (*late region*) com os genes L1 e L2 que codificam as proteínas formadoras do capsídeo (Figura 1) (STANLEY, 2010; TANCREDI, 2007). Por não ser cultivável, o HPV não é classificado em sorotipos, mas em genótipos e atualmente, mais de 130 tipos já foram identificados pela sequência de genes que codifica proteínas do capsídeo L1 (STANLEY, 2010).

Figura 1 - Estrutura viral do HPV. Adaptado de STANLEY, 2010.



Os diversos tipos do vírus estão ainda associados às suas diferentes manifestações na pele e mucosas e podem ser divididos em baixo e alto-risco oncogênico. Os vírus de baixo-risco 1, 2, 3, 4, 10 causam verrugas comuns, plantares e vulgares na pele e os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 56, 66, 68 relacionam-se as lesões benignas na região anogenital, sendo os tipos 6 e 11 os principais causadores dos condilomas acuminados. Os tipos de alto-risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 associam-se as lesões malignas da mucosa anogenital, sendo os tipos 16 e 18 responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de câncer cervical (CÂMARA, 2003; GUPTA, 2010; STANLEY, 2008). Pesquisa realizada por Baldez da Silva et al. (2009), a partir de amostras de esfregaços de colo uterino revela que em Recife, Pernambuco, há prevalência do tipo 16 e em segundo lugar o tipo 31, sendo a incidência dos tipos 33 e 18 similares, divergindo do que acontece em diferentes regiões do Brasil, onde o tipo 18 é o segundo mais prevalente.

3.1.2 Dados epidemiológicos

O HPV é um vírus DNA com elevada taxa de ocorrência em ambos os sexos, sendo mais comum em indivíduos jovens e sexualmente ativos, com pico de incidência entre 16 a 20 anos de idade segundo a Organização Mundial de Saúde

(ELEUTÉRIO, 2009; OMS, 2011). Devido à alta prevalência do HPV, acredita-se que 75 a 80% da população foi, está ou será infectada pelo vírus em algum momento da sua vida e que 50 a 80% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas por um ou mais tipos de HPV (BRASIL, 2011a; ELEUTÉRIO, 2009). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, aproximadamente 25% das mulheres estão infectadas pelo vírus e o país é um dos líderes mundiais em incidência do HPV (BRASIL, 2011a).

3.1.3 Transmissão

A principal via de transmissão do HPV é através do contato sexual e a infecção pelo vírus é considerada uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns no mundo (BRASIL, 2011a). No entanto, há outras formas de transmissão, como a auto-inoculação a partir de lesões na pele ou mucosas e a infecção materno-fetal durante a gestação, embora menos freqüente, ou ainda no momento do parto. (NICOLAU, 2002; XAVIER et al., 2007).

3.1.4 Ciclo viral

O vírus HPV tem tropismo pelo tecido epitelial e mucosas. O ciclo viral é dependente da diferenciação celular na epiderme (SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005). Após infecção, os vírus atingem as células basais da epiderme em pequena quantidade e replicam o DNA viral ampliando para 50 a 100 o número de cópias por célula. Devido à diferenciação celular, quando os queratinócitos migram para camadas mais superficiais, ocorre uma maior expressão genética, principalmente dos genes E6 e E7. A replicação do DNA viral leva a um aumento do número de cópias virais para aproximadamente 1000 unidades por célula. A expressão dos genes L1 e L2 promovem a formação do capsídeo, formando novas partículas virais na forma infecciosa. Esse ciclo dura em torno de duas a três semanas, tempo necessário para a migração e diferenciação dos queratinócitos na epiderme (STANLEY, 2008; 2010).

3.1.5 Manifestações do vírus

A infecção genital do HPV pode ser latente, subclínica e clínica. A forma latente é diagnosticada apenas através de métodos de biologia molecular. Na forma subclínica, não há sintomas clínicos aparentes, mas pequenas alterações que podem ser detectadas por técnicas diagnósticas como colposcopia, colpocitologia, peniscopia e/ou biópsia; por fim, na forma clínica, as quais se inserem os condilomas, ocorrem lesões visíveis ao exame clínico sendo facilmente diagnosticadas (ANTUNES et al., 2004; XAVIER et al., 2007).

A maioria das infecções por HPV são assintomáticas e aproximadamente 1% resultam em lesões clinicamente aparentes, sendo a maior parte benigna e relacionada aos HPV subtipos 6 e 11 causadores dos condilomas acuminados. Esses, por sua vez, podem ainda ter caráter transitório e regredirem espontaneamente (NICOLAU, 2002). Todavia, em pacientes portadores do vírus HIV, devido a imunodepressão, as manifestações anogenitais induzidas pelo HPV costumam ser mais agressivas e com maior número de recidivas (PINCINATO et al., 2009).

3.1.5.1 Câncer de colo de útero

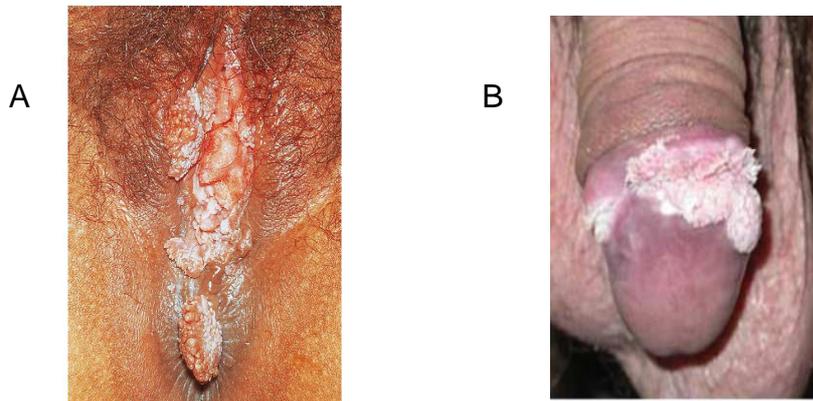
Como dito anteriormente, o vírus HPV está intimamente relacionado ao câncer de colo de útero, o quinto tipo mais comum em mulheres no mundo e o segundo no Brasil, atrás apenas do câncer de mama (GUPTA, 2010; BRASIL, 2012). Para 2012, o Ministério da Saúde estima que ocorrerão 17.540 novos casos de câncer cervical com cerca de 17 casos para cada 100.000 mulheres. No Nordeste, esse tipo de câncer é o segundo mais frequente (18/100.000), desconsiderando os tumores de pele não melanomas (BRASIL, 2011b). Em Recife, a taxa de mortalidade por esse tipo de câncer foi de 6,55 óbitos por 100.000 mulheres em 2005, índice superior ao de países como Estados Unidos, Canadá e Japão (THULER, 2008). Além do câncer cervical, outros estão associados ao HPV, como os de vagina e ânus. Estima-se que 50% dos cânceres de vulva, vagina e pênis; 85% dos cânceres anal, 20% dos cânceres de orofaringe e 10% dos cânceres de laringe e esôfago são atribuídos ao HPV (TROTTIER & FRANCO, 2006). Considerando as lesões condilomatosas, essas são causadas pelos tipos de vírus

HPV de “baixo-risco”, *i.e.*, onde não há predisposição a formação de células cancerígenas.

3.1.5.2 Condilomas

Condilomas acuminados ou verrugas genitais são lesões epiteliais causadas pelo HPV, popularmente conhecidas como “cristas de galo”, “cavalo de crista” e “figueira” (ISOLAN et al., 2004). O termo “condiloma” provém do grego e significa “tumor redondo”, enquanto “acuminado” é originado do latim, *acuminare*, que significa “tornar pontudo” (PASSOS et al., 2002). São lesões granulares e verrucosas, geralmente múltiplas, da cor da pele, avermelhadas ou hiperpigmentadas, que podem se aderir formando tumores vegetantes. As verrugas maiores tem aspecto de “couve-flor” enquanto as menores tem forma de placa, pápulas ou são filiformes (Figura 2) (ROSENBLATT et al., 2004; NADAL et al., 2008).

Figura 2 - Lesões clínicas condilomatosas vulvar, perineal, perianal (A) e peniana (B) provocadas pelo HPV. Extraídos de LACEY, 2011 (A) e TEJERA-VAQUERIZO, 2008 (B).



Segundo Nadal et al. (2008), microscopicamente os condilomas tem bordas definidas formadas por epitélio pluriestratificado, acantótico, com alongamento de cones epiteliais. As células possuem citoplasma volumoso e claro com núcleos irregulares.

O condiloma acuminado acomete a epiderme da região anogenital, predominando nas mulheres na área vulvar, entretanto verrugas e papilomas podem

surgir na pele das demais áreas do corpo e mucosas oral e gastrointestinal (XAVIER et al, 2007).

Estima-se que no mundo cerca de 1% das pessoas são acometidas a cada ano por essas lesões e que surgirão cerca de 30 milhões de novos casos por ano de lesões vulvares por HPV (FRIDMAN & PESSIM, 2009; LACEY, GARNETT, 2011).

3.1.6 Prevenção

Medidas de prevenção são essenciais para redução da infecção pelo HPV. O uso de preservativo diminui a possibilidade de transmissão do vírus através do contato sexual. A vacina quadrivalente, Gardasil[®] (Merck), contra os sorotipos 6, 11, 16 e 18 de HPV, foi licenciada pela FDA em 2006 e em 2009 foi autorizada a utilização da vacina bivalente, Cervarix[®] (Glaxo Smith Kline), profilática contra o HPV 16 e 18. A vacinação é indicada para população feminina entre os 09 e 26 anos dividida em três doses. O período de proteção imunológico é desconhecido, estudos indicam uma proteção por cinco anos, especulando-se ainda através de modelos estatísticos um período de pelo menos 20 anos para imunização com a vacina bivalente (BELLO; ENABOR; ADEWOLE, 2011; DERCHAN & SARIAN, 2007; MADDEN et al, 2011).

Embora já autorizado no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o acesso a imunização é limitado, principalmente devido ao elevado custo. Segundo Simões (2010), há ainda necessidade de cautela quanto à utilização da vacina, pois não se dispõem de informações como duração do efeito, mecanismo de proteção e efeitos a longo prazo que justifiquem um programa de vacinação do HPV como medida de saúde pública. Vale salientar que recentemente o Ministério da Saúde posicionou-se contra a introdução da vacinação contra o HPV no Programa Nacional de Imunização (BRASIL, 2011a).

3.1.7 Tratamento

O HPV não é sensível aos antivirais disponíveis. Portanto, o manejo dos condilomas acuminados costuma ser feito com cauterizações químicas, como podofilina ou ácido tricloroacético, entre outros. Nos casos de insucesso terapêutico ou na dependência da localização, as lesões condilomatosas podem ser removidas

cirurgicamente, eletrocauterizadas a frio ou por laser (FRACARO et al., 2003; PHELPS & ALEXANDER, 1995). No entanto, essas técnicas podem ser dolorosas e as recidivas costumam acontecer em curto espaço de tempo. Diante disso, uma alternativa para o tratamento seria a utilização tópica do cidofovir.

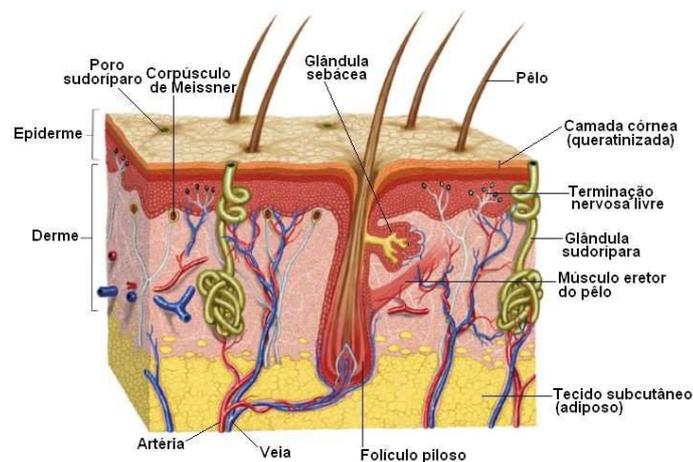
3.2 A pele

A pele humana é um órgão de revestimento representando a interface entre o organismo e o meio externo. Trata-se do um dos mais extensos órgãos do corpo atingindo 16% do peso corporal (BOROJEVIC & SERRICELA, 1999; LIRA, 2007).

Desempenha funções diversas no organismo, estando relacionadas à proteção contra radiação ultravioleta, agressões mecânicas, químicas e térmicas e invasão microbiana. Além disso, a pele, devido à relativa impermeabilidade, impede a desidratação em excesso, garante a homeostasia corporal, atua na secreção de substâncias endógenas e na percepção sensorial do meio ambiente, por possuir diversos receptores para pressão, tato, dor e temperatura (BOROJEVIC & SERRICELLA, 1999; DAL'BELO, 2008).

A pele é composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme ou tecido subcutâneo (Figura 3):

Figura 3 - Representação da estrutura da pele (disponível em: <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp> - acessado em 20/01/2012)

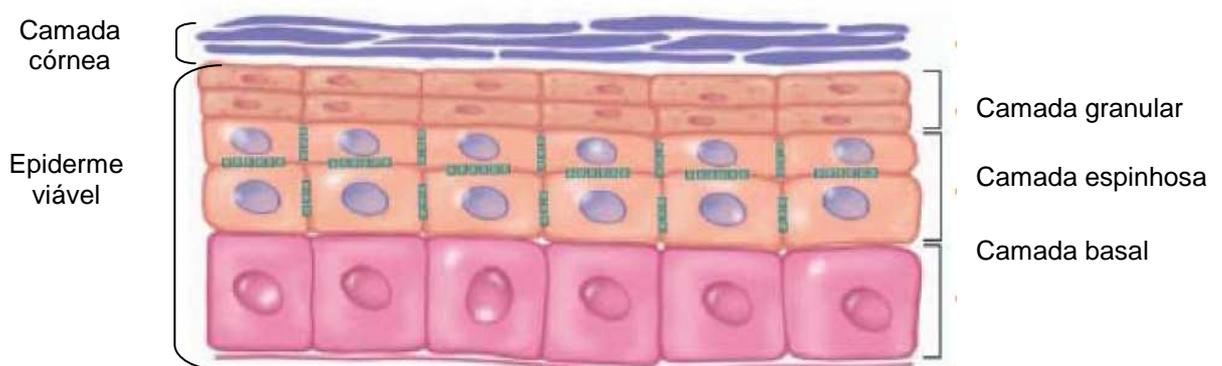


A epiderme é a camada mais superficial da pele com espessura que varia entre 0,6 mm (face) e 1,3 mm (palmas), constituída de tecido epitelial de

revestimento pavimentoso queratinizado (TOSATO, 2010; ROCHA, 2009). A epiderme é subdividida em duas camadas: o estrato córneo e a epiderme viável (Figura 4). O estrato córneo é a principal barreira a passagem substâncias através da pele e a perda de água. Sua estrutura assemelha-se a uma “parede de tijolos”, onde as células de queratina (corneócitos), que representam cerca de 80% do volume da camada córnea, estão imersas em uma matriz lipídica disposta em bicamadas e composta principalmente por ceramidas, colesterol e ácidos graxos (SILVA, 2008; STORPIRTIS et al, 2009).

A epiderme viável é formada por células em constante atividade proliferativa, dividida em camadas ou estratos: camada lúcida, camada granulosa, camada espinhosa e camada basal ou germinativa (Figura 4). Em movimento ascendente de diferenciação da camada basal, as células metabolicamente ativas se alteram, de forma ordenada, originando os corneócitos que se dispõem no estrato córneo (STORPIRTIS et al, 2009). O tempo de renovação epidérmica, desde a divisão celular na camada basal até a passagem dos corneócitos pelo estrato córneo pode ser estimado em 59 a 75 dias (HARRIS, 2009). Na epiderme encontram-se ainda os melanócitos, as células de Langerhans (defesa imunológica) e as células de Merckel (com terminações nervosas e sensoriais) (LIRA, 2007).

Figura 4 - Representação da epiderme. Adaptado de Tosato, 2010



A derme apresenta-se como uma camada de sustentação, localizada entre a epiderme e hipoderme, com espessura variável entre 2 e 4 mm. É constituída de tecido conjuntivo, constituindo uma densa malha de fibras de colágeno e elastina, produzidas pelos fibroblastos. Na derme estão inseridos os anexos cutâneos, os capilares sanguíneos, os vasos linfáticos, os nervos e terminações nervosas, além

de estruturas derivadas da epiderme, os apêndices cutâneos, como os folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (BOROJEVIC & SERRICELA, 1999; SILVA, 2008).

A derme está subdividida em duas camadas: a derme papilar, mais superficial e em contato com a epiderme, que confere maior resistência a pele além de fornecer nutriente a epiderme por difusão, e a derme reticular, que confere elasticidade e resistência à compressão (ROCHA, 2009).

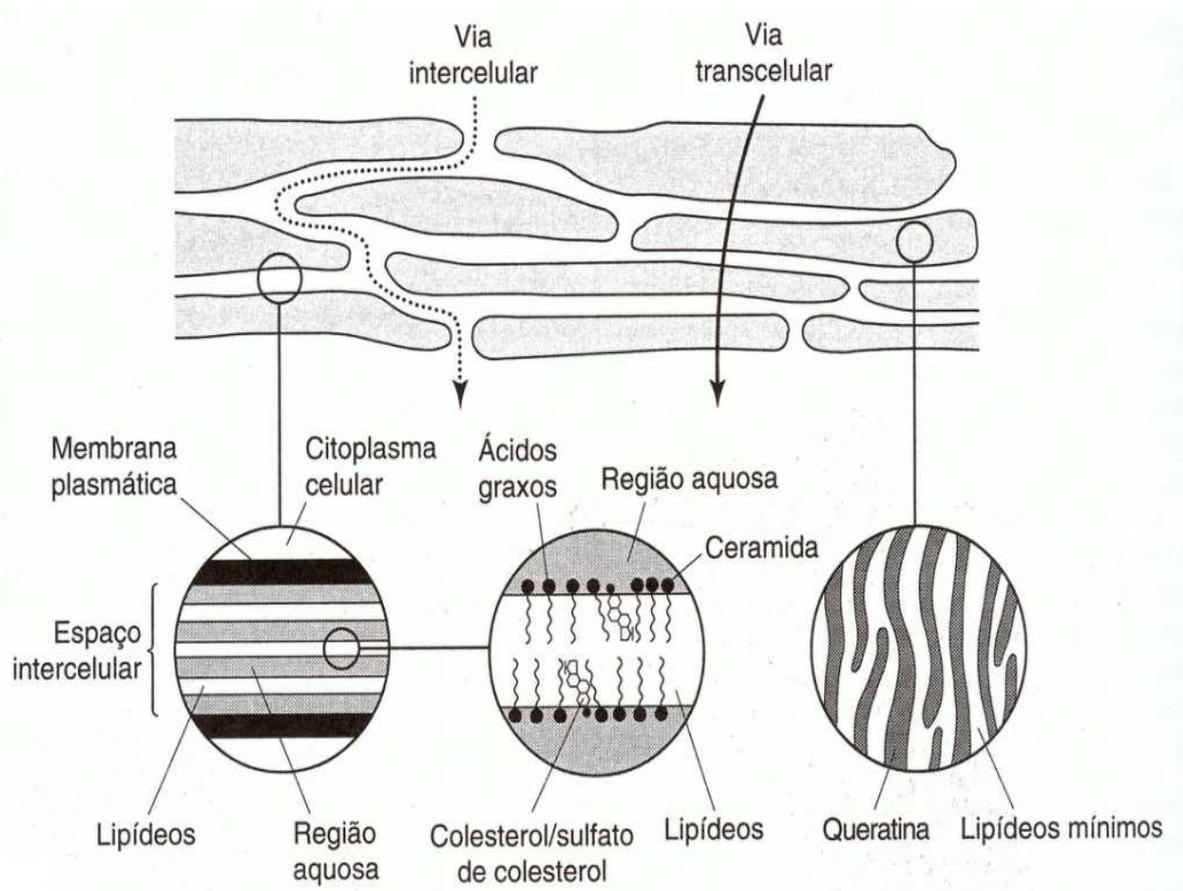
A camada mais profunda da pele é a hipoderme ou tecido subcutâneo, formada por tecido conjuntivo frouxo e pelo tecido adiposo, que quando desenvolvido forma o panículo adiposo, responsável pela modelagem corporal. Além disso, o tecido adiposo confere ainda isolamento térmico e proteção mecânica (LIRA, 2007; TOSATO, 2010).

3.2.1 Penetração cutânea de fármacos

3.2.1.1 Vias de penetração de fármacos

Os fármacos alcançam a epiderme viável, por um processo de difusão passiva, através de duas vias: a via transepidérmica ou a via transapêndices. A via transepidérmica constitui a principal via de permeação. Os apêndices cutâneos ocupam uma pequena área de aproximadamente 0,1% da superfície da pele, não contribuindo significativamente para a permeação. Na via transepidérmica, dois caminhos podem ser percorridos: a via intercelular, onde o fármaco difunde-se ao redor dos cornócitos e a via transcelular, quando a difusão ocorre através dos cornócitos (Figura 5) (MAIA CAMPOS, MERCÚRIO, 2009; ZAMPIERI, 2009).

Figura 5 - Representação esquemática dos mecanismos de permeação pelo estrato córneo.
Extraída de AULTON, 2005



Embora a via intercelular seja preconizada como a principal rota de permeação, o grau de lipofilicidade e o tamanho das partículas são características preponderantes na escolha da via a ser seguida. Moléculas polares (hidrofílicas) tendem a percorrer a via transcelular, devido à natureza aquosa dos componentes celulares, enquanto o transporte de moléculas pequenas e não carregadas se faz predominantemente pela via intercelular (LIRA, 2007; MAIA CAMPOS, MERCÚRIO 2009).

A passagem do fármaco através do estrato córneo pode ser explicada por meio de três etapas: 1) o fármaco é liberado da formulação para a superfície do estrato córneo, 2) O fármaco penetra o estrato córneo, controlado pelo coeficiente de partição, e 3) Ocorre a difusão do fármaco através do estrato córneo, considerada a etapa de maior importância nos estudos de permeação cutânea. Dessa forma, a velocidade de permeação do fármaco é dependente da sua concentração e solubilidade na formulação, da sua partição nos veículos utilizados,

e dos coeficientes de partição, de difusão através da camada córnea e demais camadas da pele e da presença de promotores de permeação na formulação (STORPIRTIS et al, 2009).

3.2.1.2 Promotores de permeação cutânea

A velocidade de permeação dos fármacos pode ser aumentada através do uso de promotores físicos ou químicos de permeação. Os promotores físicos favorecem a penetração de compostos no estrato córneo por alterar temporariamente e reversivelmente essa barreira (LIRA et al., 2004). Podem ser citadas como técnicas físicas a iontoforese, a sonoforese, a eletropermeabilidade e a magnetização (CHORILLI et al., 2007).

Os promotores de permeação químicos são a alternativa mais frequentemente utilizada em formulações semi-sólidas e transdérmicas. São compostos desprovidos de ação farmacológica, que quando incorporados em uma formulação podem permear ou interagir com os componentes do estrato córneo, reduzindo a resistência da pele à difusão do fármaco e incrementando a atividade termodinâmica do mesmo (MARTINS, VEIGA, 2002; STORPIRTIS et al, 2009). Possuem ainda capacidade de hidratação cutânea, de alteração da composição, propriedades físico-químicas e disposição lipídica e protéica do estrato córneo, diminuindo de modo reversível, a sua função barreira e/ou aumentando o coeficiente de partição do fármaco favorecendo sua difusão através da pele (SILVA et al., 2010).

Segundo Aulton (2005), as características de um promotor de permeação ideal são:

- ✓ Ser farmacologicamente inerte, como citado anteriormente;
- ✓ Ser de baixa toxicidade, não provocar irritações nem alergias;
- ✓ Possuir ação imediata, com efeito adequado e previsível;
- ✓ Ao ser removido da pele, essa recuperar imediata e totalmente sua capacidade de barreira;
- ✓ Não causar perda de eletrólitos, fluidos corporais e materiais endógenos;
- ✓ Favorecer a solubilidade dos fármacos;
- ✓ Ser compatível com os fármacos e adjuvantes;

- ✓ Possuir boa espalhabilidade e sensação sobre a pele, além de, se possível, ser inodoro, insípido, incolor e de custo reduzido.

Os promotores químicos mais utilizados são: dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol, azona, uréia, pirrolidonas, etanol, ácido oléico e agentes tensoativos.

O propilenoglicol é um líquido incolor, inodoro e miscível em água, álcoois, ésteres e cetona. A sua ação promotora deve-se a capacidade de solvatar a α -queratina presente no estrato córneo e a sua tendência em competir ou ocupar locais na proteína onde existem pontes de hidrogênio, o que pode resultar em redução da afinidade ou ligação do fármaco com o tecido, assim, favorecendo a penetração cutânea. Além disso, pode potencializar a ação de outros compostos promotores, como o ácido oléico (BABY, 2007).

O etanol é um álcool comumente empregado como promotor em produtos transdérmicos e permeia rapidamente a pele humana com fluxo de cerca de $1\text{mg}/\text{cm}^2/\text{h}$. Utilizado como solvente, aumenta a solubilidade do fármaco no veículo, além de promover a permeação por extrair lipídios do estrato córneo (CHORILLI, 2007; MARTINS, VEIGA, 2002).

3.2.1.3 Estudos de permeação cutânea

A passagem de substâncias através da pele ocorre por difusão passiva. De acordo com as leis de Fick, quando uma quantidade de massa é distribuída por uma determinada área (gradiente de concentração, ∇c), um fluxo (J) é estabelecido, havendo entres eles uma relação de proporcionalidade chamada de coeficiente de difusão, D , conforme equação 1 (NETZ & ORTEGA, 2002):

$$J = -D \cdot \nabla c \quad (\text{Equação 1})$$

Considerando um sistema bicompartimental, onde existe uma membrana semi-permeável, como o estrato córneo, separando dois meios (doador e receptor) e mantendo-se as condições *sink*, a quantidade acumulada de fármaco (m) que atravessa a membrana, por unidade de área (cm^2) e em função do tempo (t) até atingir o equilíbrio pode ser expressa pela equação 2 (AULTON, 2005; SATO, 2007):

$$J = \frac{dm}{dt} = \frac{D \cdot C_o \cdot K}{h} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

dm é a derivada da massa;

dt é a derivada do tempo;

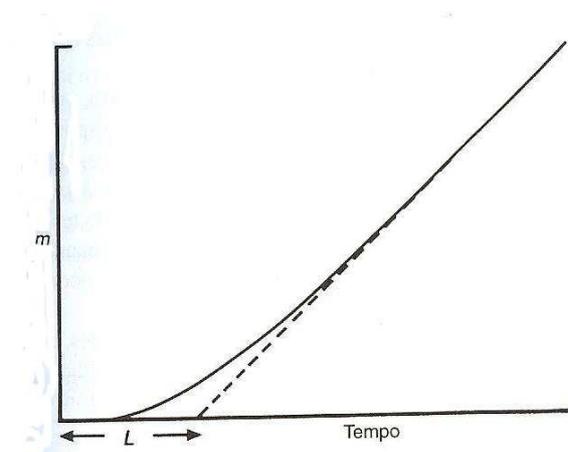
C_o é a constante de concentração do fármaco na solução doadora;

K é o coeficiente de partição do soluto entre a membrana e o veículo e;

h é a espessura da membrana.

Através de um gráfico Δm versus Δt é possível verificar o tempo (lag time, L) necessário para que o sistema alcance o equilíbrio (steady state). O lag time é obtido através da extensão da porção linear (quando o fluxo é constante) até o intercepto com o eixo das abscissas (Figura 6).

Figura 6- Gráfico da quantidade de massa difundida através de uma membrana versus tempo. (Extraído de Alton, 2005)



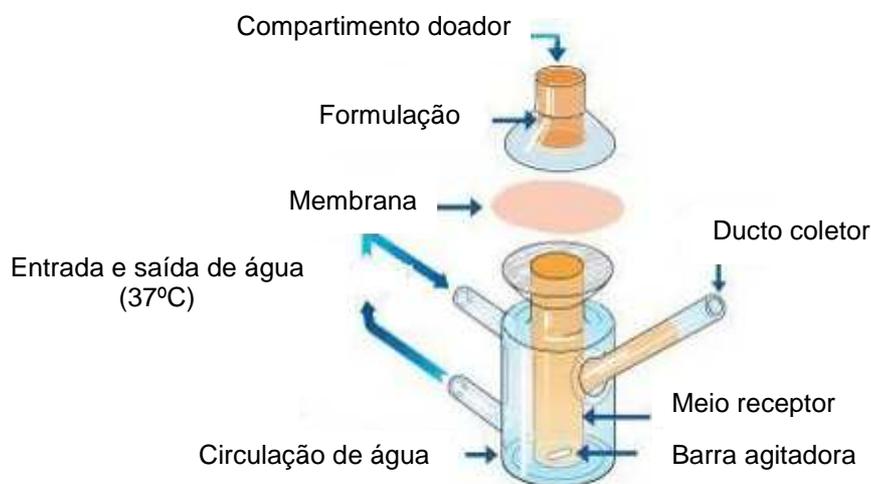
3.2.1.3.1 Métodos *in vitro* de avaliação da permeação cutânea

Durante o desenvolvimento farmacotécnico de formas farmacêuticas, o uso de técnicas *in vitro* de liberação tem sido de grande importância, pois possibilita a escolha entre diferentes formulações ou a sua otimização (PRAÇA, 2010).

Nos estudos *in vitro*, as células de difusão tipo Franz (Figura 7) são comumente empregadas para a avaliação da liberação do fármaco do veículo

estimando a quantidade do mesmo que é absorvida pela pele. Esses dispositivos são constituídos por dois compartimentos, um doador e outro receptor, separados por uma membrana sintética ou natural. O compartimento receptor é pre-enchido com uma solução que favorece as condições *sink*, isto é, uma condição de não saturação do sistema dinâmico (SILVA et al., 2010), possibilitando um fluxo contínuo do fármaco.

Figura 7- Representação esquemática da célula de difusão de Franz. Adaptado de SILVA, 2008)



Nos estudos *in vitro*, a velocidade de liberação do fármaco da forma farmacêutica é avaliada utilizando membranas sintéticas. Essas membranas possuem estruturas simples e são isentas de interferentes presentes na pele humana. Assim, a liberação do fármaco irá depender da atividade termodinâmica e da sua solubilidade no veículo. Além disso, essas membranas são facilmente adquiridas, menos onerosas e podem ser utilizadas nos estudos de delineamento de formulações dermatológicas, prevendo o comportamento do fármaco nas membranas biológicas. As membranas mais utilizadas são as de acetato de celulose, nitrato de celulose, nylon e polidimetilsiloxane (CARVALHO, 2007; SANTIS, 2008).

O comportamento biofarmacotécnico de uma formulação, se tratando de penetração e/ou permeação cutânea é observado através do uso de membranas naturais (pele humana ou natural). Podem ser utilizados como modelo natural as pele de rato, cobaio, camundongo com e sem pêlo, macaco rhesus, porco, cobra,

entre outros, sendo a pele da orelha de porco a de maior similaridade com a pele humana (SANTIS, 2008).

A utilização de muda de pele de cobra (Figura 8) vem ganhando espaço como alternativa a pele humana nos estudos de penetração cutânea. A muda de pele de cobra é constituída apenas de estrato córneo, com características próximas ao estrato córneo humano (Tabela 1). A taxa de evaporação de água também é outro fator que se assemelha a pele humana, porém a permeabilidade a água da pele de cobra é dependente das condições de habitat de acordo com a variabilidade da espécie (NUNES, 2005).

Tabela 1 - Semelhança entre o estrato córneo humano e a pele de cobra (Fonte: BABY, 2008).

Características	Estrato córneo	
	Humano	Muda de pele de cobra
Espessura do tecido	13 – 15 μm	10 – 20 μm
Estrutura protéica	Queratina do tipo α e β	Queratina do tipo α e β
Constituição lipídica*	2 – 6,5%	~ 6,0%

*colesterol, ác. graxos livres, glicoceramidas, fosfolipídios, entre outros.

A facilidade de aquisição, as menores variações interindividuais e a obtenção de resultados favoráveis são vantagens da aplicabilidade dessas membranas.

A pele humana ainda é considerada o melhor modelo. Contudo, a dificuldade de obtenção e armazenamento da pele, além da necessidade de submissão do experimento a um Comitê de Ética em Pesquisa tem limitado a aplicabilidade desse tipo de membrana. (PRAÇA, 2010).

Figura 8 – Fotografia da muda da pele de cobra *Boa constrictor* (arquivo pessoal).



Nunes et al., (2005) avaliaram a permeabilidade da indometacina através da pele de cobra *Boa constrictor* obtendo boa reprodutibilidade dos resultados, sugerindo, portanto, que esse tipo de biomembrana pode ser aplicado como modelo de estrato córneo para avaliação *in vitro* de permeação de fármacos.

3.3 Formas farmacêuticas tópicas: gel e emulsão

Duas classes de formas farmacêuticas são administradas na pele: as formas farmacêuticas tópicas, que tem ação local para o tratamento de doenças dermatológicas ou alívio dos sintomas a essas associadas e sem intenção de efeitos sistêmicos e os produtos transdérmicos, que possuem ação sistêmica, sendo o fármaco absorvido através da pele e distribuído na circulação sistêmica através da corrente sanguínea (SHAH, UEDA, 2006).

As formulações tópicas semi-sólidas, como pomadas, pastas e cremes, consistem em um fármaco incorporado a bases de caráter hidrofílico ou hidrofóbico (ANSEL et al., 2009). O veículo tem um importante papel na liberação do fármaco da formulação e não há veículo compatível com todos os insumos farmacêuticos ativos ou para todas as indicações terapêuticas (AULTON, 2005; ANSEL et al., 2009).

O veículo ideal para administração tópica deve possuir, além das características de biocompatibilidade e estabilidade química, física e microbiológica,

a capacidade de liberar facilmente o fármaco para o estrato córneo. Seu efeito sobre a disponibilidade de fármacos é provavelmente muito maior no fármaco a ser aplicado sobre a pele do que em qualquer outra via de administração (BRONAUGH, MAIABACH, 2001).

Os veículos mais frequentemente utilizados nas preparações de uso dermatológico são soluções, géis, pomadas, pastas e emulsões. Durante o desenvolvimento farmacotécnico de formulações tópicas é imprescindível considerar que a liberação do fármaco do veículo e a pele consiste em um equilíbrio dinâmico, onde os constituintes da formulação interagem entre si e irão interagir com a pele uma vez que o produto for aplicado (BRONAUGH, MAIABACH, 2001). Dessa forma, as possíveis interações entre fármaco, veículo e pele são:

- ✓ Veículo – Pele
- ✓ Veículo – Fármaco
- ✓ Fármaco – Pele
- ✓ Veículo – Fármaco – Pele

Além disso, características físico-químicas, como teor de ativo, pH, microscopia e reologia, para preparações semi-sólidas, devem ser avaliadas, assim como a velocidade de liberação do fármaco a partir do veículo e a penetração do mesmo na pele, pois esses são importantes parâmetros para que se possa prover o controle de qualidade das formulações sob aspecto biofarmacotécnico (SANTIS, 2008).

3.3.1 Géis

Os géis são sistemas semi-sólidos onde partículas inorgânicas ou moléculas orgânicas (polímeros) estão dispersas em um líquido mantendo uma rede entrelaçada que confere rigidez à estrutura (ANSEL et al., 2009; AULTON, 2005).

Os géis podem ser hidrofóbicos (oleogéis) ou hidrofílicos (hidrogéis). Os oleogéis são geralmente constituídos de parafina líquida com polietileno ou óleos gordurosos com sílica coloidal ou sabões de alumínio ou zinco (GENNARO, 2004). Os géis hidrofílicos têm sido muito usados em produtos cosméticos e como base dermatológica, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos hidrossolúveis e lipossomas (CÔRREA et al., 2005).

Os tipos de polímeros comumente empregados podem ser divididos em naturais, como as gomas adragante, carragenina, pectina, ágar e ácido algínico; semi-sintéticos, como metilcelulose, hidroxietilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e carboximetilcelulose e os polímeros sintéticos, como o álcool vinílico, povidona ou polivinilpirrolidona e o carbômero, principal agente gelificante usado em medicamentos e cosméticos. (AULTON, 2005; GENNARO, 2004; VILLANOVA, 2010).

Segundo CORRÊA et al. (2005), as características do polímero determina a natureza do gel em não-iônico e aniônico. Os géis não-iônicos são estáveis em ampla faixa de pH, podendo ser incorporadas substâncias de caráter ácido. Os géis de natureza aniônica são pH dependentes, isto é, estáveis em pH neutro ou próximo a neutralidade. O tipo de polímero também pode influenciar o comportamento reológico do gel, e, portanto pode interferir na estabilidade física da preparação e no seu comportamento sobre a pele (liberação do ativo e formação de filme na pele).

3.3.2 Emulsões

Emulsão é um sistema onde pelo menos um líquido está disperso em outro no qual é imiscível originando gotículas que variam entre 0,1 e 1,0 μm . As emulsões são termodinamicamente instáveis decorrentes do excesso de energia livre associado às superfícies das gotículas. A adição de agentes emulsionantes garante ao sistema um mínimo de estabilidade diminuindo o trabalho necessário para emulsificação (GENNARO, 2004; PRISTA et al., 2007).

As emulsões podem ser óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) dependendo do emulsificante utilizado e das quantidades relativas das fases líquidas. Quando se pretende retardar a liberação de um composto ativo pode-se fazer uso de emulsões múltiplas A/O/A ou O/A/O (GENNARO, 2004). De acordo com a viscosidade, as emulsões podem ser líquidas ou semi-sólidas. Essas são administradas por via oral, tópica ou parenteral, no entanto, as semi-sólidas são sempre tópicas (ANSEL et al., 2009).

3.4 Cidofovir

3.4.1 Aspectos Gerais

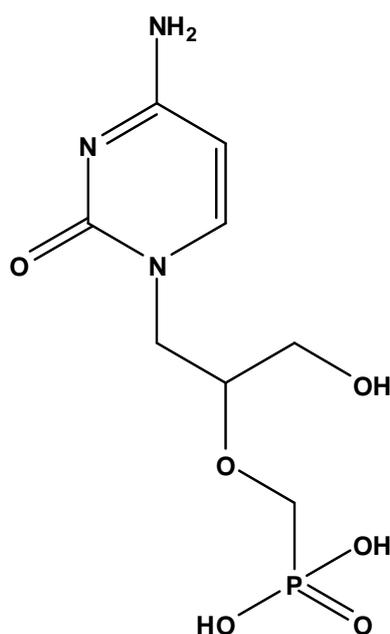
O cidofovir ((S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina) (HPMPC) é um fármaco pertencente à classe análogos nucleosídicos, sendo um análogo da desoxicidina monofosfato (Figura 9).

Os análogos nucleosídicos são análogos de nucleotídeo em que um grupamento fosfonado é ligado, através de uma ligação éter, a uma purina ou pirimidina através de uma cadeia alifática (DE JESUS, 2007). Dentre os nucleosídeos fosfonados que possuem atividades antivirais, estão o cidofovir, o adefovir e o tenofovir (DE CLERCQ, 2003).

O cidofovir possui um amplo espectro antiviral, agindo contra diferentes patógenos dentre eles o citomegalovirus, papillomavirus humano, herpes simplex vírus, varicella-zoster vírus, Epstein-barr vírus, human herpes vírus 6, 7, 8, poxvirus, poliomavirus e adenovirus (BONATTI et al., 2007).

Tem peso molecular $279,19 \text{ g mol}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$. Apresenta-se como um pó cristalino branco e funde-se a temperatura de 260°C (ZABAWSKI, 2000; THE INDEX MERCK, 2001).

Figura 9 - Estrutura química do cidofovir



A utilização clínica do cidofovir foi autorizada em 1996 pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de retinite por citomegalovírus em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida e está disponível na forma de solução para perfusão Vistide® (Gilead Sciences International) (DE CLERCQ, 2002, 2007).

3.4.2 Farmacodinâmica

Seu mecanismo de ação se dá através do metabolito ativo (difosfato de cidofovir) que age por inibição competitiva pelo substrato da enzima DNA polimerase que o vírus utiliza para se replicar. Ao contrário do aciclovir e ganciclovir, o cidofovir não precisa passar pela etapa inicial de fosforilação para ser ativada, reação essa catalisada pela enzima timidina cinase codificada pelo vírus (CUNDY et al., 1997). No mais, como um mecanismo adicional ou alternativo, esse fármaco pode ainda inibir a proliferação de células infectadas pelo HPV induzindo a apoptose e sua ação prolongada deve-se ao longo tempo de meia-vida de seus metabólitos ativos favorecendo uma melhor adaptação posológica através de doses menos frequentes (DE CLERCQ, 2003).

3.4.3 Farmacocinética

A absorção do cidofovir é lenta e ocorre por endocitose de fase fluída (ALDERN et al., 2003). Após administração oral (V.O), subcutânea (S.C) e intravenosa (I.V) do cidofovir, foi verificada uma biodisponibilidade menor que 5,3% para V.O comparada com a I.V na concentração de 10mg/kg, sendo considerada muito baixa em virtude da pouca permeabilidade do grupo fosfonato na mucosa intestinal. A administração S.C apresentou uma biodisponibilidade de 98,5% quando comparada com a via I.V, sendo a dosagem máxima tolerada de 3mg/kg. Maiores concentrações provocam dor local e fibrose transitória (WACHSMAN et al., 1996).

Estudo realizado por Herra & Barquero (2001) demonstrou que a administração de uma dose única de cidofovir (3-5 mg/kg I.V.) leva ao pico de concentrações plasmáticas de 7,3-11,5 mg / L e que 80% do fármaco é excretado inalterado na urina dentro de 24 horas, com uma vida média de 2,4 a 3,2 horas. No entanto, o difosfato de cidofovir é eliminado mais lentamente e tem uma meia-vida

intracelular de 24 à 65 horas, permitindo que o medicamento seja administrado a cada duas semanas.

3.4.4 Efeitos adversos

O efeito adverso mais pronunciado provocado pelo cidofovir foi a nefrotoxicidade (relatado também por Jacobsen & Sifontis (2010), em 25,6% dos pacientes submetidos a transplante de células-tronco), fortemente relacionado à sua ação sistêmica, sendo observado em apenas um único caso relacionado às aplicações intralesionais e tópicas (JACOBSEN & SIFONTIS, 2010; MATTELLI, 2001; WACHSMAN et al., 1996; ZABAWSKI, 2000). Nessas, por sua vez, podem ocorrer eventuais vermelhidão, ardor e dor local que geralmente desaparecem durante o período de descanso inserido nos ciclos de tratamento tópico (DE CLERCQ, 2003). Entretanto essa toxicidade pode ser amenizada com a concomitante administração de probenecida, um conhecido bloqueador da secreção tubular de moléculas de fármacos ácidos (CUNDY et al., 1999).

Diante dos efeitos adversos sistêmicos, deve-se ter cautela em relação à sua administração endovenosa, visto que a nefrotoxicidade cumulativa ocasionada pelo fármaco é dose-limitante (JACOBSEN & SIFONTIS, 2010). Outro evento adverso relatado foi o desenvolvimento de displasia durante tratamento de papilomatose respiratória recorrente (RRP). No entanto, não foi comprovado o potencial carcinogênico do fármaco, visto que o índice de desenvolvimento de degenerações malignas espontâneas encontrou-se entre 2-3% (BROEKEMA & DIKKERS, 2008).

Mesmo diante dos relatos relacionados à nefrotoxicidade provocada pelo uso do cidofovir, em estudo publicado por Brardi et al., (2009) avaliando a utilização do mesmo por via intravenosa em crianças e adolescentes portadoras de adenovírus, foi demonstrado ser o cidofovir um fármaco seguro e bem tolerado, visto que dos vinte e três pacientes participantes deste estudo, apenas dois apresentaram nefrotoxicidade cumulativa e nenhum necessitou de terapia renal substituída.

Estudo pré-clínico realizado por Duan e colaboradores (2002) demonstrou que a aplicação tópica de solução do cidofovir 1% inibiu ou preveniu o desenvolvimento de papilomas, quando aplicado em coelhos inoculados com papilloma vírus. Já de acordo com Cundy et al., (1997), a adição de 10% de propilenoglicol ao gel de hidroxietilcelulose contendo 1% do ativo facilitou a

permeação do cidofovir na pele de coelhos, sendo uma importante informação para o desenvolvimento e padronização de formulação para uso tópico.

Em relação aos efeitos colaterais, a Agência Europeia de Medicamentos não recomenda a utilização em mulheres grávidas, pela evidência de efeitos embriotóxicos em estudos realizados em coelhos e ratos (EMEA, 2011).

3.4.5 Avaliação clínica

Diversos estudos clínicos foram publicados relatando a eficácia do cidofovir frente a diversas infecções virais. Capaccio et al., (2009) avaliaram a utilização intralesional do cidofovir 0,5% após excisão cirúrgica de lesões papilomatosas nasais recorrentes em paciente HIV+ e Hepatitis C vírus+ verificando que não houve recidivas após 30 meses do último tratamento. Stragier et al., (2002) relataram quatro casos de pacientes submetidos à terapia com cidofovir (creme a 1% ou injeção intralesional de 2,5 mg/mL) para o tratamento de lesões induzidas por HPV, resultando na regressão ou desaparecimento das lesões em três casos. Bjorandi et al., (2002), utilizaram o cidofovir na forma de infusão em uma paciente submetida a transplante renal, imunodeprimida com infecção por polyomavirus (BKvírus), nas concentrações de 0,25 mg/kg e 0,45 mg/kg em solução salina e diminuição da imunossupressão, sendo verificado que após quatro meses de tratamento houve ausência do vírus no sangue e queda na carga viral encontrada na urina. Em adição as infecções virais, foi relatada ainda, a eficácia do cidofovir no tratamento de *Molluscum contagiosum* em crianças HIV+ após a administração tópica do cidofovir 3%. Após dois meses de tratamento estas lesões estavam curadas e não apresentaram recidivas após 18 e 21 meses do término do tratamento (TORO et al., 2000) .

A eficácia clínica da aplicação tópica do cidofovir em pacientes portadores de HPV por ser constatada em trabalhos citados na Tabela 2. No Brasil, não existe referência sobre sua utilização tópica. No entanto, ressalta-se que Pontes et al., (2009), realizaram estudo mediante a injeção local do cidofovir (intralesional após remoção das lesões) no tratamento de papilomatose laríngea recorrente em crianças.

Tabela 2 - Estudos clínicos utilizando cidofovir tópico para o tratamento de pacientes portadores do HPV

(continua)

AUTORES ANO LOCAL	ESTUDO REALIZADO	FORMA FARMACÊUTICA/ POSOLOGIA	EFEITOS ADVERSOS	RESULTADOS/ REINCIDÊNCIA/ OBSERVAÇÕES
Muñoz, R.M. et.al, 2010/ Espanha (11)	Estudo de caso: Tratamento de lesões por papilomavírus em paciente imunodeprimida.	Gel 1% Realizados 24 ciclos de duas semanas cada, com aplicação nos 5 primeiros dias e descanso nos 9 dias subsequentes.	Dor durante o primeiro ciclo.	Redução das lesões iniciais para 3,3% na mão esquerda e 1,5% na mão direita ao final dos ciclos.
Mariño, A.Trancoso. et al., 2007/ Espanha (12)	Estudo de caso: Tratamento de lesões verrucosas nos pés por HPV em mulher transplantada.	Pomada 3% (Base Beeler) Aplicação durante dez semanas, sendo 2x ao dia em aplicações alternadas com vaselina salicilada.	Irritação local e ulcerações.	O tratamento foi suspenso devido aos EA. Uso de ácido salicílico pode ter contribuído.
Capaccio, P. et al., 2009/ Itália (13)	Estudo de caso: Tratamento de papilomatose escamosa nasal em paciente HIV positivo	Injeção local 0,5% Realizada a aplicação com anestesia, após excisão da lesão.	Não observados	Não houve recidivas até 30 meses após o último tratamento.
Tristam, A. et al., 2005/ Inglaterra (16)	Estudo clínico 12 mulheres com Neoplasia intraepitelial anogenital.	Pomada 1%	Ulcerações sem efeitos visíveis nas proximidades da lesão.	Total de 4 mulheres apresentaram completa regressão, 5 resposta parcial, 2 sem resposta e 1 mulher apresentou uma evolução do caso.
Stragier, I. et al., 2002/ Bélgica (17)	Lesões de pele por HPV	Caso - Condiloma perivulvar e perianal. Creme 1% 1 vez ao dia por 3 semanas e descanso de 10 dias.	Não citado	Após reincidência, outro ciclo foi feito e não apresentou recidivas após 25 meses.

Tabela 2 - Estudos clínicos utilizando cidofovir tópico para o tratamento de pacientes portadores do HPV

(conclusão)

AUTORES ANO LOCAL	ESTUDO REALIZADO	FORMA FARMACÊUTICA/ POSOLOGIA	EFEITOS ADVERSOS	RESULTADOS/ REINCIDÊNCIA/ OBSERVAÇÕES
Geerinck, K et al., 2001/ Bélgica (14)	Estudo de caso: Tratamento de dermatite pustular contagiosa na mão esquerda de paciente imunocomprometido.	Creme 1% (base Beeler) Utilização uma vez ao dia por 5 dias consecutivos e cinco dias de descanso (5 ciclos).	Não citado	Houve recorrência após 2 meses, sendo realizado um novo tratamento de dois ciclos de 9 dias. Após 1 ano, não houve recorrência.
Bonatti, H. et al, 2007/ Áustria e Bélgica.(15)	Tratamento de papilomavirus associado a lesões de pele em pacientes transplantados.	Caso 1-condiloma anal-Injeção intralesional e manutenção com gel durante 3 meses. Caso 2-Condiloma uretral- Injeção intralesional (4 aplicações) e imunossupresão com rapamicyna. Caso 3-Condiloma vaginal, vulvar e anal- Injeção intralesional (4 aplicações) e imunossupresão com rapamicina. Caso4 - Verrugas vulgares nas mãos, pés e nariz - Pomada e injeção local.	Não citado	Caso 1-Recorrência após 1 ano, sendo tratado com remoção cirúrgica e imiquimod. Caso 2- Após 24 meses não houve recorrência. Caso 3- Após 4 meses houve recorrência apresentando PAP IV. Usou novamente a aplicação e após 6 meses mudança no padrão de PAP IV para PAP II. Caso 4- Redução de verrugas com a modificação do imunossupressor.

Uma característica comum aos estudos tópicos e trabalhos relatados é a utilização do cidofovir incorporado a preparações extemporâneas, manipuladas na farmacotécnica hospitalar, sem registro de padronização e ensaios de controle de qualidade.

O desenvolvimento de uma formulação tópica de cidofovir pode melhorar a eficácia do tratamento, desde que se promova a passagem do fármaco através do estrato córneo da pele lesionada e que o mesmo permaneça retido na camada basal da epiderme, local de tropismo do HPV. Além disso, a estabilidade, segurança e eficácia do produto são parâmetros imprescindíveis para se obter um medicamento que responda ao tratamento dos condilomas.

3.5 Referências Bibliográficas

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr, L. V. **Formas Farmacêuticas: e sistema de liberação de fármacos**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 776p.

AULTON, M.E. **Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

ANTUNES, A.A.; LYRA, R.; CALADO, A.A. et al. Prevalence of Koilocytosis in Penile Biopsies of Partners of Women with HPV-Induced Genital Lesions. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, nº 7, p. 557-562. 2004.

BALDEZ DA SILVA, M.F.P.T.; CHAGAS, B.S.; GUIMARÃES, V. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Researchs**, v.8, n.4, p. 1437-1443, 2009.

BABY, A.R. Avaliação in vitro da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas. 2007. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D. et al. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, n. 2, p.233-248, 2008.

BARZOTTO, I. L. M.; OLIVEIRA, S. M. M.; TAVARES, B.; DALLABRIDA, S. Estabilidade de emulsões frente a diferentes técnicas de homogeneização e resfriamento. **Visão Acadêmica**, v.10, n. 2, Jul/Dez, 2009.

BELLO, F.A.; ENABOR, O.O.; ADEWOLE, I.F. Human Papilloma Virus Vaccination for Control of Cervical Cancer: A Challenge for Developing Countries. **African Journal of Reproductive Health**, v.15, n.1, p. 25, 2011.

BONACUCINA, G.; CESPI, M.; MISICI-FALZI, M.; PALMIERI, G.F. Rheological Evaluation of Silicon/Carbopol Hydrophilic Gel Systems as a Vehicle for Delivery of Water Insoluble Drugs. **The AAPS Journal**, v. 10, n. 1, p.84-91, 2008.

BOROJEVIC, R. & SERRICELA, P. Próteses Vivas de Pele Humana. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 16-18, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327>. Acessado em 25/04/2011a.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER – INCA. Ministério da Saúde. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Acessado em 20/11/2011b.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER – INCA. Ministério da Saúde. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterо/definicao. Acessado em 13/03/2012.

BRONAUGH, R. L. MAIABACH, H. I. **Topical absorption of dermatological products**. Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc. 2001, 539 p.

CÂMARA, G. N. N. L.; CRUZ, M. R.; VERAS, V. S.; MARTINS, C. R. F. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. **Universitas: Ciências de Saúde**, n. 1, p. 149-158, 2003.

CARVALHO, A. L. M. Cinética de difusão in vitro e atividade in vivo de preparações magistrais de cetoprofeno. 2007, 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Recife, 2007.

CASTRO, T. M. P. G.; NETO, C. E. R.; SCALA, K. A.; SCALA, W.A Manifestações orais associadas ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 546-550, 2004.

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

CORRÊA, N.M.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n.1, p.73-78, 2005.

DAL'BELO, S.E. **Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de chá verde e *Ginkgo biloba***. 2008,192 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

DE CLERCQ, E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. **Antiviral Research**, v. 55, p. 1-13, 2002.

DE CLERCQ, E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. **Antiviral Research**, v. 75, p. 1-13, 2007.

DERCHAIN, S.F.M.; SARIAN, L.O.Z. Vacinas profiláticas para o HPV. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.6, p.281-284, 2007.

ELEUTÉRIO, R. M. N.; ELEUTÉRIO JÚNIOR, J.; JACYNTHO, C. M. A.; FREITAS, J. R. Frequência de HPV genital em adolescentes com citologia e colposcopia normais. **Revista Brasileira de Genitoscopia**, v. 3, n. 3-4, p. 72-75, jan-jun, 2009.

FRACARO, A.M.M.; SILVA, D.R.A.; MORIOKA, R.H. et al. Transformação maligna de condiloma acuminado gigante em dois transplantados renais. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 25, p.160-164, 2003.

FRIDMAN, F. Z, PESSIM, S. A. Tratamento da neoplasia intraepithelial vulvar com imiquimode. **Revista Brasileira de Genitoscopia**, v. 3, p. 84-87, 2009.

GENNARO, A. R. **Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia**. 20ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1022 p.

GUPTA, S.K.; SINGH, A.; SRIVASTAVA, M.; GUPTA, S.K.; AKHOON, B. A. In silico DNA vaccine designing against human papillomavirus (HPV) causing cervical cancer. **Vaccine**, n.28, p.120–131, 2010.

GUO, J. H. Carbopol polymers for pharmaceutical drug delivery. *Drug development e delivery*, v. 3, n. 6, 2006. Disponível em <<http://www.drugdeliverytech.com/ME2/dirmod.asp?sid=&nm=&type=Publishing&mod=Publications%3A%3AArticle&mid=8F3A7027421841978F18BE895F87F791&tier=4&id=C691909D749749438ABEF792F1A24A69>>. Acessado em 17 de Janeiro de 2012.

HARRIS, M. I. N.C. **Pele – Estrutura, Propriedades e Envelhecimento**. 2ª Ed. São Paulo: Senac SP, 2009, 166p.

ISOLAN, T.B.; ALMEIDA FILHO, G.L.; PASSOS, M.R.L.; BRAVO, R.S. Estudo comparativo de diferentes formas de tratamento de condilomas acuminados. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.16, n.2, p.23-27, 2004.

LACEY, J.N.C. Genital warts and anogenital papillomavirus disease. **Medicine**, v.38, n.6, p. 271-275, 2011.

LACEY, J.N.C.; GARNETT, G. P. Promising control of genital warts: but is elimination possible? **The Lancet Infectious Diseases**, v.11, 2011. Disponível em <[http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(10\)70297-8/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(10)70297-8/fulltext)>.

LIRA, A. A. M.; SESTER, E. A.; ABREU, L. R.; SILVA, L. B. L.; WANDERLEY, A. G.; SANTANA, D. P. Desenvolvimento preliminar de gel de lapachol: estudo de permeação in vitro. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 1, p. 35-41, 2004.

LIRA, A. A. M. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação de sistemas microestruturados para veiculação de ácido retinóico na pele**. 2007, 142f. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

MAIA CAMPOS, P. M. B. G.; MERCÚRIO, D. G. Farmacologia e pele. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, p. 15-21, 2009.

MADDEN, K.; NAN, X.; BRIONES, R.; WARKS, L. Sorting through search results: A content analysis of HPV vaccine information online. **Vaccine**, doi: 10.1016/j.vaccine.2011.10.025, 2011.

MARTINS, M.R. & VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.

NADAL, S.R.; MANZIONE, C.R.; HORTA, S.H.C.; CALORE, E.E. Sistematização do Atendimento dos Portadores de Infecção Perianal pelo Papilomavirus Humano (HPV). **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v.24, n.4, p.322-328, 2008.

NETZ, P. A. & ORTEGA, G. G. Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. Sistemas dispersos. 1ed. Ed. Artmed. 2002. p. 265-289.

NICOLAU, S. M. **Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento**. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina, 2002.

NOGUERES, I. B.; ZIMMERMANN, J. B.; GONÇALVES, L. G. et al. Associação entre a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e outras infecções genitais femininas. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 36, n. 1, p. 19-28, jan./mar., 2010.

NUNES, R.S.; AZEVEDO, J. R.; VASCONCELOS, A. P.; PEREIRA, N. L. Estudo de padronização da pele de cobra espécie - Boa constrictor - como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos. **Scientia Plena**, v.1, n.7, p.171-175, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, OMS. Preparing for the introduction of HPV vaccines. Disponível em: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/cancers/RHR_06.11/en/index.html> Acessado em 11/04/2011.

PASSOS, M.R.L.; FRIAS, M.C.A.A.; AGUIAR, C.B. et al. Condilomas acuminados extragenital. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.14, n.1, p. 54-57, 2002.

PHELPS, W.C.; ALEXANDER, K.A. Antiviral therapy for human papillomavirus: rationale and prospects. **Ann Intern Med**, v.123, p.168-182, 1995.

PINCINATO, A.L.; HORTA, S.H.C.; RAMACCIOTTI FILHO, P.R., FORMIGA, G.J.S. Recurrence of HPV Lesions after Surgical Treatment in HIV-Positive Patients. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 29, n. 2, p.169-173, 2009.

PRAÇA, F.S.G. **Liberação e permeação *in vitro* de produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais**. 2010, 84f. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 7. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2007.

QUEIROZ, M.B.R. **Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de matricaria (L.) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada**

com gel de diclofenaco sódico. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

ROCHA, C.L.J.V. Histofisiologia e Classificação das Queimaduras: Consequências Locais e Sistêmicas das Perdas Teciduais em Pacientes Queimados. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 3, p. 140 - 147, 2009.

ROSENBLATT, C.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G.; PINNOTTI, J.A.; ARAP, S. Papilomavírus humano em homens – “triar ou não triar” – Uma Revisão. **Einstein**, v. 2, n.3, p. 212-6, 2004.

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea in vitro do ácido kójico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.2, p.195-203, 2007.

SANTIS, A.K. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo Nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica.** 2008, 156f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UFRJ, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro, 2008.

SHAH, V. P.; UEDA, C. T. USP advisory panel on the *USP* performance test for topical and transdermal dosage forms. *Pharmaceutical Forum*, v. 32, n. 5, p. 1584-1585, set/out., 2006.

SILVA, J.A. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de Diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados.** 2008. Tese de doutorado, Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R.; DAMASCENO, B.P.G.L.; MEDEIROS, A.C.D. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31. n3, p.125-131, 2010.

SIMOES, C.B. Vacinas contra o HPV: Uma visão crítica. **Diagn Tratamento**, v.15, n.2, p.92-5, 2010.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; CRUZ, A.D. The Human papillomavirus: a factor related with the formation of neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.2, p.155-160, 2005.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, v. 109, p. S15–S21, 2008.

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, v. 117, p. S5-S10, 2010.

STORPIRTIS S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

TANCREDI, A. R. C. **Estudo clínico, epidemiológico, histológico de papilomas da mucosa oral e sua relação com o papilomavírus humano (HPV) através das técnicas de hibridização *in situ* e PCR.** 2007,13 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

TEJERA-VAQUERIZO, A.; BOSCH-GARCÍA, R.J.; FERNÁNDEZ-ORLAND A.; HERRERA-CEBALLOS, E. Resolución de condilomas acuminados recalcitrantes en un paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana tratado con cidofovir tópico. **Actas Dermosifiliogr.**, v.99, p.157-69, 2008.

THULER, L.S.C. Mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil. **Revista Brasileira Ginecologia e Obstetricia**, v.30, n.5, p. 216-218, 2008.

TOSATO, M. G. **Análise dos constituintes da pele humana sob efeito dos cosmecêuticos por espectroscopia Raman.** 2010, 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade do vale da Paraíba, São Paulo, São José dos Campos, 2010.

TROTTIER, H.; FRANCO, E.L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**, v. 24, n.S1, p. S1/4–S1/15, 2006.

VILLANOVA, J. C. O. ORÉFICE, R, L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de polímeros. **Polímeros**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

XAVIER, S.D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; CARVALHO, J.M. et al. Frequence of Appearance of Human Papillomavirus (HPV) in Oral Mucosa of Men with Anogenital HPV by a Molecular Technique. **International Archives Otorhinolaryngology**, v.11, n.1, p. 36-44, 2007.

ZAMPIERI, A.L.T.C. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea da isoflavona genisteína em nanocápsulas poliméricas.** 2009,124 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade de Goiás, Goiânia, 2009.

Capítulo II
***Caracterização Físico-
Química do Cidofovir***

CAPITULO II

4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CIDOFOVIR

Elayne Karine Souto de Melo^{1*}, Noely Camila Tavares Cavalcanti¹, Karoline Belem Seixas¹, Leila Bastos Leal¹ e Davi Pereira de Santana¹

1 - Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Núcleo de Desenvolvimento farmacêutico e Cosmético – NUDFAC, Avenida Professor Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Cep: 50740-521, Recife- PE, Brasil.

*Autor correspondente: Elayne Karine Souto de Melo. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Núcleo de Desenvolvimento farmacêutico e Cosmético – NUDFAC, Avenida Professor Artur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Cep: 50740-521, Recife- PE, Brasil.

Fone: + 55 (81) 3302.6594 Ramal 23 Fone/Fax: + 55 (81) 3302.6590

Email: karine.melo@nudfac.com.br

Resumo: O cidofovir (CDV) é um fármaco antiviral pertencente a classe dos análogos nucleosídicos com amplo espectro DNA-vírus. Tendo em vista o desenvolvimento de preparações tópicas à base do CDV para o tratamento de lesões condilomatosas provocadas pelo papilomavírus humano (HPV), faz-se necessário o conhecimento de suas características térmicas e físico-químicas. Foram realizados ensaios de teste de teor, fusão, infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , difração de raios-x, microscopia eletrônica de varredura, caracterização térmica, teor de umidade e estudo de solubilidade. Diante dos resultados obtidos, o lote de CDV, teve sua identidade caracterizada por Infravermelho e RMN ^1H e ^{13}C , apresentou teor de 102,13% e faixa de fusão entre 265 ° e 266 °C. Nas técnicas como DRX e MEV foi verificado o comportamento cristalino e a através da avaliação da umidade por análise térmica e titulometria por Karl Fischer, foi constatada uma elevada higroscopicidade. A solubilidade aquosa do fármaco é pH-dependente e foi avaliada considerando o pH fisiológico e a faixa de pH (6,0 - 8,0) no qual o fármaco exprime os múltiplos sítios de protonação e torna-se mais solúvel. Dessa forma, a caracterização foi importante para obtenção de informações úteis sobre as características físico-químicas do CDV, visto que algumas especificações não descritas em literaturas oficiais foram definidas,

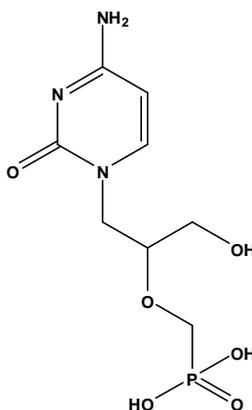
possibilitando então, uma padronização do IFA e a avaliação da qualidade do fármaco a ser utilizada no desenvolvimento de preparações de uso tópico.

4.1 Introdução

O cidofovir – CDV - ((S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)-citosina) (Figura 1) é um fármaco análogo nucleosídeo, com peso molecular de 279,19 g mol⁻¹ e fórmula molecular C₈H₁₄N₃O₆P. É um pó cristalino branco, com elevada solubilidade aquosa em pH 6,0 a 8,0 e coeficiente de partição (log P) igual a 3,3 (GILEAD SCIENCES, 2000; THE INDEX MERCK, 2001).

Apresenta amplo espectro de ação contra herpesvírus, adenovirus, polyomavirus, poxvirus e papilomavírus humano. Em 1996, a *Food and Drug Administration* (FDA) autorizou o uso do CDV para o tratamento de retinite por citomegalovírus em pacientes portadores de HIV, entretanto, também vem sendo utilizado extra-oficialmente (“*off-label*”) no tratamento de infecções contra os DNA virus, incluindo herpes e papilomavírus humano (DE CLERCQ, 2007, ANDREI & SNOECK, 2010).

Figura 1- Estrutura química do Cidofovir



O Vistide®, da empresa Gilead Sciences, é o medicamento de referência no mercado, na forma farmacêutica solução aquosa hipertônica para uso como infusão intravenosa na concentração de 7,5 mg/mL, sendo a via de administração intravenosa, a única utilizada atualmente.

Levando-se em consideração a necessidade de padronização dos IFAs para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica segura e eficaz, a proposta deste estudo de caracterização físico química torna-se bastante relevante. Principalmente,

por não haver descrições do CDV nos compêndios oficiais como a Farmacopéia Brasileira, Americana, Mexicana e ainda, ausência de referências em bancos de dados científicos relacionados às suas características, excetuando-se o Index Merck (2001) que dispõe de algumas informações. Diante disto, o objetivo deste trabalho é reunir técnicas que possibilitem o fornecimento de informações a respeito das características físico-químicas e térmicas do fármaco como parte do estudo de pré-formulação de preparações de uso tópico para o tratamento de verrugas genitais causadas pelo HPV.

4.2 Materiais e métodos

Insumo farmacêutico ativo (IFA) Cidofovir adquirido da Boyle Chem Co., Ltd., lote: BC20100625 (100,08%). Todos os solventes e reagentes utilizados nos ensaios foram de grau analítico e as vidrarias previamente calibradas, sendo os testes abaixo descritos, realizados em três réplicas.

4.2.1 Teste de Teor por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de Ultravioleta (CLAE–UV) e validação

Para avaliação do teor, diluições a partir de uma solução mãe em meio aquoso 100 µg/mL foram analisadas utilizando uma curva de calibração com concentrações que variaram 0,1 a 5 µg/mL.

As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu com controlador SCL-10, auto Injetor SIL-10AD, bomba LC-10AD, UV-VIS Detector SPD-10AV e forno - CTO-10, com fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico 3,5mM com fosfato de tetrabutilamônio 1,5 mM/acetonitrila (97:3 v/v), pH 6,0; isocrático, bombeada sob fluxo de 1,0 mL/min, com coluna Phenomenex Luna 5 µm C18, 100 A, 250 x 4,6 mm, volume de injeção de 20 µL e detecção por ultravioleta em comprimento de 274 nm, com tempo de análise de 25 minutos. Este método foi adaptado de SANTOYO, 2002. A metodologia foi validada segundo RE nº 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003), onde a linearidade do método foi verificada no intervalo de concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 µg/mL, sendo a concentração de 1,0 µg/mL equivalente a 100% de concentração teórica.

4.2.2 Faixa de Fusão

A faixa de fusão foi observado em equipamento Fusiômetro 430 D segundo o método geral da F. BRAS IV (1988) e através de Análise Térmica Diferencial (DTA).

4.2.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho foi realizada em Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier da marca Bruker, modelo IFS66 utilizando pastilha de KBr e o espectro traçado na faixa de 4500 cm^{-1} a 400 cm^{-1} (LIMA LEITE, 2007).

4.2.4 Ressonância Magnética Nuclear

As ressonâncias magnéticas nucleares protônicas (RMN¹H, 399.74 MHz) e de carbono 13 (RMN¹³C, 100.51 MHz) foram realizadas em Espectrômetro Varian®, modelo Unity plus-400 MHz, as amostras foram dissolvidas com Água deuterada (D₂O) (LIMA LEITE, 2007).

4.2.5 Perfil difratométrico

Os difratogramas de raios X foram obtidos através do equipamento difratômetro Siemens, modelo D5000 operando com corrente de 40 mA, sob tensão de 40 kV, com intervalo de análise entre 5° a 50° (2θ), com $0,05^\circ$ por passo e um tempo de 5 segundos por passo (CARINI, 2009).

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliação dos cristais, as amostras foram inicialmente recobertas com ouro (25 nm) durante 2,5 minutos em Metalizador Quick Coater, modelo SC701, Sanyu Electron. Em seguida as fotomicrografias foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) através de microscópio Shimadzu SS-550, operado com voltagem 15 KV, distância de trabalho (WD) de 16 mm e magnificação de 60, 120 e 200 vezes (USP, 2007).

4.2.7 Caracterização térmica

A caracterização térmica do cidofovir foi realizada através das análises de termogravimétrica (TG) e análise térmica diferencial (DTA).

As análises de TG e DTA foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu TGA Q60 utilizando cerca de 2mg, acondicionados em cadinho de platina fechado, numa atmosfera com fluxo de nitrogênio a 50 mL/min. A faixa de temperatura foi de 30 a 600 °C com razão de aquecimento de 10°C/min. Antes dos ensaios, o equipamento foi calibrado empregando-se amostras de alumínio e zinco (AULTON, 2005).

4.2.8 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado através de Titulometria por Karl Fischer, seguindo método da F. BRAS IV (1988), por Termogravimetria (TG/DTG) e também através de balança Mettler Toledo HB 43 com aquecimento por halogêneo.

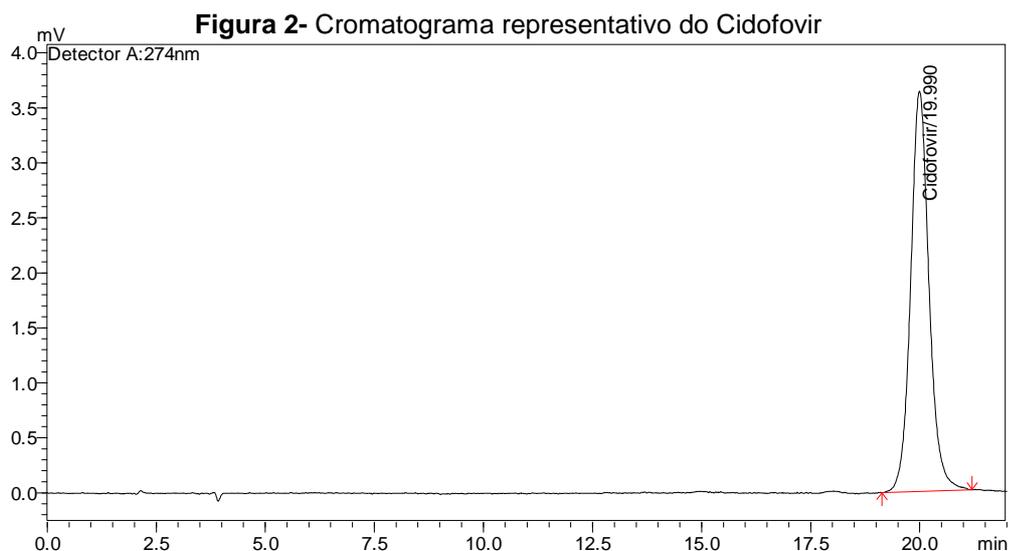
4.2.9 Estudo de Solubilidade

Para o estudo de solubilidade, um excesso do CDV foi adicionado em 10 mL de água purificada pH 7,4. As amostras de fármaco foram previamente submetidas a banho de ultrassom por 5 minutos e mantidas sob agitação magnética vigorosa a 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 16 horas. Em seguida, uma alíquota de 1,00 mL foi retirada do sobrenadante, diluída (1:1000) com água purificada e filtrada (0,45 μm). O doseamento foi realizado por metodologia de CLAE-UV a 274 nm.

4.3 Resultados

4.3.1 Teste de Teor por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção de Ultravioleta (CLAE –UV) e validação

O lote do IFA CDV avaliado frente ao padrão cidofovir Sigma-Aldrich apresentou teor de 102,13% ($\pm 2,32\%$) doseado por CLAE-UV. O CDV apresentou pico de absorção máxima a 274 nm, conforme também verificado por Santoyo, 2002 (Figura 2).



Os resultados dos parâmetros de validação que foram avaliados seguem abaixo:

Linearidade

Os valores obtidos para avaliação da linearidade do método (Tabela 1) foram tratados estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a equação da reta $y = 1,1118 (\pm 0,0019)x - 0,0987 (\pm 0,0033)$ (Figura 3). A análise de regressão linear demonstrou um coeficiente de correlação de 0,9988, apresentando um valor muito próximo da unidade e dentro do critério mínimo aceitável descrito na legislação vigente ($r = 0,99$), demonstrando que há correlação linear entre a quantidade teórica do fármaco presente na amostra (variável independente) (x) e a determinada experimentalmente (variável dependente) (y).

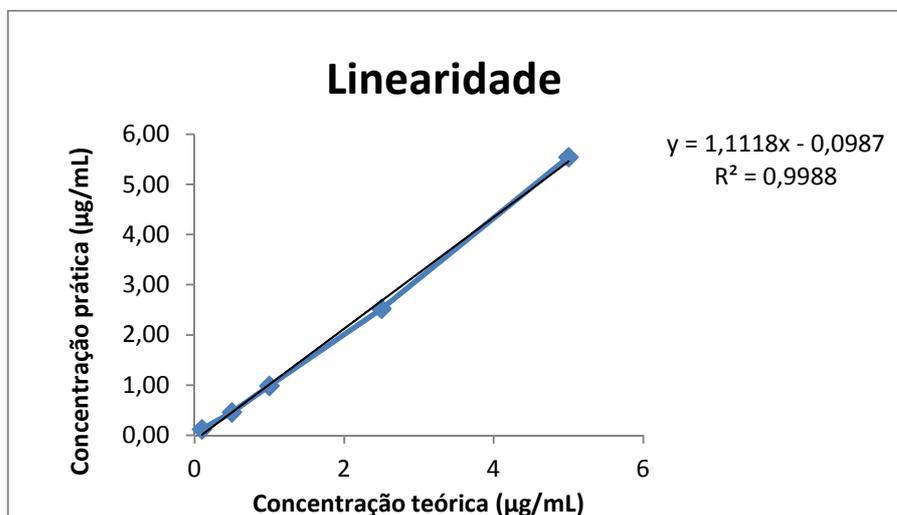
Sendo o F calculado ($4,36 \times 10^{-5}$) menor do que F tabelado (3,88), considera-se que não há diferenças estatisticamente significativas, no nível de 95% de confiança, entre as 3 curvas de calibração (Tabela 2).

Tabela 1 – Resultados da Linearidade – 3 curvas autênticas.

Concentração teórica de Cidofovir	Concentração prática de Cidofovir			Média das curvas (µgm/L)	CV (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3		
0.1	0,1195	0,1204	0,1155	0,1185	2,16
0.5	0,4575	0,4528	0,4569	0,4558	1,67
1	0,9877	0,9906	0,9761	0,9848	4,53
2.5	2,4916	2,5107	2,5692	2,5205	0,15
5	5,5454	5,5264	5,5415	5,5441	0,07

Tabela 2 – Resultados da Análise de Variância para Linearidade.

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,000431	2	0,000215	4,36E-05	0,999956	3,88529
Dentro dos grupos	59,28065	12	4,940054			
Total	59,28108	14				

Figura 3 – Curva da Regressão Linear obtida da média de três curvas de calibração autênticas.

Robustez

Os resultados da análise da robustez do método verificada em relação a temperatura e fluxo, utilizados nas condições cromatográficas estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados do teste de robustez para os parâmetros avaliados: temperatura e fluxo.

Parâmetros	Concentração (µg/mL)			Média	C.V. (%)
	A1	A2	A3		
Temperatura (40°C)	1,002	1,000	1,002	1,001	0,091
Temperatura (39°C)	1,002	0,998	0,997	0,999	0,266
Fluxo 0,9 mL/min	1,003	1,004	1,002	1,002	0,266
Fluxo 1 mL/min	1,004	1,005	1,004	1,004	0,049

Os resultados obtidos para verificação do parâmetro robustez foram tratados estaticamente pelo método *t* de *Student* para avaliar se havia diferença entre os valores médios obtidos. Conforme Tabela 4, o valor de *t* calculado apresentou-se inferior ao *t* crítico, demonstrando que não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados analíticos verificados nos parâmetros temperatura e fluxo, com 95% de confiança, indicando, portanto, que o método é robusto.

Tabela 4 – Teste *t* de *Student* – Robustez

	T calculado	T crítico
Temperatura	1,50	2,13
Fluxo	1,63	2,13

Precisão – Repetitividade

Foram preparadas amostras em sextuplicatas, equivalente a 1,0 µg/mL de Cidofovir (100% da concentração teórica). A verificação da repetitividade do método foi realizada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV) e os resultados obtidos estão agrupados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos no teste de repetitividade

Concentração 1,0 µg/mL de Cidofovir						Média	CV (%)
A1	A2	A3	A4	A5	A6		
1,08	1,00	1,07	1,10	1,11	1,06	1,05	4,13

Precisão Intermediária

Foi realizada em diferentes dias, com dois analistas, através da análise das amostras em triplicata equivalentes a 1,0 µg/mL de Cidofovir (100% da concentração teórica), estando os resultados agrupados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados da precisão intermediária em dias diferentes com dois analistas.

	Concentração			Média	CV (%)
	A1	A2	A3		
Dia 1/Analista 1	1,08	1,07	1,07	1,07	0,86
Dia 1/Analista 2	1,04	1,06	1,03	1,04	1,73
Dia 2/ Analista 1	0,97	1,04	0,99	1,00	3,79
Dia 2/Analista 2	1,06	1,07	1,06	1,06	0,26

Para verificação estatística dos resultados obtidos aplicou-se o teste comparativo de ANOVA nas análises entre dias e analistas, conforme Tabela 7.

Tabela 7 – Resultado da Análise de variância para Precisão intermediária

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,00135	2	0,000675	0,535242	0,603066	4,25649
Dentro dos grupos	0,01135	9	0,001261			
Total	0,0127	11				

O método apresentou-se preciso nos dois níveis analisados. Na repetitividade (Tabela 5), as seis amostras autênticas com concentração de 100%, apresentaram coeficiente de variação (CV) inferior a 5% para o fármaco em estudo, atendendo ao exigido pela RE 899/2003, que descreve este como valor máximo de variação permitido. Para a precisão intermediária, testada entre dias e analistas diferentes, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre analistas e dias, empregando-se Análise de variância visto que o *F* calculado foi inferior ao *F* crítico, com 95% de confiança (Tabela 7).

Exatidão

Para avaliar a exatidão do método, amostras em triplicata nas concentrações equivalentes a 50, 100 e 150% da concentração teórica analisada do fármaco, foram

testadas, as quais corresponderam à concentração mínima, média e máxima, respectivamente. Os resultados da exatidão foram expressos como percentual de recuperação e nas três concentrações analisadas apresentaram-se próximo a 100%, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados da exatidão

Determinações	1	%	2	%	3	%
0,5 µg/mL	0.49	97.54	0.49	97.40	0.49	97.41
1,0 µg/mL	1.05	104.96	1.05	105.17	1.05	105.34
1,5 µg/mL	1.58	105.17	1.57	104.42	1.58	105.13

Especificidade

Amostras de placebo foram analisadas em triplicata para verificação da especificidade/seletividade do método analítico. O método proposto demonstrou ser seletivo e específico o que pôde ser confirmado pela ausência de picos das amostras placebos no tempo de retenção do CDV.

Assim diante dos resultados, o método foi validado e apresentou-se específico, linear, robusto preciso e exato em acordo com a RE 899/03 da ANVISA.

4.3.2 Faixa de fusão

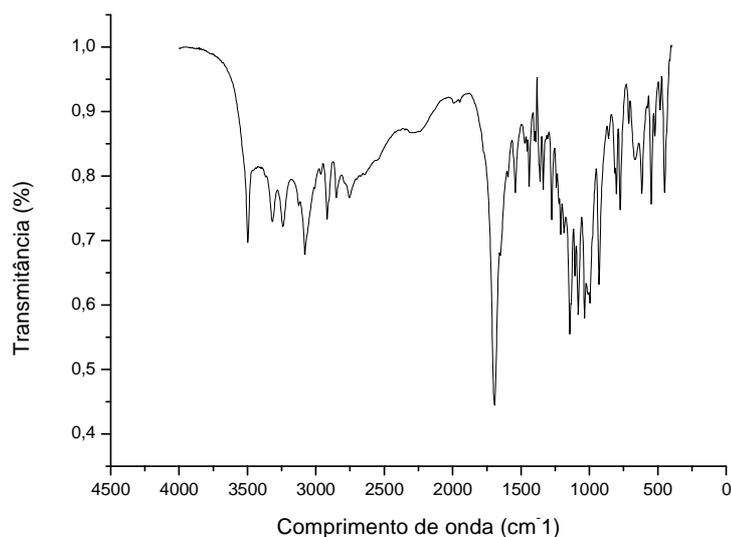
A faixa de fusão observada encontra-se entre 265° e 266°C e este resultado também foi confirmado através de DTA verificando-se valores de T_{onset} de 262,15°C, T_{endset} de 277, 95°C e T_{pico} em 266, 58°C. Esse resultado está de acordo com valor encontrado por Belletti e cols (2011) com T_{pico} de 269,8 °C, e T_{onset} de 264,4 °C.

4.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho

O espectro de infravermelho do CDV (Figura 4) mostra uma banda de forte intensidade em 1693 cm^{-1} , característica da carbonila C=O, uma banda de absorção de média intensidade em 3496 cm^{-1} correspondente a deformação axial da ligação N-H e uma banda de média intensidade correspondente a ligação C-H do ciclo heteroaromático em 3080 cm^{-1} ambas presentes no anel citosina da molécula. As bandas observadas no intervalo de 2917 e 2850 cm^{-1} correspondem aos grupos

metilenos presentes na molécula do IFA. Foi possível observar na região entre 1143 e 1081 cm^{-1} , bandas de média intensidade correspondentes ao éter alifático como também na região de 929 cm^{-1} a banda que corresponde a ligação P-OH, identificando o IFA CDV. Esse espectro apresenta-se de acordo com o observado por Sovico e cols, 2009.

Figura 4 - Infravermelho do cidofovir.



4.3.4 Ressonância magnética nuclear

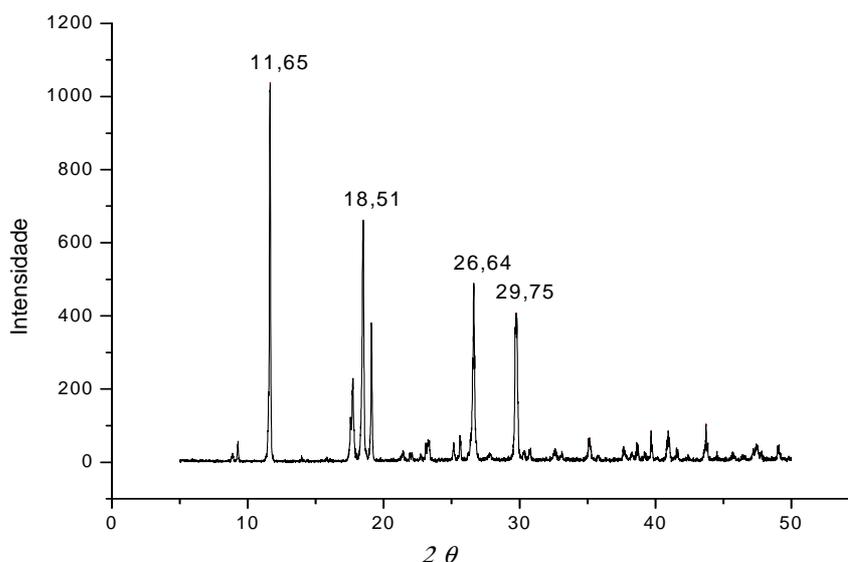
A partir da análise do espectro de RMN de ^1H foram observados dupletos em 7,9 e 6,1 ppm correspondentes aos prótons do anel heterocíclico do fármaco. Os duplo-dupletos observado nos deslocamentos 4,1 e 3,9 ppm são atribuídos aos prótons do grupamento $\text{CH}_2 - \text{OH}$ que está ligado ao carbono quiral, justificando assim a duplicação do sinal. No deslocamento químico em 3,8 ppm foi verificado o multiplete correspondente ao próton do carbono quiral e no deslocamento 3,77 ppm é possível ser visualizado o multiplete correspondente aos prótons do grupamento $\text{CH}_2 - \text{P}$. Foram verificados duplo-dupletos em 3,60 e 3,67 ppm pertencentes aos prótons do grupamento $\text{CH}_2 - \text{N}$, o qual também está ligado ao carbono quiral. No entanto, não foi possível observar os sinais correspondentes aos prótons lábeis (ligados a átomos eletronegativos, isto é, nitrogênio e oxigênio) devido à utilização de D_2O como solvente. O espectro de RMN de ^{13}C apresentou os deslocamentos dos carbonos do anel heterocíclico em 159.85, 150.70, 149.54 e 94.24 ppm e a

presença dos sinais dos carbonos alifáticos em 79.4, 66.2, 60.18 e 50.22 ppm. Dessa forma, a estrutura do IFA foi caracterizada através dos espectros de RMN corroborando com o resultado da espectroscopia da região de infravermelho.

4.3.5 Perfil difratométrico

A difração de raios X consiste numa das principais técnicas para caracterização de materiais cristalinos, como é o caso do CDV (FLORENCE & ATTWOOD, 2003). O difratograma de raios X (Figura 5) mostra a presença de inúmeros picos indicando que o lote apresenta estrutura essencialmente cristalina, com picos maiores e bem definidos em torno de 11,65°, 18,51°, 26,64° e 29,75° graus (2θ) e sem grandes mudanças na linha de base.

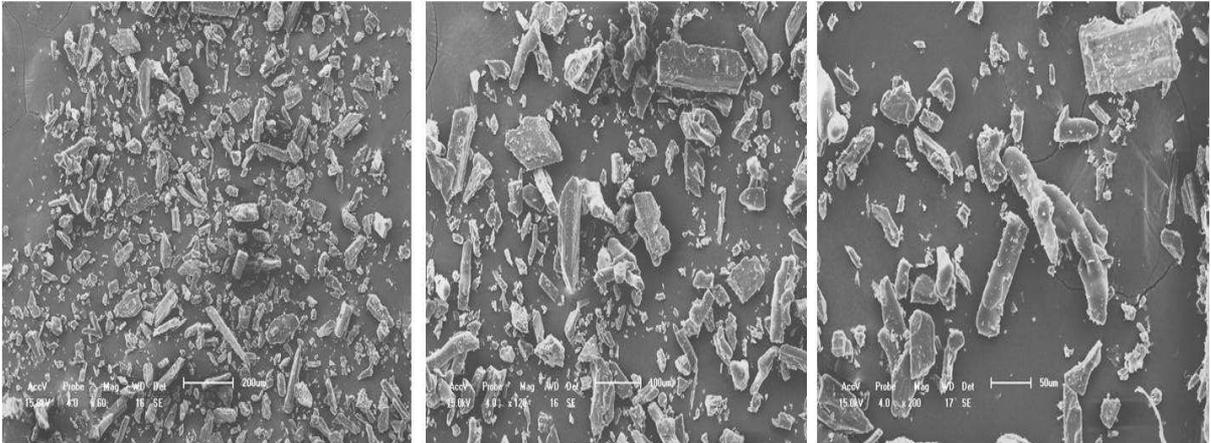
Figura 5 - Difratograma do Cidofovir.



4.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 6 mostra as imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura, sendo observado aspecto de aglomerados de partículas irregulares e com tamanhos diferenciados no lote analisado. Também pôde ser verificado o comportamento cristalino, corroborando com o resultado do difratograma apresentado na técnica de difração de raios X.

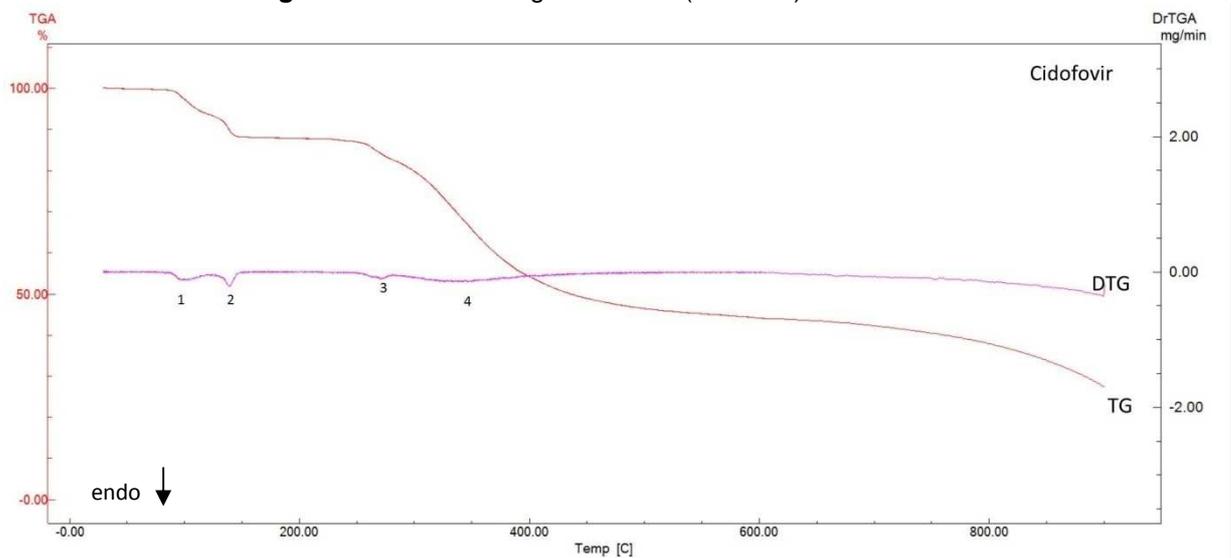
Figura 6 - Morfologia dos Cristais de CDV nas magnificações: 60x, 120x e 200x, respectivamente.



4.3.7 Caracterização térmica

Ao analisar a curva termogravimétrica (TG/DTG) (Figura 7) foram observados inicialmente dois eventos que podem ser atribuídos à perda de água do fármaco. O primeiro evento observado nas temperaturas T_{onset} 93,09°C e T_{endset} 108,73°C mostra uma perda de massa de 6,82% indicando perda de água de adsorção. Esse valor é similar ao obtido após ensaio de perda de umidade através balança de aquecimento por halogêneo cujo valor obtido foi 5,97%. No segundo evento observado nas T_{onset} 129,8°C e T_{endset} 144,6°C houve perda de massa equivalente a 5,17%, sugerindo perda de água de hidratação.

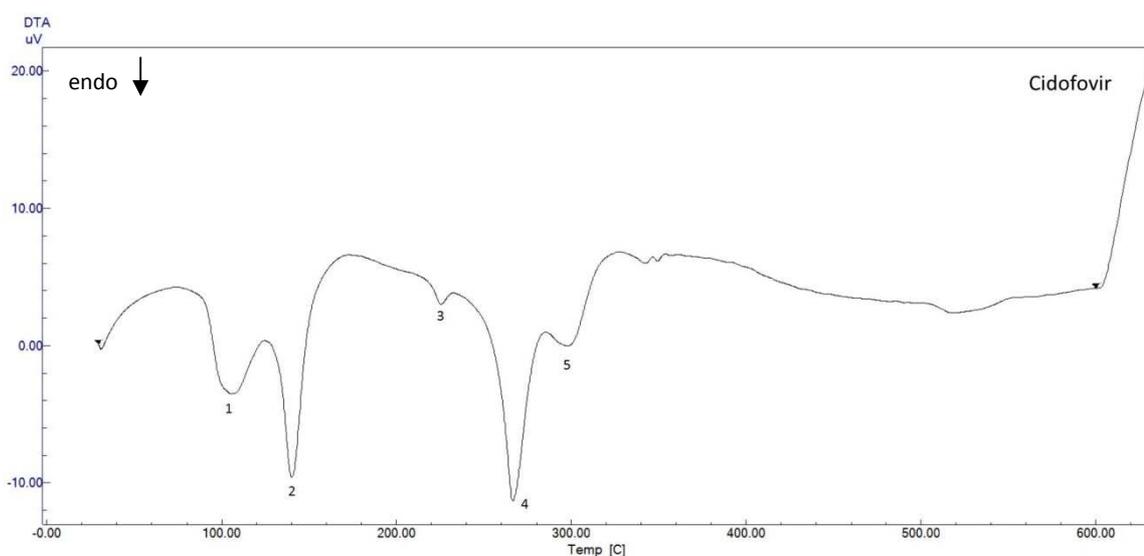
Figura 7 - Curva termogravimétrica (TG/DTG) do Cidofovir.



Vale ressaltar que a soma desses valores resulta em 11,99%, valor próximo ao obtido na determinação do teor de umidade por titulometria por Karl Fischer, 12,08%. Segundo Oliveira (2011), essas técnicas são correlacionáveis, não sendo evidenciadas diferenças significativas entre os resultados de cada uma delas. Nas curvas de DTA foram observados cinco eventos endotérmicos, enumerados na Figura 8. Os eventos 1 e 2 ocorridos até 170°C são referentes à perda de água do insumo como verificado nas curvas TG. Os eventos 3 a 5 são eventos subsequentes de fusão, onde o 4º evento é o mais pronunciado, com pico em 266,58°C e entalpia de 242,66J/g, estando o resultado em acordo com o ponto de fusão obtido através método do capilar descrito na F. BRAS IV, 1988.

O evento 3 ocorrido na faixa de temperatura T_{onset} 219,71°C e T_{endset} 231,11°C e o evento 5 na temperatura T_{onset} 257,53°C e T_{endset} 276,95°C, respectivamente, sugerem a presença de solvatos, diferindo-se da faixa de fusão principal (pico 4) conforme Figura 8. Também se observa, baseado na Figura 7 (evento 3 e 4) e Figura 8 (3, 4 e 5), que a faixa de fusão coincide com a etapa de decomposição e, portanto, são eventos concomitantes, como anteriormente observado por SHULGA & DUNN (2004) na análise da decomposição térmica do ácido 2-hidroxibenzoico e do éster 2-carboxifenil.

Figura 8 - Curva DTA do Cidofovir.



4.3.8 Teor de umidade

O teor de umidade por Karl Fischer, com já foi discutido no item anterior de Caracterização térmica, foi de 12,08%, sendo considerado elevado, tornando o IFA, portanto, mais suscetível a reações de hidrólise, daí a necessidade do mesmo ser armazenado em local protegido da umidade.

4.3.9 Estudo de Solubilidade

O CDV avaliado apresentou solubilidade aquosa em pH 7,4 à temperatura de 37°C (± 1) no valor de 12,5 mg/mL ($\pm 2,34$). A solubilidade do CDV é dependente do pH do meio de dissolução. Segundo Aspe e colaboradores (1995), esse IFA apresenta maior solubilidade em pH 7,0 quando comparada a uma solução aquosa com pH 4,5. Esse fenômeno é devido à presença dos múltiplos sítios de protonação na molécula e pelo IFA apresentar-se como uma mistura de espécies mono e dianiônicas em pH 7,0 e em pH ácido, o CDV apresenta caráter zwitteriônico.

A escolha da avaliação da solubilidade neste valor de pH considerou também o pH fisiológico, visto que durante o desenvolvimento de formulações tópicas a cedência do fármaco deverá ser realizada.

4.4 Conclusão

Diante dos resultados expostos, foi possível identificar e caracterizar o lote do CDV avaliado através de técnicas de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C .

Além disso, os ensaios de caracterização térmica, difração de raios-x, microscopia eletrônica de varredura, teor de umidade e solubilidade possibilitaram o conhecimento das características físico-químicas do fármaco e avaliação da qualidade do insumo.

Assim, como se trata de um fármaco do qual não se dispõe de especificações descritas nos compêndios oficiais, esse estudo tornou-se necessário para a obtenção das informações importantes a serem consideradas nos estudos posteriores de pré-formulação de preparações tópicas, a serem utilizadas no tratamento de lesões condilomatosas por HPV.

4.5 Referências Bibliográficas

ANDREI, G.; SNOECK, R. Cidofovir Activity against Poxvirus Infections. **Viruses**, v.2, p.2803-2830, 2010.

ASPE, E.; GUY, R.H.; LEE, W.A, et al. Optimization of in vitro flux through hairless mouse skin of cidofovir, a potent nucleotide analog. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 6, p. 750-754, 1995.

BELLETTI, D. A.; RIVAB, G.; TOSIA, G.; FORNIA, F.; BAROZZIB, P.; LUPPIB, M.; et al. Novel polymeric/lipidic hybrid systems (PLHs) for effective Cidofovir delivery: Preparation, characterization and comparative in vitro study with polymeric particles and liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 413, p. 220-228, 2011.

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

BRASIL (2003). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília: ANVISA. **RE n. 899 de 29 de Maio de 2003**.

CARINI, J.P.; PAVEI, C.; SILVA, A.P.C.; MACHADO, G.; MEXIAS, A.S.; PEREIRA, V.P.; FIALHO, S.L.; MAYORGA, P. Investigação Preliminar Avaliando a Influência dos Processos de Compactação e Trituração em Relação às Propriedades Cristalinas e Polimórficas da Talidomida. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.2, p. 226-233, 2009.

COSTA, MARCELO DO NASCIMENTO. **Estudo do Mecanismo de Ação de Derivados Aminoálcoois e de Derivados do Sistema Tienopiridina na Replicação *in vitro* do Vírus Herpes Simplex Tipo 1**. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia). Universidade Federal Fluminense, 2007.

DE CLERCQ, E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: Historical perspective. **Antiviral Research**, v.75, p.1–13, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Parte I. 4. ed. São Paulo: Atheneu; 1988.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. 732p.

GILEAD SCIENCES, 2000. Disponível em <<http://www.gilead.com/pdf/vistide.pdf>> Acessado em 15 de Janeiro de 2012.

LEITE, A.C.L.; SANTOS, L.M.F.; MOREIRA, D.R.M.; BRONDANI, D.J. Synthesis and characterization of new amino acyl-4-thiazolidones. **Quimica Nova**, v.30, n.2, p.284-286, 2007.

MAGEE, W.C.; HOSTETLER, K.Y.; EVANS, D.H. Mechanism of Inhibition of Vaccinia Virus DNA Polymerase by Cidofovir Diphosphate. **American Society for Microbiology**, v.49, n.8, p. 3153–3162, 2005.

The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 13^a ed. Merck e Co. Inc.: Whitehouse Station, New Jersey, 2001.

OLIVEIRA, M.C.; YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L. Análise Térmica aplicada a fármacos e formulações farmacêuticas na indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p.1224-1230, 2011.

SANTOYO, S.; DE JALÓN, E.G.; CAMPANERO, M.A.; YGARTUA, P. Determination of cidofovir in both skin layers and percutaneous penetration samples by HPLC. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v.29, n.5, p.819-26, 2002.

SHULGA, O.; DUNN, J. A simultaneous TG–DTA study of the thermal decomposition of 2-hydroxybenzoic acid, 2-carboxyphenyl ester (salsalate). **Thermochimica Acta**, v. 410, p. 15–21, 2004.

SNOECK, R. Papillomavirus and treatment. **Antiviral Research**, v.71, p.181–191, 2006.

SOVICO, F.; COLOMBO, G.; GALLINA, L.; BORTOLOTTI, F.; ROSSI, A.; MCLNNES, C.J, et al. Therapeutic paint of Cidofovir/Sucralfate gel combination topically administered by spraying for treatment of orf virus infections. **The AAPS Journal**, v.11, n.2, p. 242-249, 2009.

USP. The United States Pharmacopoeia. 30th. Ed.; Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2007.

Capítulo III

Caracterização físico-química e estudos de liberação / permeação cutânea in vitro de preparações tópicas de cidofovir

CAPÍTULO III

5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO / PERMEAÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO* DE PREPARAÇÕES TÓPICAS DE CIDOFOVIR

Elayne Karine Souto de Melo^{1*}, Maria Alice Maciel Tabosa¹, Giovana Damasceno de Souza¹, Gustavo Augusto Pereira dos Santos¹, André Luís Menezes Carvalho², Leila Bastos Leal¹ e Davi Pereira de Santana¹

1 – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Núcleo de desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético (NUDFAC). Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil.

2 – Universidade Federal do Piauí, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina – PI, Brasil.

Resumo: O cidofovir é um fármaco antiviral que vem sendo utilizado no tratamento de verrugas anogenitais em substituição à terapia usual. Todavia, não existe uma padronização das formas farmacêuticas semi-sólidas utilizadas, nas quais o fármaco é incorporado a partir da solução para perfusão Vistide[®]. O objetivo deste trabalho é avaliar formas gelificadas e emulsionada contendo o insumo farmacêutico ativo cidofovir quanto às características físico-químicas e ensaios de liberação e permeação cutânea *in vitro* através da pele de cobra *Boa constrictor*. Esse estudo faz parte da etapa inicial do desenvolvimento de uma formulação tópica segura e eficaz para o tratamento dos condilomas acuminados. Os resultados obtidos mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre a quantidade de fármaco liberada entre os géis e a emulsão. Também foi possível verificar que os promotores de permeação não atuaram de forma expressiva na permeação do fármaco através da muda de pele de cobra da espécie *Boa constrictor*.

5.1 Introdução

O *Papilomavírus humano* (HPV) configura uma das principais doenças sexualmente transmissíveis (NOGUERES, 2010). Devido à sua alta prevalência, acredita-se que 75 a 80% da população foi, está ou será infectada pelo vírus em algum momento da sua vida (ELEUTÉRIO, 2009). No Brasil, segundo dados do

Ministério da Saúde, aproximadamente 25% das mulheres estão infectadas pelo vírus e o país é um dos líderes mundiais em incidência do HPV (BRASIL, 2011).

O HPV está associado ao desenvolvimento do câncer de colo de útero e às verrugas genitais. As verrugas genitais, também conhecidas por condiloma acuminado, são lesões escamosas benignas que acometem a região anogenital, podendo causar prurido, queimação, dor vulvovaginal, leucorréia, sangramento e até obstrução da uretra, vagina e ânus, além do desconforto estético gerado (NAZZAL et al, 2008; ANIC, GIULIANO, 2011; GUNTER, 2003). Essas lesões, dependendo do estado imunológico do indivíduo, podem regredir de forma espontânea, ou tornarem-se mais numerosas em pessoas imunodeprimidas, como ocorre com portadores do vírus HIV ou usuários de agentes imunossupressores (SAMPAIO NETO, 2001; TANNUS et al, 2008).

Atualmente, não se dispõe de um tratamento definido para essas lesões, sendo importante, o desenvolvimento de pesquisas a fim de se obter uma terapia eficaz. Nesse sentido, estudos como os realizados por MUÑOZ et al, 2010; MARIÑO et al, 2007; GEERINCK et al, 2001; BONATTI et al, 2007; TRISTAM, FIANDER, 2005; STRAGIER et al, 2002 tem apontado o cidofovir administrado por via tópica como uma alternativa frente aos tratamentos cáusticos e dolorosos atualmente disponíveis e que não atuam diretamente no vírus (CARVALHO, QUINTANA, 2008).

O cidofovir é um fármaco antiviral pertencente à classe dos análogos nucleosídicos com amplo espectro contra DNA vírus, dentre eles os Papilomavírus. Possui peso molecular de $279,19 \text{ g mol}^{-1}$ e fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_6\text{P}$. É um pó cristalino branco, com elevada solubilidade aquosa em pH 6,0 a 8,0 e coeficiente de partição (log P) igual a 3,3 (GILEAD SCIENCES, 2000; THE INDEX MERCK, 2001).

Sua ação se dá através da inibição da síntese de DNA polimerase, enzima essencial à replicação viral, além de induzir a apoptose de células infectadas pelo HPV (DE CLERCQ, 2002, 2007).

Uma característica inerente a utilização tópica do cidofovir, é a incorporação do fármaco em preparações extemporâneas, a partir da especialidade farmacêutica Vistide[®], não havendo ainda uma formulação padrão e nem estudos que avaliem a qualidade do produto final. A avaliação das características físico-químicas e dos perfis de liberação e permeação *in vitro* é imprescindível para o conhecimento do comportamento dessas preparações utilizadas nos estudos de casos descritos, representa a proposta deste trabalho.

O perfil de liberação do fármaco foi definido empregando células de difusão tipo Franz com membranas artificiais e para a avaliação da permeação cutânea *in vitro*, optou-se pelo emprego da muda de pele de cobra da espécie *Boa constrictor*.

A utilização de pele de cobra como modelo de biomembrana, apresenta vantagens por possuir similaridade ao estrato córneo humano, sendo útil quanto ao fornecimento de dados reprodutíveis (NUNES et al, 2005). Avaliar inicialmente a passagem do cidofovir através do estrato córneo é de fundamental importância, visto que essa camada constitui a principal barreira a difusão de substâncias na pele e por se tratar de um fármaco de elevada hidrofília, fato que confere uma maior resistência a passagem pelo estrato córneo (MARTINS, VEIGA, 2002; SILVA, 2010).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi estudar diferentes formas farmacêuticas convencionais, como gel e emulsão, contendo o insumo farmacêutico ativo.

5.2 Materiais e Métodos

5.2.1 Obtenções das preparações gelificadas e emulsionada do cidofovir e avaliação das características físico-químicas

Com base nos estudos realizados por Zamacona, et al (2005), Stragier, et al (2002) e Muñoz, et al (2010) foram preparados três diferentes géis e uma emulsão conforme descrito na Tabela 1. Os géis foram preparados por dispersão do polímero em água purificada por meio de agitador mecânico Fisaton 713 D com velocidade de rotação inicial 550 rpm e final 1200 rpm durante 20 minutos, obtendo-se a característica gelificada após correção do pH. A emulsão foi preparada pela técnica de inversão de fases, onde a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, ambas com temperatura de 75 °C e a agitação mantida constante no agitador mecânico citado com velocidade de 500 rpm até temperatura de 25 °C. Após o preparo, as formulações foram acondicionadas em embalagens plásticas.

Tabela 1 - Composição e percentuais das formulações gelificadas e emulsionada

Composição	Fornecedor	Formulação (G)	Formulação (GP)	Formulação (GE)	Formulação (E)
Cidofovir	BoyleChem	1%	1%	1%	1%
Carbopol 940	Deg	1,2%	1,2%	1,2%	-
Cera Polawax	Galena	-	-	-	14%
Oleato de isodecila	Henrifarma	-	-	-	3%
Propilenoglicol	Henrifarma	-	5%	-	5%
Trietanolamina	Codossal	qs	qs	qs	qs
Etanol	Vetec	-	-	5%	-
Edta	Henrifarma	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
BHT	Henrifarma	-	-	-	0,03%
Metilparabeno	Henrifarma	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Propilparabeno	Deg	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Água purificada	-	200g	200g	200g	200g
qsp					

G: CDV 1% gel carbopol, GP: CDV 1% gel carbopol com propilenoglicol, GE: CDV 1% gel carbopol com etanol, E: CDV 1% emulsão.

5.2.1.1 Características organolépticas

Após 24 horas da preparação, as formulações foram avaliadas visualmente quanto aos parâmetros de aspecto, cor e homogeneidade. Para a emulsão também foi observado se houve indícios de instabilidades como presença de sedimentação, coalescência e separação de fases (MORAIS, 2006).

5.2.1.2 Teste de resistência à centrifugação

O ensaio de resistência à centrifugação é uma técnica bastante difundida que possibilita informações rápidas sobre a estabilidade de emulsões (MORAIS, 2006). A centrifugação simula um aumento na força de gravidade, aumentando a movimentação das gotículas e antecipando possíveis instabilidades como precipitação, separação de fases, formação de sedimento ou coalescência (BRASIL, 2008).

Neste teste uma amostra de 5 g da emulsão foi centrifugada a 3000 rpm durante 30 minutos em centrífuga Centribio 80-2B, sendo em seguida foi verificada a ocorrência ou não de separação de fases (BRASIL, 2004).

5.2.1.3 Análise do tamanho das gotículas da emulsão

A medição do tamanho de gotícula foi realizada através do método proposto por Coelho (2005). Inicialmente, a amostra foi diluída em solução propilenoglicol/água 1:1, na proporção de uma parte de amostra para vinte partes de

solução, sendo em seguida a lâmina preparada e observada em microscópio óptico Bioval com objetivas de 10, 40 ou 100 x de magnitude e uma ocular de 10 aumentos, onde foi feita a aferição do diâmetro de 100 gotículas com régua em escala micrométrica acoplada à ocular.

5.2.1.4 Determinação do pH

O pH das formulações foi verificado utilizando um pHmetro digital modelo Hanna pH 21, previamente calibrado com soluções tampão fosfato pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de 25 °C.

5.2.1.5 Ensaio de reologia e viscosidade

As propriedades reológicas e a viscosidade das formulações foram avaliadas com auxílio de viscosímetro rotacional da marca Rheology International.

Procederam-se às análises utilizando 100 gramas das amostras e *spindle* ASTM 7. As medidas foram avaliadas a velocidades de rotação progressivamente mais altas (10 –100 rpm com variação em intervalo de 1 minuto de 10 em 10 rpm) para obter-se a curva ascendente, e o procedimento foi repetido no sentido inverso com velocidades progressivamente mais baixas (100 –10 rpm) para obter-se a curva descendente. A viscosidade aparente de cada formulação foi verificada com velocidade de rotação do *spindle* a 50 rpm.

Os gráficos obtidos relacionam valores de velocidade de cisalhamento (1/s), no eixo das abscissas, com os valores de tensão de cisalhamento (N/m²) e viscosidade (Pa.s), no eixo das ordenadas.

5.2.1.6 Determinação da espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada por método adaptado de Borghetti e Knost (2006). Em uma placa de vidro disposta sobre papel milimetrado, aplicou-se 0,5 g da amostra de cada preparação e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto de espalhamento, o diâmetro foi aferido em posições opostas e calculado o diâmetro médio. Subseqüentemente, o mesmo procedimento foi repetido até um total de 5 placas. Os resultados foram

expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso aplicado, de acordo com a equação 1:

$$E_i = d^2 \times \frac{\pi}{4} \quad (1)$$

Onde, E_i = espalhabilidade da amostra para um determinado peso i (mm^2);
 d = diâmetro médio (mm).

5.2.2 Estudo de liberação e permeação *in vitro* em modelo de biomembrana alternativo

A avaliação da quantidade do cidofovir liberada e permeada da forma farmacêutica foi realizada utilizando seis células de difusão de Franz conectadas a um banho termostático a $37^\circ\text{C} \pm 0,5$ dispostas individualmente em placa agitadora magnética. Uma alíquota de 500 mg de cada formulação foi aplicada ao compartimento doador (com área difusional de $1,15 \text{ cm}^2$) separado através de uma membrana do compartimento receptor (com volume de $\pm 6 \text{ mL}$) que foi pré-enchido com tampão fosfato pH 7,4.

No estudo de liberação foi utilizada uma membrana artificial de acetato de celulose ($0,45 \mu\text{m}$) e para avaliação da permeação foi empregada pele de cobra *Boa constrictor* como modelo de biomembrana alternativo de estrato córneo. A pele foi doada pelo Laboratório de animais peçonhentos e toxinas (LAPTX) do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Previamente a realização do estudo, as membranas foram hidratadas em tampão fosfato pH 7,4 por um período de 12 horas, conforme Brito (2009).

Durante o estudo o sistema foi mantido sob agitação constante. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos, foram coletados volumes de 3 mL (estudo de liberação) e 2 mL (ensaios de permeação), da solução receptora, sendo imediatamente repostos o meio receptor com tampão fosfato pH 7,4 para manutenção da condição *sink*. Após cada coleta, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria no ultravioleta para a avaliação da liberação e para o estudo de permeação através de CLAE – UV. As metodologias foram validadas conforme RE n. 899/03 – ANVISA.

5.2.2.1 Quantificação do cidofovir proveniente do ensaio de liberação

Inicialmente, foi realizada uma varredura em espectrofotômetro Shimadzu UVmini-1240 nos comprimentos de onda de 200 – 400nm para determinação do maior comprimento de onda absorvido pelo fármaco, cujo valor obtido foi 274nm. O mesmo valor obtido por Santoyo, 2002, através de análises do fármaco por CLAE – UV.

Para quantificação do cidofovir, uma curva de calibração no intervalo de concentrações de 5 – 40 µg/mL foi preparada a partir de uma solução mãe em meio aquoso 100 µg/mL.

A metodologia foi validada segundo RE nº 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003), onde a linearidade do método foi verificada nas concentrações de 0,5; 10; 15; 20; 25; 30 e 40 µg/mL, sendo a concentração de 20 µg/mL equivalente a 100% de concentração teórica.

5.2.2.2 Condições cromatográficas para quantificação do cidofovir em amostras oriundas do ensaio de permeação cutânea

As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu com controlador SCL-10, auto Injetor SIL-10AD, bomba LC-10AD, UV-VIS Detector SPD-10AV e forno - CTO-10, com fase móvel composta por tampão fosfato de sódio monobásico 3,5 mM com fosfato de tetrabutilamônio 1,5 mM/acetoneitrila (97:3 v/v), pH 6,0; isocrático, bombeada sob fluxo de 1,0 mL/min, com coluna Phenomenex Luna 5 µm C18, 100 A, 250 x 4,6 mm, volume de injeção de 20 µL e detecção por ultravioleta em comprimento de 274 nm, com tempo de análise de 25 minutos. Este método foi adaptado de SANTOYO, 2002. A metodologia foi validada segundo RE nº 899/03 da ANVISA (BRASIL, 2003).

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Avaliação das características físico-químicas

5.3.1.1 Características organolépticas

Os ensaios de caracterização de formulações foram iniciados 24 horas após o preparo. Esse intervalo é admitido como tempo necessário para as preparações alcançarem o equilíbrio e testes imediatos poderiam fornecer resultados equivocados e indícios de instabilidade (MORAIS, 2006).

Decorrido esse período e após análise visual, as preparações gelificadas apresentaram-se homogêneas e translúcidas e inodoras. A emulsão apresentou consistência cremosa, coloração branca e brilhosa e odor característico da cera auto-emulsionante utilizada.

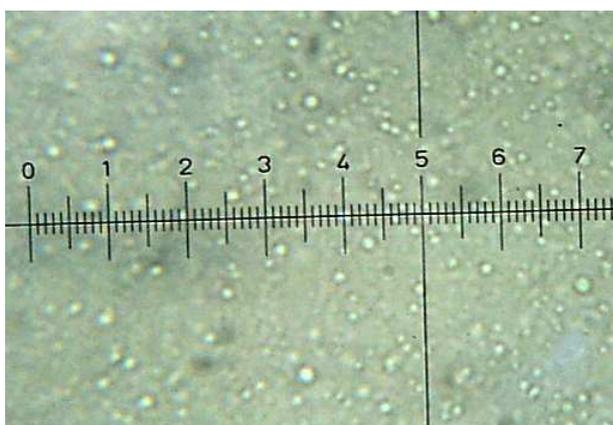
5.3.1.2 Resistência da emulsão à centrifugação

Após a centrifugação não foi visualizada a separação de fases e a emulsão manteve seu aspecto inalterado, ou seja, a velocidade de centrifugação não provocou alterações no sistema.

5.3.1.3 Análise do tamanho das gotículas da emulsão

A observação microscópica das gotículas é uma técnica vantajosa para se obter informações sobre a uniformidade da fase interna da emulsão (COELHO, 2005). A Figura 1 mostra a dispersão das gotículas na fase contínua. O tamanho médio das gotículas foi $0,56 \mu\text{m}$ ($\pm 0,21$), sendo mais frequente o valor de $0,5 \mu\text{m}$. É importante verificar que a emulsão possui gotículas de tamanhos e formas uniformes, conferindo estabilidade ao sistema. É interessante que o tamanho das gotículas seja avaliado em função do tempo, pois um aumento progressivo do tamanho pode acarretar em perda da estabilidade (AULTON, 2005).

Figura 1 – Microfotografia da emulsão



5.3.1.4 Determinação do pH

Segunda Silva (2008), o pH ideal de uma formulação é padronizado de acordo com o pH de estabilidade dos componentes ativos utilizados e o de tolerância da pele. Durante a preparação dos géis, por meio de reação de neutralização, o valor de pH foi ajustado para uma faixa próxima a neutralidade, obtendo-se os valores de 6,24, 6,15 e 6,24 para as preparações G, GP e GE, respectivamente. O pH obtido para a emulsão foi 6,7. Esses valores foram determinados a fim de se estabelecer um pH compatível com as características do fármaco, das formulações e do local de aplicação.

O cidofovir possui alta solubilidade aquosa na faixa de pH 6,0 a 8 (GILEAD SCIENCES, 2000). Este valor de pH confere estabilidade as preparações, emulsões formadas com ceras auto-emulsionantes não-iônicas, como o Polawax, possuem estabilidade em ampla faixa de pH (3 a 12) (MENDONÇA et al, 2009, CÔRREA et al., 2005) e os géis aniônicos formados por carbômeros, devem apresentar pH neutro ou próximo a neutralidade (CORRÊA et al, 2005). Além disso, esse valor de pH é compatível com o pH da pele que varia entre 4 a 6, sendo o pH da região anogenital entre os valores de 5 a 5,5 (GUPTA, PATIL, PAWASKAR, 2009).

5.3.1.5 Ensaios de reologia, viscosidade e espalhabilidade

Em relação às propriedades reológicas, as formulações G, GP e GE apresentaram comportamento não-Newtoniano do tipo pseudoplástico, explicado pelo decréscimo da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento, fato que pode ser visto através dos gráficos da viscosidade que mostra uma relação não-linear entre a viscosidade relativa e taxa de cisalhamento (Figuras 2, 3, 4 e 5) (AULTON, 2005).

O comportamento pseudoplástico, apresentado nas formulações, é apropriado para produtos de aplicação tópica onde, após cisalhamento, a resistência inicial para o gel fluir diminui, refletindo na facilidade de aplicação (MORAIS et al., 2005). Tal comportamento é frequente em formulações que contém gomas naturais ou sintéticas e polímeros (FERRARI et al., 2008).

A formulação E apresentou comportamento pseudoplástico, com área de histerese, conferindo-lhe características tixotrópicas (Figura 5) (FERRARI et al., 2008). A tixotropia é uma variável da viscosidade dependente do tempo. Este

parâmetro fornece informações da capacidade e do tempo necessário para o produto retornar à sua estrutura após a retirada da tensão (LEONARDI et al., 2009).

Esta característica é desejável, pois os produtos tixotrópicos tornam-se mais fluidos, facilitando a espalhabilidade e recuperam a viscosidade original ou parcial, com o término da tensão, evitando assim que o produto escorra sobre a pele (CORRÊA et al., 2005). O fenômeno de tixotropia da emulsão deve-se provavelmente ao aumento mobilidade cinética das gotículas após agitação mecânica, fato que propicia a diminuição da viscosidade e após o encerramento da agitação, as gotículas tendem retornar a condição inicial sob influência do movimento browniano (AULTON, 2005).

As Figuras 2, 3, 4 e 5 mostram o comportamento reológico das preparações G, GP, GE e E, respectivamente.

Figura 2 - Reogramas da Formulação G

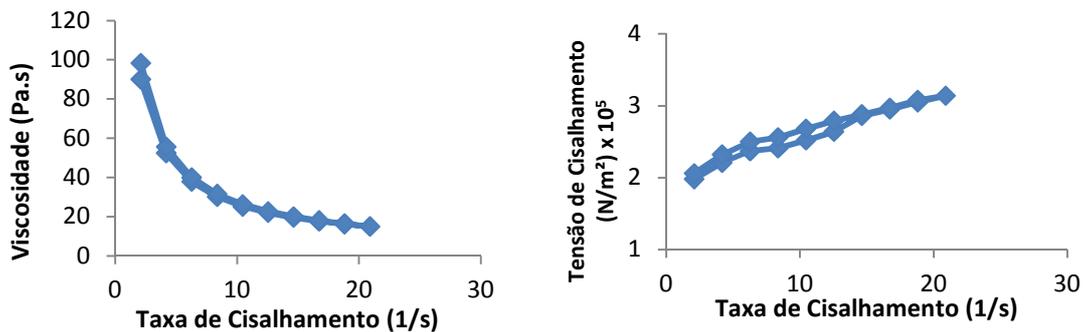


Figura 3 - Reogramas da formulação GP

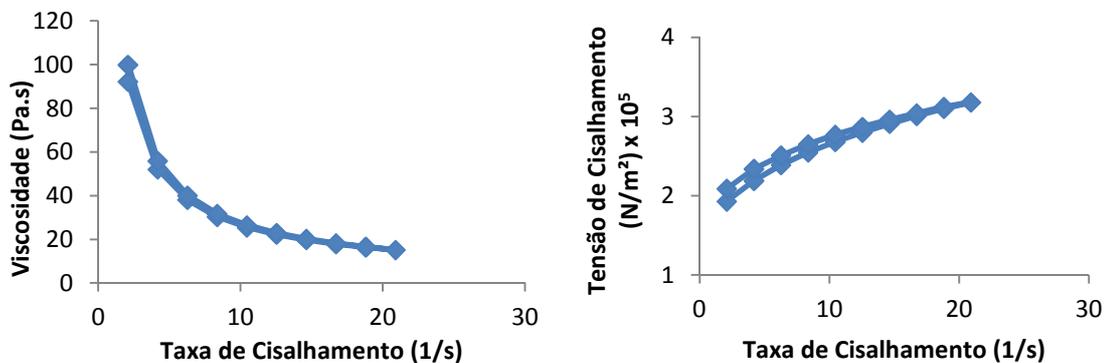


Figura 4 - Reogramas da formulação GE

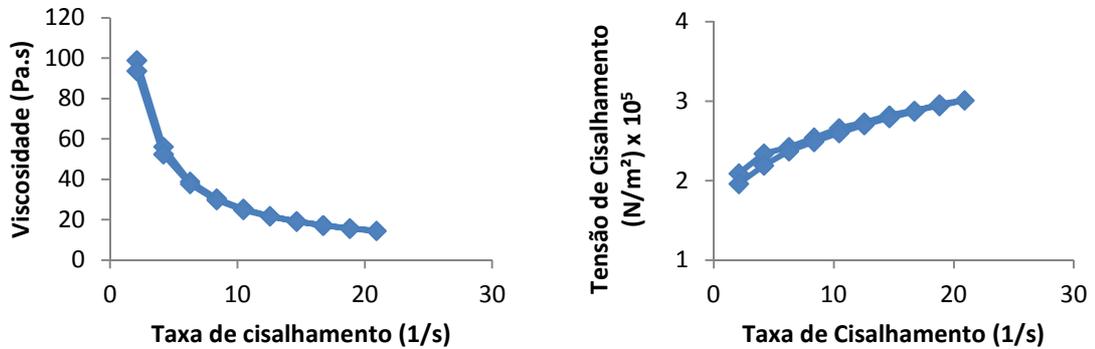
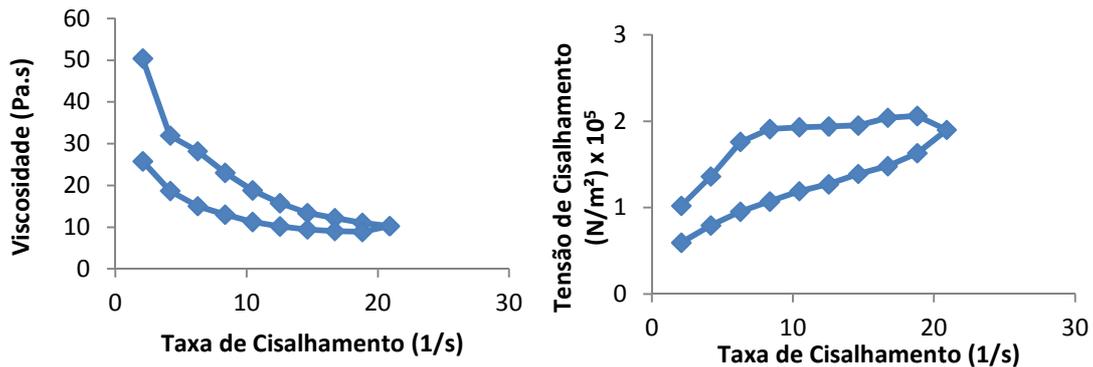


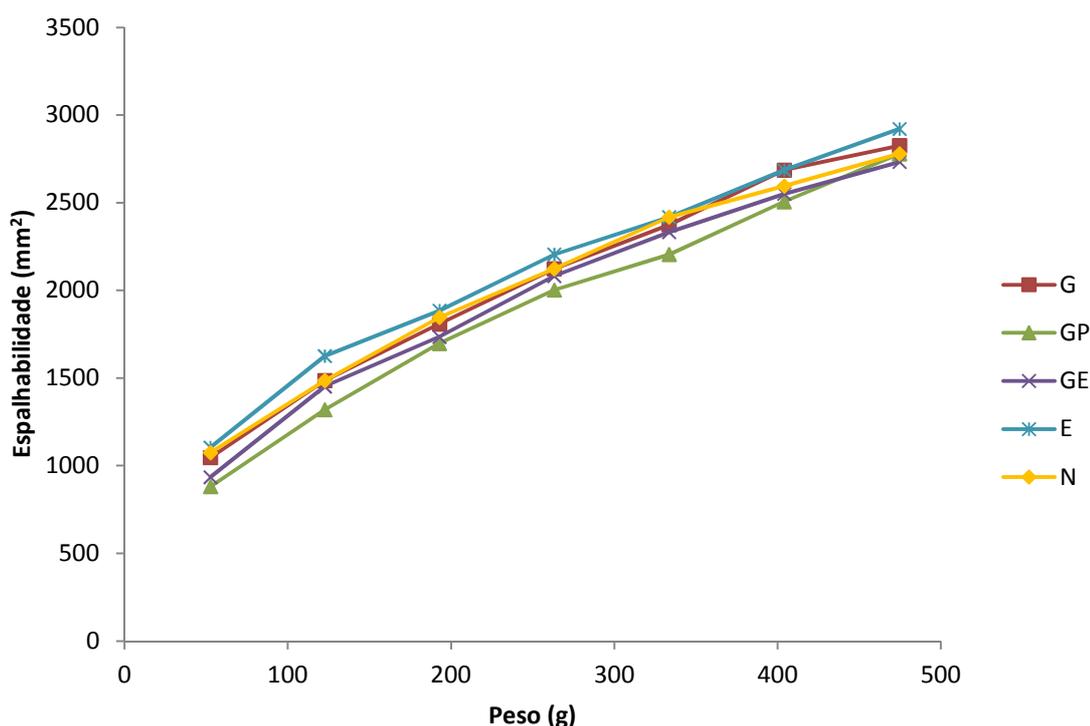
Figura 5 - Reogramas da formulação E



Os dados da viscosidade aparente das preparações presentes na Tabela 2 mostram que a emulsão apresenta menor viscosidade e conseqüentemente espalha um pouco mais em relação aos géis, todavia, os valores de espalhabilidade entre as formulações são bastante semelhantes não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os valores da espalhabilidade das formulações ($p < 0,05$) (Figura 6). A espalhabilidade de uma formulação semi-sólida é um importante parâmetro das formas farmacêuticas destinadas à administração tópica, pois está relacionada com a aplicação dessas preparações no local de ação (BORGHETTI, KNOST 2006).

Tabela 2 – Viscosidade aparente das preparações (n = 3)

Preparações	G	GP	GE	E
Média dos valores de Viscosidade aparente (Pa.s) (\pm DP)	24,74 \pm 0,13	18,12 \pm 0,06	24,83 \pm 0,30	11,13 \pm 0,19

Figura 6 – Gráfico das espalhabilidades das preparações

5.3.2 Validação de método analítico para quantificação do cidofovir nas cinéticas de liberação *in vitro*

Após varredura espectrofotométrica da solução de cidofovir, o comprimento de onda de melhor absorção para o fármaco foi 274 nm, estando em acordo com o apresentado por Santoyo e colaboradores, 2002.

Não foram observados sinais indicativos de interferentes durante o ensaio com tampão fosfato pH 7,4 e com as formulações desprovidas do fármaco demonstrado ser o método desenvolvido específico para determinação do cidofovir. No entanto, é importante salientar que, conservantes como metilparabeno são absorvidos em comprimento de onda muito próximo ao do cidofovir (269 nm), por

isso para evitar resultados errôneos, todas as formulações avaliadas estavam isentas de conservantes e antioxidantes, conforme sugerido por Sato et al (2007).

A linearidade nas concentrações (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µg/mL) foi estabelecida através da avaliação dos dados das curvas utilizando o método dos mínimos quadrados. A equação da reta é $y = 0,0283x + 0,0013$ e o coeficiente de correlação $r^2 = 0,999$. Após análise estatística por ANOVA não foi observada a falta de ajuste, isso mostra que o método é capaz de fornecer resultados proporcionais às concentrações avaliadas (BEDOR et al, 2008).

Os limites de detecção e quantificação calculados foram 0,754 µg/mL e 1,143 µg/mL, respectivamente. O limite de detecção indica a menor quantidade da substância que pode ser detectada em uma amostra, enquanto, o limite de quantificação fornece a menor quantidade da substância que pode ser quantificada com precisão e exatidão (RE 899/2003 - ANVISA).

Para avaliar a precisão do método, o ensaio de repetitividade a partir de seis réplicas da concentração teste resultou em uma concentração média de 20,07 µg/mL. Os dados da repetitividade e da precisão intermediária podem ser visualizados na Tabela 3. Após tratamento estático por ANOVA foi constatado que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos em dias diferentes e por analistas diferentes, pois o valor de F calculado foi menor que o F tabelado.

Tabela 3 - Repetitividade e Precisão intermediária entre analistas e dias diferentes

Repetibilidade	Concentração		CV (%)	
	21,42 µg/mL ± 0,027		0,13	
Precisão intermediária	Dia 1		Dia 2	
	Concentração	CV%	Concentração	CV%
Analista 1	21,42 µg/mL ±0,014	0,06	20,50 µg/mL ±0,014	0,06
Analista 2	21,21 µg/mL ±0,014	0,06	21,24 µg/mL ±0,018	0,08

O método também foi considerado exato, pois os resultados encontrados apresentaram concordância com os resultados da análise de três concentrações (baixa, média e alta) da solução de cidofovir.

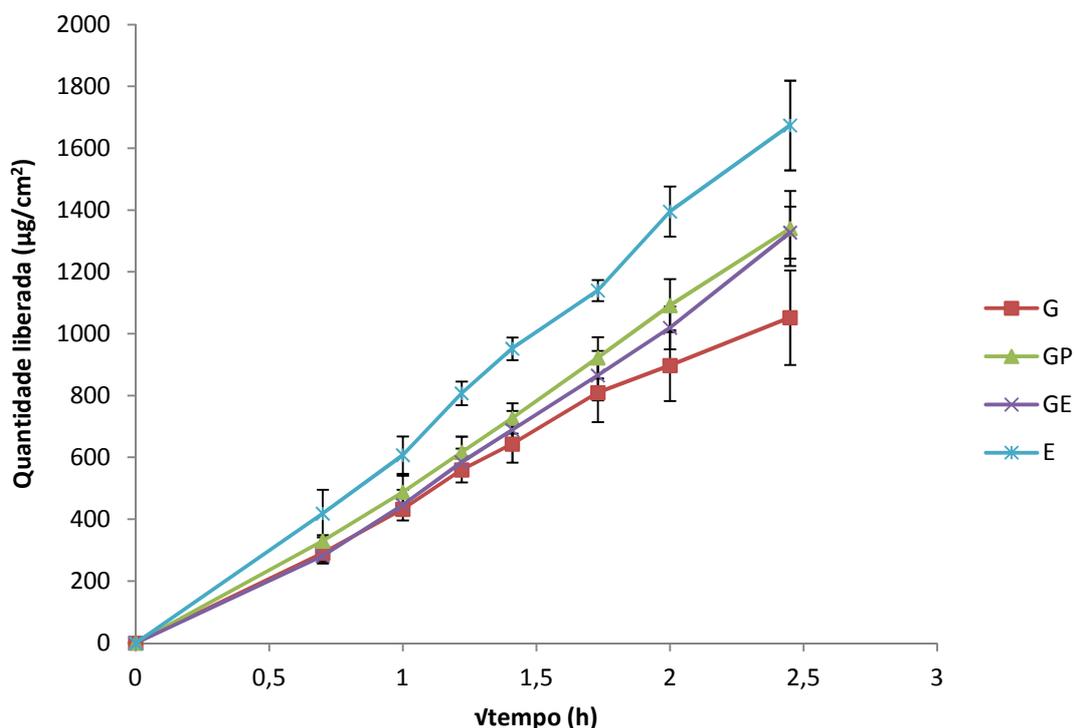
Tabela 4 – Resultados da exatidão

Teórica	Concentração			Dados estatísticos			
		Experimental		Média	DP	CV%	%
10	10,02	9,96	10,05	10,05	0,045	0,45	100,2
20	20,05	20,09	20,05	20,05	0,023	0,11	100,3
30	30,02	30,02	30,02	30,02	0,064	0,21	100

A robustez de um método está relacionada à sua capacidade em resistir a pequenas modificações dos parâmetros analíticos (RE 899/2003 ANVISA). Ao variar condições analíticas como temperatura (20 e 25°C) e pH (6,5 e 7,4) da solução de concentração teste, foi verificado que os dados obtidos são semelhantes, indicando que o método é robusto. A análise dos resultados foi verificada através de teste ANOVA, onde o F calculado (0,473) apresentou menor valor que o F tabelado (4,06) no intervalo de confiança de 95%.

5.3.3 Estudos de liberação e permeação *in vitro*

Através da observação do perfil de liberação do cidofovir *in vitro* (Figura 7), é possível verificar que a difusão do fármaco a partir da emulsão, linha azul no gráfico, foi maior em relação às formulações gelificadas. Esse resultado pode ser atribuído a viscosidade das preparações. De acordo com Davis e Khanderia (1972 apud SANTIS, 2008), a atividade termodinâmica e a viscosidade têm efeito determinante sobre a liberação do fármaco. É regra geral que o aumento da viscosidade do veículo causa a formação de uma estrutura mais rígida e, portanto a taxa de liberação da droga encontra-se diminuída (WANG et al, 2001). Dessa forma, por apresentar uma viscosidade inferior às preparações gelificadas (Tabela 2), a formulação emulsionada libera mais rapidamente e proporciona um maior particionamento do fármaco contido no veículo em direção à membrana.

Figura 7 – Perfil de liberação *in vitro* das formulações estudadas (n = 4)

Considerando as formulações gelificadas, os valores de viscosidade de cada preparação (Tabela 2) estão diretamente relacionados com seus respectivos perfis de liberação *in vitro* (Figura 7). A Figura 7 mostra ainda que esses perfis de liberação não apresentaram diferenças significativas no intervalo de confiança de 95% após tratamento estatístico por ANOVA.

Através da aplicação do método de regressão linear dos mínimos quadrados nos dados experimentais obtidos da liberação *in vitro* do cidofovir, foi verificado que o modelo de Higuchi demonstrou ser o mais adequado para todas as formulações avaliadas (Higuchi, 1962). Esse resultado pode ser observado através dos valores dos coeficientes de correlação presentes na Tabela 5. Portanto, tais perfis de liberação do cidofovir apresentaram modelo cinético de pseudoprimeira ordem, indicando que o sistema é controlado por difusão. (Higuchi, 1962).

Conforme Higuchi (1961 apud DASH, MURTHY, CHOWDHURY, 2010), a quantidade liberada é dada pela equação $Q = A\sqrt{D(2C - C_s)C} \sqrt{t}$, onde Q é a quantidade de fármaco liberada no tempo t por unidade de área A , C é a concentração inicial do fármaco, C_s é a solubilidade do fármaco no veículo e D é o coeficiente de difusão do fármaco no veículo. Comparando a equação acima com o gráfico na Figura 7, observa-se que a quantidade liberada é proporcional à raiz

quadrada do tempo e que o coeficiente de proporcionalidade é dado por $A\sqrt{D(2C - Cs)C}$. Dessa forma, quanto maior o coeficiente de difusão, maior será a quantidade de fármaco liberada.

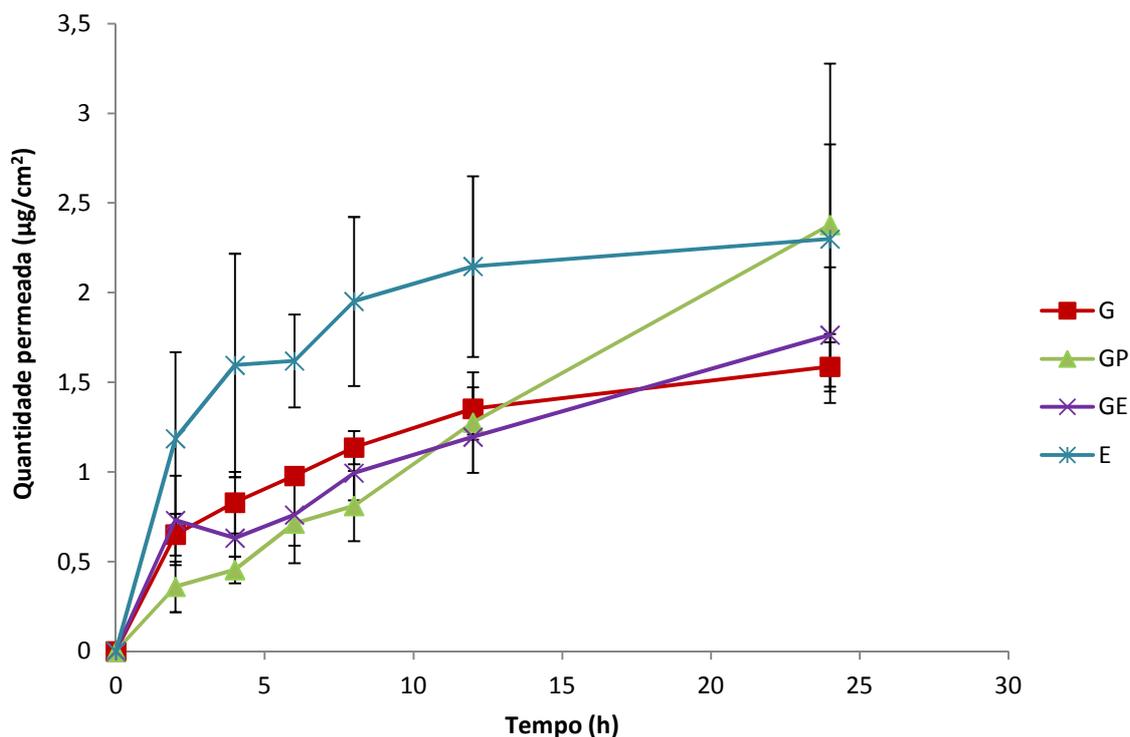
Tabela 5 – Coeficientes de correlação das formulações estudadas nas cinéticas de liberação

Formulações	Coeficiente de correlação (r^2)
G	0,9889 ± 0,0063
GP	0,9946 ± 0,0044
GE	0,9906 ± 0,0036
E	0,9907 ± 0,0089

Para os estudos de avaliação da permeação do fármaco *in vitro*, foi escolhida como biomembrana, a pele da região dorsal de cobra *Boa constrictor*. A muda de pele de cobra é constituída de estrato córneo puro desprovido de epiderme viável e possui similaridades quanto à composição lipídica e a permeabilidade aquosa do estrato córneo humano (NUNES, 2005; PRAÇA, 2010). Desse modo, optou-se por esse modelo para avaliar a permeação do cidofovir contido nas formulações, visto que o estrato córneo constitui a principal barreira de passagem de substâncias através da pele (SILVA, 2008).

De acordo com o gráfico de permeação do cidofovir através da pele de cobra *Boa constrictor* (Figura 8), observa-se que a emulsão, apresentou um maior perfil de permeação, corroborando com os resultados verificados nos estudos de liberação *in vitro*.

Figura 8 – Perfil de permeação cutânea *in vitro* através de biomembrana (n = 3)



Além da interferência da viscosidade no veículo, conforme discutido anteriormente e partindo-se do princípio de que a pele de cobra é uma biomembrana com característica lipofílica (ITOH et al, 1990), pode-se prever que os tensoativos contidos na emulsão atuem diretamente na promoção da permeação do fármaco.

Segundo Nokhodchi (2003), os tensoativos não-iônicos, como os presentes na cera autoemulsionante Polawax[®], possuem dois mecanismos facilitadores da permeação. Inicialmente, penetram na região intercelular do estrato córneo, aumentando a fluidez, a solubilidade e a extração dos componentes lipídicos. O outro mecanismo está relacionado à penetração do tensoativo na matriz intercelular que ao ligar-se aos filamentos de queratina promovem a ruptura dos corneócitos.

O cidofovir é um fármaco com característica hidrofílica e tratando-se de uma emulsão óleo em água, estaria solubilizado na fase externa da emulsão. Diante disso, não há particionamento do fármaco da fase interna, fato que retardaria a difusão, como observado por Gomes, Nunan e Ferreira (2004) no estudo da influência do tipo de formulação na liberação tópica da paromomicina.

Em relação às formulações gelificadas, pode-se observar que os promotores de permeação propilenoglicol e etanol, nas concentrações utilizadas, não

influenciaram de forma significativa a permeação do cidofovir ($p < 0,05$). Esses promotores, comumente utilizados em formulações de uso tópico, atuam como co-solventes do fármaco no veículo, melhoram a hidratação cutânea, além de serem capazes de extrair lipídios do estrato córneo favorecendo a penetração do fármaco (TOMMER, NEUBERT, 2006; CARPENTIERI-RODRIGUES, ZANLUCHI, GRABORI, 2007). No entanto, o efeito desses também depende da concentração utilizada na preparação (WILLIAMS, BARRY, 2004; TOMMER, NEUBERT, 2006).

Díez-Sales e colaboradores (2005) avaliaram a influência do propilenoglicol, nas concentrações de 0 a 70% p/p, na penetração do aciclovir na pele humana a partir de sistemas solventes e do gel de carbopol. Nesse estudo observou-se que a maior taxa de permeação do aciclovir foi obtida com 70% de propilenoglicol para o sistema solvente e 50% para o gel. Diante disso e dos resultados obtidos na permeação *in vitro* do cidofovir a partir das preparações gelificadas, consideramos importante que novos estudos sejam realizados com o intuito de avaliar a influência desses promotores em maiores concentrações.

5.4 Conclusão

As preparações farmacêuticas utilizadas nesse estudo são formas farmacêuticas convencionais comumente utilizadas nos estudos descritos na literatura para tratamento de verrugas genitais. Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que as preparações gelificadas e emulsionadas avaliadas apresentaram valores de pH compatíveis com o fármaco, forma farmacêutica e com o pH da região genital. Além disso, o comportamento reológico foi condizente com o esperado para os veículos semi-sólidos. A emulsão apresentou-se resistente ao ensaio de centrifugação e com gotículas de tamanho e formas uniformes.

Nos estudos de liberação *in vitro* utilizando membrana sintética, observou-se que a viscosidade foi fator determinante para a difusão do cidofovir. Quanto menor a viscosidade da preparação maior foi a quantidade de fármaco liberado, conforme verificado para a formulação emulsionada.

No que diz respeito ao modelo matemático da cinética de liberação, o que melhor se ajustou a todas as formulações, emulsionada e gelificadas, foi o modelo de pseudoprimeira ordem indicando que os sistemas são controlados por difusão.

Em relação ao estudo de permeação *in vitro* do cidofovir através da pele de cobra *Boa constrictor*, a emulsão apresentou um perfil de permeação superior às demais formulações, demonstrando consoância com o estudo de liberação. Todavia, para as preparações gelificadas, a concentração dos promotores de permeação não influenciou significativamente a permeação do fármaco, sugerindo a realização de novos estudos contendo esses promotores em maiores concentrações.

5.5 Referências Bibliográficas

ALLEN JUNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems**. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2009, 710 p.

ANIC, G. M.; GIULIANO, A. R. Genital HPV infection and related lesions in men. **Preventive Medicine**, v. 53, p. S36-S41, 2011.

AULTON, M.E. **Pré-formulação farmacêutica: delineamento de formas farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677 p.

BEDOR, D. C. G.; SOARES SOBRINHO, J. L.; GRANJERO JÚNIOR, S.; RAMOS, S. V.; LIMA, A. A. N.; ROLIM NETO, P. J. Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Determinação de Metronidazol em Forma Farmacêutica (Gel Vaginal). **Latin American Journal Of Pharmacy**. v. 27, n. 2, p. 263-265, 2008.

BONATTI, H.; AIGNER, F.; DE CLERCQ, E., et al. Local administration of cidofovir for human papilloma virus associated skin lesions in transplant recipients. **Transplant International**, v. 20, p. 238-246, 2007.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 4, out/dez, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327>. Acessado em 25/04/2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília: 2 ed, 2008. 120 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília: **Séries Temáticas**, 2004. 52 p.

BRASIL (2003). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília: ANVISA. **RE n. 899 de 29 de Maio de 2003**.

BRITO, M. B.; BARIN, G. B.; ARAÚJO, A. A. S.; et al. The action modes of *Lippia sidoides* (CHAM) essential oil as penetration enhancers on snake skin. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 1, p. 323 – 327, 2009.

CARPENTIERI-RODRIGUES, L. N.; ZANLUCHI, J. M.; GREBOGI, I. H. Percutaneous absorption enhancers: mechanisms and potential. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p. 949-961, 2007.

CARVALHO, B. R.; QUINTANA, S. M. Condiloma: um desafio secular. **Prática Hospitalar**, ano 10, n. 56, mar/abr, p. 145-148, 2008.

COELHO, L. C S. **Protetor solar: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da eficácia e segurança**. 2005, 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Recife, 2005.

CORNÉLIO,R.; MAYORGAE; P. Estudo da penetração cutânea do flurbiprofeno. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6 p. 883-888, 2007.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; CHOWCHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Polonic Pharmacaceutica**, v. 67, n. 3, p. 217-223, 2010.

DE CLERCQ, E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. **Antiviral Research**, v. 55, p. 1-13, 2002.

DE CLERCQ, E. The acyclic nucleoside phosphonates from inception to clinical use: historical perspective. **Antiviral Research**, v. 75, p. 1-13, 2007.

DÍEZ-SALES, O.; GARRIGUES, T.M.; HERRÁEZ, J. V.; BELDA, R.; MARTIN-VILLODRE.; HERRÁEZ, M. *In vitro* percutaneous penetration of acyclovir from solvent systems and Carbopol 971-P hydrogels: Influence of propylene glycol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 5, p. 1039-1047, 2005.

ELEUTÉRIO, R. M. N.; ELEUTÉRIO JÚNIOR, J.; JACYNTHO, C. M. A.; FREITAS, J. R. Frequência de HPV genital em adolescentes com citologia e colposcopia normais. **Revista Brasileira de Genitoscopia**, v. 3, n. 3-4, p. 72-75, jan-jun, 2009.

FERRARI, M.; PIANOVSKI, A. R. ; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

GEERINCK, K.; LUKITO, G.; SNOECK, R., et al. A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream. **Journal of Medical Virology**, v. 61, p. 543-549, 2001.

GILEAD SCIENCES, 2000. Disponível em <<http://www.gilead.com/pdf/vistide.pdf>> Acessado em 15 de Janeiro de 2012.

GOMES, S. F. O.; NUNAN, E. A.; FERREIRA, L. A. M. Influence of the formulation type (o/w, w/o/w emulsions and ointment) on the topical delivery of paromomycin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 3, p. 345-352, jul-set, 2004.

GUNTER, J. Genital and perianal warts: New treatment opportunities for human papillomavirus infection. **American Journal of Obstetrics e Gynecology**, v. 189, p. S3-S11, 2003.

GUPTA, P.; PATIL.; PAWASKAR. Vulvovaginal hygiene and care. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS*, v. 30, p. 130-133, 2009.

HIGUCHI, W.I. Analysis of data on the medicament release from ointments. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 51, p. 802-804, 1962.

ITOH, T.; MAGAVI, R.; CASADY, R. L.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J. H. A method to predict the percutaneous permeability of various compounds: shed snake skin as a model membrane. **Pharmaceutical Research**, V, 7, N. 12, 1990.

LEONARDI, G. R.; PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; CORRÊA, N. M. N.; Avaliação da estabilidade físico-química de emulsão acrescida de uréia dispersada, ou não, em propilenoglicol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 47-53, 2009.

MARIÑO, A. T.; GONZÁLEZ, J. R. C.; BOBO, M. T. I.; RODRÍGUEZ, F. A. Cidofovir topico para el tratamiento de verrugas plantares. In: **ESCP Symposium on Clinical Pharmacy**, n. 36, Estambul: 2007, p. 48-49.

MARTINS, M. R. F.; VEIGA. F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, jan./mar, 2002.

MENDONÇA, C.C.; SILVA, I.C.L.; RODRIGUES, K.A.; et al. Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação in vitro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 35-46, 2009.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões o/a com cristais líquidos acrescidas de xantinas para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006, 181 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade São Paulo, São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MORAIS, G. G.; SANTOS, O. D. H.; MASSON, D. S, OLIVEIRA, W. P.; ROCHA FILHO, P. A. Development of O/W emulsions with annatto oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 591-596, 2005.

MUÑOZ, R. M.; PRADO, E.; CISNEROS, J. M.; BAUTISTA, F. J., et al. Gel de cidofovir al 1% en lesiones por papilomavirus en una paciente con inmunodeficiencia congênita. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, p. 209-210, 2010.

NAZZAL, O. N.; SUÁREZ, E. P.; VENEGAZ, M.; et al. Imiquimod em crema al 5% en el tratamiento de verrugas anogenitales asociadas a VPH: experiência preliminar. **Revista Chilena de Obstetricia y Ginecologia**, v. 73, n. 5, p. 325-329, 2008.

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

NOGUERES, I. B.; ZIMMERMANN, J. B.; GONÇALVES, L. G.; FONTES, L. C.; ALVES, L. F.; GONTIJO, C. C. Associação entre a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e outras infecções genitais femininas. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 36, n. 1, p. 19-28, jan./mar. 2010.

NETZ, P. A. & ORTEGA, G. G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas**. 1ed. Ed. Artmed. 2002. p. 265-289.

NUNES, R. S.; AZEVEDO, J. R.; VASCONCELOS, A. P.; PEREIRA, N. L. Estudo de padronização da pele de cobra espécie – *Boa constrictor* - como modelo de estrato córneo para permeação de fármacos. **Scientia Plena**, v. 1, n. 7, p. 171-175, 2005.

PRAÇA, F.S.G. **Liberção e permeação *in vitro* d produtos transdérmicos: um estudo metodológico de aparatos e de condições experimentais**. 2010, 84f. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SANTIS, A. K. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica**. 2008, 157 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

SAMPAIO NETO, L. F.; RAMALHO, M. V.; CAMPOS JÚNIOR, M. S.; NOVO, N. F.; MENEGOCI, J. C. Estudo comparativo do tratamento da condilomatose vulvar em mulheres HIV+ e HIV-. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 13, n. 6, p. 8-11, 2001.

SANTOYO, S.; DE JALÓN, E. G.; CAMPANERO, M. A.; YGARTUA, B. P. Determination of cidofovir in both skin layers and percutaneous penetration samples by HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 819-826, 2002.

SATO, M. E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I. F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, abr./jun., 2007.

SILVA, J.A. **Desenvolvimento, caracterização e estudo de permeação cutânea de diclofenaco de dietilamônio em sistemas tópicos nanoemulsionados.** 2008, 205 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Recife, 2008.

STRAGIER, I.; SNOECK, R.; DE CLERCQ, E.; VAN DEN OORD, J. J.; VAN RANST, M.; DE GREEF, H. Local Treatment of HPV-Induced Skin Lesions by Cidofovir. **Journal of Medical Virology**, v. 67, p. 241-245, 2002.

TANNUS, B. G.; CAVALIN, L. C.; SATO, M. S.; BRENNER F. M. Dermatologia comparativa: verrugas virais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 1, p.93-94, 2008.

TRISTAM, A.; FIANDER, A. Clinical responses to Cidofovir applied topically to women with high grade vulval intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 99, p. 652-655, 2005.

TROMMER, H.; NEUBERT, R. H. H. Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 19, p. 106-121, 2006.

WANG, Y.Y.; HONG, C.T.; CHIU, W.T, FANG, J. Y. *In vitro* and *in vivo* evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, p. 84-104, 2001.

WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced. Drug Delivery Reviews**, v.56, n.5, p. 603-618, 2004.

ZAMACONA, L. E.; BLANCO-PRÍETO, M. J.; GRADO, R. M.; AYERRA, P. Y. Gel of microparticles to target cidofovir to the basal epidermis. In: Congress of the Spanish Society of Pharmacy Industrial and Galénica (biopharmabonanza), n. 7, Salamanca: 2005.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

- ✓ Através do emprego de técnicas analíticas no estudo de caracterização físico-química do cidofovir foi possível identificar do insumo farmacêutico ativo e definir especificações que não se encontram descritas em compêndios oficiais. Além disso, os resultados obtidos fornecem dados importantes a ser considerados no desenvolvimento e controle de qualidade de formas farmacêuticas a base do fármaco.

- ✓ As preparações gelificadas e emulsionadas contendo o cidofovir avaliadas apresentaram características como pH e viscosidade compatíveis com fármaco, veículo e local de administração pretendido. Além disso, a emulsão mostrou-se resistente ao teste de centrifugação e com gotículas de tamanho e formas uniformes.

- ✓ Nos estudos de liberação *in vitro*, foi observado que a viscosidade é o fator determinante na difusão do fármaco, sendo evidenciado um perfil de liberação superior para a emulsão consistindo na formulação de menor viscosidade. Além disso, verificou-se que todas as preparações seguiram o modelo cinético pseudoprimeira ordem, indicando que os sistemas são controlados por difusão.

- ✓ Com relação ao estudo de permeação cutânea *in vitro*, verificou-se que a quantidade de fármaco permeada foi maior para a emulsão apresentando um perfil de permeação consoante com a cinética de liberação. Considerando as formulações gelificadas, foi verificado que as concentrações dos promotores de permeação avaliados, propilenoglicol e etanol, não influenciaram de forma significativa a permeação do cidofovir através do modelo de biomembrana empregado.

Apêndice

***Artigo submetido à Revista
de Ciências Farmacêuticas
Básica e Aplicada***

7 APÊNDICE - Cidofovir: potente antiviral para o tratamento tópico de lesões associadas ao Papillomavírus humano?

Elayne Karine Souto de Melo¹, Anna Carolina Teixeira Mesquita², Davi Pereira de Santana³, Leila Bastos Leal⁴

Melo, EKS; Mesquita, ACT; Santana, DP, Leal, LB

- 1- Farmacêutica, mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Recife (PE), Brasil
- 2- Acadêmica de Farmácia da Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS/IMIP) – Recife (PE), Brasil
- 3- Farmacêutico, Professor doutor do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife (PE), Brasil
- 4- Farmacêutica, Professora doutora do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife (PE), Brasil

Endereço para correspondência:

Elayne Karine Souto de Melo

Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, 50740-400, Recife, Pernambuco, Brasil. Tel./Fax: 081 3302-6593/ 081 3302-6590. E-mail: karine.melo@nudfac.com.br

Resumo

As verrugas genitais são lesões epiteliais induzidas pelo Papillomavirus Humano (HPV). As técnicas atualmente utilizadas para tratamento dessas lesões são

dolorosas e as recidivas costumam acontecer em curto espaço de tempo. Uma alternativa para o tratamento seria a utilização tópica do cidofovir. O cidofovir é um fármaco antiviral autorizado pela FDA para o tratamento de retinite por citomegalovírus. No entanto, diversos estudos tem demonstrado a eficácia desse fármaco no tratamento de papillomavirus humano (HPV), herpes simplex vírus, varicella-zoster vírus, Epstein-barr vírus, human herpes vírus-6, -7, -8, poxvirus, poliomavirus e adenovirus. Com relação a infecções causadas pelo HPV, são relatadas na literatura respostas terapêuticas mediante o uso intralesional e tópico do cidofovir, através do uso de formulações extemporâneas. Considerando que, atualmente, os tratamentos de lesões provocadas pelo HPV são cáusticos, dolorosos e com curto intervalo de reincidências, a utilização tópica do cidofovir poderia ser uma alternativa clínica aos tratamentos convencionais, minimizando efeitos colaterais locais e evitando a ocorrência de efeitos adversos sistêmicos. Para tanto, há necessidade da padronização de uma formulação tópica, através de estudo de pré-formulação, observando sua estabilidade e segurança, além da realização de outros estudos clínicos para confirmação do seu efeito no tratamento das lesões associadas ao HPV.

Palavras-chave: cidofovir, *Papillomavirus humano*, antiviral, terapia tópica.

Introdução

Condilomas acuminados ou verrugas genitais, popularmente conhecidas como cristas de galo, são lesões epiteliais causadas pelo papilomavírus humano (HPV). Estima-se que no mundo cerca de 1% ou mais pessoas são acometidas a cada ano por essas lesões e que surgirão cerca de 30 milhões de novos casos por ano de lesões vulvares por HPV sendo a maioria delas condilomas (Lacey &

Garnett, 2011; Fridman & Pessim, 2009). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, aproximadamente 25% das mulheres estão infectadas pelo vírus HPV (Brasil, 2010). Nos Estados Unidos, o HPV anogenital acomete cerca de 15% dos indivíduos ou aproximadamente 24 milhões de pessoas (Gunter, 2003).

A maioria das infecções por HPV são assintomáticas, e aproximadamente 1% resultam em lesões clinicamente aparentes, a maior parte benigna e relacionada aos HPV subtipos 6 e 11 nos quais se inserem os condilomas acuminados. Esses, por sua vez, podem ainda ter caráter transitório e regredirem espontaneamente (Nicolau, 2002). No entanto, em pacientes portadores do vírus HIV, devido a imunodepressão, as manifestações anogenitais induzidas pelo HPV costumam ser mais agressivas e com maior número de recidivas (Pincinato et al., 2009).

O Papillomavírus humano não é sensível aos antivirais disponíveis. Portanto, o manejo dos condilomas acuminados costuma ser feito com cauterizações químicas, como podofilina ou ácido tricloroacético, entre outros. Nos casos de insucesso terapêutico ou na dependência da localização, as lesões condilomatosas podem ser removidas cirurgicamente, eletrocauterizadas a frio ou por laser (Phelps & Alexander, 1995. Fracaro et al., 2003). No entanto, essas técnicas podem ser dolorosas e as recidivas costumam acontecer em curto espaço de tempo. Diante disso, uma alternativa para o tratamento seria a utilização tópica do cidofovir.

O cidofovir ((S)-1-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina) (HPMPC) é um fármaco pertencente à classe análogos nucleosídicos, sendo uma análogo da desoxicidina monofosfato, tem peso molecular 279,19 g/mol e fórmula molecular $C_8H_{14}N_3O_6P$. Apresenta-se como um pó cristalino branco e funde-se a temperatura de 260°C (Zabawski, 2000; The Index Merck, 2001).

Figura 1

Esse fármaco possui um amplo espectro antiviral, agindo contra diferentes patógenos dentre eles o citomegalovirus, papillomavirus humano, herpes simplex vírus, varicella-zoster vírus, Epstein-barr vírus, human herpes vírus-6, -7, -8, poxvirus, poliomavirus e adenovirus (Bonatti et al., 2007).

A utilização clínica do cidofovir foi autorizada em 1996 pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de retinite por citomegalovírus em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida e está disponível na forma de solução para perfusão Vistide® (Gilead Sciences International).

Seu mecanismo de ação se dá através do metabolito ativo (difosfato de cidofovir) que age por inibição competitiva pelo substrato da enzima DNA polimerase que o vírus utiliza para se replicar. Ao contrário do aciclovir e ganciclovir, o cidofovir não precisa passar pela etapa inicial de fosforilação para ser ativada, reação essa catalisada pela enzima timidina cinase codificada pelo vírus (Cundy et al., 1997). De acordo com Toro et al. (2000), o cidofovir também pode ser incorporado à porção terminal da cadeia de DNA viral do citomegalovirus. No mais, como um mecanismo adicional ou alternativo, esse fármaco pode ainda inibir a proliferação de células infectadas pelo HPV induzindo a apoptose e sua ação prolongada deve-se ao longo tempo de meia-vida de seus metabólitos ativos favorecendo uma melhor adaptação posológica através de doses menos freqüentes (De Clercq, 2003).

Após administração oral (V.O), subcutânea (S.C) e intravenosa (I.V) do cidofovir, foi verificado uma biodisponibilidade menor que 5,3% para V.O comparada com a I.V na concentração de 10mg/kg, sendo considerada muito baixa em virtude da pouca permeabilidade do grupo fosfonato na mucosa intestinal. A administração S.C apresentou uma biodisponibilidade de 98,5% quando comparada com a via I.V,

sendo a dosagem máxima tolerada de 3mg/kg. Maiores concentrações provocam dor local e fibrose transitória (Wachsman et al., 1996).

O efeito adverso mais pronunciado provocado pelo cidofovir foi a nefrotoxicidade (relatado também por Jacobsen & Sifontis (2010), em 25,6% dos pacientes submetidos a transplante de células-tronco), fortemente relacionado à sua ação sistêmica, sendo observado em apenas um único caso relacionado às aplicações intralesionais e tópicas (Wachsman et al., 1996; Jacobsen & Sifontis, 2010; Zabawski, 2000; Mattelli, 2001). Nessas, por sua vez, podem ocorrer eventuais vermelhidão, ardor e dor local que geralmente desaparecem durante o período de descanso inserido nos ciclos de tratamento tópico (De Clercq, 2003). Diante dos efeitos adversos sistêmicos, deve-se ter cautela em relação à sua administração endovenosa, visto que a nefrotoxicidade cumulativa ocasionada pelo fármaco é dose-limitante (Jacobsen & Sifontis, 2010). Outro evento adverso relatado foi o desenvolvimento de displasia durante tratamento de papilomatose respiratória recorrente (RRP). No entanto, não foi comprovado o potencial carcinogênico do fármaco, visto que o índice de desenvolvimento de degenerações malignas espontâneas encontrou-se entre 2 -3% (Broekema & Dikkers, 2008). Mesmo diante dos relatos relacionados à nefrotoxicidade provocada pelo uso do cidofovir, em estudo publicado por Brardi et al. (2009) avaliando a utilização do mesmo por via intravenosa em crianças e adolescentes portadoras de adenovírus, foi demonstrado ser o cidofovir um fármaco seguro e bem tolerado, visto que dos vinte e três pacientes participantes deste estudo, apenas dois apresentaram nefrotoxicidade cumulativa e nenhum necessitou de terapia renal substituída.

Estudos pré-clínicos relatados na literatura demonstraram que a aplicação tópica de solução do cidofovir 1% inibiu ou preveniu o desenvolvimento de

papilomas, quando aplicado em coelhos inoculados com papilloma vírus (Duan et al., 2000). Já de acordo com Cundy et al. (1997), a adição de 10% de propilenoglicol ao gel de hidroxietilcelulose contendo 1% do ativo facilitou a permeação do cidofovir na pele de coelhos, sendo uma importante informação quando do desenvolvimento e padronização de formulação para uso tópico.

Em relação aos efeitos colaterais, estudos realizados em coelhos e ratos evidenciam efeitos embriotóxicos, recomendando a Agência Européia de Medicamentos (EMA) a não utilização em mulheres grávidas.

Diversos estudos clínicos foram publicados relatando a eficácia do cidofovir frente a diversas infecções virais. Capaccio et al. (2009) avaliaram a utilização intralesional do cidofovir 0,5% após excisão cirúrgica de lesões papilomatosas nasais recorrentes em paciente HIV+ e Hepatitis C vírus+ verificando que não houve recidivas após 30 meses do último tratamento. Stragier et al. (2002) relataram quatro casos de pacientes submetidos à terapia com cidofovir (creme a 1% ou injeção intralesional de 2,5mg/mL) para o tratamento de lesões induzidas por HPV, resultando na regressão ou desaparecimento das lesões em três casos. Bjorandi et al. (2002), utilizaram o cidofovir em uma paciente submetida a transplante renal, imunodeprimida com infecção por polyomavirus (BKvírus) na forma de infusão, nas concentrações de 0,25mg/kg e 0,45mg/kg em solução salina e diminuição da imunossupressão, sendo verificado que após quatro meses de tratamento houve ausência do vírus no sangue e queda na carga viral encontrada na urina. Em adição as infecções virais, foi relatada ainda, a eficácia do cidofovir no tratamento de *Molluscum contagiosum* em crianças HIV+ após a administração tópica do cidofovir 3%. Após dois meses de tratamento estas lesões estavam curadas e não

apresentaram recidivas após 18 e 21 meses do término do tratamento (Toro et al, 2000) .

Dentre o amplo espectro antiviral do cidofovir, é importante salientar sua ação contra o vírus do papiloma humano. O HPV é um vírus pertencente à família Papovaviridae. Possui de 55nm de diâmetro, sem envelope, com 72 capsômeros, em um capsídeo com arranjo icosaédrico (Castro et al., 2004). Diversos tipos do vírus já foram identificados e estão associados às suas diferentes manifestações nas membranas das mucosas e na pele. Segundo Câmara et al. (2003), os tipos 1, 2, 3, 4, 10 estão associados a lesões benignas na pele. Os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 56, 66, 68 relacionam-se as lesões benignas nas mucosas anogenitais e os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58 associam-se as lesões malignas da mucosa anogenital. O alvo da infecção pelo HPV são as células mais profundas do tecido epitelial, alcançadas através de microlacerações ou fissuras epiteliais. As proteínas do capsídeo viral interagem com as proteínas da superfície celular favorecendo a penetração do vírus que perde seu capsídeo e expõe seu DNA ao núcleo da célula hospedeira (Câmara et al., 2003; Tancredi, 2007). Seu período de incubação é de duas a oito semanas influenciado pelo estado imunológico do indivíduo (Castro et al., 2004).

Estudos realizados em diferentes países evidenciaram a eficácia clínica da aplicação tópica do cidofovir em pacientes portadores de HPV (Tabela I). No Brasil, não existe referência sobre sua utilização tópica. No entanto, ressalta-se que Pontes et al. (2009), realizaram estudo clínico mediante a injeção local do cidofovir (intralesional após remoção das lesões) no tratamento de papilomatose laríngea recorrente em crianças.

Tabela 1

Conclusão

Diante do exposto, pode-se constatar que a utilização tópica do cidofovir é uma alternativa eficaz no tratamento de diversas infecções virais e particularmente, no tratamento de lesões associadas ao papillomavírus humano, como papilomas, verrugas vulgares, plantares e em particular condilomas acuminados.

Ao mesmo tempo, é necessário atenção ao fato de que todas as formulação tópicos (géis, cremes, pomadas) utilizadas nos estudos clínicos encontrados na literatura, foram preparadas a partir da forma farmacêutica injetável (Vistide®), como manipulações extemporâneas. Assim, é necessária a realização de um estudo de pré-formulação, buscando viabilizar o desenvolvimento de uma preparação segura e eficaz do cidofovir, para então confirmar os seus efeitos clínicos, correlacionando-os a estudos de liberação *in vitro* e *ex vivo* em células de Franz, avaliação de irritabilidade dérmica e avaliação de características da formulação como: reologia, espalhabilidade, pH e estabilidade.

Outro ponto a ser levado em consideração trata-se da sua utilização apenas quando outros recursos terapêuticos já tenham sido empregados sem obtenção de sucesso, observando-se que, após o tratamento com o cidofovir, além da alta taxa de cura, regressões parciais ou totais também foram relatadas. No mais, é importante a constatação de que a aplicação tópica desse fármaco não provoca efeitos colaterais sistêmicos.

Cidofovir: potent antiviral for the topical treatment of lesions associated with Human Papillomavirus?

Abstract

Genital warts are epithelial lesions induced by Human Papillomavirus (HPV). The techniques currently used to treat these lesions are painful and recurrences usually happen within a short time. An alternative would be to treat the topical use of cidofovir. Cidofovir is an antiviral drug approved by FDA for the treatment of cytomegalovirus retinitis. However, several studies have demonstrated the efficacy of this drug in the treatment of human papillomavirus (HPV), herpes simplex virus, varicella-zoster virus, Epstein-Barr virus, human herpes virus-6, -7, -8, poxvirus, and polyoma and adenovirus. With respect to infections caused by HPV, are reported in the literature therapeutic responses through the use of topical and intralesional cidofovir, through the use of extemporaneous formulations. Whereas currently the treatment of lesions caused by HPV are caustic, tender and with a short interval of recidivism, the use of topical cidofovir could be clinical alternative to conventional treatments, minimizing local side effects and avoiding the occurrence of adverse systemic effects. For both, there is need for standardization of a topical formulation, through study of pre-formulation, noting its stability and security, besides conducting other trials to confirm its effect in the treatment of HPV-associated lesions.

Keywords: cidofovir, Human Papillomavirus, antiviral, topical therapy.

Referências

Bonatti H, Aigner F, De Clercq E, Boesmueller C, Widschwendner A, Larcher C, Margreiter R, Schneeberger S.. Local administration of cidofovir for human papilloma virus associated skin lesions in transplant recipients. *Transpl Int* 2007; 20: 238–246.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do câncer. http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327. Acessado em 25/04/2011.

Broekema FI, Dikkers FG. Side-effects of cidofovir in the treatment of recurrent respiratory papillomatosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265: 871-879.

Bhadri VA, Lee-Horn L, Shaw PJ. Safety and tolerability of cidofovir in high-risk pediatric patients. *Transpl Infect Dis* 2009; 11: 373-9.

Bjorng O, Tveit H, Midtvedt K, Broch LU, Scott H, Andresen PA. Treatment of polyomavirus infection with cidofovir in a renal-transplant recipient. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 2023-25.

Camara GNNL, Cruz MR, Veras VS, Martins CRF. Os papilomavírus humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. *Universitas: Ciências de Saúde* 2003; 1:149-158.

Capaccio P, Ottaviani F, Cuccarini V, Corbellino M, Parravicini C, Menzo S. et al. Surgery and topic cidofovir for nasal squamous papillomatosis in HIV+ patient. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266: 937-9.

Castro TMPG, Neto CER, Scala KA, Scala WA. Manifestações orais associadas ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004; 70: 546-50.

Coremans G, Margaritis V, Snoeck R, Wyndaele J, De Clercq E, Geboes K. Topical cidofovir (HPMPC) is an effective adjuvant to surgical treatment of anogenital condylomata acuminata. *Dis Colon Rectum* 2003, 46:1103-7.

Cundy KC, Lynch G, Lee WA. Bioavailability and metabolism of cidofovir following topical administration to rabbits. *Antiviral Res* 1997; 35:113-122.

De Clercq E. Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 569-596.

Duan J, Paris W, Marte J, Roopchand D, Fleet TL, Cordingley MG. Topical effects of cidofovir on cutaneous rabbit warts: treatment regimen and inoculum dependence. *Antiviral Res* 2000; 46: 135-144.

EMA (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products). 1997. http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_Product_Information/human/000121/WC500052072.pdf Acessado em 18 de outubro de 2010.

Fracaro AM, et al. Transformação maligna de condiloma acuminado gigante em dois transplantados renais. *J Bras Nefrol* 2003; 25: 160-164.

Fridman FZ, Pessim SA. Tratamento da neoplasia intraepithelial vulvar com imiquimode. *Rev Bras Genitoscopia* 2009; 3: 84-87.

Geerinck K, Lukito G, Snoeck R, De Vos R, De Clercq E, Vanrenterghem Y. et al. A case of human orf in an immunocompromised patient treated successfully with cidofovir cream. *J Med Virol* 2001; 64:543-9.

Gunter J. Genital and perianal warts: new treatment opportunities for human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: S3-S11.

Jacobsen T, Sifontis N. Drug interactions and toxicities associated with the antiviral management of cytomegalovirus infection. *Am J Health-Syst Pharm* 2010; 67: 1417-25.

Koonsaeng S, Verschraegen C, Freedman R, Bossens M, Kudelka A, Kavanagh J. et al. Successful treatment of recurrent vulvar intraepithelial neoplasia resistant to interferon and isotretinoin with cidofovir. *J Med Virol* 2001; 64:195-8.

Lacey CJ, Garnett GP. Promising control of genital warts: but is elimination possible? *Lancet Infect Dis* 2011; 20: 4-6.

Mariño AT, González JRC, Bobo MTI, Rodríguez FA. Cidofovir topico para el tratamiento de verrugas plantares. 36th ESCP Symposium. Clinical Pharmacy. Estambul, Turquia, 25-27 Octubre 2007.

Matteelli A, Beltrame A, Graifemberghi S, Forleo MA, Gulletta M, Ciravolo G. Efficacy and tolerability of topical 1% cidofovir cream for the treatment of external anogenital warts in HIV-infected persons. *Sex Transm Inf* 2001, 28:343-6.

Muñoz RM, Prado E, Cisneros JM, Bautista FJ. et al. Gel de cidofovir al 1% en lesiones por papilomavirus en una paciente con inmunodeficiencia congênita. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28:209-210.

Nicolau SM. Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento. Projeto Diretrizes - Associação Médica Brasileira, Conselho Federal de Medicina, 2002.

Phelps WC, Alexander KA. Antiviral therapy for human papillomavirus: rationale and prospects. *Ann Intern Med* 1995; 123: 168-182.

Pincinato AL, Horta SHC, Ramacciotti Filho PR, Formiga GJS. Recidiva de lesões associadas ao HPV em pacientes HIV positivos após tratamento cirúrgico. Rev Bras Coloproct 2009; 29: 169-173.

Pontes P, Weckx LLM, Pignatari SSN, Fujita RR, Avelino MAG, Sato J. Aplicação local de cidofovir como tratamento adjuvante na papilomatose laríngea recorrente em crianças. Rev Assoc Med Bras 2009; 55: 581-586.

Stragier I, Snoeck R, De Clercq E, Van den Oord JJ, Van Ranst M. Local treatment of HPV-induced Skin lesions by cidofovir. J Med Virol 2002; 67: 241-245.

Snoeck R, Bossens M, Parent D, Delaere B, Degreef H, Van Ranst M. et al. Phase II, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of cidofovir topical gel for the treatment of patients with human papillomavirus infection. CID 2001; 33:597-602.

The Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 13^a ed. Merck e Co. Inc.: Whitehouse Station, New Jersey, 2001.

Tancredi ARC. Estudo clínico, epidemiológico, histológico de papilomas da mucosa oral e sua relação com o papilomavírus humano (HPV) através das técnicas de hibridização *in situ* e PCR [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2007. 13p.

Toro JR, Wood LV, Patel NK, Tuner ML. Topical cidofovir: a novel treatment for recalcitrant molluscum contagiosum in children infected with human immunodeficiency virus 1. Arch Dermatol 2000; 136: 983-5.

Tristram A, Fiander A. Clinical responses to cidofovir applied topically to women with high grade vulval intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005, 99:652-5.

Van Pachterbeke C, Bucella D, Rozenberg S, Manigart Y, Gilles C, Larsimont D. et al. Topical treatment of CIN 2+ by cidofovir: Results of a phase II, double-blind, prospective, placebo-controlled study. *Gynecol Oncol* 2009; 115:68-74.

Wachsman M, Petty BG, Cundy KC, Jaffe HS, Fisher PE, Pastelak A, Lietman PS. Pharmacokinetics, safety and bioavailability of HPMPC (cidofovir) in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Antiviral Res* 1996; 29:153-161.

Zabawski Jr EJ. A review of topical and intralesional cidofovir. *Dermatol Online J* 2000; 6:3.

FIGURA E TABELA

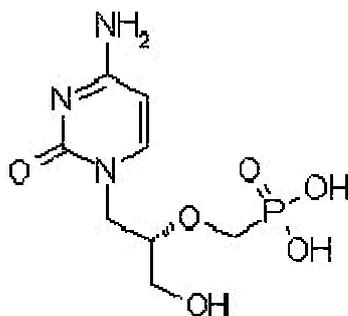


Figura 1- Estrutura química do cidofovir

Tabela 1: Estudos clínicos utilizando cidofovir tópico para tratamento de pacientes portadores de HPV.

AUTORES ANO LOCAL	ESTUDO REALIZADO	FORMA FARMACÊUTICA/ POSOLOGIA	EFEITOS ADVERSOS (EA)	RESULTADOS/ REINCIDÊNCIA/ OBSERVAÇÕES
Muñoz, R.M. et al, 2010/ Espanha	Estudo de caso: Tratamento de lesões por papiloma vírus em paciente imunodeprimida.	Gel 1%. Realizados 24 ciclos de duas semanas cada, com aplicação nos 5 primeiros dias e descanso nos 9 dias subsequentes.	Dor durante o primeiro ciclo.	Redução das lesões iniciais para 3,3% na mão esquerda e 1,5% na mão direita após o final dos ciclos.
Mariño, A.T. et al, 2007/ Espanha	Estudo de caso: Tratamento de lesões verrucosas nos pés por HPV em mulher transplantada.	Pomada 3% (Base Beeler) Aplicação durante dez semanas, sendo 2 vezes ao dia, em aplicações alternadas com vaselina salicilada.	Irritação local e ulcerações.	O tratamento foi suspensão devido aos EA. Uso de ácido salicílico pode ter contribuído para estes EA relatados.
Snoeck, R. et al, 2001/ Bélgica	Estudo clínico fase II, duplo-cego, controle com placebo. Tratamento de infecções genitais por HPV	Gel 1%. Aplicação em 19 pacientes durante 5 dias, 1 vez ao dia, seguida de observação por 1 semana em um total de 6 ciclos. Total 30 pacientes: 19 administraram o cidofovir contra 11 que administraram o placebo.	Dor, prurido e rash local em ambos os grupos (cidofovir e placebo).	Resposta completa em 47% dos pacientes que utilizaram o cidofovir comparado com nenhuma resposta para o grupo placebo.
Van Pachterbeke, C. et al, 2009/ Bélgica	Estudo clínico randomizado, duplo- cego. Tratamento de neoplasias intraepitelial cervical (CIN2+) em 48 mulheres.	Gel 2%. Aplicação 3 vezes por semana e conização após a sexta semana.	Erosão vaginal e queimação vulvo-vaginal.	Constatação que 60,8% dos cones retirados estavam livres das lesões.
Koonsaeng, S. et al, 2001/ Tailândia, EUA, Bélgica	Estudo de caso: Tratamento de neoplasia intraepitelial vulvar.	Pomada 1% (Base Beeler). Aplicação 1 vez ao dia, durante 5 dias, com 5 dias de descanso durante 5 meses.	Dor local e ulcerações.	Cura total das lesões após 5 meses de aplicações intermitente sem recidivas até 36 meses após o tratamento.
Geerinck, K et al, 2001/ Bélgica	Estudo de caso: Tratamento de dermatite pustular contagiosa na mão esquerda de paciente imunocomprometido.	Creme 1% (base Beeler). Utilização uma vez ao dia por 5 dias consecutivos e cinco dias de descanso (5 ciclos).	Não citado	Houve recorrência após 2 meses, sendo realizado um novo tratamento de dois ciclos de 9 dias. Após 1 ano, não houve recorrência.
Coremans, G. et al, 2003/ Bélgica	Estudo comparativo: Tratamento de condiloma acuminado onde 27 pacientes receberam o cidofovir e 20 tratados com remoção por coagulação.	Creme 1% (base Beeler). Aplicação durante 5 dias por 5 horas com intervalo de 1 semana. Durante 18 semanas ou até regressão visual das lesões.	Dor local e ulcerações.	O uso do cidofovir ocasionou regressão parcial ou total em 92% dos pacientes. A taxa de recorrência foi de 3,7% para o cidofovir contra 55% para os tratados com coagulação.

Bonatti, H. et al, 2007/ Áustria e Bélgica	Tratamento de papilomavirus associado a lesões de pele em pacientes transplantados.	<p>Caso 1-condiloma anal-Injeção intralesional e manutenção com gel durante 3 meses.</p> <p>Caso 2-Condiloma uretral-Injeção intralesional (4 aplicações) e imunossupressão com rapamicina.</p> <p>Caso 3-Condiloma vaginal, vulvar e anal- Injeção intralesional (4 aplicações) e imunossupressão com rapamicina.</p> <p>Caso 4-Verrugas vulgares nas mãos, pés e nariz- Pomada e injeção local.</p>	Não citado	<p>Caso 1-Recorrência após 1 ano, sendo tratado com remoção cirúrgica e imiquimod.</p> <p>Caso 2- Após 24 meses não houve recorrência.</p> <p>Caso 3- Após 4 meses houve recorrência apresentando Papanicolaou positivo (PAP) IV. Nova aplicação e após 6 meses ocorreu mudança no padrão de PAP IV para PAP II.</p> <p>Caso 4- Redução de verrugas com a modificação do imunossupressor.</p>
Tristam, A. et al, 2005/ Inglaterra	Estudo clínico em um total de 12 mulheres com Neoplasia intraepitelial anogenital.	Pomada 1%	Ulcerações sem efeitos visíveis nas proximidades da lesão.	Total de 4 mulheres apresentaram completa regressão, 5 resposta parcial, 2 sem resposta e 1 mulher apresentou uma evolução do caso.
Matteelli, A. et al, 2001/ Itália	Estudo piloto, randomizado, controlado com placebo. Tratamento de verrugas anogenitais em pacientes HIV+.	<p>Creme 1%.</p> <p>Aplicação uma vez ao dia por 5 dias durante 2 semanas.</p>	Erosão da mucosa	<p>Redução em mais de 50% na área das verrugas em 58% dos pacientes.</p> <p>Não houve resposta para uso do placebo.</p>