

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JÉSSICA BRANDÃO REOLON**

**“MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO FÁRMACOS  
ANTIVIRAIS: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,  
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* E DA ATIVIDADE  
ANTIVIRAL”**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Uruguaiana, RS, Brasil.**

**2016**

**JÉSSICA BRANDÃO REOLON**

**“MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO FÁRMACOS  
ANTIVIRAIS: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA,  
AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* E DA ATIVIDADE  
ANTIVIRAL”**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do Título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leticia Marques Colomé

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo André Bender

**Uruguiana**

**2016**

**JÉSSICA BRANDÃO REOLON**

**“MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO FÁRMACOS ANTIVIRAIS: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* E DA ATIVIDADE ANTIVIRAL”**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do Título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Letícia Marques Colomé

Dissertação defendida e aprovada em 28 de março de 2016.

Banca examinadora:

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Letícia Marques Colomé

(Orientadora)

(UNIPAMPA)

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Sandra Elisa Haas

(UNIPAMPA)

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Lisiane Bajerski

(UNIPAMPA)

**Uruguaiana**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

Se você está lendo esta página é por que eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui, do processo seletivo, passando pela aprovação até o dia em que conclui as escritas da dissertação, foi um longo caminho percorrido. E como diz o provérbio: “A sola do pé conhece toda a sujeira da estrada”. Venci! Mas jamais venceria e passaria por toda esta estrada sem a presença de muitas pessoas que contribuíram com a minha caminhada, pessoas estas que hoje merecem todo o meu reconhecimento.

À minha família, em especial a minha mãe Elenara, por não medir esforços na busca constante pelos meus sonhos, pela formação que me proporcionou e pelo incentivo constante. À minha tia Elenise, tio Aloísio, vó Clarinda, e pais Antônio e Volmir, por participarem de mais esta etapa na minha vida e por todas as demais oportunidades que me concederam.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Letícia Marques Colomé, pela confiança e oportunidade de trabalhar ao seu lado, transmitindo-me todos os seus conhecimentos. Levo comigo todos os teus ensinamentos, sejam eles profissionais ou pessoais, e espero encontrar em ti sempre uma palavra amiga e inspiração para subir os próximos degraus da vida acadêmica.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Eduardo André Bender, pelos ensinamentos transferidos e pelas atenciosas considerações dedicadas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores colaboradores deste trabalho: Prof. Dr. Marcelo D. Malesuik, pela disponibilidade e os grandiosos ensinamentos nos experimentos relacionados à validação, e Prof. Dr. Mário C. S. Brum, por me receber juntamente com seus alunos no laboratório de virologia aceitando nosso convite para viajar no mundo nanotecnológico, e engrandecendo em muito meus conhecimentos na área da virologia.

Aos professores e colegas do laboratório 105, por acompanharem de perto o desenvolvimento deste trabalho, compartilhando dúvidas, conhecimentos, aprendizados e momentos de descontração. Em especial à

Tamara, Graziela e Eduarda pelo companheirismo, parceria científica e pela amizade verdadeira, tornando os dias no laboratório mais agradáveis.

Ao Matheus pelo seu amor, pela compreensão nos momentos difíceis e incentivo incondicional.

Aos colegas e amigos feitos ao longo da graduação e pós-graduação, em especial a Maria Fernanda, Maicon, Luana, Willian, Fernanda, Carmem, Renata, Gaya, pela troca de conhecimentos, incentivo nos melhores e piores momentos do mestrado e pelos momentos de descontração. Vocês são um presente que a vida acadêmica carinhosamente me deu e que espero levar para a vida toda.

À CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos. À UNIPAMPA, instituição que me recebeu como aluna durante toda a graduação e mestrado.

A todos que de forma direta, ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O herpesvírus simples (HSV) é um importante problema de saúde pública em vários países provocando ulceração genital. Dentre o arsenal terapêutico para o tratamento da infecção por HSV destaca-se o aciclovir (ACV). No entanto, este apresenta limitações no seu uso como um tempo de meia-vida curto e uma baixa solubilidade aquosa. A curcumina (CUR) é um composto natural que vem demonstrando diversas atividades terapêuticas, dentre estas a atividade antiviral, porém o seu uso por via oral também é comprometido pela baixa solubilidade em água. A encapsulação em micropartículas poliméricas (MPs) é uma abordagem farmacotécnica que podem superar as dificuldades do uso terapêutico destes dois compostos. Em vista disto, o presente trabalho visou desenvolver e caracterizar MPs pelo método de aspersão compostas por HPMC e Eudragit<sup>®</sup> RS100 como materiais poliméricos, além de manitol como adjuvante de secagem. Os resultados demonstraram que o método de preparo por aspersão (*spray drying*) apresentou um rendimento em torno de 50% para todas as formulações desenvolvidas, mostrando um fluxo tecnológico mais vantajoso para as partículas sem manitol. O doseamento demonstrou teores de 82 a 99% e de 81 a 94%, para ACV e CUR, respectivamente. A análise granulométrica mostrou micropartículas de tamanho micrométrico entre 8,7 e 15,3  $\mu\text{m}$ . A análise morfológica evidenciou o formato esférico e confirmou o resultado das análises de tamanho. A espectroscopia na região do infravermelho mostrou uma sobreposição dos espectros obtidos pelos componentes isolados indicando boa compatibilidade entre os materiais. O perfil de liberação *in vitro* permitiu observar que as MPs foram capazes de controlar a liberação e melhorar a solubilidade dos compostos, destacando-se, neste quesito, as MPs compostas por HPMC. A avaliação preliminar da atividade antiviral *in vitro* demonstrou que a associação de ACV e CUR possui um efeito sinérgico frente ao vírus BoVH-1, sendo que as MPs foram capazes de potencializar este efeito. Neste contexto, as MPs mostraram-se sistemas promissores para a veiculação de ACV e CUR por via oral, com elevado potencial para constituir um tratamento alternativo para o herpes viral.

**Palavras-chave:** Herpes simples, micropartículas, aciclovir, curcumina, spray-drying, liberação controlada.

## ABSTRACT

The herpes simplex virus (*HSV*), also known as human herpes virus, infects humans causing mainly genital and labial ulcerations. Among the drugs available for the treatment of HSV infection the acyclovir (ACV) is an effective antiviral drug. However this drug presents limitations in its use due to the short half-life and low water solubility. Curcumin (CUR) has demonstrated several therapeutic activities, including antiviral activity, but the oral administration of this natural compound is also compromised by low solubility. The polymeric microparticles (MP) are a pharmacotechnical approach that modifies the pharmacokinetics of the compounds and offers a possibility to overcome the difficulties of the therapeutic use. In view of this, this study aimed to develop MPs by spray drying method composed of HPMC and Eudragit® RS100 as polymeric materials, and mannitol as drying material. The results showed a yield around 50% for all developed formulations and a better technological flow rate for the particles without mannitol. The assay showed levels 82-99 and 81% to 94%, to ACV and CUR, respectively. The particle size analysis showed microparticles micrometric size between 8.7 and 15.3 micrometers. Morphological analysis showed the spherical shape and confirmed the results of size analysis. Spectroscopy in the infrared showed an overlap of the spectra obtained by the individual components indicating good compatibility between the materials. The in vitro release profile observed that the PMs were able to control the release and improved the solubility of the compounds, especially when composed of HPMC. Besides, an in vitro preliminary assessment of antiviral activity demonstrated that the combination of ACV and CUR presented a synergistic effect against BoVH-1 virus, and the MPs were able to enhance this effect. The MPs showed to be promising systems for the oral administration of ACV and CUR and could be an improved alternative treatment for viral herpes.

**Keywords:** Herpes simplex, microparticles, acyclovir, curcumin, spray-drying, controlled release.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do aciclovir (STULZER <i>et al.</i> , 2009).....	23
Figura 2. Estrutura química da curcumina (PARIZE, 2009).....	24
Figura 3. Representação esquemática para microencapsulação de ativos em microcápsulas e microesferas (PARIZE, 2009).....	27
Figura 4. Figura esquemática do processo de microencapsulação por aspersão (LABMAQ, 2003).....	28
Figura 5. Cromatograma obtido a partir do padrão de ACV e CUR com a fase móvel eleita para a validação do método analítico.....	50
Figura 6. Cromatograma obtido a partir da amostra de micropartículas placebo (A), e cromatograma obtido a partir da amostra de micropartículas contendo ACV e CUR (B). .....	52
Figura 7. Imagens das micropartículas MP1 (A) e MP1-M (B) .....	57
Figura 8. Perfil de distribuição granulométrica das formulações de micropartículas MP1 (A), MP1-M (B), ACV livre (C) e CUR livre (D).....	63
Figura 9. Imagens obtidas por microscopia de força atômica das micropartículas MP1-M (A), MP1 (B), MP2-M (C), MP2 (D), MP3-M (E) e MP3 (F).....	67
Figura 10. Espectros de absorção na região do infravermelho de ACV, CUR, HPMC, eudragit <sup>®</sup> RS100, manitol, e formulações de micropartículas .....	70
Figura 11. Perfil de liberação <i>in vitro</i> do ACV (A) e CUR (B) na sua forma livre e a partir das micropartículas MP1, MP2 e MP3 .....	72
Figura 12. Perfil de distribuição granulométrica de CUR livre obtido por difratometria de laser.....	77
Figura 13. Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> de ACV, CUR e ACV+CUR em sua forma livre frente ao vírus BoHV-1.....	80
Figura 14. Avaliação da atividade antiviral <i>in vitro</i> de ACV, CUR, ACV+CUR e micropartículas, na concentração 75 µg/mL.....	82
Figura 15. Ensaio antiviral utilizando células MDBK e herpesvírus bovino 1. A – controle celular, não tratado; B – células apresentando efeito citotóxico do composto; C – células infectadas com vírus (focos brancos) e D – tratamento com redução do número de focos infecciosos, ação da substância antiviral. ....	83



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição quali-quantitativa das micropartículas de ACV e CUR preparadas pelo método de aspersão .....	40
Tabela 2. Fatos de Hausner (FH) como indicativo de fluxo de pós .....	41
Tabela 3. Índice de Carr (IC) como indicativo de fluxo de pós .....	41
Tabela 4. Comparação entre tempos de retenção de ACV e CUR obtidos por diferentes proporções de fase móvel ACN:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% (55:45) .....	49
Tabela 5. Parâmetros de adequabilidade do sistema obtidos com fase móvel eleita.....	51
Tabela 6. Resultados referentes à linearidade do método .....	53
Tabela 7. Resultados referentes à determinação dos limites de Detecção e Quantificação para ACV e CUR .....	53
Tabela 8. Valores do teor para ACV e CUR, em porcentagem (%), e desvio padrão relativo (DPR) da avaliação de precisão intradia e interdia do método analítico.....	54
Tabela 9. Valores de porcentagem (%) de recuperação de ACV e CUR e DPR para as três concentrações testadas (5, 10 e 20 µg/mL para ACV e 5, 10 e 15 µg/mL para CUR), representando a exatidão do método .....	55
Tabela 10. Resultados de teor de ACV e CUR, em porcentagem (%), e DPR referente a cada uma das modificações cromatográficas realizadas no método .....	56
Tabela 11. Resultados referentes ao rendimento de preparo das formulações de micropartículas contendo ACV e CUR obtidas por aspersão .....	58
Tabela 12. Resultados das características de fluxo para cada formulação de micropartículas .....	59
Tabela 13. Teores expressos em porcentagem de recuperação para ACV e CUR a partir das micropartículas .....	61
Tabela 14. Distribuição granulométrica por difratometria de laser das micropartículas e ativos livres aspergidos.....	65
Tabela 15. Parâmetros da modelagem matemática da dissolução/liberação do ACV livre e associada a MP1 e MP2 utilizando as equações monoexponencial e biexponencial .....	75
Tabela 16. Parâmetros da modelagem matemática da dissolução/liberação da CUR livre e associada a MP1 e MP2 utilizando as equações monoexponencial e biexponencial .....	77
Tabela 17. Parâmetros de modelagem matemática da dissolução de ACV e CUR associados a MP1 e MP2 utilizando o modelo de Lei das Potências .....	79

Tabela 18. Número de PFU formados quando aplicados os tratamentos com os ativos livres e microencapsulados, em várias concentrações .....	81
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACV: Aciclovir;

CUR: Curcumina;

HSV: Herpesvírus simples humano

DMSO: dimetilssulfóxido

HPMC: hidroxipropilmetilcelulose;

EUD RS100: Eudragit<sup>®</sup> RS100;

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência;

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

LD: Limite de Detecção;

LQ: Limite de Quantificação;

ACN: acetonitrila;

MEoH: Metanol;

DPR: Desvio padrão relativo;

TR: Tempo de Retenção;

MP1: formulação de micropartículas contendo ACV e CUR composta por HPM<sup>®</sup> e Eudragit<sup>®</sup>;

MP1-M: formulação de micropartículas contendo ACV e CUR composta por HPMC, Eudragit<sup>®</sup> e manitol;

MP2: formulação de micropartículas contendo ACV e CUR composta por HPMC;

MP2-M: formulação de micropartículas contendo ACV e CUR composta por HPMC e manitol;

MP3: formulação de micropartículas contendo ACV e CUR composta por Eudragit®;

MP3-M: formulação de micropartículas contendo ACV e CUR composta por Eudragit® e manitol;

MP1-M-BR: formulação de micropartículas MP1-M placebo;

MPs: micropartículas;

dB: Densidade bruta;

dC: Densidade de compactação;

FH: Fator de Hausner;

IC: Índice de Carr;

AFM: Microscopia de força atômica;

ED: Eficiência de Dissolução;

MEM: Meio essencial mínimo;

PFU: Unidade formadora de placa;

ECP: Efeito citopático;

DP: Desvio padrão;

CI: Bisdesmetoxicurcumina;

CII: Demetoxicurcumina;

ANOVA: Análise de Variância.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>20</b>
3.1 Herpesvírus simples .....	20
3.2 Aciclovir e o tratamento do herpes viral.....	22
3.2 Curcumina .....	24
3.2 Micropartículas poliméricas como sistemas de liberação para fármacos por via oral.....	26
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 Materiais.....	34
4.1.1 Matérias-primas.....	34
4.1.2 Aparelhos e equipamentos.....	34
4.1.3 Solventes, reagentes e outros materiais .....	35
4.2 Métodos.....	36
4.2.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de ACV e CUR por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) presente nas micropartículas .....	36
4.2.1.1 Condições cromatográficas .....	36
4.2.1.2 Preparo da solução padrão .....	36
4.2.1.3 Preparo da solução amostra.....	37
4.2.1.4 Especificidade .....	37
4.2.1.5 Linearidade.....	37
4.2.1.6 Limite de detecção e Limite de quantificação .....	38
4.2.1.7 Precisão .....	38

4.2.1.8 Exatidão .....	38
4.2.1.9 Robustez .....	39
4.2.2 Preparação das micropartículas .....	39
4.2.3 Caracterização físico-química das micropartículas .....	40
4.2.3.1 Rendimento .....	40
4.2.3.2 Caracterização do fluxo tecnológico de pós .....	40
4.2.3.3 Doseamento de ACV e CUR nas micropartículas .....	42
4.2.3.4 Análise granulométrica das micropartículas .....	42
4.2.3.5 Avaliação morfológica das micropartículas .....	42
4.2.3.6 Avaliação de espectroscopia na região do infravermelho .....	43
4.2.3.7 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	43
4.2.3.7.1 Experimentos prévios ao ensaio de liberação <i>in vitro</i> .....	43
4.2.3.7.2 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	44
4.2.3.7.3 Avaliação estatística e modelagem matemática dos perfis de liberação.....	45
4.2.3.8 Avaliação preliminar da atividade antiviral <i>in vitro</i> .....	46
4.2.3.8.1 Cultivo de células e vírus.....	46
4.2.3.8.2 Preparo das suspensões de tratamento .....	47
4.2.3.8.3 Avaliação da atividade antiviral .....	47
4.2.3.9 Análises estatísticas .....	48
<b>5 Resultados e Discussão .....</b>	<b>49</b>
5.1 Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de ACV e CUR por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) presente nas micropartículas .....	49
5.1.1 Desenvolvimento do método analítico .....	49
5.1.2 Especificidade .....	51
5.1.3 Linearidade.....	52
5.1.4 Limite de detecção e Limite de quantificação .....	53

5.1.5 Precisão .....	53
5.1.6 Exatidão .....	55
5.1.7 Robustez .....	55
5.2 Preparação das micropartículas .....	56
5.3 Caracterização físico-química das micropartículas .....	57
5.3.1 Rendimento .....	57
5.3.2 Caracterização do fluxo tecnológico de pós .....	58
5.3.3 Doseamento de ACV e CUR nas micropartículas .....	60
5.3.4 Análise granulométrica das micropartículas .....	62
5.3.5 Avaliação morfológica das micropartículas .....	65
5.3.6 Avaliação de espectroscopia na região do infravermelho .....	67
5.3.7 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	71
5.3.8 Avaliação preliminar da atividade antiviral <i>in vitro</i> .....	79
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>86</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O herpes genital é considerado uma doença sexualmente transmissível que causa ulcerações. Apresenta uma prevalência de 10 a 60% da população em países desenvolvidos, sendo que os maiores índices são identificados no continente africano e na América (CORTINA *et al.*, 2008). O herpes genital não apresenta, até o momento, um tratamento que leve a sua cura, sendo que a terapêutica existente tem como objetivo antecipar a resolução do processo, acelerando a cicatrização das úlceras e diminuindo a carga viral, evitando também o surgimento de novas lesões (JALÓN *et al.*, 2003).

Os nucleosídeos análogos são os medicamentos de primeira linha para suprimir a infecção por herpes (FIELD *et al.*, 2013). Entre os nucleosídeos análogos, encontra-se o aciclovir (ACV), sendo o fármaco de primeira escolha por apresentar elevada eficiência e segurança quando utilizado no tratamento das ulcerações (GELLER *et al.*, 2012).

Este fármaco pertence à classe IV da Classificação Biofarmacêutica Internacional (CBI), caracterizando-se por baixa hidrossolubilidade e permeabilidade, que acabam por comprometer a biodisponibilidade, especialmente em formas de dosagens orais (BARBOZA *et al.*, 2010). Outra limitação no uso do ACV é o tempo de meia-vida biológica curto, o que leva à necessidade de várias administrações diárias do medicamento.

Diante destas limitações, o ACV vem se tornando alvo de inúmeras pesquisas em tecnologia farmacêutica, a fim de melhorar as características de solubilidade e biodisponibilidade quando administrado pela via oral (DHALIWAL *et al.*, 2008).

Nesta perspectiva, STULZER e colaboradores (2009) desenvolveram formulações microparticuladas contendo ACV pelo método de *spray-drying*, avaliando diferentes proporções do polímero (quitosana), do agente reticulante e do fármaco, bem como seus efeitos sobre a liberação sustentada. As micropartículas apresentaram perfis de liberação controlada, os quais foram muito semelhantes entre si, mesmo alterando-se as proporções dos componentes da formulação.



A curcumina (CUR), extraída da curcuma, é um composto que vem sendo amplamente estudado devido a suas inúmeras propriedades farmacológicas, como ação anti-neoplásica, antiinflamatória, antioxidante, antimicrobiana e antiviral (JOSHI *et al.*, 2010; KUTLUAY *et al.*, 2008). A CUR é um composto de baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade, o que reduz a sua biodisponibilidade e pode comprometer a sua administração por via oral. Além disso, a CUR apresenta uma elevada instabilidade fotoquímica (HEGER *et al.*, 2014).

Por estas razões, este composto tem sido alvo constante de formulações farmacêuticas inovadoras, visando desenvolver sistemas capazes de evitar sua degradação frente à luz e melhorar as suas características de solubilidade, a fim de melhorar sua biodisponibilidade e possibilitar sua administração por via oral.

Um exemplo é o trabalho de LI e colaboradores (2013), que propuseram o desenvolvimento de micropartículas poliméricas contendo CUR pelo método de aspersão, utilizando derivados de celulose como material polimérico. Os resultados demonstraram que as micropartículas obtidas proporcionaram maior estabilidade química e um perfil de liberação controlada do ativo.

Considerando-se o potencial antiviral de CUR, bem como a possibilidade de desenvolvimento de formulações inovadoras contendo este composto, considera-se vantajoso o desenvolvimento de sistemas microparticulados contendo ACV em associação com CUR, visando aumentar a atividade antiviral, bem como solucionar os problemas de solubilidade e biodisponibilidade por via oral destes dois compostos.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas microparticulados para veiculação de ACV associado à CUR. Pretende-se que as micropartículas desenvolvidas sejam capazes de melhorar as características de liberação destes dois compostos, bem como aumentar a atividade antiviral através da associação, melhorando assim a eficácia do tratamento do herpes viral.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Preparar e caracterizar micropartículas poliméricas contendo aciclovir e curcumina, visando obter um sistema de liberação modificada vantajoso para a administração oral destas substâncias, constituindo-se em uma terapia alternativa para o tratamento contra o herpesvírus simples 1 e 2.

### 2.2 Objetivos específicos

- Preparar sistemas multiparticulados por aspersão utilizando como polímeros a hidroxipropilmetilcelulose e o copolímero de metacrilato de amônio, empregando como adjuvante de secagem o manitol, a fim de constituir sistemas de liberação modificada para veiculação do aciclovir associado à curcumina;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para quantificação simultânea dos dois ativos por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Caracterizar as micropartículas obtidas quanto ao rendimento de preparo, doseamento dos ativos, tamanho de partícula, morfologia e compatibilidade entre os componentes da formulação, visando avaliar a adequabilidade para serem utilizados como sistemas carreadores;
- Avaliar as características de fluxo de pós das micropartículas a fim de verificar sua potencialidade para serem intermediários na preparação de formas farmacêuticas sólidas monolíticas;
- Realizar ensaios de liberação *in vitro* com o objetivo de avaliar a capacidade das micropartículas de contornar as limitações dos ativos em termos de dissolução e disponibilidade para absorção;

- Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das micropartículas, visando observar se a associação de ACV e CUR pode ser vantajosa quanto a um possível efeito sinérgico, e ainda se a atividade biológica dos ativos é mantida quando estes são carregados nas micropartículas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Herpesvírus simples

As infecções pelo vírus do herpes ainda representam um desafio clínico no século 21, notando-se desde a década de 90 um aumento da prevalência desta infecção em humanos em diversos países (JALÓN *et al.*, 2003). Sua ocorrência pode estar associada ao crescimento do número de pacientes imunodeprimidos e aumento do número de transplantes e tratamentos quimioterápicos agressivos (GELLER *et al.*, 2012). Devido ao aumento exacerbado no número de casos, o herpesvírus simples 2, responsável pela infecção genital tem se mostrado um importante problema de saúde pública em todo o mundo (CORTINA *et al.*, 2008).

Até o momento, pelo menos oito espécies distintas do vírus do herpes foram identificadas, atribuídas a três subfamílias: *Alpha-*, *Beta-* e *Gamma-herpesvirinae*. Uma característica marcante dos herpesvirus é a capacidade de estabelecer infecção latente no hospedeiro. Nesta situação, não ocorre replicação viral e produção de partículas infecciosas. A reativação da infecção latente é caracterizada pela retomada do ciclo de replicação viral, formação de novas partículas e excreção viral e associação com recrudescência clínica. Após a resolução da infecção primária, o vírus latente se instala em gânglios de neurônios sensoriais onde permanecerá até um novo período de reativação. Quando a reativação acontece o vírus se desloca até a região periférica, dando origem a novas lesões localizadas nas mucosas (FIELD *et al.*, 2013).

O herpesvírus humano 1 e 2, formalmente denominado de vírus do herpes simples, pertence à subfamília *Alpha-herpesvirinae*, sendo uma característica da infecção primária por este vírus as lesões localizadas geralmente em áreas orofaciais (HSV-1) e genitais (HSV-2). O herpesvírus possuem genoma DNA com aproximadamente 80 genes que codificam diversas proteínas com atividades estruturais, enzimáticas e que auxiliam na replicação do vírus (GELLER *et al.*, 2012).

Normalmente, o HSV-1 é contraído na infância e adolescência por contato direto por via oral, sendo que alguns estudos recentes demonstraram que o HSV-1 tem sido indicado também como um agente causador do herpes genital em alguns países desenvolvidos. Já a infecção por HSV-2 tem maior ocorrência em adolescentes e adultos sexualmente ativos, sendo que a transmissão pode se dar a partir de pessoas sintomáticas e também assintomáticas (PELLEGRINI *et al.*, 2010).

Alguns estudos epidemiológicos demonstraram uma interação importante entre infecções por HSV, papiloma vírus humano (HPV) e vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (CELUM *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2002). A presença das ulcerações genitais pode favorecer aquisição, excreção e transmissão de HIV, podendo também acelerar a progressão da doença. Ainda, observou-se um aumento no risco de desenvolvimento de carcinoma cervical invasivo em mulheres positivas para HPV (SMITH *et al.*, 2002). A prevalência de infecções pelos vírus HSV-1 e HSV-2 ficam entre 10% e 60% da população em países desenvolvidos, sendo os maiores índices identificados nos continentes africano e americano (CORTINA *et al.*, 2008).

CLEMENS e FARHAT (2010) estimaram a soroprevalência para os vírus do herpes simples (HSV-1 e HSV-2) no Brasil, sendo que o estudo incluiu a população de diferentes regiões do país, avaliando-se também alguns fatores associados à infecção. Os resultados mostraram que a soroprevalência foi de 67,2% e 11,3% da população avaliada, para o HSV-1 e HSV-2, respectivamente. O estudo ainda demonstrou que o aumento do índice está bastante associado com o aumento da idade, bem como com algum histórico anterior de doença sexualmente transmissível (DST).

O diagnóstico é feito através das características clínicas associadas às confirmações laboratoriais da infecção. O diagnóstico laboratorial para HSV tem aplicação complementar para manifestações comuns causadas pelo vírus, destacando-se a importância da sua realização em indivíduos imunocomprometidos, transplantados, gestantes, recém-nascidos, e em suspeita de encefalites herpéticas (PELLEGRINI *et al.*, 2010).

A dimensão da ocorrência principalmente do herpes genital e o fato de portadores com infecção assintomática serem, aparentemente, responsáveis pela maioria das transmissões, sugerem que o melhor recurso para controle da infecção seria o desenvolvimento de vacinas profiláticas (FIELD *et al.*, 2013; XU *et al.*, 2006). Porém, até o momento, a vacina para HSV com desenvolvimento mais avançado demonstrou, em dois estudos clínicos, uma elevada eficácia na prevenção da doença genital herpética somente em mulheres.

O herpes genital não apresenta até o momento um tratamento que leve a sua cura, sendo que o tratamento existente tem como alvo antecipar a resolução do processo, acelerando a cicatrização das úlceras e diminuindo a excreção viral, evitando também o surgimento de novas lesões (STULZER *et al.*, 2009). Os nucleosídeos análogos são os medicamentos de primeira linha para suprimir a infecção por herpes, dentre eles, o aciclovir é o fármaco de primeira escolha para o tratamento (CORTINA *et al.*, 2008; GELLER *et al.*, 2012).

### **3.2 Aciclovir no tratamento do herpes viral**

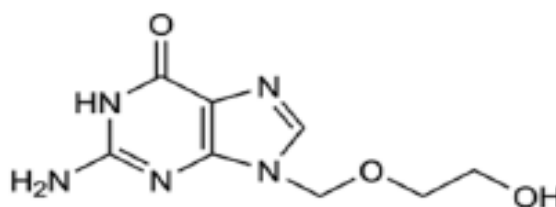
O aciclovir (9-[2-hidróxi-etóxi-metil] guanina) (ACV) foi descoberto em 1977, sendo este o marco no desenvolvimento de terapias voltadas ao tratamento de infecções causadas pelos vírus do grupo do herpes simples (FIELD *et al.*, 2013). Dentre o arsenal terapêutico disponível para o tratamento paliativo do herpes simples humano, o ACV é o fármaco de primeira escolha, tendo em vista sua elevada eficiência e segurança no tratamento das lesões causadas tanto pelo HSV-1 quanto pelo HSV-2 (GELLER *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação do ACV baseia-se na ação seletiva sobre a replicação do DNA do vírus do herpes, permanecendo na forma inativa até o contato com as células infectadas com o HSV-1 ou HSV-2. Após este contato, o ACV é rapidamente fosforilado por ação da enzima viral timidina quinase (TK), tornando-se um monofostato (ACV-MP). O ACV-MP passa então por uma série de fosforilações por ação de enzimas celulares, adquirindo então sua forma trifosfatada (ACV-TP), sendo esta a forma ativa do fármaco que é

incorporada a cadeia de DNA viral impedindo a continuação de sua replicação (PELEGRINI *et al.*, 2013).

O ACV (Figura 1) apresenta-se como um pó branco e cristalino, com baixa solubilidade em água, insolúvel em álcool e ligeiramente solúvel em soluções diluídas ácidas ou básicas, o que é relacionado aos seus valores de constantes de dissociação, sendo eles 2,3 e 9,2 (STULZER *et al.*, 2008<sup>A</sup>).

Figura 1. Estrutura química do aciclovir (STULZER *et al.*, 2009).



Atualmente, o ACV é comercializado no mercado sob a forma de creme na dose de 50mg/g e comprimidos na dose de 200 e 400mg. A administração por via tópica geralmente é empregada somente em quadros mais brandos e iniciais da infecção, após o surgimento de rubor e erupções emergentes. Já em quadros mais evoluídos das lesões, recomenda-se o uso por via oral (GELLER *et al.*, 2010; NETO *et al.*, 2006).

Apesar da via oral representar uma via de administração mais cômoda para o paciente, o ACV apresenta inúmeras limitações quando administrado desta forma (JALÓN *et al.*, 2003). A baixa solubilidade e permeabilidade, o tempo de meia-vida de aproximadamente uma a duas horas associado a uma elevada taxa de excreção por via renal, comprometem acentuadamente o tratamento com ACV quando administrado por via oral (BARBOZA *et al.*, 2010; STULZER *et al.*, 2008).

Estas limitações ficam claras ao se observar a posologia do fármaco administrado por via oral, sendo que para o primeiro episódio de herpes genital deve-se iniciar o tratamento o mais precocemente possível com ACV 200 mg, a cada 4 horas, com no máximo cinco doses diárias por sete dias, ou 400 mg via

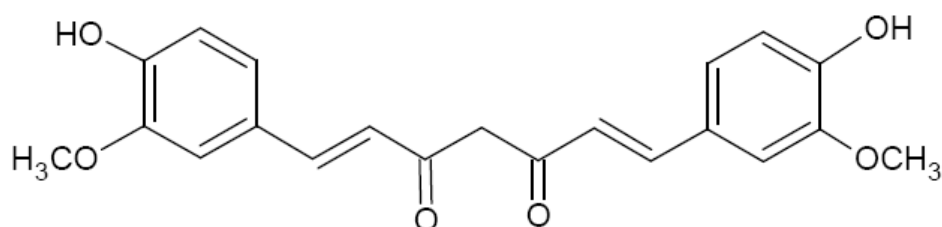
oral, a cada 8 horas por sete dias (JUNIOR *et al.*, 2009). Apesar das limitações de uso por via oral, sua administração por via parenteral não é recomendada devido à ocorrência de insuficiência renal aguda, sendo esta causada pela precipitação intratubular de cristais do fármaco (NETO *et al.*, 2007).

Em virtude de suas limitações, o ACV tem sido alvo constante de inúmeras pesquisas voltadas ao desenvolvimento industrial farmacêutico, a fim de melhorar características de solubilidade e permeabilidade quando administrado pela via oral. Dentre estes estudos, destaca-se o uso de sistemas microparticulados, onde micropartículas são obtidas por métodos diversos utilizando-se polímeros com características de liberação controlada (STULZER *et al.*, 2009; DHALIWAL *et al.*, 2008, JALÓN *et al.*, 2003).

### 3.3 Curcumina

A Curcuma (*Curcuma longa* L.), conhecida popularmente como açafrão da terra ou gengibre amarelo, trata-se de uma planta herbácea da família *Zingiberaceae*. Na sua composição estão presentes, entre outros, os chamados pigmentos curcuminóides e óleos essenciais (HEGER *et al.*, 2014). Dentre os curcuminóides que podem ser extraídos da Curcuma, encontra-se a curcumina (CUR) (Figura 2) que é isolada a partir do rizoma da planta.

Figura 2. Estrutura química da curcumina (PARIZE, 2009).



A CUR (1,7-bis[4-hidroxi-3-metoxifenil]-1,6-heptadieno-3,5-diona) apresenta-se como um pó cristalino de coloração amarela a castanho, com



baixa solubilidade em água e soluções aquosas ácidas, apresentando no entanto boa solubilidade em meio básico e solventes como etanol, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO) e clorofórmio. O composto apresenta três valores de pKa (8,3, 9,5 e 10,5) e ponto de fusão na faixa de 170 a 177°C (PARIZE, 2009; BERNABÉ-PINEDA *et al*, 2004).

. A CUR já demonstrou ter ações anti-neoplásicas, antiinflamatórias, antioxidantes, efeitos antibacteriano, antifúngico e antiviral (YALLAPU *et al.*, 2012; JOSHI *et al*, 2010; KUTLUAY *et al.*, 2008). Quanto à sua atividade antiviral, BOURNE e colaboradores (1999) demonstraram *in vivo* o efeito profilático da CUR frente ao vírus do herpes genital (HSV-2) quando esta foi administrada previamente à infecção em camundongas *Swiss Webster*. ZANDI e colaboradores (2010) demonstraram a atividade antiviral *in vitro* contra HSV-1 (herpes labial) de CUR e derivados utilizando culturas celulares e técnica de inibição citopática. Observou-se diminuição da ocorrência de efeito citopático conforme aumentou-se a concentração do ativo, sendo demonstrada atividade antiviral tanto da CUR como de seus derivados, os quais mostraram-se agentes promissores contra o HSV-1.

Embora o mecanismo de ação antiviral da CUR não esteja bem elucidado, possivelmente este composto tenha uma ação envolvida nos mecanismos de expressão gênica do vírus, fazendo com que este tenha sua replicação comprometida, conforme demonstrado em estudo de KUTLUAY e colaboradores (2008) utilizando culturas celulares.

A despeito das inúmeras ações terapêuticas, a CUR é um composto de baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade, o que pode comprometer a sua administração por via oral, já que sua biodisponibilidade torna-se muito baixa. Além disso, a CUR apresenta uma elevada taxa de degradação em meio básico e frente à luz, tendo como principais produtos de degradação a vanilina, o ácido vanílico, o ácido ferúlico e o aldeído ferúlico (HEGER *et al.*, 2014, PARIZE *et al.*, 2012).

Por estas razões, este composto tem sido alvo do estudo de desenvolvimento de sistemas de liberação modificada, como os nanossistemas, visando possibilitar o uso da CUR por via oral, aumentando a sua solubilidade e permeabilidade e, conseqüentemente, a sua

biodisponibilidade por esta via (LI *et al.*, 2013; MAZZARINO *et al.*, 2012; SHAHANI *et al.*, 2011).

Tendo em vista o potencial antiviral da CUR contra o vírus do herpes e a importância do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas devido ao aumento da ocorrência de mecanismos de resistência viral (ZANDI *et al.*, 2010), considera-se vantajoso a associação de diferentes fármacos antivirais, a exemplo de ACV em associação com CUR, visando potencializar a atividade antiviral.

Outros estudos já apresentaram propostas semelhantes, associando ACV e imiquimode por via tópica em pacientes imunocomprometidos com lesões crônicas causadas pelo herpes genital. A associação dos dois ativos mostrou-se eficaz na cicatrização das lesões, tendo em vista que estes mesmos pacientes já haviam realizado tratamento somente com ACV, sem que ocorresse a resolução completa das lesões (BARBOSA *et al.*, 2011). Embora o estudo citado tenha demonstrado um efeito sinérgico dos ativos, cabe ressaltar que ambos os compostos estavam incorporados em formas farmacêuticas convencionais, as quais não oferecem uma série de vantagens proporcionadas por sistemas de liberação modificada (BAZZO *et al.*, 2012). Neste contexto, os sistemas de liberação modificados podem representar uma alternativa vantajosa para administração de antivirais associados por via oral, contornando problemas como a solubilidade e biodisponibilidade de alguns compostos.

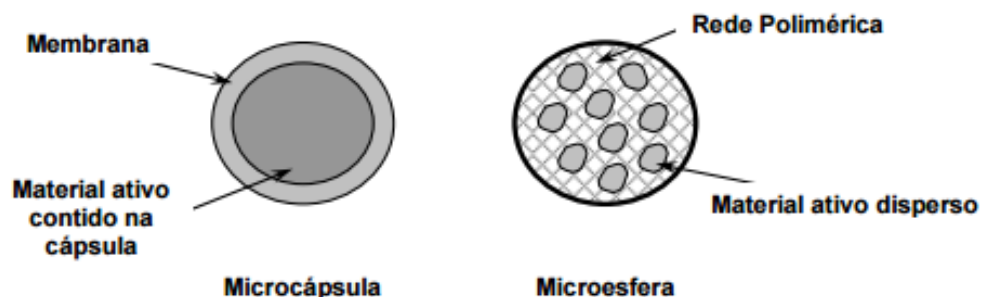
### **3.4 Micropartículas poliméricas como sistemas de liberação para fármacos por via oral**

A microencapsulação é definida como a técnica de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em sistemas poliméricos capazes de liberar seu conteúdo de forma controlada quando em condições específicas (RAM *et al.*, 2012).

As micropartículas (Figura 3) são sistemas com tamanhos de 1 a 1000 µm que podem ser microesferas e microcápsulas. As microcápsulas são partículas constituídas por um núcleo interno que contém a substância ativa recoberta por uma camada de polímero de espessura variável. Microesferas,

por sua vez, são sistemas matriciais constituídos por uma matriz polimérica na qual a substância carregada está uniformemente distribuída (RAM *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2005).

Figura 3. Representação esquemática da microencapsulação de ativos em microcápsulas e microesferas (PARIZE, 2009).



Esta tecnologia vem sendo empregada na indústria a mais de 60 anos visando desenvolver sistemas capazes de preservar a substância ativa e liberá-la quando necessário (DESAI e PARK, 2005). A técnica tem uso extenso na indústria, sendo utilizada na microencapsulação de enzimas, probióticos, proteínas, hormônios e fármacos (PRAKASH *et al.*, 2013).

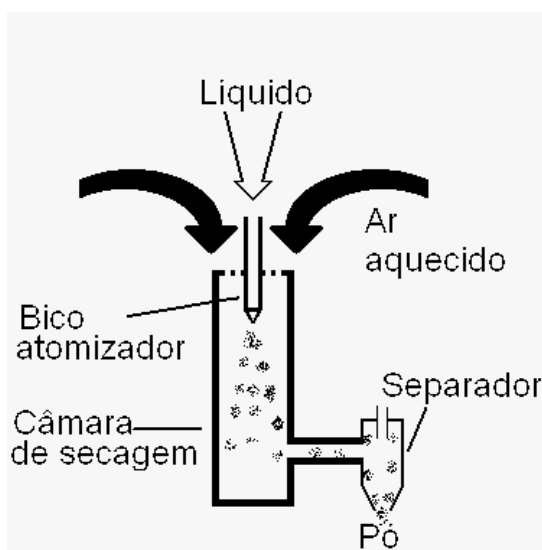
Dentre as vantagens da utilização de sistemas microparticulados estão o emprego de menor quantidade de fármaco, diminuição de efeitos adversos locais e sistêmicos, melhora na eficiência do tratamento, possibilidade de modulação da liberação do princípio ativo, maior velocidade na resposta terapêutica, aumento da biodisponibilidade de alguns fármacos e proteção do fármaco frente a possíveis degradações durante o preparo ou administração (RAM *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2005).

Além destas vantagens, as micropartículas em sua forma final apresentam-se como um pó que pode ser facilmente incorporado a formas farmacêuticas sólidas, como os comprimidos e cápsulas, tornando-se sistemas passíveis de administração por via oral, sendo esta via vantajosa por ser mais econômica e segura na administração de fármacos, sendo também a via de administração de maior adesão do paciente (YUN *et al.*, 2013).

As micropartículas apresentam métodos de preparação diversos, dentre os quais se pode citar: coacervação complexa, separação de fases poliméricas, polimerização interfacial, centrifugação-extrusão, evaporação do solvente e aspersão (SILVA *et al.*, 2003).

Dentre estes métodos, destaca-se o uso da técnica de aspersão (ou *spray-drying*), por sua simplicidade e eficiência na obtenção de micropartículas. A técnica consiste na conversão de um líquido (solução ou suspensão) em partículas sólidas em uma única etapa. O líquido, conhecido com solução de alimentação, é atomizado no interior de uma câmara de secagem onde circula ar aquecido. Rapidamente o solvente é evaporado transformando as gotículas aspergidas em partículas sólidas (COLOMÉ, 2006; DESAI e PARK, 2005).

Figura 4. Figura esquemática do processo de microencapsulação por aspersão (LABMAC, 2003).



A secagem rápida produzida pela atomização pode levar à produção de materiais micronizados amorfos, os quais são muitas vezes desejáveis para determinadas formulações, podendo ser fundamentais para o desempenho biofarmacêutico da formulação. O aumento da solubilidade, associado com formas amorfas, somado à área superficial elevada atribuída ao tamanho microparticulado, resultam em melhores taxas de dissolução e maior biodisponibilidade para fármacos pouco solúveis (HEALY *et al.*, 2008).

Comparando-se a técnica de aspersão com as demais técnicas de microencapsulação observamos vantagens como o baixo custo de operação, rendimento elevado do processo, partículas obtidas de alta qualidade, tamanho reduzido de partícula, alta estabilidade dos materiais obtidos. Porém, existem algumas limitações que devem ser consideradas, como algumas restrições na escolha de materiais encapsulantes (devem produzir uma baixa viscosidade da solução de alimentação), variedade de tamanho de partícula que pode ser produzida e custo elevado do equipamento (DESAI e PARK, 2005; SILVA *et al.*, 2003).

Atualmente, existe uma infinidade de materiais encapsulantes utilizados no preparo de micropartículas, sendo que estes devem, acima de tudo, não apresentar reatividade com a substância ativa e protegê-la de condições adversas tais como luz, umidade, pH fisiológico e oxigênio (SUAVE *et al.*, 2006). O material ainda deve ser de fácil manipulação durante o processo de preparação, possuir baixa higroscopicidade para facilitar a manipulação e evitar a aglomeração e apresentar boa solubilidade ou dispersão no solvente utilizado no preparo da solução de alimentação. Além disso, quando se pensa em uma administração futura por via oral, o material encapsulante deve possuir as propriedades desejadas de liberação do ativo (PARIZE, 2009; RAM *et al.*, 2010).

Dentre os diferentes materiais encapsulantes passíveis de serem empregados com sucesso no preparo de micropartículas, a celulose e seus derivados são polímeros de origem natural que mostram eficiência quando empregados no preparo de micropartículas a serem administradas por via oral, carreando tanto ativos com característica hidrofóbica, quanto hidrofílica (SEVERINO *et al.*, 2011).

Um exemplo de derivado de celulose amplamente utilizado é a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC E4000) que se apresenta como um pó branco ligeiramente amarelado, inodoro e insípido. Seu emprego em formulações está relacionado a diversas finalidades, tais como o emprego como agente ligante em processos de granulação (2% a 6%), revestimento de comprimidos (5%) e controle de liberação de ativos, quando em concentrações mais elevadas,

sendo este último um dos principais objetivos da incorporação de HPMC no preparo de micropartículas (SELVARAJ *et al.*, 2012; KIBBE, 2000).

Outra classe de materiais interessantes no preparo de sistemas microparticulados são os derivados do ácido metacrílico. Estes são polímeros de origem sintética, com elevada aplicabilidade na indústria de medicamentos. O Eudragit<sup>®</sup>, como é conhecido comercialmente, destaca-se por apresentar diversos subtipos disponíveis com características de solubilidade diferentes, como o E, L, S, LS e RS (KIBBE, 2000).

O Eudragit<sup>®</sup> RS é conhecido por apresentar baixa permeabilidade aquosa e insolubilidade em valores de pH fisiológico, características estas que permitem que o polímero apresente capacidade de intumescência, proporcionando uma liberação sustentada do ativo. Os sais de amônio presentes na estrutura do Eudragit<sup>®</sup> conferem a este polímero característica de permeabilidade, porém o mantém insolúvel, desta forma a liberação do fármaco fica independente do pH do meio (DOMINGUES *et al.*, 2008; COLOMÉ, 2006). Outra característica desejável deste material é sua capacidade de produzir sistemas com superfície catiônica, que permitem uma maior bioadesão das micropartículas na superfície de células do trato gastrointestinal e um maior potencial de mucoadesividade (DHALIWAL *et al.*, 2008).

Devido ao elevado número de parâmetros envolvidos no processo de secagem por pulverização, é necessária uma atenção especial à otimização deste processo, avaliando-se temperatura, teor de umidade, rendimento da operação, tamanho e densidade das partículas formadas, a fim de se determinar as condições ótimas de funcionamento (GUTERRES *et al.*, 2009).

Neste contexto, outros de materiais que vem sendo amplamente empregados no processo de secagem por aspersão são os adjuvantes de secagem, tendo como principais objetivos o aumento do rendimento do processo de preparo por aspersão, o aumento do fluxo tecnológico dos pós obtidos, diminuição do teor de umidade do produto final e a possibilidade de maior proteção de ativos termossensíveis durante o processo de secagem (MARTINS *et al.*, 2013; OLIVEIRA e PETROVICK, 2009).

O manitol é um carboidrato que pode ser empregado como adjuvante de secagem de micropartículas por aspersão visando proporcionar maior fluidez do pó formado, estabilidade e proteção do ativo encapsulado. Uma das vantagens que o diferencia dos demais adjuvantes de secagem é a ausência de grupos redutores responsáveis por interações químicas com alguns ativos (MAAS *et al.*, 2011).

Um estudo descrito na literatura comparou a influência do material escolhido como adjuvante de secagem (dióxido de silício, maltodextrina ou manitol, em concentrações e tempo de incorporação variáveis) para obtenção de micropartículas contendo extrato de *Eugenia Dysenterica* por aspersão. Os resultados demonstraram que os melhores parâmetros de fluxo tecnológico, rendimento e estabilidade do produto final foram obtidos quando empregado manitol no preparo, utilizando baixas concentrações e maior tempo de incorporação (COUTO *et al.*, 2011).

Tendo em vista as vantagens do desenvolvimento de sistemas microparticulados, e as limitações de ACV e CUR já expostas neste trabalho, alguns estudos já foram desenvolvidos visando contornar os problemas destes fármacos, como baixa solubilidade e baixa biodisponibilidade, através de sua incorporação em micropartículas.

TAO e colaboradores (2009) desenvolveram micropartículas contendo ACV pelo método de aspersão, utilizando como materiais etilcelulose e Carbopol<sup>®</sup> 974P, a fim de contornar as limitações de biodisponibilidade deste ativo por via oral. Observou-se que a liberação do ativo a partir das micropartículas ocorreu de forma sustentada, dependendo principalmente do pH do meio de liberação e quantidade de Carbopol<sup>®</sup> incorporado nas partículas. Além disso, em teste *in vivo*, as partículas demonstraram maior bioadesão ao trato gastrointestinal de ratos, quando comparadas com o fármaco em suspensão livre.

JALÓN e colaboradores (2003) propuseram o preparo de micropartículas de PLGA contendo ACV pelo método de evaporação do solvente, visando melhorar as características de liberação e minimizar efeitos tóxicos. Os resultados demonstraram que as micropartículas foram eficientes,

proporcionando uma liberação controlada do fármaco, além de diminuir a incidência de efeitos de toxicidade celular causados pelo fármaco.

Visando obter um sistema de entrega para ACV por via ocular, SELVARAJ e colaboradores (2012) desenvolveram micropartículas contendo este fármaco pelo método de gelificação iônica empregando como material polimérico a quitosana. Observou-se um perfil de liberação controlada de ACV a partir das micropartículas por um período de 24 horas, indicando que os sistemas desenvolvidos foram promissores para o tratamento de infecções oculares virais.

Outro estudo desenvolvido com ACV em sistemas microparticulados teve como objetivo o desenvolvimento de formulações com potencial de mucoadesividade (DHALIWAL *et al.*, 2008). Neste estudo, as micropartículas foram preparadas pelo método de aspersão, sendo empregados diversos polímeros, dentre eles o HPMC, a fim de se avaliar a influência do polímero escolhido na liberação do ativo. Os resultados demonstraram a ocorrência de uma liberação sustentada do ativo a partir das formulações desenvolvidas, demonstrando perfis de liberação bem semelhantes entre si independente do polímero utilizado no preparo.

Estudos também relatam o desenvolvimento de micropartículas e nanopartículas sólidas contendo ACV a partir de silício poroso preparadas por ultrassonicação, empregando diferentes características de superfície por ataque eletroquímico. Os estudos demonstraram que as partículas obtidas eram capazes de promover uma liberação sustentada do ativo, sendo esta variável de acordo com as características de superfície empregadas (MANIYA *et al.*, 2015).

Assim como o ACV, a CUR também tem sido alvo de estudos desenvolvendo formulações farmacêuticas inovadoras. MAZZARINO e colaboradores (2012) realizaram o desenvolvimento de nanopartículas com potencial de mucoadesividade utilizando o método de nanoprecipitação, visando obter um sistema de entrega de CUR por via bucal. Os estudos demonstraram uma elevada interação da quitosana empregada no



revestimento da formulação com a mucina, conferindo às nanopartículas elevado potencial de mucoadesividade para entrega bucal do ativo.

SHAHANI e colaboradores (2011) desenvolveram micropartículas poliméricas contendo CUR pelo método de evaporação do solvente, visando obter uma liberação sustentada deste composto a fim de obter uma atividade quimiopreventiva. Após administração subcutânea em camundongos, as formulações desenvolvidas mostraram uma liberação sustentada por até quatro semanas. Além disso, o doseamento de biomarcadores para quimioprevenção apresentaram-se mais elevados após o tratamento.

PARIZE e colaboradores (2012), por sua vez, desenvolveram micropartículas contendo CUR pelo método de aspersão, empregando como materiais a quitosana e tripolifosfato de sódio (TPP), visando obter um sistema capaz de melhorar a solubilidade do composto. Os resultados demonstraram que as partículas foram efetivas na proteção da CUR contra a degradação e melhoraram significativamente a solubilidade do ativo, sendo a liberação melhor controlada quando empregada uma maior concentração de TPP.

De modo semelhante, a fim de se melhorar a solubilidade de CUR e aumentar a sua aplicabilidade na indústria alimentícia, como corante e nutracêutico, MARTINS e colaboradores (2013) propuseram o preparo de micropartículas poliméricas contendo o extrato de Curcuma pelo método de aspersão, empregando como materiais a polivinilpirrolidona e o dióxido de silício. Os resultados demonstraram um aumento considerável da solubilidade da CUR presente no extrato, porém, acredita-se que o processo de pulverização tenha comprometido parcialmente a capacidade antioxidante do composto.

Embora já existam diversos estudos evidenciando o sucesso de nanossistemas como alternativa para carrear ACV e CUR, nenhum dos estudos anteriores teve como objetivo a coencapsulação em um único sistema microparticulado, visando potencializar a atividade antiviral. Desta forma, o presente estudo é considerado inédito e de elevado caráter inovador.

## 8 REFERÊNCIAS

ANVISA, **Resolução - RE 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2003.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª Ed., p. 144-145. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BARBOSA, L. N.; SOUTO, R.; FURTADO, A. L.; GRIPP, A. C.; DAXBACHER, E. Associação de aciclovir oral e imiquimode no tratamento de herpes simples genital hipertrófico em paciente com sida: relato de dois casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 5, p. 1043-1045, 2011.

BARBOZA, F. M.; DALLA VECCHIA, D.; PEREIRA, A. V.; STULZER, H. K. Desenvolvimento e validação de método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química Nova**, Volume 33, nº 3, página 747-749, 2010.

BAZZO, G. C.; RINALDI, A. P. T.; MAZERA, S. K.; PEZZINI, B. R.; ZÉTOLA, M. Preparo e caracterização de micropartículas de acetobutirato de celulose e poli (3-hidroxiacetato) contendo piroxicam. **Acta Scientiarum Health Sciences Maringá**, v. 31, n. 1, p. 51-56, 2009.

BAZZO, G. C.; MOREIRA, K.; MIRANDA, L. N.; ZÉTOLA, M.; PEZZINI, B. R. Comprimidos contendo microesferas de cetoprofeno como sistema de liberação bifásica. **Rev. Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 33, n. 1, p. 71-76, 2012.

BERNABÉ-PINEDA, M.; RAMÍREZ-SILVA, M. T.; ROMERO-ROMBO, M.; VERGANA, E. G.; HERNÁNDEZ, A. R. Determination of acidity constants of curcumin in aqueous solution and apparent rate Constant of its decomposition. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 60, p. 1091-1097, 2004.

BOURNE, Krystyn Z.; BOURNE, Nigel; REISING, Shirley F.; STANBERRY, Lawrence R. Plant products as topical microbicide candidates: assessment of in vitro and in vivo activity against herpes simplex virus type 2. **Antiviral Research**, v. 42, p. 219-226, 1999.

CAVALLI, R.; DONALISIO, M.; CIVRA, A.; FERRUTI, P.; RANUCCI, E.; TROTTA, F.; LEMBO, D. Enhanced antiviral activity of acyclovir loaded into  $\beta$ -cyclodextrin-poly (4-acryloylmorpholine) conjugate nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 137, p. 116-122, 2009.

CELUM, C.; LEVINE, R.; WEAVER, M.; WALD, A. Genital herpes and human immunodeficiency virus: double trouble. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 6, p. 447-453, 2004.

CLEMENS, S. A. C.; FARHAT, C. K. Soroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 1-8, 2010.

COLOMÉ, L. M.; **Micropartículas contendo Pantoprazol Sódico: Preparação, Caracterização Físico-Química e Avaliação Anti-Ulcerativa *in vivo* e da Absorção Intestinal *ex vivo***. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

COUTO, R. O.; ARAÚJO, R. R.; TACON, L. A.; CONCEIÇÃO, E. C.; BARA, M. T. F.; PAULA, J. R.; FREITAS, L. A. P. Development of a phytopharmaceutical intermediate product via Spray Drying. **Drying Technology**, v. 29, p. 709-718, 2011.

CORTINA, A. H. Infecção por herpes simple genital, revisão global. **R. Habana Ciência Médica**, v. 7, n. 4, p. 0-0, 2008.

CRUZ, L.; ASSUMPÇÃO, E.; GUTERREZ, S. S.; POHLMANN, A. R. High encapsulation efficiency of sodium alendronate in eudragit S100/HPMC blend microparticles. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1170-1174, 2009.

CRUZ, L.; ASSUNÇÃO, E.; ANDRADE, S. F.; CONRADO, D. J.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Microencapsulation of sodium alendronate reduces drug mucosal damage in rats. **Drug Delivery**, v. 17, n. 4, p. 231-237, 2010.

DHALIWAL, S.; JAIN, S.; SINGH, P. H.; TIWARY, A. K. Mucoadhesive Microspheres for Gastroretentive Delivery of Acyclovir: In Vitro and In Vivo Evaluation. **AAPS Journal**, v. 10, n. 2, p. 322-330, 2008.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMAN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Quím. Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008.

FIELD, H. J.; HODGE, A. V. Recent developments in anti-herpesvirus drugs. **British Medical Bulletin**, v. 106, p. 213-249, 2013.

GANDHI, A.; JANA, S.; SEN, K. K. In-vitro release of acyclovir loaded eudragit RLPO<sup>®</sup> nanoparticles for sustained drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 478-482, 2014.

GELLER, M.; SUCHMACHER, M.; RIBEIRO, M. G.; OLIVEIRA, E. N.; ABREU, C.; SHECHTMAN, R. C. Herpes Simples: Atualização Clínica, Epidemiológica e Terapêutica. **Revista Brasileira Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 24, n. 4, p. 260-266, 2012.

GEMIN, E. **Determinação da atividade antiviral de galactomananas sulfatadas contra vírus do herpes simplex tipo 1 (HSV-1)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-Drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulation for drug administration: A brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205-209, 2009.

HEALY, A. M. et al. Characterisation of excipient-free nanoporous microparticles (NPMPs) of bendroflumethiazide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 3, p. 1182-1186, 2008.

HEGER, Michal; GOLEN, Rowan F.; BROEKGAARDEN, Mans; MICHAEL, Martin C. The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 66, p. 222-307, 2014.

HELLWIG, F. M. **Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade, ensaio de dissolução e estudo preliminar da estabilidade citotoxicidade do ciprofibrato em formas farmacêuticas**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pampa, Uruguai, 2014.

HIRSCH, M. M. **Obtenção e caracterização de formulações de liberação controlada de atrazina e avaliação dos perfis de liberação**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HUANG, J.; WIGENT, R. J.; BENTZLEY, C. M.; SCHWARTZ, J. B. Nifedipine solid dispersion in microparticles of ammonio methacrylate copolymer and ethylcellulose binary blend for controlled drug delivery effect of drug loading on release kinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 316, p. 44-54, 2006.

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

JUNIOR, W. B.; SHIRATSU, R.; PINTO, V. Abordagem nas doenças sexualmente transmissíveis. **An. Brasileira Dermatologia**, v. 84, n. 2, p. 151-159, 2009.

JOSHI, Vedamurthy; AHMED, Mohammed Gulzar; SURESH, Sarasija; KOWTI, Rajesh. A Comparative Study: Solution Stability and Dissolution Behavior of Solid Dispersions Curcumin. **Indian Journal of Novel Drug delivery**, v. 2(3), p. 88-95, 2010.

KIBBE, A. H. **Handbook Of Pharmaceutical Excipients**, 3 ed. London: Ed United Kingdom, 2000.

KUTLUAY, Sebla B.; DOROGHAZI, James; ROEMES, Martha E.; TRIEZENBERG, Steven J. Curcumin inhibits herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. **Virology**, v. 373, p. 239–247, 2008.

JONES, C. A.; CONNINGHAM, A. L. Development of prophylactic vaccines for genital and neonatal herpes. **Expert Rev. Vaccines**, v. 2(4), p. 541-549, 2003.

JOSHI, Vedamurthy; AHMED, Mohammed Gulzar; SURESH, Sarasija; KOWTI, Rajesh. A Comparative Study: Solution Stability and Dissolution Behavior of Solid Dispersions Curcumin. **Indian Journal of Novel Drug delivery**, v. 2, n. 3, p. 88-95, 2010.

LABMAQ do Brasil Ltda. **Manual de Operações do Spray Dryer MSD 5.0.** Depto de engenharia, 2003.

LI, Bin; KONECKE, Stephanie; WEGIEL, Lindsay A.; TAYLOR, Lynne S. Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1108– 1116, 2013.

MAAS, S. G.; SCHALDACH, G.; LITRINGER, E. M.; MESCHER, A.; GRIESSER, U. J.; BRAUN, D. E.; WALZEL, P. E.; URBANETZ, N. A. The impact of spray drying outlet temperature on the particle morphology of manitol. **Powder Technology**, v. 213, p. 27-35, 2011.

MANIYA, N. H.; PATEL, S. R.; MURTHY, Z. V. P. Controlled delivery of acyclovir from porous silicon micro-and nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 330, p. 358-365, 2015.

MARTINS, R. M.; PEREIRA, S. V.; SIQUEIRA, S.; SALOMÃO, W. F.; FREITAS, L. A. P. Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. **Food Research International**, v. 50, p. 657-663, 2013.

MAZZARINO, Letícia; TRAVELET, Christophe; SENNA, Elenara Lemos; BORSALI, Redouane. Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 370, p. 58–66, 2012.

MOORTHI, C.; KUMAR, C. S.; MOHAN, S.; KRISHNAN, K.; KATHIRESAN, K. Application of validated RP-HPLC-PDA method for the simultaneous estimation of curcumin and piperine in Eudragit E 100 nanoparticles. **Journal of pharmacy research**, v. 7, p. 224-229, 2013.

MORAES, B. C. S.; VIEIRA, S. M.; SALGUEIRO, W. G.; MICHELS, L. R.; COLOMÉ, L. M.; AVILA, D. S.; HAAS, S. E. Clozapine-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules: Physico-chemical characterization and toxicity evaluation in *Caenorhabditis elegans* Model. **Journal of Nanoscience and nanotechnology**, v. 15, p. 1-8, 2015.

NETO, R.; OLIVEIRA, G.; PESTANA, M. Nefrotoxicidade de Antivíricos. **Acta Med. Portugal**, v. 20, p. 59-63, 2006.

NETO, Francisco Radler de Aquino, NUNES, Denise da Silva e Souza, Cromatografia, princípios básicos e técnicas afins, **ed. Intercência**, RJ, 2003.

PARIZE, A. L. **Desenvolvimento de sistemas microarticulados e de filmas a base de quitosana e corante natural cúrcuma**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

PARIZE, A. L.; STULZER, H. K.; LARANJEIRA, M. C. M.; BRIGHENTE, I. M. C.; SOUZA, T. C. R. Evaluation of chitosan microparticles containing curcumin and crosslinked with sodium tripolyphosphate produced by spray-drying. **Química Nova**, V. 35, n. 6, p. 1127-1132, 2012.

PELLEGRINI, E.; PENELLO, A. M.; CAMPOS, B. C.; SIMÃO, M. S.; GONÇALVES, M. A.; SOUZA, P. M. T.; SALLES, P. S. Herpes Genital. **J. Bras. Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22 (2), p. 64-72, 2010.

PEREIRA, M. R.; CRUZ, L.; RE, M. I.; GUTERRES, S. S. Micropartículas secas contendo fármaco modelo lipofílico preparadas a partir de suspensão aquosa: Estudo de Formulação. *Acta. Farm. Bonaerense*, v. 25, n. 2, p. 198—205, 2006.

PEREIRA, M. et al. Micropartículas Secas contendo Fármaco Modelo Lipofílico preparadas a partir de Suspensão Aquosa: Estudo de Formulação. **Acta Farmaceutica. Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 198-205, 2005.

PETROVICK, P. R.; OLIVEIRA, O. W. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of pharmacognosy**, v.20(4), p. 641-650, 2010.

POLETTO, F. S.; JÄGER, E.; RÉ, M. I. R.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A. R. Rate-modulating PHBV/PPCL microparticles containing weak acid model drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 345, p. 70-80, 2007.

PRAKASH, S.; DUCHESNEAU, C. T.; SAHA, S.; MALHOTRA, M.; KAHOU LI, I. Microencapsulation for the therapeutic delivery of drugs, live mammalian and bacterial cells, and other biopharmaceutics: current status and future directions. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2013, p.1-19, 2013.

RAM, H. M.; SINGH, M. N.; SHIVAKUMAR, H. G. Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery. **Research in Pharmaceutical Sciences**, V. 5 (2), p. 65-77, 2010.

RAHMAN, S. M. H.; TELNY, T. C.; RAVI, T. K.; KUPPUSAMY, S. Role of surfactant and pH in dissolution of curcumin. **Indian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 2, p. 139-142, 2009

RATTES, A. L. R.; OLIVEIRA, W. R. Spray drying conditions and encapsulating composition effects on formation and properties of sodium diclofenac microparticles. **Powder Technology**, v. 171, p. 7-14, 2007.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SAHOO, N. G. et al. Fabrication of composite microparticles of artemisinin for dissolution enhancement. **Powder Technology**, v. 203, n. 2, p. 277-287, Nov 2010.

SAKARIAH, K. K.; RAO, L. J. M.; JAYAPRAKASHA, G. K. Improved HPLC Method for the determination of Curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 3668-3672, 2002.

SANCHO, C. M.; VANRELL, R. H.; NEGRO, S. Study of gamma-irradiation effects on aciclovir poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid microspheres for intravitreal administration. **Journal of Controlled Release**, v. 99, p. 41-52. 2004.

SELVARAJ, S.; KARTHIKEYAN, J.; SARAVANAKUMAR, N. Chitosan loaded microspheres as an ocular delivery system for acyclovir. **Int. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 125-132, 2012.

SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena; MALMONGE, Sônia M. Polímeros usados como sistemas de transporte de princípios ativos. **Rev. Polímeros**, v. 21, p. 361-368, 2011.

SHAHANI, K.; PANYAM, J. Highly Loaded, Sustained-Release Microparticles of Curcumin for Chemoprevention. **JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**, v. 100, N. 7, p. 2599-2609, 2011.

SILVA, Catarina; RIBEIRO, Antonio; FERREIRA, Domingos; VEIGA, Francisco. Oral delivery system for peptides and proteins: II Application of microencapsulation methods. **Rev. bras. Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 1-20, 2003.

SIMON, A. Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE para quantificação simultânea de dipropionato de betametasona e fosfato sódico de betametasona em suspensão injetável. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 593-600, 2012.

SMITH, J. S.; HERRERO, R.; BOSETTI, C. MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; ELUFNETO, J.; CASTELLSAGUÉ, X.; MEIJER, C. J. L.; BRULE, A. J. C.; FRANCESCHI, S.; ASHLEY, R. Herpes Simplex Virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 21, p. 1604-1613, 2002.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P. Avaliação da compatibilidade entre a fluoxetina e excipientes usados na fabricação de cápsulas pela farmácia magistral. **Visão Acadêmica**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2006.



STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Desenvolvimento, avaliação e caracterização físico-química de micropartículas constituídas de aciclovir/quitosana. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 866-871, 2007.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Development and Validation of an RP-HPLC Method to Quantitate Acyclovir in Cross-Linked Chitosan Microspheres Produced by Spray Drying. **Journal of Chromatographic Science**, v. 46, p. 496-500, 2008<sup>A</sup>.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; CRUZ, A. P.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Compatibility studies between piroxicam and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Pharmaceutical chemistry journal**, v. 42, n. 4, p. 215-219, 2008<sup>B</sup>.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P., PARIZE, A. L.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. **Journal Materials Science and Engineering**, v. 29, p. 387-392, 2009.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. L. **Microencapsulação: inovação em diferentes áreas**. Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE. Florianópolis: 2006.

TAO, Y.; LU, Y.; SUN, Y.; GU, B.; LU, W.; PAN, J. Development of mucoadhesive microspheres of acyclovir with enhanced bioavailability. **International Journal of Pharmaceutics**, v 378, p. 30-35, 2009.

XU, F.; STERNBERG, M. R.; KOTTIRI, B. J.; MCQUILLAN, G. M.; LEE, F. K.; NAHMIAS, A. J. BERMAN, S. M.; MARKOWITZ, L. E. Trends in herpes simplex virus type 1 and type 2 seroprevalence in the United States. **JAMA**, vol. 296, n. 8, p. 965-973, 2006.

YALLAPU, Murali M.; JAGGI, Meena; CHAUHAN, Subhash C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug Discovery Today**, V. 17, p. 71-80, 2012.

YUN, Yeonhee; CHO, Young Woo; PARK, Kinam. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. **Advanced Drug Delivery Review**, v.65, p. 822-832, 2013.

ZANDI, K.; RAMEDANI, E.; MOHAMMADI, K.; TAJBAKHS, S.; DEILAMI, I.; RASTIAN, Z.; FOULADVAND, M.; YOUSEFI, F.; FARSHADPOUR, F. Evaluation of antiviral activities of Curcumin derivatives against HSV-1 in vero cell line. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 12, p. 1935-1938, 2010.