

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

**Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões contendo extrato padronizado de  
*Pterocaulon balansae* visando à atividade antifúngica**

BRUNA MEDEIROS NEVES

Porto Alegre, 2018



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

**Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões contendo extrato padronizado de  
*Pterocaulon balansae* visando à atividade antifúngica**

Tese apresentada por Bruna Medeiros  
Neves para obtenção do TÍTULO DE  
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Professor Dr. Helder Ferreira Teixeira  
Coorientadora: Professora Dr<sup>a</sup>. Gilsane Lino von Poser

Porto Alegre, 2018

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 com indicação de louvor em 27 de abril de 2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Angela Machado de Campos  
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva  
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Elfrides Eva Scherman Schapoval  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Medeiros Neves, Bruna  
Desenvolvimento tecnológico de nanoemulsões  
contendo extrato padronizado de *Pterocaulon balansae*  
visando à atividade antifúngica / Bruna Medeiros  
Neves. -- 2018.

206 f.

Orientador: Helder Teixeira.

Coorientador: Gilsane von Poser.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2018.

1. *Pterocaulon*. 2. Cumarinas. 3. Nanoemulsões. I.  
Teixeira, Helder, orient. II. von Poser, Gilsane,  
coorient. III. Título.

## APRESENTAÇÃO

A presente tese foi redigida no modelo com encarte de publicações no formato de capítulos seguindo o modelo proposto para elaboração de teses e dissertações recomendado pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dessa forma, o trabalho encontra-se dividido em:

- Introdução;
- Objetivo geral e objetivos específicos;
- Capítulo I – Artigo de revisão: The genus *Pterocaulon* (Asteraceae) – A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and biological properties;
- Capítulo II – Artigo científico: Determination of main coumarins of *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) by an ultra-fast liquid chromatography method — analytical and bioanalytical assays;
- Capítulo III – Artigo científico: Supercritical CO<sub>2</sub> extraction as a selective method for the obtainment of coumarins from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae);
- Capítulo IV – Artigo científico: Topical nanoemulsions as delivery systems for *Pterocaulon balansae* extracts aiming at the treatment of sporotrichosis;
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências.



*Agradecimento à CAPES, órgão financiador da bolsa de estudos para desenvolvimento desta tese, e ao CNPq pelo suporte financeiro na realização dos experimentos. Agradecimentos também ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, assim como ao Laboratório de Fungos Patogênicos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Laboratório de Operações Unitárias da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul que disponibilizaram equipamentos e materiais necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente tese.*



“É o tempo da travessia: e se não  
ousarmos fazê-la, teremos ficado, para  
sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa



## AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial aos meus orientadores, Professor Dr. Helder Teixeira e a Professora Dra. Gilsane von Poser. A vocês professores, que estiveram comigo nessa caminhada, durante o mestrado e agora no doutorado muito obrigado! Obrigado por me guiarem nesse tempo, por despertarem em mim o amor pela ciência e por serem exemplo. Vocês inspiram muitas pessoas e poder caminhar junto com vocês sempre foi motivo de orgulho. Obrigado pelo conhecimento, pela troca, por nortear esse trabalho, pelos momentos de felizes e principalmente por transmitirem tanta seriedade no trabalho de uma forma leve e uma risada boa!

A família LDGênica que esteve comigo durante esse caminho, obrigado pelo carinho, amizade e apoio. Em especial as colegas e amigas Flávia Fachel, Marina Nemitz, Rose Schuh e Sara Bianchi que estiveram comigo em todos os momentos e que levo para vida! A minha querida bolsista e agora colega de profissão Nathalya Brazil pelo apoio e ajuda neste trabalho. Aqueles que foram além de professores, nossos grandes incentivadores e amigos, professores Dr. George González Ortega, Dra. Letícia Koester, Dr. Pedro Ros Petrovick e Dra. Valquíria Linck Bassani. Meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos.

Um agradecimento muito especial a colega e amiga Daiane Diedrich pelo reencontro e ajuda nesse último ano de doutorado, contribuindo com seu conhecimento e carinho. A Professora Dra. Maria Lúcia Scronfenecker e todo o seu laboratório muito obrigado pela acolhida e apoio nesse último ano. Ao professor Rubem Vargas e Eduardo Cassel, meu muito obrigado pela parceria nesse trabalho.

As queridas amigas que a faculdade deu de presente Christine Bierhals, Débora Becker, Jaqueline Pinto, Juliana González e Luiza Wild obrigado por tudo! Amo muito vocês! As minhas amorinhas queridas Aida Fogaça, Carolina Cereser, Gabrieli Monteiro, Ilana Kenne, Georgina Morschel e Tássia Tonello obrigado por todo amor e apoio!

As Controlets por estarem junto nessa caminhada. Um especial e carinhoso obrigado a amiga Michele Rambo (*in memorian*), você deu mais luz e amor à minha vida. Você foi um presente da Pós-graduação e levo sempre comigo no coração.

Ao meu amor Dárlon Soliman, obrigado pela paciência, pelo carinho principalmente nos momentos mais difíceis, por ser um dos meus maiores incentivadores e por todo amor com que sempre se doou. Aos meus sogros, que foram pessoas maravilhosas e sempre compreenderam a ausência para que esse trabalho pudesse se concretizar, meu muito obrigado!

A minha base, minha família. Pai, mãe, mano, mana e os meus amores Theo e Davi. Vocês são o alicerce para tudo, sempre me apoiaram, com incentivos que foram além de palavras, foram através de gestos, de compreensão nos momentos de ausência, de ombro, abraço e beijos nos momentos mais difíceis. Esse trabalho é nosso. Aos meus cunhados, Júlia e Daison, que também são minha família a muito tempo, meus sinceros muito obrigado.

## RESUMO

*Pterocaulon balansae* (Asteraceae) é uma planta utilizada na medicina popular para tratamento de diversas afecções. Recentemente, estudos demonstraram atividade antifúngica de extratos orgânicos de *P. balansae* frente a cepas do fungo *Sporothrix schenckii*. Tal atividade tem sido relacionada à presença majoritária de cumarinas nesses extratos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi desenvolver nanoemulsões para uso tópico contendo extratos de *P. balansae* visando o tratamento de infecções causadas pelo fungo *S. schenckii*. Em uma primeira etapa foi realizada uma revisão do gênero *Pterocaulon* a fim de compilar dados importantes sobre etnofarmacologia, composição química e atividades biológicas do gênero. Os estudos fitoquímicos mostraram que as espécies de *Pterocaulon* são compostas majoritariamente por cumarinas, apresentando também flavonoides, ácidos fenólicos, poliacetilenos e terpenos. A maior parte das atividades biológicas atribuídas a esse gênero foi associada à presença das cumarinas. Os efeitos biológicos encontrados corroboram os dados etnofarmacológicos que relatam a utilização dessas plantas como anti-inflamatórios, antioxidantes e antifúngicos. Na sequência, a parte experimental deste estudo focou no desenvolvimento e validação de duas técnicas cromatográficas (HPLC e UFLC) para quantificação das cumarinas presentes em extratos de *P. balansae*. Os métodos mostraram-se específicos, lineares, precisos, robustos e exatos. Além disso, o método foi validado para a quantificação das cumarinas em diferentes matrizes analíticas e bioanalíticas visando estudos de desenvolvimento de produtos tópicos e estudos de permeação cutânea. Em uma segunda etapa, foi otimizado um método de extração das cumarinas de *P. balansae* por fluido supercrítico utilizando CO<sub>2</sub> como solvente (SFE). Esse extrato (SFE) apresentou um perfil lipofílico, com maiores quantidades de cumarinas com substituição epóxi. Em contraponto, em estudo publicado anteriormente demonstramos a obtenção de um extrato aquoso de *P. balansae* (AE) por maceração a quente, que apresentou um perfil de cumarinas mais hidrofílicas. Observando essas características, optamos por investigar esses dois tipos de extratos (SFE e AE), incorporando-os em nanoemulsões para aplicação tópica. As nanoemulsões foram obtidas por homogeneização à alta pressão conduzindo à obtenção de formulações monodispersas com diâmetro de gotícula e potencial zeta de cerca de 140 nm e -30 mV, respectivamente. Em etapa posterior, foi analisado o perfil de permeação/retenção das cumarinas incorporadas nas nanoemulsões. As cumarinas foram detectadas nas camadas da pele, especialmente quando essa foi lesionada, o que foi confirmado por microscopia confocal. As formulações foram testadas para a atividade antifúngica *in vitro* frente a cepas do fungo *S. schenckii* demonstrando que a incorporação de diferentes extratos de *P. balansae* (AE e SFE) em nanoemulsões conduz à redução da concentração inibitória mínima. O conjunto dos resultados demonstra que nanoemulsões são potenciais carreadores para extratos de *P. balansae* visando sua utilização tópica.

**Palavras-chave:** Cromatografia líquida de ultraeficiência; cumarinas; nanoemulsões; *Pterocaulon balansae*; *Sporothrix schenckii*.



## ABSTRACT

### Technological development of nanoemulsions containing standardized extract of *Pterocaulon balansae* aiming at antifungal activity

*Pterocaulon balansae* (Asteraceae) is a plant used in folk medicine for the treatment of various diseases. Recently, studies demonstrated antifungal activity of organic extracts of *P. balansae* against strains of the fungus *Sporothrix schenckii*. Such activity has been related to the presence of coumarins in these extracts. In this context, the objective of the present study was to develop topical nanoemulsions containing extracts of *P. balansae* for the treatment of infections caused by the *S. schenckii* fungus. In a first step, a review was carried out compiling important data about ethnopharmacology, chemical composition, and biological activities of the genus *Pterocaulon*. Phytochemical studies have shown that *Pterocaulon* species extracts are composed mainly of coumarins, also exhibiting flavonoids, phenolic acids, polyacetylenes, and terpenes. Most of the biological activities attributed to this genus were associated with the presence of coumarins. The biological effects corroborate the ethnopharmacological data that indicate these plants for use as anti-inflammatory, antioxidant and antifungal agents. Afterwards, the experimental part of this study was focused on the development and validation of methods for the quantification of the coumarins contained in *P. balansae* extracts through two chromatographic techniques (HPLC and UFLC). The methods are specific, linear, precise, robust and accurate for quantification of *P. balansae* coumarins. In addition, the method was validated for the quantification of coumarins in different analytical and bioanalytical matrices aiming at development and cutaneous permeation studies. In a second step, an extraction method of coumarins from *P. balansae* by supercritical fluid using CO<sub>2</sub> as solvent (SFE) was optimized. This extract (SFE) presented a lipophilic profile, with higher amounts of coumarins with epoxy substitution. In contrast, in a previously published study we demonstrated the obtaining of an aqueous extract of *P. balansae* (AE) by hot maceration, which had a profile of hydrophilic coumarins. Observing these characteristics, we chose to investigate these two types of extracts (SFE and AE), incorporating in nanoemulsions for topical application. Nanoemulsions were obtained by high-pressure homogenization leading to the production of monodisperse formulations with droplet diameter and zeta potential of about 140 nm and -30 mV, respectively. In a later stage, the permeation/retention profile of coumarins was analyzed when incorporated into the nanoemulsions. Coumarins were detected in the skin layers, especially when it was impaired, which was confirmed by confocal microscopy. The formulations were tested for *in vitro* antifungal activity against *S. schenckii* strains demonstrating that the incorporation of different extracts of *P. balansae* (AE and SFE) into nanoemulsions led to a reduction in the minimum inhibitory concentration. The set of results show that nanoemulsions are potential carriers of *P. balansae* extracts aiming at topical use.

**Keywords:** Ultra-fast liquid chromatography; coumarins; nanoemulsions; *Pterocaulon balansae*; *Sporothrix schenckii*.



## LISTA DE ABREVIATURAS

5MMDC: *5-methoxy-6,7-methylenedioxcoumarin* – 5-metóxi-6,7-metilenodióxicumarina

ACN: *Acetonitrile*

ANOVA: Análise de Variância

BHT: *Butylated hydroxytoluene*

CIM: Concentração inibitória mínima

CFM: Concentração fungicida mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLUE: Cromatografia Líquida de Ultraeficiência

CT: Cumarinas Totais

DAD: Detector de Arranjo de Diodos

DMSO: *Dimethyl sulfoxide*

DPPH: *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

EMA: *European Medicines Agency*

FDA: *Food and Drug Administration*

FRAP: *Ferric reducing antioxidant power*

HCMV: *Human cytomegalovirus*

HPLC: *High pressure liquid chromatography*

HSV-1-ACVr: *Herpes simplex virus type 1 resistant to acyclovir*

HSV-2-ACVr: *Herpes simplex virus type 2 resistant to acyclovir*

ICH: *International Conference on Harmonisation*

IC<sub>50</sub>: *Half maximal inhibitory concentration*

LC: *Liquid chromatography*

LIPOID E80®: Lecitina de gema de ovo

LD<sub>50</sub>: *Lethal dose*

LOD: *Detection limits*

LOQ: *Quantification limits*

MCT/TCM: *Medium chain triglycerides* - triglicerídeos de cadeia média

ME: *Matrix effect*

MIC: Minimum inhibitory concentration

MFC: Minimum fungicidal concentration

MOPS: *Morpholinepropanesulfonic acid*

MTT: [(tetra-zolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)]

NBD-PE: (*N*-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)-1,2-Dihexadecanoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine, Triethylammonium Salt

NBT: *Nitroblue tetrazolium*

NE: *Nanoemulsions* – nanoemulsões

NE<sub>B</sub>: *Blank nanoemulsions* – nanoemulsões brancas

NPSH: *Non-protein thiol*

O/W: *Oil in water* – óleo em água

P.E/D: *Porcine epidermis/dermis/epiderme/derme* de pele de orelha suína

PDA: *Photodiode array detection* - detector de arranjo de diodos

PSC: *Porcine stratum corneum layer after tape stripping method*

RF: *Receptor fluid* – fluído receptor

RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute 1640 broth medium*

RRV: *Ross river vírus*

RSD: *Relative standard deviation*

RSM/MSR: *Response surface methodology* – metodologia de superfície de resposta

SPE: *Supercritical fluid extraction*

TBARS: *Thiobarbituric acid reactive substances*

TC: *Total coumarins*

TRAP: *Total radical trapping antioxidant*

TWEEN 80®: Polissorbato 80

UFLC: *Ultra-Fast Liquid Chromatography*

UPLC-UV-MS: *Ultra Performance Liquid Chromatography – accopled Ultraviolet and mass*

UV: *Ultraviolet* - ultravioleta



## LISTA DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Chromatographic profile of the HPLC method: 0-17% B (0-0.01 min), 1 mL min<sup>-1</sup> for 45 min at 30 °C with the injection volume of 20 µL. The chemical name and structure of the *Pterocaulon balansae* coumarins 1-7 are presented in **Table 2**..... 112
- Figura 2.** Chromatographic profile of the development of methods, where **B1.** UFLC Method: 0.45 mL min<sup>-1</sup>, initial elution gradient of 0-17% B, oven temperature 55 °C, injection volume of 5µL and analysis time of 12.6 min; **B2.** UFLC Method: 0.55 mL min<sup>-1</sup>, was increased to 0-17 % B (0-0.05 min), **B3.** UFLC Method: 0.55 mL min<sup>-1</sup> up to 8 min, injection volume 5 µL, and the analysis was carried out 55 °C. The peaks 3' and 5' correspond to coumarins, with maximum UV absorption at 244/336 and 245/333, respectively. However, these compounds are in low amount in the aqueous extract for a complete structural elucidation..... 112
- 

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Coumarins from *P. balansae*..... 136
- Figura 2.** HPLC chromatographic profile of the fraction obtained at 150 bar..... 140
- Figura 3.** Mechanism of epoxide ring opening under acid catalysis..... 144
- Figura 4.** Precursors **5**, **6** and **7** and their putative hydrolytic products **1**, **2** and **3** 145
-

## CAPÍTULO IV

<b>Figura 1.</b> Structure, molecular weight, and LogP of the coumarins described in <i>P. balansae</i> extracts.....	167
<b>Figura 2.</b> Chromatographic profile of A. Supercritical fluid extract-loaded nanoemulsion (NSFE); B. Aqueous extract-loaded nanoemulsion (NAE); and C. Blank nanoemulsions (NB).....	167
<b>Figura 3.</b> Representative hematoxylin/eosin-stained histological (lower images) and fluorescence (upper images) images of intact and impaired skin, as control, treated with NAE for 1h and 8h, and treated with NSFE for 1h and 8h. Notes: Histological images show no skin damage after treatment with the nanoemulsions. The confocal images revealed that the fluorescence was distributed throughout the skin layers when the dye was incorporated into nanoemulsions. Images were obtained after 1 hour and 8 hours of permeation/retention studies using a Franz diffusion cell. Images were obtained at $\times 100$ and 400 magnifications. NBD-PE was used as fluorescent dye in confocal images. NAE: aqueous extract-loaded nanoemulsion; NSFE: supercritical fluid extract-loaded nanoemulsio.....	173
<b>Figura 4.</b> Fluorescent intensity levels detected for impaired or intact skin relative to the percentage of fluorescence emitted by the control tissue. Statistically significant differences were determined by ANOVA with Tukey post hoc (* $p < 0.05$ , ** $p < 0.005$ , *** $p < 0.0005$ ). Differences between intact and impaired tissues were represented by (#), while differences between 1h and 8h of incubation with the same nanoemulsion were represented by (*)......	173

---

## DISCUSSÃO GERAL

<b>Figura 1.</b> Cumarinas majoritárias encontradas no extrato por fluido supercrítico (SFE) das partes aéreas de <i>P. balansae</i> .....	189
<b>Figura 2.</b> Cumarinas majoritárias encontradas no extrato aquoso (AE) das partes aéreas de <i>P. balansae</i> .....	190



## LISTA DE TABELAS

---

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Scientific names and synonym(s) of reported <i>Pterocaulon</i> species (according to The Plant List 2013).....	55
<b>Tabela 2.</b> Coumarins from <i>Pterocaulon</i> species .....	60
<b>Tabela 3.</b> Phenolic acids and flavonoids from <i>Pterocaulon</i> species.....	65
<b>Tabela 4.</b> Ethnobotanical studies described for <i>Pterocaulon</i> species.....	69

---

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Factors and levels used in evaluating the robustness of methods.....	106
<b>Tabela 2.</b> Structure of the coumarins present in aqueous extract of <i>Pterocaulon balansae</i> .....	110
<b>Tabela 3.</b> Linearity data of the standard and the matrix effect for each matrix studied by the methods for HPLC and UFLC.....	116
<b>Tabela 4.</b> Recovery data of the 5MMDC in biological matrices by the methods for HPLC and UFLC.....	118
<b>Tabela 5.</b> Parameters of system suitability of the HPLC and UFLC methods for determination of 5MMDC in aqueous extract of <i>P. balansae</i> .....	119
<b>Tabela 6.</b> Determination of the 5MMDC in real samples.....	121

---

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1.</b> Yields (w/w%) and recovery rates (g/min) observed for the crude extracts from <i>P. balansae</i> using different pressure levels in the SC-CO <sub>2</sub> extraction.....	139
<b>Tabela 2.</b> Summary of the coumarin contents (mg/g*) in the SC-CO <sub>2</sub> extracts from <i>P. balansae</i> . (a,b,c,d). Different letters indicate significant differences among the different pressures ( $P < 0.05$ ).....	141
<b>Tabela 3.</b> Linearity data of the standard and the matrix effect for each matrix studied by the methods for HPLC and UFLC.....	142

---

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 1.</b> Composition of nanoemulsions.....	161
<b>Tabela 2.</b> Physicochemical properties of nanoemulsions.....	168
<b>Tabela 3.</b> Distribution profile of total coumarins (TC) from NAE and NSFE in impaired and intact porcine ear skin layers after 8 hours of permeation/retention study.....	171
<b>Tabela 4.</b> Antifungal activity (MICs in $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) of <i>P. balansae</i> extracts and nanoemulsions.....	174

---

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	41
Objetivos gerais e específicos .....	43
<b>CAPÍTULO I - <i>Revisão da literatura</i></b> .....	45
<b>1.1. Introdução</b> .....	47
<b>1.2. Artigo</b> .....	49
<b>THE GENUS <i>Pterocaulon</i> (ASTERACEAE) - A REVIEW ON TRADITIONAL MEDICINAL USES, CHEMICAL CONSTITUENTS AND BIOLOGICAL PROPERTIES</b> .....	51
Abstract .....	51
Contents .....	52
Graphical abstract .....	52
1.2.1. Introduction .....	53
1.2.2. Occurrence and botanical description .....	53
1.2.3. Phytochemistry .....	57
1.2.3.1. Coumarins .....	57
1.2.3.2. Phenolic acids and flavonoids .....	64
1.2.3.3. Terpenes .....	67
1.2.3.4. Polyacetylenes .....	67
1.2.4. Ethnopharmacology and ethnobotany .....	67
1.2.5. Biological activity .....	72
1.2.5.1. Antifungal activity .....	72
1.2.5.2. Antibacterial activity .....	73
1.2.5.3. Antiviral activity .....	74
1.2.5.4. Antioxidant activity .....	75
1.2.5.5. Antiparasitic activity .....	77
1.2.5.7. Insecticidal activity .....	78

1.2.5.8. Cytotoxic activity .....	78
1.2.6. Toxicology .....	80
1.2.7. Concluding remarks.....	81
1.2. Acknowledgments .....	82
1.2. Author's contribution .....	82
1.2.8. References .....	83

**CAPÍTULO II - *Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de cumarinas de Pterocaulon balansae em amostras analíticas e bioanalíticas*** .....

<b>3.1. Introdução</b> .....	95
<b>3.2. Artigo</b> .....	97

**DETERMINATION OF MAIN COUMARINS OF Pterocaulon balansae (ASTERACEAE) BY AN ULTRA-FAST LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD — ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL ASSAY** .....

Abstract.....	100
2.2.1. Introduction .....	101
2.2.2. Material and methods .....	102
2.2.2.1. Chemicals and Materials .....	102
2.2.2.1.1. Plant material.....	102
2.2.2.2. Apparatus and chromatographic conditions .....	102
2.2.2.2.1. HPLC analysis .....	103
2.2.2.2.2. UFLC analysis .....	103
2.2.2.3. Solutions .....	103
2.2.2.3.1. Stock and reference solutions.....	104
2.2.2.3.2. Matrices solutions.....	104
<i>Aqueous extract</i> .....	104
<i>Nanoemulsions</i> .....	104
<i>Porcine skin layers</i> .....	104
<i>Receptor fluid for permeation studies</i> .....	105

2.2.2.4. Validation .....	105
2.2.2.4.1. Specificity.....	105
2.2.2.4.2. Linearity, precision and accuracy.....	105
2.2.2.4.3. Robustness .....	106
2.2.2.4.4. Assessment of the matrix effect .....	107
2.2.2.4.5. Recovery of coumarins after extraction from porcine skin.....	107
2.2.2.4.6. Coumarins stability in matrices.....	107
2.2.2.4.7. System suitability .....	108
2.2.2.5. Method application.....	108
2.2.3. Results and discussion.....	109
2.2.3.1. UFLC method optimization: chromatographic conditions.....	109
2.2.3.2. Method validation.....	113
2.2.3.2.1. Specificity.....	113
2.2.3.2.2. Linearity, precision and accuracy.....	113
2.2.3.2.3. Robustness .....	114
2.2.3.2.4. Assessment of the matrix effect .....	114
2.2.3.2.5. Coumarins stability in matrices.....	115
2.2.3.2.6. Coumarin extraction from skin layers.....	118
2.2.3.2.7. System suitability .....	120
2.2.3.3. Method application.....	120
2.2.4. Conclusions .....	121
2.2.5. Acknowledgments .....	122
3.2.6. References .....	123
<b>CAPÍTULO III – <i>Emprego da green chemistry para obtenção de extrato rico em cumarinas através da extração por SC-CO2</i></b> .....	<b>127</b>
<b>3.1. Introdução .....</b>	<b>129</b>
<b>3.2. Artigo .....</b>	<b>131</b>

<b>SUPERCRITICAL CO<sub>2</sub> EXTRACTION AS A SELECTIVE METHOD FOR THE OBTAINMENT OF COUMARINS FROM <i>Pterocaulon balansae</i> (ASTERACEAE)</b> .....	133
Abstract.....	133
Graphical Abstract.....	134
Highlights .....	134
3.2.1. Introduction .....	135
3.2.2. Materials and Methods .....	136
3.2.2.1. <i>Materials</i> .....	137
3.2.2.2. <i>Plant Material</i> .....	137
3.2.2.3. <i>Pterocaulon balansae</i> extraction.....	137
3.2.2.4. Quantification of coumarins .....	138
3.2.2.5. Statistical analysis .....	138
3.2.3. Results and Discussion .....	138
3.2.4. Conclusion .....	145
Acknowledgments .....	146
References .....	146

**CAPÍTULO IV - *Desenvolvimento de nanoemulsões de uso tópico contendo extrato de Pterocaulon balansae para o tratamento de infecções por S. schenckii*** .....

<b>4.1. Introdução</b> .....	153
------------------------------	-----

<b>4.2. Artigo</b> .....	155
--------------------------	-----

**TOPICAL NANOEMULSIONS AS DELIVERY SYSTEMS FOR *Pterocaulon balansae* EXTRACTS AIMING AT THE TREATMENT OF SPOROTRICHOSIS**.....

Abstract.....	157
---------------	-----

4.2.1. Introduction .....	158
---------------------------	-----

4.2.2. Materials and Methods .....	159
------------------------------------	-----

<i>Plant Material</i> .....	159
-----------------------------	-----

<i>Materials</i> .....	159
------------------------	-----

<i>Strains</i> .....	160
4.2.2.1. <i>Pterocaulon balansae</i> extraction.....	160
4.2.2.2. Preparation of nanoemulsions .....	161
4.2.2.3. Physicochemical properties of nanoemulsions.....	161
4.2.2.3.1. Droplet size, polydispersity index (PDI), and zeta-potential .....	161
4.2.2.3.2. pH and viscosity measurements .....	162
4.2.2.3.3. NBD-PE labeled nanoemulsions .....	162
4.2.2.4. Permeation/retention assay in intact and impaired procine skin .....	162
4.2.2.5. Histological and confocal microscopy .....	163
4.2.2.6. UFLC analysis .....	164
4.2.2.7. Antifungal activity.....	164
4.2.2.7.1. Minimum inhibitory concentration (MIC) .....	164
4.2.2.7.2. Hyphal damage assay with MTT.....	165
4.2.2.8. Statistical analyses.....	165
4.2.3. Results and Discussion .....	165
4.2.3.1. Preparation and characterization of nanoemulsions.....	166
4.2.3.2. Permeation/retention assay in intact and impaired skin .....	169
4.2.3.3. Microscopy analyses .....	172
4.2.3.4. Antifungal activity.....	174
4.2.4. Conclusion.....	175
4.2.5. References .....	176
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>181</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>193</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>197</b>







A alta incidência de infecções fúngicas invasivas representa uma importante causa de morbidade e mortalidade, estando associada a pelo menos 1,5 milhão de mortes em todo o mundo a cada ano. Os pacientes de grupos especiais, como os gravemente enfermos e imunodeprimidos (ex: politraumatizados, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida ou em tratamento com quimioterápicos), são mais suscetíveis a desenvolver infecções oportunistas por leveduras e fungos filamentosos, o que agrava consideravelmente seu quadro clínico. O tratamento das infecções fúngicas, de modo geral, tem se mostrado limitado devido ao número reduzido de agentes antifúngicos disponíveis e principalmente devido à resistência microbiana adquirida a esses fármacos (BARKER; ROGERS, 2006; CAMPOY; ADRIO, 2017).

*Sporothrix schenckii* é o agente etiológico da esporotricose, uma micose adquirida pela inoculação de material contaminado do solo, plantas e material orgânico que pode afetar tanto humanos quanto animais causando lesões usualmente limitadas à pele, tecidos subcutâneos e circundantes aos vasos linfáticos. A esporotricose é uma doença predominante em zonas tropicais e temperadas e, recentemente, uma revisão sobre esta doença apresentou o Brasil como o país que tem o maior número de casos relatados em humanos, como também é o país que mais apresenta estudos de pesquisa na área (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). Especificamente no Estado do Rio Grande do Sul esta é a micose subcutânea mais comum (DA ROSA et al., 2005)

Neste cenário, as plantas medicinais surgem como fonte para novas moléculas, sendo alvo de estudos com extratos, frações e/ou compostos isolados que visam à identificação de potenciais agentes terapêuticos (NEWMAN; CRAGG, 2012, 2016). Nesse contexto uma planta da Família Asteraceae conhecida como “quitoco” (*Pterocaulon balansae*) tem sido bastante estudada, em função de sua alta concentração de cumarinas, compostos aos quais são atribuídas diversas ações farmacológicas (PANATIERI et al., 2017; STEIN et al., 2005, 2006; STOPIGLIA et al., 2011; VIANNA et al., 2012).

Recentemente, um estudo desenvolvido em nosso grupo de pesquisa em parceria com o Laboratório de Fungos Patogênicos (UFRGS), avaliou uma série de extratos metanólicos obtidos a partir de diferentes espécies de *Pterocaulon*, dentre elas *P. balansae*, a fim de obter informações referentes à concentração inibitória mínima (CIM) e à concentração fungicida mínima (CFM) desses extratos frente a cepas do fungo *Sporothrix schenckii*. Todas as cepas testadas apresentaram inibição frente aos diferentes extratos com valores de CIM entre 156 a 1250 µg/mL e CFM entre 312 a 5000 µg/mL. Esses resultados reafirmam a importância de estudos na área da etnofarmacologia como fonte promissora de novos agentes terapêuticos (STOPIGLIA et al., 2011).

Estudos desenvolvidos com a espécie *P. balansae* exploram a extração dos seus compostos ativos por meio de solventes orgânicos (hexano, diclorometano e metanol), empregando métodos de extração em Soxhelt, maceração estática e imersão (PANATIERI et al., 2017; STEIN et al., 2005, 2006; STOPIGLIA et al., 2011; VIANNA et al., 2012). Atualmente, métodos que empregam tecnologias verdes para extração de produtos naturais encontram-se em destaque, pois baseiam-se na descoberta de processos que reduzem o consumo de energia gerando menos resíduos, permitindo o uso de solventes alternativos garantindo a qualidade do produto final (DE MELO; SILVESTRE; SILVA, 2014; JANGHEL et al., 2015; PEREIRA; MEIRELES, 2010). As técnicas e matérias-primas empregadas variam bastante, havendo destaque para os solventes como água, CO<sub>2</sub>, líquidos iônicos e métodos como extração por fluido supercrítico, destilação a vapor, destilação por micro-ondas, dentre outros.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a obtenção de cumarinas de *P. balansae* utilizando como solvente a água num processo de maceração dinâmica com temperatura (MEDEIROS-NEVES et al., 2015). A viabilidade de uma tecnologia verde para obtenção de um extrato rico em cumarinas se mostrou promissor para obtenção de extratos e/ou frações de *P. balansae*, sendo uma alternativa aos métodos que anteriormente empregavam solventes orgânicos.

Diversos métodos cromatográficos quantitativos podem ser empregados para a análise de teores de ativos em um extrato. Recentemente, descrevemos um método analítico por CLAE a fim de quantificar as cumarinas presentes no extrato aquoso obtido da espécie *P. balansae* (MEDEIROS-NEVES et al., 2015). No entanto, métodos empregando técnicas mais modernas, tais como CLUE também vêm sendo relatados para análise de cumarinas (LI et al., 2014; ZHANG; WEI; YANG, 2017). Tais técnicas são vantajosas, pois suportam altas pressões, possibilitam o uso de colunas cromatográficas com diâmetro interno reduzido ( $< 2 \mu\text{m}$ ), aumentam a resolução dos picos e diminuem tanto o tempo de corrida cromatográfica como o consumo dos reagentes químicos (MALDANER; JARDIM, 2009).

As nanoemulsões têm sido descritas para incorporação de extratos vegetais de forma a viabilizar sua aplicação, melhorando características como, por exemplo, a maior penetração desses compostos nas camadas da pele. Geralmente constituídas de um núcleo oleoso (de origem natural ou semi-sintética), as nanoemulsões são estabilizadas por uma mistura de fosfolipídeos, que atuam na interface entre óleo e água (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; SINGH et al., 2017).

Com base no supramencionado, a presente tese de doutorado visou o desenvolvimento de uma metodologia bioanalítica para quantificação de cumarinas de *P. balansae* em diferentes materizes biológicas. Além disso, objetiva a otimização de um extrato de *P. balansae* utilizando fluido supercítico, bem como o desenvolvimento de um produto nanoemulsionado contendo extrato aquoso e fluido supercítico de *P. balansae* para o tratamento tópico de infecções fúngicas causadas por *Sporothrix schenckii*.

## REFERÊNCIAS

- BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. **Current Infectious Disease Reports**, v. 8, n. 6, p. 449–456, 2006.
- BARROS, M. B. D. L.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 633–654, 2011.
- CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.
- DA ROSA, A. C. M. et al. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 451–459, 2005.
- DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115–176, 2014.
- JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123–127, 2015.
- JANGHEL, A. et al. Supercritical fluid extraction (SFE) techniques as an innovative green technologies for the effective extraction of the active phytopharmaceuticals. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 8, n. 6, p. 775–786, 2015.
- LI, P. L. et al. Systematic chemical profiling of *Citrus grandis* “Tomentosa” by ultra-fast liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 90, p. 167–179, 2014.
- MALDANER, L.; JARDIM, I. CRISTINA S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.
- MEDEIROS-NEVES, B. et al. Quantification of coumarins in aqueous extract of *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) and characterization of a new compound. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18083–18094, 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- PANATIERI, L. F. et al. Nanoemulsions Containing a Coumarin-Rich Extract from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) for the Treatment of Ocular *Acanthamoeba* Keratitis. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 3, p. 721–728, 2017.
- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 2017.

STEIN, A. C. et al. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: Antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 211–214, 2005.

STEIN, A. C. et al. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 95–98, 2006.

STOPIGLIA, C. D. O. et al. Antifungal activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 21, n. 3, p. 169–172, 2011.

TORRES, F. C. et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction as a selective method for the obtainment of coumarins from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae). **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 18, p. 303–308, 2017.

VIANNA, D. R. et al. Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 268–274, 2012.

ZHANG, L.; WEI, W.; YANG, X. W. Simultaneous quantification of nine new furanocoumarins in *Angelicae Dahuricae Radix* using ultra-fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 322–333, 2017.







## Objetivo geral

Desenvolver nanoemulsões contendo extrato aquoso e extrato supercrítico a partir de *P. balansae*, visando o tratamento tópico da infecção pelo fungo *Sporothrix schenkii*.

O objetivo geral pode ser dividido nos seguintes objetivos específicos:

(i) Validação de métodos analítico e bioanalítico por cromatografia líquida de alta e ultra eficiência para avaliação das cumarinas presentes no extrato aquoso, bem como da cumarina 5MMDC nas formulações e na pele;

(ii) Otimização de um extrato rico em cumarinas a partir das partes aéreas de *P. balansae*, através da extração por fluido supercrítico, utilizando CO<sub>2</sub> como solvente;

(iii) Desenvolvimento e caracterização físico-química de nanoemulsões de uso tópico contendo extrato aquoso e por fluido supercrítico de *P. balansae*;

(iv) Avaliação *in vitro* do perfil de permeação cutânea, em células de difusão de Franz, das cumarinas dos extratos aquoso e fluido supercrítico a partir das formulações preparadas;

(v) Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica das formulações frente a cepas do fungo *Sporothrix schenkii*.



**Capítulo I**  
***Revisão da literatura***

---



## 1.1. INTRODUÇÃO

O estudo desta tese tem como base a compreensão, pesquisa e desenvolvimento da espécie *P. balansae*. Esta espécie, pertencente à Família Asteraceae, está inserida no gênero *Pterocaulon*, o qual vem sendo investigado pelo nosso grupo de pesquisa nos últimos anos. O interesse em se trabalhar com esse gênero se deu por meio de relatos do uso popular dessas plantas para o tratamento de diversas afecções, em geral utilizadas através do preparo de decoctos e infusões.

A literatura reporta diversas atividades, tais como: digestiva (GOLENIOWSKI et al., 2008), antisséptica (SMITH, 1991), emenagoga (GARLET et al., 2001), antifúngica (SMITH, 1991; AVANCINI et al., 2008), antipirética (RASONAIVO et al., 1992; LANGUEFOSSE et al., 1996), para doenças do fígado (GARLET et al., 2001; GOLENIOWSKI et al., 2008), artrites (ZARDINI, 1984), picadas de serpentes (FILIPOV, 1994), inseticida (ZARDINI, 1984; SMITH, 1991), pesticida (GOLENIOWSKI et al., 2008), e também como aromática (ZARDINI, 1984).

Embora seja de amplo uso popular, esse gênero carece de estudos, com poucos grupos de pesquisa engajados na investigação dessas espécies. Os trabalhos publicados relatam, na grande maioria, a obtenção de extratos e óleos voláteis, a identificação de compostos químicos e atividades biológicas relacionadas.

Neste sentido, para compreender melhor o tema exposto, este capítulo será apresentado na forma de artigo de revisão, redigido nas normas do periódico ao qual foi publicado: *Journal of Ethnopharmacology*.



## **1.2. ARTIGO**

*Artigo publicado na revista *Journal of Ethnopharmacology*:*

**The genus *Pterocaulon* (Asteraceae) – A review on traditional medicinal uses,  
chemical constituents and biological properties**

---



*O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 51 – 91.*

Medeiros-Neves, B., Teixeira, H.F., von Poser, G.L. **The genus *Pterocaulon* (Asteraceae) – A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and biological properties.** Journal of Ethnopharmacology, v. 224 (2018) 451-464.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.012>



















































































## **Capítulo II**

### ***Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de cumarinas de Pterocaulon balansae em amostras analíticas e bioanalíticas***

---



## 2.1. INTRODUÇÃO

A maioria dos estudos relacionados a *Pterocaulon* e seus principais componentes está focada na obtenção de extratos/frações, isolamento dos compostos, identificação por técnicas espectroscópicas e determinação da atividade biológica. Existe, neste cenário, uma lacuna com relação a métodos cromatográficos capazes de quantificar os compostos a partir de extratos da planta.

Diferentes técnicas são empregadas para a quantificação dos compostos ativos presentes em uma planta medicinal, como por exemplo as metodologias por cromatografia líquida (FEKETE et al., 2014). Neste contexto, são amplamente descritas as técnicas por CLAE e CLUE. Embora a técnica por CLAE seja mais amplamente difundida, a tendência atual tem sido a utilização de métodos denominados de ultraeficientes. Tais métodos são capazes de suportar altas pressões, possibilitando o uso de colunas cromatográficas com tamanhos de partícula menores, melhorando a resolução dos picos, diminuindo o tempo de análise e por consequência, resultando na redução do consumo de solvente (MALDNER & JARDIM, 2009)

Visando o desenvolvimento de metodologias confiáveis, rápidas e eficientes para as análises qualitativa e quantitativa dos produtos, a realização de uma etapa denominada “validação de método analítico e/ou bioanalítico” é recomendada pelos guias e compêndios mundiais (SHABIR, 2003; NOVÁKOVÁ & VLCKOVÁ, 2009). Essa validação assegura que a metodologia desenvolvida seja precisa, específica, reprodutível e robusta, garantindo confiabilidade durante a rotina de uso.

O presente capítulo descreve o desenvolvimento e validação de métodos por CLAE e CLUE, com o objetivo de quantificar as cumarinas presentes no extrato aquoso de *P. balansae*, bem como nas nanoemulsões contendo o extrato aquoso e a cumarina 5MMDC, e o perfil de permeação destas cumarinas na pele de orelha suína. O capítulo está escrito no formato de manuscrito.



### **3.2. ARTIGO**

*Manuscrito em preparação*

**Determination of main coumarins of *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) by an ultra-fast liquid chromatography method — analytical and bioanalytical assays**

---



*O texto completo do Capítulo 2, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 99 - 126, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico de acordo com o título e descrições informados abaixo.*

**Determination of coumarins from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) by an ultra-fast liquid chromatography method — analytical and bioanalytical assays**

Bruna Medeiros-Neves<sup>a</sup>, Marina Cardoso Nemitz<sup>a</sup>, Nathalya Tesch Brazil<sup>a</sup>, Martin Steppe<sup>a</sup>, Gilsane Lino von Poser<sup>a</sup>, and Helder Ferreira Teixeira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 2752, Porto Alegre/RS, Brazil.

\*Corresponding author: Helder Ferreira Teixeira (helder.teixeira@ufrgs.br) Address: Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre/RS – Brazil - Fone: 55 51 33085231























































### **Capítulo III**

***Emprego da green chemistry para obtenção de extrato rico em cumarinas  
através da extração por SC-CO<sub>2</sub>***

---



### 3.1. INTRODUÇÃO

O terceiro capítulo desta tese foi realizado em colaboração com o Dr. Fernando Torres, orientado da Prof. Gilsane von Poser, que no âmbito da sua tese de doutorado estudou cumarinas isoladas de *Pterocaulon* e cumarinas sintéticas.

A parceria deste trabalho surgiu no sentido de explorar técnicas alternativas para obtenção de cumarinas de *P. balansae* que seguissem as diretrizes das tecnologias verdes. Até o momento, o que existia reportado na literatura para a espécie *P. balansae* eram métodos de extração convencionais (maceração estática, Soxhelt) empregando solventes orgânicos (hexano, metanol, diclorometano) para a obtenção de extratos e frações de *P. balansae* ricos em cumarinas.

A ideia de trabalhar com extratos “mais limpos” surgiu durante a minha dissertação de mestrado, quando desenvolvemos um método de maceração a quente sob agitação utilizando água como solvente, com a finalidade de obter um extrato rico em cumarinas a partir das partes aéreas de *P. balansae*. Este trabalho, publicado em 2015 na revista *Molecules*, despertou o interesse em explorar novas metodologias para obtenção de extratos com menor geração de resíduos na natureza.

Atualmente, as discussões sobre o emprego de tecnologias verdes vêm tomando força e os pesquisadores têm voltado seus projetos para o desenvolvimento de novas técnicas para obtenção de compostos ativos a partir das fontes naturais. Essas iniciativas buscam a otimização de processos por meio da inovação, utilização de energias renováveis e emprego de solventes alternativos (água, CO<sub>2</sub>, agro solventes), resultando num menor impacto no meio ambiente (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO, 2012; CUE; ZHANG, 2009; TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2017).

A partir do contexto apresentado, esta parte do trabalho realizado em parceria teve por objetivo a extração de cumarinas das partes aéreas de *P. balansae* por SC-CO<sub>2</sub>, otimizando as condições de extração para a maior recuperação dos compostos. O capítulo está escrito no formato de artigo seguindo as normas da revista em que foi publicado: *Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*.



### **1.3. ARTIGO**

*Publicado na revista Journal of CO<sub>2</sub> Utilization*

**Supercritical CO<sub>2</sub> extraction as a selective method for the obtainment of  
coumarins from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae)**

---



*O Capítulo 3 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 133 – 150.*

TORRES, F.C., MEDEIROS-NEVES, B., TEIXEIRA, H.F., KAWANO, D., EIFLER-LIMA, V.L., CASSEL, E., VARGAS, R.M.F., VON POSER, G.L. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction as a selective method for the obtainment of coumarins from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization** v. 18, p. 303–308, 2017.



































**Capítulo IV**  
**Desenvolvimento de nanoemulsões de uso tópico contendo extrato de**  
***Pterocaulon balansae* para o tratamento de infecções por *S. schenckii***

---



## 4.1. INTRODUÇÃO

Em continuidade aos estudos da tese, visando o tratamento tópico do fungo *Sporothrix schenckii*, este capítulo aborda a viabilidade de incorporação de extratos de *P. balansae* em nanoemulsões lipídicas. As nanoemulsões têm sido consideradas potenciais sistemas para administração tópica de moléculas, tanto de caráter lipofílico quanto hidrofílico (ROBERTS et al., 2017). Esses sistemas são dispersões nanométricas de gotículas oleosas em uma fase aquosa externa, estabilizada por um sistema tensoativo. Além disso, possuem uma ação promotora de absorção dos componentes das nanoemulsões (óleos e tensoativos), através do reduzido tamanho dessas estruturas, possibilitando a formação de um depósito mais uniforme sobre a pele e uma maior superfície de contato em comparação com os sistemas convencionais (PURI et al., 2009; ZHAI & ZHAI, 2014; ROBERTS et al., 2017).

Em etapa anterior a esse capítulo, empregando novas técnicas verdes para extração de ativos naturais, realizamos um estudo de otimização de um extrato aquoso de *P. balansae* rico em cumarinas empregando o modelo matemático de Box Behnken Design (BBD). Os resultados apontaram para a condição ótima de extração do extrato aquoso com o maior conteúdo de cumarinas totais. A condição otimizada foi 4h07min, na proporção de 2% (material vegetal:solvente), a 65 °C (MEDEIROS-NEVES, dados não publicados). Seguindo a linha de tecnologias verdes, recentemente publicamos um estudo apresentando uma nova técnica para extração de cumarinas de *P. balansae*, por meio da extração por fluido supercrítico. Foram testadas algumas condições de temperatura e pressão, das quais selecionou-se a pressão de 120 bar a 40 °C, condição em que o extrato apresentou o maior conteúdo de cumarinas totais.

Neste capítulo, visando o tratamento das infecções subcutâneas causadas pelo fungo *S. schenckii*, desenvolvemos duas nanoemulsões pelo método de homogeneização à alta pressão incorporando esses diferentes extratos (extrato aquoso e extrato por fluido supercrítico). O perfil de permeação/retenção dessas cumarinas nas diferentes camadas da pele foi analisado em duas situações: na pele

intacta e na pele lesada. O capítulo a seguir está apresentado no formato de manuscrito.

### **4.3. ARTIGO**

*Manuscrito em preparação*

**Topical nanoemulsions as delivery systems for Pterocaulon balansae  
extracts aiming at the treatment of sporotrichosis**

---



*O texto completo do Capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 157 -179, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico de acordo com o título e descrições informados abaixo.*

## **Topical nanoemulsions as delivery systems for *Pterocaulon balansae* extracts aiming at the treatment of sporotrichosis**

Bruna Medeiros-Neves<sup>a</sup>, Daiane Heidrich<sup>b</sup>, Roselena Silvestri Schuh<sup>a</sup>, Flávia N.S. Fachel<sup>a</sup>, Eduardo Cassel<sup>c</sup>, Rubem Mário Figueiró Vargas<sup>c</sup>, Maria Lúcia Scroferneker<sup>b</sup>, Gilsane Lino Von Poser<sup>a</sup>, Helder Ferreira Teixeira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681-Prédio 30-Sala 277, 90619.900 Porto Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding author. Tel.: (+55) 51 3308 5231; fax: (+55) 51 3308 2165. E-mail address: helder.teixeira@ufrgs.br (Helder Ferreira Teixeira).



















































Nas últimas décadas, aproximadamente 49% dos medicamentos aprovados para uso são de origem natural ou moléculas semi-sintéticas derivadas dessas matérias primas (NEWMAN & CRAGG, 1997, 2003, 2007, 2012, 2016). Esse número expressivo destaca a importância do estudo com produtos naturais na busca por novos fármacos. Este importante dado está relacionado ao fato do reino vegetal ser uma fonte abundante para o isolamento de novos compostos (COS et al., 2006; MAREGESI et al., 2008). Dentre as possibilidades de estudos, a probabilidade de se detectar atividades biológicas em plantas é mais elevada quando existem relatos de usos etnofarmacológicos (SVETAZ, 2010).

Nesse contexto, o tema geral da tese envolve a investigação da espécie *Pterocaulon balansae*. Diversos estudos vêm sendo realizados com esta planta, demonstrando resultados promissores em avaliações das atividades antifúngica, antibacteriana, antiparasitária e antitumoral. Além disso, estudos recentes têm demonstrado a presença de cumarinas em diferentes tipos de extratos, e considerando-se que normalmente são os compostos majoritários, é provável que as ações farmacológicas desta espécie estejam relacionadas a sua presença (STEIN et al., 2005; STEIN et al., 2006; STOPIGLIA et al., 2011; VIANNA et al., 2012, PANATIERI et al., 2016; TORRES et al., 2017).

A fim de aprofundar o conhecimento acerca da espécie em estudo nesse trabalho (*Pterocaulon balansae*), a primeira etapa da tese foi dedicada a uma revisão da literatura sobre o gênero *Pterocaulon* Elliot. Através deste estudo foi possível compilar informações sobre a composição química, dados etnofarmacológicos e atividades biológicas descritas até o presente momento para este gênero. A busca (1968-2017) foi realizada nas bases de dados *Science Direct*, *Web of Science*, *Scopus* e *Pubmed*. Trabalhos anteriores a 1968 referem-se somente à descrição e classificação botânica do gênero, desde quando foi identificado por Elliot em 1823. O gênero *Pterocaulon*, pertencente à família Asteraceae, foi revisado por Bean (2011), que descreveu a existência de 26 espécies, que são divididas em americanas e não americanas. De forma geral, as espécies apresentam altura em torno de um metro, caule alado e capítulos sésseis terminais, os quais formam densos glomérulos, ou estão arrançados em densas

espigas (CABRERA and RAGONESE, 1978; LIMA & MATZENBACHER, 2008; BEAN, 2011).

Em relação à composição química dos representantes deste gênero, já foram isolados e identificados até o momento cumarinas, ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos e poliacetilenos. Confirmando o descrito na literatura, os compostos mais relatados são as cumarinas, consideradas marcadores quimiotaxonômicos do gênero. Ao todo já foram identificadas 41 cumarinas, originárias das espécies *P. intermedium*, *P. balansae*, *P. lanatum*, *P. virgatum*, *P. serrulatum*, *P. purpurascens*, *P. rugosum*, *P. alopecuroides* e *P. redolens*. Os compostos são 6,7 dioxigenados (16 compostos), 6,7,8 trioxigenados (8 compostos), 5,6,7-trioxigenados (14 compostos) e 5,6,7,8 tetraoxigenados (3 compostos). Foram encontrados também ácidos fenólicos e flavonoides em 7 espécies (*P. virgatum*, *P. purpurascens*, *P. sphacelatum*, *P. serrulatum*, *P. redolens*, *P. balansae* e *P. alopecuroides*), somando um total de 26 compostos.

Vale ressaltar que no gênero *Pterocaulon* a maioria dos flavonoides isolados até o momento ocorre em sua forma aglicona. Já os terpenos foram encontrados numa quantidade equivalente (28 compostos) aos ácidos fenólicos e flavonoides, mas concentrados em 4 espécies (*P. virgatum*, *P. serrulatum*, *P. balansae* e *P. polystachyum*). Para os poliacetilenos foram encontrados somente dois trabalhos na literatura (BOHLMANN et al., 1981 e MAGALHÃES et al., 1989), que identificaram a presença de 13 compostos nas espécies *P. alopecuroides*, *P. balansae*, *P. lanatum*, *P. rugosum* e *P. virgatum*. Ao todo, encontramos 108 compostos químicos já relatados para o gênero *Pterocaulon*, identificados em 11 das 26 espécies existentes.

Em continuidade, os estudos etnofarmacológicos encontrados estão concentrados em países como a Argentina, Austrália, Madagascar, Martinica e Brasil. No total, foram relacionadas 13 espécies de *Pterocaulon*, sendo mais relatado o uso das partes aéreas em forma de decocto. A grande maioria relata o uso dessas plantas para o tratamento de problemas de pele de diferentes etiologias. É importante ressaltar que o segundo maior uso encontrado para essas espécies é para o tratamento de distúrbios do fígado, seguido

do tratamento de problemas respiratórios. Por fim, o capítulo I apresenta uma ampla relação de estudos com atividades biológicas para o gênero, contemplando as atividades antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiparasitária, inseticida e antitumoral. Foram encontrados ao todo 32 estudos que relatam diversas atividades biológicas e toxicidade.

Os estudos confirmaram que várias espécies de *Pterocaulon* citadas nos estudos etnofarmacológicos contêm moléculas bioativas que podem explicar os efeitos benéficos e promotores da saúde observados. A maior parte das atividades tem sido atribuída às cumarinas, abundantes no gênero. Outro dado relevante observado neste tópico foi a utilização de solventes orgânicos na obtenção dos extratos e/ou compostos isolados.

Esse estudo tornou possível conhecer melhor o gênero *Pterocaulon*, e confirmar, por meio das publicações, a importância deste gênero como fonte de novas moléculas, principalmente de cumarinas, que são promissoras para uma série de aplicações terapêuticas. No entanto, para desenvolvimento de produtos para a saúde, bem como durante os ensaios analíticos e bioanalíticos, é de extrema importância um método quantitativo que assegure a confiabilidade dos resultados obtidos através da sua comparabilidade e rastreabilidade (ANVISA, 2003; PASCHOAL, 2008; ANVISA, 2012).

Para a análise das cumarinas presentes na espécie *P. balansae*, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um método de CLAE que possibilitou a análise de um extrato aquoso, onde foram identificadas sete cumarinas (MEDEIROS-NEVES et al., 2015). No entanto, para analisar essa matriz complexa, são necessários 45 minutos no CLAE, o que consome muito tempo na rotina de trabalho, além de gastar uma grande quantidade de solvente. A alternativa encontrada foi o desenvolvimento de um novo método que permitisse uma análise rápida e eficiente das cumarinas presentes na espécie *P. balansae*. Optou-se pela utilização da técnica de CLUE, que permite trabalhar a pressões superiores à do CLAE, possibilitando o uso de colunas cromatográficas com menor tamanho de partículas. Dessa forma, apresenta como vantagem direta a redução do tempo

de análise, aumentando a eficiência e a redução do consumo de solventes (GAIKWAD et al., 2010; GANGADASU et al., 2015).

Face ao exposto, o Capítulo II apresentou o desenvolvimento de um método por CLUE, bem como a validação analítica e bioanalítica de duas metodologias (CLAE e CLUE) para a determinação de cumarinas presentes no extrato aquoso de *P. balansae* em diferentes matrizes. Os equipamentos utilizados foram o CLAE, acoplado a espectro UV (CLAE-UV) e o CLUE com detecção de arranjo de diodos (CLUE-DAD). A amostra utilizada para a avaliação da separação dos compostos foi o extrato aquoso de *P. balansae*, obtido pela metodologia descrita por Medeiros-Neves e colaboradores (2015). Por meio de um programa disponibilizado pela Shimadzu, foi realizada inicialmente a adaptação da técnica de CLAE para a técnica por CLUE. Foi realizada uma série de modificações na metodologia, visando uma melhor resolução entre os picos ( $R_s > 1.5$ ), número de pratos teóricos adequados ( $N > 2000$ ), menor fator de cauda ( $T < 1.5$ ) e menor tempo de análise até chegar à condição desejada.

A fase estacionária selecionada para os estudos foram as colunas Phenomenex-C<sub>18</sub> RP para CLAE-UV e Shim-pack XR ODS para CLUE-DAD. A fase móvel foi constituída por 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B) usando gradiente de eluição, fluxo e temperatura de forno para CLAE (1 mL/min; 30 °C) e CLUE (0,55 mL/min; 55 °C) por 45 e 8 min, respectivamente. Ambas análises foram realizadas a 327 nm, comprimento de onda referente ao máximo de absorção no UV para esse grupo de cumarinas (MEDEIROS-NEVES et al., 2017). Após o desenvolvimento do método por CLUE, ambas metodologias (CLAE e CLUE) foram validadas conforme guias internacionais (ICH, 2005; EMA, 2011; FDA, 2013) para a análise quantitativa das cumarinas presentes em diferentes matrizes. As matrizes utilizadas no trabalho foram o extrato aquoso de *P. balansae*, a nanoemulsão contendo o extrato bem como as camadas da pele suína (derme, epiderme e estrato córneo) para estudos posteriores de permeação/retenção cutânea *in vitro*.

Após a etapa de seleção dos parâmetros cromatográficos, as matrizes foram analisadas quanto à especificidade. As matrizes nanoemulsão branca, epiderme/derme,

estrato córneo e fluído receptor mostraram ausência de picos no mesmo tempo de retenção das cumarinas de *P. balansae*, demonstrando que os métodos empregados são específicos para a análise simultânea de cumarinas de *P. balansae* nas matrizes analisadas. A quantificação da 5MMDC por ambos os métodos apresentou regressão linear na faixa de 0,1 a 7,5 µg/mL em todas as matrizes avaliadas. As curvas padrão não apresentaram desvio da linearidade após análise de ANOVA ( $p > 0,05$ ) e apresentaram coeficiente de correlação adequado para determinação analítica e bionalítica da 5MMDC. As metodologias também se mostraram precisas na determinação da 5MMDC, com valores de DPR menor que 2% nos experimentos intra-dia e inter-dia. Os métodos também foram considerados exatos, considerando-se a complexidade das diferentes matrizes, na faixa de 99.31-102 % para o CLAE e 102-106 % para o CLUE. Para os estudos bioanalíticos, as matrizes da pele (epiderme/derme; estrato córneo) foram contaminadas com uma solução padrão de 5MMDC em diferentes concentrações e determinada a capacidade de recuperação após a extração da 5MMDC destas matrizes. A taxa de recuperação ficou na faixa de 85 – 92%, com desvio padrão relativo menor que 8.83%, dentro do preconizado pelo FDA (2013). Os resultados apresentaram baixo efeito de matriz durante as análises. Posteriormente foram realizadas pequenas alterações nos parâmetros cromatográficos dos métodos, através de um desenho experimental de Plackett-Burman, a fim de avaliar a robustez das metodologias. Foram modificados fatores como concentração inicial de acetonitrila, temperatura do forno, fluxo inicial da fase móvel e concentração de ácido fórmico. De acordo com os resultados obtidos, as modificações nos fatores estudados não interferiram na determinação da 5MMDC nas diferentes matrizes avaliadas.

Após a etapa de validação das metodologias foi analisada a aplicabilidade dos métodos. Inicialmente foram preparadas nanoemulsões contendo 5MMDC e o extrato aquoso de *P. balansae* na concentração de 0,5 mg/mL. As formulações foram compostas por lecitina de gema de ovo, TCM, polissorbato 80 e água. Essas nanoemulsões foram, então, submetidas a estudos de permeação/retenção cutânea em pele de orelha suína. Após as 8 h de experimento, observou-se diferença significativa das formulações testadas em relação ao controle, restando na pele uma quantidade de aproximadamente 3 µg/cm<sup>2</sup> de cumarinas em ambos os métodos. Também foram encontradas quantidades

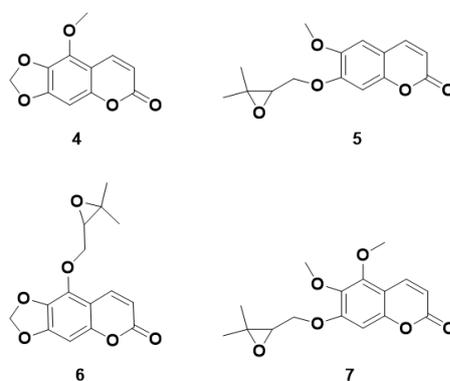
de 5MMDC no fluido receptor, demonstrando a capacidade de permeação desses compostos quando incorporados a um sistema nanoestruturado. Da mesma forma, a permeação das cumarinas a partir das nanoemulsões foi superior ao controle, assim como também houve diferença significativa entre as nanoemulsões (NE<sub>AE</sub> e NE<sub>5MMDC</sub>). Estes resultados preliminares sugerem que a quantidade de 5MMDC retida na pele não foi influenciada pela presença dos outros compostos do extrato, no entanto, a quantidade de 5MMDC permeada é reduzida na presença destes compostos.

De maneira geral, as metodologias propostas mostraram ser lineares, precisas e exatas para estimar cumarinas em extratos aquosos de *P. balansae*, sem diferenças significativas entre os dois métodos (CLAE e CLUE). No entanto, o método por CLUE foi mais rápido (quase 4 vezes), consumindo menos solvente, sendo considerado *eco-friendly* em comparação com o CLAE.

Na linha de pensamento *eco-friendly*, o terceiro capítulo da tese focou na otimização de uma nova ferramenta para extração das cumarinas da espécie *P. balansae* utilizando tecnologias verdes (*green technology*). Esse trabalho foi realizado em uma parceria com o pesquisador Fernando Torres, que no âmbito da sua tese de doutorado também investigou as cumarinas presentes no gênero *Pterocaulon* focando também na síntese desses compostos. Essa parte da tese contou com a colaboração do Laboratório de Operações Unitárias da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul que disponibilizou o equipamento de fluido supercrítico para a realização dos processos de extração. A ideia inicial foi submeter as partes aéreas de *P. balansae* à extração por fluido supercrítico (SFE) usando CO<sub>2</sub> como solvente. Uma extensa revisão, publicada em 2016, apresentou a extração por fluido supercrítico como uma alternativa verde para a extração de compostos ativos, classificando como um método com boa recuperação de ativos, baixa degradação e maior facilidade de remoção do solvente. Na lista apresentada, das 33 extrações apenas uma utilizava propano e todas as outras utilizavam CO<sub>2</sub> como solvente no processo (DA SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

Considerando as informações, o solvente escolhido para realizar as extrações foi o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Inicialmente, foram fixadas algumas condições como o

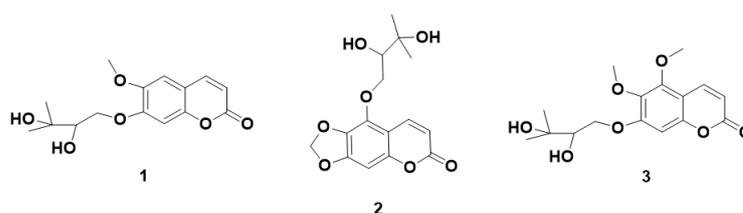
solvente e a temperatura de 40 °C e avaliado o efeito da pressão crescente (90, 120, 150 e 200 bar), sobre o rendimento em cumarinas totais e na preservação das características estruturais dessas cumarinas. Os resultados encontrados apontaram para a condição de 120 bar como a melhor pressão para obtenção dos maiores rendimentos de cumarinas. Nesta condição, os rendimentos foram 1,5; 2 ou 3 vezes maiores que as pressões de 90, 200 e 150 bar, respectivamente. As amostras foram analisadas por HPLC e observou-se que nessas condições de processo extraiu-se majoritariamente as cumarinas mais lipofílicas (4 – 7), ou seja, aquelas que apresentavam anel epóxi como substituição na posição 7 do anel cumárico, conforme apresentado na **Figura 1**.



**Figura 1.** Cumarinas majoritárias encontradas no extrato por fluido supercrítico (SFE) das partes aéreas de *P. balansae*.

Essa condição de extração (40° C, 120 bar) mostrou-se seletiva para as cumarinas mais lipofílicas, com menor tempo de extração (40 min) e utilizando solvente *eco-friendly* com menor geração de resíduos na natureza.

O perfil de extrato encontrado no SFE mostrou-se diferente daquele observado para o AE avaliado em estudo anterior (MEDEIROS-NEVES et al., 2015). Era de se esperar que uma extração utilizando água como solvente tivesse mais afinidade pelos compostos mais hidrofílicos, como foi possível comprovar. O perfil do AE apresentou majoritariamente os compostos apresentados na **Figura 2**. Considerando os perfis distintos desses dois extratos (AE e SFE), optou-se por investigar a incorporação de ambos em nanoemulsões para testar suas atividades biológicas e determinar se as mesmas estavam atreladas aos tipos de cumarinas encontradas em cada extrato.



**Figura 2.** Cumarinas majoritárias encontradas no extrato aquoso (AE) das partes aéreas de *P. balansae*.

Após a validação das metodologias de análises cromatográficas optou-se por dar segmento ao método por CLUE para analisar a composição quantitativa das cumarinas presentes, devido às vantagens da redução no tempo de análise e conseqüentemente menor gasto de solvente. Nesse sentido, visando o tratamento tópico do fungo *Sporothrix schenckii*, o capítulo IV apresenta estudos de viabilidade da incorporação dos extratos de *P. balansae* em nanoestruturas lipídicas, o perfil de permeação/penetração destes compostos nas camadas da pele e a atividade antifúngica *in vitro* destas formulações frente a diferentes cepas do fungo *S. schneckii*.

O fungo *S. schenckii*, agente etiológico da esporotricose, é um fungo que pode afetar seres humanos, com lesões usualmente limitadas à pele e tecidos subcutâneos (DIXON et al., 1991; DA ROSA et al., 2005). Visando a permeação das cumarinas até camadas mais profundas da pele (por exemplo, derme) analisamos as características físico-químicas das nanoemulsões contendo extratos de *P. balansae* através de estudo de permeação/retenção cutânea em pele de orelha suína e posterior determinação da atividade antifúngica destas formulações frente a cepas do fungo *S. schenckii*.

O conjunto de resultados obtido demonstra que a técnica de homogeneização à alta pressão foi eficaz na produção das nanoemulsões contendo os extratos AE (NAE) e SFE (NSFE). O método de preparo gerou nanoemulsões monodispersas, com tamanho de gotícula de 162 nm e 127 nm, e potencial zeta de -32 e -21 mV, respectivamente. As cumarinas permearam nas camadas mais profundas da pele, principalmente quando havia remoção parcial do estrato córneo. Através das micrografias da pele observou-se que as formulações não danificaram os tecidos. Após a análise do perfil de permeação/retenção das formulações deu-se seguimento à etapa de análise *in vitro*

dessas formulações frente a diferentes cepas de *S. schenckii*, sendo duas cepas resistentes aos tratamentos convencionais. Os valores de MIC encontrados para os extratos puros (SFE e AE) foram acima de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto para as nanoemulsões esses valores foram 4 vezes menores, aproximadamente 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para todas as formulações. Os resultados apresentados demonstraram que a incorporação dos extratos de *P. balansae* nos sistemas nanoestruturados intensificam a atividade antifúngica dos extratos.







- Desenvolveu-se um método por CLUE para realizar a análise das cumarinas presentes no extrato aquoso de *P. balansae*.
- Realizou-se a validação analítica e bioanalítica dos métodos por CLAE e CLUE para a quantificação da 5MMDC, que se mostrou específico, linear, preciso, exato e robusto para a análise da 5MMDC nas diferentes matrizes (extrato aquoso, nanoemulsão branca, derme/epiderme, extrato córneo e fluido receptor).
- Otimizou-se o processo de extração por fluido supercrítico em função de maiores rendimentos de cumarinas. As melhores condições encontradas foram solvente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 40° C de temperatura e pressão de 120 bar.
- Demonstrou-se a viabilidade de incorporação dos dois diferentes extratos de *P. balansae* (AE e SFE) em um sistema nanoestruturado com propriedades físico-químicas adequadas para produtos de uso tópico.
- Os estudos de permeação/retenção cutânea *in vitro* demonstraram que as cumarinas da *P. balansae* permanecem retidas na epiderme da pele intacta, enquanto na pele lesada as cumarinas permeiam até o fluido receptor.
- Os extratos quando incorporados às nanoemulsões apresentaram maior atividade antifúngica (MIC = 250 µg mL<sup>-1</sup>) frente a diferentes cepas de *S. schenckii*.







ADAMS, G. The principles of freeze-drying **Methods in molecular biology** v. 368, p. 15-38, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos, 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M. Etnomedicina veterinária, etnonosotaxia e etnoterapêutica de doenças de pele como referência para seleção e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, p.21-28, 2008.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27 - 51, 2005.

BARKER, K.S; ROGERS, P.D. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. **Current Infectious Disease Reports**, v.8, p. 449-456, 2006.

BEAN, A.R. A taxonomic revision of *Pterocaulon* section *Monenteles* (Labill.) Kuntze (Asteraceae: *Inuleae-Plucheinae*) **Austrobaileya** v. 8, p. 80-33, 2011.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry **Talanta**, v. 76, p. 965–977, 2008.

BOHLMANN, F., ABRAHAM, W.R., KING, R.M., ROBINSON, H. Thiophene acetylenes and flavanols from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**. v. 20, p. 825-827, 1981.

CABRERA, A.L.; RAGONESE, A.M. Revisión del género *Pterocaulon* (Compositae). **Darwiniana**, v. 21, p. 185-257, 1978.

COS, P., VLIETINCK, A.J., VANDEN BERGHE, D., MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology** v. 106, p. 290–302, 2006.

CRAGG, G.M. AND NEWMAN, D.J., SNADER, K.M.J. Natural products in drug discovery and development **Journal of Natural Products** v. 60, p. 52-60, 1997

DA ROSA, A.C.M., SCROFERNEKER, M.L., VETTORATO, R., GERVINI, R.L., VETTORATO, G., WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil **Journal of the American Academy of Dermatology** v. 52, p. 451-459, 2005.

DIXON DM, SALKIN IF, DUNCAN RA, et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis **Journal Clinical Microbiology**, v. 29, p.1106—13, 1991.

DUDEK-MAKUCH, M.; MATTAWSKA, I. Coumarins in horse chestnut flowers: isolation and quantification by UPLC method **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 70, p. 517 – 522, 2013.

EFFERTH, T. Perspectives for Globalized Natural Medicines **Chinese Journal of Natural Medicines** v. 9, p. 1–6, 2011.

EMA. European Medicines Agency. Guideline on quality of herbal medicinal products /traditional herbal medicinal products, EMA/CPMP/QWP/2819/00 Rev. 2; EMA/CVMP/814/00 Rev. 2; EMA/HMPC/201116/2005 Rev. 2, 2011a.

EMA. European Medicines Agency. Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products, EMA/CPMP/QWP/2820/00 Rev. 2; EMEA/CVMP/815/00 Rev. 2; EMA/HMPC/162241/2005 Rev. 2, 2011b.

FDA. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2013.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; FERREIRA, H.S.; MATOS, G.D.; DAVID, J.M.; BRANDÃO G.C.; DA SILVA, E.G.P.; PORTUGAL, L.A.; DOS REIS, P.S.; SOUZA, A.S.; DOS SANTOS, W.N.L. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Anal Chim Acta** v. 597, p. 179–186, 2007.

FEKETE, S., KOHLER, I., RUDAZ, S., GUILLARME, D. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis **J. Pharma. Biomed. Anal.** v. 87, p. 105–119, 2014.

FILIPOV, A. Medicinal plants of the Pilagá of Central Chaco. **Journal of Ethnopharmacology** v. 44, p181–193, 1994.

GAIKWAD, P.V; SAWANT, S.D.; GHANTE M.R.; MUNOT, N.M. Ultra performance liquid chromatography: a recent novel development in HPLC. **Pharmacie Globale**, v. 1, p. 1 - 3, 2010.

GANGADASU, B.R., REDDY N.G., DHANALAKSHMI, K. Comparison of UPLC with UFLC: Liquid Chromatography **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research** v.31, p. 97-101, 2015.

GARLET, T.M.B., IRGANG, B.E. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, RS, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 4, p9-18, 2001.

GOLENIOWSKI, M.E., BONGIOVANNI, G.A., PALACIO, L., NUÑEZ, C.O., CANTERO, J.J. Medicinal plants from the “Sierra de Comechingones”, Argentina. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 107, p324–341, 2006.

ICH. International Conference on Harmonization. Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.

JAHANGIRIAN, H., LEMRASKI, E.G., WEBSTER, T.J., RAFIEE-MOGHADDAM, R., ABDOLLAHI, Y. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine **International Journal of Nanomedicine** v. 12, p. 2957–2978, 2017.

KARAZHIYAN, H., RAZAVI, S.M.A., PHILLIPS, G.O. Extraction optimization of a hydrocolloid extract from cress seed (*Lepidium sativum*) using response surface methodology **Food Hydrocolloids** v. 25, p. 915-920, 2011.

KUMAR, R., SAHA, A., SAHA, D. A new antifungal coumarin from *Clausena excavate* **Fitoterapia** v. 83, p. 230–233, 2012.

LIAPIS, A.I. & BRUTTINI, R. Freeze drying In: **Handbook of Industrial Drying** CRC Press 4 ed, Eds: Arun S. Mujumdar, 2015, 1334 p.

LIMA, L.F.P., MATZENBACHER, N.I. O gênero *Pterocaulon* Ell. (Asteraceae pluceae) no estado Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Sér. Bot. v. 63, p213-229, 2008.

LONGUEFOSSE, J.L., NOSSIN, E. Medical ethnobotany survey in Martinique. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53, p117-142, 1996.

MAGALHÃES, A.F.; MAGALHÃES, E.G.; JUNIOR, V.N.; FILHO, H.F.L. Polyacetylenes from *Pterocaulon* species. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2497-2499, 1989.

MAREGESI, S.M., PIETERS, L., NGASSAPA, O.D., APERS, S., VINGERHOETS, R., COS, P., VANDEN BERGHE, D.A., VLIETINCK, A.J. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology** v. 119, p. 58–66, 2008.

MEDEIROS-NEVES, B., DE BARROS, F.M.C., TEIXEIRA, H.F., VON POSER, G.L. Quantification of coumarins in aqueous extract of *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) and characterization of a new compound. **Molecules**. v. 20, p18083–94, 2015.

MISHRA, B.B., TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MALDANER, L.; JARDIM, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.

MARAN, J.P.; MANIKANDAN, S; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; NIVETHA, C.V.; DINESH, R. Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 604– 611, 2013.

MARTINI, E.; CARVALHO, E.; TEIXEIRA, H. F.; LEÃO, F; OLIVEIRA, M. C. Adsorção de oligonucleotídeos em nanoemulsões obtidas por emulsificação espontânea **Química Nova**, v.30, p. 930 - 934, 2007.

MARTINS, A. O. B. P. B. **Identificação do perfil químico e avaliação das atividades antioxidante, gastroprotetora, cicatrizante e antimicrobiana do extrato hidroalcoólico das cascas de *Astronium fraxinifolium* Schott ex.Spreng. (Gonçalvo)** 2013. Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Bioprospeção Molecular.

MINJARES-FUENTES, R., FEMENIA, A., COMAS-SERRA, F., ROSSELLÓ, C., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, V.M., GONZÁLEZ-LAREDO, R.F., GALLEGOS-INFANTE, J.A., MEDINA-TORRES L. Effect of different drying procedures on physicochemical properties and flow behavior of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel **LWT - Food Science and Technology** v. 74, p. 378-386, 2016.

MORETTI, M.L. A importância crescente das infecções fúngicas. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 9, p. 8-9, 2007.

NEWMAN, D.J. AND CRAGG, G.M., SNADER, K.M.J. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 to 2002 **Journal of Natural Products** v. 66, p. 1022–1037, 2003.

NEWMAN, D.J. AND CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years **Journal of Natural Products** v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D.J. AND CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D.J. AND CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 **Journal of Natural Products** v. 79, p. 629–661, 2016.

NOVÁKOVÁ, L., VLČKOVÁ H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation **Analytica Chimica Acta** v. 656, p. 8–35, 2009.

PANATIERI, L.F., BRAZIL, N.T., FABER, K., MEDEIROS-NEVES, B., VON POSER, G., ROTT, M.B., ZORZI, G.K., TEIXEIRA, H.F. Nanoemulsions containing a coumarin-rich extract from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) for the treatment of ocular *Acanthamoeba keratitis*. **AAPS PharmSciTech**, 2016.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; SILVA, F. P. DA; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Revista Química Nova*, Campinas, v. 31, n. 5, p. 1190-1198, 2008.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high value foods: a review **Journal of food engineering** v. 49, p. 311-319, 2001.

RASOANAIVO, P., PETITJEAN, A., RATSIMAMANGA-URVERG, S., Rakoto-Ratsimamanga, A. Medicinal plants used to treat malaria in Madagascar **Journal of Ethnopharmacology**. v.37, p117-127, 1992.

SAID, K.A.M. and AMIN, M.A.M. Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes **Journal of Applied Science & Process Engineering** v. 2, p. 8-17, 2015.

SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization **Journal of Chromatography A** v. 987, p. 57–66, 2003.

SMITH, N.M. Ethnobotanical field notes from the Northern Territory, Australia. **Journal of the Adelaide Botanic Gardens**. v. 14, p1–65, 1991.

STEIN, A.C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 211-214, 2005.

STEIN, A.C.; ALVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 95-98, 2006.

STOPIGLIA, C.D.O.; VIANNA, D.R.; MEIRELLES, G.C.; TEIXEIRA, H.; von POSER, G.L.; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*, **Journal de Mycologie Médicale**, v. 21, p. 169-172, 2011.

VIANNA, D.R.; CORVELLO, F.; RÓDIO, C.; BRUXEL, F.; VELHO, A.; CARVALHO, E.S.; VON POSER, G.; TEIXEIRA, H.F. Spectrophotometric determination of coumarins incorporated into nanoemulsions containing *Pterocaulon balansae* extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1487-1491, 2011.

VIANNA, D.R.; HAMERSKI, L.; FIGUEIRÓ, F.; BERNARDI, A.; VISENTIN, L. C.; PIRES, E. N. S.; TEIXEIRA, H. F.; SALBEGO, C. G.; EIFLER-LIMA, V. F.;

BATTASTINI, A. M. O.; von POSER, G. L.; PINTO, A. C. Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from Pterocaulon species **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 268-274, 2012.

ZARDINI, E. Etnobotânica de compuestas argentinas com especial referencia a su uso farmacológico. **Acta Farm. Bonaerense**. v. 3, p77-99, 1984.

TOBISZEWSKI, M. AND NAMIESNIK, J. Greener organic solvents in analytical chemistry **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry** v. 5, p. 1–4, 2017.

TORRES, F.C., MEDEIROS-NEVES, B., TEIXEIRA, H.F., KAWANO, D., EIFLER-LIMA, V.L., CASSEL, E., VARGAS, R.M.F., VON POSER, G.L. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction as a selective method for the obtainment of coumarins from *Pterocaulon balansae* (Asteraceae) **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization** v. 18, p. 303–308, 2017.