



Ministério da Educação

Universidade Federal do Rio Grande

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



**NANOEMULSÕES CONTENDO QUERCETINA E CURCUMINA PARA
ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIVIRAL**

DANIELA PASTORIM VAISS

Rio Grande, 2023



Ministério da Educação

Universidade Federal do Rio Grande

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



**NANOEMULSÕES CONTENDO QUERCETINA E CURCUMINA PARA
ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIVIRAL**

DANIELA PASTORIM VAISS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiana Lima Dora

Rio Grande, 2023

DANIELA PASTORIM VAISS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

NANOEMULSÕES CONTENDO QUERCETINA E CURCUMINA PARA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL

Banca Examinadora

Profa. Dra. Anna Siebel – FURG

Dra. Bibiana Franzen Matte – Externo

Dr. Gustavo Richter Vaz (Suplente) – FURG

Profa. Dra. Cristiana Lima Dora – FURG (Orientador)

Rio Grande, 2023

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Agentes virais causadores de infecções respiratórias	13
2.2. Coronavírus.....	15
2.2.1. Classificação e estrutura	15
2.2.2. Patogênese.....	17
2.2.3. SARS E MERS	19
2.2.4. SARS-CoV-2.....	20
2.3. Compostos de origem natural.....	22
2.4. Via intranasal	25
2.5. Nanotecnologia farmacêutica	27
2.5.1. Nanocarreadores contendo curcumina e quercetina	31
3. OBJETIVOS.....	38
3.1. Objetivo geral	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
Original Article	51
Curcumin and quercetin co-encapsulated in nanoemulsions for intranasal administration: a promising therapeutic and prophylactic treatment for viral respiratory infections	51
1 Introduction.....	53
2 Materials and Methods.....	56
2.1 Materials	56
2.2 Development of Nanoemulsion containing CUR and QUE.....	56
2.3 Measurements of Size and Zeta Potential	57
2.4 Determination of CUR and QUE concentrations in NEs.....	58

2.5 Ex vivo permeation and retention study of CUR and QUE NEs on nasal mucosa	58
2.6 Antiviral Activity Assay	59
2.7 Cell culture	59
2.8 Cell cytotoxicity	60
2.9 Antiviral assays	60
2.10 Surface viral inactivation assay	61
3. Results	61
3.1. Preparation and characterization of NEs	61
3.2 Ex vivo porcine nasal mucosa permeation and retention test	62
3.3 Antiviral activity	62
3.3.1. Cell cytotoxicity	62
3.3.2. Antiviral assays	63
3.3.3. Surface viral inactivation assay	64
4. Discussion	64
5. Conclusions	70
References	72

RESUMO

As infecções respiratórias causadas por vírus são uma das causas mais frequentes deste tipo de infecção. Apresentam graus variáveis de sintomas e aspectos das doenças. Os vírus que atingem este sistema são altamente contagiosos e de difícil tratamento, sendo a cavidade nasal sua principal porta de entrada. O uso de plantas medicinais, como a curcumina (CUR) e a quercetina (QUE), tem se mostrado eficazes para auxiliar no tratamento de doenças respiratórias, por possuírem atividade anti-inflamatória, antioxidante e antivirais. No entanto, estes compostos possuem baixa solubilidade em água e conseqüentemente baixa biodisponibilidade, o que limita seu uso na prática clínica. Neste sentido, o uso da nanotecnologia pode auxiliar, uma vez permite a encapsulação de compostos hidrofóbicos em formulações aquosas, se mostrando uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de novas terapias que possam auxiliar na prevenção antiviral. Desta forma, este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos (NL) contendo CUR e QUE visando a administração pela via intranasal. Os NL foram desenvolvidos pela técnica de homogeneização a alta pressão, e caracterizados quanto ao seu tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta, teor, liberação *in vitro*, permeação/retenção dos ativos em mucosa nasal suína (*ex vivo*) e quanto a sua capacidade antiviral (*in vitro*), frente ao vírus causador de hepatite em murinos (MHV-3), um β -coronavírus, utilizado como modelo de partícula viral para SARS-COV-2. Os NL apresentaram tamanho médio de 400 nm, boa capacidade de retenção na mucosa nasal suína, indicando uma liberação local e atividade virucida $\geq 90,00\%$ contra MHV-3. Desta forma, os nanocarreadores desenvolvidos apresentaram características promissoras para o desenvolvimento de uma terapia antiviral adjuvante inovadora e eficaz, frente aos vírus que atingem o sistema respiratório.

Palavras-chave: Nanocarreadores lipídicos, SARS-COV-2, antiviral, compostos naturais, flavonoide.

Este trabalho se enquadra nos Indicadores Brasileiros para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: Objetivo 3 - Boa Saúde e Bem-Estar e Objetivo 9 - Indústria, Inovação e Infraestrutura.

ABSTRACT

Respiratory infections caused by viruses are one of the most frequent causes of this type of infection. They present variable degrees of symptoms and aspects of the diseases. Viruses that affect this system are highly contagious and difficult to treat, with the nasal cavity being their main gateway. The use of medicinal plants, such as curcumin (CUR) and quercetin (QUE), has been shown to be effective in helping to treat respiratory diseases, as they have anti-inflammatory, antioxidant and antiviral activity. However, these compounds have low water solubility and consequently low bioavailability, which limits their use in clinical practice. In this sense, the use of nanotechnology can help, since it allows the encapsulation of hydrophobic compounds in aqueous formulations, proving to be a promising technology for the development of new therapies that can help in antiviral prevention. Thus, this work aims to develop lipid nanocarriers (NL) containing CUR and QUE for intranasal administration. The NL were developed using the high pressure homogenization technique, and characterized as to their average size, polydispersion index, zeta potential, content, in vitro release, permeation/retention of the actives in porcine nasal mucosa (ex vivo) and their antiviral capacity (in vitro), against the virus that causes hepatitis in murines (MHV-3), a β -coronavirus, used as a viral particle model for SARS-COV-2. The NL showed an average size of 400 nm, good retention capacity in the porcine nasal mucosa, indicating local release and virucidal activity $\geq 90.00\%$ against MHV-3. In this way, the developed nanocarriers showed promising characteristics for the development of an innovative and effective adjuvant antiviral therapy against viruses that reach the respiratory system.

Keywords: Lipid nanocarriers, SARS-COV-2, antiviral, natural compounds, flavonoid.

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1: Composition of nanoemulsions NEs	56
Table 2: Average particle size, polydispersity index, zeta potential, drug loading and recovery	61
Table 3: Reduction of viral particles	64
Table 4: Viral reduction, surface viral inactivation assay	64
Table 5S1: Chromatographic conditions for elution of solvents in gradient mode – HPLC	71
Table 6S2: Data related to the LOD, LOQ, slope, and interception for curcumin and quercetin spectrophotometer analysis method.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Partícula viral de CoV, adaptado de CUI e colaboradores, (2019). Apresenta glicoproteínas de membrana (S), envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (ssRNA). 16

Figura 2: Corte sagital da cavidade nasal, adaptado de “The Nasal Cavity - Structure - Vasculature - Innervation - TeachMeAnatomy”, [s.d.]. Apresentando as principais regiões da cavidade nasal, área vestibular, olfatória e respiratória 26

Artigo:

FIGURE 1. Mass of QUE and CUR retained in porcine nasal mucosa after 4 h of permeation test in Franz-type diffusion cell. The compounds were extracted with methanol overnight. **Statistically significant compared with NE-CQ/QUE at $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA of using graphPad prism 8.0.2) 62

FIGURE 2: Cytotoxicity assay of the tested compounds in L929 cells. The cytotoxicity of NE-Blank, NE-QUE, NE-CUR and NE-CQ based on the dose–response was determined using SRB, the control group was normalized to 100% and the other groups compared to him..... 63

FIGURE 3: Enveloped viruses and their structures, highlighting possible sites of action for NE-QUE, NE-CUR and NE-CQ 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH – Ácido hialurônico

CoV – Coronavírus

CUR – Curcumina

DMSO – Dimetilsulfóxido

HAP – Homogeneizador de alta pressão

HCoV – Coronavírus Humano

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina)

NE – Nanoemulsão

NL – Nanocarreador lipídico

NP – Nanocarreador polimérico

NV – Nano-vesículas

OMS – Organização Mundial de Saúde

ORF – Estrutura de Leitura aberta

PDI – Índice de polidispersão

PED – Diarreia Epidêmica Suína

PEG – Polietilenoglicol

PIV – Parainfluenza Vírus

PVP – Polivinilpirrolidona

QUE – Quercetina

SADS – Síndrome aguda de diarreia Suína

SH – Sem hialuronato

SRB – Sulforodamina B

TRS – Trato Respiratório Superior

TRI – Trato Respiratório Inferior

VSR – Vírus Sincicial Respiratório

1. INTRODUÇÃO

As doenças respiratórias em humanos causadas por vírus são frequentemente associadas a surtos e epidemias, e possuem impacto significativo na morbidade e mortalidade em todo o mundo (CHEN; YANG, 2022). Apresentam graus variáveis de sintomas e aspectos da doença, desde sintomas leves e autolimitados a sintomas sistêmicos (JONES et al., 2021).

A transmissão viral pode ocorrer por meio do contato direto ou indireto com fômites e objetos contaminados. Além disso, há fatores que podem afetar a transmissão e disseminação viral, como fatores ambientais: o clima, a temperatura e a umidade; e fatores comportamentais individuais do hospedeiro, como o estilo de vida e o acesso aos bens e serviços essenciais para a saúde. Esses fatores podem influenciar na sazonalidade e surtos deste tipo de infecção (MORIYAMA; HUGENTOBLE; IWASAKI, 2020; UMUHOZA et al., 2021).

As abordagens para conter as infecções virais consistem no desenvolvimento de vacinas para controlar a disseminação e em abordagens terapêuticas, na qual podem ser utilizados métodos para tratar pessoas já infectadas, reduzir os danos causados pelo vírus e a suscetibilidade viral do hospedeiro, assim como prevenir a infecção viral (WEISS et al., 2020).

Neste contexto, sabe-se que o desenvolvimento de novos medicamentos pode ser um destes recursos, porém, é uma das abordagens que demora alguns anos para ser concluída, pois é um processo oneroso composto por diversas etapas. Neste sentido, há algumas estratégias que podem ser utilizadas para facilitar esse processo, como alternativas pode-se citar o reposicionamento de fármacos já existentes e a utilização de compostos naturais com propriedades terapêuticas já estudadas (MOUNCE et al., 2017; ZHAO et al., 2021).

Ao longo dos anos o estudo sobre plantas medicinais e seus derivados tem aumentado crescentemente, as plantas são fontes de muitos compostos químicos bioativos que são utilizados na medicina desde a antiguidade. Muitas delas são conhecidas por terem efeito terapêutico em diferentes doenças (BEN-SHABAT et al., 2020; DAS et al., 2021).

O *açafrão-da-terra* (*Curcuma longa* spp), uma especiaria amplamente utilizada na culinária, é um bom exemplo de planta medicinal utilizada, sendo a curcumina seu principal composto polifenólico com diferentes atividades já descritas na literatura, como exemplo cita-se as suas ações anti-inflamatórias, antioxidantes (GUPTA; PATCHVA; AGGARWAL, 2013), anticancerígenas (CALIBASI-KOCAL et al., 2019), antibacteriana (BARROS et al., 2021) e antiviral (LI et al., 2020). Além dos seus múltiplos benefícios os estudos relatam ainda um bom perfil de segurança na sua utilização (HEWLINGS; KALMAN, 2017).

Outro composto que também se destaca por suas atividades benéficas a saúde é a quercetina, um flavonoide presente em diferentes vegetais, como por exemplo a cebola; em frutas como a maçã, a uva e as frutas vermelhas; e em verduras como a couve (CHENG et al., 2019; SINGH; BHARDWAJ; PUROHIT, 2021). Dentre suas atividades, seus efeitos antivirais vem se destacando com estudos frente influenza A (CHOI et al., 2009; CHOI; SONG; KWON, 2012), vírus da hepatite em murinos, vírus da dengue (CHLOW et al., 2016) e mais recente como uma suplementação alimentar para auxiliar na prevenção da progressão da infecção causada por SARS-COV-2 (SHOHAN et al., 2022).

Estes compostos naturais além de possuírem diferentes ações terapêuticas relacionadas, apresentam menor toxicidade e são bem aceitos pela população (BEN-SHABAT et al., 2020). No entanto, sua utilização pode apresentar limitações devido algumas características físico-químicas, como a baixa solubilidade em água e alto metabolismo intestinal e hepático (YI et al., 2021; ZHENG; MCCLEMENTS, 2020).

Para contornar tais limitações e melhorar a liberação de compostos naturais, a nanotecnologia vem sendo utilizada, pois através dela podem ser desenvolvidos diferentes tipos de carreadores como, por exemplo, hidrogéis, lipossomas, micelas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, carreadores lipídicos sólidos ou carreadores lipídicos nanoestruturados (JORES et al., 2004; KHIZAR et al., 2023).

Através da sua utilização pode-se obter benefícios como o aumento da solubilidade aquosa, aumento da estabilidade da molécula, proteção contra degradação dos ativos e direcionamento ao alvo terapêutico, além da

possibilidade de combinar moléculas com diferentes graus de hidrofília ou lipofília mantendo um sistema estável. Ainda, nessa forma, as moléculas são menos reconhecidas pelo patógeno podendo retardar o processo de desenvolvimento de resistência (BEN-SHABAT et al., 2020; PATRA et al., 2018).

Em relação a via de administração, quando se trata de infecções que atingem o sistema respiratório, a via nasal pode ser uma boa opção de escolha, pois é a porta de entrada principal para este tipo de vírus. Além disso, a administração pela via nasal é indolor e as formulações podem ser desenvolvidas visando o tratamento ou a prevenção de infecções virais. A utilização dessa via favorece o desenvolvimento de formulações com entrega local, proporcionando redução de efeitos indesejáveis e adversos por não ter a absorção sistêmica (CHENTHAMARA et al., 2019; TAYEB et al., 2021; VAZ et al., 2020; WONG et al., 2014).

Neste sentido, este trabalho propõe o desenvolvimento de um produto nanotecnológico contendo compostos de origem natural como a curcumina e a quercetina para potencial administração pela via intranasal, que poderá ser utilizado como terapia adjuvante para prevenção de infecções respiratórias virais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agentes virais causadores de infecções respiratórias

As infecções respiratórias em humanos são causadas em sua grande maioria por agentes virais e bacterianos, sendo as de origem viral com maior proporção. Essas infecções vão desde resfriados autolimitados a infecções mais graves e até mesmo sistêmicas, afetam os indivíduos de diferentes faixas etárias e são frequentemente associados a surtos e epidemias, ocasionando importantes problemas em saúde pública (AGCA et al., 2021; CHEN; YANG, 2022; ETEMADI et al., 2019).

De acordo com dados epidemiológicos, fatores climáticos podem influenciar na sazonalidade de disseminação destes agentes virais, sendo observado nos

meses de inverno um aumento no número de casos de pessoas com sintomas respiratórios e busca por serviços de saúde, associados aos vírus do tipo influenza, coronavírus humano (HCoV) e vírus sincicial respiratório (VSR). Assim como em outras épocas do ano a frequência de ocorrência deste tipo de infecção pode estar associada a outros agentes virais como os rinovírus, os adenovírus, parainfluenza vírus (PIV), bocavírus humano e metapneumovirus humano. Os acompanhamentos epidemiológicos auxiliam no monitoramento do possível agente etiológico causador da infecção, direcionando medidas para prevenção e controle da disseminação, bem como o tratamento inicial da sintomatologia dos pacientes (GERAGHTY; ALIOTA; BONNAC, 2021; MORIYAMA; HUGENTOBLE; IWASAKI, 2020; PSCHEIDT et al., 2021)

Dentre estes agentes virais, os rinovírus são a principal causa de resfriado no mundo, afetam o trato respiratório superior e causam na grande maioria das vezes apenas infecções leves e limitadas. A doença aguda tem duração de 7 dias, sendo as principais manifestações clínicas são os espirros, seguido por rinorreia e obstrução nasal. Alguns indivíduos podem apresentar dor de garganta branda, cefaleia e mal estar. Devido seus principais sintomas serem autolimitados, seu tratamento foi negligenciado no passado, mas atualmente os estudos demonstram que sua infecção não está limitada ao trato respiratório superior, pois vem sendo detectado com frequência no tecido pulmonar (BOCHKOV; GERN, 2012; JACOBS et al., 2013; TO; YIP; YUEN, 2017).

Outros agentes virais causadores de resfriados são os bocavírus, adenovírus, metapneumovírus e PIV, mais comumente encontrados na primavera e verão, estão associados a infecções tanto do trato respiratório superior, quanto do inferior. São mais frequentes em crianças pequenas entre 0 e 2 anos, idosos e pacientes imunocomprometidos, os quais podem apresentar características clínicas leves e semelhantes no trato respiratório superior, ocasionalmente com presença de febre e diarreia. Quando atingem o trato respiratório inferior apresentam sintomas como chiado, crupe, sibilos, dificuldades respiratórias, assim como também levam ao agravamento de doenças preexistentes (GUIDO et al., 2016; HAAS et al., 2013; ISON, 2017; KING; COLBOURN, 2021; LION, 2014; LYNCH; FISHBEIN; ECHAVARRIA, 2011; PAWEŁCZYK; KOWALSKI, 2017; SCHUSTER; WILLIAMS, 2014).

Já o VSR, representa a causa mais comum de pneumonia grave em neonatos e bebês. Sua invasão viral no epitélio respiratório leva a lesão celular pela resposta imune e como causa necrose dos brônquios e bronquíolos, ocasionando bronquiolites e pneumonias, sua infecção pode ser fatal em bebês prematuros, assim como em pessoas com histórico de doença pulmonar e em imunocomprometidos. Em crianças e adultos imunocompetentes causa infecções brandas similares aos outros resfriados. Como o VSR não produz imunidade duradoura, deste modo há ocorrências de reinfecções ao longo da vida (BORCHERS et al., 2013; BOUKHVALOVA; YIM; BLANCO, 2018; GONZÁLEZ et al., 2012).

Os únicos agentes causadores de gripe, uma das enfermidades respiratórias mais importante das doenças epidêmicas, são as influenzas, as quais sofrem mutações de caráter antigênico e funcional provocando surtos, epidemias e pandemias. Existem 3 tipos de influenza A, B e C, as quais apresentam tamanho aproximado de 100 nm, genoma RNA segmentado de fita simples, polaridade negativa e carregam RNA polimerase. São capazes de infectar uma ampla variedade de hospedeiros favorecendo o surgimento de novas cepas virais por infecções na mesma espécie e interespecies. Suas mutações levam a população a se tornar suscetível a novas infecções, assim sendo importante a atualização vacinal. Seus principais sintomas são a febre súbita e alta, dores de cabeça, tosse seca, coriza e congestão nasal, causa dores musculares e mal estar geral. Sua recuperação é mais lenta podendo durar até semanas, ocasiona sintomas gastrointestinais e em casos mais graves leva a danos no tecido pulmonar podendo causar pneumonias, além de facilitar a infecção de bactérias, acarretando em pneumonias bacterianas (CUNHA, 2010; GAITONDE; MOORE; MORGAN, 2019; WEBSTER; GOVORKOVA, 2014).

Atualmente, além das influenzas, os coronavírus são os agentes virais de maior importância nas infecções respiratórias. Desta forma, estes serão abordados de forma mais completa, direcionando este trabalho ao seu tratamento.

2.2. Coronavírus

2.2.1. Classificação e estrutura

Os CoVs pertencem à família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae*, de acordo com suas estruturas genômicas os membros desta subfamília podem ser classificados em quatro gêneros os *Alphacoronavírus*, *Betacoronavírus*, *Gammacoronavírus* e *Deltacoronavírus*, ainda, dentro do gênero β existem quatro linhagens reconhecidas, A, B, C e D. Dentre os gêneros, os alfacoronavírus e betacoronavírus causam infecção apenas em mamíferos e os gamacoronavírus e deltacoronavírus em aves e alguns mamíferos (CUI; LI; SHI, 2019; LI et al., 2020; YADAV et al., 2021).

São vírus envelopados com tamanho aproximado entre 100 nm a 160 nm de diâmetro, na figura 1 estão ilustradas as principais características da partícula viral de CoVs. Apresentam genoma RNA fita simples sentido positivo com tamanho entre 27–32 kb, possuem projeções de glicoproteínas na superfície externa, além de proteínas de membrana, proteínas de envelope e nucleocapsídeo, que são fatores importantes no processo estrutural e funcional do vírus (AGCA ET AL., 2021; YADAV ET AL., 2021).

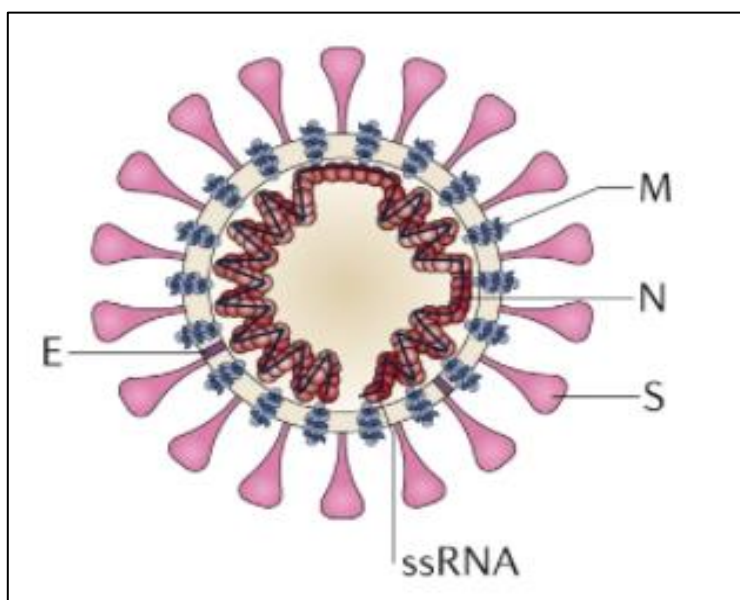


Figura 1: Partícula viral de CoV, adaptado de CUI e colaboradores, (2019). Apresenta glicoproteínas de membrana (S), envelope (E), membrana (M), nucleocapsídeo (N) e genoma de RNA de fita simples de sentido positivo (ssRNA).

Os genomas carregam um número variável de conjuntos de estruturas de leitura aberta (ORF) responsáveis pela codificação das proteínas não estruturais e de estruturas funcionais, embora a quantidade e a localização de ORFs

acessórias presentes variem, os CoV compartilham várias proteínas não estruturais como a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), a protease principal do coronavírus (3CLpro) e a protease semelhante à papaína (PLpro), codificadas pelo genoma viral. Além disso, possuem sequência líder 5' comum e uma sequência terminal 3' junto com mRNAs subgenômicos. Uma diferença importante está na entrada do CoV nas células do hospedeiro, onde ocorre uma ligação específica da proteína *spike* (S) aos receptores de entrada celular, tais como a aminopeptidase N humana (APN), a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e dipeptidil peptidase 4 (DPP4). A expressão e a distribuição tecidual dos receptores de entrada influenciam consequentemente o tropismo e a patogenicidade viral (CUI; LI; SHI, 2019; KAUR et al., 2021; V'KOVSKI et al., 2021; YADAV et al., 2021).

O tamanho do seu genoma relativamente grande para vírus, além da quantidade de proteínas não estruturais e funcionais, podem estar relacionados a sua capacidade de mutações, fatores esses que facilitam o aumento da diversidade de cepas e genótipos de cada espécie (WOO et al., 2009). Inicialmente acreditava-se que sua capacidade de infecção era limitada ao seu hospedeiro natural, posteriormente foi observado que algumas espécies sofreram mutações com adaptação a diferentes nichos ecológicos e a diferentes hospedeiros, levando ao aumento de possibilidades de surtos não só entre os animais, mas surtos zoonóticos (MALIK, 2020; WOO et al., 2009).

2.2.2. Patogênese

Os vírus do tipo CoV causam uma grande variedade de doenças tanto em humanos quanto em animais, possuindo maior tropismo por células epiteliais dos sistemas respiratório e entérico. Por este motivo grande parte das manifestações clínicas estão associadas a problemas respiratórios e gastrointestinais. No entanto também podem afetar outros sistemas importantes como o hepático e nervoso central (CHEN; LIU; GUO, 2020; LEE, 2015; MALIK, 2020).

Os surtos de CoV em animais afetam principalmente a indústria agropecuária, gerando grandes perdas e prejuízos econômicos. A diarreia epidêmica suína (PED) é um exemplo, uma vez que foi responsável por grandes

prejuízos econômicos. Teve seu primeiro surto na Europa no ano de 1970, posteriormente em 2013 afetando os Estados Unidos, Canadá e México, posteriormente tornando-se global (LEE, 2015). Mais recente o surto de coronavírus da síndrome da diarreia aguda suína (SADS-CoV), uma mutação de um CoV originário de morcegos, que surgiu na China foi considerada uma das doenças virais mais devastadoras de suínos (ZHOU et al., 2018). Em aves também ocasionam doenças importantes como a bronquite infecciosa aviária, uma doença com altas taxas de perdas dos animais que afeta economicamente os produtores de aves em todo o mundo (TIZARD, 2020). Em bovinos, um β -CoV é responsável por causar infecções respiratórias e gastrointestinais, afetando principalmente os bezerros recém nascidos, sendo na maioria das vezes letal (SZCZEPANSKI et al., 2019; TIZARD, 2020).

Os CoVs também são responsáveis por causarem infecções em animais domésticos como cães e gatos. Em cães, um α -COV é responsável por causar infecções entéricas e um β -COV, causador de infecções respiratórias leve a autolimitada. Já os CoV felinos, são muito contagiosos e endêmicos, sendo dois sorotipos mais responsáveis por afetá-los. Estes infectam principalmente os enterócitos e, de acordo com o sorotipo pode causar uma diarreia leve e transitória ou uma grave peritonite (TIZARD, 2020).

Em humanos os CoV representam um grupo importante de vírus com diferentes graus de patogenicidade e uma alta taxa de evolução, sendo os animais, representantes importantes no seu ciclo evolutivo. Os animais podem servir de vetores, hospedeiros intermediários e até mesmo reservatórios virais de CoVs e, desta forma, podem facilitar ou permitir a transmissão de vírus de diferentes hospedeiros naturais para os humanos (CUI; LI; SHI, 2019).

O período de incubação e de apresentação dos sintomas pode variar aproximadamente de 2 a 11 dias. Dentre os HCoV identificados até o momento, 4 são os responsáveis por um terço dos resfriados comuns de inverno, sendo eles: HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43 e o HKU1 os quais apresentam infecções respiratórias do trato respiratório superior de grau leve. Os principais sintomas são: congestão nasal, rinorreia, febre leve e dor de cabeça. Em casos raros, ocasionam infecção no trato respiratório inferior que podem desencadear pneumonias, bronquites e/ou infecção grave.

Os outros 3 tipos de HCoV: SARS-COV, MERS-COV e SARS-COV-2, estão associados a graves epidemias e, por este motivo, serão discutidos de forma mais detalhada (HALAJI et al., 2020; UPPALAPATI et al., 2022).

2.2.3. SARS E MERS

SARS-COV é um β -CoV, provavelmente originário de morcegos e tendo como hospedeiro intermediário as civetas e os cães-guaxinins, que foram responsáveis por transmitirem inicialmente o vírus aos humanos. Surgiu pela primeira vez em 2002 em Guangdong na China, foi responsável pela primeira epidemia em humanos causada por CoV. Inicialmente se propagou através do contato humano com os vetores, posteriormente através da transmissão entre humanos (HALAJI et al., 2020).

Os indivíduos infectados geralmente apresentam sintomas como febre, tosse, dor de cabeça e dor de garganta, desconforto torácico e dificuldade respiratória, porém em casos mais graves desenvolvem a síndrome respiratória aguda grave, que apresenta alto índices de letalidade (CHEN; LIU; GUO, 2020; CUI; LI; SHI, 2019).

Sua disseminação atingiu diversos países até a metade do ano de 2003, infectando cerca de 8000 mil pessoas e ocasionou cerca de 800 mortes (HALAJI et al., 2020; UPPALAPATI et al., 2022). Após a descoberta do vetor inicial de transmissão, foram abatidas cerca de 10 mil civetas para tentar conter a propagação do vírus, visto que estes animais eram presentes em grandes mercados de alimentos da China. Depois disso os relatos de infecções causadas por SARS-CoV, foram esporádicos no ano de 2004 (GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013; UPPALAPATI et al., 2022).

O MERS-COV também é um β -CoV e seu nome foi atribuído por síndrome respiratória do oriente médio. Surgiu pela primeira vez em setembro de 2012 na Arábia Saudita, causando pneumonia atípica grave, síndrome respiratória aguda grave, insuficiência renal e muitas vezes letal. Causou um número menor de infecções que o SARS-CoV cerca de 2500 casos, sendo a maioria relatada em países do Oriente Médio e alguns distribuídos pela Ásia, África e Europa. No

entanto, apresentou um índice de letalidade de aproximadamente 34% maior nos casos identificados (HALAJI et al., 2020; HELMY et al., 2020).

Semelhante ao SARS, o MERS também é um CoV provavelmente originário de morcegos, mas desta vez o hospedeiro identificado como intermediário, responsável pela transmissão para humanos foram os dromedários, a transmissão entre humanos de MERS é muito baixa, mas desde o seu surgimento ao longo dos anos há relatos de novos casos e mortes sendo na maioria das vezes relacionados ainda a uma transmissão direta de dromedários (GRAHAM; DONALDSON; BARIC, 2013; UPPALAPATI et al., 2022).

2.2.4. SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 surgiu em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan da China, causando vários casos de pneumonia até então com origem desconhecida, mas foi posteriormente identificado como sendo um novo CoV o agente causador dessas infecções (HALAJI et al., 2020; SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021; UPPALAPATI et al., 2022). Este novo CoV, com alta capacidade de transmissão, responsável por graves infecções do sistema respiratório, se espalhou rapidamente de forma mundial, sendo determinado em março de 2020, pela OMS como pandemia COVID-19 causada por SARS-CoV-2, a primeira pandemia causada por um CoV (ALMUBAID; AL-MUBAID, 2021; SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021).

O SARS-CoV-2 demonstra o sério potencial dos CoV para se adaptar e melhorar sua capacidade de transmissão de humano para humano (ALMUBAID; AL-MUBAID, 2021; UPPALAPATI et al., 2022). O evento de transmissão inicial se assemelha aos anteriores relatados, sendo possível se tratar de outra zoonose, porém ainda sem a identificação de hospedeiros intermediários ou de como ocorreu a primeira transmissão aos humanos (HALAJI et al., 2020; HOLMES et al., 2021).

Ele é um β -CoV linhagem B, compartilha em torno de 76% - 79% de identidade de sequência do genoma com SARS-CoV, em torno de 50% com MERS-CoV e em torno de 97% de semelhança com o CoV RaTG13 do morcego. O seu rápido sequenciamento, assim como o grande volume de sequenciamento

que vem sendo realizado durante a pandemia contribui para identificação de mutações (HU et al., 2021; KADAM et al., 2021).

Ele apresenta as proteínas estruturais comuns dos CoVs, sendo as glicoproteínas *spike* (S), responsáveis pela sua entrada nas células do hospedeiro através da ligação ao receptor-alvo. Possui mais afinidade que outros CoV pelo receptor da enzima conversora angiotensina 2 (ECA2). Este receptor é expresso em vários tipos de tecidos, como intestino delgado, coração e pulmão. Ainda a expressão deste receptor é maior nas células alveolares do tipo II, no epitélio brônquico superior e no epitélio nasal, sendo estes os alvos primários para a replicação do SARS-CoV-2 (HU et al., 2021; SOY et al., 2020).

Sua replicação celular desencadeia respostas imunes inatas e adaptativas, além disso, o processo de saída das partículas virais do meio intracelular pode ocasionar a destruição da célula do hospedeiro, aumentando a resposta inflamatória no local. Em casos mais graves quando há uma alta carga viral, devido a intensa resposta inflamatória imunológica, desencadeia uma tempestade de citocinas, ocasionando graves danos nos pulmões e afetando outros órgãos (BAHUN et al., 2022; V'KOVSKI et al., 2021).

Esse processo começa na replicação desencadeando mecanismos como a piroptose e a liberação de DNA, ATP, IL-1 β e outros fatores. Estes fatores são reconhecidos por células vizinhas e macrófagos alveolares, os quais vão promover a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, IL-8, TNF- α , fazendo com que ocorra atração de células de defesas e aumentando ainda mais a liberação destes fatores. Esses sinais atraem as células T e mais células imunes que, em uma resposta imune defeituosa, aumentam ainda mais a resposta inflamatória descontrolada, provocando extensos danos ao tecido pulmonar, como consequência levando ao desenvolvimento da síndrome do desconforto respiratório agudo e insuficiência respiratória grave, que é uma das principais causas de mortes (BAKHJET; TAURIN, 2021; HU et al., 2021; ZHANG; WANG; CHENG, 2022).

O entendimento da biologia e patologia dos membros da família do CoV proporciona melhores resultados no desenvolvimento de terapias contra o SARS-CoV-2, identificando melhor seus principais alvos de ação, sítios de

atividade viral, proteínas funcionais e ciclo de replicação viral (ZHANG; WANG; CHENG, 2022). Diante disso, alguns compostos naturais foram identificados através de triagens de literatura por possuírem potencial antiviral para o desenvolvimento de terapias, visando uma maior efetividade contra o SARS-COV-2.

2.3. Compostos de origem natural

Os produtos naturais fornecem oportunidades como fontes de medicamentos devido à disponibilidade de uma diversidade de constituintes químicos, seja na utilização dos compostos puros ou de seus extratos vegetais. As plantas medicinais são utilizadas desde a antiguidade no tratamento de muitas doenças, o conhecimento histórico sobre as suas utilizações tem despertado o crescente interesse científico na identificação de seus compostos ativos e sua utilização no desenvolvimento de novos tratamentos para diversas doenças (ANAND et al., 2022; DHOUIBI et al., 2020).

A curcumina (CUR) é o principal composto polifenólico lipofílico extraído de *Curcuma longa*, planta herbácea perene rizomatosa popularmente conhecida como açafrão (HEWLINGS; KALMAN, 2017; PRIYADARSINI, 2014). Vem sendo utilizada há muitos anos no continente asiático por suas propriedades medicinais e na rotina diária de mulheres devido as suas atividades antienvhecimento (GANESAN; CHOI, 2016). Além disso, utilizada no mundo todo como uma especiaria culinária e, por ser um corante natural também, é utilizada nas indústrias alimentar, cosmética e têxtil (HEWLINGS; KALMAN, 2017; KIM; CLIFTON, 2018; KOTHA; LUTHRIA, 2019; PRIYADARSINI, 2014).

Ao longo dos anos tem recebido grande interesse na comunidade científica para elucidar melhor suas qualidades e seus potenciais benefícios para a saúde humana com estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos (HEWLINGS; KALMAN, 2017). Seu potencial terapêutico vem sendo descrito como atividade antioxidante (SAMARGHANDIAN et al., 2017), antifúngica (PRAJAPATI et al., 2021), anti-inflamatória (DE ALMEIDA et al., 2018), antibacteriana (GUNES et al., 2016; IZUI et al., 2016), antiviral (YANG; LI; HUANG, 2016).

As suplementações de CUR podem atuar em diferentes alvos moleculares com capacidade de modular a produção de citocinas induzidas por algumas doenças ou patógenos, destacando seu potencial anti-inflamatório e antioxidante (PANAHI et al., 2016; ZAHEDIPOUR et al., 2020). Além disso, a sua ação antiviral está associada ao seu potencial de interferir em diferentes etapas do processo patogênico viral, como inibir a entrada do vírus nas células, inibir a encapsulação do vírus e a protease viral, inibir a replicação do vírus, além de modular diversas vias de sinalização (MRITYUNJAYA et al., 2020).

Outro composto natural com grande importância para área medicinal é a quercetina (QUE), um flavonoide, encontrado em vários vegetais, grãos e frutas como chá verde, maçãs, frutas vermelhas, vinho tinto, cebola e que apresenta inúmeros benefícios à saúde como: ação anticancerígena (HASHEMZAEI et al., 2017), anti-inflamatória (HOU et al., 2019), antioxidante (KOTTAKIS et al., 2022), antimicrobiana (WANG et al., 2018), antiviral (KIM; KIM; SONG, 2020).

A QUE pertence à subfamília dos flavonóis, é o flavonoide mais abundante na natureza. É uma aglicona, mas nas diferentes plantas encontradas pode estar conjugada com açúcares, formando seus derivados. QUE glicosilada pode apresentar algumas diferenças da QUE aglicona, como por exemplo o aumento da solubilidade aquosa e melhora da biodisponibilidade. Deste modo os estudos podem avaliar as propriedades individuais de QUE e seus glicosídeos, bem como também podem avaliar a atividade sinérgica (LEE et al., 2016; MANJUNATH; THIMMULAPPA, 2021). No entanto, o termo QUE deve ser utilizado para descrever apenas sua forma aglicona (LI et al., 2016).

A ingestão de QUE na forma de suplemento alimentar, assim como de outros produtos naturais pode fornecer nutrientes que auxiliam na profilaxia de algumas doenças. Uma ingestão diária de 500 mg de QUE por exemplo, é relatada como capaz de promover efeito benéfico na redução da pressão arterial (DABEEK; MARRA, 2019; ZAHEDI et al., 2013). Além disso, seus efeitos têm sido investigados para diminuir a susceptibilidade a infecções virais através do aumento da resposta imunológica (DAVIS et al., 2008; DI PETRILLO et al., 2022).

Os estudos também demonstram o papel importante de QUE em vias de sinalização inflamatória, como a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, diminuição de interleucinas, diminuição na expressão do fator de necrose tumoral alfa (KIM; KIM; SONG, 2020; LIN; PIAO; SONG, 2019). Além disso, podem diminuir as espécies reativas de oxigênio induzido por lipopolissacarídeos (SUL; RA, 2021; TANG et al., 2019), inibir a translocação nuclear do NF- κ B (SUL; RA, 2021), além de bloquear a ativação de MAPK e de vias de sinalização do NF- κ B. Podendo deste modo ser uma molécula potencial capaz de auxiliar no controle da resposta inflamatória exagerada gerada por SARS-COV-2, onde ocorre a liberação de vários destes fatores (CHENG et al., 2019).

No entanto, embora estes compostos apresentem uma ampla gama de benefícios terapêuticos ou protetivos na sua utilização, possuem algumas limitações que acabam dificultando o seu uso, como a baixa solubilidade em meio aquoso (KOTHA; LUTHRIA, 2019; KOTTAKIS et al., 2022), baixa absorção gastrointestinal e metabolismo hepático elevado (KOTHA; LUTHRIA, 2019; KOTTAKIS et al., 2022; TAGDE et al., 2021). Além disso, a CUR apresenta fotossensibilidade (ZHENG; MCCLEMENTS, 2020) e a QUE apresenta instabilidade química em condições fisiológicas (JURASEKOVA et al., 2014; MANDIĆ et al., 2019).

Diante do exposto alguns estudos sugerem diferentes melhorias para a sua utilização, como a administração conjunta com outros compostos naturais que podem melhorar a sua absorção, como por exemplo a piperina principal constituinte ativo da pimenta-do-reino (ROSHDY et al., 2020; SHARMA; AHMAD FAROUK; LAL, 2021) ou através do desenvolvimento de formulações nanotecnológicas que possam aumentar sua solubilidade aquosa, proteger da degradação e da exposição ao meio externo (MANDIĆ et al., 2019; SHI et al., 2019).

2.4. Via intranasal

O nariz é uma estrutura complexa, subdivido em parte externa e interna, é o principal órgão responsável pelo sentido do olfato, é também a principal via de acesso do sistema respiratório. Sendo essas funções localizadas na parte interna, denominada cavidade nasal (MUKHTYAR; MILLS; SCOTT, 2020; PATEL, 2017).

A cavidade nasal, dividida por um septo cartilaginoso na linha mediana, apresenta projeções nas laterais internas que aumentam a área superficial de contato com o meio externo e é recoberta quase em sua totalidade por epitélio respiratório nasal. É responsável por filtrar, aquecer e umidificar o ar inalado, representando a primeira linha de defesa das vias aéreas respiratórias (BITTER; SUTER-ZIMMERMANN; SURBER, 2011; PATEL, 2017).

É subdivida em três regiões principais, conforme observa-se na figura 2, sendo elas: (1) região vestibular, localizada na abertura da cavidade nasal, pequena área superficial composta por tecido epitelial escamoso e queratinizado estratificado, responsável principalmente pela filtração do ar através do pelos; (2) região olfatória, localizada na parte superior da cavidade nasal com tamanho aproximado de 15 cm², muito vascularizada, onde ficam os neurônios sensoriais olfativos, sendo este o único local no corpo que o sistema nervoso central entra em contato direto com a superfície externa do corpo, através da mucosa nasal; e a (3) região respiratória, maior superfície de contato medindo cerca de 130 cm², onde estão localizados os cornetos, as microvilosidades e as células multiciliadas. Recoberta por epitélio colunar pseudoestratificado, conhecido como epitélio respiratório nasal, ou ainda mucosa nasal. Essa região é altamente vascularizada e conta com uma camada de muco, produzida por células especializadas, servindo como um eficiente sistema de proteção (BITTER; SUTER-ZIMMERMANN; SURBER, 2011; CHUNG et al., 2023; KAKAD et al., 2022; ZHANG et al., 2016).

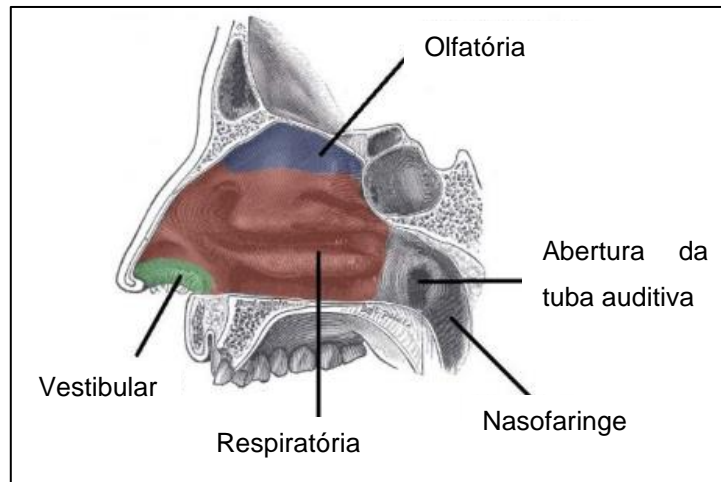


Figura 2: Corte sagital da cavidade nasal, adaptado de “The Nasal Cavity - Structure - Vasculature - Innervation - TeachMeAnatomy”, [s.d.]. Apresentando as principais regiões da cavidade nasal, área vestibular, olfatória e respiratória

Devido à grande vascularização e suas importantes características, a via intranasal tem sido muito estudada como alvo de entrega para terapias. A região olfatória destaca-se para entrega de terapias que visam a rota nariz ao cérebro pela localização dos neurônios olfativos. E a região respiratória é o alvo de entrega de diferentes terapias locais e sistêmicas, incluindo a entrega de vacinas. No entanto, desenvolver estratégias que protejam contra patógenos na superfície da mucosa, é uma abordagem promissora para fornecer proteção contra doenças infecciosas (AZEGAMI et al., 2018; GRASSIN-DELYLE et al., 2012).

Uma das principais dificuldades encontradas no desenvolvimento de terapias para administração intranasal é a constante atividade de depuração mucociliar, principal mecanismo de defesa da cavidade nasal. As substâncias inaladas do exterior através da respiração são aprisionadas no muco e, a atividade das células multiciliadas fazem o direcionamento do muco para a nasofaringe, fazendo com que escoem pelo trato digestivo, limpando a cavidade nasal e eliminando partículas estranhas (GRASSIN-DELYLE et al., 2012; LOBAINA MATO, 2019).

No entanto, algumas partículas virais conseguem superar essa barreira e se ligar a receptores específicos presentes no epitélio respiratório nasal, conseguindo desta forma, realizar as etapas posteriores e ter sua replicação intracelular bem sucedida (BENAM; DENNEY; HO, 2019; INVERNIZZI; LLOYD;

MOLYNEAUX, 2020). Nesse contexto, a formulação intranasal ideal deve apresentar características específicas que superem a barreira de proteção natural, permanecendo no local de ação para que forneçam proteção auxiliar contra partículas virais, além de não causar danos, nem irritação nessa mucosa.

2.5. Nanotecnologia farmacêutica

O termo “nanômetro” foi proposto pela primeira vez por Richard Zsigmondy, ganhador do Prêmio Nobel de Química em 1925. Foi o primeiro a medir o tamanho das partículas como colóides de ouro usando um microscópio e utilizou o termo para descrever o tamanho de partícula observado. Posteriormente Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel de Física em 1965, introduziu o conceito de manipulação da matéria em nível atômico. Em uma palestra na reunião anual de 1959 da American Physical Society no California Institute of Technology intitulada, “Há muito espaço no fundo, um convite para entrar em um novo campo da física” (ASIYANBOLA; SOBOYEJO, 2008; HULLA; SAHU; HAYES, 2015).

Nesta palestra surgiu então a primeira visão da nanotecnologia, e a partir da década de 1980, o interesse por manipular e visualizar a matéria em escala nanométrica vem crescendo rapidamente e se difundindo entre as diferentes áreas científicas de pesquisa (CONTERA; BERNARDINO DE LA SERNA; TETLEY, 2020; HULLA; SAHU; HAYES, 2015) .

Hoje, amplamente definida, a nanotecnologia é a ciência multidisciplinar que estuda os materiais em escala nanométrica, com o objetivo de criar, controlar e fabricar novos materiais, devido às características proporcionadas ao tamanho reduzido. A mudança de tamanho da matéria para nanoescala, proporciona alterações químicas e físicas que abrem uma infinidade de oportunidades em diversas áreas (BHUSHAN, 2010; CONTERA; BERNARDINO DE LA SERNA; TETLEY, 2020).

A nanotecnologia normalmente é associada a materiais que estejam com tamanho em torno de 1 nm e 100 nm, porém, o principal requisito é que o material possua até duas dimensões na nanoescala. Em nanotecnologia farmacêutica uma de suas principais aplicações é o desenvolvimento de nanocarreadores, os

quais possuem até 1000 nm de tamanho e podem transportar diferentes substâncias ativas (BAYDA et al., 2019; CONTERA; BERNARDINO DE LA SERNA; TETLEY, 2020; PATRA et al., 2018).

Nanocarreadores são definidos como uma dispersão coloidal, capaz de melhorar o potencial de partículas alterando sua estabilidade, solubilidade e promover o direcionamento a tecidos específicos (KOU et al., 2018; MITCHELL et al., 2021). Para o seu desenvolvimento utiliza-se diferentes materiais como lipídeos, fosfolipídios, polímeros sintéticos ou naturais, polissacarídeos, proteínas e peptídeos (KOU et al., 2018; MITCHELL et al., 2021; PATRA et al., 2018).

O tipo de nanocarreador, assim como os materiais utilizados no seu desenvolvimento, devem ser escolhidos de acordo com as propriedades físicas e químicas desejadas do ativo encapsulado e do local de entrega. Dentre os mais estudados estão as micelas poliméricas, os lipossomas, as microemulsões, as nanopartículas poliméricas, as nanopartículas lipídicas sólidas e líquidas e as nanoemulsões (BATISTA et al., 2018; PATRA et al., 2018).

Podem ser utilizados por diferentes vias de administração, sendo a via de administração um fator importante que dita a farmacocinética, biodistribuição, assim como a utilização e a adesão de terapias farmacológicas, o desenvolvimento de nanocarreadores trouxe transformações significativas nessa área. Eles proporcionam melhorias na eficácia de terapias já existentes, sugerindo novas alternativas terapêuticas, assim como diminuindo reações adversas, aumentando a qualidade de vida e com isso proporcionando o aumento a adesão aos tratamentos (CHENTHAMARA et al., 2019; JAIN; THAREJA, 2019).

O uso de nanocarreadores a base de lipídicos ganha destaque na área farmacológica em razão de sua biocompatibilidade, pois podem utilizar diferentes lipídeos como por exemplo moléculas lipídicas de colesterol e fosfatidilcolina. Sua classificação é realizada de acordo com o lipídio utilizado no seu desenvolvimento, o que pode proporcionar diferenças na concentração e liberação da substância ativa encapsulada (CHENTHAMARA et al., 2019).

Dentre os nanocarreadores lipídicos encontram-se os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, os carreadores lipídicos nanoestruturados e as nanoemulsões. Os lipossomas são vesículas esféricas, compostos por uma ou mais bicamada fosfolipídica que envolvem o núcleo aquoso, podem transportar tanto partículas hidrofóbicas quanto hidrofílicas, mas podem apresentar uma formulação com distribuição heterogênea de tamanhos e baixa reprodutibilidade (TANAKA et al., 2020; ZHAO et al., 2015).

As nanopartículas lipídicas sólidas são carreadores constituídos de lipídeos sólidos a temperatura ambiente. Uma de suas principais vantagens está no seu sistema altamente organizado que levam a um controle da liberação do ativo, mas devido a utilização do lipídeo sólido podem apresentar uma capacidade limitada de carregamento da substância ativa e expulsão dos fármacos incorporados durante o armazenamento (FANG et al., 2008; JORES et al., 2004).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados, por sua vez, contêm em sua composição uma mistura de lipídeos sólidos e líquidos a temperatura ambiente. Possuem algumas vantagens em relação as nanopartículas lipídicas sólidas, como uma maior eficiência de incorporação e aumento da estabilidade (WEBER; ZIMMER; PARDEIKE, 2014).

As nanoemulsões (NEs) são dispersões cineticamente estáveis que podem ser do tipo óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O), estabilizadas por uma camada de tensoativos. As NEs são os sistemas que permitem maior taxa de incorporação do ativo e, embora seja a que possibilite menor controle de liberação, neste carreador se consegue a adição de um alto teor de componentes oleosos, além da facilidade de preparo em grande escala através de métodos de alta energia, como a homogeneização a alta pressão (HAP) (TAYEB et al., 2021; VAZ et al., 2020).

No desenvolvimento das NEs são utilizados lipídeos líquidos, agentes tensoativos e surfactantes, os quais reduzem a tensão superficial facilitando a homogeneização da formulação, prevenindo a separação de fases e assim garantindo um sistema estável. A escolha correta destes agentes, bem como o processo de desenvolvimento escolhido são etapas fundamentais que irão determinar as características da nanoemulsão, visto que quaisquer alterações

nas propriedades físico-químicas proporcionam impactos nas propriedades farmacológicas (DOMINGOS et al., 2009; TAYEB et al., 2021).

As NEs do tipo óleo em água (O/A) são sistemas que requerem energia para seu desenvolvimento, dentre os métodos com alta energia mais utilizados, temos o ultrassom e a homogeneização a alta pressão (HAP), estes equipamentos mecânicos, geram forças disruptivas para dividir a fase dispersa em partículas menores. No HAP as misturas de NE passam por uma câmara de válvula sob alta pressão produzindo energia de cisalhamento que fragmenta o núcleo de óleo em gotículas em nanoescala. O tempo, a pressão utilizada, assim como a composição da formulação prévia afetam o tamanho da partícula resultante da homogeneização (TAGDE et al., 2021; TAYEB et al., 2021).

As técnicas de baixa energia, exploram mais o uso de tensoativos como estabilizantes, nestes métodos são utilizadas mudanças de temperatura para induzir a emulsificação espontânea ou solventes que auxiliam na diminuição do tamanho das partículas. Os métodos de baixa energia mais comumente usados são, temperatura de inversão de fase, inversão de fase da emulsão, emulsificação espontânea e difusão de solvente a quente ou a frio, na qual nesta última a NE é produzida pela taxa de difusão muito rápida do solvente orgânico miscível em água na fase aquosa, resultando na formação espontânea de gotículas nanométricas (DORA et al., 2012; NIKOLIC et al., 2018; TAGDE et al., 2021).

Na etapa posterior os métodos de caracterização das NEs fornecem uma melhor compreensão do comportamento e possíveis interações em aplicações. Dentre os métodos de caracterização destacam-se (i) espalhamento de luz dinâmico (DLS), é o método de caracterização mais comum de NEs, o qual tem por objetivo indicar o tamanho das gotículas e o índice de polidispersão (Pdl) das partículas; (ii) o Potencial Zeta, utilizado para determinar às cargas presentes na superfície dos nanocarreadores e serve um indicativo da estabilidade destes sistemas; (iii) o pH, utilizado para verificar a existência de alteração de pH em soluções; (iv) a avaliação morfológica, realizada em microscopia a qual oferece um exame de maior resolução da estrutura, morfologia e tamanho dos nanocarreadores, sendo a microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizada para visualizar estruturas menores de 1000 nm; (v) avaliação do teor e eficiência

de encapsulação, para verificar a quantidade de fármaco total (teor) e incorporado na fase oleosa (eficiência de encapsulação) e (vi) avaliação do tempo de liberação do fármaco a partir dos nanocarreadores, que verifica o tempo necessário para liberação do ativo a partir dos nanocarreadores.

Ainda existem outras caracterizações que podem ser realizadas visando obter mais dados sobre os nanocarreadores, como medidas de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Varredura diferencial de calorimetria (DSC), Difração de raios-X e avaliação da atividade biológica e toxicológica dos nanocarreadores desenvolvidos (CHENTHAMARA et al., 2019; TAYEB et al., 2021).

A estrutura e composição química biocompatível das NEs proporcionam melhorias no campo de entrega de medicamentos, como o desenvolvimento de vacinas e novas opções terapêuticas, as quais podem ser administrados pelas vias parenterais, oral, nasal e pulmonar. Em especial as NEs, são carreadores capazes de superar a barreira do trato gastrointestinal, proteger o ativo da formulação contra a degradação enzimática e ainda liberar de maneira prolongada (CHENTHAMARA et al., 2019; TAYEB et al., 2021).

Em relação a administração pela via nasal, as NEs são capazes de realizar entrega local, agindo a nível de seios da face, narinas e garganta ou sistêmica através da absorção pela mucosa. Estudos também tem demonstrado que são uma ótima opção para entrega de medicamentos que atuam no cérebro, visto que por essa via evitam a barreira hematoencefálica e também não sofrem metabolismo de primeira passagem (TAYEB et al., 2021; VAZ et al., 2020; WONG et al., 2014).

Acrescenta-se também que as NEs podem ser entregues diretamente ao pulmão, utilizando métodos de nebulização. Na administração pulmonar é possível a proteção dos bronquíolos alveolares com uma liberação gradual sustentada (TAYEB et al., 2021).

2.5.1. Nanocarreadores contendo curcumina e quercetina

Os estudos tem demonstrado que uma das maneiras de proteger os compostos naturais contra degradação química, aumentar a solubilidade,

umentar a biodisponibilidade e ainda direcionar a órgãos e alvos específicos é a sua encapsulação em nanocarreadores (MOON et al., 2021; SHI et al., 2019). Deste modo diferentes tipos de nanocarreadores podem ser utilizados para melhorar as propriedades químicas, físicas e terapêuticas de CUR e QUE como demonstram alguns estudos abaixo.

O estudo de DE ALMEIDA e colaboradores (2018), avaliaram a capacidade anti-inflamatória de nanopartículas poliméricas carregadas com CUR e realizaram a comparação com a CUR livre *in vivo* em ratos machos no experimento de edema de pata induzido por carragenina. As nanopartículas poliméricas foram desenvolvidas pelo método de dispersão sólida contendo 300 mg de polivinilpirrolidona (PVP) solubilizado em 75 ml de água e 50 mg de CUR foi solubilizada em etanol, após a mistura das duas fases sob agitação o etanol foi completamente removido por reevaporação e a dispersão foi congelada e liofilizada, esse método resultou na proporção de massa entre PVP e CUR de 6:1 (m:m) e nanopartículas com tamanho médio de 10 nm. O tratamento dos animais foi realizado 1 h antes da indução da resposta inflamatória em grupos. Tratamento com solução de CUR, tratamento com nanopartículas de PVP-CUR e tratamento com indometacina como medicamento anti-inflamatório de referência. Como resultado observaram que o tratamento com a dose mais alta de CUR em solução 400 mg/kg e as doses de 25 e 50 mg/kg de nanopartículas de PVP-CUR reduziram o edema induzido de forma semelhante ao tratamento controle com indometacina 5 mg/kg. Com esses dados foi possível demonstrar uma maior eficácia das nanopartículas PVP-CUR em comparação com a CUR livre, na qual foi necessária uma dose 16 vezes maior para obter o mesmo efeito inibitório sobre a resposta inflamatória.

KUMAR e colaboradores (2016), desenvolveram nanoemulsões lipídicas carregadas com CUR para avaliar sua biodisponibilidade através do transporte linfático, permeabilidade intestinal, estabilidade da formulação e citotoxicidade em células de glioma maligno. A NE selecionada para os estudos posteriores foi desenvolvida pelo método de emulsificação espontânea, com a adição de 10 mg/ml de CUR, Labrafac® lipophile como veículo oleoso, solutol HS 15 e transcutool HP respectivamente. O tamanho médio observado foi de 67 ± 6 nm e o potencial zeta $-37 \pm 2,5$ mV. A NE-CUR desenvolvida apresentou boa

estabilidade em pH 6,8 e uma liberação uniforme de CUR nos mesmos ensaios realizados comparada com a CUR em solução. Além disso nos estudos *in vitro* e *ex vivo*, foi avaliada a capacidade de permeação em intestino delgado de rato, a NE-CUR apresentou capacidade de liberação e permeação de $85,8 \pm 2,95\%$ após 3h e $100,3 \pm 4,89\%$ após 12h. Enquanto CUR em solução apresentou apenas $28,2 \pm 1,73\%$ de liberação e permeação ao final das 12 h. Os experimentos de citotoxicidade foram realizados comparativamente, células tratadas com quantidades equivalentes de DMSO ou placebo NE (sem CUR) foram usados como controles para CUR em solução e NE-CUR, respectivamente. A viabilidade celular foi maior a partir da concentração de 10 mM para a NE-CUR. Esse estudo demonstrou a superioridade que a formulação NE-CUR obteve nos ensaios quando comparado com solução de CUR, indicando que NE lipídicas podem ser uma alternativa com capacidade de melhorar a biodisponibilidade e a estabilidade de CUR.

No estudo de ABDEL FADEEL e KAMEL; FADEL, (2020), foram desenvolvidos nanocarreadores lipídicos (NL) de CUR contendo polietilenoglicol (PEG) na superfície para direcionar e potencializar o tratamento fotodinâmico de câncer de pele. CUR (10 mg/G) e Tefose® 1500, composto por uma mistura de PEG-6 estearato e PEG-32 estearato, foram adicionados na fase oleosa. Os NLs PEGlados foram obtidos através do método de ultrassonicação com sonda a 20 W por 90 s. O NL-CUR-PEG de escolha para os próximos estudos apresentou tamanho médio de $167,60 \text{ nm} \pm 15,12$ e uma eficiência de encapsulação de $40,01\% \pm 2,10$ com liberação de CUR de $75,02\% \pm 4,61$ após 24h e $98,25\% \pm 6,89$ após 48h. A avaliação de citotoxicidade celular *in vitro* em células cancerígenas, foi realizada utilizando uma linha celular de carcinoma espinocelular humano (A431). O experimento foi realizado com a exposição das células a diferentes concentrações de CUR em suspensão ou no NL-CUR-PEG, além da exposição ou não exposição a irradiação UV por 2 min. Finalmente, a toxicidade sem irradiação e a fototoxicidade foram avaliadas pelo ensaio MTT (grupo controle sem formulação foi realizado). Os resultados demonstraram que a citotoxicidade de CUR foi dependente da concentração. No entanto os NL-CUR-PEG foram mais eficazes em comparação com a suspensão de CUR em todas as concentrações estudadas com irradiação ou sem irradiação. E ainda

nas células tratadas com NL-CUR-PEG expostas a irradiação o resultado foi significativamente melhor.

O estudo de TERNULLO e colaboradores (2019), também teve como objetivo o direcionamento melhorado de CUR. Neste estudo desenvolveram lipossomas com tamanho médio entre 200 e 300 nm com diferentes cargas de superfície (aniônica, neutra e catiônica) para o tratamento de doenças de pele. No estudo de permeação cutânea *in vitro* foi utilizado pele humana saudável doada após procedimento cirúrgicos. O estudo apresentou que a permeação de CUR dos lipossomas foi relativamente baixa, mas que mesmo assim conseguiu se difundir entre as camadas da pele e ser quantificada. Esse estudo demonstrou que todos os lipossomas foram capazes de promover uma liberação constante de CUR no local da pele, limitando a absorção sistêmica. A atividade antibacteriana dos lipossomas também foi avaliada frente as bactérias *S. aureus* e *S. pyogenes*. Os lipossomas com carga positiva em sua superfície apresentaram melhor resultado e inibiram o crescimento bacteriano em maior extensão do que a CUR livre (CUR em solução de polietilenoglicol). Este estudo indica que a carga de superfície positiva dos lipossomas facilitou suas interações com a célula bacteriana carregada com membrana negativa aumentando assim a atividade antibacteriana da CUR incorporada. Os lipossomas de CUR desenvolvidos no estudo apresentaram características promissoras que podem ser úteis no tratamento de várias doenças de pele cujas patologias envolvem principalmente infecção e inflamação.

Já o estudo de VAZ e colaboradores (2017), desenvolveram nanocarreadores lipídicos visando a direcionamento ao cérebro, através da rota nariz-cérebro para o tratamento de doenças neurológicas. Para isso desenvolveram nanoemulsões lipídicas com tamanho médio aproximado de 20 nm pelo método de difusão de solvente a quente associado a temperatura de inversão de fases. O estudo avaliou *ex vivo* a capacidade de permeação em mucosa nasal suína, comparativamente com CUR livre. A capacidade de permeação da CUR da NE-CUR em mucosa foi superior a capacidade da CUR livre, e ainda através de microscopia confocal a laser foi possível visualizar a distribuição de CUR permeada da NE-CUR na mucosa nasal, enquanto CUR livre ficou retida na superfície da mucosa. Esse demonstra novas possibilidades

de direcionamento de CUR através do pequeno tamanho de partícula obtido nas NEs.

Este mesmo grupo de pesquisadores, VAZ e colaboradores (2020), também desenvolveram nanoemulsões lipídicas carregadas com CUR e QUE, com o objetivo de potencializar os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes a nível cerebral. Neste estudo realizaram estudos físico-químicos de compatibilidade e identificação simultânea destes compostos. A NE foi obtida pelo método de homogeneização de alta pressão e apresentou tamanho médio de 110 nm, boa estabilidade física e química, demonstrando ser uma alternativa promissora para a entrega nariz-cérebro da combinação de CUR e QUE.

SADEGHI GHADI e colaboradores (2019), desenvolveram e caracterizaram diferentes nano-vesículas com hialuronato de sódio contendo CUR e QUE, com o objetivo de melhorar a co-entrega de produtos naturais hidrofóbicos, melhorando a entrega de CUR e QUE e sua eficácia farmacológica. O hialuronato de sódio foi adicionado à estrutura dos niossomas para melhorar suas propriedades físico-químicas. No estudo foi observado que o aumento da concentração de hialuronato de sódio nas formulações fez com o tamanho de partícula diminuísse e melhorasse o aprisionamento de CUR e QUE. Ao final deste estudo a formulação contendo hialuronato de sódio na concentração de (0,1 a 0,5 % P/V), 2% de CUR e 2,68% de QUE apresentou tamanho médio de 260.37 nm \pm 6.58 PDI 0.42 \pm 0.03 potencial zeta -34.97 mV \pm 1.50 e eficiência de encapsulamento de 98.85% \pm 0.55 para CUR e 93.13% \pm 1.22 para QUE.

Este grupo, SADEGHI-GHADI e colaboradores (2020), posteriormente avaliaram o potencial antifúngico de diferentes nano-vesículas contendo CUR e QUE para entrega tópica visando o aumento dos efeitos antifúngicos. O estudo também analisou as diferenças de capacidade de permeação *in vitro* em pele abdominal de ratos. Os grupos de estudo foram: CUR nano-vesículas (CUR-NV), QUE nano-vesículas (QUE-NV), nano-vesículas vazias (E-NV), CUR-QUE nano-vesículas (CUR-QUE-NV), nano-vesículas CUR-QUE sem hialuronato de sódio (CUR-QUE-NV-SH) e para o estudo de permeação CUR e QUE dissolvidas em etanol. A CUR e QUE diferiram na permeabilidade da pele. QUE permeou a pele e foi recuperada na fase receptora, enquanto nenhuma quantidade detectável de CUR foi recuperada para CUR-QUE-NV, CUR-QUE-NV-SH e CUR-NV. Tanto a

CUR quanto a QUE em NV demonstraram acúmulo nas camadas da pele. No entanto a permeação cutânea de CUR e QUE dissolvida em etanol foi maior que a dos fármacos encapsulados nas nano-vesículas. Essa permeação pode ter ocorrido pois o etanol pode ter danificado as estruturas da pele, extraído lipídios intercelular e aumentando a fluidez das bicamadas lipídicas da membrana. No estudo sobre a atividade antifúngica a formulação CUR-QUE-NV-SH apresentou potente ação antifúngica *in vitro* contra todos os isolados de *Cândida*. Em conclusão, os resultados indicaram que a CUR e a QUE co-encapsuladas em nano-vesículas sem hialuronato de sódio apresentaram atividade antifúngica *in vitro* e capacidade para aplicação transdérmica.

Recentemente outro grupo de pesquisadores também desenvolveram nanocarreadores contendo CUR e QUE com a funcionalização de ácido hialurônico (AH) na superfície visando uma melhora no direcionamento dos ativos para a pele e uma maior eficácia na cicatrização de queimaduras. HUSSAIN e colaboradores (2022), desenvolveram nanopartículas poliméricas (NPs) de quitosana com baixo peso molecular carregadas com CUR e QUE e funcionalizadas com ácido hialurônico na superfície. As NPs apresentaram tamanho de partícula de 177 ± 11 nm, potencial zeta $+37,0 \pm 3,2$ mV, e eficiência de encapsulamento de $\sim 84\%$ para QUE e $\sim 64\%$ para CUR. No estudo *in vitro* de permeação cutânea foi utilizado amostra de pele de ratos queimada, previamente excisada e congelada. A pele foi descongelada à temperatura ambiente e reidratada com o mesmo fluido introduzido no compartimento receptor por 30 min. A permeação de CUR e QUE foi avaliada da formulação incorporada em creme. CUR permeou $2414 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e QUE $1984 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ através do estrato córneo dentro do período de 24 h, bem como apresentaram retenção prolongada na epiderme CUR $\sim 1720 \mu\text{g}/\text{g}$ tecido da pele e QUE $\sim 1560 \mu\text{g}/\text{g}$ tecido da pele e derme CUR $\sim 980 \mu\text{g}/\text{g}$ tecido da pele e QUE $\sim 880 \mu\text{g}/\text{g}$ de tecido cutâneo. O estudo *in vivo* em animais (ratos Wistar) autenticou uma eficácia superior de cicatrização de feridas de NPs funcionalizados com AH, na qual a taxa de fechamento de feridas foi mais alta entre todos os grupos testados com 25% (dia 7), 45% (dia 14), 67% (dia 21) e 98% (dia 28). Como conclusão os autores relatam que a funcionalização de AH de NPs pode ser uma abordagem

promissora para maximizar a penetração de ativos na pele, proporcionando a regeneração e cicatrização mais rápida.

A encapsulação de QUE em nanocarreadores também tem sido demonstrada como vantajosa quando comparada com sua utilização livre. Como mostra o estudo de ALAQEEL; ALSHEIKH e AL-HARIRI (2022), que desenvolveram nanoemulsões lipídicas (NE) carregadas com QUE para tratar disfunção neuronal em modelo experimental de doença de Alzheimer. A NE-QUE foi desenvolvida dissolvendo 1 g de QUE em 20 mL de éster de óleo de palma (PEO) e 0,3 g de lecitina, para fase aquosa utilizou 10 mL de água desionizada contendo 1 g de Tween 80 foram adicionados gota a gota na fase oleosa. A mistura final foi então homogeneizada a 12 rpm por 10 min seguido de sonicação a 125 W em banho de gelo por 50 min. Para avaliação da atividade *in vivo* foram utilizados ratos, os quais foram divididos em seis grupos e tratados com (1) Veículo sem ativos (2) QUE livre por via oral, (3) Indução de Alzheimer $AlCl_3$ por via oral, (4) $AlCl_3$ oral + QUE livre injeção intraperitoneal (IP), (5) $AlCl_3$ oral + QUE livre por via oral e (6) $AlCl_3$ oral + injeção IP de NE-QUE – A concentração de QUE padronizada foi “15 mg/kg de peso corporal/dia”. Ao final do experimento (30 dias) foram realizadas análises *ex vivo* do cérebro dos ratos, através da medição do estresse oxidativo cerebral e de marcadores inflamatórios. O tratamento com NE-QUE apresentou potencial na proteção contra a disfunção neuronal induzida por $AlCl_3$, o grupo tratado com NE-QUE apresentou valores dos marcadores antioxidantes/anti-inflamatórias cerebrais muito próximos dos valores apresentados pelos animais do grupo (1). Ainda o grupo tratado com QUE livre IP não apresentou redução significativa dos marcadores antioxidantes/anti-inflamatórias cerebrais induzidos por $AlCl_3$ comparado com o grupo que teve a doença induzida e não teve tratamento.

O estudo de PENALVA e colaboradores (2017), por sua vez desenvolveram nanopartículas poliméricas com zeína e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD) carregadas com QUE, para promover a biodisponibilidade oral da QUE e melhorar sua ação anti-inflamatória. As nanopartículas exibiram um tamanho médio de cerca de 300 nm quando houve adição apenas de Zeína e 360 nm quando houve adição de Zeína e HPCD. O estudo farmacocinético foi avaliado *in vivo* em ratos wistar, comparativamente com NP-QUE-zeína, NP-QUE-HPCD-

zeína, QUE-Suspensão (aquosa), QUE-Solução (PEG400:água 60:40 v/v) e QUE-HPCD (solução). Todos os animais receberam a quantidade de 25 mg/kg de QUE por via oral. QUE foi dosada do plasma dos animais por CLAE. Foi observado que a biodisponibilidade oral relativa de QUE quando incorporada em NP de zeína mostrou-se ser 35% para NP-QUE-zeína e 57% para NP-QUE-HPCD-zeína. Pelo contrário, para QUE-sol ou QUE-HPCD, a biodisponibilidade oral do flavonoide foi de apenas 4% ou 2,5%, respectivamente. Ainda as NP-QUE-zeína mantiveram liberação constante até as 72h, enquanto NP-QUE-zeína foi até as 48h. Neste estudo as NP-QUE apresentaram melhores resultados de biodisponibilidade oral que QUE-livre, e ainda a adição de HPCD na formulação favoreceu a liberação mais prolongada de QUE. Indicando que as NP de zeína em combinação com HPCD parecem ser transportadores adequados para a administração oral de QUE.

Como pode-se observar a encapsulação de CUR e QUE em diferentes tipos de nanocarreadores tem demonstrado maior eficiência de entrega dos ativos. Além disso as formulações contendo os dois ativos têm demonstrado boa estabilidade física e química. Indicando que a combinação destes compostos pode ser explorada para verificar se há um aumento de eficácia de suas propriedades quando utilizados juntos. Deste modo, é interessante explorar a co-encapsulação de CUR e QUE para avaliar se há um sinergismo de ação frente a capacidade de atividade antiviral destes compostos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação lipídica de base nanotecnológica contendo curcumina e quercetina para administração intranasal e avaliação das propriedades antivirais.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar nanoemulsões contendo curcumina e quercetina;

- Caracterizar as nanoemulsões quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta e teor de incorporação dos ativos;
- Avaliar o perfil de liberação *in vitro* dos diferentes ativos utilizados a partir dos nanocarreadores;
- Avaliar a capacidade de permeação e retenção dos nanocarreadores *ex vivo* em mucosa nasal suína;
- Avaliar o potencial antiviral dos nanocarreadores *in vitro*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL FADEEL, D. A.; KAMEL, R.; FADEL, M. PEGylated lipid nanocarrier for enhancing photodynamic therapy of skin carcinoma using curcumin: in-vitro/in-vivo studies and histopathological examination. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10435, 26 jun. 2020.

AGCA, H. et al. Changing epidemiology of influenza and other respiratory viruses in the first year of COVID-19 pandemic. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 9, p. 1186–1190, set. 2021.

ALAQEEL, N. K.; ALSHEIKH, M. H.; AL-HARIRI, M. T. Quercetin Nanoemulsion Ameliorates Neuronal Dysfunction in Experimental Alzheimer’s Disease Model. **Antioxidants**, v. 11, n. 10, p. 1986, 5 out. 2022.

ALMUBAID, Z.; AL-MUBAID, H. Analysis and comparison of genetic variants and mutations of the novel coronavirus SARS-CoV-2. **Gene Reports**, v. 23, p. 101064, jun. 2021.

ANAND, U. et al. Ethnodermatological use of medicinal plants in India: From ayurvedic formulations to clinical perspectives – A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 284, p. 114744, fev. 2022.

ASIYANBOLA, B.; SOBOYEJO, W. For the Surgeon: An Introduction to Nanotechnology. **Journal of Surgical Education**, v. 65, n. 2, p. 155–161, mar. 2008.

AZEGAMI, T. et al. Nanogel-based nasal vaccines for infectious and lifestyle-related diseases. **Molecular Immunology**, v. 98, p. 19–24, jun. 2018.

BAHUN, M. et al. Inhibition of the SARS-CoV-2 3CLpro main protease by plant polyphenols. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131594, mar. 2022.

BAKHJET, M.; TAURIN, S. SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 58, p. 16–29, abr. 2021.

BARROS, C. H. N. et al. Synthesis and self-assembly of curcumin-modified amphiphilic polymeric micelles with antibacterial activity. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 104, 13 abr. 2021.

BATISTA, P. et al. Recent insights in the use of nanocarriers for the oral delivery of bioactive proteins and peptides. **Peptides**, v. 101, p. 112–123, mar. 2018.

BAYDA, S. et al. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 27 dez. 2019.

BENAM, K. H.; DENNEY, L.; HO, L.-P. How the Respiratory Epithelium Senses and Reacts to Influenza Virus. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 60, n. 3, p. 259–268, mar. 2019.

BEN-SHABAT, S. et al. Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, n. 2, p. 354–367, abr. 2020.

BHUSHAN, B. **Springer handbook of nanotechnology**. 3rd rev. & extended ed. Berlin: Springer, 2010.

BITTER, C.; SUTER-ZIMMERMANN, K.; SURBER, C. Nasal Drug Delivery in Humans. Em: SURBER, C.; ELSNER, P.; FARAGE, M. A. (Eds.). **Current Problems in Dermatology**. [s.l.] S. Karger AG, 2011. v. 40p. 20–35.

BOCHKOV, Y. A.; GERN, J. E. Clinical and molecular features of human rhinovirus C. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 6, p. 485–494, jun. 2012.

BORCHERS, A. T. et al. Respiratory Syncytial Virus—A Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 45, n. 3, p. 331–379, dez. 2013.

BOUKHVALOVA, M.; YIM, K.; BLANCO, J. Cotton rat model for testing vaccines and antivirals against respiratory syncytial virus. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 26, p. 204020661877051, jan. 2018.

CALIBASI-KOCAL, G. et al. Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, v. 24, n. 4, p. 1482–1487, 2019.

CHEN, F.; YANG, J.-R. Distinct codon usage bias evolutionary patterns between weakly and strongly virulent respiratory viruses. **iScience**, v. 25, n. 1, p. 103682, jan. 2022.

CHEN, Y.; LIU, Q.; GUO, D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 418–423, abr. 2020.

CHENG, S.-C. et al. Quercetin Inhibits the Production of IL-1 β -Induced Inflammatory Cytokines and Chemokines in ARPE-19 Cells via the MAPK and

NF- κ B Signaling Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 2957, 17 jun. 2019.

CHENTHAMARA, D. et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. **Biomaterials Research**, v. 23, p. 20, 2019.

CHIUW, K. H. et al. Evaluation of antiviral activities of *Houttuynia cordata* Thunb. extract, quercetin, quercetrin and cinanserin on murine coronavirus and dengue virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–7, jan. 2016.

CHOI, H. J. et al. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3–4, p. 329–333, jun. 2009.

CHOI, H. J.; SONG, J. H.; KWON, D. H. Quercetin 3-rhamnoside Exerts Antiinfluenza A Virus Activity in Mice: *IN VIVO* ANTI-INFLUENZA A VIRUS ACTIVITY OF Q3R. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 3, p. 462–464, mar. 2012.

CHUNG, S. et al. The nose has it: Opportunities and challenges for intranasal drug administration for neurologic conditions including seizure clusters. **Epilepsy & Behavior Reports**, v. 21, p. 100581, 2023.

CONTERA, S.; BERNARDINO DE LA SERNA, J.; TETLEY, T. D. Biotechnology, nanotechnology and medicine. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 4, n. 6, p. 551–554, 17 dez. 2020.

CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181–192, mar. 2019.

CUNHA, B. A. Swine Influenza (H1N1) Pneumonia: Clinical Considerations. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 24, n. 1, p. 203–228, mar. 2010.

DABEEK, W. M.; MARRA, M. V. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2288, 25 set. 2019.

DAS, A. et al. Role of phytoconstituents in the management of COVID-19. **Chemico-Biological Interactions**, v. 341, p. 109449, maio 2021.

DAVIS, J. M. et al. Quercetin reduces susceptibility to influenza infection following stressful exercise. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 2, p. R505–R509, ago. 2008.

DE ALMEIDA, M. et al. Evaluation of the *in vivo* acute antiinflammatory response of curcumin-loaded nanoparticles. **Food & Function**, v. 9, n. 1, p. 440–449, 2018.

DHOUBI, R. et al. Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 150, p. 67–77, jan. 2020.

DI PETRILLO, A. et al. Quercetin and its derivatives as antiviral potentials: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 266–278, jan. 2022.

DOMINGOS, R. F. et al. Characterizing Manufactured Nanoparticles in the Environment: Multimethod Determination of Particle Sizes. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 19, p. 7277–7284, 1 out. 2009.

DORA, C. L. et al. Physicochemical and morphological characterizations of glyceryl tristearate/castor oil nanocarriers prepared by the solvent diffusion method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 1972–1981, nov. 2012.

EMA. **Pharmaceutical quality of inhalation and nasal products - Scientific guideline.** Text. Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/pharmaceutical-quality-inhalation-nasal-products-scientific-guideline>>. Acesso em: 28 fev. 2023

ETEMADI, M. R. et al. Diversity of respiratory viruses detected among hospitalized children with acute lower respiratory tract infections at Hospital Serdang, Malaysia. **Journal of Virological Methods**, v. 269, p. 1–6, jul. 2019.

FANG, J.-Y. et al. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 633–640, 1 out. 2008.

GAITONDE, D. Y.; MOORE, F. C.; MORGAN, M. K. Influenza: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, v. 100, n. 12, p. 751–758, 15 dez. 2019.

GANESAN, P.; CHOI, D. K. Current application of phytochemical-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy. **International Journal of Nanomedicine**, p. 1987, maio 2016.

GERAGHTY, R.; ALIOTA, M.; BONNAC, L. Broad-Spectrum Antiviral Strategies and Nucleoside Analogues. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 667, 13 abr. 2021.

GONZÁLEZ, P. A. et al. Respiratory syncytial virus infection and immunity: Immunity triggered by RSV infection. **Reviews in Medical Virology**, v. 22, n. 4, p. 230–244, jul. 2012.

GRAHAM, R. L.; DONALDSON, E. F.; BARIC, R. S. A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 836–848, dez. 2013.

GRASSIN-DELYLE, S. et al. Intranasal drug delivery: An efficient and non-invasive route for systemic administration. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 134, n. 3, p. 366–379, jun. 2012.

GUIDO, M. et al. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 39, p. 8684, 2016.

GUNES, H. et al. Antibacterial effects of curcumin: An *in vitro* minimum inhibitory concentration study. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 2, p. 246–250, fev. 2016.

GUPTA, S. C.; PATCHVA, S.; AGGARWAL, B. B. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. **The AAPS Journal**, v. 15, n. 1, p. 195–218, jan. 2013.

HAAS, L. et al. Human Metapneumovirus in Adults. **Viruses**, v. 5, n. 1, p. 87–110, 8 jan. 2013.

HALAJI, M. et al. Emerging coronaviruses: first SARS, second MERS and third SARS-CoV-2: epidemiological updates of COVID-19. **Le Infezioni in Medicina**, v. 28, n. suppl 1, p. 6–17, 1 jun. 2020.

HASHEMZAEI, M. et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. **Oncology Reports**, v. 38, n. 2, p. 819–828, fev. 2017.

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 4, p. 1225, 24 abr. 2020.

HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 22 out. 2017.

HOLMES, E. C. et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. **Cell**, v. 184, n. 19, p. 4848–4856, set. 2021.

HOU, D.-D. et al. Anti-inflammatory effects of quercetin in a mouse model of MC903-induced atopic dermatitis. **International Immunopharmacology**, v. 74, p. 105676, set. 2019.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141–154, mar. 2021.

HULLA, J.; SAHU, S.; HAYES, A. Nanotechnology: History and future. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318–1321, dez. 2015.

HUSSAIN, Z. et al. Hyaluronic acid functionalization improves dermal targeting of polymeric nanoparticles for management of burn wounds: In vitro, ex vivo and in vivo evaluations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 150, p. 112992, jun. 2022.

INVERNIZZI, R.; LLOYD, C. M.; MOLYNEAUX, P. L. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs. **Immunology**, v. 160, n. 2, p. 171–182, jun. 2020.

ISON, M. G. Antiviral Treatments. **Clinics in Chest Medicine**, v. 38, n. 1, p. 139–153, mar. 2017.

IZUI, S. et al. Antibacterial Activity of Curcumin Against Periodontopathic Bacteria. **Journal of Periodontology**, v. 87, n. 1, p. 83–90, jan. 2016.

JACOBS, S. E. et al. Human Rhinoviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 135–162, jan. 2013.

JAIN, A. K.; THAREJA, S. *In vitro* and *in vivo* characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 524–539, 4 dez. 2019.

JONES, W. A. et al. Influenza Management During the COVID-19 Pandemic: A Review of Recent Innovations in Antiviral Therapy and Relevance to Primary Care Practice. **Mayo Clinic Proceedings: Innovations, Quality & Outcomes**, v. 5, n. 6, p. 974–991, dez. 2021.

JORES, K. et al. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 217–227, 5 mar. 2004.

JURASEKOVA, Z. et al. Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 16, n. 25, p. 12802–12811, 2014.

KADAM, S. B. et al. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 180–202, mar. 2021.

KAKAD, S. P. et al. Nose to brain delivery of nanosuspensions with first line antiviral agents is alternative treatment option to Neuro-AIDS treatment. **Heliyon**, v. 8, n. 7, p. e09925, jul. 2022.

KAUR, N. et al. Genetic comparison among various coronavirus strains for the identification of potential vaccine targets of SARS-CoV2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, p. 104490, abr. 2021.

KHIZAR, S. et al. Nanocarriers based novel and effective drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 632, p. 122570, fev. 2023.

KIM, C. H.; KIM, J.-E.; SONG, Y.-J. Antiviral Activities of Quercetin and Isoquercitrin Against Human Herpesviruses. **Molecules**, v. 25, n. 10, p. 2379, 20 maio 2020.

KIM, Y.; CLIFTON, P. Curcumin, Cardiometabolic Health and Dementia. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, p. 2093, 24 set. 2018.

KING, C.; COLBOURN, T. Global human parainfluenza virus estimates for action on childhood pneumonia. **The Lancet Global Health**, v. 9, n. 8, p. e1033–e1034, ago. 2021.

KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2930, 13 ago. 2019.

KOTTAKIS, G. et al. Effects of the Antioxidant Quercetin in an Experimental Model of Ulcerative Colitis in Mice. **Medicina**, v. 59, n. 1, p. 87, 31 dez. 2022.

KOU, L. et al. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 27, 26 jan. 2018.

KUMAR, A. et al. Curcumin-loaded lipid nanocarrier for improving bioavailability, stability and cytotoxicity against malignant glioma cells. **Drug Delivery**, v. 23, n. 1, p. 214–229, 2 jan. 2016.

LEE, C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 193, dez. 2015.

LEE, J. et al. The immunostimulating activity of quercetin 3-O-xyloside in murine macrophages via activation of the ASK1/MAPK/NF- κ B signaling pathway. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 88–97, fev. 2016.

LI, G. et al. Coronavirus infections and immune responses. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 4, p. 424–432, abr. 2020.

LI, Y. et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 167, 15 mar. 2016.

LIN, R.; PIAO, M.; SONG, Y. Dietary Quercetin Increases Colonic Microbial Diversity and Attenuates Colitis Severity in *Citrobacter rodentium*-Infected Mice. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1092, 16 maio 2019.

LION, T. Adenovirus Infections in Immunocompetent and Immunocompromised Patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 441–462, jul. 2014.

LOBAINA MATO, Y. Nasal route for vaccine and drug delivery: Features and current opportunities. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 572, p. 118813, dez. 2019.

LYNCH, J.; FISHBEIN, M.; ECHAVARRIA, M. Adenovirus. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 32, n. 04, p. 494–511, ago. 2011.

MALIK, Y. A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. **The Malaysian Journal of Pathology**, v. 42, n. 1, p. 3–11, abr. 2020.

MANDIĆ, L. et al. Enhanced Protection of Biological Membranes during Lipid Peroxidation: Study of the Interactions between Flavonoid Loaded Mesoporous

Silica Nanoparticles and Model Cell Membranes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2709, 1 jun. 2019.

MANJUNATH, S. H.; THIMMULAPPA, R. K. Antiviral, immunomodulatory, and anticoagulant effects of quercetin and its derivatives: Potential role in prevention and management of COVID-19. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, p. S2095177921001106, set. 2021.

MITCHELL, M. J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 2, p. 101–124, fev. 2021.

MOON, H. et al. Nano-encapsulated quercetin by soluble soybean polysaccharide/chitosan enhances anti-cancer, anti-inflammation, and anti-oxidant activities. **Journal of Functional Foods**, v. 87, p. 104756, dez. 2021.

MORIYAMA, M.; HUGENTOBLE, W. J.; IWASAKI, A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. **Annual Review of Virology**, v. 7, n. 1, p. 83–101, 29 set. 2020.

MOUNCE, B. C. et al. Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding. **Antiviral Research**, v. 142, p. 148–157, jun. 2017.

MRITYUNJAYA, M. et al. Immune-Boosting, Antioxidant and Anti-inflammatory Food Supplements Targeting Pathogenesis of COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 570122, 7 out. 2020.

MUKHTYAR, C.; MILLS, J.; SCOTT, D. G. I. The nose is an organ too. **Rheumatology**, v. 59, n. 6, p. 1196–1197, 1 jun. 2020.

NIKOLIC, I. et al. Curcumin-loaded low-energy nanoemulsions as a prototype of multifunctional vehicles for different administration routes: Physicochemical and in vitro peculiarities important for dermal application. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 550, n. 1, p. 333–346, 25 out. 2018.

PANAHI, Y. et al. Effects of curcumin on serum cytokine concentrations in subjects with metabolic syndrome: A post-hoc analysis of a randomized controlled trial. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p. 578–582, ago. 2016.

PATEL, R. Nasal Anatomy and Function. **Facial Plastic Surgery**, v. 33, n. 01, p. 003–008, fev. 2017.

PATRA, J. K. et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 1, p. 71, dez. 2018.

PAWEŁCZYK, M.; KOWALSKI, M. L. The Role of Human Parainfluenza Virus Infections in the Immunopathology of the Respiratory Tract. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 17, n. 3, p. 16, mar. 2017.

PENALVA, R. et al. Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti-inflammatory effects in a mouse

model of endotoxemia. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 103–110, jan. 2017.

PEREIRA, P. R. T. Ministério da Saúde, INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 33, DE 16 DE ABRIL DE 2019 -Dispõe sobre os ensaios de desempenho in vitro de medicamentos nasais e inalatórios orais, nos termos da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 278, de 16 de abril de 2019,. [s.d.].

PRAJAPATI, J. et al. Unravelling the antifungal mode of action of curcumin by potential inhibition of CYP51B: A computational study validated in vitro on mucormycosis agent, *Rhizopus oryzae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 712, p. 109048, nov. 2021.

PRIYADARSINI, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 1 dez. 2014.

PSCHEIDT, V. M. et al. Epidemiology of human adenovirus associated with respiratory infection in southern Brazil. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 4, jul. 2021.

RESEARCH, C. FOR D. E. AND. **Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products--Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nasal-spray-and-inhalation-solution-suspension-and-spray-drug-products-chemistry-manufacturing-and>>. Acesso em: 28 fev. 2023.

ROSHDY, W. H. et al. EGYVIR: An immunomodulatory herbal extract with potent antiviral activity against SARS-CoV-2. **PLOS ONE**, v. 15, n. 11, p. e0241739, 18 nov. 2020.

SADEGHI GHADI, Z. et al. Preparation, characterization and in vivo evaluation of novel hyaluronan containing niosomes tailored by Box-Behnken design to co-encapsulate curcumin and quercetin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 130, p. 234–246, mar. 2019.

SADEGHI-GHADI, Z. et al. Potent in vitro activity of curcumin and quercetin co-encapsulated in nanovesicles without hyaluronan against *Aspergillus* and *Candida* isolates. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 4, p. 101014, dez. 2020.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p. 223–229, mar. 2017.

SCHUSTER, J. E.; WILLIAMS, J. V. Human Metapneumovirus. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, p. 2.5.25, 19 set. 2014.

SHARMA, A.; AHMAD FAROUK, I.; LAL, S. K. COVID-19: A Review on the Novel Coronavirus Disease Evolution, Transmission, Detection, Control and Prevention. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 202, 29 jan. 2021.

SHI, L. et al. In vitro Permeability and Bioavailability Enhancement of Curcumin by Nanoemulsion via Pulmonary Administration. **Current Drug Delivery**, v. 16, n. 8, p. 751–758, 9 out. 2019.

SHOHAN, M. et al. The therapeutic efficacy of quercetin in combination with antiviral drugs in hospitalized COVID-19 patients: A randomized controlled trial. **European Journal of Pharmacology**, v. 914, p. 174615, jan. 2022.

SINGH, R.; BHARDWAJ, V. K.; PUROHIT, R. Potential of turmeric-derived compounds against RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2: An in-silico approach. **Computers in Biology and Medicine**, v. 139, p. 104965, dez. 2021.

SOY, M. et al. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment. **Clinical Rheumatology**, v. 39, n. 7, p. 2085–2094, jul. 2020.

SUL, O.-J.; RA, S. W. Quercetin Prevents LPS-Induced Oxidative Stress and Inflammation by Modulating NOX2/ROS/NF- κ B in Lung Epithelial Cells. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6949, 17 nov. 2021.

SZCZEPANSKI, A. et al. Canine Respiratory Coronavirus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43: Receptors and Attachment Factors. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 328, 5 abr. 2019.

TAGDE, P. et al. The Multifaceted Role of Curcumin in Advanced Nanocurcumin Form in the Treatment and Management of Chronic Disorders. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7109, 24 nov. 2021.

TANAKA, Y. et al. Preparation of liposomes encapsulating β -carotene using supercritical carbon dioxide with ultrasonication. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 161, p. 104848, jul. 2020.

TANG, J. et al. Quercetin and Quercitrin Attenuates the Inflammatory Response and Oxidative Stress in LPS-Induced RAW264.7 Cells: In Vitro Assessment and a Theoretical Model. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–8, 28 out. 2019.

TAYEB, H. H. et al. Nanoemulsions: Formulation, characterization, biological fate, and potential role against COVID-19 and other viral outbreaks. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 45, p. 100533, 2021.

TERNULLO, S. et al. Liposomes augment biological benefits of curcumin for multitargeted skin therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 144, p. 154–164, nov. 2019.

The Nasal Cavity - Structure - Vasculature - Innervation - TeachMeAnatomy. Disponível em: <<https://teachmeanatomy.info/head/organs/the-nose/nasal-cavity/>>. Acesso em: 27 fev. 2023.

TIZARD, I. R. Vaccination against coronaviruses in domestic animals. **Vaccine**, v. 38, n. 33, p. 5123–5130, jul. 2020.

TO, K. K. W.; YIP, C. C. Y.; YUEN, K.-Y. Rhinovirus – From bench to bedside. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 116, n. 7, p. 496–504, jul. 2017.

UMUHOZA, T. et al. Morbidity burden, seasonality and factors associated with the human respiratory syncytial virus, human parainfluenza virus, and human adenovirus infections in Kenya. **IJID Regions**, v. 1, p. 72–78, dez. 2021.

UPPALAPATI, L. et al. Functional reconstitution of the MERS CoV receptor binding motif. **Molecular Immunology**, v. 145, p. 3–16, maio 2022.

VAZ, G. R. et al. Development of Nasal Lipid Nanocarriers Containing Curcumin for Brain Targeting. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 59, n. 3, p. 961–974, 29 jul. 2017.

VAZ, G. R. et al. Curcumin and Quercetin-Loaded Nanoemulsions: Physicochemical Compatibility Study and Validation of a Simultaneous Quantification Method. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1650, 22 ago. 2020.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, mar. 2021.

WANG, C. C. et al. Airborne transmission of respiratory viruses. **Science**, v. 373, n. 6558, p. eabd9149, 27 ago. 2021.

WANG, S. et al. Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 1, p. 68–78, jan. 2018.

WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7–22, 1 jan. 2014.

WEBSTER, R. G.; GOVORKOVA, E. A. Continuing challenges in influenza. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, p. 115–139, set. 2014.

WEISS, C. et al. Toward Nanotechnology-Enabled Approaches against the COVID-19 Pandemic. **ACS Nano**, v. 14, n. 6, p. 6383–6406, 23 jun. 2020.

WONG, P. T. et al. Formulation and Characterization of Nanoemulsion Intranasal Adjuvants: Effects of Surfactant Composition on Mucoadhesion and Immunogenicity. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 531–544, 3 fev. 2014.

WOO, P. C. Y. et al. Coronavirus Diversity, Phylogeny and Interspecies Jumping. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 10, p. 1117–1127, out. 2009.

YADAV, R. et al. Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 4, p. 821, 6 abr. 2021.

YANG, X. X.; LI, C. M.; HUANG, C. Z. Curcumin modified silver nanoparticles for highly efficient inhibition of respiratory syncytial virus infection. **Nanoscale**, v. 8, n. 5, p. 3040–3048, 7 fev. 2016.

YI, H. et al. The Therapeutic Effects and Mechanisms of Quercetin on Metabolic Diseases: Pharmacological Data and Clinical Evidence. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 1–16, 23 jun. 2021.

ZAHEDI, M. et al. Does Quercetin Improve Cardiovascular Risk factors and Inflammatory Biomarkers in Women with Type 2 Diabetes: A Double-blind Randomized Controlled Clinical Trial. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 7, p. 777–785, jul. 2013.

ZAHEDIPOUR, F. et al. Potential effects of curcumin in the treatment of COVID-19 infection. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 11, p. 2911–2920, nov. 2020.

ZHANG, S.; WANG, L.; CHENG, G. The battle between host and SARS-CoV-2: Innate immunity and viral evasion strategies. **Molecular Therapy**, p. S1525001622000971, fev. 2022.

ZHANG, Y.-Q. et al. Lgr5 regulates the regeneration of lesioned nasal respiratory epithelium. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 481, n. 3–4, p. 195–200, dez. 2016.

ZHAO, L. et al. Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide technology: Effects of phospholipids and sterols. **Food Research International**, v. 77, p. 63–72, nov. 2015.

ZHAO, M. et al. Recent progress of antiviral therapy for coronavirus disease 2019. **European Journal of Pharmacology**, v. 890, p. 173646, jan. 2021.

ZHENG, B.; MCCLEMENTS, D. J. Formulation of More Efficacious Curcumin Delivery Systems Using Colloid Science: Enhanced Solubility, Stability, and Bioavailability. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2791, 17 jun. 2020.

ZHOU, P. et al. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. **Nature**, v. 556, n. 7700, p. 255–258, abr. 2018.

Original Article

This article will be submitted to the journal *Pharmaceutics* and is already within the guidelines of the journal

Curcumin and quercetin co-encapsulated in nanoemulsions for intranasal administration: a promising therapeutic and prophylactic treatment for viral respiratory infections

Daniela Pastorim Vaiss¹, Jamile Lima Rodrigues¹, Virginia Campello Yurgel¹, Frank do Carmo Guedes JR¹, Lauanda Larissa Mendonça da Matta¹, Paula Alice Bezerra Barros¹, Gustavo Richter Vaz¹, Raíssa Nunes dos Santos^{2,3}, Bibiana Franzen Matte², Larine Kupski⁴, Jaqueline Garda-Buffon⁴, Juliana Bidone⁵, Ana Luiza Muccillo-Baisch¹, Fabio Sonvico^{6*} and Cristiana Lima Dora^{1,*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande 96203-900, Brazil; danipvaiss@gmail.com; jamile.lr@gmail.com; virginia.yurgel@gmail.com; frankjrguedes@gmail.com; lauanda2011@hotmail.com; alicebarros.pb@gmail.com; richtervaz@gmail.com; anabaisch@gmail.com; cristianadora@gmail.com

² Virology Laboratory of the Biotechnology Startup Núcleo Vitro, Porto Alegre 91040-600, Brazil; bibiana@nucleovitro.com; raissa.nunes@nucleovitro.com

³ Laboratory of Bioinformatics and Biotechnology, Campus de Gurupi, Federal University of Tocantins, Gurupi 77402-970, Brazil; engraisanunes@gmail.com

⁴ Laboratory for Mycotoxins and Food Science, School of Chemistry and Food, Federal University of Rio Grande – FURG, Italy Avenue 8 km, Campus Carreiros, 96203-900. Rio Grande, RS, Brazil; larinekupski@yahoo.com.br; jaquelinebuffon@furg.br

⁵ Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, 96010-610. Pelotas, RS, Brazil; julianabidone@gmail.com

⁶ Food and Drug Department, University of Parma, Parma, Italy; fabio.sonvico@unipr.it

* **Correspondence: C.L.D. cristianadora@gmail.com; Tel.: +55-53-32935313; F.S. fabio.sonvico@unipr.it; Tel.: +39-339-5019016**

Abstract: One of the most frequent causes of respiratory infections are viruses. The viruses that reach the airways can be absorbed by the human body through the respiratory mucosa and mainly infect the lung cells, causing a variety of symptoms and diseases in individuals. Many viruses are not yet curable, such as coronavirus-2 (SARS-CoV-2). Furthermore, the side effect of synthetic antiviral drugs antiviral and reduced efficacy against resistant variants have reinforced the search for alternative and effective treatment options, such as plant-derived antiviral molecules. Curcumin (CUR) and quercetin (QUE) are two natural compounds that have been widely studied for their numerous health benefits, such as antiviral and anti-inflammatory activity. However, poor oral bioavailability limits the clinical applications of these natural compounds. In this work, nanoemulsions (NE) co-encapsulating CUR and QUE designed for intranasal administration were developed as promising prophylactic and therapeutic treatments for viral respiratory infections. The NEs were prepared by high-pressure homogenization combined with the Phase Inversion Temperature technique and evaluated for their physical and chemical characteristics. In vitro assays were performed to evaluate the nanoemulsion retention and permeation across the porcine nasal mucosa. In addition, the curcumin and quercetin-loaded nanoemulsion antiviral activity was tested against a murine β -COV, namely MHV-3. The results evidenced that CUR and QUE loaded nanoemulsion had a particle size of 400 nm with good stability and retention in the nasal mucosa. The antiviral activity of the NEs showed a percentage of inhibition of around 99%, indicating that the developed NEs have a range of interesting properties as a therapeutic and/or prophylactic treatment for viral respiratory infections.

Keywords: antiviral; natural compound; curcumin; quercetin; co-encapsulation.

1 Introduction

In recent years, viral infections represent a global health issue that caused unexpectedly high mortality due to the spread of COVID-19 pandemic [1,2]. Virus ability to rapidly spread among individuals leads to outbreaks and epidemics, can cause significant impacts on morbidity and mortality worldwide [2,3]. The severity of the disease can be variable, depending on different aspects such as the type and virulence of the invading virus, as well as on individual aspects of the host [1,2,4]. The main viruses that affect the respiratory system are human rhinovirus (HRV), influenza, respiratory syncytial virus (RSV), human parainfluenza viruses (HPV), human adenoviruses (HAdV), and human corona-viruses (HCoV). These viruses are responsible for causing infections ranging from mild and self-limited symptoms to severe and even systemic infections [5,6]. Along with these viruses, coronavirus-2 (SARS-CoV-2) has been turning into a global burden since 2019. The coronavirus infection also termed COVID-19 is characterized by severe acute respiratory syndrome resulting in very high morbidity in certain patient populations [7].

The respiratory epithelium is the main gateway for viral particles. This epithelium extends from the nasal cavity to the bronchi, allowing contact of the lungs with the external environment and represent the first and main point of defense against external pathogens [5,8]. To carry out this protection role, the airways rely on physical and immunological defenses. The mucus secreting cells and multi-ciliated cells act together to prevent the persistence of inhaled invading particles and pathogens and eliminate them. Indeed, the first cells secrete mucus that traps the invading particles for subsequent elimination. The multi-ciliated cells have cilia on their apical surface that beat coordinately to eliminate the inhaled invading particles and the mucus produced in excess. The airway epithelia are characterized also by the presence of basal cells that act as stem cells that can differentiate and renew epithelial cells for the maintenance of homeostasis [9]. In addition, neuroendocrine cells secrete inflammatory mediators to act against invaders and to trigger immune defenses [10]. However, respiratory viruses constantly mutate and often develop mechanisms that bypass these host defenses [5].

Over the past few decades, advanced scientific research has discovered many synthetic antiviral agents which are effective against a number of viral infectious diseases. Unfortunately, these synthetic drugs have been reported to produce countless undesired adverse effects, in addition, to having a high cost. Furthermore, they may become ineffective on emerging resistant viral strains [7]. The global burden of viral infections and medication costs calls for the urgent development of affordable and effective new antiviral drugs. The development of innovative preventive and/or therapeutic strategies contributing to inhibit viral entry into the respiratory epithelium and its replication and subsequent complications is essential. In this regard, natural active compounds, such as quercetin (QUE) and curcumin (CUR), that are widely studied for their multiple biological activities, could be used to the development of new protective and therapeutic measures against viral infections [11–13].

CUR, the yellow pigment of spice turmeric, is the major active polyphenolic compound extracted from the roots of the rhizome plant *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). CUR has a wide range of in vivo pharmacological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, antithrombotic, antimicrobial, and antitumor effects [14–23]. CUR is also an effective antiviral agent against many viruses including dengue virus, human immunodeficiency virus (HIV), Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), enterovirus, Zika virus, Chikungunya virus, vesicular stomatitis virus, human respiratory syncytial virus, influenza A virus, hemorrhagic septicemia virus, herpes simplex type 2, norovirus, hepatitis C virus, hepatitis B virus, SARS-CoV-1, and SARS-CoV-2 [24–29].

QUE, one of the most abundant dietary flavonoids, occurs naturally in a wide range of fruits and vegetables. QUE supplements are used for improving immunity and maintaining general well-being. In vivo studies demonstrated the anti-inflammatory, immuno-protective, and antioxidant effects of QUE [30–34]. QUE has also a broad-spectrum antiviral properties and has shown inhibitory activity against many viruses including HIV, herpes simplex virus (type 1 and 2), poliovirus (type 1), parainfluenza (type 3), hepatitis C virus, human respiratory syncytial virus, Sindbis virus, vaccinia virus, SARS-CoV-1, and SARS-CoV-2 [12,29,35–41]. QUE and CUR have a well-established safety profile, and oral intake doses up to 1 g/day for three months have resulted in no significant

adverse effects [35,36]. Both have an excellent safety profile with “Generally Recognized as Safe” (GRAS) status received from the USA Food and Drug Administration (FDA) [37–39] and could be used in combination with clinically used antivirals and drugs that control the symptoms of COVID-19 and other viral infections.

Along with numerous advantages, some challenges must be overcome during the drug development process involving natural substances. Pharmacokinetic ADME (absorption, distribution, metabolism, and elimination) parameters are the crucial factors that affect the drugability of a plant-derived compound. QUE and CUR have low aqueous solubility and poor oral bioavailability, which limits their clinical applications [13,40]. Fortunately, the advancement of novel drug delivery systems and nanotechnologies can contribute to enable the use of these plant metabolites as potential drugs [41–43].

Through pharmaceutical nanotechnology, nanocarriers can be developed to protect unstable molecules, improve aqueous solubility of poorly soluble compounds, and even direct molecules to specific targets in the body, providing increased therapeutic efficacy [41,44,45]. Among the nanocarriers, lipid-based nanocarriers stand out for their versatility and high biocompatibility and biodegradability, especially nanoemulsions (NEs), in which liquid lipids are used at room temperature and are capable of carrying higher concentrations of actives in their oily core [46,47]. Lipid NEs also provide a slower and more gradual release of the encapsulated actives, sustaining their concentrations and action at the administration site [48].

The demonstrated anti-inflammatory, immunomodulatory, antiviral, and antioxidant activities of QUE and CUR, encouraged us to investigate a combination of these agents loaded in NEs as an adjuvant therapy for viral infections. In the present study, we develop lipid NEs containing QUE and CUR for nasal administration and evaluate the antiviral activity in murine β -Cov, a relevant viral model belonging to the SARS-CoV-2 family. It is speculated that the coadministration of QUE and CUR NEs by intranasal route could be used as a therapeutic and/or prophylactic treatment for viral respiratory infections. The synergistic mechanisms can effectively target the infection by interfering with viral

replication and simultaneously modulating the host's hyperinflammatory response.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Curcumin (CUR), quercetin (QUE), 12-hydroxystearic acid-polyethylene glycol copolymer (PEG 660-stearate/Solutol HS15®), castor oil (CO), were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Egg lecithin (Lipoid E80®) was purchased from Lipoid (Steinhausen, Switzerland). Polyethylene glycol 400 (PEG400) was purchased from Synth (São Paulo, Brazil). Acetonitrile and methanol of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade was purchased from Panreac (Barcelona, Spain), and the water was achieved with a Milli-Q® ultrapure water system (Millipore, Burlington, MA, USA). Potassium chloride, sodium chloride and methanol analytical grade were obtained from Synth (São Paulo, SP, Brazil). Monobasic sodium phosphate and dibasic sodium phosphate were purchased from Alphatec (Porto Alegre, RS, Brazil). Calcium chloride dihydrate was purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

2.2 Development of Nanoemulsion containing CUR and QUE

Different types of nanoemulsion (NE) were prepared by the method of high pressure homogenization (HPH) combined with the Phase Inversion Temperature Technique as previously described by Vaz et al. [49]. In brief, two phases were prepared, the oily phase with castor oil, egg lecithin, and the natural compounds (three oil phases were prepared: 1) CUR; 2) QUE; 3) CUR and QUE), and the aqueous phase composed by the surfactant PEG 660-stearate dissolved in ultrapure water (2% w/v), Table 1. The blank formulation (control) was prepared without the natural compounds in the organic phase.

Table 1: Composition of nanoemulsions NEs

		NE Blank	NE CUR	NE QUE	NE CQ ¹
Oils Phase	Castor oil	1.6 g	1.6 g	1.6 g	1.6 g
	Curcumin	-	0.03 g	-	0.015 g

	Quercetin	-	-	0.03g	0.015 g
	Egg lecithin	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
Aqueous Phase	Peg-660 stearate	2 % w/V	2 % w/V	2 % w/V	2 % w/V
	Water purified qs	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL

¹CQ – Curcumin+quercetin

For the preparation of NEs, the oil phase was heated at 68 °C, under magnetic stirring at 1500 rpm, for 30 minutes. The aqueous phase was heated to 80 °C, under magnetic stir-ring at 700 rpm, for about 2 minutes. Then, the aqueous phase was added to the oil phase and kept under magnetic stirring at 1500 rpm, remaining for 2 min. After this time of agi-tation, the NEs were submitted to a high-speed homogenizer (Ultra-turrax® T10 basic, IKA) at 14,500 rpm for 2 min, followed by 18 cycles of 24 s (totaling 7 min and 12 s) in HPH (EmulsiFlex-C3, Avestin, Ottawa, Canada) at 10,000 psi. The formulations were cooled to room temperature and stored in a refrigerator at 4-8 °C.

2.3 Measurements of Size and Zeta Potential

The average hydrodynamic diameter, particle size distribution (as polydispersity in-dex), and zeta potential of the NEs were determined by dynamic light scattering and laser doppler anemometry, respectively, using a Zetasizer Nano Series (Malvern Pananalytical, Malvern, UK). The particle size measurements were performed at 25 °C after appropriate dilution of the samples in distilled water (1:100, approximately 10 µL of nanoemulsion per mL). Each size analysis lasted 300 s and was performed with a detection angle of 90°. The hydrodynamic radius was determined according to Stokes- Einstein's equation (Equation (1)):

$$R = \frac{kBT}{6\pi\eta D} \quad (1)$$

where B is Boltzmann's constant (J/K), T is temperature (in K), D is diffusion coefficient and η indicate viscosity of the medium, water in this case (0.89 cP at 25 °C).

For measurements of zeta potential, the samples were placed in the electrophoretic cell, where an alternating voltage of ± 150 mV was applied. The zeta potential values were calculated as mean electrophoretic mobility values using Smoluchowski's equation

2.4 Determination of CUR and QUE concentrations in NEs

The CUR and QUE content carried in the NEs was determined using a UV/Vis spectrophotometer. For this, the Perkin Elmer Lambda 45 equipment (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) was used. First, the method was validated evaluating specificity, linearity, precision, and accuracy are reported in Supplementary Material. Then, using the calibration curve of the equipment, the compounds were quantified and detected.

For the analyzes, an aliquot of 30 μ l of each NEs was taken and diluted in a 10 ml volumetric flask in methanol, after dilution an aliquot was placed in a quartz cuvette to be evaluated, for the detection used wavelength of 375 nm for QUE and 425 nm for CUR. Through the absorbances obtained, the concentrations were calculated.

2.5 *Ex vivo* permeation and retention study of CUR and QUE NEs on nasal mucosa

The permeation tests of the NEs were performed using Franz-diffusion cells type, as described by Kakad *et al.* [50] with porcine nasal mucosa, an interface area of 2.268 cm², and an internal volume of 12 mL. The porcine nasal mucosa was obtained from a slaughterhouse accredited by the Ministry of Agriculture (Frigorífico Castro, Pelotas, RS, Brazil). Freshly excised porcine nasal mucosa was placed between the donor and receptor compartments. The receiving compartment was filled with 12 mL containing simulated nasal fluid (SNF) the receiving fluid was selected to simulate the conditions at the NE delivery site, for which a combination of salts was used (NaCl 8.766 mg/mL, KCl 2.98 mg/mL, NaH₂PO₄ 0.8998 mg/mL, Na₂HPO₄ 0.4258 mg/mL, CaCl₂.2H₂O 0.5549 mg/mL) to form FNS at pH 6.4 and polyethyleneglycol-400 (PEG400) as a co-solvent to increase the solubility of the compounds and the viscosity of the receptor fluid at concentrations of 70:30, v/v respectively. And kept at 37 \pm 1°C in a thermostatic bath with continuous stirring at 650 rpm for 4 h. In the donor compartment, 350 μ l of the NE was added.

Four hours after the beginning of the experiment, the receptor medium was collected and filtered through a 0.45 μ m membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and analyzed by high performance liquid chromatography

(HPLC) according to the method described by Vaz *et al.* [51]. HPLC analyses were performed on a Shimadzu liquid chromatograph fitted with an autosampler using automatic injection with a 15 μ L sample loop, a LC-10 AT quaternary pump, a DGU degasser, and a CBM20A controller associated with a MP20A Photodiode Array Detector (Shimadzu, Kyoto, Japan). The HPLC analytical method used a 150 \times 4.6 mm C18 column, 5 μ m particle size (Zorbax ODS, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) in gradient elution with mobile phase obtained by mixing 1% w/v aqueous phosphoric acid adjusted to pH 2.6 (Eluent A) and acetonitrile (Eluent B) at a flow rate of 1.0 mL/min, details about the gradient are reported in Supplementary Material. The detection wavelength was 375 nm for QUE and 425 nm for CUR, LC Solution-Shimadzu software was used for data acquisition.

At the end of the permeation experiment, the porcine nasal mucosa was removed from the Franz cells, the excess NE was removed with approximately 60 ml of methanol:SNF (25:75) and gently dried with filter paper for the total removal of NE not absorbed by the mucosa according to the method described by Vaz *et al.* [49]. To evaluate the retention of CUR and QU in the tissue, the exposed region of the swine nasal mucosa was cut with a scalpel and placed in a 10 ml volumetric flask with methanol and maintained under magnetic stirring at 650 rpm overnight. After this period, an aliquot of the obtained solution was filtered through a 0.45 μ m membrane and analyzed by HPLC as previously described.

2.6 Antiviral Activity Assay

For the antiviral assays, the Murine hepatitis VR-261 (MHV-3) strain, a β -Cov, was used as a model of viral particles belonging to the SARS-CoV-2 family, together with mouse fibroblast cell line L929 (CCL-1 NCTC clone 929, strain L, ATCC, Manassas, VA, USA) derived in 1948 from a C3H/An male mouse. The analyzes were performed at the Virology Laboratory of the Biotechnology Startup Núcleo Vitro – Porto Alegre, RS, Brazil and the strains used were from its stock.

2.7 Cell culture

L929 cells were distributed in 96-well plates suitable for monolayer cultivation, for the number cells/well 2×10^4 and maintained in culture for 24 hours

with DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplemented with antibiotics and 5% of bovine fetal serum, in an oven at 37°C and 5% CO₂, previously to antiviral experiments.

2.8 Cell cytotoxicity

The cytotoxicity effect of NEs was evaluated by the sulforhodamine B (SRB) assay, as previously described with some modifications [52,53]. Briefly, monolayers of L929 cells distributed in 96-well plates were incubated for 48h at 37 °C with the mixture of formulations diluted in DMEM in dilutions from 10% to 1%. Later, it was fixed with trichloroacetic acid and stained with sulforhodamine to quantitatively assess the presence of viable cells. Afterward, the plate was read in a spectrophotometer using a reference wavelength of 560 nm. The control group was normalized to 100%, and the other groups were compared to it. From cell viability above 70%, non-cytotoxic concentration was considered for evaluation in the following studies.

2.9 Antiviral assays

The antiviral activity of NEs determined by the tissue culture infectious dose reduction assay (TCID). Briefly, a series of dilutions of the initial MHV-3 titer was performed in DMEM cell culture medium (from 1:10,000 virus dilution to 1:10) and mixed with safe concentrations of NEs (1% 1:100 ~14 µg/mL NE-CUR or NE-QUE and ~ 0.65 µg/mL NE-CQ, i.e.). Virus and NEs mixtures were incubated for 1 hour at room temperature. The growth medium was removed from the previously prepared cell culture plates, and 0.1 ml of virus and NEs mixture was added to the cell monolayer, then the plates were incubated at 37 °C for 24h. The untreated virus was included in each plate as a control. NE without actives (NE-blank) was also used as a viral growth control. Finally, the TCID₅₀ was calculated as proposed by Reed and Muench [54], and the percent reduction of virus was recorded as follows:

$$\text{Viral inhibition (\%)} = \frac{\text{viral count of untreated cells} - \text{viral count of treated cells}}{\text{viral count of untreated cells}} \times 100 \quad (2)$$

2.10 Surface viral inactivation assay

Viral solution containing 100000 viral particles was distributed on a previously sterilized aluminum surface measuring 5 cm x 5 cm, with the aim of simulating surface contamination and mimicking the time of contact with the skin, and left for 1 hour for fixation. Subsequently, 400 µl of NEs to be tested were added to the plate. The formulation was in contact with the virus on this surface for a specified period (1 hour), after which it was removed with filter paper. Then 400 µl of DMEM cell culture medium was applied to this surface to recover viable viral particles. The residual viral titer was measured using a TCID₅₀ according to the methodology adapted from Reed and Muench [54], on previously cultured cells L929 to assess the viability of the virus and its replication potential. The plates were incubated for 24h at 37 °C with 5% CO₂. The control groups of the study were performed without the addition of NEs and with the addition of NE without actives. The study was carried out in triplicate with repetition on different days, with an acceptable experimental deviation of ± 0.5 log₁₀ considering a cell culture system and virus.

3. Results

3.1. Preparation and characterization of NEs

The proposed method for the development of the formulations led to the formation of stable NEs capable of encapsulating CUR and QUE efficiently, with the recovery rate of the actives at the end of the development being always higher than 85%. The NEs had an average particle size of 400 nm with polydispersity index lower than 0.3 and a zeta potential close to -30 mV, as shown in Table 2.

Table 2: Average particle size, polydispersity index, zeta potential, drug loading and recovery

Formulation	Average Particle Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	Drug Loading (mg/mL)	Recovered Drug Content (%)
NE-Blank	394.55 ± 7.5	0.27 ± 0.01	-34.9 ± 0.77	-	-
NE-CUR	388.5 ± 2.4	0.25 ± 0.04	-28.5 ± 0.41	1.36 ± 0.05	90.8 %
NE-QUE	435.9 ± 3.5	0.28 ± 0.01	-34.1 ± 0.10	1.38 ± 0.03	91.8 %
NE-CQ ¹	396.45 ± 7.5	0.25 ± 0.03	-39.7 ± 0.53	CUR 0.64 ± 0.02 QUE 0.66 ± 0.02	CUR 84.8 % QUE 88.4 %

¹ CQ – Curcumin+quercetin

3.2 Ex vivo porcine nasal mucosa permeation and retention test

After four hours of experiment, no significant amounts of actives were found in the receiving medium. The mucous membranes were cleaned and subjected to an overnight extraction process. After the extraction process of the compounds retained in the mucosa, the solutions were filtered and analyzed by HPLC. The values found for retained compounds in the porcine nasal mucosa were expressed as amount per surface area unit ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). In this test, there were different concentrations of retention found between the formulations shown in Figure 1, with the average values being: NE-QUE 3.67 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, NE-CUR 2.73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and NE-CQ 1.57 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ QUE and 1.67 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ CUR.

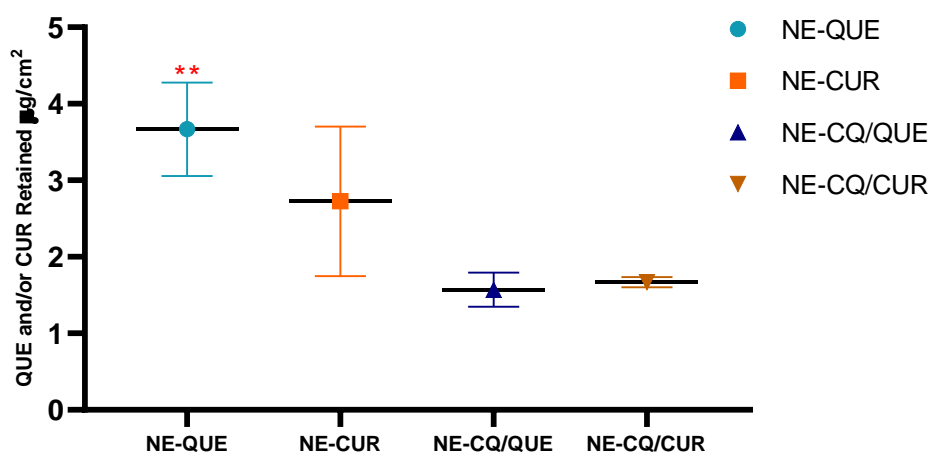


FIGURE 1. Mass of QUE and CUR retained in porcine nasal mucosa after 4 h of permeation test in Franz-type diffusion cell. The compounds were extracted with methanol overnight. **Statistically significant compared with NE-CQ/QUE at $p < 0.05$ (Ordinary one-way ANOVA of using graphPad prism 8.0.2)

3.3 Antiviral activity

3.3.1. Cell cytotoxicity

Cell viability higher than 70% was found in the NEs CUR, QUE, and CQ from the dilution of 1.25 %, as seen in Figure 2, corresponding to the concentration of 17.5 µg/mL of active compound for NE-CUR or NE-QUE and 8.13 µg/mL of both natural compounds for NE-CQ. The blank NE had a cytotoxic concentration lower than 70% already for dilutions 2.5%, but it was used in the same dilution of the NEs containing the natural compounds. Thus, in order to use safe dilutions of NEs, their dilution was fixed to 1% for all the antiviral studies.

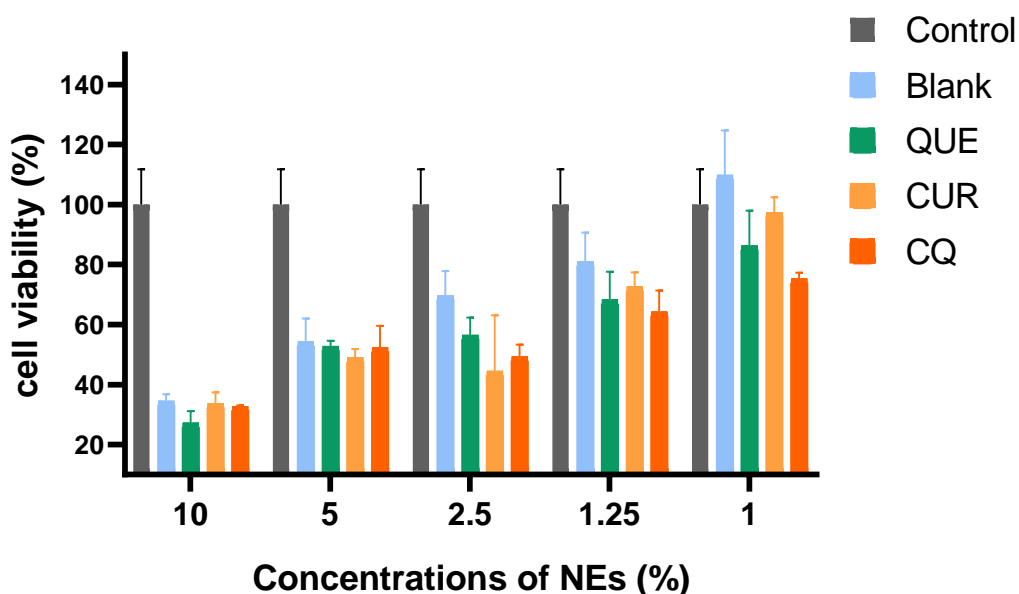


FIGURE 2: Cytotoxicity assay of the tested compounds in L929 cells. The cytotoxicity of NE-Blank, NE-QUE, NE-CUR and NE-CQ based on the dose–response was determined using SRB, the control group was normalized to 100% and the other groups compared to him.

3.3.2. Antiviral assays

The NEs QUE and CQ showed similar viral inhibitory activity, with $\geq 99.00\%$ corresponding to ≥ 2.0 log 10 reduction in the virus titer. NE-CUR, on the other hand, showed a greater viral inhibitory capacity, providing an viral inhibitory percentage $\geq 99.68\%$ corresponding to ≥ 2.5 log 10 reduction. Interestingly, NE-Blank did not show any viral inhibitory activity, Table 3.

Table 3: Reduction of viral particles

Formulation	Reduction of Viral Particles (log10)	Viral Particle Reduction (%)
Control	-	-
NE-Blank	-	-
NE-CUR	2.5	99.68 %
NE-QUE	2.0	99.00 %
NE-CQ	2.0	99.00 %

3.3.3. Surface viral inactivation assay

In this test, the NEs were added directly to the surface contaminated by the virus and without any contact with the cells. The NEs were removed after 1 hour contact with viral particles. In this surface viral inactivation assay, the NEs QUE and CQ showed a greater capacity for viral inhibition, corresponding to $\geq 96.83\%$ virucidal activity against MHV-3, corresponding to ≥ 1.5 log 10 reductions in the virus titer, whereas NE-CUR showed a lower inhibitory activity corresponding to $\geq 90.00\%$ virucidal activity against MHV-3, corresponding to ≥ 1.0 log 10 reductions in virus titer, Table 4.

Table 4: Viral reduction, surface viral inactivation assay

Formulation	Mean viral particles (log10)	Reduction of viral particles (log10)	Viral particle reduction (%)
Control	$10^{5.0}$	-	-
NE-Blank	$10^{3.5}$	-	-
NE-CUR	$10^{2.5}$	1.0	90.00 %
NE-QUE	$10^{2.0}$	1.5	96.83 %
NE-CQ	$10^{2.0}$	1.5	96.83 %

4. Discussion

In the present study, we investigated the potential *in vitro* antiviral effects of QUE and CUR co-encapsulated in nanoemulsions (NEs) against the MHV-3 strain, a murine betacoronavirus (β -Cov) that was used as a model of viral particles belonging to the same family of SARS-CoV-2. The current study showed several novel findings; our results demonstrate that it was possible efficiently co-encapsulate CUR and QUE in NEs with a good drug loading and final

concentration of the two natural compounds. The nanoemulsion showed adequate size for intranasal administration that allows CUR and QUE to be only retained in the nasal mucosa. Interestingly, no drug permeation was detected for any of the two natural compounds, indicating that they could be used for local treatment. But more significantly, the drug-loaded NEs showed a remarkable viral inhibitory capacity, up to 99%, even if they were employed at a dilution 1:100 of the initial concentration.

To achieve a higher efficacy, the selection of the components of the formulation are important since each component can contribute with distinct mechanisms of action. QUE demonstrated *in vitro* dose-dependent activity against herpes simplex virus HSV-1 and HSV-2 and showed inhibitory anti-cytopathic effects to damages caused by various serotypes of rhinovirus, echovirus, coxsackievirus, and poliovirus type 1 Sabin [55]. This compound has also demonstrated potential against the SARS virus due to its ability to interfere with various stages of the coronavirus entry and replication cycles such as PLpro, 3CLpro, and NTPase/helicase. Molecular docking analysis also found that QUE binds to spike protein, as well as to viral RdRp, and PLpro enzymes [55]. On the other hand, studies have suggested that CUR is able to inhibit HCV, Zika, and chikungunya viral replication during the binding and fusion stages [56,57]. Additionally, CUR affects virus replication machinery by reducing the activity of integrase of HIV- 1 [58] and affects viral replication as well as adsorption mechanisms on infectious SARS-CoV-2 in a dose-dependent fashion [59].

Based on these properties described in the literature of QUE and CUR, we decided to investigate a combination of these agents loaded in NEs as an adjuvant therapy for viral infections. Some studies were performed using the compounds in association with the free form. Ujjan *et al.* [60] assessed the possible treatment benefits of a combined curcumin and quercetin (CUR-QUE) oral supplementation for early-stage COVID-19 infection. After one week of treatment, most of the patients in the CUR-QUE group showed an expedited clearance of the viral infection, *i.e.* 18 (72.0%) vs. 6 (24.0%) patients in the control group tested negative for SARS-CoV-2 in the nasal-oro-pharyngeal swab reverse transcription polymerase chain reaction (RT- PCR) analysis. In addition, COVID-19-associated acute symptoms were also speedily resolved in the CUR-QUE

treated patients, *i.e.* 10 (40.0%) vs. 4 (16.0%) patients in the control group. Also, the CUR-QUE supplementation therapy was well-tolerated by all 25 patients, and no treatment emergent effects or serious adverse events were reported. Kumar Verma *et al.* [61] aimed to identify molecules from medicinal plants that may inhibit SARS-CoV-2 by acting on the major target proteins such as spike protein, main protease, angiotensin-converting enzyme-2, furin, and RdRp. The obtained results by molecular docking, molecular dynamic simulation, binding free energy calculations, pharmacophore model, and structure-based alignment methods showed that CUR, gingerol, and QUE may work against COVID-19.

However CUR and QUE own high first-pass metabolism and limited absorption. They are unstable and metabolized by photo and oxidative degradation routes. Therefore, many novel drug delivery systems have been prepared to overcome these drawbacks. Furthermore, co-encapsulation and co-delivery of bioactive molecules are other strategies to overcome drug delivery deficiencies or to improve therapeutic efficiencies against resistant pathogens by the synergistic effects [62].

In our study, we choose to co-encapsulate QUE and CUR in NEs for intranasal administration. Considering the first location of viral infections occurred in the upper airways mucosa or lung of most patients, and most oral drugs can't attain sufficient anti-viral concentration, the *in situ* drug administration by a nasal spray could provide a locally effective dose [63].

During the development and characterization of the NEs, the loading capacity of QUE was greater than CUR when encapsulated alone. In NE-CQ, the concentrations of the two compounds were very close, indicating that the loading capacity of the compounds was influenced by co-encapsulation. Another important factor to consider in the developed NEs was the size around 400 nm, which can interfere in the release of QUE and CUR and in the permeation capacity. Corroborating our suggestion that size influences permeation capacity, the study of Vaz *et al.* [64] showed that NE-CUR with a maximum mean size of 40 nm about 10 times lower than those in our study, had a permeation capacity in porcine nasal mucosa after four hours under the same conditions this study.

As the purpose of our study is to help treat and prevent viral infection and avoid possible complications caused by viral respiratory infection, intranasal administration is preferable. However, due to the constant mucociliary activity of the respiratory epithelium, the formulation must have a sufficient affinity to diffuse through the mucosa, remaining available at the site [65]. Studies have explored the intranasal route for different types of drug delivery due to anatomical and tissue characteristics of the nasal cavity [66]. For systemic delivery, for the administration of vaccines [67,68], and for administering therapies to the central nervous system for the treatment of neurological disorders [50,64,69]. But even so, its main use has been to treat local symptoms, mainly those resulting from allergies, pathogens, and external particles that cause irritation, and inflammation in the mucosa. For this, formulations containing decongestants, antihistamines and anti-inflammatories such as glucocorticoids are widely used [67,70].

The strategies used for the development of nasal formulations took into account the type of drug used and the intended place of delivery based on pharmacopeias (European [71], USP [72], and Brazilian [73]) do not show characterization methods for local or systemic nasal formulations regarding the most indicated particle size. The literature showed that for local administration they must show predominant nasal deposition. In this sense, our results showed that QUE and CUR were retained in the nasal mucosa and no permeated, indicating an excellent behavior in view of a local administration. As CUR and QUE, can act as mediators of the most common mechanisms of inflammation that are associated with exacerbation of allergic symptoms [74–76], we believe that their use by the intranasal route and its retention in the mucosa will not be a problem and may also contribute to the reduction of local inflammation.

Our studies also evaluated the virucidal capacity of the formulations, verifying whether they inhibit the virus already before the infection. For this, the virus was pre-treated for one hour with the NEs. As a result, the formulations in contact with the viral particles inhibited their subsequent entry into the cells [77,78].

Some studies have already evaluated the antiviral capacity of QUE, as in the study by Hung *et al.* [79] that evaluated the ability of *Houttuynia cordata* aqueous extract to inhibit the initial stages of Herpes Simplex Virus (HSV-1)

infection. The main components of this extract are flavonoids, QUE, and its glycosides. In this study, the extract showed a potent viral inhibitory activity, and to determine at which stage of viral infection these compounds act, the pure components were analyzed by plaque reduction assays with virus pre-treatment (2 h of contact). QUE at the concentration of 52.9 µg/ml showed $\geq 50\%$ inhibition of 10^6 pfu/ml of HSV-1. Proving to be the main compound of this extract responsible for inhibiting the initial processes of this viral infection.

The study realized by Chiow *et al.* [80] also evaluated the antiviral activities of *Houttuynia cordata* aqueous extract and isolated QUE. In this study, the antiviral activity was evaluated against the MHV-3 strain, the virus that causes mouse hepatitis, a β -COV, like SARS-COV and MERS-COV. The minimum inhibitory concentration of QUE for a 50% reduction of viral load from MHV-3 10^5 pfu/mL was 125 µg/mL. The experimental strategy of the study was to investigate the extract's prophylactic antiviral effects. The compounds interacted with the viruses for one hour before their introduction into the cells. Our study with NE-QUE was performed in the same conditions, with pretreatment of the virus for one hour. However, in Chiow study, a concentration of 125 µg/mL of quercetin was necessary to achieve the viral inhibitory activity. The concentration of cellular cytotoxicity equivalent to 50% (CC50) was 116.52 µg/mL, very close to the concentration of antiviral activity. In our experiment performed with NE-QUE using the same virus as a model, viral inhibition was achieved with a concentration of 14 µg/mL, and the CC50% of NE-QUE was 35 µg/mL. Thus, it was observed that NE-QUE showed lower cellular cytotoxicity and higher viral inhibition with a much lower concentration, suggesting a better activity of QUE in the nanoencapsulated form. According to Chiow study, QUE can inhibit the H⁺-ATPase pump of the lysosomal membrane and thus prevent the removal of the virus coat. This may indicate that QUE has an antiviral potential that should be explored for its use in antiviral therapies, and even that it could be used against β -CoVs.

Studies have also evaluated the antiviral potential of CUR. Li *et al.* [81] analyzed the antiviral and virucidal effects of CUR against transmissible gastroenteritis virus (TGEV), an α -COV that infects swine. To evaluate the antiviral potential the cells were treated with different concentrations of CUR for

one hour and subsequently infected with TGEV strain WH-1 (0.1 mol). To evaluate the virucidal potential of CUR, virus was incubated with different concentrations of CUR for two hours and subsequently titrated. Data were reported as TCID₅₀. The greatest reduction in TGEV titers was found in the virucidal assay, when the virus was pre-incubated with CUR, suggesting that CUR affects TGEV infection at the time of adsorption/penetration. The study showed that CUR has direct inactivation effects on TGEV as well as robust antiviral abilities that primarily interfere with the adsorption stage in the TGEV life cycle. Corroborating with the information from our study, the pre-treatment of the virus with NE-CUR showed a greater antiviral capacity than in the surface virucidal experiment, after the viral particles have adhered to the surface sterile experimentally analyzed.

The study by Mounce *et al.* [57] reported similar results when evaluating CUR against Zika and Chikungunya virus (CHIKV). Direct treatment of the virus with CUR reduced virus infectivity in a dose-dependent manner. They also evaluated the possible interference of CUR in viral replication, but through quantification of viral RNA by RT/PCR. The data suggest that CUR does not directly interfere with the replication machinery of CHIKV and that the antiviral activity of CUR probably derives from the inhibition of virus binding to the cells.

Chen *et al.* [63] has confirmed that the viral interfering capacity of CUR differs between enveloped and non-enveloped viruses. The study confirmed that CUR showed inhibitory capacity in viral strains of influenza A, and as a control, they performed the tests with the strain EV71 a non-enveloped enterovirus. They observed that the infectivity of EV71 remained unchanged in presence of CUR, suggesting that CUR exerts a general inhibitory effect on viruses with an envelope. In our study, we used a β -CoV, enveloped virus, and NE-CUR and NE-CQ showed both antiviral activity, confirming reports already found and suggesting that their use for this viral type may be promising.

Our data indicate that CUR and QUE can interfere with viral adsorption to the nasal mucosa, and according to studies reported in the literature, they can act on different structures of the viral envelope, demonstrating that their co-encapsulation in NEs can be advantageous in the prevention of viral adsorption and replication (Figure 3).

However, additional studies with other viral species are necessary, as well as in vivo assays, so that we could better understand the viral inhibitory mechanisms and their potential to prevent and/or treat viral respiratory infections.

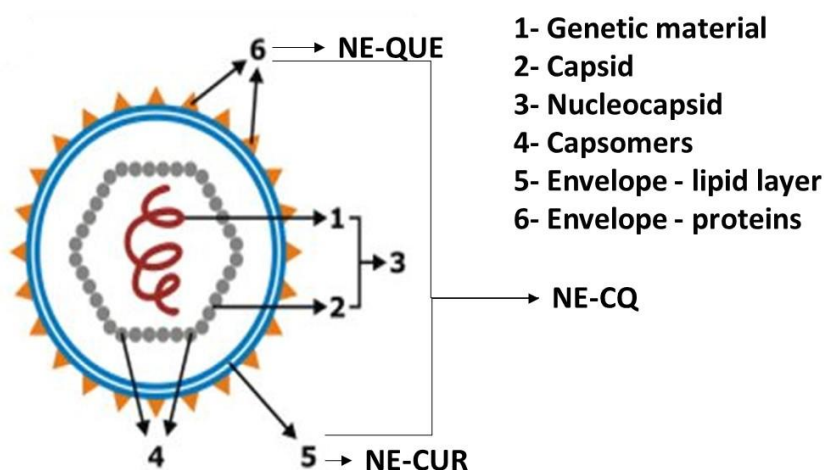


FIGURE 3: Enveloped viruses and their structures, highlighting possible sites of action for NE-QUE, NE-CUR and NE-CQ

5. Conclusions

It was possible to develop NEs co-encapsulating QUE and CUR with adequate particle size for local delivery. The retention test indicated that the compound might have the capacity to remain in the mucosa providing local protection at the site of entry of viral particles. The analyses of the antiviral activity of NE-QUE and NE-CUR demonstrated that the compounds can inhibit the entry process of viruses into cells and that together in NE-CQ they can provide a simultaneous protective effect, working together to treat and prevent viral adsorption and even decrease local inflammatory responses.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Table 5S1: Chromatographic conditions for elution of solvents in gradient mode – HPLC; Table 6S2: Data related to the LOD, LOQ, slope, and interception for curcumin and quercetin spectrophotometer analysis method.

Table 5S1: Chromatographic conditions for elution of solvents in gradient mode – HPLC

Time (min)	Eluent A (%)	Eluent B (%)	Flow rate (mL/min)
1.0	60	40	1,0
5.0	60	40	1,0
7.0	50	50	1,0
16.0	50	50	1,0

*Eluent A: Phosphoric acid 1% w/v in water, pH 2.6; Eluent B: Acetonitrile

Table 6S2: Data related to the LOD, LOQ, slope, and interception for curcumin and quercetin spectrophotometer analysis method.

	Parameters	Validation Results
Curcumin	Linearity	Calibration range (µg/mL): 0.5–10 $y = 0.1179x + 0.0345$ $R^2 = 0.9935$
	LOD	0.062 µg/mL
	LOQ	0.189 µg/mL
	SLOP	0.1179 ± 0.0060
	Intercept	-0.0345 ± 0.0023
Quercetin	Linearity	Calibration range (µg/mL): 0.5–12.5 $y = 0.0763x - 0.0077$ $R^2 = 0.9998$
	LOD	0.143 µg/mL
	LOQ	0.433 µg/mL
	SLOP	0.0763 ± 0.0046
	Intercept	-0.0077 ± 0.0035

Author Contributions: D.P.V.; V.C.Y.; R.N.S.; B.F.M.; J.B.; B.F.M; F.S. and C.L.D. conceived and designed the experiments; D.P.V.; J.L.R.; V.C.Y.; F.C.G.JR.; L.L.M.M.; P.A.B.B.; G.R.V.; R.N.S.; B.F.M. and L.K. performed the experiments; D.P.V.; V.C.Y.; G.R.V.; R.N.S.; B.F.M.; J.B.; J.G.B; F.S. and C.L.D. analyzed the data; R.N.S.; B.F.M.; F.S; B.F.M; J.G.B. and C.L.D. contributed reagents/materials/analysis tools. D.P.V.; V.C.Y.; R.N.S.; B.F.M.; F.S. and C.L.D. Cristiana Lima Dora., writing—original draft preparation; D.P.V.; G.R.V.; F.S. and C.L.D., writing—review and editing; D.P.V.; F.S. and C.L.D., visualization; J.B.; B.F.M.; F.S., and C.L.D., supervision; B.F.M; J.G.B; A.L.M.B; A.L.M.B; J.B.; F.S., and C.L.D. project administration and funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by National Council for Scientific and Technological Development PQ2 Productivity Grant - Process 308565/2021-5

Acknowledgments: The authors thank CNPq and the CAPES for the scholarship of undergraduate students. CIA, CEME-SUL, and NanoSul of the Federal University of Rio Grande by the analyzes performed.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chen, F.; Yang, J.-R. Distinct Codon Usage Bias Evolutionary Patterns between Weakly and Strongly Virulent Respiratory Viruses. *iScience* **2022**, *25*, 103682, doi:10.1016/j.isci.2021.103682.
2. Kleinehr, J.; Wilden, J.J.; Boergeling, Y.; Ludwig, S.; Hrinčius, E.R. Metabolic Modifications by Common Respiratory Viruses and Their Potential as New Antiviral Targets. *Viruses* **2021**, *13*, 2068, doi:10.3390/v13102068.
3. Wang, C.C.; Prather, K.A.; Sznitman, J.; Jimenez, J.L.; Lakdawala, S.S.; Tufekci, Z.; Marr, L.C. Airborne Transmission of Respiratory Viruses. *Science* **2021**, *373*, eabd9149, doi:10.1126/science.abd9149.
4. Moriyama, M.; Hugentobler, W.J.; Iwasaki, A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu. Rev. Virol.* **2020**, *7*, 83–101, doi:10.1146/annurev-virology-012420-022445.
5. Kikkert, M. Innate Immune Evasion by Human Respiratory RNA Viruses. *J. Innate Immun.* **2020**, *12*, 4–20, doi:10.1159/000503030.
6. Umuhiza, T.; Oyugi, J.; Mancuso, J.D.; Ahmed, A.; Bulimo, W.D. Morbidity Burden, Seasonality and Factors Associated with the Human Respiratory Syncytial Virus, Human Parainfluenza Virus, and Human Adenovirus Infections in Kenya. *IJID Reg.* **2021**, *1*, 72–78, doi:10.1016/j.ijregi.2021.10.001.
7. Bachar, S.C.; Mazumder, K.; Bachar, R.; Aktar, A.; Al Mahtab, M. A Review of Medicinal Plants with Antiviral Activity Available in Bangladesh and Mechanistic Insight Into Their Bioactive Metabolites on SARS-CoV-2, HIV and HBV. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 732891, doi:10.3389/fphar.2021.732891.
8. Benam, K.H.; Denney, L.; Ho, L.-P. How the Respiratory Epithelium Senses and Reacts to Influenza Virus. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2019**, *60*, 259–268, doi:10.1165/rcmb.2018-0247TR.
9. Invernizzi, R.; Lloyd, C.M.; Molyneaux, P.L. Respiratory Microbiome and Epithelial Interactions Shape Immunity in the Lungs. *Immunology* **2020**, *160*, 171–182, doi:10.1111/imm.13195.
10. Guo-Parke, H.; Linden, D.; Weldon, S.; Kidney, J.C.; Taggart, C.C. Deciphering Respiratory-Virus-Associated Interferon Signaling in COPD Airway Epithelium. *Medicina (Mex.)* **2022**, *58*, 121, doi:10.3390/medicina58010121.
11. Ben-Shabat, S.; Yarmolinsky, L.; Porat, D.; Dahan, A. Antiviral Effect of Phytochemicals from Medicinal Plants: Applications and Drug Delivery Strategies. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10*, 354–367, doi:10.1007/s13346-019-00691-6.
12. Kim, C.H.; Kim, J.-E.; Song, Y.-J. Antiviral Activities of Quercetin and Isoquercitrin Against Human Herpesviruses. *Molecules* **2020**, *25*, 2379, doi:10.3390/molecules25102379.

13. Yang, X.X.; Li, C.M.; Huang, C.Z. Curcumin Modified Silver Nanoparticles for Highly Efficient Inhibition of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Nanoscale* **2016**, *8*, 3040–3048, doi:10.1039/c5nr07918g.
14. Aggarwal, B.B.; Sung, B. Pharmacological Basis for the Role of Curcumin in Chronic Diseases: An Age-Old Spice with Modern Targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 85–94, doi:10.1016/j.tips.2008.11.002.
15. Bandyopadhyay, D. Farmer to Pharmacist: Curcumin as an Anti-Invasive and Antimetastatic Agent for the Treatment of Cancer¹. *Front. Chem.* **2014**, *2*, doi:10.3389/fchem.2014.00113.
16. Nabavi, S.; Thiagarajan, R.; Rastrelli, L.; Daglia, M.; Sobarzo-Sanchez, E.; Alinezhad, H.; Nabavi, S. Curcumin: A Natural Product for Diabetes and Its Complications. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 2445–2455, doi:10.2174/1568026615666150619142519.
17. Perrone, D.; Ardito, F.; Giannatempo, G.; Dioguardi, M.; Troiano, G.; Lo Russo, L.; De Lillo, A.; Laino, L.; Lo Muzio, L. Biological and Therapeutic Activities, and Anticancer Properties of Curcumin. *Exp. Ther. Med.* **2015**, *10*, 1615–1623, doi:10.3892/etm.2015.2749.
18. Padmanaban, G.; Rangarajan, P.N. Curcumin as an Adjunct Drug for Infectious Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *37*, 1–3, doi:10.1016/j.tips.2015.09.007.
19. Kunnumakkara, A.B.; Bordoloi, D.; Padmavathi, G.; Monisha, J.; Roy, N.K.; Prasad, S.; Aggarwal, B.B. Curcumin, the Golden Nutraceutical: Multitargeting for Multiple Chronic Diseases: Curcumin: From Kitchen to Clinic. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174*, 1325–1348, doi:10.1111/bph.13621.
20. Boroumand, N.; Samarghandian, S.; Hashemy, S.I. Immunomodulatory, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Effects of Curcumin. *J. Herbmed Pharmacol.* **2018**, *7*, 211–219, doi:10.15171/jhp.2018.33.
21. Giordano; Tommonaro Curcumin and Cancer. *Nutrients* **2019**, *11*, 2376, doi:10.3390/nu1102376.
22. Karimi, A.; Ghodsi, R.; Kooshki, F.; Karimi, M.; Asghariazar, V.; Tarighat-Esfanjani, A. Therapeutic Effects of Curcumin on Sepsis and Mechanisms of Action: A Systematic Review of Preclinical Studies. *Phytother. Res.* **2019**, *33*, 2798–2820, doi:10.1002/ptr.6467.
23. Patel, S.S.; Acharya, A.; Ray, R.S.; Agrawal, R.; Raghuwanshi, R.; Jain, P. Cellular and Molecular Mechanisms of Curcumin in Prevention and Treatment of Disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 887–939, doi:10.1080/10408398.2018.1552244.
24. Wen, C.-C.; Kuo, Y.-H.; Jan, J.-T.; Liang, P.-H.; Wang, S.-Y.; Liu, H.-G.; Lee, C.-K.; Chang, S.-T.; Kuo, C.-J.; Lee, S.-S.; et al. Specific Plant Terpenoids and Lignoids Possess Potent Antiviral Activities against Severe Acute

Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4087–4095, doi:10.1021/jm070295s.

25. Praditya, D.; Kirchhoff, L.; Brüning, J.; Rachmawati, H.; Steinmann, J.; Steinmann, E. Anti-Infective Properties of the Golden Spice Curcumin. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 912, doi:10.3389/fmicb.2019.00912.

26. Jennings, M.R.; Parks, R.J. Curcumin as an Antiviral Agent. *Viruses* **2020**, *12*, 1242, doi:10.3390/v12111242.

27. Bormann, M.; Alt, M.; Schipper, L.; van de Sand, L.; Le-Trilling, V.T.K.; Rink, L.; Heinen, N.; Madel, R.J.; Otte, M.; Wuensch, K.; et al. Turmeric Root and Its Bioactive Ingredient Curcumin Effectively Neutralize SARS-CoV-2 In Vitro. *Viruses* **2021**, *13*, 1914, doi:10.3390/v13101914.

28. Marín-Palma, D.; Tabares-Guevara, J.H.; Zapata-Cardona, M.I.; Flórez-Álvarez, L.; Yepes, L.M.; Rugeles, M.T.; Zapata-Builes, W.; Hernandez, J.C.; Taborda, N.A. Curcumin Inhibits In Vitro SARS-CoV-2 Infection In Vero E6 Cells through Multiple Antiviral Mechanisms. *Molecules* **2021**, *26*, 6900, doi:10.3390/molecules26226900.

29. Bahun, M.; Jukić, M.; Oblak, D.; Kranjc, L.; Bajc, G.; Butala, M.; Bozovičar, K.; Bratkovič, T.; Podlipnik, Č.; Poklar Ulrih, N. Inhibition of the SARS-CoV-2 3CLpro Main Protease by Plant Polyphenols. *Food Chem.* **2022**, *373*, 131594, doi:10.1016/j.foodchem.2021.131594.

30. Nair, M.P.N.; Kandaswami, C.; Mahajan, S.; Chadha, K.C.; Chawda, R.; Nair, H.; Kumar, N.; Nair, R.E.; Schwartz, S.A. The Flavonoid, Quercetin, Differentially Regulates Th-1 (IFN γ) and Th-2 (IL4) Cytokine Gene Expression by Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2002**, *1593*, 29–36, doi:10.1016/S0167-4889(02)00328-2.

31. Robaszkiewicz, A.; Balcerczyk, A.; Bartosz, G. Antioxidative and Prooxidative Effects of Quercetin on A549 Cells. *Cell Biol. Int.* **2007**, *31*, 1245–1250, doi:10.1016/j.cellbi.2007.04.009.

32. Uchide, N.; Toyoda, H. Antioxidant Therapy as a Potential Approach to Severe Influenza-Associated Complications. *Molecules* **2011**, *16*, 2032–2052, doi:10.3390/molecules16032032.

33. Colunga Biancatelli, R.M.L.; Berrill, M.; Catravas, J.D.; Marik, P.E. Quercetin and Vitamin C: An Experimental, Synergistic Therapy for the Prevention and Treatment of SARS-CoV-2 Related Disease (COVID-19). *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1451, doi:10.3389/fimmu.2020.01451.

34. Salehi, B.; Machin, L.; Monzote, L.; Sharifi-Rad, J.; Ezzat, S.M.; Salem, M.A.; Merghany, R.M.; El Mahdy, N.M.; Kılıç, C.S.; Sytar, O.; et al. Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega* **2020**, *5*, 11849–11872, doi:10.1021/acsomega.0c01818.

35. Harwood, M.; Danielewska-Nikiel, B.; Borzelleca, J.F.; Flamm, G.W.; Williams, G.M.; Lines, T.C. A Critical Review of the Data Related to the Safety of

Quercetin and Lack of Evidence of in Vivo Toxicity, Including Lack of Genotoxic/Carcinogenic Properties. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 2179–2205, doi:10.1016/j.fct.2007.05.015.

36. Andres, S.; Pevny, S.; Ziegenhagen, R.; Bakhiya, N.; Schäfer, B.; Hirsch-Ernst, K.I.; Lampen, A. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, 1700447, doi:10.1002/mnfr.201700447.

37. Basnet, P.; Skalko-Basnet, N. Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules* **2011**, *16*, 4567–4598, doi:10.3390/molecules16064567.

38. Gupta, S.C.; Patchva, S.; Aggarwal, B.B. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS J.* **2013**, *15*, 195–218, doi:10.1208/s12248-012-9432-8.

39. Cheng, A.L.; Hsu, C.H.; Lin, J.K.; Hsu, M.M.; Ho, Y.F.; Shen, T.S.; Ko, J.Y.; Lin, J.T.; Lin, B.R.; Ming-Shiang, W.; et al. Phase I Clinical Trial of Curcumin, a Chemopreventive Agent, in Patients with High-Risk or Pre-Malignant Lesions. *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2895–2900.

40. Derman, S.; Uzunoglu, D.; Acar, T.; Ozbek Arasoglu, T.; Ucak, S.; Ozalp, V.; Mansuroglu, B. Antioxidant Activity and Hemocompatibility Study of Quercetin Loaded Plga Nanoparticles. *Iran. J. Pharm. Res.* **2020**, *19*, doi:10.22037/ijpr.2020.1101000.

41. Hamimed, S.; Jabberi, M.; Chatti, A. Nanotechnology in Drug and Gene Delivery. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2022**, *395*, 769–787, doi:10.1007/s00210-022-02245-z.

42. Khizar, S.; Alrushaid, N.; Alam Khan, F.; Zine, N.; Jaffrezic-Renault, N.; Errachid, A.; Elaissari, A. Nanocarriers Based Novel and Effective Drug Delivery System. *Int. J. Pharm.* **2023**, *632*, 122570, doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122570.

43. Yang, K.-C.; Lin, J.-C.; Tsai, H.-H.; Hsu, C.-Y.; Shih, V.; Hu, C.-M.J. Nanotechnology Advances in Pathogen- and Host-Targeted Antiviral Delivery: Multipronged Therapeutic Intervention for Pandemic Control. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**, *11*, 1420–1437, doi:10.1007/s13346-021-00965-y.

44. Gulati, N.; Kumar Chellappan, D.; M. Tambuwala, M.; A. A. Aljabali, A.; Prasher, P.; Kumar Singh, S.; Anand, K.; Sharma, A.; Kumar Jha, N.; Gupta, G.; et al. Oral Nanoemulsion of Fenofibrate: Formulation, Characterization, and *In Vitro* Drug Release Studies. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **2021**, *19*, 246–261, doi:10.1089/adt.2021.012.

45. Mishra, D.K.; Shandilya, R.; Mishra, P.K. Lipid Based Nanocarriers: A Translational Perspective. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2018**, *14*, 2023–2050, doi:10.1016/j.nano.2018.05.021.

46. Chenthamara, D.; Subramaniam, S.; Ramakrishnan, S.G.; Krishnaswamy, S.; Essa, M.M.; Lin, F.-H.; Qoronfleh, M.W. Therapeutic Efficacy of Nanoparticles

and Routes of Administration. *Biomater. Res.* **2019**, *23*, 20, doi:10.1186/s40824-019-0166-x.

47. Mitchell, M.J.; Billingsley, M.M.; Haley, R.M.; Wechsler, M.E.; Peppas, N.A.; Langer, R. Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 101–124, doi:10.1038/s41573-020-0090-8.

48. Tayeb, H.H.; Felimban, R.; Almaghrabi, S.; Hasaballah, N. Nanoemulsions: Formulation, Characterization, Biological Fate, and Potential Role against COVID-19 and Other Viral Outbreaks. *Colloid Interface Sci. Commun.* **2021**, *45*, 100533, doi:https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100533.

49. Vaz, G.R.; Carrasco, M.C.F.; Batista, M.M.; Barros, P.A.B.; Oliveira, M. da C.; Muccillo-Baisch, A.L.; Yurgel, V.C.; Buttini, F.; Soares, F.A.A.; Cordeiro, L.M.; et al. Curcumin and Quercetin-Loaded Lipid Nanocarriers: Development of Omega-3 Mucoadhesive Nanoemulsions for Intranasal Administration. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 1073, doi:10.3390/nano12071073.

50. Kakad, S.P.; Gangurde, T.D.; Kshirsagar, S.J.; Mundhe, V.G. Nose to Brain Delivery of Nanosuspensions with First Line Antiviral Agents Is Alternative Treatment Option to Neuro-AIDS Treatment. *Heliyon* **2022**, *8*, e09925, doi:10.1016/j.heliyon.2022.e09925.

51. Vaz, G.R.; Clementino, A.; Bidone, J.; Villetti, M.A.; Falkembach, M.; Batista, M.; Barros, P.; Sonvico, F.; Dora, C. Curcumin and Quercetin-Loaded Nanoemulsions: Physicochemical Compatibility Study and Validation of a Simultaneous Quantification Method. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1650.

52. Orellana, E.; Kasinski, A. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *BIO-Protoc.* **2016**, *6*, doi:10.21769/BioProtoc.1984.

53. Vichai, V.; Kirtikara, K. Sulforhodamine B Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1112–1116, doi:10.1038/nprot.2006.179.

54. Reed, L.J.; Muench, H. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹². *Am. J. Epidemiol.* **1938**, *27*, 493–497, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.

55. Agrawal, P.K.; Agrawal, C.; Blunden, G. Quercetin: Antiviral Significance and Possible COVID-19 Integrative Considerations. *Nat. Prod. Commun.* **2020**, *15*, 1934578X2097629, doi:10.1177/1934578X20976293.

56. Anggakusuma; Colpitts, C.C.; Schang, L.M.; Rachmawati, H.; Frentzen, A.; Pfaender, S.; Behrendt, P.; Brown, R.J.P.; Bankwitz, D.; Steinmann, J.; et al. Turmeric Curcumin Inhibits Entry of All Hepatitis C Virus Genotypes into Human Liver Cells. *Gut* **2014**, *63*, 1137–1149, doi:10.1136/gutjnl-2012-304299.

57. Mounce, B.C.; Cesaro, T.; Carrau, L.; Vallet, T.; Vignuzzi, M. Curcumin Inhibits Zika and Chikungunya Virus Infection by Inhibiting Cell Binding. *Antiviral Res.* **2017**, *142*, 148–157, doi:10.1016/j.antiviral.2017.03.014.

58. Mazumder, A.; Raghavan, K.; Weinstein, J.; Kohn, K.W.; Pommier, Y. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Integrase by Curcumin. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1165–1170, doi:10.1016/0006-2952(95)98514-A.
59. Goc, A.; Rath, M.; Niedzwiecki, A. Composition of Naturally Occurring Compounds Decreases Activity of Omicron and SARS-CoV-2 RdRp Complex. *Eur. J. Microbiol. Immunol.* **2022**, *12*, 39–45, doi:10.1556/1886.2022.00009.
60. Ujjan, I.D.; Khan, S.; Nigar, R.; Ahmed, H.; Ahmad, S.; Khan, A. The Possible Therapeutic Role of Curcumin and Quercetin in the Early-Stage of COVID-19—Results from a Pragmatic Randomized Clinical Trial. *Front. Nutr.* **2023**, *9*, 1023997, doi:10.3389/fnut.2022.1023997.
61. Kumar Verma, A.; Kumar, V.; Singh, S.; Goswami, B.Ch.; Camps, I.; Sekar, A.; Yoon, S.; Lee, K.W. Repurposing Potential of Ayurvedic Medicinal Plants Derived Active Principles against SARS-CoV-2 Associated Target Proteins Revealed by Molecular Docking, Molecular Dynamics and MM-PBSA Studies. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *137*, 111356, doi:10.1016/j.biopha.2021.111356.
62. Sadeghi Ghadi, Z.; Dinarvand, R.; Asemi, N.; Talebpour Amiri, F.; Ebrahimnejad, P. Preparation, Characterization and in Vivo Evaluation of Novel Hyaluronan Containing Niosomes Tailored by Box-Behnken Design to Co-Encapsulate Curcumin and Quercetin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *130*, 234–246, doi:10.1016/j.ejps.2019.01.035.
63. Chen, T.-Y.; Chen, D.-Y.; Wen, H.-W.; Ou, J.-L.; Chiou, S.-S.; Chen, J.-M.; Wong, M.-L.; Hsu, W.-L. Inhibition of Enveloped Viruses Infectivity by Curcumin. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62482, doi:10.1371/journal.pone.0062482.
64. Vaz, G.R.; Hädrich, G.; Bidone, J.; Rodrigues, J.L.; Falkembach, M.C.; Putaux, J.-L.; Hort, M.A.; Monserrat, J.M.; Varela Junior, A.S.; Teixeira, H.F.; et al. Development of Nasal Lipid Nanocarriers Containing Curcumin for Brain Targeting. *J. Alzheimers Dis.* **2017**, *59*, 961–974, doi:10.3233/JAD-160355.
65. Baumann, D.; Bachert, C.; Högger, P. Development of a Novel Model for Comparative Evaluation of Intranasal Pharmacokinetics and Effects of Anti-Allergic Nasal Sprays. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80*, 156–163, doi:10.1016/j.ejpb.2011.09.003.
66. Scherließ, R. Nasal Formulations for Drug Administration and Characterization of Nasal Preparations in Drug Delivery. *Ther. Deliv.* **2020**, *11*, 183–191, doi:10.4155/tde-2019-0086.
67. Hartwell, B.L.; Melo, M.B.; Xiao, P.; Lemnios, A.A.; Li, N.; Chang, J.Y.H.; Yu, J.; Gebre, M.S.; Chang, A.; Maiorino, L.; et al. Intranasal Vaccination with Lipid-Conjugated Immunogens Promotes Antigen Transmucosal Uptake to Drive Mucosal and Systemic Immunity. *Sci. Transl. Med.* **2022**, *14*, eabn1413, doi:10.1126/scitranslmed.abn1413.

68. Xu, H.; Cai, L.; Hufnagel, S.; Cui, Z. Intranasal Vaccine: Factors to Consider in Research and Development. *Int. J. Pharm.* **2021**, *609*, 121180, doi:10.1016/j.ijpharm.2021.121180.
69. Jiang, Y.; Jiang, Y.; Ding, Z.; Yu, Q. Investigation of the “Nose-to-Brain” Pathways in Intranasal HspA Nanoemulsions and Evaluation of Their in Vivo Pharmacokinetics and Brain-Targeting Ability. *Int. J. Nanomedicine* **2022**, *Volume 17*, 3443–3456, doi:10.2147/IJN.S369978.
70. Marx, D.; Williams, G.; Birkhoff, M. Intranasal Drug Administration — An Attractive Delivery Route for Some Drugs. In *Drug Discovery and Development - From Molecules to Medicine*; Vallisuta, O., Olimat, S., Eds.; InTech, 2015 ISBN 978-953-51-2128-2.
71. EMA Pharmaceutical Quality of Inhalation and Nasal Products - Scientific Guideline Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/pharmaceutical-quality-inhalation-nasal-products-scientific-guideline> (accessed on 28 February 2023).
72. Research, C. for D.E. and Nasal Spray and Inhalation Solution, Suspension, and Spray Drug Products--Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation Available online: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nasal-spray-and-inhalation-solution-suspension-and-spray-drug-products-chemistry-manufacturing-and> (accessed on 28 February 2023).
73. Pereira, P.R.T. Ministério da Saúde, INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 33, DE 16 DE ABRIL DE 2019 -Dispõe sobre os ensaios de desempenho in vitro de medicamentos nasais e inalatórios orais, nos termos da Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 278, de 16 de abril de 2019,.
74. Hou, D.-D.; Zhang, W.; Gao, Y.-L.; Sun, Y.; Wang, H.-X.; Qi, R.-Q.; Chen, H.-D.; Gao, X.-H. Anti-Inflammatory Effects of Quercetin in a Mouse Model of MC903-Induced Atopic Dermatitis. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *74*, 105676, doi:10.1016/j.intimp.2019.105676.
75. Cheng, S.-C.; Huang, W.-C.; S. Pang, J.-H.; Wu, Y.-H.; Cheng, C.-Y. Quercetin Inhibits the Production of IL-1 β -Induced Inflammatory Cytokines and Chemokines in ARPE-19 Cells via the MAPK and NF-KB Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2957, doi:10.3390/ijms20122957.
76. Hewlings, S.; Kalman, D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods* **2017**, *6*, 92, doi:10.3390/foods6100092.
77. Roshdy, W.H.; Rashed, H.A.; Kandeil, A.; Mostafa, A.; Moatasim, Y.; Kutkat, O.; Abo Shama, N.M.; Gomaa, M.R.; El-Sayed, I.H.; El Guindy, N.M.; et al. EGYVIR: An Immunomodulatory Herbal Extract with Potent Antiviral Activity against SARS-CoV-2. *PLOS ONE* **2020**, *15*, e0241739, doi:10.1371/journal.pone.0241739.
78. Anderson, D.E.; Sivalingam, V.; Kang, A.E.Z.; Ananthanarayanan, A.; Arumugam, H.; Jenkins, T.M.; Hadjiat, Y.; Eggers, M. Povidone-Iodine

Demonstrates Rapid In Vitro Virucidal Activity Against SARS-CoV-2, The Virus Causing COVID-19 Disease. *Infect. Dis. Ther.* **2020**, *9*, 669–675, doi:10.1007/s40121-020-00316-3.

79. Hung, P.-Y.; Ho, B.-C.; Lee, S.-Y.; Chang, S.-Y.; Kao, C.-L.; Lee, S.-S.; Lee, C.-N. Houttuynia Cordata Targets the Beginning Stage of Herpes Simplex Virus Infection. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0115475, doi:10.1371/journal.pone.0115475.

80. Chiow, K.H.; Phoon, M.C.; Putti, T.; Tan, B.K.H.; Chow, V.T. Evaluation of Antiviral Activities of Houttuynia Cordata Thunb. Extract, Quercetin, Quercetrin and Cinanserin on Murine Coronavirus and Dengue Virus Infection. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *9*, 1–7.

81. Li, Y.; Wang, J.; Liu, Y.; Luo, X.; Lei, W.; Xie, L. Antiviral and Virucidal Effects of Curcumin on Transmissible Gastroenteritis Virus in Vitro. *J. Gen. Virol.* **2020**, *101*, 1079–1084, doi:10.1099/jgv.0.001466.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.