

***Plectranthus madagascariensis* phytosomes: formulation optimization**

Fitossomas de Plectranthus madagascariensis: otimização da formulação

Diogo Matias¹, Luís Roque¹, Maria de Fátima Simões^{1,3}, Ana Diaz-Lanza², Patrícia Rijo^{*1,3} and Catarina P. Reis^{*1,4}

¹Universidade Lusófona Research Center for Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

²Dpto. Ciencias Biomédicas, Univesidad de Alcalá, Plaza de San Diego, s/n, 28801 Alcalá de Henares, Madrid, Espanha

³Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.ULisboa), Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Av. Professor Gama Pinto 1649-003 Lisboa, Portugal

⁴IBEB - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

***Shared senior authorship**

E-mail: patricia.rijo@ulusofona.pt

Abstract

Medicinal plants have been a reliable source of bioactive natural products with potential pharmaceutical applications. The delivery of those bioactive agents into nanosystems is considered a promising strategy for the optimization of their pharmacologic effects. This work describes the preparation of phytosomes containing a bioactive extract from *Plectranthus madagascariensis* and optimization of the preparation method. Different formulations and process parameters were studied. It was observed that smaller and more uniform particles were obtained using acetone as solvent, a reaction time of two hours, and the addition of 2.5% molar concentration of cholesterol. The optimally prepared phytosomes had a diameter of 191.3 ± 75.3 nm with a polydispersity index of 0.243 ± 0.18 , and a spherical shape with amorphous appearance. These nanosystems were able to encapsulate 92.8% of the extract, as evaluated by HPLC, relative to $7\alpha,6\beta$ -dihydroxyroyleanona, the main extract component. This study suggests a future application of those phytosomes in the delivery of bioactive agents with therapeutic interest.

Keywords: Phytosome, *Plectranthus*, Lamiaceae, Diterpenes, Formulation optimization

Resumo

As plantas medicinais são uma fonte interessante de produtos naturais bioativos com potenciais aplicações farmacêuticas. A veiculação destes agentes bioativos em nanossistemas é considerada uma estratégia promissora para a optimização dos seus efeitos farmacológicos. O objectivo deste trabalho incide na preparação de fitossomas contendo um extracto bioactivo de *Plectranthus madagascariensis* e a sua optimização no método de preparação. Foram estudados vários parâmetros de formulação e processo. Observou-se que partículas menores e mais uniformes foram obtidas utilizando acetona como solvente, um período de reacção de 2h e com a adição do colesterol a uma concentração molar de 2,5%. Os fitossomas apresentaram um diâmetro de $191,3 \pm 75,3$ nm e com um índice de polidispersividade de $0,243 \pm 0,18$. Os fitossomas apresentaram uma forma esférica mas com aspecto amorfo. Estes nanossistemas foram capazes de encapsular 92,8% do extracto avaliado por HPLC em relação ao composto $7\alpha,6\beta$ -dihidroxi-roileanona, o principal composto do extracto. Este estudo sugere uma futura aplicação destes fitossomas na veiculação de agentes bioativos com interesse terapêutico.

Palavras-chave: Fitossoma, *Plectranthus*, Lamiaceas, Diterpenos, Optimização da formulação

Introduction

Medicinal plants have been one of the most valuable sources of new drug leads. Recent reviews have shown that for modern clinically used drugs, about 90% were from natural origin, were derived from natural products, or their chemical structure was inspired from natural products¹.

Plants of the *Plectranthus* genus (Lamiaceae) have diverse ethnopharmacological applications including gastro-intestinal, infection and skin conditions² 1 and 2. The members of Clade 1 (corresponding to the formally recognized genus *Coleus*. These uses may be related to the presence of bioactive diterpenes, namely abietanes³. Some physico-chemical characteristics of those molecules impair their bioavailability, however, namely an inadequate partition coefficient (log P) for solubilization in aqueous medium and/or to biological membrane crossing and the intrinsic instability of those molecules in physiological fluids (gastric pH effect, gut microflora metabolism, etc.)⁴.

New drug delivery systems as the Phytosome® (Indena, Milan, Italy), have proven to be effective in surpassing those limitations⁵. A phytosome is complex formed between phospholipids such as phosphatidylcholine and the phytocomponents in the natural product. As main components of the cell membrane, the phospholipids possess an outstanding biocompatibility. Additionally, the phospholipids were notable for their amphiphilic structures. This characteristic leads to a self-assembling ability which can easily originate emulsions and confer humectant characteristics, valuable from the cosmetic point of view. In aqueous medium, the phospholipids create supramolecular structures which are naturally dependent on their properties and specific conditions. There are several phytosome based products already in the market⁶.

They differ from liposomes as they have a similar proportion between phospholipid and drug (1:1 or 2:1) allowing higher entrapment of drug in the complex. Additionally, in liposomes the drug is placed into an internal cavity of the particle with limited interaction with surrounding medium, while in phytosomes the drug is dispersed in the phospholipid medium⁷.

The first reports of phyto-phospholipid complex preparation used essentially organic aprotic solvents as dichloromethane, or dioxane as the reaction medium⁸ catalase and thiobarbituric acid reactive substances with respect to carbon tetrachloride treated group ($P < 0.05$ and < 0.01). Those harmful solvents have been progressively substituted by less toxic solvents as acetone or ethanol⁹. The phytosomes were generally obtained

Introdução

As plantas medicinais são consideradas excelentes fontes de novos protótipos de fármacos. Recentes revisões bibliográficas demonstraram que, de todos os fármacos utilizados na clínica moderna, cerca de 90% apresentaram origem natural, isto é, são derivados de produtos naturais ou a sua estrutura química foi inspirada em produtos naturais¹. As plantas do género *Plectranthus* (Lamiaceae) apresentam um conjunto diverso de usos etnofarmacológicos com aplicações no tratamento de sintomas gastrointestinais, infeções e problemas de pele² 1 and 2. The members of Clade 1 (corresponding to the formally recognized genus *Coleus*. Esta utilização tradicional poderá estar relacionada com a presença de diterpenos e, em particular, diterpenos com esqueleto do tipo de abietano³. No entanto, algumas características físico-químicas destas moléculas limitam a sua biodisponibilidade como, por exemplo, o coeficiente de partição (log P) inadequado à solubilidade em meio aquoso e/ou à passagem através das membranas biológicas e a instabilidade intrínseca dessas moléculas em alguns fluidos fisiológicos (efeito do pH gástrico, metabolização pela microflora intestinal, etc)⁴. Novas estratégias de veiculação de fármacos como acontece com os fitossomas® (Indena, Milão, Itália) têm demonstrado inúmeras vantagens para ultrapassar essas limitações⁵. Os fitossomas são complexos moleculares formados por fosfolípidos, como a fosfatidilcolina, e os fitocomponentes existentes num produto natural. Como principais componentes da membrana celular, os fosfolípidos possuem uma excelente biocompatibilidade. Além disso, os fosfolípidos são conhecidos pelas suas estruturas anfífilas. Esta característica confere uma capacidade de auto-organização, para fácil formação de emulsões e características humectantes muito interessantes do ponto de vista cosmético. Em meio aquoso, os fosfolípidos geram diferentes estruturas supramoleculares que são naturalmente dependentes das suas propriedades e condições específicas. Existem já no mercado inúmeros produtos baseados em fitossomas⁶.

Eles diferem dos lipossomas pois têm um teor de fosfolípido similar ao do fármaco (proporção 1:1 ou 1:2), que permite uma maior proporção de fitocomponentes no complexo. No caso dos lipossomas, o composto ativo é colocado no interior de uma cavidade interna da partícula, verificando-se uma interação limitada com o meio circundante. No fitossoma, existe uma dispersão do fármaco no meio fosfolipídico⁶. As primeiras referências da preparação destes complexos referem-se ao uso essencialmente de solventes orgânicos no meio reaccional⁷ como por exemplo, o diclorometano ou o

by solvent evaporation (drying at reduced pressure or freeze-drying), *salting out* or using supercritical fluids as the reaction medium¹⁰.

This study describes the production optimization process of phytosomes containing a bioactive extract of *Plectranthus madagascariensis* based in two important parameters for their future clinical application: smaller particle size and more uniform size distribution.

Material and Methods

Chemicals

Phosphatidylcholine (48% purified from soy lecithin) and cholesterol were purchased from Sigma-Aldrich, Co (St. Louis, MO, USA). The chromatography solvents were HPLC-grade (Merck, Darmstadt, Germany) and remaining reagents were analytic grade.

Plant extract preparation

Dried and pulverized *Plectranthus madagascariensis* plant was sonicated (USC1200TH 45 kHz, VWR, Radnor, PA, USA) into acetone (100 mg plant/mL solvent). The resultant was filtered through Whatman paper n°4, vacuum-dried (RV06, IKA, Staufen, Germany) and an aliquot was analyzed using a validated HPLC-DAD method (1200 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), identifying the main components of the extract by comparison to authentic standards¹¹.

Phytosome preparation: research parameters

Different solvents (acetone, dichloromethane and ethanol), reaction times (60, 120 and 240 minutes) and cholesterol concentrations in the formulation (molar percentage 0, 2.5 and 5 %) were tested in order to obtain the smallest and most uniform nanoparticles. Briefly, molar equivalent concentrations of phosphatidylcholine and extract were solubilized in 20 mL of solvent, with constant stirring at 50°C during the reaction time. Then, 40 mL of reverse osmosis water was added and the organic solvent was eliminated in a rotary evaporator, after which the pellet was recovered by centrifugation (23540G, 10 min).

dioxano⁷. Estes solventes apresentam grandes limitações de segurança e têm sido progressivamente substituídos por solventes menos tóxicos como a acetona ou o etanol⁷. As técnicas mais frequentes de preparação de fitossomas são a evaporação de solvente (secagem, a pressão reduzida ou liofilização), *salting out* ou ainda a utilização de fluídos supercríticos como meio reacional⁷.

Neste artigo, é descrito o processo de otimização da produção de fitossomas contendo um extrato bioativo de *Plectranthus madagascariensis*, baseado em dois parâmetros importantes para a sua futura aplicação clínica: menor tamanho possível e distribuição de tamanho mais uniforme.

Material e Métodos

Reagentes

Fosfatidilcolina (48% purificada a partir da lecitina de soja) e colesterol foram adquiridos à Sigma-Aldrich, Co (St. Louis, MO, EUA). Os solventes de cromatografia são de grau HPLC (Merck, Darmstadt, Alemanha) e os restantes reagentes foram de grau analítico.

Preparação do extracto vegetal

Material vegetal, seco e moído, de *Plectranthus madagascariensis* foi sonicado (USC1200TH 45 kHz, VWR, Radnor, PA, USA) em acetona (100 mg planta/mL solvente). O resultante foi filtrado em filtro Whatman n.º 4, seco a pressão reduzida (RV06, IKA, Staufen, Alemanha) e uma alíquota foi analisada usando um método validado de HPLC-DAD (1200 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, EUA) sendo identificados os componentes maioritários do extracto por comparação com amostras autênticas¹¹.

Preparação dos Fitossomas: parâmetros a investigar

Diferentes solventes (acetona, diclorometano e etanol), tempos de reação (60, 120 e 240 min) e a concentrações de colesterol na formulação (percentagem molar de 0; 2,5 e 5%) foram testadas de modo a obter fitossomas de tamanho reduzido e uniformes. Resumidamente, as concentrações de equivalente molar de fosfatidilcolina e extrato foram solubilizados em 20 mL de solvente e mantidos em agitação a 50°C durante o tempo de reação. Posteriormente, 40 mL de água bidestilada foram adicionados e o solvente orgânico foi eliminado por evaporação (utilizando o evaporador rotativo), sendo o precipitado recuperado por centrifugação (23540G, 10 min).

Determination of encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE, %) of the extract into phytosomes was determined by evaluation of the non-encapsulated fraction. After centrifugation, the supernatant was collected, freeze-dried and dissolved into methanol prior to analysis by HPLC-DAD. The encapsulation efficiency was determined based on 7 α ,6 β -dihydroxyroyleanone (the major compound in the extract) for which a calibration curve was established using pure synthetic standards.

Physical and morphological characterization

Phytosomes were diluted with distilled water and analysed in a Delsa Nano C Particle Analyzer (Beckman Coulter, CA, USA). The mean particle size and polydispersity index (PI) were evaluated at ambient temperature and 165°C. Morphology was assessed by surface electronic microscopy (SEM 5200LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at 20 Kv after drying and gold cover (500 nm) of the samples.

Results

Extract preparation and characterization

Extract was obtained as a yellowish gum with a yield of 0.22% ($m_{\text{extract}}/m_{\text{dry plant}}$). The HPLC-DAD analysis showed that this extract was rich in polyphenols and diterpenes, including 7 α ,6 β -dihydroxyroyleanone (**1**) and coleon U (**2**) among the main components (Figure 1).

Determinação da eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE, %) do extracto nos fitossomas foi determinada pela avaliação da fração do extracto não-encapsulado. Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido, liofilizado e dissolvido em metanol, antes da análise realizada em HPLC-DAD. A eficiência de encapsulação foi determinada tendo por base o pico de 7 α ,6 β -dihidroxiroyleanona (o composto maioritário do extrato), para o qual tinha sido estabelecida previamente uma curva de calibração utilizando amostras autênticas.

Caracterização física e morfológica

Os fitossomas foram diluídos com água destilada e analisados num Delsa Nano C (Coulter, CA, EUA). O tamanho médio, o índice de polidispersividade (PI) foram avaliados neste equipamento à temperatura ambiente com 165°C. A morfologia foi avaliada por microscopia electrónica de varrimento (SEM 5200LV, JEOL, Tóquio, Japão) a 20 Kv após secagem e revestimento de ouro (500 nm) das amostras.

Resultados

Preparação e caracterização do extrato

O extrato apresentou uma coloração amarelada com um rendimento de extração de 0,22% ($m_{\text{extrato}}/m_{\text{planta seca}}$). A análise por HPLC-DAD demonstrou que o extrato apresentou um elevado teor em polifenóis e diterpenos, sendo os componentes maioritários a 7 α ,6 β -dihidroxiroyleanona (**1**) e a coleona U (**2**) (figura 1).

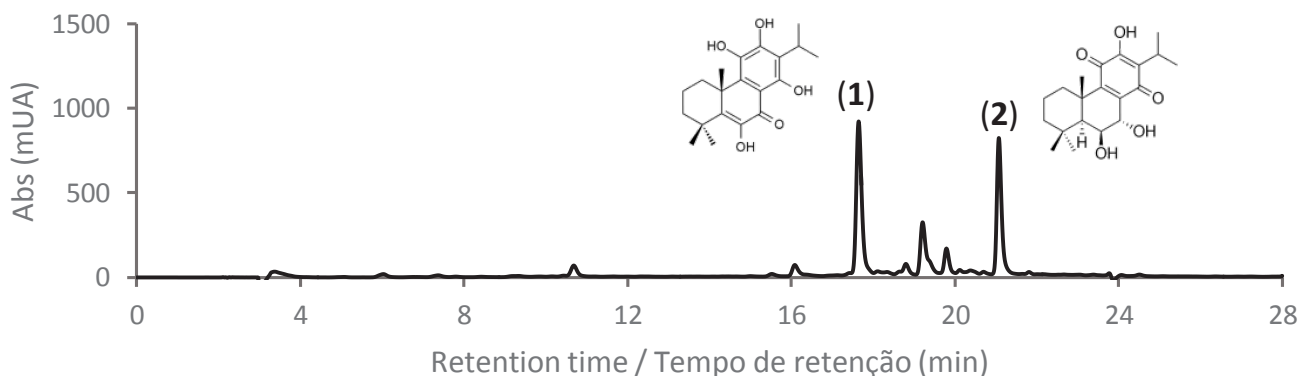


Figura 1/ Figure 1. HPLC profile of the prepared *Plectranthus madagascariensis* extract (280 nm) and identified major compounds /Perfil de HPLC do extracto de *Plectranthus madagascariensis* (280 nm) e identificação dos compostos maioritários

Phytosome complexes optimization

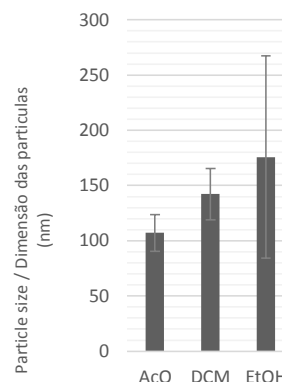
The results from the optimization process were presented in the Tables 1-3. Under the process conditions studied, the smallest and most uniform particles were produced using acetone, a reaction time of two hours and adding 2.5% of cholesterol.

Optimização dos fitossomas

Os resultados obtidos durante o processo de otimização estão apresentados nas tabelas 1-3. Os fitossomas de tamanho reduzido e uniformes foram produzidos utilizando a acetona, com um período de reação de 2h e adicionando 2,5% de colesterol.

Table 1/ Tabela 1. Influence of solvent choice in phytosome properties
Influência do solvente nas propriedades dos fitossomas.

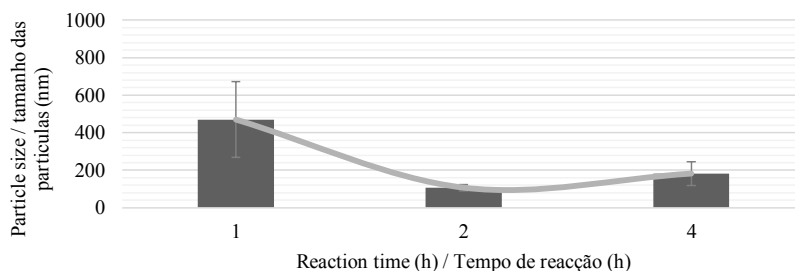
Reaction solvent / Solvente reação	Size $\pm$ SD / Dimensão $\pm$ DP	PI / IP
Acetone / Acetona	107.2 $\pm$ 16.55	0.419 $\pm$ 0.06
Dichloromethane / Diclorometano	142.2 $\pm$ 23.3	0.511 $\pm$ 0.12
Ethanol / Etanol	175.7 $\pm$ 91.65	0.359 $\pm$ 0.001



PI / IP: Polydispersity index / Índice de polidispersidade; AcO: Acetone / Acetona; DCM: Dichloromethane / Diclorometano; EtOH: Ethanol / Etanol

Table 2 / Tabela 2. Influence of reaction time in phytosome properties
Influência do tempo de reação nas propriedades dos fitossomas.

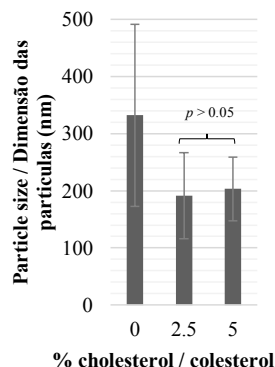
Time / Tempo (h)	Size / Tamanho	PI / IP
1	469.85 $\pm$ 201.95	0.772 $\pm$ 0.04
2	107.2 $\pm$ 16.55	0.410 $\pm$ 0.06
4	182.1 $\pm$ 64.35	0.458 $\pm$ 0.01



PI / IP: Polydispersity index / Índice de polidispersidade

Table 3/ Tabela 3. Influence of cholesterol concentration in phytosome properties
Influência da concentração de colesterol nas propriedades dos fitossomas.

Cholesterol / Colesterol (% , M)	Size / Dimensão	PI / IP
0 %	332.2 ± 159.7	0.247 ± 0.03
2.5 %	191.3 ± 75.3	0.243 ± 0.18
5 %	203.3 ± 55.8	0.263 ± 0.15



PI / IP: Polydispersity index / Índice de polidispersividade; %M: molar percentage /

percentagem molar.

Encapsulation efficiency of optimized formulation

In order to quantify the amount of non-encapsulated main compound of the extract (**2**), a calibration curve was developed in the 0.005-1 mg/mL range ($y = 25442x - 85.131$; LOD: 0.002; LOQ: 0.006) with high linearity ($R^2 = 0.9999$). The encapsulation efficiency was 92.83 ± 0.520 % which is in accordance with other methods of production of phyto-phospholipidic particles⁹.

Morphologic characterization

The nanoparticles were formed after the addition of water, verified by a change in the coloration of the reaction medium from translucent yellow to a yellowish opaque solution (Figure 2). The SEM images show that the phytosomes present a relatively amorphous spherical shape (Figure 2).

Eficiência de encapsulação da formulação otimizada

Para a determinação da EE foi construída uma curva de calibração utilizando uma gama de concentrações entre 0,005-1 mg / mL ($y = 25442x - 85,131$; LDD: 0,002; LOQ: 0,006) com alta linearidade ($R^2 = 0,9999$), tendo por base o composto maioritário do extracto não encapsulado. A eficiência de encapsulação foi de $92,83 \pm 0,52\%$, o que está em conformidade com os resultados verificados em outros métodos de preparação de partículas fito-fosfolipídicas⁸.

Morfologia

Após a adição de água, verificou-se uma mudança na coloração do meio da reação de amarelo translúcido para uma solução opaca e com uma coloração amarelada (Figura 2). As imagens SEM demonstraram que os fitossomas apresentam uma forma esférica relativamente amorfa (Figura 2).

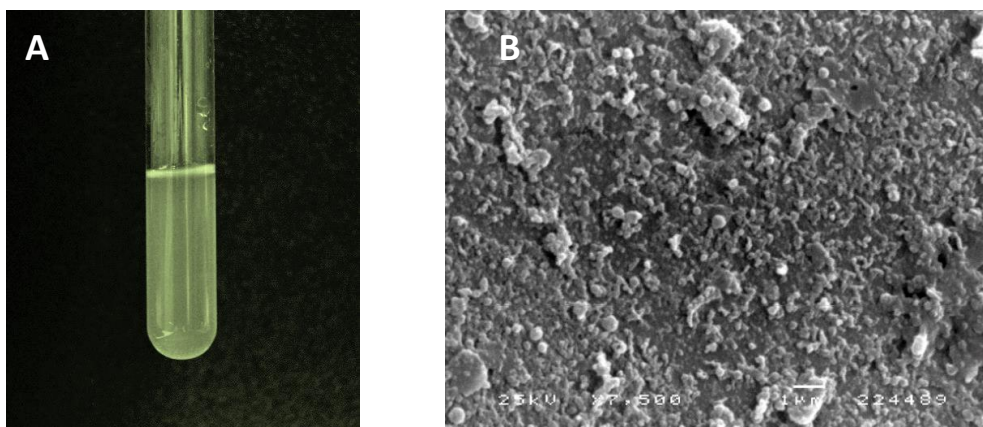


Figure 2/ Figura 2. Macro-(A) and microscopic (B) aspect of the optimized phytosomes / Aspecto macro- (A) e microscópica (B) dos fitossomas otimizados.

Discussion

This study demonstrates that the selection of formulation production parameters could be important factors in the final characteristics of the drug delivery system. The extract was successfully encapsulated into phytosomes, which are an excellent option for the delivery of natural compounds with low stability. Previously published studies have shown that the complexation of natural compounds with phospholipids could enhance the stability of a formulation⁵. The use of acetone for this formulation was more effective, producing smaller and more uniform particles than dichloromethane or ethanol, which are more frequently found in literature^{8,9} catalase and thiobarbituric acid reactive substances with respect to carbon tetrachloride treated group ($P < 0.05$ and < 0.01). This could be related to the enhanced solubility of the extract components in this solvent, which is the same used for the extraction. This solvent is also considered less toxic than dichloromethane in pharmaceutical formulations (ICH class 2 vs ICH class 3). Related to the time of reaction, the literature describes that an extension of the reaction time does not always produce advantages at the granulometric level. The phenomena related to the higher aggregation probability could be responsible for this observation¹². Cholesterol has been used in phytosomes as stability enhancer of the nanosystems¹³. In this study it was shown that the inclusion of cholesterol results in smaller particles but without statistically significant difference between the use of a molar percentage of 2.5 or 5% ($p > 0.05$, t-student test, MS Excel). The smaller size of those nanosystems could be crucial for their absorption at the oral or transdermal level, if applicable. Previous studies have shown that a reduction on the size of the drug delivery systems improved their intestinal absorption^{14,15}. This could mean that this size reduction improves the bioavailability of the encapsulated phytocomponents. The inclusion of the extract into phytosomes could be useful to obtain a stable pharmaceutical formulation with possible application as antibacterial or antitumor treatments. The acetonic extract prepared from *P. madagascariensis* possess as main compounds two diterpenes with interesting antibacterial^{11,16} and anticancer¹² activities, 7 α ,6 β -dihydroxyroyleanone and coleon U, respectively. The abietane diterpenes present in this extract possess conjugated quinone systems which contribute to their cytotoxicity by the induction of free radicals¹⁸. The coleon U has also shown to be a selective inhibitor of the protein kinase C delta¹⁹ 11,12,14-tetrahydroxy-abieta-5,8,11,13-tetraene-7-one (coleon U). This mechanism of action could be useful for the modulation of molecular pathways that are altered in some types of cancer.

Discussão

Este estudo demonstrou que a seleção dos parâmetros do processo e formulação poderão ser fatores importantes nas características finais do sistema de veiculação de fármacos. O extrato foi encapsulado com sucesso em fitossomas, representando aqui uma excelente alternativa para a veiculação de compostos de origem natural relativamente instáveis. Os estudos anteriores descritos na literatura, demonstraram que a complexação de produtos naturais com fosfolípidos melhora a estabilidade das formulações⁵. A utilização de acetona como meio reacional permitiu a obtenção de fitossomas de tamanho mais uniforme e de menor dimensão quando comparado com os solventes mais frequentemente referidos na literatura, diclorometano ou etanol^{8,9} catalase and thiobarbituric acid reactive substances with respect to carbon tetrachloride treated group ($P < 0.05$ and < 0.01). Este facto poderá estar relacionado com a melhor solubilidade dos componentes do extrato neste solvente, uma vez que este foi o mesmo solvente extrator. Este solvente é também considerado menos tóxico que por exemplo o diclorometano para uso em preparações farmacêuticas (ICH classe 2 versus ICH classe 3). Em relação ao tempo de reação, é descrito na literatura que a extensão do tempo reacional nem sempre apresenta vantagens do ponto de vista granulométrico. Os fenómenos relacionados com a maior probabilidade de aglomeração poderão ser os responsáveis por esta observação¹². O uso de colesterol nos fitossomas está geralmente relacionado com o seu efeito estabilizador dos nanossistemas¹³. No presente estudo, observou-se uma diminuição no tamanho após adição do colesterol mas sem diferenças estatisticamente significativas entre a percentagem molar de 2,5 ou 5% ($p > 0.05$, teste t-student). O pequeno tamanho destes nanossistemas, poderá ser crucial para a sua absorção quer ao nível transdérmico ou oral, se aplicável. Estudos anteriores demonstraram que uma redução de tamanho dos sistemas de veiculação de fármacos conduz a uma melhoria da absorção intestinal dos mesmos^{14,15}. Deste modo, a redução do tamanho destas nanopartículas poderá conduzir a uma melhoria da biodisponibilidade dos fitocomponentes encapsulados.

A inclusão do extrato em fitossomas poderá ser extremamente útil para obter uma forma farmacêutica estável com aplicação terapêutica que poderá ser a nível de actividade antibacteriana ou antitumoral. O extrato acetónico preparado a partir de *P. madagascariensis*, possui como componentes maioritários, dois diterpenos com interessante actividade antibacteriana^{11,16} e antitumoral^{17,18}, a 7 α ,6 β -dihidroxyroyleanone e a coleona U, respectivamente. Os diterpenos abietânicos presentes neste extrato, possuem na sua estrutura uma quinona conjugada que pode contribuir para a sua citotoxicidade devido à indução de radicais livres¹⁸. A coleona U também está descrita como um inibidor seletivo da proteína quinase C delta¹⁹ 11,12,14-tetrahydroxy-abieta-5,8,11,13-tetraene-7-one (coleon U). Este mecanismo de ação poderá ser útil na modelação de vias moleculares que se encontram alteradas em alguns tipos de cancro.

Conclusion

This study showed that the extract containing the $7\alpha,6\beta$ -dihydroxyroyleanone as its main compound was successfully encapsulated into lipid structures. Phytosomes with reduced and uniform dimension with smaller and more uniform size was achieved by the use of acetone as reaction medium over two hours and with the addition of a molar proportion of 2.5% of cholesterol. The selection of any drug delivery system must always be careful and dependent on the therapeutic target. This study suggests that phytosomes could be considered excellent natural bioactive products delivery systems with interest for the cosmetic and pharmaceutical industries.

Acknowledgements

The authors would like to thank to professor Lia Ascensão (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa) SEM analysis. This project was supported by the grant PADDIC 2013-2014 from ALIES-COFAC.

Conflict of interests

The authors declare that there are no financial and personal relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interests

Conclusão

Este estudo demonstrou que o extracto contendo como composto principal a $7\alpha,6\beta$ -dihidroxiroileanona foi encapsulado com sucesso em estruturas lipídicas. Foram obtidos fitossomas de reduzida dimensão e uniforme após utilização de acetona como meio reacional, durante 2h e com adição de uma proporção molar de 2,5% de colesterol. A selecção de qualquer sistema de veiculação de fármacos deverá ser sempre cuidadosa e dependente do fim terapêutico. Este estudo sugere que os fitossomas poderão ser aqui considerados excelentes sistemas de veiculação de compostos naturais bioactivos com interesse nas indústrias cosmética e farmacêutica.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à professora Lia Ascensão (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa) pela análise SEM. Este projeto foi financiado pela bolsa PADDIC 2013-2014, da ALIES-COFAC.

Conflitos de interesses

Os autores declaram não existir qualquer relação pessoal ou financeira que possa ser entendida como representando um potencial conflito de interesses.

References / referências

1. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010(). *J. Nat. Prod.* 75, 311–335 (2012).
2. Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S. J. & Paton, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *J. Ethnopharmacol.* 103, 1–24 (2006).
3. Abdel-Mogib, M., Albar, H. A. & Batterjee, S. M. Chemistry of the Genus *Plectranthus*. *Molecules* 7, 271–301 (2002).
4. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 3–25 (1997).
5. Semalty, A., Semalty, M., Rawat, M. S. M. & Franceschi, F. Supramolecular phospholipids-polyphenolics interactions: The PHYTOSOME® strategy to improve the bioavailability of phytochemicals. *Fitoterapia* 81, 306–314 (2010).
6. Indena. Phytosome®. at <<http://www.phytosome.info/>>
7. Saraf, S., Khan, J., Alexander, A., Ajazuddin & Saraf, S. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. *J. Control. Release* 168, 50–60 (2013).
8. Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B. P. & Mukherjee, P. K. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int. J. Pharm.* 330, 155–163 (2007).
9. Zhang, J., Tang, Q., Xu, X. & Li, N. Development and evaluation of a novel phytosome-loaded chitosan microsphere system for curcumin delivery. *Int. J. Pharm.* 448, 168–174 (2013).
10. Khan, J., Alexander, A., Saraf, S. & Saraf, S. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. *Int. J. Pharm.* 448, 168, 50–60 (2013).
11. Gaspar-Marques, C., Rijo, P., Simões, M. F., Duarte, M. a. & Rodriguez, B. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine* 13, 267–271 (2006).
12. Volodkin, D., Ball, V., Schaaf, P., Voegel, J. C. & Mohwald, H. Complexation of phosphocholine liposomes with polylysine. Stabilization by surface coverage versus aggregation. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768, 280–290 (2007).
13. Rasaie, S., Ghanbarzadeh, S., Mohammadi, M. & Hamishehkar, H. Nano Phytosomes of Quercetin: A Promising Formulation for Fortification of Food Products with Antioxidants. *Pharm. Sci.* 20, 96 (2014).
14. Jani, P., Halbert, G. W., Langridge, J. & Florence, A. T. Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* 42, 821–826 (1990).
15. Hussain, N., Jaitley, V. & Florence, A. T. Recent advances in the understanding of uptake of microparticulates across the gastrointestinal lymphatics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 50, 107–142 (2001).
16. Kubínová, R. et al. Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 6366, 1–4 (2014).
17. Marques, C. G. et al. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on the growth of human cancer cell lines. *Planta Med.* 68, 839–840 (2002).
18. Burmistrova, O. et al. Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against human tumor cells. *J. Nat. Prod.* 76, 1413–1423 (2013).
19. Coutinho, I. et al. Selective activation of protein kinase C-delta and -epsilon by 6,11,12,14-tetrahydroxy-abieta-5,8,11,13-tetraene-7-one (coleon U). *Biochem. Pharmacol.* 78, 449–459 (2009).