

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

Nanoemulsões de uso tópico contendo extrato de *Achyrocline satureioides*: estudos de formulação, permeação e atividade anti-herpética

JULIANA BIDONE

PORTO ALEGRE, 2013

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

Nanoemulsões de uso tópico contendo extrato de *Achyrocline satureioides*: estudos de formulação, permeação e atividade anti-herpética

Tese apresentada por **Juliana Bidone**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Porto Alegre, 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18.09.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Lucas Antonio Miranda Ferreira
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dr. Marilise Brittes Rott
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Bidone, Juliana

Nanoemulsões de uso tópico contendo extrato de
Achyrocline satureioides: estudos de formulação,
permeação e atividade anti-herpética / Juliana
Bidone. -- 2013.
139 f.

Orientador: Helder Ferreira Teixeira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2013.

1. Nanoemulsão. 2. Achyrocline satureioides. 3.
Flavonóides. 4. Penetração pele/mucosa. 5. Atividade
anti-herpética. I. Teixeira, Helder Ferreira,
orient. II. Título.

Agradecimentos à CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos para desenvolvimento desta tese, ao CNPq pelo auxílio na realização dos experimentos, ao Laboratório de Parasitologia e ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tão bem como ao Laboratório de Virologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina, que deram suporte técnico e intelectual em etapas fundamentais do trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Helder Teixeira pelos momentos de incentivo, pelo reconhecimento e pela compreensão nos momentos mais delicados e, com a mesma importância, pelo bom humor e contagiantes gargalhadas.

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia-UFRGS que possibilitaram a realização deste trabalho e tornaram este período muito mais agradável.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia, sempre acolhedores, gentis e prestativos.

À Prof^a. Cláudia M. O. Simões por ter disponibilizado seu laboratório e nos permitido permear por novos conhecimentos.

Aos antigos e novos amigos do Laboratório de Virologia Aplicada-UFSC pelo auxílio no trabalho e pelo carinho de sempre.

Em especial, ao Thiago Caon, ser único e especial.

Aos professores do Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG), Prof. George Ortega, Prof. Pedro R. Petrovick, Prof^a. Letícia Koester e Prof^a. Valquíria Linck Bassani, por terem me acolhido nesta singular família e pelos exemplos de amizade, dedicação e trabalho.

Aos queridos amigos e eternos LDGênicos, Alexandre, Bárbara, Cabral, Daiane, Evelyn, Greice, Leandro (Sidóca), Lilian, Lísias, Paula, Regina e Simone.

E aos LDGênicos, companheiros diários de trabalho e diversão (claro), Bruna, Fran, Gabriela, Giovanni, Karina, Letícia, Lucélia, Liege, Marina, Pedro, Renata, Samo, Sara, e Vini.

À Débora e à Cris pela amizade, pelas deliciosas conversas e por todo o auxílio.

À Mi e, de modo muito especial, à Fê Bruxel, pelo constante incentivo e pelos valorosos exemplos de profissionalismo e companherismo.

À Ju Carini, parceira, amiga, psicóloga, *magnifique chef*. Enfim, sem palavras.

Aos antigos e novos amigos, em especial, Di, Dani Arend, Raquel, Mari, Cris, Emiliana e Tiago, pelo bem precioso da amizade.

À minha querida família, em especial à minha mãe Martha, aos meus irmãos Daniela e Rodolpho, e aos meus irmãos postíços, Tica, Leo, Tina, Furo e Preta, por ser a minha fortaleza.

RESUMO

Achyrocline satureioides (AS) - Asteraceae, conhecida como marcela, é uma planta medicinal amplamente utilizada na América do Sul. Estudos recentes demonstraram a atividade anti-herpética dos extratos hidroalcoólicos de AS. Tal atividade tem sido relacionada à presença de constituintes flavonoídicos (i.e. quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina) nesses extratos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver nanoemulsões de uso tópico contendo o extrato de AS visando o tratamento do herpes simples. Em uma primeira etapa, o extrato hidroetanólico líquido ou seco (aspersão ou liofilização) de AS foi incorporado em nanoemulsões constituídas de um núcleo oleoso de triglicerídeos de cadeia média estabilizado por lecitina de gema de ovo e polissorbato 80. As nanoemulsões foram obtidas por emulsificação espontânea. As formulações foram adicionalmente caracterizadas por medidas de tamanho, potencial zeta, viscosidade e morfologia. A incorporação dos flavonoides nas nanoemulsões foi total e mostrou-se estável por quatro meses. A liberação da 3-O-metilquercetina a partir das formulações contendo extratos ocorreu dentro de 8 horas seguindo uma cinética de 1ª ordem, utilizando células de difusão de Franz. Quando a membrana utilizada foi pele de orelha suína, não foram detectados flavonoides no fluido receptor. Os flavonoides foram detectados nas camadas da pele, especialmente quando essa foi lesionada, o que foi confirmado por microscopia confocal usando Vermelho do Nilo como marcador fluorescente. A utilização de mucosa esofágica como membrana conduziu a uma maior retenção dos flavonóides em comparação à pele, e a remoção da camada superficial permitiu a permeação dos flavonóides. A determinação dos flavonoides tanto nas formulações como na pele e mucosa suína foi realizada por cromatografia líquida em condições analíticas validadas ao longo do estudo. A avaliação da atividade anti-herpética *in vitro* frente ao HSV (tipo 1) demonstrou que a incorporação de extrato de AS em nanoemulsões conduz à redução da concentração inibitória 50% e ao aumento do índice de seletividade. O conjunto dos resultados demonstra que nanoemulsões são potenciais carreadores de uso tópico para o extrato de AS.

Palavras-chave: *Achyrocline satureioides*, nanoemulsão, validação, penetração/retenção, atividade anti-herpética.

ABSTRACT

Achyrocline satureioides (AS) - Asteraceae, known as marcela, is a medicinal plant widely used in South America. Recent studies have demonstrated the antiherpetic activity of hydroalcoholic extracts of AS. Such activity has been related to the presence of flavonoids (i.e. quercetin, luteolin, and 3-O-methylquercetin) in these extracts. In this context, the objective of this study was to develop topical nanoemulsions containing extract of AS intended for the treatment of herpes simples. First, the liquid or dry (spray- or freeze-dried) hydroethanolic extract was incorporated in nanoemulsions, composed of an oil core of medium chain triglycerides stabilized by egg-lecithin and polysorbate 80. The extracts were incorporated during the preparation of the nanoemulsion by spontaneous emulsification. The formulations were further characterized by evaluating size, zeta potential, viscosity, and morphology. The incorporation of the flavonoids in the nanoemulsions was total and the formulation was stable for four months. The release of 3-O-methylquercetin from nanoemulsions containing extracts occurred within 8 hours following 1st-order kinetics, using the Franz diffusion cells. When the membrane used was pig ear skin, flavonoids were not detected in the receptor fluid. The flavonoids were detected in the skin layers, especially when this was injured, which was confirmed by confocal microscopy using Nile Red as a fluorescent marker. The use of esophageal mucosa as membrane led to greater retention of flavonoids in comparison to skin, and the removal the superficial layer of epithelium allowed the permeation of the flavonoids. The determination of the flavonoids in the formulations and the pig ear skin layers was assayed by liquid chromatography in analytical conditions validated throughout the study. The evaluation of the *in vitro* antiherpetic activity over HSV (Type 1) demonstrated that the incorporation of AS extract into nanoemulsions led to a reduction of the inhibitory concentration and an increase in the selectivity index. The overall results show that nanoemulsions are potential carriers for the topical use of AS extract.

Keywords: *Achyrocline satureioides*, nanoemulsion, validation, penetration/retention, antiherpetic activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Representação esquemática dos extratos, produtos intermediários e finais obtidos a partir de inflorescências de *Achyrocline satureioides* . **36**
- Figura 2.** Estrutura química dos flavonóides majoritários de *Achyrocline satureioides*: quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina..... **38**

CAPÍTULO 2

- Figure 1.** Liquid chromatography profile at 362nm and diode array from to 500nm. Chromatogram of *Achyrocline satureioides* spiked with skin sample at QCT, LUT and 3-O-MQ concentration of approximately 4.0, 3.0 and 10.0 µg/mL, respectively, chromatogram of blank nanoemulsion and chromatogram of skin sample..... **65**

CAPÍTULO 3

- Figure 1.** Physicochemical properties of nanoemulsions containing increasing amount of HEE. Droplet size, polydispersity index, ζ -potential and viscosity..... **85**
- Figure 2.** TEM images of the nanoemulsions containing HEE, FDE or SDE at 1.0% of dried residue of HEE **89**
- Figure 3.** Release profile of 3-O-MQ from nanoemulsions containing liquid (HEE) or dried (FDE or SDE) *Achyrocline satureioides* extracts at 0.25% or 1.0 %..... **90**
- Figure 4.** Histological images obtained after 8 hours of permeation assay from untreated skin and skin treated with blank nanoemulsion or nanoemulsion containing quercetin, HEE, SDE and FDE..... **93**

CAPÍTULO 4

- Figure 1.** TEM images obtained for blank nanoemulsion and nanoemulsions containing quercetin or 1.0 % of extract dried residue..... **113**
- Figure 2.** Physicochemical properties of nanoemulsions containing HEE at 1.0% over time (up to 180 days). Droplet size, polydispersity index, ζ -potential and viscosity..... **114**
- Fluorescent images of porcine ear intact or impaired skin from

Figure 3. permeation/retention studies after the application of *Achyrocline satureioides*-loaded nanoemulsion containing Nile Red dye (8 h). Control hematoxylin/eosin histological images of intact or impaired skin. Confocal images were obtained 10 and 40 fold magnification.... **116**

Figure 4. Fluorescent images of porcine esofagical mucosa intact or impaired skin from permeation/retention studies after the application of *Achyrocline satureioides*-loaded nanoemulsion containing Nile Red dye (8 h). Control hematoxylin/eosin histological images of intact or impaired mucosa. Confocal images were obtained 10 and 40 fold magnification **118**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1		
Tabela 1.	Patentes com descrição da obtenção de extratos e produtos a partir de <i>Achyrocline satureioides</i>	37
<hr/>		
CAPÍTULO 2		
Table 1.	Linearity curves data for QCT, LUT and 3-O-MQ.....	66
Table 2.	Precision and accuracy data of the method	67
Table 3.	Recovery of the main flavonoids (QCT, LUT and 3-O-MQ) of <i>A. satureioides</i> into nanoemulsion and skin samples	68
Table 4.	Flavonoids determination in <i>Achyrocline satureioides</i> extract, nanoemulsion and skin.....	69
<hr/>		
CAPÍTULO 3		
Table 1.	Final composition (wt.%) of nanoemulsions (NE) containing 0.25 or 1.0% of HEE, SDE or FDE of <i>Achyrocline satureioides</i>	81
Table 2.	Flavonoid content ($\mu\text{g}/\text{mg}$) determined in HEE and FDE or SDE..	85
Table 3.	Flavonoid content ($\mu\text{g}/\text{mL}$) in nanoemulsions containing increasing amount of liquid extract (HEE expressed as dried residue).....	86
Table 4.	Physicochemical properties of nanoemulsions containing liquid (HEE) or dried (FDE or SDE) <i>A. satureioides</i> extracts at 0.25% or 1.0%.....	87
Table 5.	Flavonoid content (%) of nanoemulsions containing liquid (HEE) or dried (FDE or SDE) <i>A. satureioides</i> extracts at 0.25% or 1.0%.....	88
Table 6.	Correlation coefficient (r^2) values obtained by fitting the 3-O-MQ released values to the zero order, first order and <i>Higuchi</i> kinetic models	91
Table 7.	Parameters obtained from first order model for nanoemulsion (at 1.0%).....	92

Table 8.	3-O-MQ retention ($\mu\text{g/g}$) into skin from nanoemulsions containing HEE, FDE and SDE at 0.25% or 1.0% after 8 hours of permeation kinetics.....	92
-----------------	--	-----------

CAPÍTULO 4

Table 1.	Physicochemical properties of nanoemulsions (NE)	112
Table 2.	Flavonoid retention ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) after permeation assay with intact or impaired (up to 60 tapes) porcine ear skin.....	115
Table 3.	Flavonoid permeation and retention ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) after permeation assay with intact or impaired mucosa.....	117
Table 4.	Cytotoxicity and antiherpetic activity of <i>Achyrocline satureioides</i> -loaded nanoemulsions or isolates quercetin and their controls before incorporation in formulations.....	119

SUMÁRIO

Introdução	19
Objetivos	25
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
Capítulo 1	
Revisão dos estudos de base tecnológica realizados para obtenção de extratos e produtos a partir de <i>Achyrocline satureioides</i>	29
Resumo	31
Introdução.....	34
Obtenção e otimização dos extratos de <i>Achyrocline satureioides</i>	38
Obtenção de produtos intermediários.....	40
Formas farmacêuticas sólidas.....	43
Formas farmacêuticas semissólidas.....	44
Sistemas de liberação nanoestruturados.....	45
Considerações Finais.....	47
Referências.....	49
Capítulo 2	
Validação de uma metodologia por cromatografia líquida para a determinação da retenção na pele de flavonóides a partir de nanoemulsões contendo extratos de <i>Achyrocline satureioides</i>	55
Resumo	57
Introduction	60
Experimental	61
Materials	61
Preparation of the <i>Achyrocline satureioides</i> extract	61
Preparation of nanoemulsions.....	62
Chromatographic conditions	62
Validation.....	62
Skin permeation/retention study	64
Results and Discussion.....	64
References.....	70
Capítulo 3	
Incorporação de extratos líquido e secos de <i>Achyrocline satureioides</i> Lam (DC) em nanoemulsões de uso tópico obtidas por emulsificação espontânea.	73

Resumo.....	75
Introduction.....	78
Experimental.....	79
Materials	79
Preparation of the <i>Achyrocline satureioides</i> extracts.....	79
Chromatographic conditions for flavonoids assay.....	80
Evaluation of flavonoids content in the extracts.....	80
Preparation of the nanoemulsions.....	81
Evaluation of flavonoids content in the nanoemulsions.....	82
Characterization of the nanoemulsions.....	82
3-O-MQ release kinetics.....	83
Permeation/penetration assay.....	83
Skin histological examination.....	84
Results	84
Flavonoids content of the extracts.....	84
Properties of nanoemulsions containing increasing amount of HEE.....	85
Flavonoids content into the nanoemulsions.....	86
Properties of nanoemulsions containing liquid and dried extracts.....	87
Flavonoids content into the nanoemulsions containing HEE and FDE or SDE...	88
Morphological examination of nanoemulsions.....	88
Release of 3-O-MQ.....	90
Skin permeation/retention evaluation of 3-O-MQ.....	92
Histological analysis.....	93
Discussion	93
Conclusions	97
References.....	97

Capítulo 4

Avaliação do efeito da integridade de pele e mucosa suína na retenção de flavonóides a partir de nanoemulsões contendo extrato de <i>Achyrocline satureioides</i>.....	101
Resumo	103
Introduction	106
Experimental	107
Materials	107
Preparation of the <i>Achyrocline satureioides</i> extract	107
Chromatographic conditions for flavonoids assay	108

Preparation of the nanoemulsions	108
Flavonoid content into HEE and HEE-loaded nanoemulsions	108
Characterization of the nanoemulsions	109
Permeation assay in intact and impaired skin or esophageal mucosa	110
Confocal fluorescence microscopy	111
Cytotoxicity measurement	111
Anti-HSV-1 measurement	111
Results	112
Properties of nanoemulsions containing HEE	112
Properties of nanoemulsions containing HEE at 1% over time	113
Skin permeation/retention study.....	114
Esophageal mucosa permeation/retention study.....	116
<i>In vitro</i> antiherpetic activity	118
Discussion	119
Conclusions	122
References	122
Discussão geral	127
Referências	134
Conclusões	137

A resistência dos vírus herpéticos aos fármacos de primeira escolha, principalmente em pacientes imunocomprometidos, torna as infecções herpéticas um preocupante problema de saúde pública (FIELD, 2001; SCHNITZLER et al., 2007; MUNDINGER e EFFERTH, 2008). Até o momento, não existe tratamento totalmente eficaz para o herpes simples, uma vez que a farmacoterapia disponível apenas minimiza as crises, retarda ou espaça o aparecimento de novas manifestações. Desta maneira, a busca por novos fármacos e estratégias para o tratamento das infecções herpéticas é crescente.

Diversos estudos recentes têm demonstrado as potencialidades do uso de extratos, frações e/ou compostos bioativos isolados de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças (SCHMIDT et al., 2009). Neste sentido, uma planta tradicional do Sul do Brasil, a *Achyrocline satureioides* Lam DC – Asteraceae (marcela), tem revelado diversas atividades biológicas, incluindo a anti-herpética. Estudos relataram a atividade de extratos hidroalcoólicos e secos por aspersão frente ao Vírus Herpético tipo 1 (HSV-1) indicando uma perturbação tardia no ciclo de replicação do vírus (SIMÕES et al., 1999; BETTEGA et al., 2004). Tal atividade foi atribuída à presença das agliconas flavonoídicas majoritárias, especialmente quercetina e 3-O-metilquercetina, uma vez que a atividade antiviral destes compostos isolados já foi claramente demonstrada (KHAN et al., 2005).

Contudo, esses flavonoides do extrato de marcela apresentam uma reduzida hidrossolubilidade, o que dificulta a incorporação dos extratos em formulações de uso tópico, geralmente de caráter hidrofílico. Nanoemulsões de uso tópico têm sido descritas como potenciais carreadores de moléculas de reduzida hidrossolubilidade, como no caso dos flavonoides (FASOLO et al., 2009; VARGAS, 2012). Nanoemulsões são sistemas constituídos de um núcleo oleoso de diâmetro nanométrico estabilizado por um sistema tensoativo, disperso em uma fase aquosa. O interesse destes sistemas reside na possibilidade de melhoria de suas propriedades físicas, como espalhabilidade e oclusividade, na modulação da permeação de fármacos através das camadas da pele e mucosas, ou ainda, no direcionamento a um sítio específico (FRONZA et al., 2007; GUTIÉRREZ et al., 2008; CEVC e VIERL, 2010).

Em 2007, Zorzi e colaboradores descreveram um processo de obtenção de sistemas nanoestruturados de uso tópico contendo o extrato de *Achyrocline satureioides* que originou uma patente - INPI-PI0805156-9 (CARVALHO et al., 2008). No seu conjunto, os resultados obtidos demonstraram a viabilidade de incorporação dos constituintes majoritários do extrato hidroalcoólico da referida planta medicinal em nanoestruturas de composição lipídica, polimérica ou mista, na forma de nanoemulsões, nanopartículas, lipossomas e agregados.

A incorporação do extrato de *Achyrocline satureioides* em sistemas nanoestruturados pode exercer um efeito positivo tanto na permeação/retenção dos flavonóides majoritários (i.e. quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina) através da pele e mucosas, bem como na atividade anti-herpética dos extratos desta planta medicinal. Partindo-se desta hipótese, a presente tese de doutorado tem por objetivo principal aplicar a tecnologia de obtenção de nanoestruturas contendo extrato de *Achyrocline satureioides* (CARVALHO et al., 2008) com ênfase no desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados destinados à aplicação tópica para o tratamento do herpes simples. A tese está apresentada em quatro capítulos:

- O capítulo 1 apresenta uma revisão dos estudos de desenvolvimento de produtos contendo extratos de *Achyrocline satureioides*;
- O capítulo 2 descreve a validação de uma metodologia por cromatografia para a quantificação dos flavonóides majoritários da planta;
- O capítulo 3 apresenta uma metodologia de incorporação de extratos líquidos ou secos (por aspensão ou liofilização) de *Achyrocline satureioides* em nanoemulsões de uso tópico, bem como as propriedades físico-químicas dos produtos desenvolvidos;
- O capítulo 4 investiga o efeito da incorporação do extrato de *Achyrocline satureioides* sobre a permeação/retenção dos flavonóides majoritários em pele e mucosa íntegras e lesionadas, bem como na atividade anti-herpética *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- B. A. Vargas B. A., J. Bidone, L. K. Oliveira, L. S. Koester, V. Bassani, H. F. Teixeira. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **8**: 1-7 (2012).
- C. M. O. Simões, M. Amoros, L. Girre. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. *Phytotherapy Research* **13**: 323-328 (1999).
- C. Schmidt, M. Fronza, M. Goettert, F. Geller, S. Luik, E.M.M. Flores, C.F. Bittencourt, G.D. Zanetti, B.M. Heinzmann, S. Laufer. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *Journal of Ethnopharmacology* **122**: 523-532, 2009.
- D. Fasolo, V. L. Bassani, H. F. Teixeira. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. *Pharmazie* **64** (11): 726-730 (2009).
- E. L. S. Carvalho, G. K. Zorzi, G. L. V. Poser, H. F. Teixeira, J. C. F. Moreira, V. L. Bassani. Nanoestrutura compreendendo extratos vegetais, processo de produção de nanoestrutura compreendendo extratos vegetais e composições compreendendo as mesmas (PI0805156-9) (2008).
- G. Cevc, U. Vierl. Nanotechnology and transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *Journal Controlled Release* **141**: 277-299 (2010).
- G. K. Zorzi, G.K. *Nanoemulsões contendo solução extrativa de Achyrocline satureioides: formulação, permeação cutânea e atividade antioxidante*. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 100p. (2007).
- H. J. Field. Herpes simplex virus antiviral drug resistance- current trends and future prospects. *Journal of Clinical Virology* **21**: 261-269 (2001).
- J. M. Gutiérrez, C. González, A. Maestro, I. Solé, C. M. Pey, J. Nolla. Nanoemulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **13**(4): 245-251 (2008).
- J. M. R. Bettega, H. Teixeira, V. L. Bassani, C. R. M. Barardi, C. M. O. Simões. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research* **18**: 819-823 (2004).
- M. T. H. Khan, A. Ather, K. D. Thompson, R. Gambari. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research* **67**: 107-119 (2005).
- P. Schnitzler, C. Koch, J. Reichling. Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strain to essential oils of Ginger, Thyme, Hyssop, and Sandalwood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**(5): 1859-1862 (2007).
- T. Fronza, S. Guterres, A. Pohlmann, H. Teixeira. *Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios*. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS (2007).

T.A. Munding, T. Efferth. Herpes simplex virus: Drug resistance and new treatment options using natural product (Review). *Molecular Medicine Reports* 1: 611-616, 2008.

OBJETIVOS

Objetivo geral

A presente tese tem por objetivo geral o desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões de uso tópico contendo extrato etanólico de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. — Asteraceae (marcela) visando à obtenção de produtos com atividade anti-herpética.

Objetivos específicos

- Preparar nanoemulsões de uso tópico contendo extratos líquidos ou secos (por aspersão ou liofilização) de *Achyrocline satureioides*;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das nanoemulsões, avaliando o efeito da incorporação do extrato (concentração e modo de incorporação) sobre as propriedades das nanoestruturas;
- Validar metodologia analítica por cromatografia líquida para a determinação simultânea dos flavonóides majoritários de *Achyrocline satureioides* nas formulações, e em camadas de pele de orelha suína;
- Investigar o perfil de permeação e retenção cutânea dos flavonóides majoritários de *Achyrocline satureioides* em mucosa esofágica e em pele de orelha suína íntegras e lesionadas;
- Avaliar *in vitro* a atividade anti-herpética dos produtos desenvolvidos frente aos vírus herpéticos do tipo 1.

CAPÍTULO 1

Revisão dos estudos de base tecnológica realizados para obtenção de extratos e produtos a partir de *Achyrocline satureioides*

*Neste primeiro capítulo da tese buscou-se revisar os estudos realizados para a obtenção de extratos a partir de *Achyrocline satureioides* (marcela) visando o desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas. De maneira geral, em uma primeira etapa, os estudos descrevem a obtenção de extratos a partir das inflorescências de marcela por maceração utilizando soluções hidroetanólicas como líquido extrator. Em condições otimizadas, os extratos contém elevados teores dos flavonoides majoritários da planta: quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina. A esses flavonoides é atribuída a maior parte das atividades biológicas relatadas aos extratos de marcela. Alguns estudos descrevem a obtenção de extratos secos por aspersão a partir de macerados de marcela em escala piloto ou semi-industrial. Esses produtos intermediários foram diretamente incorporados em formulações semissólidas (pomadas e cremes), ou ainda, utilizados no desenvolvimento de comprimidos, obtidos após a prévia granulação dos extratos. Mais recentemente, produtos de base nanotecnológica contendo extratos de marcela foram desenvolvidos como lipossomas, nanopartículas e nanoemulsões. O crescente número de patentes de produtos intermediários ou finais contendo extratos de *Achyrocline satureioides* demonstra o interesse comercial de produtos contendo extratos dessa planta, especialmente no setor de cosméticos. A compilação de todos estes estudos de base tecnológica envolvendo a *Achyrocline satureioides* será submetida a um periódico da área. Por esta razão, nesta versão foram suprimidas as páginas 33 a 54.*

CAPÍTULO 2

Validação de uma metodologia por cromatografia líquida para a determinação da retenção na pele de flavonóides a partir de nanoemulsões contendo extratos de

Achyrocline satureioides

No segundo capítulo deste trabalho objetivou-se a validação de um método por cromatografia líquida com sensibilidade adequada para quantificar os flavonoides majoritários da *Achyrocline satureioides* (marcela) em pele de orelha de porco após ensaio de permeação/ penetração com nanoemulsões contendo extratos da planta. O método selecionado utiliza como fase móvel metanol: ácido fosfórico 0,16M: acetonitrila (46:44:10, v/v/v) e como fase estacionária uma coluna de fase reversa polar, que permite uma otimização do tempo de análise das amostras. O processo de validação englobou todos os parâmetros exigidos para análise de amostras biológicas. Nenhum interferente da nanoemulsão ou extrato da pele foi observado no tempo de retenção dos flavonoides e a pureza dos picos foi adequada. O método mostrou ser linear na faixa de concentração de 0,25 a 10 µg/mL com coeficiente de determinação maior que 0,999 para os três flavonoides avaliados. O limite de quantificação inferior (LLOQ) obtido foi de 0,25 µg/ mL. Na determinação da precisão intra e inter-dia os resultados ficaram compreendidos entre 1,79 a 6,73% para 0,25 µg/mL e entre 0,23 a 0,96 % para a concentração de 10 µg/mL. A recuperação dos flavonoides a partir da nanoemulsão e do extrato da pele encontra-se entre 90,05 e 109,88 %. O método foi utilizado para a determinação de quercetina, luteolina e 3-O-metil quercetina em nanoemulsões contendo 1% de extrato de marcela (calculado como resíduo seco) e em amostras de pele após ensaio de permeação/penetração utilizando células de difusão de Franz. O teor de flavonoides nas nanoemulsões foi aproximadamente 100 %. Após 2 horas de permeação, $0,63 \pm 0,05$ µg/g de luteolina e $0,92 \pm 0,22$ µg/g de 3-O- metilquercetina foram detectados na pele. Quercetina não foi detectada nas mesmas condições experimentais. Em conclusão, o método selecionado para quantificação dos principais flavonoides da marcela em nanoemulsões e em pele de orelha de porco mostrou ser adequado, sendo específico, linear, preciso e exato. Tais resultados foram aceitos para publicação na revista *Pharmazie*, nº 68, DOI 10.1691/ph.2013.3049. Devido aos direitos de confiabilidade, as páginas 59 a 71 desta tese foram suprimidas.

CAPÍTULO 3

Incorporação de extratos líquido e secos de *Achyrocline satureioides* Lam (DC) em nanoemulsões de uso tópico obtidas por emulsificação espontânea

*Neste terceiro capítulo, extratos de *Achyrocline satureioides* (marcela) líquido ou secos (por aspersão ou liofilização) foram incorporados em nanoemulsões. Os extratos foram adicionados à fase orgânica durante o processo de preparo das nanoemulsões por emulsificação espontânea. Em uma primeira etapa, quantidades crescentes do extrato líquido foram adicionadas às nanoemulsões a fim de avaliar a capacidade do nanocarreador em incorporar o extrato. Os resultados demonstraram que as formulações permanecem monodispersas com um diâmetro médio próximo de 250nm até a incorporação de 1,0 % de extrato, calculado como resíduo seco. Na sequência, os extratos secos por liofilização ou aspersão foram incorporados às formulações nesta mesma concentração (1%). Independente do tipo de extrato utilizado, o procedimento mostrou-se adequado, resultando em nanoemulsões com tamanho médio de 264,59 a 266,95 nm e índice de polidispersão de 0,13 a 0,15. O potencial zeta foi aproximadamente -44,0 mV para todas as formulações e os teores obtidos foram maiores que 84 % para os três flavonoides monitorados: quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina. Prosseguiu-se com o estudo de liberação das nanoemulsões preparadas com os diferentes extratos nas duas concentrações 0.25% e 1.0% de extrato, utilizando como marcador o constituinte majoritário da marcela, 3-O- metilquercetina. Após 8 horas de ensaio, até 90 % deste flavonoide foi liberado a partir das formulações, com uma cinética de liberação de primeira ordem. Para a avaliação da permeação/penetração cutânea foi utilizada a metodologia das células de difusão de Franz com pele de orelha suína. A maior concentração de 3-O-MQ retida na pele foi encontrada para a formulação preparada com a maior concentração de extrato hidroetanólico (1.0%): $5 \pm 1,27 \mu\text{g/g}$ após oito horas de ensaio. A avaliação histológica demonstrou que nenhuma das formulações avaliadas neste estudo causa danos à pele. Assim, concluiu-se que é possível a obtenção de nanoemulsões contendo elevada quantidade de extratos de *Achyrocline satureioides*. A nanoemulsão preparada com extrato hidroetanólico foi escolhida para experimentos posteriores, pelo número reduzido de etapas tecnológicas para sua obtenção, bem como pelos resultados observados no estudo de retenção cutânea. Este terceiro capítulo foi organizado em um artigo a ser submetido a um periódico da área. Por esta razão, as páginas 77 a 100 desta tese foram suprimidas.*

CAPÍTULO 4

Avaliação do efeito da integridade de pele e mucosa suína na retenção de flavonóides a partir de nanoemulsões contendo extrato de *Achyrocline satureioides*

Neste último capítulo buscou-se o aprofundamento dos conhecimentos a cerca da formulação preparada com 1 % de extrato hidroetanólico de *Achyrocline satureioides*. Em um primeiro momento, a estabilidade da formulação foi avaliada por 180 dias. Parâmetros como tamanho médio, potencial zeta, índice de polidispersão e viscosidade demonstraram que tais formulações são estáveis neste período, embora o teor de quercetina tenha apresentado alteração a partir de 150 dias. Em continuidade, com intuito da utilização das formulações para o tratamento tópico do herpes simples, a permeação/penetração cutânea dos flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina foi determinada nas diferentes camadas da pele usando células de difusão de Franz e pele de orelha suína íntegra ou 'lesionada' por tape stripping. A retenção das três moléculas foi mais pronunciada no estrato córneo (0,24; 0,39 e 1,02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, para quercetina, luteolina e 3-O-metilquercetina), sendo que maiores concentrações na epiderme e derme foram obtidas quando a barreira cutânea foi alterada pelo tape stripping. Concentração de 3-O-metilquercetina cerca de quatorze vezes maior foi encontrada na epiderme quando o estrato córneo foi lesionado com 60 fitas. Os resultados obtidos no estudo de permeação/penetração foram confirmados pela análise das peles por microscopia confocal. A marcação fluorescente nas camadas superiores da pele foi mais intensa com o estrato córneo não íntegro. A avaliação da permeação/retenção de flavonóides em modelo de mucosa esofágica suína também foi realizada, sendo obtidos resultados superiores aos encontrados no ensaio de permeação com pele. Por fim, a atividade anti-herpética frente ao HSV, tipo 1, do extrato de *Achyrocline satureioides* e do flavonoide quercetina, bem como das nanoemulsões preparadas com estes compostos, foi avaliada. Quando a quercetina estava incorporada na nanoemulsão o CI_{50} reduziu de 6,50 para 5,28 $\mu\text{g}/\text{mL}$; para o extrato esta redução foi de 12,83 para 2,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O índice de seletividade, por sua vez, aumentou cerca de 9 vezes para quercetina e 8 vezes para o extrato quando os nanocarreadores foram avaliados. Com isso, verifica-se que a incorporação do extrato de *Achyrocline sauteioides* em nanoemulsões pode melhorar a atividade anti-herpética deste extrato, sendo uma promissora alternativa no desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica para o tratamento tópico do herpes simples. Tais resultados e discussões foram inseridos em um artigo a ser submetido e por questões de confiabilidade as páginas 105 a 126 da tese foram suprimidas.

DISCUSSÃO GERAL

O herpes labial é uma infecção causada pelos vírus do herpes simples (HSV) que provoca ulcerações nos lábios e região perioral. O HSV permanece intacto e latente em nervos adjacentes à região afetada e causa infecções recorrentes. Até o momento, o herpes não possui cura, sendo os tratamentos disponíveis eficazes apenas frente à manifestação aguda da doença. Infecção, reinfecção e recorrência do HSV estão associadas a alterações do sistema imunológico (RIEDIGER et al., 2009). O tratamento tópico do herpes labial baseia-se em sucessivas aplicações de formulações contendo aciclovir ou penciclovir, que levam ao desaparecimento das lesões e ao alívio da dor (HASLER-NGUYEN et al., 2009). No entanto, a ampla utilização deste esquema terapêutico tem ocasionado a disseminação de cepas resistentes, principalmente em pacientes imunocomprometidos (SAUERBREI et al., 2010; FIELD e BISWAS, 2011).

Neste contexto, observa-se um crescimento na busca de novos compostos antivirais, especialmente a partir de plantas medicinais uma vez que essas têm se mostrado uma promissora fonte de novos fármacos (ZHU et al., 2006; DE CLERCQ, 2012; CECÍLIO et al., 2012). No Brasil, essa estratégia torna-se ainda mais relevante considerando-se a riqueza da nossa flora (CECÍLIO et al., 2012). Frente aos vírus HSV, estudos têm mostrado elevada atividade de extratos ricos em polifenóis e compostos flavonoídicos (GONÇALVES et al., 2001; CHUANASA et al., 2008). No Sul da América do Sul é encontrada a *Achyrocline satureioides*, uma planta amplamente utilizada na medicina popular conhecida como marcela ou macela. Dentre as inúmeras atividades atribuídas a ela, recentemente foi comprovada a atividade anti-herpética de extratos secos por aspersão, o que foi relacionado à presença das agliconas flavonoídicas QCT, LUT e 3-O-MQ (BETTEGA et al., 2004; RETTA et al., 2012).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu um procedimento visando a incorporação do extrato hidroetanólico de *Achyrocline satureioides* em sistemas nanoestruturados lipídicos e/ou poliméricos (CARVALHO et al., 2008). Nas condições experimentais utilizadas, o extrato hidroalcoólico da planta medicinal substituiu uma parte do solvente correntemente utilizado na metodologia de preparação de nanemulsões por emulsificação espontânea.

Partindo-se da metodologia proposta por Carvalho e colaboradores (2008), que possibilitou a incorporação dos flavonoides em uma única etapa tecnológica, sem a prévia desalcoholização do extrato, o presente trabalho teve por objetivo principal obter formulações de uso tópico contendo os componentes bioativos (especialmente flavonoides) do extrato etanólico de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. — Asteraceae (marcela), com ênfase no desenvolvimento de nanoemulsões com atividade anti-herpética.

A primeira etapa do trabalho consistiu na validação de uma metodologia analítica para a quantificação dos flavonoides de *Achyrocline satureioides* a partir dos extratos, formulações e amostras de pele, utilizada ao longo do trabalho. A quantificação simultânea das agliconas QCT, LUT e 3-O-MQ encontradas no extrato da planta medicinal reveste-se de grande interesse, uma vez que esses flavonóides apresentam atividade anti-herpética. Nossos estudos tiveram como ponto de partida o relato recente de Bica (2009) que propôs o uso de uma coluna fenila para separar e quantificar os três flavonóides com um tempo de retenção bastante inferior aos descritos para essa planta medicinal (RETTA et al., 2011). O método validado mostrou-se linear em uma faixa de 0,25 a 10 µg/ mL, específico, preciso e exato, sendo adequado para as análises pretendidas no trabalho. O reduzido valor do limite de quantificação (LLOQ = 0,25 µg/mL), determinado através dos parâmetros preconizados para análise de amostras biológicas (FDA, 2001), foi satisfatório visto que as concentrações de compostos retidas na pele são geralmente muito baixas.

Nas condições analíticas validadas, o primeiro conjunto de experimentos visou avaliar a capacidade das formulações desenvolvidas em incorporar o extrato de *Achyrocline satureioides*. Para tanto, quantidades crescentes de extrato foram adicionadas a fase etanólica do procedimento de emulsificação espontânea. Os resultados mostraram um teor crescente de QCT, LUT e 3-O-MQ até a concentração final de 2.0% do resíduo do extrato de *Achyrocline satureioides*. Contudo, a partir da adição de 1% de extrato, as formulações apresentaram um aumento significativo do diâmetro médio, índice de polidispersão e viscosidade. Desta forma, a concentração de 1% de resíduo foi selecionada para os estudos subsequentes. Nessa concentração, as formulações apresentam-se monodispersas com um diâmetro médio de cerca de 250 nm e um teor de flavonoides de 1,3 mg/mL de nanoemulsão.

Extratos secos apresentam diversas vantagens sobre os líquidos, incluindo a concentração e a estabilidade dos compostos bioativos (TEAGARDEN e BAKER, 2002). Assim, nesse estudo, a substituição do extrato líquido de *Achyrocline satureioides* por extratos secos (por aspersão ou liofilização) desta planta medicinal foi paralelamente avaliada. Foi demonstrada a incorporação dos flavonoides majoritários do extrato nas nanoemulsões. A incorporação foi realizada mediante a solubilização dos mesmos na fase etanólica do procedimento de emulsificação espontânea. Independente do extrato adicionado, os flavonoides parecem estar incorporados nas nanoemulsões considerando-se que os mesmos não foram detectados na fase aquosa externa das formulações, obtida após a separação em membranas de ultrafiltração. Tal resultado pode ser atribuído à reduzida hidrosolubilidade dessas agliconas favorecendo assim a partição na fase interna oleosa das formulações. Contudo, cabe ressaltar que a incorporação dos extratos secos nas formulações, apesar de promissora, necessita da diluição do extrato hidroalcoólico para a liofilização e a adição de adjuvantes de secagem e tensoativos para evitar a precipitação de compostos pouco solúveis do extrato de *Achyrocline satureioides* (BASSANI et al., 2001).

A avaliação do diâmetro médio de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e viscosidade demonstrou que o tipo de extrato incorporado não influencia de maneira marcante as propriedades das nanoemulsões. Algumas pequenas diferenças foram detectadas, especialmente para a formulação contendo o extrato seco por aspersão, fato atribuído à presença do adjuvante de secagem (dióxido de silício coloidal). O diâmetro e morfologia das nanogotículas foram paralelamente avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. As fotomicrografias obtidas, apresentadas nos capítulos 3 e 4, demonstram que as formulações apresentam nanogotículas homogêneas individualizadas, independentemente do tipo de extrato adicionado.

Para as formulações contendo o extrato líquido, as propriedades físico-químicas das formulações foram avaliadas em função do tempo (até 6 meses). Os resultados mostraram-se similares aqueles observados logo após o preparo: diâmetro médio de cerca de 250 nm com índice de polidispersão e viscosidade próximos a 0,1 e 2 cP, respectivamente. Apenas uma pequena variação do teor de

quercetina foi observada a partir de 150 dias fato esse que precisa ser investigado de maneira mais aprofundada com base nos interessantes resultados sobre a estabilidade dos flavonoides de marcela descritos por Holzschuh (2007). A estabilidade físico-química pode ser atribuída ao filme interfacial misto constituído de lecitina de gema de ovo e polissorbato 80, bem como ao elevado potencial zeta negativo das formulações. Esse, por sua vez, aumenta progressivamente com a adição de quantidades crescentes de extrato de *Achyrocline satureioides*. Apesar de ser complexa a atribuição desta carga de superfície a um composto específico do extrato, pode ser sugerido que a adsorção de compostos como ácidos fenólicos (DESMARCHELIER et al., 1998) na interface óleo/água poderia contribuir para esse resultado.

Os compostos bioativos devem ser liberados a partir da formulação para alcançarem o seu sítio de ação. A liberação da 3-O-MQ a partir das formulações foi avaliada utilizando-se células de difusão de Franz. Uma liberação de cerca de 60% ou 90% foi observada para as formulações contendo 0,25% ou 1,0% dos diferentes extratos após 8 horas de ensaio. A extensão da liberação da 3-O-MQ foi influenciada pela quantidade de extrato incorporado nas formulações seguindo em todos os casos uma cinética de 1ª ordem, indicando que a liberação foi dependente da concentração de flavonoide remanescente no carreador. A formulação preparada com o extrato seco por aspersão liberou um pouco mais lentamente nos tempos curtos, sendo esse resultado atribuído à presença dos adjuvantes de secagem. Quando a liberação da 3-O-MQ foi avaliada a partir de uma formulação contendo a molécula isolada, obteve-se uma liberação máxima de 50 % em 8 horas, seguindo uma cinética de ordem zero. Isto indica que a presença de outros compostos do extrato influencia na liberação da 3-O-MQ a partir do carreador, provavelmente em decorrência de maior saturação do núcleo oleoso e interface da nanoestrutura.

Para as moléculas com potencial atividade anti-herpética deve ser verificada a capacidade destas em penetrar na pele. O melhor efeito dos fármacos antivirais aplicados topicamente está relacionado à concentração que alcança à camada basal da epiderme, que é o principal local de replicação do HSV (HASLER-NGUYEN et al., 2009). O conjunto dos resultados obtidos indicou que os flavonoides não chegam à fase aceptora após 8 horas de experimento com pele suína, independente do tipo de

extrato utilizado. A estratificação mostrou que os flavonoides ficam retidos nas camadas da pele seguindo a seguinte ordem: estrato córneo > epiderme > derme. Além disso, foi observado que a penetração de QCT, LUT e 3-O-MQ na pele é mais dependente da estrutura da molécula (Log P) do que da sua concentração no extrato. Após os estudos de permeação, a análise histológica das peles de orelha suína foi realizada e as imagens mostraram que as formulações não provocam danos à pele. Os resultados de liberação e histologia são bastante importantes na determinação do tempo a ser utilizado no ensaio de permeação/ penetração cutânea.

A manifestação mais comum da infecção herpética é o aparecimento de lesões, que geralmente surgem no início da fase aguda e permanecem por até 10 dias. Inicialmente aparecem como vesículas na borda labial, e rapidamente se colapsam em ulcerações, pústulas e crostas (YUE et al., 2002). Considerando-se esta importante etapa do processo patológico do herpes simples buscou-se avaliar a penetração cutânea dos flavonoides a partir da nanoemulsão também em amostras de pele lesionada. A metodologia do *tape stripping* foi escolhida para lesionar o estrato córneo e com isso diminuir o efeito da barreira cutânea. O *tape stripping* tem sido amplamente utilizado para avaliar a penetração de fármacos em peles não íntegras (JENSEN et al., 2011; SPAGNUL et al., 2011). Diferentes graus de comprometimento da integridade cutânea foram obtidos com crescente número de fitas no *tape stripping*. Quando a barreira cutânea foi alterada, uma maior concentração de flavonóides foi encontrada na epiderme e na derme, sendo a resposta proporcional à extensão da lesão provocada. Esta é uma observação de relevante importância, visto que a aplicação tópica de fármacos anti-herpéticos ocorre comumente no período de aparecimentos das lesões labiais (BRADY e BERNSTEIN, 2004).

Visando ilustrar essa distribuição dos compostos a partir das formulações, o perfil de penetração e retenção dos flavonoides liberados a partir da nanoemulsão foi avaliado utilizando-se um marcador fluorescente incorporado no núcleo oleoso das nanoemulsões, o Vermelho do Nilo. A intensidade da fluorescência observada foi maior na camada mais superior da pele e aumentou na epiderme e derme quando o estrato córneo foi lesionado.

Neste estudo, a permeação/retenção dos flavonóides também foi avaliada utilizando mucosa esofágica suína. Devido às características peculiares do herpes simples que acomete lábios, região perioral e cavidade oral, a administração do tratamento na mucosa bucal é uma alternativa bastante interessante. A mucosa oral é constituída por três regiões bem definidas, sendo a região denominada como mucosa bucal uma área não-queratinizada de elevada permeabilidade (SHOJAEI, 1998). Como a mucosa bucal suína é frequentemente lesionada no processo de alimentação do animal, além de ser de difícil separação a partir da musculatura adjacente, modelo com mucosa esofágica tem sido descrito para substituição (CONSUELO et al., 2005; CAON et al., 2011), tendo sido adotado neste trabalho. A mucosa esofágica é constituída de epitélio estratificado não-queratinizado, similar ao epitélio da mucosa bucal. Os resultados obtidos para permeação/retenção dos flavonóides confirmaram a elevada permeabilidade das mucosas. Maiores concentrações de QCT, LUT e 3-O-MQ foram extraídas a partir da mucosa, além de ter sido obtida permeação dos flavonóides, fato não observado nos ensaios de permeação com a pele suína. A retirada da camada mais superficial do epitélio aumentou ainda mais a retenção dos flavonóides.

A extrapolação de comportamentos apresentados por formulações em avaliações *in vitro* para uma escala *in vivo* é bastante complexa (PATEL et al., 1996) e conduz na maior parte das vezes a proporções de doses altamente distintas. No entanto, os ensaios *in vitro* são de extrema importância na predição da real aplicabilidade de uma determinada molécula ou formulação. Neste trabalho, a atividade anti-herpética dos flavonóides do extrato hidroetanólico de *Achyrocline satureioides*, bem como do flavonóide isolado quercetina, em solução ou incorporados em nanoemulsões, foi avaliada frente ao HSV, tipo 1, cepa KOS. Com os resultados observou-se que a incorporação de quercetina ou extrato em sistemas nanoestruturados intensifica a atividade antiviral dos compostos por redução da citotoxicidade ou por diminuição da dose efetiva.

REFERÊNCIAS

A. B. Cecílio, D. B. de Faria, P. C. Oliveira, S. Caldas, D. A. de Oliveira, M. E. G. Sobral, M. G. R. Duarte, C. P. S. Moreira, C. G. Silva, V. L. de Almeida. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of Ethnopharmacology* **141**: 975-981 (2012).

A. H. Shojaei. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: A review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **1** (1): 15-30 (1998).

A. Sauerbrei, S. Deinhardt, R. Zell, P. Wutzler. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant clinical isolates. *Antiviral Research* **86**: 246-252 (2010).

A. Spagnul, C. Bouvier-Capely, G. Phan, G. Landon, C. Tessier, D. Suhard, F. Rebière, M. Agarande, E. Fattal. *Ex vivo* decrease in uranium diffusion through intact and excoriated pig ear skin by a calixarene nanoemulsion. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **79**: 258-267 (2011).

C. Desmarchelier, J. Coussio, G. Ciccía. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("Marcela"). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **31**: 1163-1170 (1998).

C. Riediger, P. Sauer, E. Matevossian, M. W. Muller, P. Buchler, H. Friess. Herpes simplex virus sepsis and acute liver failure. *Clinical Transplantation* **23**: 37-41 (2009).

D. L. Teagarden, D. S. Baker. Practical aspects of lyophilization using non-aqueous co-solvent systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **15**: 115-133 (2002).

D. Retta, E. Dellacassa, J. Villamil, S. A. Suárez, A.L. Bandoni. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products* **38**: 27-38 (2012).

E. de Clercq. Highlights in antiviral drug research: antivirals at the horizon. *Medicinal Research Reviews* **00**: 1-34 (2012).

E. L. S. Carvalho, G. K. Zorzi, G. L. V. Poser, H. F. Teixeira, J. C. F. Moreira, V. L. Bassani. Nanoestrutura compreendendo extratos vegetais, processo de produção de nanoestrutura compreendendo extratos vegetais e composições compreendendo as mesmas (PI0805156-9) (2008).

FDA. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville, USA (2001).

H. J. Field, S. Biswas. Antiviral drug resistance and helicase-primase inhibitors of herpes simplex virus. *Drug Resistance Updates* **14**: 45-51 (2011).

I. D. del Consuelo, G.-P. Pizzolato, F. Falson, R. H. Guy, Y. Jacques. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **94** (12): 2777-2788 (2005).

J. L. S. Gonçalves, s. G. Leitão, F. D. Monache, M. M. F. S. Miranda, M. G. M. Santos, M. T. V. Romanos, M. D. Wigg. *In vitro* antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. *Phytomedicine* **8**(6): 477-480 (2001).

J. M. R. Bettega, H. Teixeira, V. L. Bassani, C. R. M. Barardi, C. M. O. Simões. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research* **18**: 819-823 (2004).

K. A. Yeung-Yue, M. H. Brentjens, P. C. Lee, S. K. Tying. Herpes simplex viruses 1 and 2. *Dermatologic Clinics* **20**: 249-266 (2002).

L. B. Jensen, K. Petersson, H. M. Nielsen. *In vitro* penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact barrier-impaired skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **79**: 68-75 (2011).

N. Hasler-Nguyen, D. Shelton, G. Ponard, M. Bader, M. Schaffrik, P. Mallefet. Evaluation of the *in vitro* skin permeation of antiviral drugs from penciclovir 1% cream and acyclovir 5% cream used to treat herpes simplex virus infection. *BMC Dermatology* **9** (3): 1-10 (2009).

P. J. Patel, A.-H. Ghanem, W. I. Higuchi, V. Srinivasan, E. R. Kern. Correlation of in vivo topical efficacies with in vitro predictions using acyclovir formulations in the treatment of cutaneous HSV-1 infections in hairless mice: an evaluation of the predictive value of the C* concept. *Antiviral Research* **29**: 279-286 (1996).

R. C. Brady, D. I. Bernstein. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research* **61**: 73-81 (2004).

T. Caon, C. M. O. Simões. Effect of freezing and type of mucosa on ex vivo drug permeability parameters. *AAPS PharmSciTech* **12**: 587-592 (2011).

T. Chuanasa, J. Phromjai, V. Lipipun, K. Likhitwitayawuid, M. Suzuki, P. Pramyothin, M. Hattori, K. Shiraki. Anti-herpes simplex virus (HSV-1) activity of oxyresveratrol derived from Thai medicinal plant: Mechanism of action and therapeutic efficacy on cutaneous HSV-1 infection in mice. *Antiviral Research* **80**: 62-70 (2008).

V. C. Bica; J. P. Carini, S. M. Piran, V. L. Bassani, P. R. Petrovick. Improvement of a HPLC method for determining quercetin, luteolin, 3-O- methylquercetin and achyrobichalcone in *Achyrocline satureioides*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Submitted. (2012).

V. L. Bassani, H. F. Teixeira, G. G. Ortega, E. Lemos-Senna, C. M. O. Simões, D. Sonaglio, P. R. Petrovick, 2001. Processo para obtenção de extratos de *Achyrocline satureioides* e produto obtido (PI 103468-5) (2001).

W. Zhu, L. C. M. Chiu, V. E. C. Ooi, P. K. S. Chan, P. O. Ang Jr. Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against *Herpes simplex* virus type 1. *Phytomedicine* **13**: 695-701 (2006).

CONCLUSÕES

- O método analítico proposto para doseamento simultâneo dos flavonóides QCT, LUT e 3-O-MQ do extrato da *Achyrocline satureioides* mostrou ser adequado para análise do teor desses compostos em nanoemulsões e para quantificação destes em extratos de pele em estudos de permeação cutânea.
- Foi demonstrada a viabilidade de incorporação de extratos líquidos e secos (obtidos por aspensão ou liofilização) de *Achyrocline satureioides* em nanoemulsões através da técnica de emulsificação espontânea, sem alterações marcantes das propriedades físico-químicas das mesmas (até 1% de resíduo seco).
- As propriedades físico-químicas e o teor dos flavonóides das nanoemulsões contendo o extrato de *Achyrocline satureioides* permaneceram constantes durante 4 meses de armazenamento.
- A liberação do marcador químico 3-O-MQ a partir das nanoemulsões contendo o extrato de *Achyrocline satureioides* foi dependente da concentração inicial de extrato, seguindo uma cinética de 1ª ordem.
- Os estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro* mostraram que os flavonóides do extrato de *Achyrocline satureioides* permanecem preferencialmente retidos no estrato córneo e na epiderme de pele de orelha suína.
- Um aumento significativo da quantidade de flavonoides, a partir das nanoemulsões contendo extrato de *Achyrocline satureioides*, foi detectado na epiderme e na derme em pele lesada, como sugerido pelos estudos de microscopia confocal usando Vermelho do Nilo como marcador.
- A retenção dos flavonoides nas camadas mais superficiais da mucosa esofágica suína foi claramente demonstrada, sendo que a localização em camadas mais profundas e uma permeação através desta foi detectada quando a camada superficial do epitélio foi removida;
- Os ensaios *in vitro* demonstraram que a incorporação de flavonóides em nanoemulsões reduz consideravelmente sua citotoxicidade. Além disso, quercetina e extrato de *A. satureioides* em nanoemulsões mostraram ser mais seletivos frente à cepa KOS do HSV-1.

