



CONSEJO NACIONAL  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



*CONACYT, desarrollando cultura de ciencia, tecnología, innovación y calidad*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**GENERACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN  
DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL IN VITRO DE FORMULACIONES  
TÓPICAS CONTRA EL VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 1**

**MARIA PAZ CÁCERES VILLALBA**

**TUTOR: Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres  
CO-TUTORA: Prof. Dra. Gladys Mabel Maidana**

**Ciudad Universitaria-San Lorenzo**

**PARAGUAY**

**SEPTIEMBRE – 2021**



*CONACYT, desarrollando cultura de ciencia, tecnología, innovación y calidad*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

GENERACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN  
DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL IN VITRO DE FORMULACIONES  
TÓPICAS CONTRA EL VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 1

Tesis presentada por la Química Farmacéutica María Paz Cáceres  
Villalba a la Coordinación de Postgrado, para optar por el título  
de Máster en Ciencias Farmacéuticas

Ciudad Universitaria, San Lorenzo

PARAGUAY

Septiembre 2021

Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres, Jefe del Departamento de Biotecnología de Facultad de Ciencias Químicas-UNA

### **TUTOR/A DE LA PRESENTE TESIS**

Autoriza: La presentación del trabajo titulado: **“Generación de un método para la evaluación de actividad antiviral *in vitro* de formulaciones tópicas contra el virus del herpes simple tipo I”**

Dado que el mismo reúne la calidad y cantidad de trabajo necesario para constituir la TESIS DE MAESTRÍA que la QF. María Paz Cáceres Villalba presenta para aspirar al grado de Máster en Ciencias Farmacéuticas.

San Lorenzo, 30 de Septiembre 2021

---

Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres  
Jefe del Departamento de Biotecnología. FCQ-UNA

**Cáceres Villalba, Maria Paz**

**Generación de un Método para la Evaluación de Actividad Antiviral In Vitro de Formulaciones Tópicas Contra el Virus del Herpes Simple Tipo 1**

**/ Maria Paz Cáceres Villalba. - - San Lorenzo : La Autora, 2021.**

**VIII, 62 p.: fig. ; 30 cm.**

**Tesis presentada a la Coordinación de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Título de Máster en Ciencias Farmacéuticas.**

**1. HSV-1, ACTIVIDAD ANTIVIRAL. 2. FORMULACIONES TÓPICAS**

**I. Título.**

**CDD: 615.1**

**C118g**

**GENERACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN  
DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL *IN VITRO* DE FORMULACIONES  
TÓPICAS CONTRA EL VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 1**

**MARIA PAZ CÁCERES VILLALBA**

Aprobado en fecha

Tribunal Examinador:

Prof. Dr. Julio César Iehisa	FCQ/UNA
Prof. Dra. Prof. Dra. María Fátima Yubero de Servian	FCQ/UNA
Prof. Dra. Lourdes Raquel Samaniego Silva	FCQ/UNA
Prof. Dr. Nelson Luis Alvarenga Sosa	FCQ/UNA

---

Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres  
Tutor

---

Prof. Dra. Gladys Mabel Maidana  
Co-tutora

---

Prof. Lic. Laura Joy Ramírez  
Directora de Postgrado

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y amigos, por acompañarme incondicionalmente en cada paso dado en la vida. A Sebastián por su amor y apoyo incondicional.

Al Dr. Pablo Sotelo, por darme la oportunidad de aprender y crecer en el campo de la investigación, por la paciencia y todas las enseñanzas dadas, por ser un gran maestro y guía en esta etapa. Un agradecimiento enorme a todos mis compañeros en el departamento de Biotecnología, por el compañerismo y amabilidad. A Guada, Pame, Emilio, Enmanuel, Miguel, Seto y Marquitos por enseñarme y ayudarme en cada desafío. A la Dra. Mabel Maidana, por brindarme todo su apoyo y abrirme las puertas del Departamento de Farmacia para este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme crecer como profesional y el total apoyo para llegar a la meta.

## INDICE

RESUMEN .....	VI
ABSTRACT .....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
Justificación.....	3
MARCO TEÓRICO .....	5
1. VIRUS DEL HERPES SIMPLE .....	5
1.1 Estructura.....	5
1.2 Ciclo lítico del HSV-1 .....	6
1.3 Latencia y reactivación del VHS-1 .....	7
1.4 Epidemiología y patogenia.....	7
1.5 Manifestaciones clínicas .....	7
1.6 Tratamiento.....	8
2. BÚSQUEDA DE COMPUESTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL .....	10
2.1 Aceites esenciales con propiedades antivirales .....	11
3. DESARROLLO DE FORMULACIONES ANTIVIRALES.....	12
4. FORMAS FARMACÉUTICAS TÓPICAS .....	12
5. PROCESO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (I +D) DE UN FÁRMACO .....	13
6. CONTROL DE CALIDAD Y EVALUACIONES FISICOQUÍMICAS DE FORMULACIONES .....	14
7. ESTUDIOS PRE-CLÍNICOS .....	14
7.1 Estudios <i>in vitro</i> .....	15
7.1.1 Ensayos de citotoxicidad <i>in vitro</i> .....	15
7.1.2 Ensayo de actividad antiviral <i>in vitro</i> .....	15

OBJETIVOS.....	20
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. Virus y células .....	21
2. Aceites esenciales .....	21
3. Drogas.....	21
4. Preparación de bases tópicas, formulaciones tópicas y controles .....	21
4.1 Crema base .....	21
4.2 Gel base .....	22
4.3 Pomada: .....	23
4.4 Formulaciones tópicas de Aciclovir y de Aceite esencial. ....	23
4.5 Control de calidad de las formulaciones.....	23
5. Preparación del Stock de las formulaciones tópicas.....	25
6. Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> de bases y formulaciones tópicas .....	25
7. Ensayo de actividad antiviral <i>in vitro</i> de bases y formulaciones tópicas .....	26
8. Determinación de la concentración citotóxica 50 (CC50), concentración efectiva 50 (EC50) y el índice de selectividad (IS).....	26
GESTIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS .....	28
ASUNTOS ÉTICOS.....	28
RESULTADOS .....	29
1. DESARROLLO DE BASES TÓPICAS PARA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> .....	29
2. CITOTOXICIDAD DE LAS BASES TÓPICAS Y DETERMINACIÓN DE CC50	32
3. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LAS BASES TÓPICAS Y DETERMINACIÓN DE IC50.....	34
4. ELABORACIÓN DE FORMULACIONES TÓPICAS DE ACICLOVIR 5%.	35

5. CITOTOXICIDAD FORMULACIONES DE ACICLOVIR 5% .....	36
6. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE FORMULACIONES DE ACICLOVIR 5%. DETERMINACIÓN DE IC50.....	38
6. ELABORACION DE FORMULACIONES DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA 5% .....	39
7. CITOTOXICIDAD FORMULACIONES DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA 5% .....	40
8. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DEL GEL MELALEUCA ALTERNIFOLIA 5%	42
9. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SELECTIVIDAD (IS) DE FORMULACIONES TÓPICAS.....	42
DISCUSION.....	44
CONCLUSIÓN .....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
ANEXOS .....	61

# GENERACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL *IN VITRO* DE FORMULACIONES TÓPICAS CONTRA EL VIRUS DEL HERPES SIMPLE TIPO 1

Autor: María Paz Cáceres Villalba

Tutor: Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres

## RESUMEN

El Virus del Herpes Simple tipo I (HSV-1) es el causante de las infecciones más comunes a nivel mundial, con altas tasas de morbilidad. La primera línea de tratamiento para estas infecciones es el Aciclovir y sus derivados, pero su uso prolongado ha llevado a una aparición creciente de resistencias a estos fármacos, lo que lleva a la búsqueda de alternativas de tratamiento. En la actualidad se ha hecho un gran énfasis en los ensayos *in vitro* como estrategia para reemplazar de manera parcial o total los ensayos *in vivo*, debido a los problemas éticos, morales y económicos que estos conllevan. El objetivo de esta investigación fue generar un método de evaluación de actividad antiviral *in vitro* de formulaciones tópicas contra el VHS-1. Para ello se desarrollaron formulaciones utilizando 3 bases tópicas diferentes (Crema, Gel y Pomada) conteniendo activos como el Aciclovir al 5% y el Aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* al 5% y posteriormente se evaluaron los parámetros como la Citotoxicidad y el cálculo de la Concentración Citotóxica 50 (CC50), la Actividad Antiviral y el cálculo de la Concentración Inhibitoria 50 (IC50) y el Índice de Selectividad (IS). Se observó altos niveles de Citotoxicidad en la base Crema, siendo esta descartada para ser evaluada a través de este método. En el caso de las Pomadas, la Pomada de Aciclovir al 5% demostró valores CC50, IC50 e IS acordes a estudios previos, pero para la Pomada de Melaleuca al 5%, no pudo obtenerse valores de CC50 e IC50, siendo la lipofilicidad del activo un parámetro importante para la evaluación adecuada de esta base. En cambio, tanto el Gel de Aciclovir al 5% (con el mejor valor de IS) como el Gel Melaleuca al 5%, mostraron valores de CC50, IC50 e IS acordes a los esperados, pudiendo este método de evaluación *in vitro* ser utilizado sobre todo para la base de geles, brindando datos de eficacia y seguridad importantes para estudios preclínicos de nuevas formulaciones.

**Palabras Clave:** HSV-1, actividad antiviral, formulaciones tópicas, *in vitro*, Aciclovir, *Melaleuca alternifolia*

# GENERATION OF A METHOD FOR *IN VITRO* ANTIVIRAL ACTIVITY EVALUATION OF TOPICAL FORMULATIONS AGAINST SIMPLE TYPE 1 HERPES VIRUS

Author: María Paz Cáceres Villalba

Advisor: Prof. Dr. Pablo Hernán Sotelo Torres

## ABSTRACT

The herpes simplex virus type I (HSV-1) is the cause of the most common infections worldwide, with high rates of morbidity. The first line of treatment for these infections is Acyclovir and its derivatives, but their prolonged use has led to a growing emergence of resistance to these drugs, leading to the search for treatment alternatives. At present, a great emphasis has been placed on *in vitro* tests as a strategy to replace *in vivo* tests partially or totally, due to the ethical, moral, and economic problems involve with these. The objective of this research was to generate a method for evaluating the *in vitro* antiviral activity of topical formulations against HSV-1, developing formulations using 3 different topical bases (Cream, Gel and Ointment) containing actives such as Acyclovir at 5% and *Melaleuca alternifolia* essential oil at 5% and evaluating parameters such as Cytotoxicity and the calculation of the Cytotoxic Concentration 50 (CC50), the Antiviral Activity and the calculation of the Inhibitory Concentration 50 (IC50) and the Selectivity Index (IS). High levels of cytotoxicity were observed o in the cream base, which was discarded to be evaluated by this method. In the case of the Ointments, the 5% Acyclovir Ointment showed CC50, IC50 and IS values according to previous studies, but for the 5% Melaleuca Ointment, CC50 and IC50 values could not be obtained, being the lipophilicity of the active an important parameter for the proper evaluation of this base. On the other hand, both the 5% Acyclovir Gel (with the best IS value) and the 5% Melaleuca Gel, showed CC50, IC50 and IS values according to those expected, so this *in vitro* evaluation method can be used specially for gel formulations, providing important efficacy and safety data for preclinical studies of new formulations.

**Key Words:** HSV-1, antiviral activity, topical formulations, *in vitro* evaluation, Acyclovir, Melaleuca alternifolia

# INTRODUCCIÓN

La infección por Herpesvirus (HSV) es una de las principales infecciones virales a nivel mundial. El virus del herpes simple pertenece a la familia de virus de doble cadena de ADN (1). Comprende dos virus relacionados, HSV-1 y HSV-2, donde el primero se asocia más a lesiones orales y mucocutáneas, donde se estima que el 67% de la población mundial se encuentra infectada con el virus, y el segundo asociado más comúnmente a lesiones genitales. (2). El virus VHS-1, es muy frecuente y endémica en todo el mundo. Se adquiere mayoritariamente durante la infancia y dura toda la vida (3). Además, el HSV-1 es una de las causas más comunes de encefalitis esporádica en adultos y niños, que es rara pero devastadora, con alta morbilidad y costos asociados (4), además, en el caso de los neonatos, una infección por VHS puede causar la muerte del neonato o deficiencias en el neurodesarrollo (5).

Después de una infección primaria, el virus se replica dentro de las células epiteliales de la mucosa y entra en las neuronas sensoriales a través de las terminaciones nerviosas. Luego, el virus se transporta a los cuerpos celulares neuronales donde se puede establecer la latencia. En respuesta a una variedad de estímulos diversos, el virus puede reactivarse periódicamente para reanudar la replicación del virus y producir virus infecciosos, que se transportan anterógradamente de regreso a la periferia para facilitar la infección de las células epiteliales y la consiguiente reaparición de síntomas asociados. (6)

Los pacientes con infecciones graves y recurrentes pueden sufrir un deterioro significativo de la calidad de vida secundaria al dolor y la desfiguración (7). El tratamiento facilita la curación, minimizando la duración de las molestias asociadas con las lesiones (8).

La principal modalidad de tratamiento para las infecciones por HSV es el uso de antivirales análogos de nucleósidos (9). Los agentes disponibles para el HSV-1 y 2 son el Aciclovir, Valaciclovir, Famciclovir y Penciclovir que se usan ampliamente como terapia episódica por un período corto o como terapia supresora diaria durante meses o años, a pesar de que el virus latente no se puede erradicar. (10). Los análogos de nucleósidos inhiben la ADN polimerasa viral después de la activación por la timidina quinasa viral

con una alta afinidad, como en el caso del Aciclovir, que puede encontrarse en células infectadas por HSV en concentraciones 40-100 veces más alta que el encontrado en células no infectadas (11).

El incremento de la incidencia de estas infecciones, así como las apariciones de resistencias a los tratamientos convencionales como los análogos de nucleósidos, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos (12), nos lleva a la necesidad de buscar nuevas opciones para el tratamiento del HSV-1.

Son varios los productos naturales con actividad anti-HSV-1 ya descritas y otras que siguen en estudio (13), entre ellas aceites esenciales. (14,15). Los aceites esenciales derivados de diferentes plantas aromáticas (por ejemplo, *Mentha piperita* y *Thymus vulgaris*) (16) así como componentes aislados de aceites esenciales únicos (por ejemplo, eugenol) (17) mostraron propiedades antivirales contra virus envueltos como el HSV-1, además, se ha informado sobre la aplicación del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, para el tratamiento del herpes labial recurrente (18).

Con bajas tasas de éxito en los ensayos clínicos, el descubrimiento de fármacos sigue siendo un proceso lento y costoso, donde una de las áreas más prometedoras en el mejoramiento de las tasas de éxito es el desarrollo de modelos *in vitro* eficaces durante las etapas preclínicas del desarrollo de fármacos, que podrían brindarnos información confiable y detallada sobre la seguridad y eficacia de nuevos fármacos. (19). Esta tendencia aparece ante la necesidad de buscar alternativas que reemplacen total o parcialmente el uso de animales durante las etapas de experimentación, debido a factores económicos como los altos costos de mantenimiento e implementación de animales, los problemas éticos y morales cada vez más discutidos a nivel mundial sobre el uso de estos, además de los tiempos de ensayo más extensos que conllevan este tipo de ensayos (20).

El departamento de Biotecnología de la FCQ-UNA cuenta con un método estandarizado de evaluación de la actividad antiviral *in vitro* mediante la cuantificación de HSV-1 por qPCR de productos naturales (21). A través de la evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral de bases tópicas conteniendo activos como Aciclovir o el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, se pretende generar una técnica que permita evaluar la eficacia *in vitro* de formulaciones para su uso en el tratamiento y prevención de las infecciones cutáneas causadas por HSV-1, y que permitan seleccionar las formulaciones más adecuadas según estos parámetros y simplificar así ensayos posteriores como los

ensayos *in vivo*, disminuyendo los animales a utilizar y lograr así disminuir costos y tiempo de ensayo.

### **Justificación**

Las infecciones causadas por HSV-1 son un problema de salud a nivel mundial, con una tasa de incidencia y morbilidad creciente. Aunque las manifestaciones clínicas más comunes son las infecciones orofaciales, con presencia de lesiones mucocutáneas, la infección puede agravarse, encontrándose casos de encefalitis esporádica grave en neonatos, queratoconjuntivis e infecciones generalizadas y extensas en sujetos inmunodeprimidos como pacientes con VIH.

Las lesiones cutáneas causadas por el HSV-1, sobre todo las orofaciales, afectan la calidad de vida de las personas, ya que además de causar severas molestias y dolor en las lesiones, pueden dificultar la capacidad de comer, además del factor estético que causa un impacto negativo en sus relaciones sociales.

A pesar de que los fármacos análogos de nucleósidos tienen buenas tasas de eficacia y seguridad, tanto a nivel tópico como sistémico, la aparición de resistencias a estos fármacos lleva a la necesidad de búsqueda de nuevos activos para el tratamiento de estas afecciones. El estudio de plantas medicinales, sobre todo las de uso tradicional, se ha convertido en un amplio campo para la identificación y caracterización de nuevos compuestos con actividad antiviral. Se han reportado, por ejemplo, aceites esenciales con propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antivirales *in vitro*.

Durante el proceso de desarrollo de un medicamento, los estudios preclínicos, que incluyen los ensayos *in vitro* e *in vivo* son esenciales para brindar información sobre la eficacia y la toxicidad de la formulación. En el caso de los ensayos *in vitro*, los mismos ofrecen ciertas ventajas frente a los ensayos *in vivo*, como una simplificación del sistema de trabajo, lo que permite evaluar parámetros de manera puntual y detallada, además de una rapidez y costos menores. Además, los ensayos *in vivo* acarrear consigo problemas morales y éticos, además de que ser ensayos más costosos, largos y cuyos parámetros experimentales son más difíciles de manejar o estandarizar.

Es por esto por lo que en las últimas décadas se ha hecho un gran énfasis en el mejoramiento y/o introducción de nuevas técnicas de ensayos *in vitro*, como una alternativa para eliminar de manera parcial o total el número de animales utilizados para

los ensayos preclínicos, pudiendo de esta manera acortar los tiempos de desarrollo y lanzamiento de un medicamento y eliminando los dilemas éticos y la creciente presión social contra el uso de animales de experimentación.

El departamento de Biotecnología de la FCQ-UNA, cuenta con un método estandarizado de evaluación de actividad antiviral de extractos vegetales por un método de PCR en tiempo real. .En este trabajo se procedió a adaptar este método como una alternativa para la evaluación *in vitro* de formulaciones tópicas de Aciclovir y del Aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* de manera a poder seleccionar las mejores formulaciones con actividad antiviral contra el HSV-1 como posibles candidatos para tratamientos del herpes cutáneo.

## MARCO TEÓRICO

### 1. VIRUS DEL HERPES SIMPLE

#### 1.1 Estructura

La familia *Herpesviridae* es una de las familias que comprende alguno de los principales patógenos de una amplia gama de huéspedes, incluyendo al menos ocho especies de virus que infectan seres humanos (22).

Los virus del herpes simple tipo 1 y 2 son miembros de los simplexvirus de la subfamilia *Alphaherpesvirinae* y son patógenos importantes con un rango de hospedador natural restringido a los humanos. Los herpesvirus tienen genomas de ADN de doble hebra lineales de segmento único y bajas tasas de mutación (23).

El ADN viral está empaquetado en una cápside icosaédrica compleja T = 16 que tiene un diámetro de 1.250 Å (24,25). La cápside que contiene ADN, o nucleocápside, está recubierta en una capa proteica conocida como el tegumento que a su vez está rodeado por una envoltura lipídica derivada del huésped. En la envoltura viral se encuentran las glicoproteínas virales que median la unión y entrada a la célula (26).

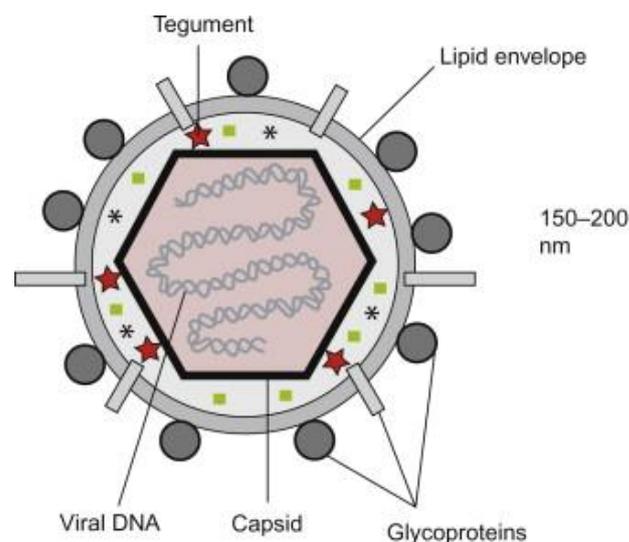


Ilustración 1. Estructura del Virus del Herpes Simple. (Patel D.H et al, 2011)

## 1.2 Ciclo lítico del HSV-1

La unión inicial del virus a las células está mediada por la asociación de la glicoproteínas virales gB y/o gC con los proteoglicanos HS (HSPG) presentes en la superficie celular.(27). Esta interacción va seguida de la unión de la gD a uno de sus receptores. Los receptores gD incluyen HVEM, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral; nectina-1 (CD111), un miembro de la superfamilia Ig; y Heparán sulfato 3-O-sulfatado o 3 OS HS.

La interacción entre gD y su receptor moviliza, la participación de gB, gH y gL para desencadenar el proceso de fusión de membranas. Notablemente, los receptores gD también son esenciales para la entrada a través de endocitosis (28). Además, en algunos casos, el virus se une inicialmente a los filopodios y migra hacia el cuerpo celular para iniciar la entrada, en un proceso denominado "*Surfing viral*". (29). Una vez en la célula, la cápside atraviesa los poros nucleares y libera el ADN en el nucleoplasma, donde probablemente, el citoesqueleto celular colabora con el transporte hacia el núcleo (1).

En particular, HSV-1 emplea varios mecanismos para bloquear la expresión de proteínas celulares y facilitar la eficiencia síntesis de proteínas virales. La proteína viral que ejecuta el ataque más temprano en la expresión génica es la proteína vhs (gen UL 41), destruyendo la mayoría de los ARNm mensajeros para permitir al HSV-1 hacerse totalmente cargo de la maquinaria de síntesis de proteínas y aumentar la eficiencia en la producción de virus (30).

Dentro del núcleo el ADN viral se circulariza rápidamente y se transcribe, a través de la ARN polimerasa II celular (31), para expresar secuencialmente los genes inmediatos-tempranos (IE), tempranos (E) y tardíos (L). Los genes inmediatos-tempranos (IE) son inducidos por una combinación de componentes virales y factores de transcripción celular. Estos genes, incluidos ICP27, ICP4 e ICP0, actúan en parte para regular positivamente los genes tempranos (E). ICP8 y timidina quinasa (TK), junto con los productos de otros genes tempranos, llevan a cabo funciones involucradas en la síntesis de ADN viral. La tercera clase de genes, los genes tardíos (L), depende de la replicación del ADN para su máxima expresión (32) y que codifican principalmente proteínas estructurales para el ensamblaje y liberación de nuevos viriones (33).

### **1.3 Latencia y reactivación del VHS-1**

El VHS es un virus neurotrópico y es dentro de las neuronas sensoriales donde se establece la infección latente. Tras la replicación primaria del VHS en la mucosa oral o genital, el virus puede infectar las células dendríticas neuronales de los ganglios sensoriales que inervan estos tejidos y a través de un transporte retrógrado por el axón viajar hasta el soma neural donde reside en forma latente hasta su reactivación (34). El estado de latencia viral se caracteriza por una represión importante de la transcripción de genes virales, donde el único transcrito es el Transcrito asociado a la Latencia o LATs (35).

Algunos factores como fiebre, estrés, traumas y heridas, exposición continua a rayos UV, inmunosupresión, fatiga, menstruación y enfermedades concomitantes, son considerados factores que pueden desencadenar la reactivación de la infección con la consecuente reaparición de síntomas a lo largo de la vida del individuo (36).

### **1.4 Epidemiología y patogenicidad**

Se ha planteado la hipótesis de que aproximadamente que más un tercio de la población mundial ha experimentado HSV-1 sintomático en algún momento de su vida (37). Según una revisión de datos proporcionados por la OMS hasta el 2016, se estima que 3583,5 millones de los 5632,6 millones de la población mundial de 0 a 49 años se infectaron por HSV tipo 1, con una prevalencia del 63,6% aproximadamente. El número de personas con HSV-1 oral fue mayor en la Región de Asia Sudoriental, seguida de la Región del Pacífico Occidental. La infección genital por VHS tipo 1 afectó a aproximadamente 192,0 millones de personas de 15 a 49 años en todo el mundo, lo que equivale a una prevalencia del 5,2% con mayor incidencia en la Región de las Américas, seguida de la Región de Europa. (38)

### **1.5 Manifestaciones clínicas**

Las manifestaciones clínicas dependen del sitio de la infección y del estado inmune del huésped. El periodo de incubación es de aproximadamente cuatro días, con un rango de dos a doce días. El herpes labial (VHS-1) se caracteriza clínicamente por vesículas agrupadas en racimo, usualmente pruriginosa. (39). Estas manifestaciones clínicas pueden agruparse en:

Gingivoestomatitis y faringitis: La gingivoestomatitis herpética y las faringitis son más

comúnmente asociados al VHS-1. Las lesiones incluyen ulceraciones orales que comprometen los paladares blando y duro, la lengua y la mucosa oral, así como las áreas faciales circundantes. Otros síntomas comunes son fiebre, malestar general, mialgias, dolor, irritabilidad y adenopatía cervical. La reactivación del virus compromete las lesiones periorales, principalmente la de los labios. La severidad de estas infecciones puede incrementarse en el caso de pacientes inmunocomprometidos (40).

Herpes genital: El herpes genital es la principal presentación clínica del VHS-2, aunque puede ser ocasionada por el VHS-1 en 10 a 40% de los casos. La forma de presentación clínica en la forma primaria en ambos casos es similar. Por lo general, hay lesiones genitales extensas en diferentes estadios de evolución incluidas vesículas, pústulas y úlceras eritematosas, que pueden tardar dos a tres semanas en cicatrizar (41).

Herpes neonatal: La infección por VHS-1 del recién nacido es una entidad poco frecuente, pero con una alta mortalidad y secuelas neurológicas. A su vez, la infección intrauterina es una complicación inusual de la infección por este virus y casi siempre con resultados fatales para el niño. El espectro clínico de la infección por VHS en el recién nacido agrupa tres síndromes clínicos que se superponen entre sí: la forma diseminada, que da cuenta de 25% de los casos, la infección mucocutánea o de piel-ojo-boca y el compromiso de sistema nervioso central (SNC) (60%-75%) (42).

Encefalitis esporádica por VHS-1: La encefalitis por herpes simple (HSE) es la causa más común de encefalitis viral esporádica en el mundo occidental. Sigue siendo una enfermedad rara pero grave con una incidencia de 1 en 250.000 a 500.000 habitantes. A pesar de la terapia antiviral eficaz, la mortalidad se ha informado de forma variable entre el 4% y el 28%, y solo entre el 15% y el 38% de los pacientes regresan a un nivel normal de funcionamiento, sobre todo en pacientes resistentes al aciclovir, fenómeno que puede ocurrir principalmente en pacientes inmunodeprimidos (43).

## **1.6 Tratamiento**

### **1.6.1 Aciclovir y derivados**

Los medicamentos antivirales orales, intravenosos o tópicos que requieren activación por una timidina quinasa viral funcional, donde encontramos los análogos de desoxiguanosina, como aciclovir y sus derivados, son actualmente las principales modalidades de tratamiento para las infecciones herpéticas (44). El Aciclovir es, un

análogo de desoxiguanosina con una cadena lateral acíclica que carece del grupo 3'-hidroxilo de los nucleósidos naturales (45). Después de la absorción preferencial por las células infectadas, el aciclovir se monofosforila por la timidina quinasa codificada por el virus. La timidina quinasa de la célula huésped es aproximadamente 1 millón de veces menos eficiente en convertir el aciclovir en su derivado de monofosfato. Posteriormente la difosforilación y trifosforilación son catalizadas por las enzimas de la célula huésped, lo que resulta en concentraciones de aciclovir trifosfato que son 40 a 100 veces más altas en las células infectadas con HSV que en las células no infectadas (46). Esto también fomentó el desarrollo de los profármacos nucleares, Valaciclovir y Famciclovir, que exhiben características de absorción mejoradas, en comparación al Aciclovir (9).

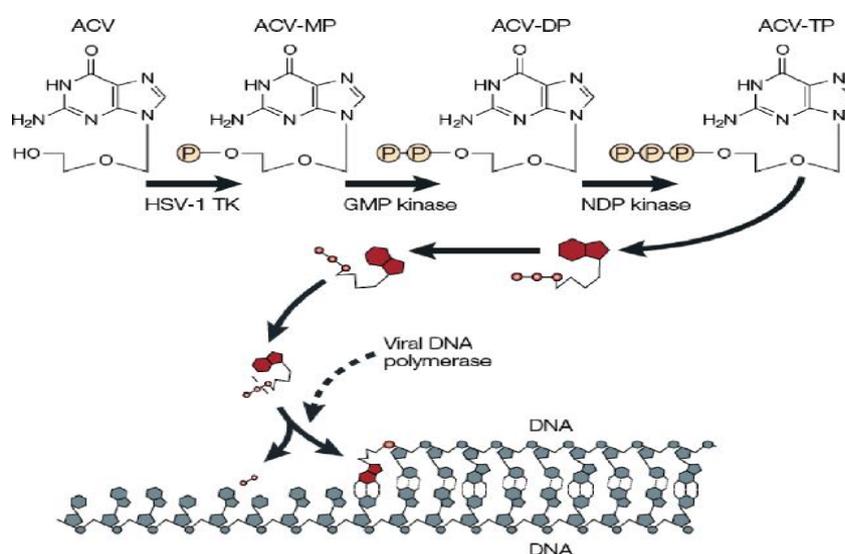


Ilustración 2. Mecanismo de acción antiviral del Aciclovir (De Clerq et al, 2002)

El aciclovir y el valaciclovir son fármacos extremadamente bien tolerados con pocos efectos adversos significativos. Se han informado reacciones alérgicas al aciclovir o valaciclovir, pero son considerados poco frecuentes, aunque con la terapia con aciclovir intravenoso, puede ocurrir inflamación y flebitis después de la extravasación localizada del fármaco. Entre efectos adversos más graves se describe nefrotoxicidad, disfunción renal incluidos casos de disfunciones renales agudas. También se asocia el tratamiento con la aparición de alteraciones en el SNC como agitaciones, alucinaciones, desorientación, temblores y convulsiones (47,48).

Uno de los inconvenientes principales con estos medicamentos es el incremento de la aparición de resistencias a los mismos (44). La resistencia del VHS al Aciclovir puede

desarrollarse mediante una mutación de los genes del virus que codifican Timidina quinasa o ADN polimerasa. La mayoría de los aislados clínicos de VHS-1 son deficientes en TK y, por lo tanto, no pueden fosforilar el Aciclovir. En consecuencia, estos aislados también serán resistentes a valaciclovir, penciclovir, famciclovir y ganciclovir, ya que todos ellos tienen el mismo mecanismo de acción y requieren TK viral para activación (49).

### **1.6.2 Brivudina**

La Brivudina es un agente antivírico muy potente, activo selectivamente contra VZV y HSV-1 con equivalencia terapéutica con Aciclovir. Es utilizado para tratamientos orales de VZV y HSV-1, y tópicamente para tratamiento de queratitis herpética, no siendo efectivo para VHS-2. Debido a una preocupación por la posible toxicidad e interacciones medicamentosas reportadas, el desarrollo comercial de brivudina se ha detenido en algunos países (incluido EE. UU.), aunque el fármaco está disponible en Europa y otros países (50,51).

### **1.6.3 Docosanol**

El n-docosanol es un alcohol graso de 22 carbonos con actividad *in vitro* contra el HSV-1 (49). Actúa a través de la inhibición de la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped. El n-docosanol está disponible sin receta en forma tópica al 10% pero considerada sólo moderadamente eficaz para el tratamiento del herpes labial recurrente (49,52).

## **2. BÚSQUEDA DE COMPUESTOS NATURALES CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL**

Para encontrar nuevos agentes antivirales menos tóxicos, mucha investigación se ha centrado en productos vegetales, donde muchos extractos de plantas fueron descritos como potenciales agentes antivirales (53). Los diversos mecanismos de acción que las terapias con extractos naturales pueden provocar contra el VHS-1, tienen el potencial de tener efectos beneficiosos sobre la profilaxis y el tratamiento de la infección. Particularmente, algunos han demostrado una fuerte actividad antiviral que actúa en varias etapas del crecimiento viral. También poseen ciertas ventajas como una menor aparición efectos secundarios, menor aparición de resistencias y menor toxicidad que los

tratamientos farmacológicos (54).

## 2.1 Aceites esenciales con propiedades antivirales

Los aceites esenciales son mezclas complejas de varios compuestos con olor aromático; Los compuestos predominantes son hidrocarburos de monoterpeno y sesquiterpeno, alcoholes, aldehídos, éteres y cetonas, así como diferentes derivados de fenilpropeno, El uso de aceites esenciales está ampliamente extendido en la medicina popular, así como en la medicina alternativa y aromaterapia. Revelan efectos antibacterianos, antifúngicos y antivirales (55).

Los aceites esenciales derivados de diferentes plantas aromáticas, por ejemplo, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita*, *Thymus vulgaris* (16), *Illicium verum*, *Pinus mugo* y *Matricaria recutita* (56) así como componentes aislados de aceites esenciales únicos, por ejemplo, eugenol (17), trans-anetol, farnesol,  $\beta$ -eudesmol,  $\beta$ -caryophyllene, entre otros, demostraron una muy buena actividad antiviral contra el VHS-1 (57).

### 2.1.1 *Melaleuca alternifolia*

*Melaleuca alternifolia*, comúnmente conocida como árbol del té, es una especie de arbusto de la familia Myrtaceae. Se trata de un pequeño árbol con corteza que crece en rodales naturales en tierras pantanosas a lo largo del norte costa de Nueva Gales del Sur y la costa sur de Queensland, Australia (58).

El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, también conocido como aceite de árbol de té (TTO), es una mezcla compleja de terpeno hidrocarburos y alcoholes terciarios (59). A través de estudios de Cromatografía de gases/Espectrometría de Masa (GC/MS) fueron identificados varios componentes en una alta proporción como el terpinen-4-ol y  $\gamma$ -terpineno, y niveles moderados de 1,8 cineole,  $\rho$ -cimeno,  $\alpha$ -terpineno, terpinoleno y  $\alpha$ -terpineol (60).

El aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, o aceite de árbol de té, fue principalmente estudiada por su actividad antimicrobiana, entre los que puede citarse efectos bacteriostáticos y bactericidas en bacterias aerobias y anaerobias, Gram positivas y negativas como *Estafilococos*, *micrococcus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aureginosa* entre otros (61–63), contra levaduras y hongos (64,65) incluidas cepas de *Candida albicans* resistentes a Fluconazol (66). También demostró actividad

antiinflamatoria (67), y antiviral *in vitro* contra el VHS entre otros virus (68,69). Además, un estudio clínico aleatorizado y controlado con placebo, utilizando un Gel de aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* al 6%, demostró una moderada eficacia del tratamiento sobre la aceleración de la epitelización de las heridas causadas por VHS-1 (70).

### **3. DESARROLLO DE FORMULACIONES ANTIVIRALES**

Cuando la infección por VHS-1 se limita a la piel, se debe considerar la terapia tópica debido a su conveniencia; una exposición sistémica reducida a los efectos secundarios de los medicamentos; y el potencial, con el uso de potenciadores de penetración en la piel, de concentraciones más altas del agente antiviral en el sitio de replicación viral comparado a lo podría lograrse con un fármaco sistémico (71).

### **4. FORMAS FARMACÉUTICAS TÓPICAS**

Las formulaciones tópicas son las que se aplican directamente sobre la piel. Las mismas preparan en un vehículo o base, que puede optimizarse para un sitio particular del cuerpo o tipo de afección de la piel. El producto puede diseñarse para ser hidratante o para maximizar la penetración de un ingrediente activo, a menudo un medicamento, en la piel o a través de ella.

Con referencia al vehículo, usualmente la misma contiene agua, aceites, alcoholes o propilenglicol, mezclados con preservantes, emulsificantes, promotores de absorción y fragancias o colorantes. Según su estado físico podemos clasificarlas en sólidos, líquidos y semisólidos, siendo las últimas las más utilizadas para tratamiento de afecciones de la piel, como es el caso de las cremas, lociones, geles y pomadas (72).

#### **4.1 Geles**

Son sistemas semisólidos con un alto contenido acuoso o hidroalcohólico y baja o media viscosidad conferida por un agente gelificante. Cuando la masa del gel consta de una red de partículas discretas pequeñas, el gel se clasifica como un sistema de dos fases (como por ej. Gel de hidróxido de aluminio), mientras que, si el tamaño de partícula de la fase dispersa es relativamente grande, generalmente se denomina magma (como por ej., Magma de bentonita)

## **4.2 Cremas**

Son formas farmacéuticas semisólidas emulsionadas que contienen uno o varios principios activos y hasta un 80 % de agua. Este término se ha aplicado tradicionalmente a los semisólidos que poseen una consistencia relativamente fluida formulados ya sea como una emulsión agua en aceite o aceite en agua. Sin embargo, más recientemente el término ha estado restringido a los productos que consisten en emulsiones aceite en agua o dispersiones acuosas microcristalinas de ácidos grasos o alcoholes de cadena larga que son fácilmente lavables, cosmética y estéticamente más aceptables (73).

## **4.3 Pomadas**

Es una forma farmacéutica semisólida, para aplicación en piel o en membranas mucosas, que consiste en una solución o dispersión de uno o más principios activos en bajas proporciones en una base, usualmente no acuosa (74).

## **5. PROCESO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (I +D) DE UN FÁRMACO**

Uno de los factores determinantes en la biodisponibilidad de un medicamento es sin duda la forma en que se dispone de un fármaco, considerando la forma farmacéutica en la que está formulado y la vía de administración (75).

. Éste es un proceso largo (9 a 13 años) y no necesariamente eficaz, considerando que aproximadamente de 10,000 potenciales compuestos sólo uno de ellos se lanzará al mercado. Es por eso por lo que en los últimos años se ha avanzado en la optimización de este proceso tratando de acortar los tiempos sin afectar la eficacia y la seguridad del medicamento (76).

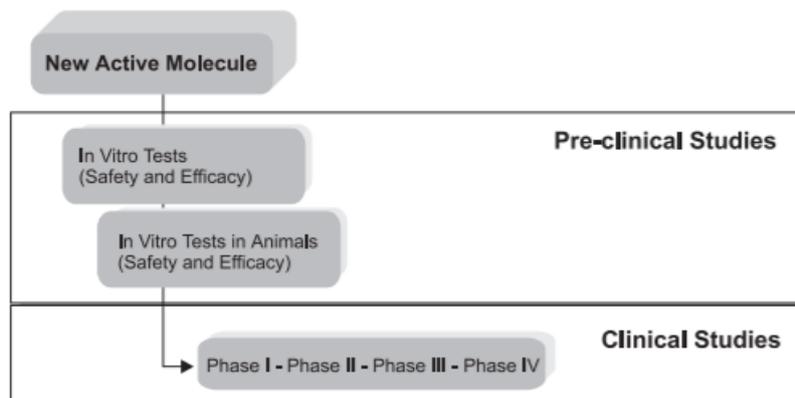


Ilustración 3. Etapas del proceso de Investigación y Desarrollo de un medicamento

## 6. CONTROL DE CALIDAD Y EVALUACIONES FISICOQUÍMICAS DE FORMULACIONES

La Farmacopea de los Estados Unidos (USP), indica como requisito de calidad para la mayoría de las formas farmacéuticas, pruebas generales de calidad del producto, como identificación, ensayo, uniformidad de contenido (uniformidad de unidades de dosificación), impurezas, pH, contenido de agua, límites microbianos, contenido de conservante antimicrobiano, el contenido de conservante antioxidante y la esterilidad deben realizarse para productos farmacéuticos.

En el caso de formulaciones tópicas, además, existen pruebas específicas, que deben llevarse a cabo como viscosidad y tamaño de partícula. También se detalla una prueba de performance del producto tópico como el Ensayo *in vitro* de difusión mediante celdas verticales para el cálculo de la tasa (flujo) y la cantidad de fármaco liberado a partir de la forma farmacéutica, como un dato preliminar del comportamiento absorción de la formulación para su posterior metabolismo (74).

## 7. ESTUDIOS PRE-CLÍNICOS

El análisis farmacológico preclínico de nuevos fármacos cubre áreas que abarcan desde ensayos *in vitro* funcionales, a través de células aisladas y estudios de tejidos, a experimentos farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) *in vivo* en animales. La respuesta a una dosis de fármaco se cuantifica en términos de eficacia (fuerza máxima del efecto) y potencia (cantidad de fármaco necesario para que se produzca un efecto específico; generalmente expresado como inverso de EC50). Además, se deben tener en cuenta los efectos tóxicos o inespecíficos del fármaco, datos que son generados y

evaluados principalmente en la etapa de ensayos preclínicos (77).

### **7.1 Estudios *in vitro***

Los estudios *in vitro* son una parte esencial de la investigación orientada al descubrimiento de fármacos candidatos. Impulsado por la necesidad de información predictiva, se han desarrollado técnicas *in vitro* para estudiar muchos aspectos de la disposición de fármacos. Estas incluyen: absorción, estabilidad metabólica, elucidación de las vías de eliminación, potencial de inhibición de las enzimas CYP, potencial de inducción de CYP450 enzimas y perfiles de metabolitos. Otro aspecto importante es la toxicidad de los fármacos candidatos. La toxicología *in vitro* nos ha proporcionado una comprensión más clara del tema a través de estrategias alternativas y ha sido fundamental para reducir suficientemente los enfoques basados en animales de experimentación. (77,78).

Estos ensayos tienen algunas ventajas, como velocidad del ensayo, reducción de costos y potencial de automatización en comparación a ensayos *in vivo*, además que, en algunos casos, las pruebas que utilizan células humanas pueden ser más relevantes que algunas pruebas en animales *in vivo*. Sin embargo, tienen algunas desventajas porque aún no están lo suficientemente avanzados técnicamente como para reemplazar completamente las pruebas con animales (79) aunque con el avance de los años y las tecnologías, los investigadores están centrándose cada vez más en perfeccionar este tipo de ensayos como parte esencial del éxito en el desarrollo de nuevos fármacos (19).

#### **7.1.1 Ensayos de citotoxicidad *in vitro***

El término "citotoxicidad" a menudo tiene un significado amplio y mal definido en el proceso de desarrollo e investigación de un fármaco. Para los sistemas de cultivo celular *in vitro*, un compuesto o en el tratamiento se considera citotóxico si interfiere con la unión celular, altera significativamente la morfología, afecta adversamente la tasa de crecimiento celular o causa muerte (80). Se han desarrollado y utilizado una variedad de ensayos para la medición de viabilidad o citotoxicidad *in vitro*, incluida la inclusión o exclusión de colorantes y ensayo de formación de colonias (81).

#### **7.1.2 Ensayo de actividad antiviral *in vitro***

El screening de compuestos antivirales requiere el desarrollo de sistemas de cultivo

celular que permitan una replicación viral óptima y la selección del método más apropiado para evaluar la acción de estos compuestos contra un virus. (82)

El método más común para cuantificar la actividad antiviral de los productos naturales es el ensayo de reducción de placa (PRA). Este método, a pesar de ser ampliamente utilizado, es técnicamente complicado y requiere varios días y personal altamente capacitado para obtener resultados confiables. Otro defecto de este método es su limitación para analizar múltiples muestras en el mismo ensayo. En las últimas décadas, Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qPCR) se ha utilizado para la cuantificación viral y la búsqueda de actividad antiviral en cultivos celulares. (83) La PCR en tiempo real ha generado una aceptación más amplia de la PCR debido a su mayor rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y al menor riesgo de contaminación por arrastre (84).

#### **7.1.2.1 PCR en tiempo real**

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un método ampliamente utilizado para la detección de material genético en distintas áreas de investigación, incluyendo la virología. Esta técnica utiliza un par de cebadores o oligonucleótidos sintéticos, cada uno de los cuales se hibrida con una hebra de una diana de ADN bicatenario (dsDNA), y el par abarca una región que se reproducirá exponencialmente. El cebador hibridado actúa como sustrato para una ADN polimerasa (más comúnmente derivada de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* y llamada Taq), que crea una hebra complementaria mediante la adición secuencial de desoxinucleótidos. El proceso se puede resumir en tres pasos: separación del dsDNA a temperaturas  $> 90^{\circ}\text{C}$ , hibridación del cebador a  $50\text{-}75^{\circ}\text{C}$  y extensión óptima a  $72\text{-}78^{\circ}\text{C}$ . La tasa de cambio de temperatura o la tasa de rampa, la duración de la incubación a cada temperatura y el número de veces que se repite cada conjunto de temperaturas (o ciclo) se controlan mediante un termociclador programable. (84,85).

Una variante de la PCR, la qPCR o PCR en tiempo real, se basa en la monitorización en tiempo real de la formación de amplicones por una molécula informadora fluorescente (p. Ej., SYBR Green). La fluorescencia (Y) se mide después de cada ciclo de temperatura y es proporcional a la cantidad de amplicón sintetizado (N):  $N \propto Y$ . El crecimiento exponencial de la concentración de amplicón en la mezcla de reacción, NC, puede

describirse como una función exponencial de la concentración inicial de la muestra,  $N_0$ ; la eficiencia de la qPCR,  $E$ ; y el número de ciclos de qPCR,  $C$ :  $NC = N_0 \times EC$  (86).

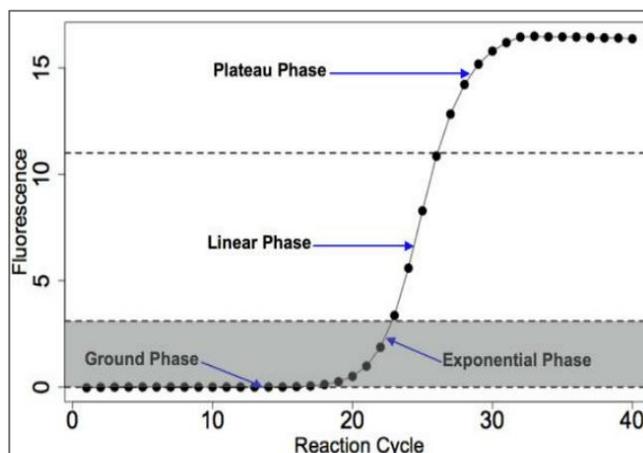


Ilustración 4. Esquema de amplificación por qPCR, mostrando las 4 fases principales de una PCR donde la fase exponencial se resalta en gris. (Wangler et al, 2017)

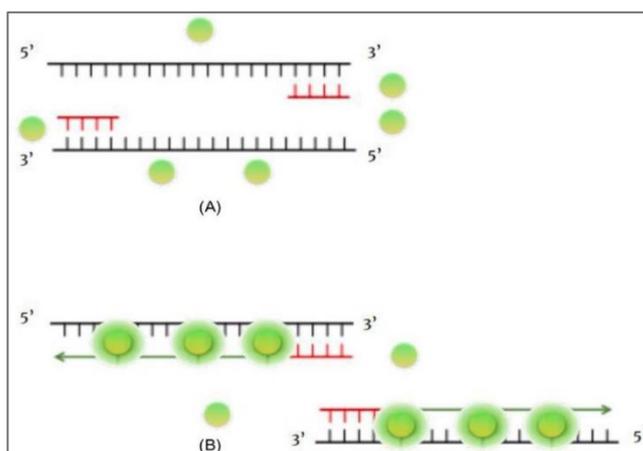


Ilustración 5. Esquema de funcionamiento del SYBR Green. A. El SYBR Green flota libremente emitiendo baja fluorescencia. B. Cuando el SYBR Green se une a las dobles hebras sintetizadas produce alta fluorescencia (Page et al, 2011)

### 7.1.2.2 Cuantificación de genoma viral por qPCR

El departamento de Biotecnología de la FCQ-UNA, cuenta con un método estandarizado de evaluación de actividad antiviral *in vitro* de extractos vegetales contra el VHS-1 por el método de PCR en tiempo real que, a diferencia de otras técnicas, no requiere extracción de ADN de las células, ni la congelación o descongelación para inducir la lisis celular, haciéndolo un proceso más rápido y eficiente. El mismo utiliza como cebador el gen ICP0 del VHS-1 y como indicador de fluorescencia el SYBR Green (21).

## **7.2. La problemática de los ensayos *in vivo* y búsqueda de alternativas de ensayo.**

Desde hace muchos siglos el ser humano ha venido utilizando los animales para el conocimiento científico y gracias a estos animales se ha avanzado mucho en el desarrollo de terapias, cirugías, etc (20). Los resultados de la investigación con modelos animales proporcionan información necesaria para diseñar pruebas humanas que también deben completarse para la aprobación legal de nuevos dispositivos, fármacos y procedimientos con carácter terapéutico y de diagnóstico (87). Pero este tipo de ensayos conlleva una serie de problemas como los altos costos de mantenimiento de los animales y mayor tiempo para el desarrollo experimental (88), así como el gran debate ético sobre la utilización de animales, el sufrimiento, el estrés y la muerte que el ser humano pueda causar sobre ellos lo que lleva a una constante búsqueda de alternativas a ensayos experimentales con animales (89).

El término alternativa en la experimentación animal describe cualquier cambio en los protocolos oficiales que contribuya al refinamiento de las técnicas, la reducción del número de animales utilizados o el reemplazo de ellos. Estos principios se conocen como 3Rs y fueron definidos por Russell y Burch en su libro “*The principles of humane experimental technique*” (90).

Dentro de las alternativas en el desarrollo de nuevos fármacos encontramos, por ejemplo, los denominados modelos *in silico*, o modelos matemáticos computacionales. Estos modelos poseen una serie de ventajas ya que permiten simular computacionalmente situaciones reales, modificando los valores de las variables involucradas en un amplio rango de valores y contrastarlos con los valores reales, además de ser relativamente de bajo costo (91). Métodos como el acoplamiento (docking) molecular (92), modelado del farmacóforo y el cribado virtual reducen significativamente el número de ensayos biológicos que se harían si no hubiera una selección de compuestos. Sin embargo, es un proceso predictivo que debe integrarse con ensayos experimentales que validen estas predicciones (93).

Otra de las alternativas de reemplazo total o parcial de modelos animales son los ensayos *in vitro*, que en muchos casos permiten obtener datos mucho más relevantes ya que pueden permitir un análisis completo del impacto de un nuevo medicamento a nivel molecular, además de evitar las posibles complicaciones encontradas en modelos de

experimentación animal como condiciones experimentales más difíciles de controlar y la diferencia en el metabolismo entre especies (94).

En el caso del VHS-1, el tratamiento tópico es una alternativa ideal cuando las lesiones se limitan a la piel, los tratamientos tópicos actuales son siempre efectivos debido a la generación de resistencia, debiendo optar por tratamientos más agresivos, como los intravenosos, con la consecuente aparición de efectos adversos más graves (95). El estudio *in vitro* de formulaciones tópicas antivirales podría brindarnos datos de eficacia y seguridad del activo en estudio, de su comportamiento dentro de bases tópicas farmacéuticas además de poder utilizarse como un método de selección de formulaciones de manera a facilitar los posteriores ensayos *in vitro*, al reducir la cantidad de formulaciones a testear y los animales a utilizar.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Generar un método para evaluar la actividad antiviral *in vitro* de formulaciones tópicas contra el virus del Herpes simple tipo 1.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar bases tópicas de distinta composición evaluando sus características fisicoquímicas según monografías oficiales.
2. Evaluar la citotoxicidad y actividad antiviral de diferentes bases tópicas a ser utilizadas en el modelo *in vitro* celular.
3. Elaborar distintas formulaciones tópicas conteniendo Aciclovir o Aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, utilizando las bases tópicas evaluadas.
4. Determinar la citotoxicidad de distintas formulaciones tópicas mediante la determinación de los valores de la Concentración Citotóxica 50 (CC 50).
5. Determinar la actividad antiviral contra el VHS-1 de las formulaciones tópicas mediante la determinación de los valores de la Concentración Inhibitoria 50 (IC50) y el Índice de selectividad (IS).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Virus y células

Las células Vero CCL81 (células de riñón de mono verde africano) fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 7,5% de Suero Fetal Bovino (SFB), aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomina, a 37°C en una atmósfera humedecida con CO<sub>2</sub> al 5% en el laboratorio de Biotecnología de la FCQ-UNA.

La cepa de VHS-1 (F) fue proporcionada por el Dr. Jonás Chnaiderman de la Universidad de Chile y el Dr. Bernard Roizman Sc. D. de la Universidad de Chicago conservadas a -20 °C en el Laboratorio de Biotecnología de la FCQ-UNA.

### 2. Aceites esenciales

El Aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* fue proveída por Magnolia Mutisia SRL con su certificado de calidad correspondiente y almacenado según sus especificaciones técnicas.

### 3. Drogas

Acyclovir (9-[(2-hydroxyethoxy)methyl]guanine) fue provisto por Vicente Scavone & CIA con su certificado de calidad correspondiente y almacenado según sus especificaciones técnicas.

### 4. Preparación de bases tópicas, formulaciones tópicas y controles

El desarrollo de todas las formulaciones y los controles fueron realizados en el Laboratorio Universitario (UNILAB) del departamento de Farmacia de la FCQ-UNA.

#### 4.1 Crema base

- **Formula 1.** Conteniendo Ceral-10 12% (96), vaselina líquida 2% (97) , propilparabeno 0,02% (98), metilparabeno 0,1% (98), agua destilada csp 100g.

Primeramente, en un recipiente se disuelve el propilparabeno y metilparabeno de agua destilada a 80°C por 3 minutos. En otro recipiente se calienta el Ceral 10 y vaselina a 65°C por 4 minutos hasta obtener una mezcla líquida. Agregar la fase

acuosa sobre la oleosa y mezclar con agitación constante hasta enfriamiento de la mezcla. Verificar que el preparado se encuentre a un pH 5.5 a 7 compatible con la piel. (99).

- **Formula 2.** Conteniendo Ceral-10 10%, vaselina líquida 5%, propilparabeno 0,02%, metilparabeno 0,1%, Glicerina (98) y agua destilada csp 100 g

Primeramente, en un recipiente se disuelve el propilparabeno y metilparabeno en la glicerina a 75°C por 2 minutos, luego se agrega el agua destilada y se mezcla manteniendo la temperatura. En otro recipiente se calienta el Ceral 10 y vaselina a 65°C por 4 minutos hasta obtener una mezcla líquida. Agregar la fase acuosa sobre la oleosa y mezclar con agitación constante hasta enfriamiento de la mezcla. Verificar que el preparado se encuentre a un pH 5.5 a 7 compatible con la piel.

#### 4.2 Gel base

- **Formula 1.** Conteniendo Carbopol 940 2% (98), metilparabeno 0,1%, glicerina 4% trietanolamina 0.05% y agua destilada csp 100 g.

Primeramente, se procederá a disolver el metilparabeno en glicerina calentándolo a 75°C hasta completa disolución. Seguidamente, se deja enfriar hasta los 50°C y se dispersa el carbopol 940 de manera progresiva. Se mezcla con ayuda de un agitador a hélice a 500 rpm por 60 minutos hasta obtener una mezcla homogénea y transparente, libre de grumos. Ajustar el pH de la preparación agregando la Trietanolamina hasta alcanzar un pH 5,5 a 7 compatible con la piel.

- **Formula 2.** Conteniendo Carbopol 940 1%, metilparabeno 0,1%, glicerina 4% trietanolamina 0.05% y agua destilada csp 100 g.

Primeramente, se procederá a disolver el metilparabeno en glicerina calentándolo a 75°C hasta completa disolución. Seguidamente, se deja enfriar hasta los 50°C y se dispersa el carbopol 940 de manera progresiva. Se mezcla con ayuda de un agitador a hélice a 500 rpm por 60 minutos hasta obtener una mezcla homogénea

y transparente, libre de grumos. Ajustar el pH de la preparación agregando la Trietanolamina hasta alcanzar un pH 5,5 a 7 compatible con la piel.

#### 4.3 Pomada:

- **Formula 1.** Conteniendo vaselina líquida 40% y vaselina sólida csp. 100 g (97).

Se procede a mezclar la vaselina líquida con la vaselina sólida hasta formar una mezcla homogénea. Ajustar el pH de la preparación agregando unas gotas de trietanolamina hasta alcanzar un pH 5,5 a 7 compatible con la piel.

- **Formula 2.** Conteniendo vaselina líquida 20% y vaselina sólida csp. 100 g.

Se procede a mezclar la vaselina líquida con la vaselina sólida hasta formar una mezcla homogénea. Ajustar el pH de la preparación agregando unas gotas de trietanolamina hasta alcanzar un pH 5,5 a 7 compatible con la piel.

#### 4.4 Formulaciones tópicas de Aciclovir y de Aceite esencial.

Se elaboraron formulaciones con las distintas bases conteniendo Aciclovir al 5% o Aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* al 5%.

El agregado de Aciclovir se realizó pulverizando la materia prima con ayuda de un mortero hasta obtener partículas finas y homogéneas. Posteriormente se suspendió en propilenglicol (100) y se añadirá a la base mezclándolo hasta obtener una mezcla homogénea.

El agregado de los aceites esenciales se realizó, añadiéndolo directamente a la base y mezclándolo hasta obtener una mezcla homogénea.

Luego se verifica que los preparados se encuentren a un pH 5,5 a 7 compatible con la piel.

#### 4.5 Control de calidad de las formulaciones

Los ensayos básicos de control de calidad de las formulaciones se realizarán en

base a las especificaciones de la Farmacopea de los Estados Unidos y la Farmacopea Argentina para formulaciones tópicas.

- **Caracteres organolépticos:** Se evaluaron los caracteres como color, consistencia, olor, homogeneidad y presencia de partículas visibles.
- **pH:** El pH es un índice numérico que se emplea para expresar el grado de acidez o alcalinidad de una solución. La determinación del pH se realiza empleando un medidor del pH, calibrado y capaz de reproducir valores de pH con variaciones menores a 0,02 unidades de pH, empleando un electrodo indicador sensible a la actividad del ión hidrógeno, como el electrodo de vidrio, y un electrodo de referencia apropiado, como por ej., calomel o plata-cloruro de plata.
- La medición de pH de los productos acuosos fueron realizados a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C, con ayuda de un pHmetro Oakton previamente calibrado con tres soluciones buffers de pH 4, pH 7 y pH 10 (73). Se pesó 2 gramos del producto disolviéndolo en 20 ml de agua y el pH de la solución obtenida fue medida por triplicado.
- **Viscosidad:** La viscosidad es una propiedad de los líquidos que está estrechamente relacionada con la resistencia al flujo. Se define en términos de la fuerza requerida para mover una superficie plana continuamente más allá de otra en condiciones específicas de estado estacionario cuando el espacio intermedio se llena con el líquido en cuestión. Se define como el esfuerzo cortante dividido por la tasa de deformación cortante. La unidad básica es el equilibrio; sin embargo, las viscosidades que se encuentran comúnmente representan fracciones del poise, de modo que el centipoise (1 poise = 100 centipoises) resulta ser la unidad más conveniente (101).

La determinación de la viscosidad se efectuó a una temperatura de  $20,0 \pm 0,1$ °C. (73) Se utilizó un viscosímetro de Brookfield, con una aguja S7 y a una velocidad de rotación de 100 rpm con un torque mayor al 45%. Las muestras fueron cargadas en un vaso de precipitado de 500 ml y la viscosidad en centipoise (cP) fue medida por triplicado.

- **Comprobación del tipo de emulsión:** Realizado en las formulaciones de cremas. Para ello se utilizó el Método de la gota donde una gota de emulsión se coloca en 30 ml aproximadamente de H<sub>2</sub>O. Si después de una ligera agitación la gota

difunde homogéneamente la emulsión es de tipo O/W. Si la gota queda unida sobre la superficie del H<sub>2</sub>O, la emulsión es de tipo W/O (102).

- **Determinación de uniformidad:** Este ensayo se suele realizar cuando la emulsión formulada contiene principios activos insolubles que han sido incorporados reducidos a polvo fino. Se realiza una extensión de 0.5 g de la muestra de la emulsión sobre un portaobjetos y se sitúa éste encima de una superficie negra, procediendo a su visualización mediante una lupa. Este ensayo fue realizado para las formulaciones conteniendo Aciclovir.

## 5. Preparación del Stock de las formulaciones tópicas

Para la preparación del Stock de las formulaciones a evaluar, se utilizó como disolvente Dimetilsulfóxido (DMSO) debido a su amplio uso como disolvente para ensayos en cultivos celulares, sobre todo para compuestos no hidrosolubles (103). Fueron preparados Stock de formulaciones de 10 mg/mL siendo luego almacenadas a -20°C.

## 6. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* de bases y formulaciones tópicas

Para evaluar toxicidad celular se sembraron células Vero en placas de 96 pocillos hasta observación de confluencia. Luego de 24 horas se removió el sobrenadante y las formulaciones previamente disueltas a distintas concentraciones en medio DMEM. Los pocillos utilizados como controles fueron: en el caso de evaluación de las bases tópicas, pocillos reemplazados sólo con el medio y en el caso de la evaluación de las formulaciones tópicas conteniendo el activo de interés, pocillos reemplazados sólo con la formulación base correspondiente (Crema, Gel o Pomada base). Se incubaron por 72 horas a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. A las 72 horas se agregó 20 µL de Resazurina y se incubará por 3 horas a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>; Se procedió a medir la absorbancia de la placa a 570 y 630 nm. El porcentaje de células vivas se calculó a través de la ecuación (104):

$$\frac{(\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1} A_{\lambda_2} \text{ of test agent dilution}}{(\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_2} A^{\circ\lambda_1} - (\epsilon_{\text{OX}})_{\lambda_1} A^{\circ\lambda_2} \text{ of untreated positive growth control}} \times 100$$

Donde

- $\epsilon_{\text{OX}}$  : coeficiente de extinción molar de la forma oxidada de Resazurina

- A: absorbancia de los pocillos testados con los extractos,
- A°: absorbancia de los pocillos usados como control positivo
- $\lambda_1$ : Longitud de onda 570 nm
- $\lambda_2$ : Longitud de onda 630 nm

### 7. Ensayo de actividad antiviral *in vitro* de bases y formulaciones tópicas

Se cultivaron células VERO en placa de 96 pocillos incubando durante 24 horas a 37° y 5% de CO<sub>2</sub> con medio DMEM al 7,5% de SFB hasta la observación de células en confluencia. Luego se procedió a realizar la infección con el VHS-1 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1,5 incubando por 1 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, seguidamente el virus fue reemplazado por las formulaciones a distintas concentraciones previamente disueltas en medio DMEM para los pocillos de prueba por 72 horas a 37° y 5% de CO<sub>2</sub>.

Luego de la incubación se recogieron los sobrenadantes de los pocillos para realizar la cuantificación del genoma viral por qPCR. Se utilizó como grupo control células que no fueron infectadas con el virus ni tratadas con la formulación realizando solo la sustitución del medio y como normalizador en el caso de la evaluación de las bases tópicas, células infectadas con el virus y sin tratar, y para la evaluación de las formulaciones conteniendo el activo de interés, células infectadas con el virus y tratadas sólo con la formulación base correspondiente.

El porcentaje de inhibición viral fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ de inhibición de bases tópicas} = \frac{\text{Genoma de virus en células infectadas + tratados con la base tópica}}{\text{Genoma de virus en células infectadas sin tratar}} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición de bases tópicas + activo} = \frac{\text{Genoma de virus en células infectadas + tratados con formulación}}{\text{Genoma de virus en células infectadas tratadas sólo con base tópica}} \times 100$$

### 8. Determinación de la concentración citotóxica 50 (CC50), concentración efectiva 50 (EC50) y el índice de selectividad (IS).

La concentración citotóxica 50 (CC50) es la concentración que resulta en la muerte de 50 por ciento de las células huésped y la efectiva 50 (EC50) es la concentración de producto en el que se inhibe la replicación del virus en un 50 por ciento. Para la determinación de EC50 y CC50 se ensayaron diferentes concentraciones de formulaciones con los activos de estudio para obtener curvas de dosis-respuesta.

La efectividad relativa del producto en investigación para inhibir la replicación viral en comparación con la inducción de la muerte celular se define como el índice terapéutico o de selectividad (IS) (es decir, CC50 / EC50). Es deseable tener un alto índice terapéutico que proporcione la máxima actividad antiviral con mínima toxicidad celular. Fue realizado el cálculo del IS para las formulaciones de Aciclovir y de *Melaleuca alternifolia*, teniendo como cifra de IS adecuados, resultados  $\geq 10$  (79).

## **GESTIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS**

Los datos obtenidos en los diferentes ensayos fueron expresados como promedios de 2 o más mediciones. El análisis estadístico y los gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 8.0.1, a través de un modelo de regresión no lineal de log (concentración) vs respuesta, considerando valores adecuados coeficiente de determinación  $r^2 \geq 0,90$ .

## **ASUNTOS ÉTICOS**

El proyecto fue sometido a evaluación por el comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas-UNA y aprobado (Código 713/2021).

Con respecto a la disposición de residuos se realizó conforme al procedimiento establecido por el Departamento de Biotecnología de la FCQ-UNA, que se adecua al Procedimiento Operativo Estándar de Salud y Seguridad Ocupacional de la FCQ.

## RESULTADOS

### 1. DESARROLLO DE BASES TÓPICAS PARA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIVIRAL *IN VITRO*

Fueron desarrolladas tres formulaciones tópicas semisólidas de Crema base, Gel base y Pomada base y se analizaron 2 fórmulas diferentes para cada una de estas bases, seleccionando una para los ensayos posteriores de acuerdo con las características fisicoquímicas obtenidas.

#### 1.1 Crema base

Para el desarrollo de Crema base se analizaron 2 fórmulas diferentes variando las concentraciones o componentes (Tabla 1).

Posteriormente se procedió a realizar el análisis de control de calidad cuyos resultados se encuentran descriptos en la Tabla 2.

**Tabla 1. Fórmula cualitativa y cuantitativa de las formulaciones de Crema base.**

Componentes	Función	Cantidad	
		Fórmula 1	Fórmula 2
Ceral 10	Agente emulsificante. Cera autoemulsionable	12 %	10%
Vaselina líquida	Excipiente hidrofóbico. Emoliente	2%	5%
Propilparabeno	Conservante	0,02%	0,02%
Metilparabeno	Conservante	0,1%	0,1%
Glicerina	Excipiente hidrofílico. Co-solvente. Emoliente e hidratante	-----	4%
Agua destilada	Vehículo hidrofílico	Csp. 100 g	Csp. 100 g

**Tabla 2. Controles de calidad realizados a las formulaciones de Crema base.**

Controles	Resultados	
	Formula 1	Formula 2
<b>Caracteres organolépticos</b>	Aspecto homogéneo, color blanco, alta consistencia, olor agradable	Aspecto homogéneo, color blanco, alta consistencia, olor agradable

<b>Viscosidad</b>	21750 cP	12160 cP
<b>pH</b>	7,12	6,30
<b>Tipo de emulsión</b>	O/W	O/W

A partir de estos resultados se optó por la segunda fórmula de Crema base para la incorporación de los compuestos a evaluar, debido a que la misma se encontraba dentro del rango de pH deseado y con una menor viscosidad lo que permitiría una mejor manipulación.

### 1.2 Gel Base

Para el desarrollo del Gel base se analizaron 2 fórmulas diferentes variando las concentraciones de los componentes (Tabla 3).

Posteriormente se procedió a realizar el análisis de control de calidad cuyos resultados se encuentran descriptos en la Tabla 4.

**Tabla 3. Fórmula cualitativa y cuantitativa de las formulaciones de Gel base**

<b>Componentes</b>	<b>Función</b>	<b>Cantidad</b>	
		<b>Fórmula 1</b>	<b>Fórmula 2</b>
Carbopol 940	Agente gelificante	2 %	1%
Propilparabeno	Conservante	0,02%	0,02%
Metilparabeno	Conservante	0,1%	0,1%
Glicerina	Excipiente hidrofílico. Co-solvente. Emoliente e hidratante	4%	4%
Trietanolamina	Regulador de pH	0,3%	0,2%
Agua destilada	Vehículo hidrofílico	Csp. 100 g	Csp. 100 g

**Tabla 4. Controles de calidad realizados a las formulaciones de Gel base**

<b>Controles</b>	<b>Resultados</b>	
	<b>Formula 1</b>	<b>Formula 2</b>
<b>Caracteres organolépticos</b>	Aspecto homogéneo, transparente, alta consistencia, inoloro	Aspecto homogéneo, transparente, alta consistencia, inoloro
<b>Viscosidad</b>	30120 cP	27200 cP

<b>pH</b>	7,61	6,42
-----------	------	------

A partir de los resultados de control de calidad obtenidos, se optó por la segunda fórmula del Gel base para la incorporación de los compuestos a evaluar, debido a que se encontraba dentro del rango de pH deseado, compatible con la piel y con una menor viscosidad lo que permitiría una mejor manipulación.

### 1.3 Pomada base

Para el desarrollo de la Pomada base se analizaron 2 fórmulas diferentes variando las concentraciones de los componentes (Tabla 5).

Posteriormente se procedió a realizar el análisis de control de calidad cuyos resultados se encuentran descriptos en la Tabla 6.

**Tabla 5. Formula cualitativa y cuantitativa de las formulaciones de Pomada base**

<b>Componentes</b>	<b>Función</b>	<b>Cantidad</b>	
		<b>Fórmula 1</b>	<b>Fórmula 2</b>
Vaselina líquida	Excipiente hidrofóbico. Emoliente	40 %	20%
Vaselina sólida	Vehículo hidrofóbico	Csp 100 g	Csp 100g

**Tabla 6. Controles de calidad realizados a las formulaciones de Pomada base**

<b>Controles</b>	<b>Resultados</b>	
	<b>Formula 1</b>	<b>Formula 2</b>
<b>Caracteres organolépticos</b>	Aspecto homogéneo. Color ligeramente blanquecino. Baja consistencia	Aspecto homogéneo. Color ligeramente blanquecino. Alta consistencia
<b>Viscosidad</b>	7650 cP	12360 cP

A partir de estos resultados se optó por la segunda fórmula de la Pomada base para la incorporación de los compuestos a evaluar, debido a que la misma poseía una viscosidad adecuada para la incorporación de activos, siendo la primera ya de muy baja consistencia.

**1.4 Almacenamiento:** Todas las fórmulas fueron almacenadas en recipientes cerrados y en ambiente refrigerado (8-10°C) por un periodo máximo de 30 días.

## 2. CITOTOXICIDAD DE LAS BASES TÓPICAS Y DETERMINACIÓN DE CC50

Como se mencionó anteriormente, uno de los aspectos básicos a ser evaluados es la toxicidad. Es por ello, que se evaluó la posible toxicidad que las bases tópicas podían ejercer sobre el cultivo de manera a determinar si las mismas son aptas para ser evaluadas en este modelo. Además, de esta manera se determinaron las concentraciones máximas que podrían emplearse para ensayos posteriores. Se evaluó la citotoxicidad de las bases tópicas a distintas concentraciones, obteniendo así curvas de citotoxicidad y la CC50.

La Crema base mostró una citotoxicidad elevada (>60%) (Figura 1) en todas las concentraciones. Debido a ello no se realizaron ensayos posteriores con esta base.

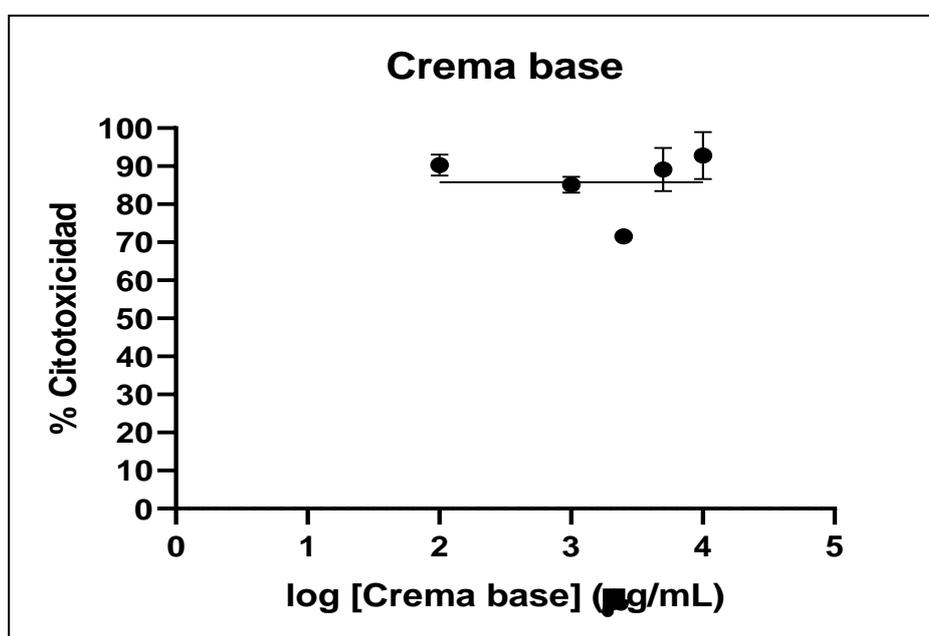


Figura 1. Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [log(µg/mL)] de Crema base. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones (n=2) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 10.000, 5000, 2500, 1000 y 100 µg/mL

Debido a la baja solubilidad de la Pomada base en el medio de cultivo DMEM, se optó por utilizar el DMSO para la preparación del stock inicial de las diferentes formulaciones, de manera a mejorar la solubilidad de las bases

El Gel y la Pomada base a diferencia de la Crema base, mostraron valores de CC50 de 873,8 µg/mL ( $r^2=0,965$ ) (Figura 2) y 797,2 µg/mL ( $r^2=0,976$ ) (Figura 3) respectivamente, siendo considerados aptos para ser utilizados en ensayos posteriores debido a su baja toxicidad.

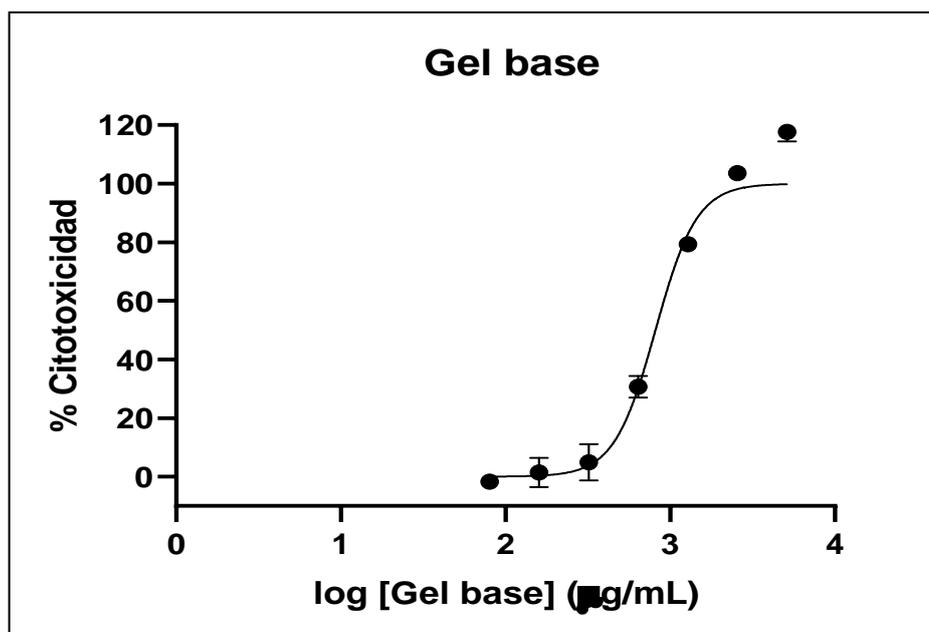


Figura 2. Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [ $\log(\mu\text{g/mL})$ ] de Gel base. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 5120, 2560, 1280, 500, 320, 160 y 80  $\mu\text{g/mL}$ .

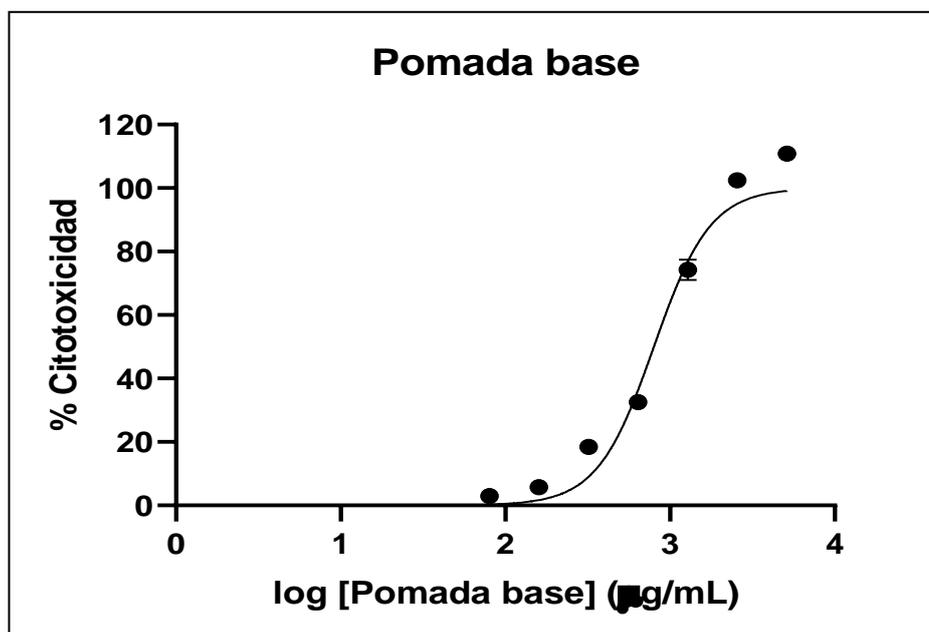


Figura 3. Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [ $\log(\mu\text{g/mL})$ ] de la Pomada base. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 5120, 2560, 1280, 500, 320, 160 y 80  $\mu\text{g/mL}$ .

### 3. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LAS BASES TÓPICAS Y DETERMINACIÓN DE IC50

Considerando que las bases podrían ejercer algún efecto sobre el virus o procesos relacionados con la infección, se decidió evaluar el efecto de las bases sobre modelo de infección *in vitro*. Para ello, se procedió a la cuantificación de genoma viral de VHS-1 por qPCR, en células infectadas en presencia o ausencia de las de formulaciones de Gel base y Pomada base.

Inesperadamente, tanto para el Gel base como la Pomada base se observó una acción inhibitoria viral a alta concentraciones, igual o mayores 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 4). Es por ello, que esta concentración fue considerada como la concentración máxima de base a utilizar para la medición de actividad antiviral de ensayos posteriores, de manera a que evaluar adecuadamente la actividad de los compuestos de interés.

Además, se calcularon los valores de Concentración inhibitoria 50 (IC50) de 224,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r^2=0,984$ ) (Figura 4) y 196,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r^2=0,995$ ) (Figura 5) para el Gel de y la Pomada respectivamente.

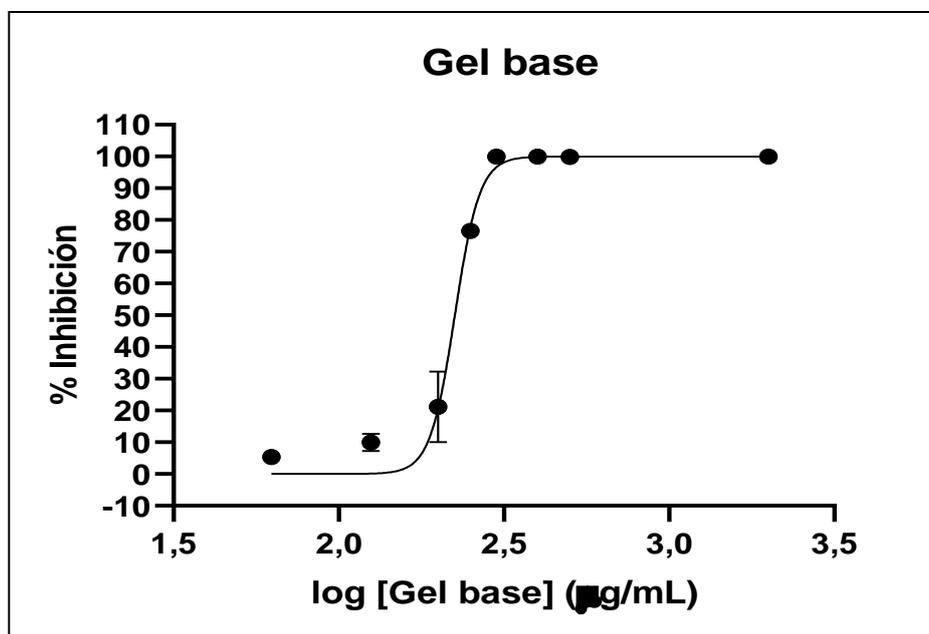


Figura 4. Porcentaje de Inhibición viral vs Concentración [ $\log(\mu\text{g}/\text{mL})$ ] de Gel base. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 600, 500, 400, 300, 250, 200, 125 y 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

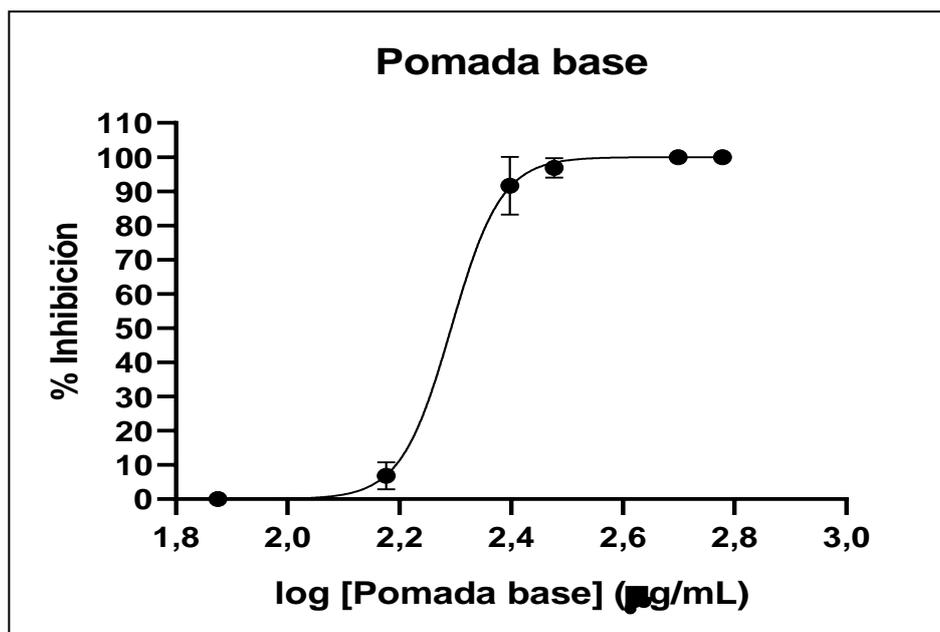


Figura 5. Porcentaje de Inhibición viral vs Concentración [ $\log(\mu\text{g/mL})$ ] de Pomada base. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 600, 500, 300, 250, 150 y 75  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4. ELABORACIÓN DE FORMULACIONES TÓPICAS DE ACICLOVIR 5%.

Considerando la citotoxicidad observada por la Crema base se decidió realizar 2 formulaciones conteniendo una concentración estándar de Aciclovir (5%) (105) en bases de Gel y Pomada (Tablas 7 y 8) de acuerdo la con técnica de elaboración descrita en la metodología previamente.

Posteriormente se procedió a realizar el control de calidad correspondiente a ambas fórmulas cuyos resultados se encuentran descritos en la Tabla 9.

Tabla 7. Fórmula cualitativa y cuantitativa del Gel de Aciclovir 5%

Fórmula cuali/cuantitativa	
Aciclovir	5%
Propilenglicol	5%
Gel base	Csp 100 g

**Tabla 8. Fórmula cualitativa y cuantitativa de la Pomada de Aciclovir 5%**

<b>Fórmula cuali/cuantitativa</b>	
Aciclovir	5%
Propilenglicol	5%
Pomada base	100 g

**Tabla 9. Controles de calidad realizados a las formulaciones del Gel y la Pomada de Aciclovir**

<b>Controles</b>	<b>Resultados</b>	
	<b>Gel de Aciclovir 5%</b>	<b>Pomada de Aciclovir 5%</b>
<b>Caracteres organolépticos</b>	Aspecto homogéneo, color blanco, alta consistencia, olor agradable	Aspecto homogéneo, color blanco, alta consistencia, olor agradable
<b>Determinación de Uniformidad</b>	Uniforme. Partículas dispersas adecuadamente. Presencia de pocas burbujas	Uniforme. Partículas dispersas adecuadamente. Presencia de pocas burbujas
<b>Viscosidad</b>	25750	16120
<b>pH</b>	6,53	N/A

**4.1 Almacenamiento:** Todas las fórmulas fueron almacenadas en recipientes cerrados y en ambiente refrigerado (8-10°C) por un periodo máximo de 30 días.

## **5. CITOTOXICIDAD FORMULACIONES DE ACICLOVIR 5%**

Al analizar la citotoxicidad de las formulaciones se obtuvieron valores de CC50 de 582,4 µg/mL ( $r^2=0,967$ ) (Figura 6) y 495,0 µg/mL ( $r^2=0,889$ ) (Figura 7) para el Gel de Aciclovir y la Pomada de Aciclovir respectivamente, siendo estos valores un poco mayores a los CC50 obtenidos de las bases, comprobando así, una ligera influencia del activo sobre la toxicidad del sistema en estudio.

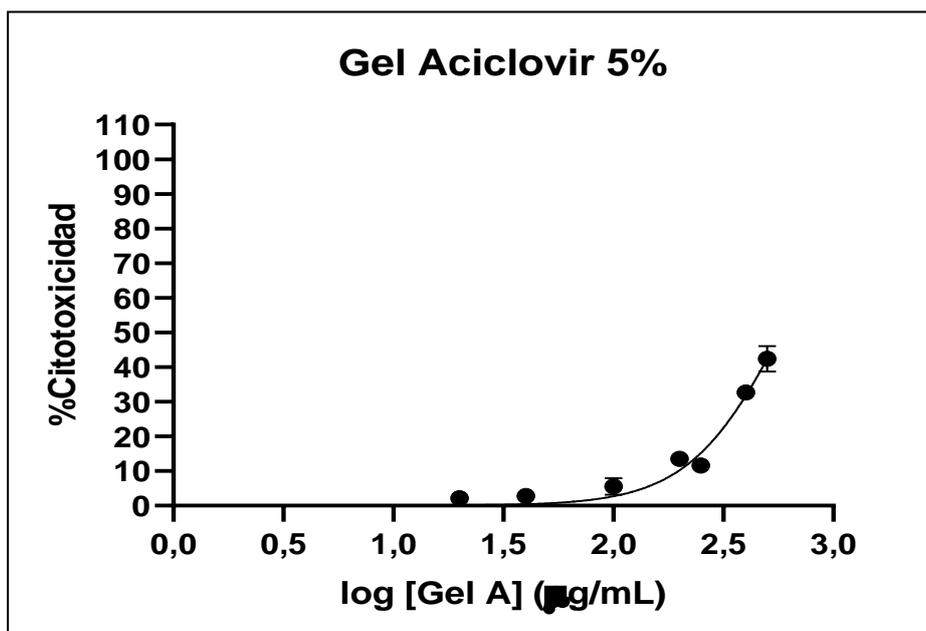


Figura 6. Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [ $\log(\mu\text{g/mL})$ ] de Gel de Aciclovir 5%. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 500, 400, 250, 200, 100, 40, 20  $\mu\text{g/mL}$

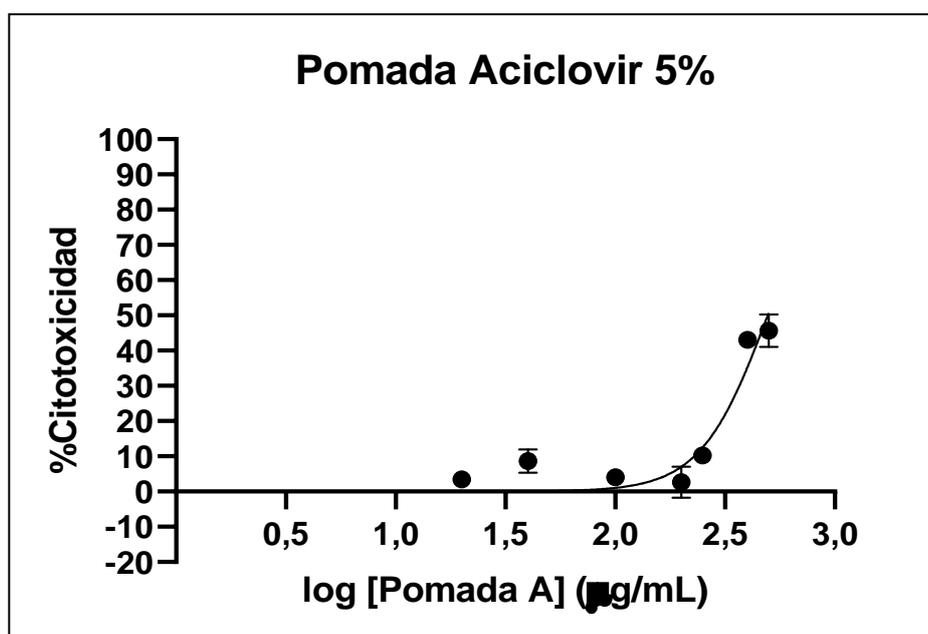


Figura 7. A. Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [ $\log(\mu\text{g/mL})$ ] de Pomada de Aciclovir 5%. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 500, 400, 250, 200, 100, 40, 20  $\mu\text{g/mL}$

## 6. ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE FORMULACIONES DE ACICLOVIR 5%. DETERMINACIÓN DE IC50

Para evaluar la actividad antiviral de las formulaciones fue utilizado el método de cuantificación de genoma viral de VHS-1 por qPCR, pudiendo así obtener el valor de IC50 de formulaciones de Gel de Aciclovir 5% y Pomada de Aciclovir 5%.

Para el caso del Gel de Aciclovir, se obtuvieron valores de IC50  $<1,25 \mu\text{g/mL}$  ( $r^2=0,908$ ), ya que se observaba un fenómeno de inhibición viral mayor al 70% incluso en la menor concentración de ensayo. (Figura 8). En el caso de la Pomada de Aciclovir se obtuvo un valor de IC50 de  $3,6 \mu\text{g/mL}$  ( $r^2=0,889$ ) (Figura 9). El Gel presentó mejores valores de IC50 en comparación a la Pomada que puede deberse a la naturaleza hidrofílica y polimérica del gel, que permite un mejor contacto con el sistema.

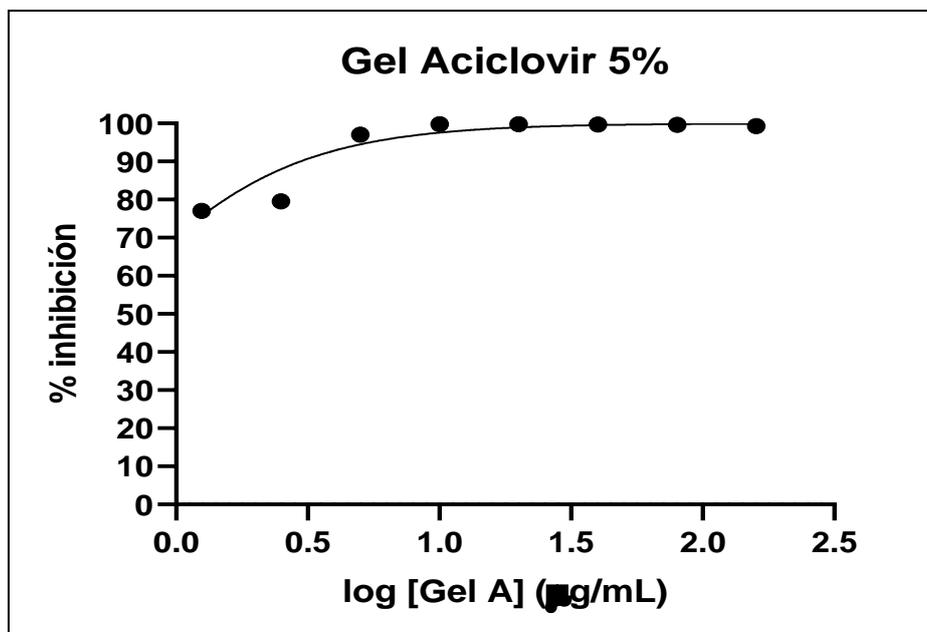


Figura 8. Porcentaje de Inhibición viral vs Concentración [ $\log(\mu\text{g/mL})$ ] de Gel de Aciclovir 5%. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 y  $1,25 \mu\text{g/mL}$

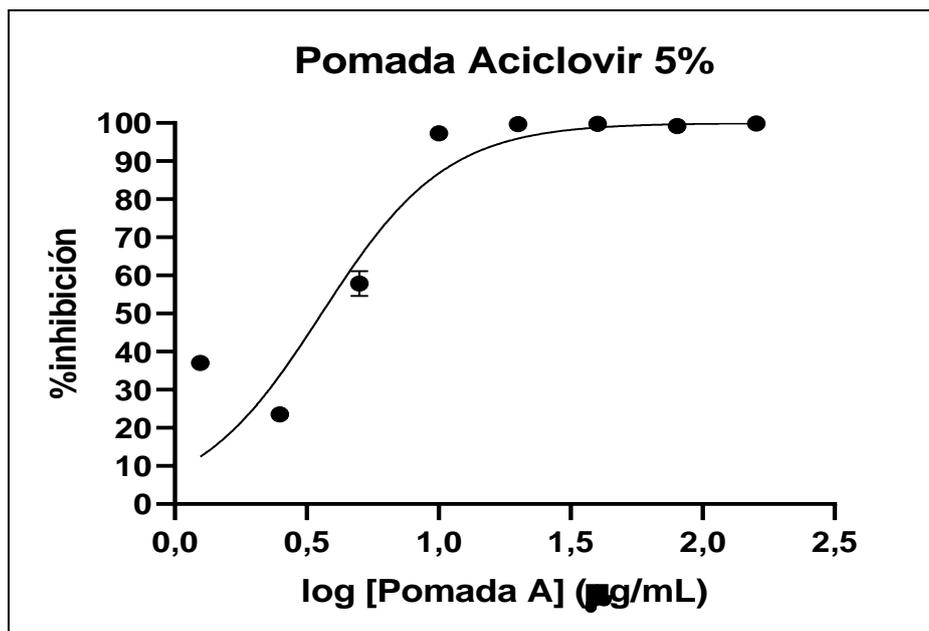


Figura 9. Porcentaje de Inhibición viral vs Concentración [log( $\mu\text{g/mL}$ )] de la Pomada de Aciclovir 5%, En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 y 1,25  $\mu\text{g/mL}$

## 6. ELABORACION DE FORMULACIONES DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA 5%

En el caso del aceite esencial de *Melaleuca alternifolia*, un aceite esencial de actividad antiviral contra el VHS-1 ya descrita, fueron elaboradas 2 formulaciones conteniendo una concentración de 5% del aceite (Tablas 10 y 11), en bases de Gel y Pomada, de acuerdo con técnica de elaboración descrita en la metodología.

Posteriormente se procedió a realizar el control de calidad correspondiente a ambas fórmulas cuyos resultados se encuentran descritos en la Tabla 12.

Tabla 10. Formula cualitativa y cuantitativa del Gel de aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* 5%

Fórmula cuali/cuantitativa	
Aceite esencial de Melaleuca	5%
Propilenglicol	5%
Gel base	Csp 100 g

**Tabla 11. Fórmula cualitativa y cuantitativa de la Pomada de aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* 5%**

Fórmula cuali/cuantitativa	
Aceite esencial de Melaleuca	5%
Pomada base	Csp 100 g

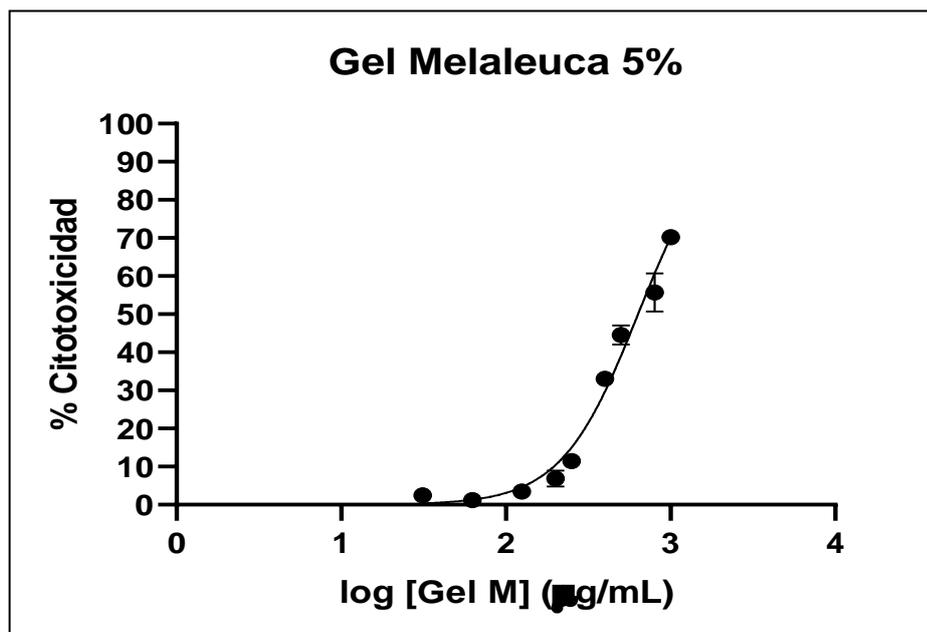
**Tabla 12: Controles de calidad realizados a las formulaciones de Gel y Pomada de *Melaleuca alternifolia* 5%**

Controles	Resultados	
	Gel de Melaleuca 5%	Pomada de Melaleuca 5%
<b>Caracteres organolépticos</b>	Aspecto homogéneo. Color ligeramente blanquecino. Alta consistencia	Aspecto homogéneo. Color blanquecino. Alta consistencia
<b>Determinación de Uniformidad</b>	Uniforme. Gotas dispersas adecuadamente. Presencia de pocas burbujas	N/A
<b>Viscosidad</b>	23570	15340
<b>pH</b>	6,57	N/A

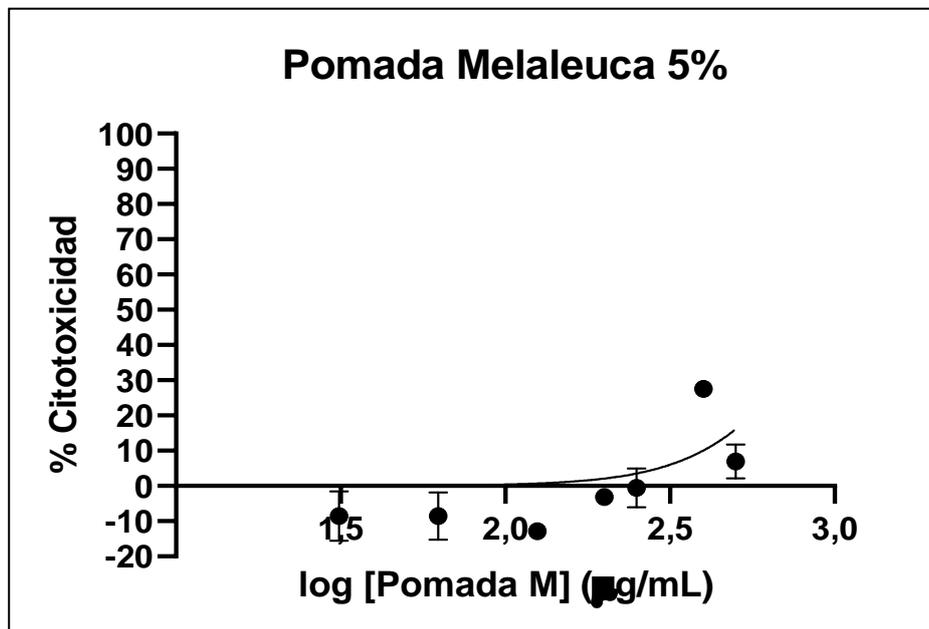
**6.1 Almacenamiento:** Todas las fórmulas fueron almacenadas en recipientes cerrados y en ambiente refrigerado (8-10°C) por un periodo máximo de 30 días.

## **7. CITOTOXICIDAD FORMULACIONES DE MELALEUCA ALTERNIFOLIA 5%**

Posteriormente se procedió a realizar el ensayo de Citotoxicidad y determinar las CC50 de las formulaciones previamente realizadas. El Gel y la Pomada base mostraron valores de CC50 634,2 µg/mL ( $r^2=0,9764$ ) (Figura 10) y >500 µg/mL ( $r^2=0,302$ ) (Figura 10). La Pomada presentó valores de toxicidad casi nulos inferiores inclusive a lo observado en los estudios realizados solo con la base (Figura 11). Ante esta situación la formulación de Pomada fue descartada para los ensayos posteriores de actividad antiviral.



**Figura 10.** Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [ $\log(\mu\text{g/mL})$ ] de Gel de Melaleuca 5%. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con las desviaciones estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 1000, 800, 500, 400, 250, 200, 125, 62,5 y 31,25  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 11.** Porcentaje de Citotoxicidad vs Concentración [ $\log(\mu\text{g/mL})$ ] de Pomada de Melaleuca 5%. En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con las desviaciones estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 500, 400, 250, 200, 125, 62,5, 31,25  $\mu\text{g/mL}$ .

## 8. ACTIVIDAD ANTIVIRIAL DEL GEL MELALEUCA ALTERNIFOLIA 5%

Posteriormente, se analizó a través del método de cuantificación de genoma viral de VHS-1 por qPCR la actividad antiviral del Gel de Melaleuca al 5%, obteniéndose un valor de IC50 de 75,96  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r^2=0,979$ ) (Figura 12)

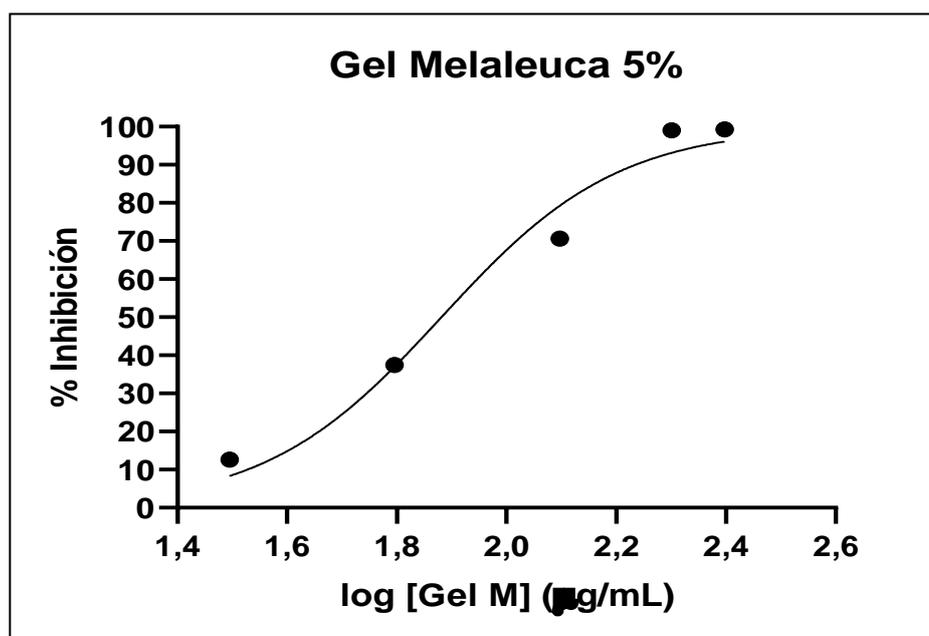


Figura 12. Porcentaje de Inhibición viral vs Concentración [ $\log(\mu\text{g}/\text{mL})$ ] del Gel de *Melaleuca alternifolia* 5%, En el gráfico los puntos indican el promedio de las mediciones ( $n=2$ ) con la desviación estándar. Las concentraciones utilizadas fueron de 250, 200, 125, 62,5, 31,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$

## 9. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE SELECTIVIDAD (IS) DE FORMULACIONES TÓPICAS

Una vez determinadas las CC50 e IC50 de formulaciones de Aciclovir 5% y Melaleuca 5% se procedió a calcular el Índice de Selectividad de estas, cuyos resultados se observan en la siguiente tabla:

Formulación	CC50	IC50	IS (CC50/IC50)
Gel Aciclovir 5%	582,4	<1,25	>465,92
Pomada Aciclovir 5%	495,0	3,6	137,5
Gel Melaleuca 5%	634,2	75,96	8,34

En el caso del Gel de Aciclovir, puede observarse un índice de selectividad alto, superior al de la Pomada de Aciclovir, demostrando un mejor perfil de seguridad y eficacia, con un índice de selectividad incluso mejor que estudios *in vitro* con el Aciclovir de manera aislada. (106). En el caso de la formulación en Gel de Melaleuca al 5%, se observó un índice de selectividad moderado de 8,34.

## DISCUSION

El aumento de la morbilidad a nivel mundial de las infecciones por VHS-1 y la aparición de cepas de VHS-1 resistentes al Aciclovir sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antiviral frente a este virus. Dentro del proceso de desarrollo de nuevas formulaciones, los estudios *in vitro* nos pueden brindar información preliminar muy valiosa sobre la seguridad y efectividad de un medicamento. Este proyecto tenía el fin de desarrollar una técnica de evaluación de formulaciones tópicas *in vitro* contra el VHS-1 de manera a brindarnos más información acerca del comportamiento de estas formulaciones en términos de toxicidad e inhibición viral.

Para analizar el método de análisis de actividad antiviral *in vitro* de formulaciones tópicas contra el VHS-1, fueron seleccionadas tres formas farmacéuticas semisólidas de uso tópico ampliamente utilizadas en tratamiento de afecciones de la piel: Cremas, geles y pomadas. Estas bases tópicas presentan características fisicoquímicas distintas entre ellas, respecto a la rapidez de la absorción o propiedades de hidratación o emoliencia, y cada una presentando ciertas ventajas y desventajas respecto a las demás (107). En el caso del fármaco Aciclovir, todas estas bases son utilizadas como vehículo para su uso tópico, siendo la Pomada, la primera forma tópica del Aciclovir lanzada (Zovirax) y aún la más comercializada (105), seguida de la Crema (108) y en menor medida el Gel (109), es por ello que se decidió analizar si estas tres bases tópicas son aptas para su evaluación a través de este método *in vitro*.

En la primera etapa del proyecto, se realizó el desarrollo de las tres bases tópicas (Crema, Gel y Pomada), analizando 2 fórmulas diferentes para cada una de ellas. Se seleccionó 1 fórmula por cada base tópica de acuerdo con cuáles presentaban los parámetros fisicoquímicos óptimos según los parámetros establecidos, como pH y viscosidad y caracteres organolépticos.

El método de evaluación de actividad antiviral *in vitro* de formulaciones tópicas contra el VHS-1 consistió en la realización de dos ensayos principales: El ensayo de Citotoxicidad y el ensayo de Actividad Antiviral. A través de estas se obtuvieron los resultados de CC50 e IC50, que permitieron calcular el índice de selectividad (IS) como una medida de

eficiencia y seguridad de estas formulaciones. Cabe destacar que estos cálculos fueron realizados en base al activo de estudio dentro de la base tópica correspondiente.

Primeramente, fue realizado el ensayo de Citotoxicidad y determinación de la CC50 de las bases tópicas, de manera a analizar si las mismas son aptas para su utilización el sistema y poder determinar las concentraciones máximas que podrían ser utilizadas para los ensayos posteriores. En el caso de la Crema base, aunque se ha observado estudios *in vitro* hechos con bases de emulsiones con una baja citotoxicidad (110), se observó una alta citotoxicidad en este estudio a todas las concentraciones utilizadas. Esto podría estar influenciado por la composición de la crema y sus componentes emulsificantes, ya que estudios anteriores varían en la composición de las cremas, utilizando por ejemplo tensoactivos como span 80 o tween 80 con bajas tasas de citotoxicidad (111). No se han reportado ensayos *in vitro* de formulaciones conteniendo al Ceral 10 como emulsificante, pudiendo esta provocar una alta citotoxicidad por la formación de una emulsión con el medio de cultivo y causando una alta muerte celular incluso a bajas concentraciones. Tanto el Gel base como la Pomada base mostraron CC50 altas ( $>700 \mu\text{g/mL}$ ), resultados que coinciden con estudios previos donde pudo evaluarse la baja citotoxicidad de los componentes tanto de geles como de pomadas (112,113).

Seguidamente, fue realizado el ensayo de Actividad antiviral de las bases de Gel y Pomada, de manera a observar si la base ejerce cierta actividad antiviral sobre el sistema. Cabe destacar que tanto para el Gel y la Pomada base, se presentó un fenómeno de inhibición viral a concentraciones igual o mayores a  $200 \mu\text{g/mL}$ , pero cuya actividad descendía drásticamente a concentraciones menores a estas. Mishra et al estudiaron la actividad antiviral de un Gel base para la incorporación de extractos naturales y encontraron una inhibición de la actividad de HSV-2 en un 5.88% a una concentración de  $125 \mu\text{g/mL}$ , siendo ésta la concentración máxima de estudio (114). Sin embargo, no se han reportado otros estudios de actividad antiviral u de otro tipo de bases tópicas a concentraciones mayores, por lo que este proyecto podría aportar un dato importante todavía no descrito en el comportamiento de las bases en un modelo *in vitro*. Esto permitió evaluar que este método podría ser utilizado para medir la actividad antiviral en concentraciones de bases menores a  $200 \mu\text{g/mL}$ , de manera a observar adecuadamente la actividad que ejerce el activo en estudio sobre la inhibición viral.

El Aciclovir es considerado el tratamiento de primera línea para infecciones por VHS-1, tanto de manera oral como tópica (11). Es un activo que presenta datos fuertemente

validados sobre su seguridad y eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* (115). Es por ello, que para verificar que el método de evaluación funcione de manera adecuada fueron evaluadas primeramente formulaciones de Aciclovir al 5% tanto en base de Gel como de Pomada. Esto nos permitiría comparar los resultados obtenidos con estudios previos realizados con este activo.

Primeramente, se realizó el ensayo de Citotoxicidad de las formulaciones de Gel y Pomada Aciclovir al 5%, obteniendo valores de CC 50 de 582,4  $\mu\text{g/mL}$  y 495  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, siendo valores un poco menores a los CC50 de sus respectivas bases, pudiendo observarse así la influencia del Aciclovir en la citotoxicidad.

Luego, fue realizado el ensayo de Actividad antiviral de estas formulaciones, obteniendo valores de IC50 de <1,25  $\mu\text{g/mL}$  para el Gel de Aciclovir al 5% y 3,6  $\mu\text{g/mL}$  para la Pomada base, valores comparables con estudios previos hechos con este activo (105,114). Piret et al realizaron de efectividad de distintas formulaciones de Aciclovir y Foscarnet en un modelo murino de infección cutánea por VHS-1, donde obtuvieron mejores tasas de eficacia del Aciclovir en una matriz polimérica en comparación a la Pomada. Concluyeron que una matriz polimérica, como por ej. geles, puede conducir a un mejor direccionamiento de los sitios de replicación viral, por sus características de semiviscosidad y mejor tasa de difusión cutáneas (116), pudiendo de esta manera justificar el mejor comportamiento *in vitro* del Gel en comparación a la Pomada en este ensayo.

Dentro del proceso de búsqueda de compuestos antivirales, se ha puesto una gran atención en el estudio de extractos vegetales como posibles alternativas eficaces para las infecciones por VHS-1. Debido a ello, en una segunda etapa del proyecto se optó por el desarrollo y evaluación de una formulación del aceite esencial *Melaleuca alternifolia*, comúnmente conocida como Tea Tree oil, de actividad antiviral anti-HSV-1 ya descrita para evaluar si el método también puede adecuarse al estudio de formulaciones de compuestos vegetales, entre ellos, aceites esenciales.

Para el ensayo de Citotoxicidad fueron evaluadas formulaciones de aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* al 5% en base de Gel y Pomada. Para el caso del Gel de Melaleuca al 5% pudo observarse un CC50 de 634,2  $\mu\text{g/mL}$ , una citotoxicidad incluso menor a los obtenidos con las formulaciones de Aciclovir. En el caso de la Pomada, no pudieron obtenerse resultados confiables en las mediciones de citotoxicidad, al encontrarse valores casi nulos de citotoxicidad y poco proporcionales a la concentración del activo y la base.

Esto es probablemente debido a que mezcla de la base de Pomada con el aceite, de carácter muy hidrofóbico, no permitía una buena interacción con el medio de cultivo. Se ha comprobado además que las bases hidrófobas tienen muchas características que limitan las velocidades de liberación de la sustancia activa en estudios *in vitro*. Los ingredientes poco solubles en agua de las bases hidrófobas no pueden penetrar en el líquido aceptor (siendo en este caso el medio de cultivo), por lo que no pueden cambiar el valor del coeficiente de partición del líquido aceptor / base semisólida para la sustancia activa. Esto hace que la liberación de sustancias activas lipofílicas a partir de bases hidrofóbicas sea limitada en esta clase de ensayos, incluso si están disueltas en la base debido a su fuerte afinidad por los componentes lipofílicos (117,118). A través de estos resultados se descartó a la Pomada de Aceite de Melaleuca al 5% de posteriores ensayos, concluyendo que, en el caso de evaluación de formulaciones con la base de Pomada, la solubilidad del activo es un parámetro crucial para la obtención de datos confiables en este tipo de sistema.

Con respecto a datos previos sobre la actividad antiviral del aceite esencial de Melaleuca sobre VHS, se observan resultados variados entre distintos estudios que van desde valores de IC<sub>50</sub> de 2 a 2700 µg/mL. Los investigadores consideran que estos resultados pudieron variar por la metodología del ensayo empleado o una posible variación en la composición del aceite esencial, de acuerdo a la zona de recolección o procesos de extracción realizados (68,69,119). En el caso del Gel de Melaleuca al 5% la misma demostró poseer actividad antiviral contra VHS-1 con un IC<sub>50</sub> de 75,96 µg/mL de principio activo.

Estos resultados nos permitieron obtener los datos de Índice de Selectividad de las formulaciones de Aciclovir y el Gel de Melaleuca. En el caso de las formulaciones de Aciclovir, tanto el Gel como la Pomada mostraron IS bastante altos, comportamiento esperado para este activo. En el caso del Gel de Melaleuca, aunque su IS tuvo un valor un poco menor a 10, siendo de esta forma considerado como un activo poco prometedor para esta patología. Estos resultados podrían ser acordes a los obtenidos con un ensayo clínico de tratamiento de lesiones cutáneas por VHS-1, en donde fue utilizado un Gel de *Melaleuca alternifolia* al 6% obteniendo sólo una ligera mejoría en el proceso de reepitelización de las heridas con este porcentaje de aceite (70).

Entre las proyecciones de este estudio podría incluirse la evaluación de una formulación a distintas concentraciones de activo, o variación en la composición de las bases hidrofílicas y evaluar de esta manera la influencia de estos factores sobre la citotoxicidad

y la actividad antiviral de los mismos, complementándolo con modelos *in vivo* de manera a determinar las correlaciones *in vitro* e *in vivo* de la actividad antiviral de formulaciones tópicas, hasta ahora poco descritas .(120–122).

## CONCLUSIÓN

Fueron desarrolladas formulaciones utilizando 3 bases tópicas diferentes (Crema, Gel y Pomada), cuyos parámetros fisicoquímicos fueron evaluados a través de los controles de calidad de las monografías oficiales.

Se pudo observar que este método de evaluación *in vitro* no fue adecuado para la base de Crema, debido a una alta citotoxicidad en todas las concentraciones de ensayo.

Se identificó la citotoxicidad de formulaciones de Gel de Aciclovir 5% (CC50 de 582,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Pomada de Aciclovir 5% (CC50 de 495  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y Gel de *Melaleuca alternifolia* 5% (CC50 de 634,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). En el caso de la Pomada de *Melaleuca alternifolia* 5%, la misma fue descartada del modelo al obtener datos de citotoxicidad poco confiables y concluyentes (CC50 >500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $r^2=0,302$ ), siendo la solubilidad del activo un posible factor determinante a ser considerado para la evaluación de activos en este tipo de bases.

Se determinó la actividad antiviral de estas formulaciones en un modelo de infección *in vitro* por HSV-1 para el Gel de Aciclovir (IC50 <1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Pomada de Aciclovir (IC50 de 3,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y Gel de *Melaleuca alternifolia* 5% (IC50 de 75,96  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). De esta manera, el Gel de Aciclovir 5% mostró el mejor valor de IS (>465,9) seguido de la Pomada de Aciclovir 5% (IS 137,5) mientras que en el caso del Gel *Melaleuca alternifolia* 5%, se obtuvo un valor de IS de sólo 8,34.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bascones-Martínez A, Pousa-Castro X. Herpesvirus. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2011 [cited 2019 Nov 16];27(1):11–24. Available from: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-12852011000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852011000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
2. Hantz S, Alain S. Infecciones por el virus del herpes simple. *EMC - Pediatría*. 2018;53(2):1–13.
3. OMS | Se calcula que dos terceras partes de la población mundial menor de 50 años está infectada por el virus del herpes simple de tipo 1. WHO. 2015;
4. Bradshaw MJ, Venkatesan A. Herpes Simplex Virus-1 Encephalitis in Adults: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2016;13(3):493–508. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-016-0433-7>
5. The acquisition of herpes simplex virus during pregnancy. England TN. *Journal Medicine* ©. 1997;337:509–15
6. Nicoll MP, Proença JT, Efstathiou S. The molecular basis of herpes simplex virus latency. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(3):684–705.
7. Lorette G, Crochard A, Mimaud V, Wolkenstein P, Stalder JF, El Hasnaoui A. A survey on the prevalence of orofacial herpes in France: The INSTANT Study. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(2):225–32.
8. Modi S, Van L, Gewirtzman A, Mendoza N, Bartlett B, Tremaine AM, et al. Single-day treatment for orolabial and genital herpes: A brief review of pathogenesis and pharmacology. *Ther Clin Risk Manag*. 2008;4(2):409–17.
9. Au E, Sacks SL. Therapeutic options for herpes simplex infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2003;5(1):22–7.
10. Biswas S, Sukla S, Goldner T, Field HJ, Kropcit D, Paulsen D, et al. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of the helicase-primase inhibitor pritelivir following treatment of wild-type or pritelivir-resistant virus infection in a murine herpes simplex virus 1 infection model. *Antimicrob Agents Chemother*.

- 2014;58(7):3843–52.
11. Gnann JW, Barton NH, Whitley RJ. Acyclovir: Mechanism of Action, Pharmacokinetics, Safety and Clinical Applications. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther.* 1983;3(5):275–83.
  12. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: Mechanisms, prevalence, and management. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):459–72.
  13. Li W, Wang XH, Luo Z, Liu LF, Yan C, Yan CY, et al. Traditional chinese medicine as a potential source for hsv-1 therapy by acting on virus or the susceptibility of host. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):1–23.
  14. Koch C, Reichling J, Schneele J, Schnitzler P. Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine.* 2008;15(1–2):71–8.
  15. Gavanji S, Sayedipour SS, Larki B, Bakhtari A. Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture. *J Acute Med [Internet].* 2015;5(3):62–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacme.2015.07.001>
  16. Peace J. *Aromatherapeutic blending: essential oils in synergy.* Sining Dragon Ed; London.2016
  17. Benencia F, Courrges MC. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. *Phyther Res.* 2000;14(7):495–500.
  18. Carson CF. Melaleuca alternifolia (tea tree) oil gel (6%) for the treatment of recurrent herpes labialis. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(3):450–1.
  19. Langhans SA. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Front Pharmacol.* 2018;9(JAN):1–14.
  20. Vinardell Martinez-Hidalgo MP. ¿Existen alternativas a los experimentos con animales? *Rev Bioética y Derecho.* 2021;(51):81–97.
  21. Gabaglio S, Alvarenga N, Cantero-González G, Degen R, Ferro EA, Langjahr P, et al. A quantitative PCR assay for antiviral activity screening of medicinal plants against Herpes simplex 1. *Nat Prod Res [Internet].* 2019;0(0):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1675064>

22. Sharma V, Mobeen F, Prakash T. Comparative Genomics of Herpesviridae Family to Look for Potential Signatures of Human Infecting Strains. *Int J Genomics*. 2016;2016.
23. Strasfeld L, Chou S. Antiviral drug resistance: Mechanisms and clinical implications. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2010;24(3):809–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2010.01.001>
24. Davison AJ, Bhella D. Comparative betaherpes viral genome and virion structure. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. 2007. 177–203 p.
25. Zhou ZH, Dougherty M, Jakana J, He J, Rixon FJ, Chiu W. Seeing the Herpesvirus Capsid at 8.5 Å. *Science* (80- ) [Internet]. 2000 May 5;288(5467):877 LP – 880. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/288/5467/877.abstract>
26. Heldwein EE, Krummenacher C. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2008;65(11):1653–68. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7570-z>
27. Agelidis AM, Shukla D. Cell entry mechanisms of HSV: What we have learned in recent years. *Future Virol*. 2015;10(10):1145–54.
28. Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BYJT, Shukla D. A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol*. 2006;174(7):1009–21.
29. L Oh M-J, Akhtar J, Desai P, Shukla D. A role for Heparan Sulfate in Viral Surfing. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 January 1.; 391 (1); 179-181.
30. Mohr I. Phosphorylation and dephosphorylation events that regulate viral mRNA translation. *Virus Res*. 2006;119(1):89–99.
31. Birkenheuer CH, Danko CG, Baines JD. Herpes Simplex Virus 1 Dramatically Alters Loading and Positioning of RNA Polymerase II on Host Genes Early in Infection. *J Virol*. 2018;92(8):1–18.
32. Pesola JM, Zhu J, Knipe DM, Coen D. Herpes Simplex Virus 1 Immediate-Early and Early Gene Expression during Reactivation from Latency under Conditions That Prevent Infectious Virus Production. *J. Virol*. 2005;79(23):14516–25.
33. Gruffat H, Marchione R, Manet E. Herpesvirus late gene expression: A viral-

- specific pre-initiation complex is key. *Front Microbiol.* 2016;7(JUN):1–15.
34. Retamal-Díaz AR, Suazo PA, Garrido I, Kalergis AM, González PA. Evasión de la respuesta inmune por virus herpes simplex. *Rev Chil Infectol.* 2015;32(1):58–70.
  35. Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML, Feldman LT. RNA complementary to a herpesvirus  $\alpha$  gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* (80- ). 1987;235(4792):1056–9.
  36. Al-Dujaili LJ, Clerkin PP, Clement C, McFerrin HE, Bhattacharjee PS, Varnell ED, et al. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiol.* 2011;6(8):877–907.
  37. Rechenchoski DZ, Faccin-Galhardi LC, Linhares REC, Nozawa C. Herpesvirus: an underestimated virus. *Folia Microbiol (Praha)* [Internet]. 2017;62(2):151–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-016-0482-7>
  38. James C, Harfouche M, Welton NJ, Turner KME, Abu-Raddad LJ, Gottlieb SL, et al. Herpes simplex virus: Global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ.* 2020;98(5):315–29.
  39. Whitley RJ, Roizman B. Infecções pelo vírus Herpes. *Lancet* 2001;357:1513–8.
  40. Valverde-I J. Herpes virus. *Dermatol Peru* 2017;27(4):212–24..
  41. Wald A. Genital herpes. *West J Med.* 1999;170(6):343–7.
  42. Cienfuegos G, Elena SM. Encefalitis herpética neonatal: dos gemelas, dos casos. :257–61.
  43. Tan IL, McArthur JC, Venkatesan A, Nath A. Atypical manifestations and poor outcome of herpes simplex encephalitis in the immunocompromised. *Neurology.* 2012;79(21):2125–32.
  44. Yeung-yue KA, Brentjens MH, Lee PC, Tyring SK. The management of herpes simplex virus infections. 2002;
  45. Wagstaff AJ, Faulds D, Goa KL. Aciclovir. *Drugs* [Internet]. 1994;47(1):153–205. Available from: <https://doi.org/10.2165/00003495-199447010-00009>
  46. Elion GB. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am J Med.* 1982;73(1 PART 1):7–13.

47. Chowdhury MA, Derar N, Hasan S, Hinch B, Ratnam S, Assaly R. Acyclovir-Induced Neurotoxicity : A Case Report and Review of Literature. 2016;943:2014–6.
48. Gunness P, Aleksa K, Bend J, Koren G. Acyclovir-induced nephrotoxicity: The role of the acyclovir aldehyde metabolite. *Transl Res* [Internet]. 2011;158(5):290–301. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2011.07.002>
49. Salvaggio MR, Gnann JW. *Drugs for Herpesvirus Infections* [Internet]. Fourth Edi. Infectious Diseases. Elsevier Ltd; 2017. 1309-1317.e1 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00153-2>
50. Heidl M, Scholz H, Dörffel W, Hermann J. Antiviral therapy of varicella-zoster virus infection in immunocompromised children - A prospective randomized study of aciclovir versus brivudin. *Infection*. 1991;19(6):401–5.
51. Wassilew SW, Wutzler P. Oral brivudin in comparison with acyclovir for improved therapy of herpes zoster in immunocompetent patients: Results of a randomized, double-blind, multicentered study. *Antiviral Res*. 2003;59(1):49–56.
52. Pope LE, Marcelletti JF, Katz LR, Lin JY, Katz DH, Parish ML, et al. The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process. *Antiviral Res*. 1998;40(1–2):85–94.
53. Garber A, Barnard L, Pickrell C. Review of Whole Plant Extracts With Activity Against Herpes Simplex Viruses In Vitro and In Vivo. *J Evidence-Based Integr Med*. 2021;26:1–57.
54. Hassan STS, Masarčíková R, Berchová K. Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. *J Pharm Pharmacol*. 2015;67(10):1325–36.
55. Schnitzler P. Essential Oils for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. *Chemotherapy*. 2019;64(1): 1–7.
56. Koch C, Reichling J, Kehm R, Sharaf MM, Zentgraf H, Schneelee J, et al. Efficacy of anise oil, dwarf-pine oil and chamomile oil against thymidine-kinase-positive and thymidine-kinase-negative herpesviruses. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(11):1545–50.
57. Schnitzler P, Astani A, Reichling J. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-based Complement Altern Med*. ;2011.

58. Swords G, Hunter GLK. Composition of Australian Tea Tree Oil (*Melaleuca alternifolia*). *J Agric Food Chem*. 1978;26(3):734–7.
59. Garozzo A, Timpanaro R, Bisignano B, Furneri PM, Bisignano G, Castro A. In vitro antiviral activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49(6):806–8.
60. Shellie R, Marriott P, Zappia G, Mondello L, Dugo G. Interactive use of linear retention indices on polar and apolar columns with an MS-library for reliable characterization of australian tea tree and other melaleuca sp. Oils. *J Essent Oil Res*. 2003;15(5):305–12.
61. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley T V. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(6):389–92.
62. Hammer KA, Carson CF, Riley T V. In vitro susceptibilities of lactobacilli and organisms associated with bacterial vaginosis to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(1):196.
63. Papadopoulos CJ, Carson CF, Hammer KA, Riley T V. Susceptibility of pseudomonads to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and components. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(2):449–51.
64. Neves RCSM, Makino H, Cruz TPPS, Silveira MM, Sousa VRF, Dutra V, et al. In vitro and in vivo efficacy of tea tree essential oil for bacterial and yeast ear infections in dogs. *Pesqui Vet Bras*. 2018;38(8):1597–607.
65. Nenoff P, Hausteil U-F, Brandt W. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) and components. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(2):449-51
66. Mertas A, Garbusińska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant candida albicans strains. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
67. Caldefie-Chézet F, Fusillier C, Jarde T, Laroye H, Damez M, Vasson MP, et al. Potential anti-inflammatory effects of *Melaleuca alternifolia* essential oil on human peripheral blood leukocytes. *Phyther Res*. 2006;20(5):364–70.
68. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The

- inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol Immunol.* 2003;47(9):681–4.
69. Schnitzler P, Schön K, Reichling J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Pharmazie.* 2001;56 4:343–7.
  70. Carson CF, Ashton L, Dry L, Smith DW, Riley T V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil gel (6%) for the treatment of recurrent herpes labialis [5]. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48(3):450–1.
  71. Spruance SL, Freeman DJ. Topical treatment of cutaneous herpes simplex virus infections. *Antiviral Res.* 1990;14(6):305–21.
  72. Oakley A. Topical formulations. *DermNet NZ* [Internet]. 2010 [cited 2021 Jul 28]; Available from: <https://dermnetnz.org/topics/topical-formulations/>
  73. ANMAT. *Farmacopea Argentina.* 7ma ed. Buenos Aires; 2003. 2745 p.
  74. ANVISA, Agency S. *Formulario Nacional de la Farmacopea Brasileña.* 2012.
  75. Pabón Varela Y, González Julio L. *Formas Farmacéuticas (Documento de docencia N°12).* Univ Coop Colomb [Internet]. 2017;28. Available from: <https://doi.org/10.16925/greylit.2110>
  76. Rendo P. Desarrollo de nuevos medicamentos, de la experiencia clínica al mercado: Una perspectiva desde la industria. *Development of the new drugs, from the clinical experience to the marketplace: A perspective from the industry.* Número XXII Congr Oct. 2015;19:177–82.
  77. Brodniewicz T, Gryniewicz G. Mini Review Preclinical Drug Development. *Acta Pol Pharm.* 2010;67(6):578–85.
  78. Singh S, Khanna VK, Pant AB. Development of In Vitro Toxicology: A Historic Story. *In Vitro Toxicol.* 2018 Jan 1;1–19.
  79. Aslantürk ÖS. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predict Risk to Our Actual World.* 2018;1–18.
  80. Gary PH. JBM. SCT et al. *The New England Journal of Medicine* Downloaded from [nejm.org](http://nejm.org) on April 1, 2015. For personal use only. No other uses without

- permission. Copyright © 1990 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. *New English J Med.* 1990;323(16):1120–3.
81. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opin Drug Discov.* 2008;3(6):655–69.
  82. Smee DF, Morrison AC, Barnard DL, Sidwell RW. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *J Virol Methods.* 2002;106(1):71–9.
  83. Van der Beek MT, Claas ECJ, van der Blij-de Brouwer CS, Morfin F, Rusman LG, Kroes ACM, et al. Rapid susceptibility testing for herpes simplex virus type 1 using real-time PCR. *J Clin Virol [Internet].* 2013;56(1):19–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2012.09.004>
  84. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(6):1292–305.
  85. Freymuth F, Eugene G, Vabret A, Petitjean J, Gennetay E, Brouard J, et al. Detection of respiratory syncytial virus by reverse transcription-PCR and hybridization with a DNA enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1995;33(12):3352–5.
  86. Brankatschk R, Bodenhausen N, Zeyer J, Burgmann H. Simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(12):4481–9.
  87. Rodríguez Yunta E. Ética De La Investigación En Modelos Animales De Enfermedades Humanas. *Acta Bioeth.* 2007;13(1):25–40.
  88. Vásquez Villalobos VJ, Rojas Padilla CR, Luján Velásquez MN, Cholán Rodríguez M, Mercedes Chávez L, Vásquez Angulo JD. Evaluación de digestibilidad proteica in vivo e in vitro utilizando *Saccharomyces cerevisiae* (Saccharomycetaceae) como organismo modelo. *Arnaldoa.* 2019;26(3):1125–42.
  89. Mukerjee M. Trends in animal research. *Sci Am.* 1997;276(2):86–93.
  90. R Russel, W. M., Burch RL. *The Principles of humane experimental technique.* Methuen.1959.
  91. Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actual osteol.* 2013;9(3):294–9.

92. Scior T, Martínez Morales E, Salinas Stefanón E. Los modelos in silico , una herramienta. *Elementos*. 2007;68(January):45–8.
93. Saldívar-González F, Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educ Quim*. 2017;28(1):51–8.
94. Pearson RM. In-vitro techniques: Can they replace animal testing? *Hum Reprod*. 1986;1(8):559–60.
95. Chilukuri S, Rosen T. Management of acyclovir-resistant herpes simplex virus. *Dermatol Clin*. 2003;21(2):311–20.
96. Fabriquímica SAU. Ficha técnica del producto [Internet]. Fabriquímica Sau. Available from: <http://www.fabriquimica.com/producto/ceral-10/>
97. Pareja B. Los sistemas no acuosos y sus posibles aplicaciones en Dermatología y Cosmética Nonaqueous systems and their possible applications in Dermatology and Cosmetics. 2005;16(2):67–9.
98. Tercedor J. Conocimiento de conservantes: crucial en Dermatología. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2017;108(8):702–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ad.2017.05.004>
99. Pereira L. *Cosméticos e Formulações*. 1era ed. Sao Paulo; 2014. 70 p.
100. Sales OD. *Desarrollo y elaboración de productos cosméticos: Cuadernos formativos Vol 81*. 1era ed. Universitat de Valencia; 2020. 214 p.
101. United States Pharmacopeial Convention. *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 41-NF 36)*. 2016.
102. Calvo B. *Prácticas de tecnología farmacéutica I*. Universidad del País Vasco. 2016
103. Timm M, Saaby L, Moesby L, Hansen EW. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology*. 2013;65(5):887–94.
104. Invitrogen. *alamarBlue® Assay*. US Pat No 5501959. 2007;(5):1–27.
105. Food and Drug Administration, Glaxo Wellcome Inc. *Zovirax® Ointment 5%*. 2001; Available from: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2001/018604s018lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2001/018604s018lbl.pdf)
106. Boff L, Schneider NFZ, Munkert J, Ottoni FM, Ramos GS, Kreis W, et al. Elucidation of the mechanism of anti-herpes action of two novel semisynthetic

- cardenolide derivatives. *Arch Virol* [Internet]. 2020;165(6):1385–96. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04562-1>
107. García Delgado R, Escario Travesedo E, Sánchez Romero A. Uso racional de la medicación tópica en dermatología. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 2004;32(1):39–44.
  108. FDA, CDER. ZOVIRAX® (acyclovir) cream 5% for topical use. 2002; Available from: [www.fda.gov/medwatch](http://www.fda.gov/medwatch).
  109. Kern Pharma SL., Lavirk 50mg/mL: Prospecto de información al usuario. 2020
  110. Donalisio M, Leone F, Civra A, Spagnolo R, Ozer O, Lembo D, et al. Acyclovir-loaded chitosan nanospheres from nano-emulsion templating for the topical treatment of herpesviruses infections. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):1–12.
  111. Lipipun V, Sasivimolphan P, Yoshida Y, Daikoku T, Sritularak B, Ritthidej G, et al. Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Res* [Internet]. 2011;91(2):154–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.05.013>
  112. Hayati F, Ghamsari SM, Dehghan MM, Oryan A. Effects of carbomer 940 hydrogel on burn wounds: an in vitro and in vivo study. *J Dermatolog Treat* [Internet]. 2018;29(6):593–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09546634.2018.1426823>
  113. Kempf M, Kimble RM, Cuttle L. Cytotoxicity testing of burn wound dressings, ointments and creams: A method using polycarbonate cell culture inserts on a cell culture system. *Burns*. 2011;37(6):994–1000.
  114. Mishra NN, Kesharwani A, Agarwal A, Polachira SK, Nair R, Gupta SK. Herbal gel formulation developed for anti-human immunodeficiency virus (HIV)-1 activity also inhibits in vitro HSV-2 infection. *Viruses*. 2018;10(11):1–18.
  115. Collins P. The spectrum of antiviral activities of acyclovir in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother*. 1983;12(SUPPL. B):19–27.
  116. Piret J, Désormeaux A, Gourde P, Juhász J, Bergeron MG. Efficacies of topical formulations of foscarnet and acyclovir and of 5- percent acyclovir ointment (Zovirax) in a murine model of cutaneous herpes simplex virus type 1 infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(1):30–8.
  117. Jankowski A, Dyja R, Phd B. Dermal and transdermal delivery of active substances

- from semisolid bases. *Indian J Pharm Sci.* 2017;79:488–500.
118. Mo J, Kaewnopparat N, Songkro S, Panichayupakaranant P, Reanmongkol W. Physicochemical properties, in vitro release and skin permeation studies of a topical formulation of standardized pomegranate rind extract. *Pak J Pharm Sci.* 2015;28(1):29–36.
  119. Jang MH, Piao XL, Kim JM, Kwon SW, Park JH. Inhibition of cholinesterase and amyloid- $\beta$  aggregation by resveratrol oligomers from *Vitis amurensis*. *Phyther Res* [Internet]. 2008;22(4):544–549. Available from: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/117934759/abstract>
  120. Rodu B, Lakeman F. In vitro virucidal activity components of a forming medication. *J Oral Pathol Med.* 1988;17(7):324–6.
  121. Rezazadeh F, Moshaverinia M, Motamedifar M, Alyaseri M. Assessment of Anti HSV-1 Activity of Aloe Vera Gel Extract: an In Vitro Study. *J Dent (Shiraz, Iran)* [Internet]. 2016;17(1):49–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26966709>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4771053>
  122. Valenti D, De Logu A, Loy G, Sinico C, Bonsignore L, Cottiglia F, et al. Liposome-incorporated *Santolina insularis* essential oil: Preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *J Liposome Res.* 2001;11(1):73–90.

## ANEXOS



*Imagen 1. Proceso de elaboración del Gel base. Dispersión del Carbopol en medio acuoso*



*Imagen 2. Medición de viscosidad utilizando un Viscosímetro de Brookfield*



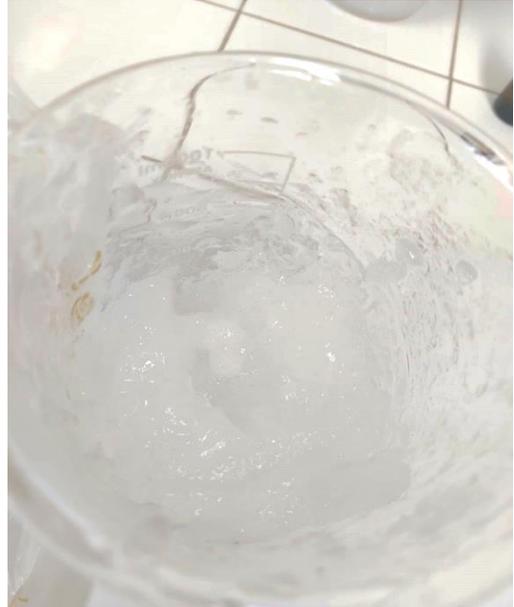
*Imagen 3. Medición de pH de las formulaciones finales*



*Imagen 4. Aspecto de la Pomada base*



*Imagen 5. Aspecto de la Crema base*



*Imagen 6. Aspecto del Gel base*



*Imagen 7. Aspecto del Gel de Aciclovir*