



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

VERONICA SANTANA DE FREITAS BLANCO

**EXTRAÇÃO DE ESPILANTOL NO CONTEXTO DA QUÍMICA VERDE
E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA MUCOSITE ORAL**

PIRACICABA

2018

VERONICA SANTANA DE FREITAS BLANCO

**EXTRAÇÃO DE ESPILANTOL NO CONTEXTO DA QUÍMICA VERDE
E SUA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DA MUCOSITE ORAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, na Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VERONICA SANTANA DE FREITAS BLANCO E ORIENTADA PELO PROF. DR. RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

Piracicaba

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2014/06461-2; CAPES, 6211/2015-01
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7506-4717>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Freitas-Blanco, Veronica Santana de, 1983-
F884e Extração de espilantol no contexto da química verde e sua aplicação no tratamento da mucosite oral / Veronica Santana de Freitas Blanco. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Espilantol. 2. Mucosite. 3. Química verde. 4. Extração com fluído supercrítico. I. Rodrigues, Rodney Alexandre Ferreira, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Extraction of spilanthol in the context of green chemistry and its application in the treatment of oral mucositis

Palavras-chave em inglês:

Spilanthol

Mucositis

Green chemistry

Supercritical fluid extraction

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Doutora em Odontologia

Banca examinadora:

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues [Orientador]

Severino Matias de Alencar

Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi

Maria Cristina Volpato

Michelle Franz Montan Braga Leite

Data de defesa: 19-02-2018

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 19 de Fevereiro de 2018, considerou a candidata VERONICA SANTANA DE FREITAS BLANCO aprovada.

PROF. DR. RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

PROF. DR. SEVERINO MATIAS DE ALENCAR

PROF^a. DR^a. FERNANDA OLIVEIRA DE GASPARI DE GASPI

PROF^a. DR^a. MARIA CRISTINA VOLPATO

PROF^a. DR^a. MICHELLE FRANZ MONTAN BRAGA LEITE

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho e me conceder a graça de conhecer pessoas maravilhosas que tanto me ajudaram nesta jornada.

Agradeço ao Felipe, meu esposo, pelo apoio e companheirismo durante todos estes anos de estudo. Você foi essencial para que eu conseguisse concluir este trabalho.

Agradeço a minha mãe, Mara, e ao meu pai João (*In memoriam*) por terem sempre me incentivado a estudar e a buscar meus objetivos. Agradeço também o apoio dado pelas minhas irmãs Nayara e Mariana e também ao meu irmão Flávio, a todos os meus tios, tias, primos e primas e todos os demais familiares que perto ou longe, demonstraram seu carinho.

Ao Prof. Dr. Rodney, pela orientação e amizade ao longo do mestrado e doutorado. Aprendi muitas coisas e sou extremamente grata por isso. Agradeço também ao Prof. Dr. João Ernesto pela orientação e por ter me ajudado sempre que precisei.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques e também ao Programa de Pós Graduação em Odontologia sob coordenação do Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim. Agradeço ainda a Elisa dos Santos, secretária do PPG em Odontologia e a Ana Paula Carone da CPG por terem respondido aos meus questionamentos e me ajudado da melhor forma possível.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA sob diretoria da Dra. Carolina María Rodríguez Zuccolillo e da Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte.

Meu profundo agradecimento aos Professores que desempenharam papel importante na realização desta tese, Fernando Cabral, Júlio Pastre, Marco Chaud, Antônio Gilberto Ferreira, Vera Garcia, Marili Rodrigues, Michelle Franz, Ramiro Murata, Adilson Sartoratto, Karin Monteiro, Fernanda Gaspi, Francisco Groppo, Cínthia Tabchoury, Maria Cristina Volpato, Pedro Rosalen, Patrícia Oliveira, Carmen Queiroga, Mary Ann Foglio, Ana Lúcia Ruiz, Glyn Figueira, Illo Montanari Jr e

Benício Pereira. Agradeço também aos Professores que contribuíram na etapa de qualificação deste trabalho, Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior, Dr. Adilson Sartoratto e ao Prof. Dr. Julian Martinez.

Aos meus amigos de laboratório e de pós-graduação, agradeço pela amizade, sugestões e toda ajuda que me deram durante esses anos. Serei sempre grata a Laís Yamane, Isabella Alonso, Carol Maloper, José Klier, Ângela Granados, Carol Spindola, Ícaro Zellioli, Ilza Oliveira, Katyri Paganotti, Carolina Brintrup, Lúcia Braga, Ellen Oliveira, Sirlene Tinti, Rosanna Basting, Bruno Muniz, Bruno Nani, Josy Lazarini, Luciano Serpe, Bruna Benso, Jonny Burga, Laila Facin, Irlan Almeida, Felipe Lloret, Layani Mourão, Adriana Oliveira, Bruna Zancopé, Juliana Noguti, Leila Giarola, Larissa Shiozawa, Núbia Almeida, Mariana Cechetto, Vanessa Souza, Elloisa Muller, Natália Niizu, Paula Paiva, Paula Monteiro, Patrícia Zago, Rogério Grando e Fabrício Favero.

Aos meus amigos queridos, que também me deram muito apoio, fica aqui registrado meu agradecimento a Rafael Camargo, Erick Dhandon, Luiz Albiero, Ricardo Alvarez, Bianca Megiatto, Rafael Nava, Veronika Reichenberger, André Gerotto, Bruna Fatoretto, Rodrigo Marçura, Bianca Foguel, Fernanda Marques, Andreza Zuntini, Nei Kloss, Flaviano Diniz, Rodrigo Teixeira, Rodrigo Anselmo, Gisele dos Santos e Marina Padilla.

Ao apoio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de concessão de bolsa de doutorado, processo nº 2014/06461-2. Agradeço também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de doutorado sanduíche – processo nº 6211/2015-01.

Por fim, agradeço ao Calvin e Haroldo, pela companhia constante durante a escrita desta tese.

RESUMO

A extração de compostos de matrizes vegetais geralmente é associada à utilização de solventes orgânicos tóxicos, que como consequência, geram resíduos com grande impacto ambiental e custo operacional elevado. Por esta razão, a utilização de processos que eliminem ou minimizem o uso de solventes orgânicos, como a extração por fluido supercrítico utilizando CO₂, é de grande interesse. O espilantol, uma alquilamida encontrada em algumas espécies vegetais, dentre elas, a *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen possui diversas propriedades farmacológicas, como atividade anti-inflamatória, anestésica e antioxidante. Estas propriedades podem ser de grande interesse no tratamento da mucosite, um efeito colateral comum, decorrente do tratamento de pacientes com câncer submetidos a radio e quimioterapia. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi isolar o espilantol contido nas partes aéreas da *Acmella oleracea* utilizando técnicas de química verde e avaliar sua atividade anti-inflamatória em modelos *in vitro* e *in vivo*, bem como a incorporação em uma formulação mucoadesiva visando auxiliar na terapêutica da mucosite. Foi possível obter espilantol com alto grau de pureza (97%) através de extração seguida de fracionamento utilizando dióxido de carbono supercrítico, com subsequente isolamento do espilantol através de cromatografia Flash, utilizando como solventes, etanol e água. Na avaliação *in vitro*, foi possível determinar baixa toxicidade do espilantol em fibroblastos gengivais humanos (HGF-1) em concentrações de até 200 µM. Também foi possível observar efeito supressor *in vitro* do espilantol na expressão de genes envolvidos no processo inflamatório, como a Selectina E e a Interleucina-9. No experimento *in vivo*, o espilantol, na concentração de 30 mg/kg, foi capaz de atenuar de maneira significativa a inflamação provocada pelo quimioterápico 5-FU em modelo de mucosite intestinal em camundongos Swiss. Foi possível também desenvolver uma formulação promissora, contendo espilantol para possível uso na mucosite.

Palavras-chave: espilantol, mucosite, química verde, extração com fluido supercrítico

ABSTRACT

The extraction of bioactive compounds from plants is usually associated with the use of toxic organic solvents, which, as a consequence, generate waste with high environmental impact and high operating costs. For this reason, the use of processes that eliminate or minimize the use of organic solvents, such as supercritical fluid extraction using CO₂, is of great interest. Spilanthol, an alkylamide found in various species, among them, *Acmeella oleracea* (L.) R.K. Jansen has several pharmacological properties, such as anti-inflammatory, anesthetic and antioxidant activity. These properties may be of great interest for the treatment of oral mucositis, one of the most common side effects from the treatment of cancer patients undergoing radiotherapy and chemotherapy. Therefore, the purpose of this work was to isolate the spilanthol contained in the aerial parts of *Acmeella oleracea* employing green chemistry techniques and evaluate its anti-inflammatory activity through *in vitro* and *in vivo* models, as well as, the incorporation of spilanthol in an oral formulation aimed to treat of oral mucositis. It was possible to obtain high purity (97%) spilanthol employing green extraction techniques, such as extraction followed by fractionation using supercritical carbon dioxide, with subsequent isolation of the spilanthol by Flash chromatography, using as solvents, ethanol, and water. In the *in vitro* evaluation, it was possible to determine the low toxicity of spilanthol to human gingival fibroblasts (HGF-1) in concentrations of up to 200 µM, and also its suppressor effect in the expression of genes involved in the inflammatory process, such as Selectin E and Interleukin-9. In the *in vivo* experiment, spilanthol, at 30 mg/kg, was able to significantly attenuate the inflammation caused by 5-FU chemotherapy in a model of intestinal mucositis in Swiss mice. It was also possible to develop a promising formulation containing spilanthol for a possible use in mucositis.

Key Words: spilanthol, mucositis, green chemistry, supercritical fluid extraction

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fases do desenvolvimento da mucosite.....	17
Figura 2 – Folhas e flores de jambu (<i>Acmeella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen).	20
Figura 3 – Estrutura química do espilantol (N-Isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida)	20
Figura 4 - Diagrama de fases	29
Figura 5 – Equipamento de extração e fracionamento com fluido supercrítico.	33
Figura 6 – Protocolo experimental para indução da mucosite intestinal com 5-FU... <td>38</td>	38
Figura 7 – Placa de vidro e extensor de acrílico.....	41
Figura 8 – Aspecto visual de três frações provenientes do Tratamento 2.....	44
Figura 9 – Cromatografia em camada delgada de frações obtidas no Tratamento... <td>44</td>	44
Figura 10 – Cromatogramas obtidos por HPLC do espilantol	45
Figura 11 – Cromatograma obtido pelo equipamento Flash.....	46
Figura 12 – Fração obtida por cromatografia Flash.....	46
Figura 13 – Cromatograma obtido por HPLC.....	47
Figura 14 – Viabilidade de Fibroblastos Gengivais Humanos (HGF-1),	48
Figura 15 – Variação no consumo de ração por animal (gramas).....	50
Figura 16 – Variação da porcentagem de peso de animais.	51
Figura 17 – Variação dos níveis de mieloperoxidase (U/g tecido).....	51
Figura 18 – Secções histológicas do intestino delgado de camundongos.	52
Figura 19 – Variação na altura das vilosidades do intestino delgado	53
Figura 20 – Aspecto de bioadesivo contendo espilantol após corte.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escala classificatória de toxicidade oral e intestinal definida pela Organização Mundial da Saúde.....	15
Tabela 2 – Princípios da química verde	27
Tabela 3 – Condições de pressão (bar) e temperatura (°C) empregadas para isolamento do espilantol.....	33
Tabela 4 – Rendimento e teor de espilantol em porcentagem.....	43
Tabela 5 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) e de ^1H (400 MHz) para a fração isolada por Cromatografia Flash (espilantol).	47
Tabela 6 – Fator de alteração (<i>fold change</i>) de genes diferencialmente expressos em fibroblastos HGF-1 tratados com 20 μM de espilantol.....	49
Tabela 7 – Avaliação do pH e do teor de espilantol nos bioadesivos de jambu	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
3 PROPOSIÇÃO	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS	66
ANEXO 1 – Certificado Comitê de Ética Animal Unicamp - CEUA 4534-1	83

1 INTRODUÇÃO

Devido ao envelhecimento e crescimento populacional, além da propagação de fatores de risco, como o uso do tabaco e o alcoolismo, o número de casos de câncer deve chegar a aproximadamente 25 milhões mundialmente nas próximas duas décadas. Somente nos Estados Unidos, estimam-se mais de um milhão e setecentos mil novos casos de câncer diagnosticados em 2018 com projeção de mais de seiscentas mil mortes (WHO, 2014; Siegel et al., 2018).

Apesar dos avanços observados no tratamento do câncer terem possibilitado aumento nas taxas de sobrevivência de pacientes com alguns tipos de tumores, a radioterapia e a quimioterapia ainda provocam diversos efeitos colaterais, e dentre eles, um dos mais frequentes e indesejados é a mucosite (Al-Ansari et al., 2015; Miller et al., 2016).

Caracterizada por danos no revestimento da mucosa gastrointestinal, que resultam em lesões extremamente dolorosas, a mucosite ainda representa um desafio no tratamento de pacientes, uma vez que em casos severos, atrasos, interrupções e até mesmo a descontinuação da quimioterapia ou radioterapia se faz necessária, o que pode afetar de maneira negativa o prognóstico do paciente (Cinausero et al., 2017).

Devido a sua complexa patologia e por apresentar característica multifatorial, o tratamento disponível para a mucosite é, até o momento, muito limitado, atuando de maneira paliativa e visando somente alívio dos sintomas (Van Sebille et al., 2015). Desta forma, outras opções têm sido buscadas na tentativa de melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

As plantas medicinais têm uma grande importância como medicina alternativa no Brasil e no mundo, sendo um vasto celeiro de novas moléculas promissoras na terapêutica. A *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen é uma planta originária da América do Sul, muito utilizada pela população da região norte do Brasil na culinária. Conhecida como agrião-do-pará, jambu e agrião-do-brasil, possui em sua parte aérea, o espilantol, uma alquilamida com diversas propriedades farmacológicas, tais como, atividade anti-inflamatória (Wu et al., 2008; Nomura et al., 2013) e anestésica

(Chakraborty et al., 2010; Freitas-Blanco et al. 2016), sendo, portanto, de interesse para uma possível aplicação no tratamento da mucosite (Lorenzi e Matos, 2008; Barbosa et al., 2016a). Por estas atividades, esta espécie demonstrou grande potencial no combate desta enfermidade e despertou o interesse em seu uso.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Mucosite

Mucosite é o termo dado ao eritema e ulcerações dolorosas que ocorrem de maneira generalizada em qualquer lugar do trato gastrointestinal, incluindo a boca, esôfago, estômago, intestino e ânus de pacientes submetidos à radioterapia e quimioterapia, bem como aos submetidos a condicionamento para transplante de medula óssea (Dios et al., 2016).

A frequência e severidade da mucosite podem variar de acordo com o tipo de câncer, do tipo de terapia escolhida (quimioterapia, radioterapia ou a combinação das duas), com a dose e com o esquema terapêutico utilizado. Alguns quimioterápicos, como o 5-Fluorouracil, Metotrexato, Cisplatina e Irinotecam apresentam altas taxas de mucotoxicidade e pacientes submetidos a regimes radioterápicos com doses diárias de 2 Gray são altamente suscetíveis a mucosite (Villa e Sonis., 2015).

Outros efeitos colaterais provocados pela terapia anticâncer, como por exemplo, alterações no paladar e a xerostomia, na qual o paciente tem a sensação de boca seca devido à diminuição de saliva, são extremamente incômodos e podem se prolongar por meses, requerendo o uso constante de saliva artificial, enxaguatórios bucais ou outras substâncias sialogogas, que atuam estimulando a produção de saliva (O'Brien, 2009).

Embora existam diversos sistemas de classificação da mucosite, o sistema proposto pela Organização Mundial da Saúde é um dos mais utilizados na prática clínica e classifica a mucosite em graus que variam de 0 a 4, onde no grau 0 o paciente não apresenta nenhum sintoma e no grau 4, o grau mais severo, o paciente fica impossibilitado de comer e apresenta vômito e diarreia intratáveis. Maiores detalhes desta classificação podem ser observados na Tabela 1 (WHO, 1979; Sroussi et al., 2017).

Tabela 1 – Escala classificatória de toxicidade oral e intestinal definida pela Organização Mundial da Saúde.

Grau	Oral	Intestinal
0	Nenhuma	Nenhuma
1	Eritema e sensibilidade dolorosa	Náusea, diarreia transitória (< 2 dias)
2	Eritema, úlcera, dieta sólida é tolerada.	Vômito e diarreia (> 2 dias)
3	Úlcera, somente dieta líquida é tolerada.	Vômito e diarreia intoleráveis, terapia é requerida.
4	Alimentação oral impossibilitada	Vômito intratável e diarreia hemorrágica

Pacientes com grau de mucosite mais severo desenvolvem ulcerações que rotineiramente requerem altas doses de opióides para alívio da dor, além de apresentarem aumento do risco de desenvolvimento de bacteremia, fungemia e sepse. Além disso, uma vez que a dor e a perda da integridade tecidual afetam a habilidade de o paciente comer, a nutrição parenteral é requerida, o que consequentemente afeta sua qualidade de vida, aumenta os custos do tratamento e diminui a tolerância ao mesmo, impactando dessa forma seu prognóstico (Sonis, 2004; Al-Dasooqi et al., 2013).

O desenvolvimento da mucosite é um processo complexo e dinâmico, resultante de uma série de eventos biológicos e celulares que ocorrem na submucosa. Sonis (1998, 2007) propôs um modelo de progressão da mucosite dividido em cinco estágios: iniciação (I), resposta ao dano primário (II), amplificação de sinais (III), ulceração (IV) e cicatrização (V).

A etapa de iniciação ocorre segundos após a administração da radioterapia/quimioterapia ao paciente e, apesar de externamente a mucosa parecer absolutamente normal, internamente há uma cascata de eventos intracelulares sendo desenvolvida. As espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pelo agente anticâncer são de grande importância e resultam na apoptose de fibroblastos, danos ao DNA e ao tecido conectivo além de estimular a resposta imune inata (Sonis, 2007; Cinausero et al., 2017).

Na segunda etapa, denominada de resposta ao dano primário, a propagação do insulto inicial resulta em estímulo de macrófagos e em uma complexa cadeia de eventos que leva ao aumento de moléculas de adesão, angiogênese e à ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), que parece ser diretamente ligado à toxicidade e resistência do tumor à terapia. A ativação do NF- κ B regula a expressão de mais de 200 genes, dentre eles citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e a ciclooxygenase-2 (COX-2), todas correlacionadas com a toxicidade provocada pela radio e quimioterapia (Sonis, 2007; Cinausero et al., 2017).

Uma vez que estas interleucinas são liberadas, além de provocarem dano tecidual, há a amplificação do sinal por meio de *feedback*-positivo, que pode se prolongar por dias após o insulto inicial. Um exemplo é o TNF- α que ativa de maneira eficiente o NF- κ B, que então ativam as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e c-Jun N-terminal quinase (JNK) e ambas atuam acelerando e ampliando o dano tecidual. A via ceramida, atua de maneira independente do NF- κ B e inicia a apoptose nas células epiteliais da submucosa, que em conjunto com enzimas pertencentes ao grupo das metaloproteinases da matriz (MMP), levam a ulceração deste tecido (Sonis, 2007; Cinausero et al., 2017).

A fase ulcerativa é a de maior importância para o paciente, uma vez que isso resulta em lesões profundas e extremamente dolorosas no tecido bucal. Estas lesões são cobertas por uma pseudomembrana contendo células mortas e fibrinas, o que favorece a colonização por bactérias, e pode se tornar um alvo para infecções, em especial em pacientes com granulocitopenia, que são ainda mais propensos a infecções e seu risco de desenvolver sepse é aumentado de maneira significativa. No intestino, o dano celular é quase imediato e a enterite torna-se aparente um ou dois dias após a quimioterapia (Sonis, 2007; Cinausero et al., 2017).

A fase de cicatrização ocorre cerca de duas a três semanas após a finalização do tratamento e é regulada pelo tipo de tratamento, medicamentos e doses utilizadas. O tecido epitelial apresenta proliferação, migração e diferenciação, todas estimuladas pela matriz extracelular, que reconstrói então a submucosa. É importante frisar, porém, que este tecido não é idêntico ao início do tratamento e que há maiores chances deste paciente voltar a desenvolver mucosite em ciclos

quimioterápicos ou radioterápicos subsequentes (Sonis, 2007; Cinausero et al., 2017). As etapas deste processo estão ilustradas na Figura 1.

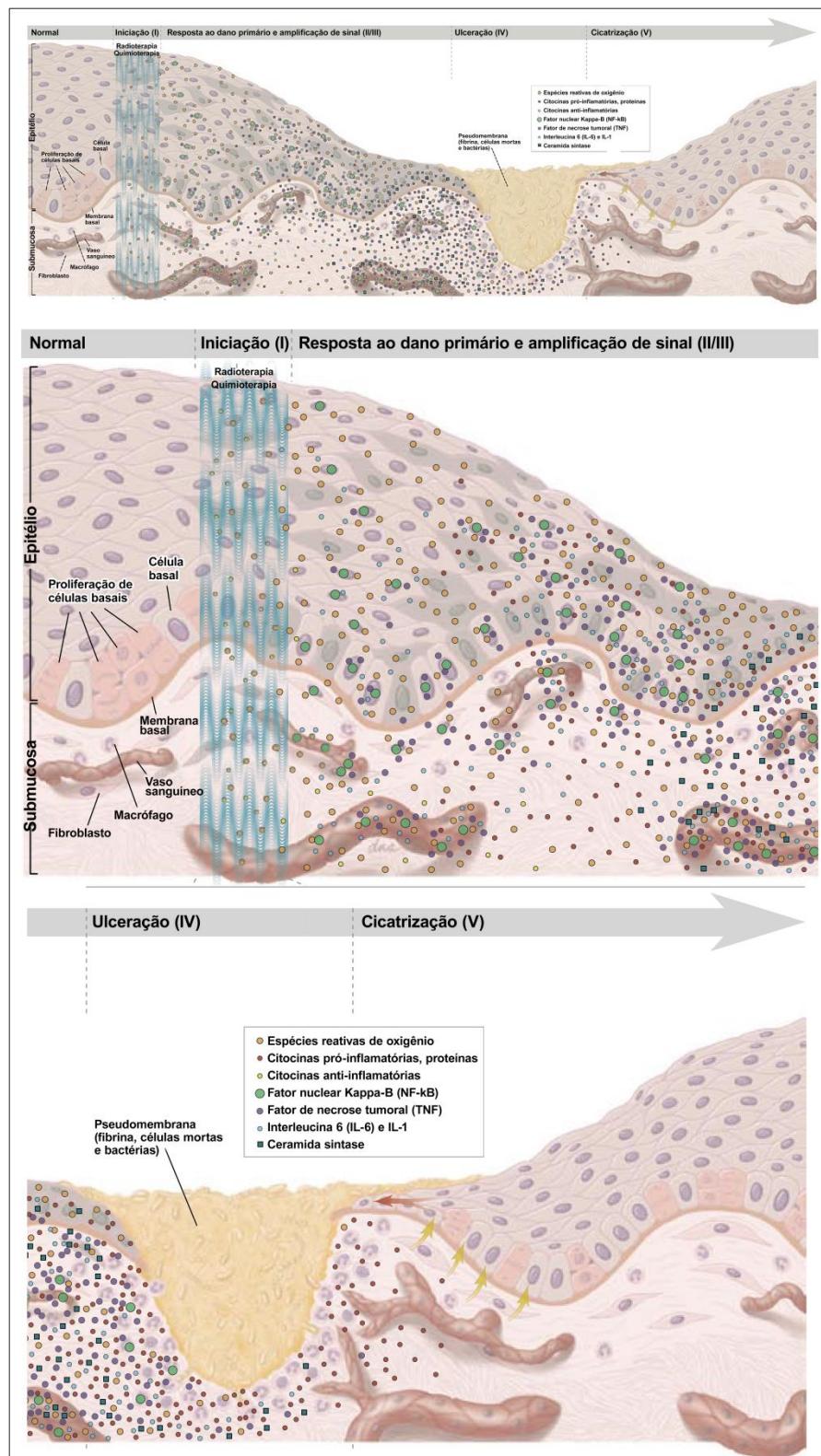


Figura 1 – Fases do desenvolvimento da mucosite.

Fonte: Sonis, 2007. Tradução livre.

Algumas medidas podem ser tomadas em caráter preventivo para evitar o desenvolvimento de mucosite oral severa em pacientes que receberão a radio/quimioterapia, como por exemplo, a realização de tratamento odontológico intensivo, bem como a manutenção de boas práticas de higiene oral (Duncan e Grant, 2003).

A crioterapia, também tem sido utilizada para a prevenção da mucosite oral e consiste na administração de lascas de gelo ou agua gelada ao paciente no momento em que ele recebe a quimioterapia, afim de que a vasoconstrição provocada pelo gelo reduza a quantidade de quimioterápico no tecido oral, e consequentemente, as chances de desenvolver mucosite são diminuídas. A crioterapia possui baixo custo e não apresenta efeitos colaterais graves, porém, parece ser mais efetiva somente quando são utilizados quimioterápicos com meia vida curta, como o 5-Fluorouracil (Riley et al., 2015).

O controle da dor provocada pela mucosite geralmente é feito com o uso de opióides administrado por via intravenosa, uma vez que as lesões são extremamente dolorosas e dificultam a deglutição. Alternativas também são o uso do fentanil por via transdérmica, e colutórios para bochechos contendo anestésicos como a lidocaína (Ing, 2017).

Um dos primeiros medicamentos utilizados para a prevenção e tratamento da mucosite oral foi a amifostina (Ethyol®), um agente antioxidante administrado intravenosamente 15 minutos antes de cada sessão de quimio/radioterapia (Villa e Sonis, 2015). A amifostina atua como um citoprotetor seletivo e reduz a incidência de xerostomia e outros efeitos colaterais decorrentes do tratamento do câncer. Seu uso, porém, não foi recomendado para tratamento da mucosite oral em guia publicado pela *Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology* por apresentar resultados conflitantes na eficácia da mucosite oral (Nicolatou-Galitis et al., 2013; Lalla et al., 2014).

O único agente aprovado pelo FDA (US Food and Drug Administration) para uso no tratamento da mucosite oral é a palifermina (Kepivance®), um fator de crescimento de queratinócitos humanos que está envolvido em vários processos de proteção celular, tais como supressão da apoptose, atividade anti-inflamatória,

redução de espécies reativas de oxigênio, auxiliando na conservação da integridade da barreira epitelial. A palifermina deve ser administrada por via intravenosa, e a dose recomendada é de 60 µg/kg/dia, durante três dias consecutivos antes e após a terapêutica de radio/quimioterapia (Raber-Durlacher et al., 2013; Lalla et al., 2014).

O custo estimado de um ciclo do tratamento com a palifermina para um paciente com peso de 70 kg é de aproximadamente US\$9.600,00 (CMS, 2017). Este alto custo, porém, se justifica em alguns casos específicos, como em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas e submetidos à irradiação corporal total (Panjwani, 2013).

O laser de baixa intensidade ou fotobiomodulação tem sido utilizado como terapia na mucosite, pois controla a dor, estimula a regeneração tecidual e reduz a inflamação. O mecanismo de ação envolvido nestes processos ainda não foi completamente elucidado, mas acredita-se que se deva principalmente aos efeitos provocados nas etapas da inflamação, reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, além de estimular a proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e outros componentes reparatórios (Zecha et al., 2016).

Tendo em vista as formas disponíveis atualmente para o tratamento e/ou alívio da mucosite oral, pudemos identificar que existe a necessidade do desenvolvimento de medicamentos que sejam eficazes e que, além disso, apresentem custo acessível. As plantas medicinais representam uma alternativa de baixo custo, de viabilidade rápida, que oferecem uma grande quantidade de moléculas já implantadas em nossa terapêutica, assim como outras por serem descobertas.

2.2 – *Acmella oleracea*

A *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, sinonímia *Spilanthes acmella* L. Murray, pertencente à família Asteraceae, é uma planta originária da América do Sul (Figura 2) e encontra-se distribuída nos trópicos e subtrópicos, incluindo o norte da Austrália, África, Índia e Sri Lanka (Paulraj et al., 2013).

No Brasil é popularmente conhecida como jambu, abecedária, agrião-do-pará e agrião-do-brasil. Em outros países é conhecida como “toothache plant”, “eyeball plant” ou “paracress”. Esta espécie é muito utilizada na culinária, principalmente na região norte do Brasil, e seu uso, na medicina popular, abrangem desde o tratamento de dores de dente e de garganta, até tuberculose e anemia (Favoreto e Gilbert, 2010; Lim, 2014).



Figura 2 – Folhas e flores de jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen).

Fonte: Arquivo pessoal

Diversos compostos estão presentes no nas partes aéreas do jambu, tais como os terpenos β cariofileno, limoneno e timol, substâncias fenólicas como o ácido vanílico e o ácido *trans*-ferulico, além de fitoesteróis, polissacarídeos, e outras alquilamidas (Ramsewak et al., 1999; Jirovetz et al., 2005; Prachayasittikul et al., 2013; Nascimento et al., 2013).

A principal alquilamida encontrada no jambu é o espilantol (Figura 3), composto que, ao entrar em contato com a mucosa oral, provoca sensação de formigamento, dormência e salivação na boca. O espilantol também está presente em espécies das famílias Asteraceae, Solanaceae e Piperaceae (Ley et al., 2006; Dubey et al., 2013; Urankar et al., 2013).

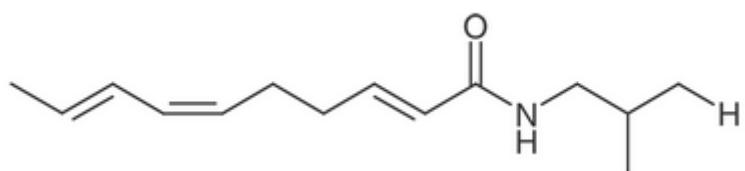


Figura 3 – Estrutura química do espilantol (N-Isobutil-2E,6Z,8E-decatrienamida)

O espilantol é capaz de permear a mucosa e a derme e também age como um promotor de absorção, aumentando a permeação de algumas substâncias através da derme (Boonen et al., 2010a; Boonen et al., 2010b; De Spiegeleer et al., 2013; Freitas-Blanco et al., 2016). Recentemente, a absorção intestinal foi observada através de experimentos *in vitro* com células Caco-2 e confirmada também *in vivo* após administração oral em ratos (Veryser et al., 2016).

O Jambu foi classificado como seguro (Generally Recognized as Safe-GRAS nº3783) pela Associação dos Fabricantes de Extratos e Flavorizantes (FEMA – *Flavor and Extract Manufacturers Association*) e também pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA – *European Food Safety Authority*) e é utilizado como flavorizante em diversos produtos, tais como sopas, vegetais processados, condimentos, goma de mascar e em dentífricos (Fema, 2000; EFSA, 2015).

Diversas propriedades farmacológicas foram descritas na literatura sobre o jambu, tais como diurética (Ratnasooriya et al., 2004; Yadav et al., 2011; Gerbino et al., 2016), antipirética (Chakraborty et al., 2010), afrodisíaca (Regatas, 2008; Sharma et al., 2011), antimalária (Pandey et al., 2007; Pandey & Agrawal, 2009; Spelman et al., 2011), acaricida (Cruz et al., 2016; Anholeto et al., 2017), e gastroprotetora (Nascimento et al., 2013; Maria-Ferreira et al., 2014).

Vários autores vêm investigando o aspecto de segurança e toxicidade desta espécie. Chakraborty et al. (2004) não observaram qualquer efeito tóxico ou mortalidade em ratos Wistar tratados por via oral com extrato aquoso das partes aéreas (folhas, flores e caules) de jambu até a dose máxima de 3000 mg/kg.

Sharma et al. (2011) administraram por via oral, extrato etanólico das flores de jambu (2000 mg/kg) em ratos Wistar (n=6/sexo) e relataram que, no período do estudo (48 h), não houve mortalidade ou alterações comportamentais, como sedação, convulsão e hiperatividade.

Yadav et al. (2011) avaliaram extratos etanólico, de éter de petróleo e de clorofórmio das folhas de jambu e não observaram qualquer sinal de toxicidade ou mortalidade em camundongos de ambos os sexos submetidos até 5000 mg/kg por via oral.

Nomura et al. (2013) avaliaram o extrato etanólico das flores frescas de jambu em camundongos Swiss machos e relataram que, nas doses de 5, 50 e 500 mg/kg, por via intraperitoneal, não houve qualquer sinal de mortalidade ou toxicidade pelo período de 7 dias de observação. Os autores relatam, porém, que na dosagem de 5000 mg/kg os animais apresentaram alterações respiratórias e convulsões, o que culminou com a morte de todos os animais em menos de três minutos.

É interessante observar que esse efeito adverso também foi relatado em outro estudo, conduzido por Moreira et al. (1989), no qual o extrato *n*-hexânico de jambu, nas dosagens de 100 e 150 mg/kg, injetado por via intraperitoneal, induziu a ocorrência de convulsões tônico-clônicas em ratos.

Nigrinis et al. (1987) observaram efeito semelhante em estudo feito com alquilamida isolada da espécie *Spilanthes americana* (Mutis), no qual a dosagem de 140 mg/kg por via intraperitoneal resultou em convulsões seguidas de morte. Estas reações são provavelmente devido à via intraperitoneal de administração do extrato, uma vez que quando administrado por via oral, não houve qualquer sintoma de intoxicação.

Escobedo-Martinez et al. (2017) avaliaram toxicidade aguda *in vivo* e a dose letal mediana (DL 50 - dose capaz de matar 50% dos animais de um grupo teste) de fração enriquecida contendo 95% de espilantol. Os camundongos tratados por via oral com doses de 10 e 100 mg/kg foram observados pelo período de 14 dias sem apresentar qualquer sinal de toxicidade e a DL 50 por via oral foi determinada em 775 mg/kg.

A toxicidade crônica do espilantol foi avaliada por Bauter (2012) o qual tratou, por 90 dias, ratos da espécie Sprague-Dawley ($n=10/\text{sexo}$) com 180, 360 e 1200 mg/kg de espilantol misturados na ração. Durante o período não foram observados quaisquer sinais de toxicidade, ou alterações bioquímicas significativas na urina ou no sangue dos animais. A única alteração, observada nos animais submetidos à maior dose de espilantol (1200 mg/kg), foi hipertrofia da glândula salivar submandibular.

O fato de esta espécie ser considerada segura por agências como a FEMA (*Flavor and Extract Manufacturers Association*) e também a EFSA (*European Food Safety Authority*), somado ao fato de que esta espécie é consumida há muitos anos

pela população do norte e nordeste brasileiro em sua culinária, demonstra a viabilidade do emprego do extrato bruto e composto isolado a partir desta fonte vegetal.

2.2.1 – Atividade anti-inflamatória e anestésica do espilantol e de extratos provenientes da *Acmeella oleracea*

A atividade anti-inflamatória e anestésica do espilantol e de extratos provenientes do jambu, também já foi alvo de estudo entre vários pesquisadores e por esta razão, nos motivou a estudar esta espécie mais profundamente. Sobre as propriedades mencionadas, em estudo preliminar conduzido por Chakraborty et al. (2004), a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato aquoso das partes aéreas da *Spilanthes acmella* foi avaliada em três modelos experimentais em duas espécies de animais. Ratos Wistar e camundongos Swiss receberam as doses de 100, 200 e 400 mg/kg por via oral. Os autores observaram efeitos anti-inflamatórios e analgésicos significantes e de maneira dose-dependente nos modelos de edema de pata induzido por carragenina, contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste de retirada de cauda (*tail flick*).

Em 2005, Ratnasooriya & Pieris demonstraram efeito anti-inflamatório e anti-hiperalgésico do extrato aquoso de flores frescas de jambu nas dosagens de 500, 1000 e 1500 mg/kg administradas por via oral em ratos, de maneira dose dependente, por meio dos modelos de dor inflamatória aguda e persistente com formalina e de hiperalgesia provocada por carragenina.

O espilantol (1 mg/kg, via intraperitoneal) isolado das raízes da espécie *Helianthus longipes* (A. Gray) S.F. Blake, pertencente à família Asteraceae e muito utilizada no México como condimento, reduziu em 95% o número de contorções induzidas por ácido acético quando comparado ao grupo controle. Foi observado também efeito antinociceptivo no teste de placa quente (1 mg/kg, via intraperitoneal) durante os sessenta minutos de experimento (Cilia-López et al., 2010).

A atividade anti-inflamatória do jambu foi também observada por Gupta et al. (2012), que avaliaram uma formulação tópica em gel contendo 1% de extrato de éter

de petróleo das flores de jambu em modelo de edema de pata induzido por carragenina. Os autores relataram que a atividade anti-inflamatória do gel de jambu foi semelhante à do diclofenaco de sódio em gel, e também que a formulação não demonstrou qualquer sinal de irritação ou eritema em modelo de irritação de pele em ratos.

Nomura et al. (2013) relataram a atividade antinociceptiva orofacial do extrato etanólico das flores frescas de jambu nas dosagens de 10, 30 e 100 mg/kg (via intraperitoneal) em camundongos Swiss. Os autores relataram redução das fases neurogênicas e inflamatórias nos modelos de formalina e capsaicina e diminuição da hiperalgésia no modelo de placa quente. Os autores sugeriram que este efeito esteja ligado à modulação ou bloqueio de receptores de potencial transitório TRPV1 e TRPA1.

Outro mecanismo de ação sugerido para o efeito analgésico do espilantol foi proposto por Rios et al. (2007), ao observar aumento na liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA) no cérebro de camundongos em contato com 10 µg/mL de espilantol. O efeito analgésico do GABA se deve a sua ação inibitória pré-sináptica da liberação de neurotransmissores pró-nociceptivos, tais como o glutamato e a substância P (Jasmin et al., 2004).

Em 2008, Wu et al. observaram, por meio de testes *in vitro* com macrófagos RAW 264,7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), efeito inibitório do espilantol (90 e 180 µM) sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como óxido nítrico, COX-2, IL-1β, IL-6 e TNF-α. Os autores sugerem que o efeito supressor se deve, em parte, a uma diminuição na ativação do NF-κB provocada pelo espilantol, uma vez que esse fator está associado à expressão de diversos mediadores pró-inflamatórios.

Atividade semelhante foi relatada por Cho et al. (2017), ao avaliarem a atividade anti-inflamatória de extrato metanólico de jambu (\leq 300 µg/mL), também em macrófagos RAW 264,7 estimulados com LPS. Os autores relatam inibição na produção de óxido nítrico, e redução na expressão de COX-2, IL-1β e IL-6, sem, porém, observar alterações na produção de TNF-α.

Atividade antiartrítica de fração enriquecida em espilantol (95%) foi descrita por Escobedo-Martinez et al. (2017) em modelo *in vivo* de artrite induzida por adjuvante completo de Freund. Espilantol, extraído das raízes da espécie *Heliopsis longipes* (A. Gray) S.F. Blake, foi administrado diariamente, por via oral, a ratos Wistar nas concentrações de 2,2 a 20 mg/kg durante 25 dias. Nestas condições, os grupos tratados com espilantol apresentaram marcante atividade anti-inflamatória e antiartrítica, quando comparados ao controle (fenilbutazona, 80 mg/kg).

Além da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, foi também avaliada a atividade anestésica local do jambu em estudo preliminar publicado em 2010 por Chakraborty et al. Estes autores utilizaram o modelo de infiltração anestésica no dorso de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*), que permite estimar o grau e a duração da anestesia de maneira simultânea. Ao final do experimento, os autores observaram efeito anestésico de 70,36% e 87,02% do extrato aquoso, respectivamente nas concentrações de 10 e 20%, comparados ao controle positivo (2% de xilocaína; $p < 0,001$).

Andrade et al. (2013) relataram efeito anestésico de pomada contendo 15% ou 30% de extrato de jambu em voluntários que, por meio de escala visual, avaliaram a dor à punção de uma agulha na mucosa bucal. Os autores também avaliaram os batimentos cardíacos, e não observaram diferença estatística no efeito anestésico entre o grupo que utilizou a pomada contendo jambu e o grupo controle, que utilizou benzocaína 20%, indicando a pomada de jambu como uma alternativa segura e efetiva para anestesia tópica oral.

Em trabalho conduzido por nosso grupo de pesquisa, a atividade anestésica tópica do bioadesivo contendo 10% de extrato de jambu foi observada *in vivo* através de teste de retirada de cauda (*tail flick*) no qual se mostrou semelhante ao EMLA® (mistura eutética dos anestésicos lidocaína e prilocaina), formulação muito utilizada e considerada, atualmente, como padrão ouro para anestesia tópica dermatológica (Freitas-Blanco et al., 2016).

Ainda dentro do nosso grupo de pesquisa, a atividade tópica anestésica e cicatrizante foi também observada *in vivo* por Yamane et al. (2016) ao avaliarem bioadesivo contendo 15% de extrato de jambu combinado a 1,5% de óleo essencial

de macela (*Achyrocline satureioides* Lam. (DC) - Asteraceae) quando comparados aos controles positivos (EMLA® e alantoína).

Barbas et al. (2016) avaliaram a atividade sedativa e anestésica de extrato das flores de jambu em peixes da espécie tambaqui (*Colossoma macropomum*). O extrato, que continha aproximadamente 65% de espilantol, foi capaz de induzir sedação na concentração de 2 mg/L e rápida anestesia (menos de 3 minutos) na concentração de 20 mg/L, de maneira segura e resultando em mínimas alterações fisiológicas, mostrando-se uma alternativa interessante para uso em piscicultura.

Assim sendo, é promissora a utilização do jambu e/ou espilantol como um anti-inflamatório e anestésico no que tange a sua aplicação no tratamento da mucosite oral.

2.3 – Química Verde

A preocupação com o meio ambiente, muito em evidência nas últimas décadas, levou à geração de protocolos para diminuição da poluição química em diversos países.

O intuito foi motivar um desenvolvimento autossustentável, para que as necessidades atuais não sobrepujassem as necessidades das gerações futuras, buscando alternativas que evitassem ou minimizassem a produção de resíduos ao invés de tratar o resíduo ao final da linha produtiva (Lenardão et al., 2003).

Química verde ou química sustentável trata do desenvolvimento de produtos químicos, desde o seu desenho até sua degradação, com o objetivo de reduzir ou eliminar a geração de substâncias nocivas à saúde e ao ambiente (Lenardão et al., 2003; Correa e Zuin, 2012; USEPA, 2013).

Existem doze princípios que regem esse conceito, e são apresentados de maneira resumida na Tabela 2 (Lenardão et al., 2003; Correa e Zuin, 2012; USEPA, 2013).

Tabela 2 – Princípios da química verde

Nº	Princípios
1	Evitar a produção do resíduo é melhor do que tratar posteriormente os mesmos.
2	A síntese de produtos deve maximizar a incorporação de todos os materiais utilizados no produto final.
3	A síntese de um produto deve utilizar e gerar compostos menos perigosos
4	Os compostos devem possuir a função desejada apresentando a menor toxicidade possível.
5	Substâncias auxiliares, como solventes, devem ser evitadas sempre que possível e quando utilizadas devem ser inócuas.
6	Se possível, os processos químicos devem ser conduzidos à pressão e temperatura ambiente.
7	Sempre que viável deve-se priorizar o uso de matérias-primas renováveis.
8	A derivatização deve ser evitada ou minimizada quando possível.
9	Reagentes catalíticos são superiores aos reagentes estequiométricos
10	Os compostos desenvolvidos devem se degradar de maneira a gerar produtos inócuos e que não persistam no ambiente
11	Desenvolver e aprimorar metodologias analíticas que permitam o monitoramento e controle de processos em tempo real, evitando a formação de compostos nocivos
12	A escolha e utilização de substâncias químicas devem levar em conta sua periculosidade a fim de minimizar os riscos de causar acidentes

A vasta aplicação da química verde pode ser também observada através de publicações na área de química analítica na qual, por exemplo, são sugeridos novos métodos de preparação da amostra ou da redução do consumo de solventes ao se diminuir o diâmetro, tamanho e partícula da coluna cromatográfica empregada (Gałuszka et al., 2013; Płotka et al., 2013; Armenta & Guardia, 2016; Filippou et al., 2017).

A escolha adequada de solventes em diferentes ramos de trabalho é de extrema importância, uma vez que poderão representar grande impacto ambiental (Dunn, 2012). A combinação diclorometano–metanol, frequentemente preferida e usada em purificações por muitos pesquisadores, contribui enormemente na geração de resíduos de solventes clorados na química medicinal (Taygerly et al., 2012).

O diclorometano está associado à toxicidade humana significativa, tanto aguda quanto crônica, afetando os sistemas respiratório, nervoso, cardiovascular, hepático e renal, além de ser genotóxico e carcinógeno (Schlosser et al., 2015). Por essa razão, a substituição do diclorometano por outro solvente com menor toxicidade e maior segurança é imprescindível. Taygerly et al. (2012) oferecem um guia de solventes menos tóxicos para a substituição do diclorometano na separação de diversos compostos.

MacMillan et al. (2012), em estudo semelhante, sugerem o CPME (ciclopentil metil éter) como um potencial substituto ao diclorometano nas combinações binárias com metanol em purificações. O CPME tem se mostrado uma alternativa promissora na cromatografia, pois, além de manter a capacidade de separação cromatográfica similar a solventes mais tóxicos, apresenta maior estabilidade, baixa volatilidade e hidrofobicidade, e por essa razão é facilmente separado e recuperado da água, reduzindo assim as chances de contaminação ambiental.

A GlaxoSmithKline (GSK) desenvolveu um guia voltado para a química medicinal, onde lista 110 solventes e os classifica de 1 (vermelho) a 10 (verde) em diversas categorias que vão desde o impacto ambiental para descartar ou reciclar o solvente até os efeitos crônicos na saúde humana devido à exposição ao mesmo.

Os autores descrevem também diversas estratégias que foram implementadas para aumentar a adoção de solventes verdes, como disponibilizar nos laboratórios amostras destes solventes para uso imediato, bem como cópias do guia em locais de fácil acesso e visibilidade, como nas mesas e nas capelas de exaustão (Henderson et al., 2011).

É importante lembrar também que a seleção e substituição de um solvente por outro devem levar em conta parâmetros como o rendimento final do produto e os gastos energéticos provenientes dessa substituição, para que a sustentabilidade do processo se mantenha consistente (Welton, 2015).

Outra alternativa para extrações mais verdes é a utilização do dióxido de carbono supercrítico. O estado supercrítico de uma substância ocorre quando esta se encontra a uma temperatura e pressão acima de seus valores críticos (Figura 4), e suas propriedades físico-químicas assumem valores intermediários àqueles dos estados líquido e gasoso (Andrade, 2012).

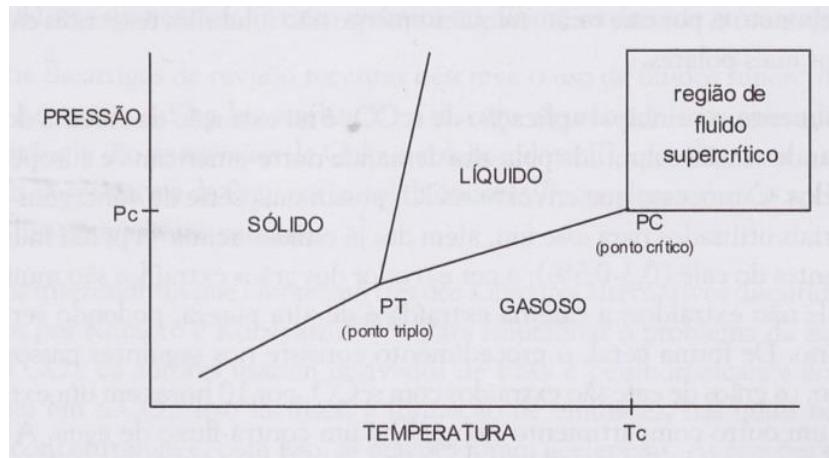


Figura 4 - Diagrama de fases

Fonte: Andrade, 2012.

Dessa forma, os fluidos supercríticos se difundem de maneira mais eficiente e apresentam menor viscosidade do que os líquidos, resultando em extrações mais eficientes e sem resíduos químicos no extrato final (Rozzi e Singh, 2002).

O dióxido de carbono supercrítico é um solvente amplamente utilizado na indústria alimentícia para extrair a cafeína de grãos de café, do chá e de flavorizantes presentes em matrizes vegetais. Isto se deve principalmente a sua pressão e temperatura crítica moderadas (73,8 bar, 31,1 °C), que ajudam a prevenir a degradação térmica de componentes de alimentos no momento da extração. Além disso, o dióxido de carbono não é inflamável, é atóxico, existe em abundância, apresenta custo baixo e é praticamente inerte quimicamente (Rozzi e Singh, 2002; Erkey, 2011; Andrade, 2012; Peach e Eastoe, 2014).

Por essas razões, este trabalho tratou de respeitar os princípios da química verde durante as etapas de fracionamento e isolamento do espilantol, utilizando como solventes o dióxido de carbono supercrítico, etanol e água.

3 PROPOSIÇÃO

Extração do espilantol das partes aéreas da *Acmella oleracea* por meio de técnicas da química verde e avaliação de sua aplicação no tratamento na mucosite.

3.1 – Objetivos Específicos

- Extrair e isolar o espilantol utilizando técnicas verdes;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do espilantol em modelos *in vitro* e *in vivo*;
- Desenvolver e caracterizar preliminarmente uma formulação contendo espilantol para uso na terapêutica da mucosite oral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Material

4.1.1 – Reagentes e solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico ou cromatográfico. Foram utilizados Álcool Etílico Absoluto (Synth, São Paulo, BR); Dióxido de Carbono (99,9%, White Martins, São Paulo, BR), metanol e acetonitrila, grau HPLC (J. T. Baker, Nova Jersey, EUA); água ultrapura obtida a partir do sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Massachusetts, EUA); carboximetilcelulose (média viscosidade, Sigma Aldrich, Missouri, EUA); propilenoglicol (Ecibra, São Paulo, BR); hidroxipropilmelcelulose (Sigma Aldrich, Missouri, EUA); transcutol CG (Brasquim, São Paulo, BR); cloridrato de orto-dianisidina (95% pureza), peroxidase de râbano e brometo de hexadecil trimetil amônio, todos adquiridos da Sigma Aldrich, (Missouri, EUA).

4.1.2 – Equipamentos

Os equipamentos empregados foram: equipamento de extração supercrítica com fracionamento (Maq'nagua, São Paulo, BR); deionizador (modelo Simplicity, Millipore®, Massachusetts, EUA); estufa com ventilação forçada (Fabbe, São Paulo, BR); estufa (modelo Precision, GCA, Chicago, EUA); câmara climática (Tecnal modelo TE-4003, São Paulo, BR); moinho de facas (Primotécnica, São Paulo, BR); sistema de evaporação rotativo (modelo R-215, Büchi, Flawil, SWZ); liofilizador (modelo Sentry, VirTis, Pensilvânia, EUA); cromatógrafo Flash CombiFlash® Rf+ (Teledyne ISCO, Nebraska, EUA); cromatógrafo Waters® Alliance modelo 2695, com detector de arranjo de fotodiodo Waters® modelo 2996; equipamento de ressonância magnética nuclear Bruker 9.4 T, modelo AVANCE III; ultrassom (modelo Bransonic 220, Branson, Connecticut, EUA); câmara escura ultra violeta (modelo SL-204, Solab, São Paulo, BR); balança analítica (modelo AUW220D Shimadzu, Kyoto, JP). As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas de alumínio (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, ALE), microsseringa de 10 µL (Hamilton, Nevada, EUA).

4.1.3 – Material vegetal

O material vegetal foi semeado e cultivado no campo experimental do CPQBA/UNICAMP, localizado no município de Paulínia, SP (-22° 47' 52" , -47° 6' 49"). A identificação foi feita pelo Dr. John F. Pruski do *Missouri Botanical Garden*. A exsicata está depositada no Herbário da UNICAMP, sob nº181452. Também foi obtida autorização de acesso e de remessa de patrimônio genético (CGEN) sob nº 010577/2014-9.

4.2 – Métodos

4.2.1 – Secagem e moagem do material vegetal

As partes aéreas do jambu foram secas em estufa com ventilação forçada por 48 h a 40 °C até massa constante (Rodrigues et al., 2006). A moagem foi realizada em moinho de facas com peneira de 48 mesh. Após secagem e moagem, o material foi mantido em embalagem de papel craft revestido com polipropileno e fechamento simples; armazenado em freezer -18 °C até utilização. Os valores referentes ao diâmetro médio das partículas ($290 \pm 10 \mu\text{m}$) bem como o teor de umidade ($9,44\% \pm 0,22$) utilizados no presente trabalho foram determinados por nosso grupo de trabalho (Zelioli et al. , 2015).

4.2.2 – Extração seguida de fracionamento com dióxido de carbono supercrítico

A etapa de extração seguida de fracionamento com dióxido de carbono supercrítico foi realizada no laboratório ExTrAE (Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Antônio Cabral e com a participação do aluno de iniciação científica Ícaro Augusto Maccari Zelioli, bolsista Fapesp (processo 2014/07225-0).

A extração e fracionamento do jambu para obtenção do espilantol foram conduzidas utilizando um extrator de aço inoxidável com leito fixo acoplado a separadores (Figura 5).



Figura 5 – Equipamento de extração e fracionamento com fluido supercrítico.

É importante frisar que as condições de extração e fracionamento do jambu por dióxido de carbono supercrítico desenvolvidas neste trabalho foram determinadas utilizando-se como ponto de partida publicações científicas prévias, bem como testes conduzidos no ExTrAE por nosso grupo de pesquisa, que nos orientaram sobre os parâmetros a serem avaliados (Cavalcanti, 2008; Dias et al., 2012; Zelioli et al., 2015).

Foram testadas três condições diferentes de fracionamento (Tabela 3), em no mínimo duplícata, onde parâmetros como o rendimento de espilantol (massa de espilantol/massa de planta*100), teor de espilantol (massa de espilantol/massa de extrato*100) presente em cada fração, bem como o rendimento global (massa da soma das frações/massa de planta*100) e o rendimento de cada fração (massa do extrato de cada separador/massa de planta*100) foram avaliados.

Tabela 3 – Condições de pressão (bar) e temperatura (°C) empregadas para isolamento do espilantol.

Condições	Separador	Separador	Separador	Separador
	1	2	3	4
1	100 bar/60 °C	80 bar/60 °C	75 bar/60 °C	atm/ambiente*
2	100 bar/60 °C	75 bar/60 °C	atm/ambiente*	----
3	80 bar/60 °C	75 bar/60 °C	atm/ambiente*	----

*atm: atmosférica

Para estes testes, o jambu, seco e moído (50 g), foi colocado em um cartucho de tecido e acondicionado em leito fixo onde houve então a passagem do dióxido de carbono nas condições de 300 bar e 60 °C, sendo esta etapa denominada extração. O período de extração foi precedido por um período estático de 30 min para permitir um contato inicial do jambu com o solvente de extração.

Após passar pelo leito, o dióxido de carbono foi então conduzido para os separadores nas condições de pressão e temperatura de acordo com a Tabela 3.

Estabeleceu-se a massa de 1,7 kg de CO₂ (vazão média de 1 kg h⁻¹) como ponto de parada de extração para cada um dos tratamentos, o material precipitado em cada separador foi então acondicionado em frasco âmbar e armazenado em freezer para análise futura.

Para a avaliação do perfil fitoquímico de maneira rápida e prática, foram feitas cromatografias em camada delgada com todas as frações, utilizando como fase móvel n-hexano:acetato de etila na proporção 70:30 (v:v). As frações foram aplicadas em banda com ajuda de microseringa de 10 µL e a detecção dos compostos foi feita inicialmente sob lâmpada UV a 254 nm, e, posteriormente, após revelação com solução de p-anisaldeído seguida de aquecimento a 100°C durante 3 min.

4.2.3 – Cromatografia Flash

Frações obtidas previamente por extração seguida de fracionamento com dióxido de carbono supercrítico e enriquecidas em espilantol foram reunidas e submetidas à Cromatografia Flash em um equipamento CombiFlash® Rf+ (Teledyne ISCO, Nebraska, EUA) equipado com coluna RediSep Rf de fase reversa C18 (40-60 µm; 9,6 cm h x 2,2 cm diâmetro; 40 g) e detector UV-Vis.

A fase móvel foi constituída por água ultrapura (solvante A) e etanol absoluto (solvante B) e teve como condição inicial de eluição 50% de B por 10 minutos, seguido por gradiente linear de 50-100% de B de 10 a 35 minutos, com vazão de 10 mL/min e coleta de frações com 10 mL cada. O espilantol foi monitorado aos 229 nm e as frações foram inicialmente analisadas por meio de CCDs e as que continham espilantol foram posteriormente analisadas por HPLC-DAD. O método, utilizando água e etanol como solventes, foi desenvolvido baseando-se em trabalho publicado

por Modarai et al. (2010). Estes experimentos foram realizados no CPQBA na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica sob supervisão da Dra. Vera Lucia Garcia.

4.2.4 – Análises por HPLC

As análises por HPLC foram conduzidas em um equipamento Waters® Alliance modelo 2695, com detector de arranjo de fotodiodo Waters®, modelo 2996. A análise foram baseadas em metodologia adaptada de Castro et al. (2014), utilizando coluna Luna Phenomenex® (150 x 4,60 mm, 5µm), fase móvel Acetonitrila:Água (30:70, v/v) em modo isocrático, com fluxo de 1 mL/min, e volume de injeção de 20 µL. A determinação do teor de espilantol no presente trabalho foi feita através da construção de curvas analíticas, utilizando como padrão analítico, espilantol adquirido da empresa ChromaDex® com pureza informada de 88,5%. As análises foram realizadas no CPQBA na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, sob supervisão da Dra. Marili Villa Nova Rodrigues.

4.2.5 – Análises por RMN

A identidade do espilantol foi confirmada através de ressonância magnética nuclear em equipamento Bruker 9.4 T, modelo AVANCE III, operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C), utilizando sonda BBI de 5 mm a 25° C, CDCl_3 (clorofórmio deuterado) como solvente e TMS (tetrametilsilano) como padrão interno. Os espectros foram obtidos no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, através de parceria com o Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira.

4.3 – Avaliação *in vitro* do espilantol

Os testes de avaliação da viabilidade celular em fibroblastos gengivais humanos (HGF-1, sigla em inglês), bem como a análise de expressão gênica e de citocinas foram conduzidos na *University of Southern California* (USC, Los Angeles -

CA), sob a supervisão do Prof. Dr. Ramiro Mendonça Murata, através de concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche à doutoranda Verônica Santana de Freitas Blanco (08/2015 a 06/2016 - bolsista Capes nº6211/2015-01).

4.3.1 – Avaliação da Viabilidade Celular

A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada por meio de método fluorimétrico (O'Brien et al., 2000; Silva et al., 2017). Fibroblastos Gengivais Humanos (ATCC® CRL-2014™), cultivados em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Lonza, Maryland, EUA) foram semeados (1×10^5 células/mL) em uma placa com 96 poços e mantidos em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ para crescimento. Após 24 h, aspectos morfológicos, bem como a aderência dos fibroblastos a placa foram observados através de microscópio invertido (EVOS FL, Life Technologies, CA, EUA). Espilantol (1 a 1000 µM/mL ou 221.34 ng a 221.34 µg/mL) foi adicionado ao meio de cultura e novamente incubado (37 °C e 5% CO₂). Após o período de incubação determinado (24, 48 ou 72 h) o meio foi descartado, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS, Lonza, Maryland, EUA) e novo meio contendo resazurina foi adicionado (CellTiter Blue Viability Assay; Promega Corp, Wisconsin, EUA). A placa foi novamente incubada (37 °C e 5% CO₂) e após 4 horas o sobrenadante foi transferido para nova placa e a fluorescência foi medida em um leitor de microplacas (SpectraMax M5; Molecular Devices, California, EUA) com 550 nm de excitação e 585 nm de emissão.

4.3.2 – Análise de expressão gênica

RNA total foi isolado dos fibroblastos gengivais humanos tratados com espilantol (20 µM ou 4,43 µg/mL) utilizando-se o kit Qiagen RNeasyMini Kit (Qiagen, California, EUA). A quantidade e a qualidade (razão 260/280) de RNA foram obtidas por meio de nanofotometria (NanoPhotometer P360, Implen, California, EUA). Um micrograma de RNA foi convertido em cDNA através do kit RT² First Strand em acordo com as orientações do fabricante (Qiagen, California, EUA).

O cDNA obtido foi utilizado para a avaliação da expressão gênica por meio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) em um painel contendo 84 genes

implicados na resposta inflamatória e imune (Human Inflammatory Response & Autoimmunity kit, PAHS-077Z, Qiagen, California, EUA). A análise foi realizada através do portal da Qiagen Sabiosciences, disponível em: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>.

4.3.3 – Análise de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Doze citocinas e quimiocinas (IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17A, IFN γ , TNF α , GM-CSF) presentes no sobrenadante das culturas de fibroblastos gengivais humanos tratadas com espilantol (concentração de 20 e 200 μ M ou 4,43 e 44,23 μ g/mL, respectivamente) foram analisadas utilizando-se o kit *Human Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISArray* (MEH-004A; SABiosciences, Maryland, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.4 – Avaliação *in vivo* do espilantol

4.4.1 – Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25-40 g) obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) mantidos a 25 ± 2 °C em ciclos claro-escuro de 12 h (fase clara iniciando às 7:00 h) e mantidos em biotério com água e ração “ad libitum”, por pelo menos 7 dias antes dos experimentos. O experimento foi realizado após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNICAMP sob nº 4534-1/2017, e o certificado encontra-se anexado a este trabalho (Anexo 1).

4.4.2 – Modelo de mucosite intestinal em camundongos

O modelo de mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil (5-FU) foi realizado conforme metodologia descrita por Hamouda et al. (2017). Este experimento foi conduzido no CPQBA na Divisão de Farmacologia, sob supervisão do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e da médica veterinária Dra. Karin Maia Monteiro. Os animais foram divididos aleatoriamente em 5 grupos ($n=6-7/\text{grupo}$) sendo:

- *Controle negativo* - Foram tratados, por via oral (gavagem), com veículo (suspensão de 0,2 % de carboximetilcelulose – 5 mL/kg) por 7 dias e, a partir do quarto dia, receberam solução salina estéril por via intraperitoneal (dias 4 a 7);
- *Controle positivo* – Foram tratados por via oral (gavagem), com veículo por 7 dias, e, a partir do quarto dia, receberam dose de 50 mg/kg de 5-FU por via intraperitoneal (dias 4 a 7).
- *Grupos 10, 20 e 30* - Foram tratados, por via oral (gavagem), com espilantol (10, 20 e 30 mg/kg suspenso em solução de 0,2 % de carboximetilcelulose) por 7 dias, e, a partir do quarto dia, receberam dose de 50 mg/kg de 5-FU por via intraperitoneal (dias 4 a 7).

A Figura 6 ilustra o protocolo experimental utilizado.

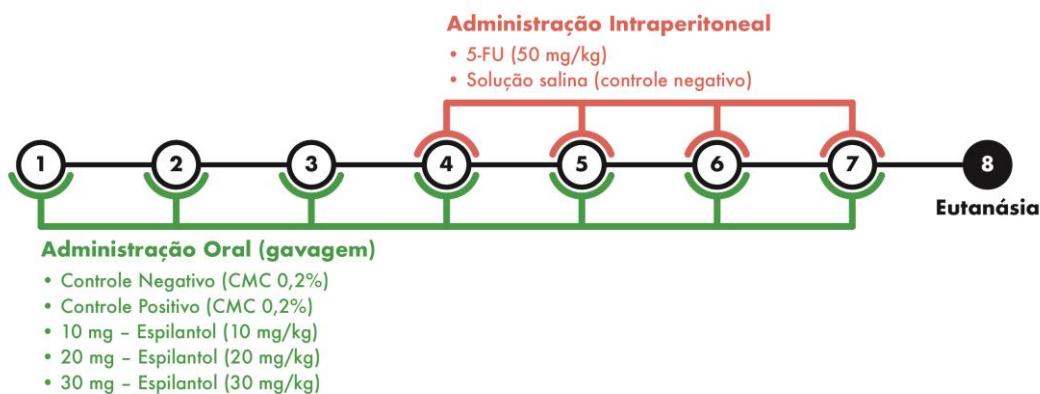


Figura 6 – Protocolo experimental para indução da mucosite intestinal com 5-FU.

No oitavo dia de experimento, foram coletadas amostras de sangue periférico de cada animal, em tubos com anticoagulante (EDTA-sódico) direto do plexo retro orbital para aferição de citocinas inflamatórias. Os animais foram então eutanasiados por aprofundamento da anestesia (combinação de quetamina e xilazina) e segmentos do intestino delgado foram retirados para análise morfológica e histológica. Amostras desta mesma região também foram congeladas a -80 °C para posterior dosagem de mieloperoxidase (MPO).

4.4.3 – Avaliação do consumo de ração e peso corporal

O consumo de ração foi determinado diariamente durante todo o período experimental através da aferição do consumo da ração em cada gaiola, dividido pelo número de animais presentes na mesma, determinando-se assim o consumo de ração médio diário para cada animal.

Para a determinação do peso corporal, os animais foram pesados diariamente e os valores foram expressos como variação de peso (%) em relação ao peso no início do período experimental.

4.4.4 – Determinação de citocinas plasmáticas.

Os níveis plasmáticos das citocinas IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α foram determinados utilizando imunoensaio multiplex com o kit de ensaios de citocinas (Bio-Plex Pro, Bio-Rad, BEL). Imediatamente após a coleta, os tubos contendo sangue periférico e o anticoagulante EDTA-sódico foram centrifugados por 15 min a 1000 g em centrífuga refrigerada a 4 °C para separação do plasma.

O plasma foi então transferido para um novo tubo de polipropileno e submetido à nova centrifugação (2000 g, por 10 min, 4 °C) para remoção de quaisquer eventuais precipitados ainda presentes. Após esta etapa, o plasma foi aliquotado e armazenado a te -20 °C até utilização.

Para a quantificação das citocinas, o plasma foi diluído uma vez seguindo as instruções do fabricante. As medidas foram realizadas em equipamento Bio-Plex 200 (Bio-Rad, SWE) no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da Unicamp.

4.4.5 – Determinação dos níveis da mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO), uma enzima encontrada em neutrófilos, foi realizada de acordo com o método descrito por

Krawisz et al. (1984). Fragmentos do intestino delgado, na razão de 1:20 (p/v) foram suspensos e homogeneizados em tampão de fosfato 50 mM contendo brometo de hexadecil trimetil amônio a 0,5% (pH 6,0). As amostras foram então submetidas a congelamento e descongelamento por três vezes e então centrifugados a 8300 rpm durante 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de 96 poços onde foi então adicionado cloridrato de orto-dianisidina (0,167 mg/mL) em tampão fosfato contendo peróxido de hidrogênio (2 µl/ml). As mudanças na absorbância a 450 nm foram registradas com um espectrofotômetro. A atividade da enzima MPO foi calculada por interpolação em uma curva padrão, realizada com peroxidase de râbano. Uma unidade de mieloperoxidase (U) é definida como aquela suficiente para degradar 1 µmol/min de peróxido de hidrogênio a 25 °C. Os resultados foram expressos como U/g de tecido.

4.4.6 – Histologia

As análises histológicas foram realizadas na Universidade Estadual Paulista - UNESP em Rio Claro/SP através de parceria com a Dra. Patrícia Rosa de Oliveira do Departamento de Biologia. Segmentos do intestino delgado (jejuno) foram fixados durante 24 horas em paraformaldeído a 4%, desidratados em série crescente de etanol (50 a 100%), diafanizados em xilol e então transferidos para moldes plásticos previamente preenchidos com Paraplast Plus®. Em seguida, todos os blocos foram seccionados em fatias de 7 µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. Foram preparadas 10 lâminas para cada animal e estas foram então examinadas em um fotomicroscópio Motic BA300.

4.5 – Preparo do bioadesivo

Com base em testes preliminares e em publicações recentes, diversas combinações de polímeros foram avaliadas a fim de determinar a mais adequada para a incorporação do espirantol. Os testes preliminares avaliaram características como tempo de secagem, friabilidade, maleabilidade, homogeneidade e aspecto visual do bioadesivo (Preis et al., 2013; Rana e Murthy, 2013; Borges et al., 2015).

A combinação contendo 3,5 % de hidroxipropilmetylcelulose (HPMC) e 2 % de carboximetilcelulose (CMC) tendo, como coadjuvantes, 2,5 % de propilenoglicol e

2,5 % de transcutol[®], se mostrou a mais apropriada, e foi utilizada na confecção do bioadesivo neste trabalho.

Os polímeros HPMC e CMC foram dissolvidos em água deionizada sob aquecimento (60 ± 2 °C) e agitação constante. A mistura foi então mantida em repouso para completa eliminação de bolhas e, após 24 h, com o auxílio de um homogeneizador (modelo T10 basic, Ultra Turrax[®], Staufen, Alemanha), os coadjuvantes foram então adicionados junto com o espilantol isolado na concentração de 9,7 µg/mg de filme. A fim de obtenção de bioadesivos ainda mais homogêneos, a técnica de extensão do hidrogel sobre uma placa de vidro com o auxílio de um extensor (Figura 7) foi utilizada.



Figura 7 – Placa de vidro e extensor de acrílico empregados na preparação do bioadesivo.

4.5.1 – Avaliação do bioadesivo

4.5.1.1 – Massa, espessura e pH

Após secagem em temperatura ambiente, o bioadesivo foi cuidadosamente removido da placa de vidro e recortado em quadrados de 1,0 x 1,0 cm. As medidas de espessura foram feitas com o auxílio de paquímetro digital (modelo Cal II, Tesa, Renens, SWZ) e a massa obtida em balança analítica (Mettler Toledo, São Paulo, BR). O pH foi avaliado dissolvendo-se o bioadesivo em 7 mL de água destilada e

medindo o pH da solução resultante após 15 min em pHmetro (Micronal , São Paulo, BR) calibrado previamente. Todos os testes foram realizados em quadruplicata.

4.5.1.2 – Avaliação do teor de espilantol no bioadesivo

Para a avaliação do teor de espilantol no bioadesivo, um quadrado de dimensões 1,5 x 1,5 cm foi posto em contato, por 24 h, com 5 mL de metanol grau HPLC. Após esse período, uma alíquota foi retirada e o teor de espilantol foi determinado por HPLC conforme metodologia descrita no item 4.2.4. Todos os testes foram realizados em quadruplicata.

4.5.2 – Estudo de estabilidade acelerada do bioadesivo

Os bioadesivos, acondicionados em embalagens plásticas impermeáveis revestidas com alumínio e com fechamento *zip*, foram submetidos à estufa seca com temperatura de 40 ± 1 °C por 120 dias. Os bioadesivos foram analisados nos tempos 0, 30 e 120 dias nos quesitos aparência, pH e teor de espilantol. Os testes foram realizados como descrito anteriormente em, no mínimo, quadruplicata (Brasil, 2005).

4.6 – Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância considerando nível de significância de 5%. As análises foram feitas no software R versão 3.4.3 (The R Foundation for Statistical Computing) e os gráficos foram preparados no GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

5 RESULTADOS

5.1 – Extração seguida de fracionamento com dióxido de carbono supercrítico

O rendimento global (massa da soma das frações/massa de planta*100) dos tratamentos 1, 2 e 3 com dióxido de carbono supercrítico foi, respectivamente, $3,6 \pm 0,8\%$; $3,9 \pm 0,16\%$ e $3,13 \pm 0,04\%$. O rendimento das frações (massa de extrato de cada separador/massa de planta*100) obtido em cada um dos tratamentos encontra-se detalhado na Tabela 4.

Tabela 4 – Rendimento e teor de espilantol em porcentagem (massa de espilantol/massa de extrato*100) das frações nas diferentes condições de pressão e temperatura. (média ± desvio padrão).

	Condição 1		Condição 2		Condição 3	
	Rendimento (%)	Teor de Espilantol (%)	Rendimento (%)	Teor de Espilantol (%)	Rendimento (%)	Teor de Espilantol (%)
Separador 1	$1,89 \pm 0,56$ P(bar)/T(°C) 100/60	$1,7 \pm 0,9$	$2,86 \pm 0,05$ 100/60	$2,3 \pm 0,4$	$2,56 \pm 0,01$ 80/60	$5,1 \pm 0,1$
Separador 2	$0,82 \pm 0,16$ P(bar)/T(°C) 80/60	$9,3 \pm 1,5$	$0,71 \pm 0,02$ 75/60	$19,9 \pm 2,7$	$0,259 \pm 0,04$ 75/60	$5,4 \pm 0,1$
Separador 3	$0,35 \pm 0,09$ P(bar)/T(°C) 75/60	$4,8 \pm 0,2$	$0,34 \pm 0,09$ atm/amb	$12,8 \pm 0,4$	$0,31 \pm 0,01$ Atm/room T	$11,1 \pm 0,3$
Separador 4	$0,59 \pm 0,01$ P(bar)/T(°C) atm/amb	$8,3 \pm 2,1$	--	--	--	--
Total	$3,6 \pm 0,8$	$4,8 \pm 0,22$	$3,9 \pm 0,16$	$6,4 \pm 0,03$	$3,13 \pm 0,04$	$5,7 \pm 0,01$

*atm: atmosférica amb: ambiente

O rendimento de espilantol (massa de espilantol/massa de planta*100) obtido nos tratamentos 1 e 3 foi muito semelhante, apresentando $0,17 \pm 0,05\%$ e $0,18 \pm 0,01\%$ de espilantol, respectivamente. O rendimento de espilantol apresentado no tratamento 2 se mostrou superior ($0,25 \pm 0,02\%$).

O teor de espilantol (massa de espilantol/massa de extrato*100), como pode ser observado na Tabela 4, também variou nas diferentes condições de pressão e temperatura dos separadores, sendo que o Separador 2 (75 bar/60 °C) do

Tratamento 2, apresentou o maior teor de espilantol ($19,9 \pm 2,7\%$). Tais diferenças, no entanto, não apresentaram significância estatística segundo os testes utilizados (Kruskal-Wallis, seguido do teste discriminatório de Dunn ao nível de 5 % de significância).

As frações obtidas exibiram diferentes colorações, como pode ser observado na Figura 8.

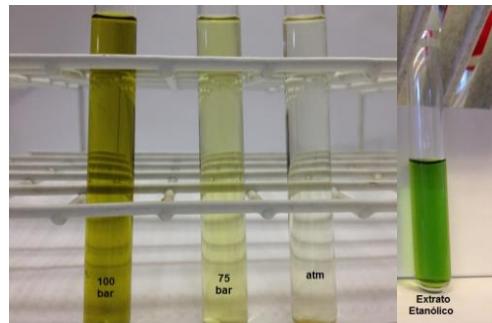


Figura 8 – Aspecto visual de três frações provenientes do Tratamento 2. Ao lado, extrato etanólico de jambu para comparação.

Cromatografias em camada delgada foram realizadas para a avaliação do perfil cromatográfico inicial nas frações obtidas por dióxido de carbono supercrítico, conforme ilustrado na Figura 9. O extrato etanólico foi incluído afim de comparação.

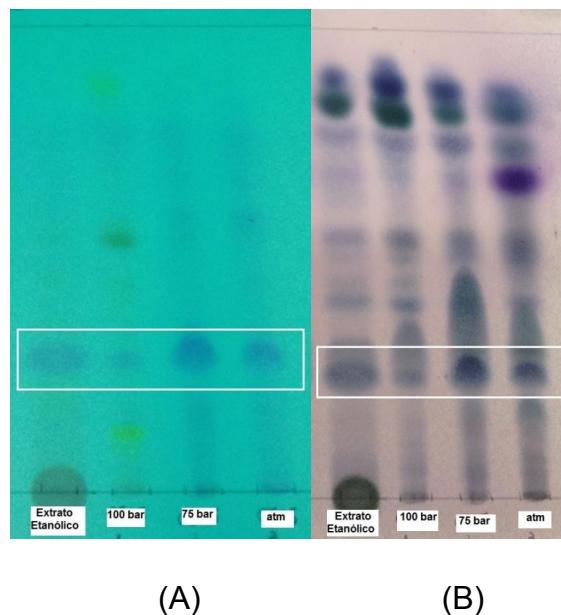


Figura 9 – Cromatografia em camada delgada de frações obtidas no Tratamento 2 e também do extrato etanólico de jambu. Fase Móvel: n - hexano:acetato de etila 70:30; (v/v). (A) revelação em 254 nm; (B) revelação após borrifar com p-anisaldeído/aquecimento. Áreas em destaque referem-se à banda do espilantol.

O cromatograma do padrão de espilantol (A) e os chromatogramas das frações provenientes do Tratamento 2 estão ilustrados na Figura 10. Neles, é possível observar a presença de um pico majoritário, aos 16 minutos, referente ao espilantol.

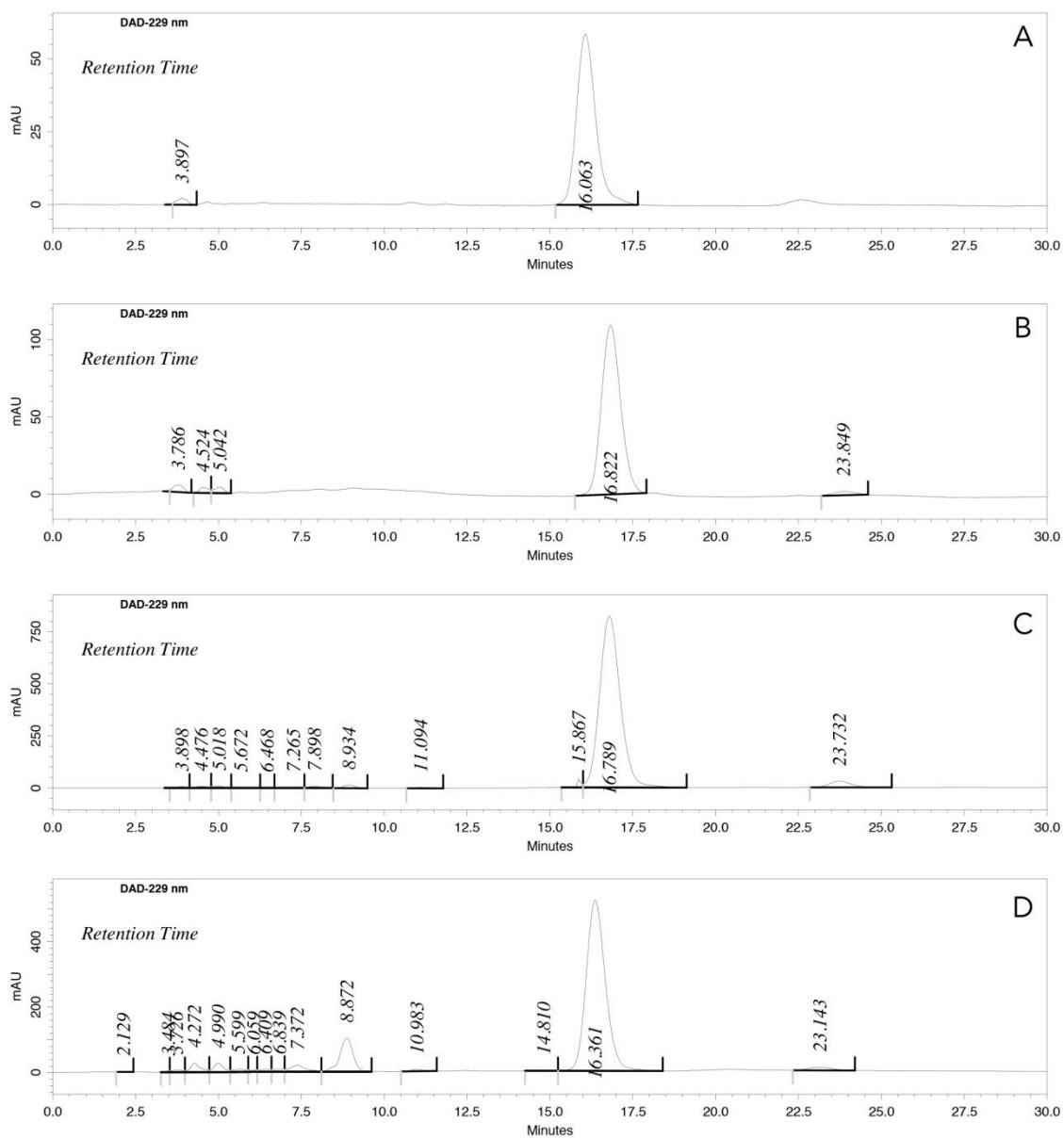


Figura 10 – Cromatogramas obtidos por HPLC do espilantol e das frações provenientes do Tratamento 2. A: padrão de espilantol (pico aos 16 min); B: 100 bar/60 °C; C: 75 bar/60 °C; D: pressão atmosférica e temperatura ambiente.

5.2 – Purificação do espilantol por meio de Cromatografia Flash

As frações enriquecidas em espilantol provenientes da extração e fracionamento com dióxido de carbono supercrítico foram reunidas e submetidas à purificação através da cromatografia Flash. Nas condições descritas no item 4.2.3, foi possível observar região de eluição do espilantol após cerca de 20 min (20 a 30 min), quando a porcentagem de etanol encontrava-se entre 70 e 80%. O cromatograma obtido pode ser observado na Figura 11.

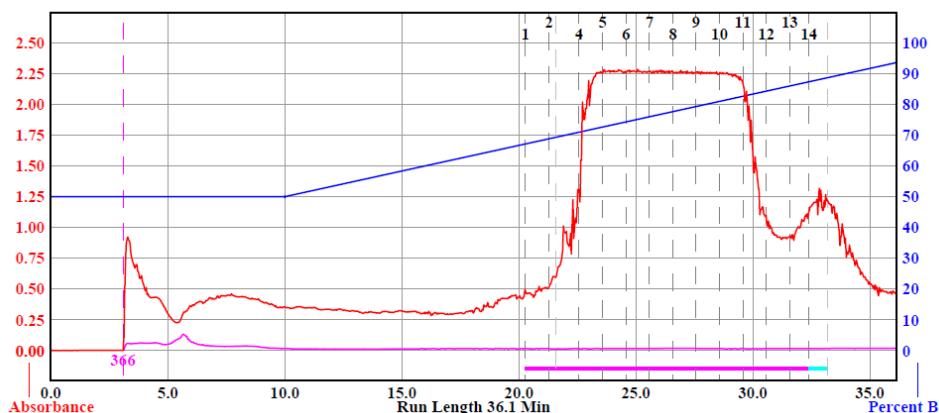


Figura 11 – Cromatograma obtido pelo equipamento Flash. A linha azul no gráfico indica a porcentagem empregada do solvente etanol absoluto. Linha vermelha: 229 nm. Linha rosa: 366 nm.

As frações referentes a essa região apresentaram coloração amarelada, como pode ser observado na Figura 12. A coloração amarela é característica da presença do espilantol.



Figura 12 – Fração obtida por cromatografia Flash.

As frações que continham espilantol foram então analisadas por HPLC e as que eram semelhantes foram reunidas. A Figura 13 mostra cromatograma obtido por HPLC de uma fração contendo 97,22% de pureza em espilantol.

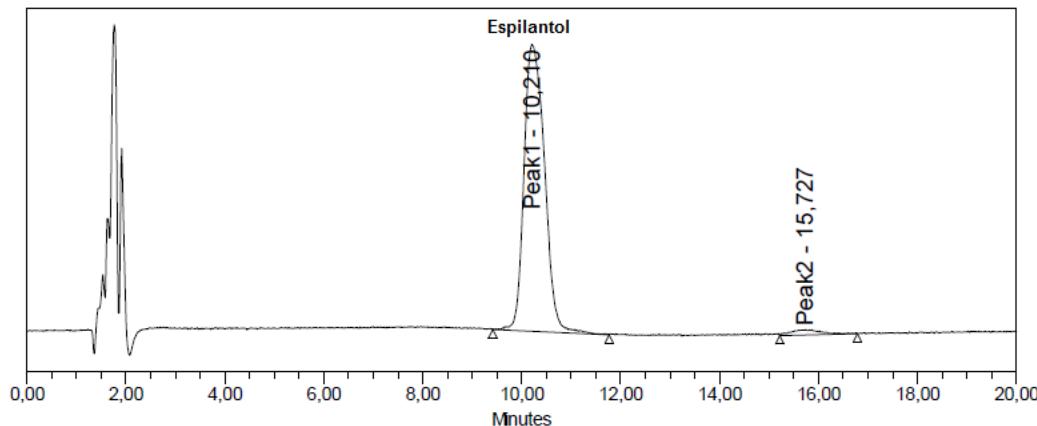


Figura 13 – Cromatograma obtido por HPLC. O pico referente ao espilantol é observado a 10,21 minutos, bem como os picos referentes ao diluente (2 min) e impureza (15 min). Coluna X Bridge™ Shield C18 (100 x 2.1 mm, 3.5 µm), fase móvel - Acetonitrila: Água (40:60, v/v).

A análise por RMN desta fração confirmou a identidade do espilantol, e os valores dos deslocamentos químicos (ppm) e constantes de acoplamento (*J*) podem ser observados na Tabela 5. Estes resultados foram semelhantes aos descritos previamente em literatura (Nakatani e Nagashima, 1992; Mbeunkui et al., 2011).

Tabela 5 – Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) e de ^1H (400 MHz) para a fração isolada por Cromatografia Flash (espilantol).

Posição do átomo de carbono	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$
1	166,0 >C=O	-----
2	124,1 CH	5,80 (dt $J=15,3$ e 1,4 - 1H)
3	143,6 CH ₃	6,82 (dt $J=15,3$ e 6,7 - 1H)
4	32,1 CH ₂	2,37 – 2,22 (m - 2H)
5	26,4 CH ₂	2,37 – 2,22 (m - 2H)
6	127,7 CH	5,26 (td $J=10,8$ e 0,7 - 1H)
7	129,5 CH	5,97 (tl $J=10,8$ - 1H)

8	126,7	CH	6,29 (dddq J=15,0; 10,8, 1,7 e 1,1 - 1H)
9	130,0	CH	5,70 (dqt J=15,0, 6,8 and 0,7 - 1H)
10	18,3	CH3	1,78 (ddt J=6,8, 1,7 and 0,7 - 3H)
1'	46,9	CH2	3,15 (dd J=6,8 and 6,2 - 2H)
2'	28,7	CH	1,80 (hept J=6,8 - 1H)
3',4'	20,1	CH3	0,92 (d J=6,8 - 6H)
NH	-----		5,56 (sl - 1H)

*deslocamento químico em ppm, J em Hz. dt (duplo triplo), m (multiplo), td (triplo duplo), tl (triplo largo), dddq (duplo duplo duplo quarteto), dqt (duplo quintuplo), ddt (duplo duplo triplo), dd (duplo doubleto), hept (hepteto), sl (singleto largo).

5.3 – Avaliação *in vitro* do espilantol

No que se refere à viabilidade celular, foi possível observar diminuição significativa somente em fibroblastos expostos à dose mais alta de espilantol testada (1000 µM), nos tempos de 48 e 72h, como pode ser observado na Figura 14.

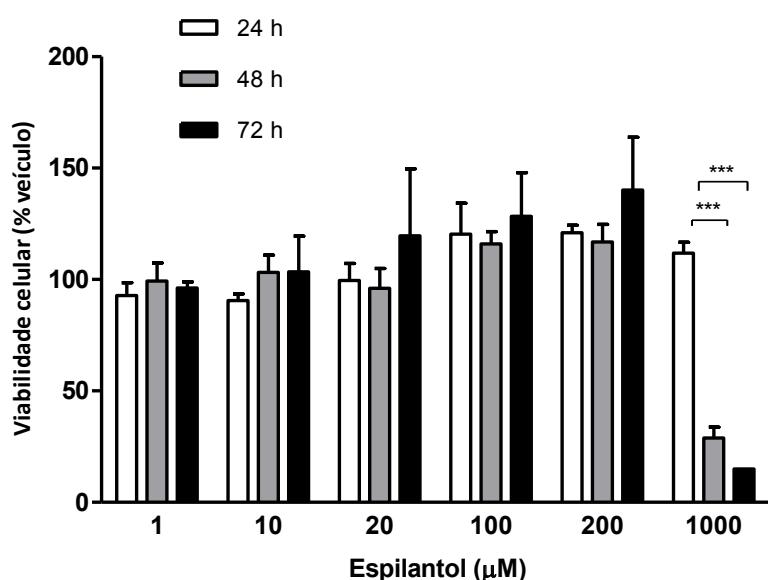


Figura 14 – Viabilidade de Fibroblastos Gengivais Humanos (HGF-1) expostos a diferentes concentrações de espilantol comparados a grupo controle (veículo). ANOVA seguido por Dunnet teste, ***P < 0,001. Média ± desvio padrão.

Com base neste resultado, para as análises seguintes, utilizou-se concentração de espilantol de 200 µM ou inferior, já que nestas concentrações não houve qualquer sinal de toxicidade celular nos fibroblastos.

Sendo assim, para a avaliação dos efeitos do espilantol na regulação da expressão gênica em fibroblastos, optou-se por focar em painel com 84 genes relacionados à resposta imune e inflamatória humana. Após a análise, dentre os 84 genes testados, foi possível identificar 5 genes diferencialmente expressos, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 – Fator de alteração (*fold change*) de genes diferencialmente expressos em fibroblastos HGF-1 tratados com 20 µM de espilantol.

Gene	Descrição	Fold Change
SELE	Selectina E	-5,6689
CCL17	Quimiocina (Motivo C-C) ligante 17	-5,4283
IL9	Interleucina 9	-3,2344
TNFSF14	Fator de Necrose Tumoral - Membro 14 da Superfamília de Ligantes	-2,8856
CXCL1	Quimiocina (Motivo C-X-C) ligante 1	-2,1039

Além do estudo dos efeitos do espilantol sobre a expressão gênica, é importante também avaliar os níveis de proteínas efetivamente produzidas. Para isso foram medidos os níveis de 12 citocinas envolvidas diretamente no processo inflamatório (IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17A, IFNg, TNF- α e GM-CSF).

Após exposição ao espilantol nas concentrações de 20 µM e 200 µM por 48h, não foi possível observar alterações significativas nos níveis destas citocinas quando comparado ao grupo controle.

5.4 – Avaliação *in vivo* do espilantol

Os animais submetidos à administração repetida de 5-FU apresentaram diminuição no consumo de ração a partir do quarto dia experimental, como pode ser observado na Figura 15. Esta diminuição, porém, não foi estatisticamente significante (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn)

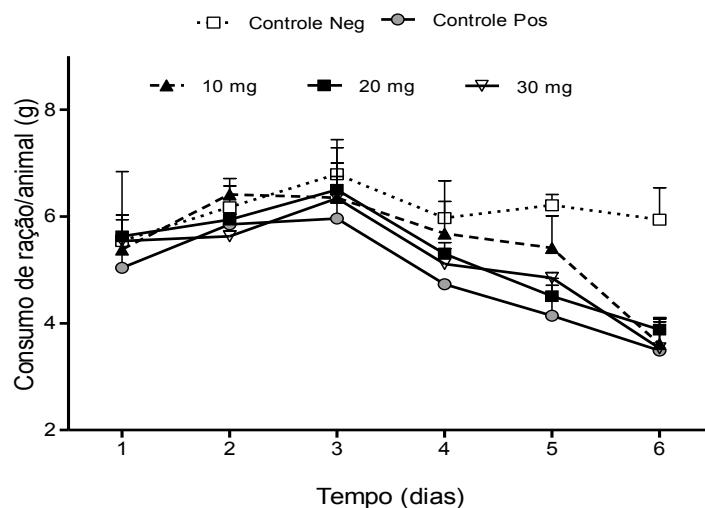


Figura 15 – Variação no consumo de ração por animal (gramas) em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com espilantol em diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/kg). Média ± Desvio Padrão. n=6-7. (Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn)

Pode-se observar também perda de peso de maneira gradual, sendo esta perda mais evidente no sétimo dia experimental, conforme Figura 16.

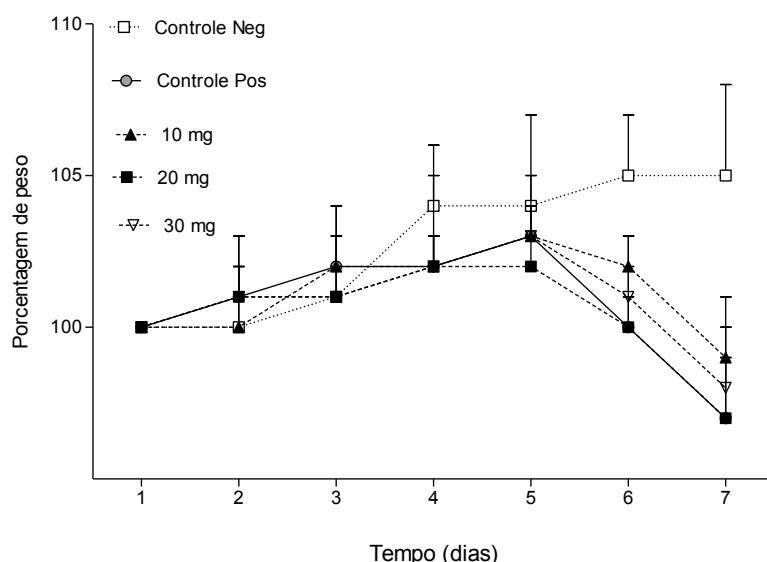


Figura 16 – Variação da porcentagem de peso de animais com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com espilantol em diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/kg). Média ± Desvio Padrão. n=6-7. ANOVA de único fator, seguido do teste de Dunnet.

A perda de peso dos animais também não apresentou diferença estatística entre os grupos (ANOVA de único fator, seguido do teste de Dunnet). Além da perda de peso e diminuição no consumo da ração, os animais que receberam 5-FU apresentaram também diarreia, em grau leve a moderado, a partir do sexto dia experimental.

Na análise do plasma periférico dos animais, não foi possível detectar nenhuma das citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) testadas.

Quanto aos níveis de mieloperoxidase, foi possível observar redução, de maneira estatisticamente significante, no grupo tratado com 30 mg de espilantol, conforme pode ser observado na Figura 17.

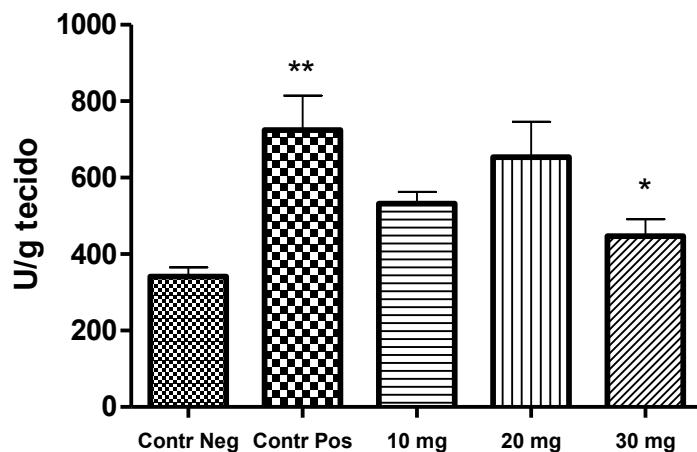


Figura 17 – Variação dos níveis de mieloperoxidase (U/g tecido) em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com espilantol em diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/kg). Média ± erro padrão. ANOVA seguida por teste de Dunnett, ** P < 0,002 comparado ao controle negativo; * P < 0,05 comparado ao controle positivo.

A análise histológica do intestino dos camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com espilantol revelou que, no grupo controle positivo, a administração do 5-FU induziu alterações na mucosa intestinal, traduzida pela perda da integridade do epitélio e redução da altura das vilosidades, como pode ser

observada na Figura 18 (B). Essas alterações ficam ainda mais evidentes quando comparadas ao controle negativo (A), no qual a integridade tecidual está mantida.

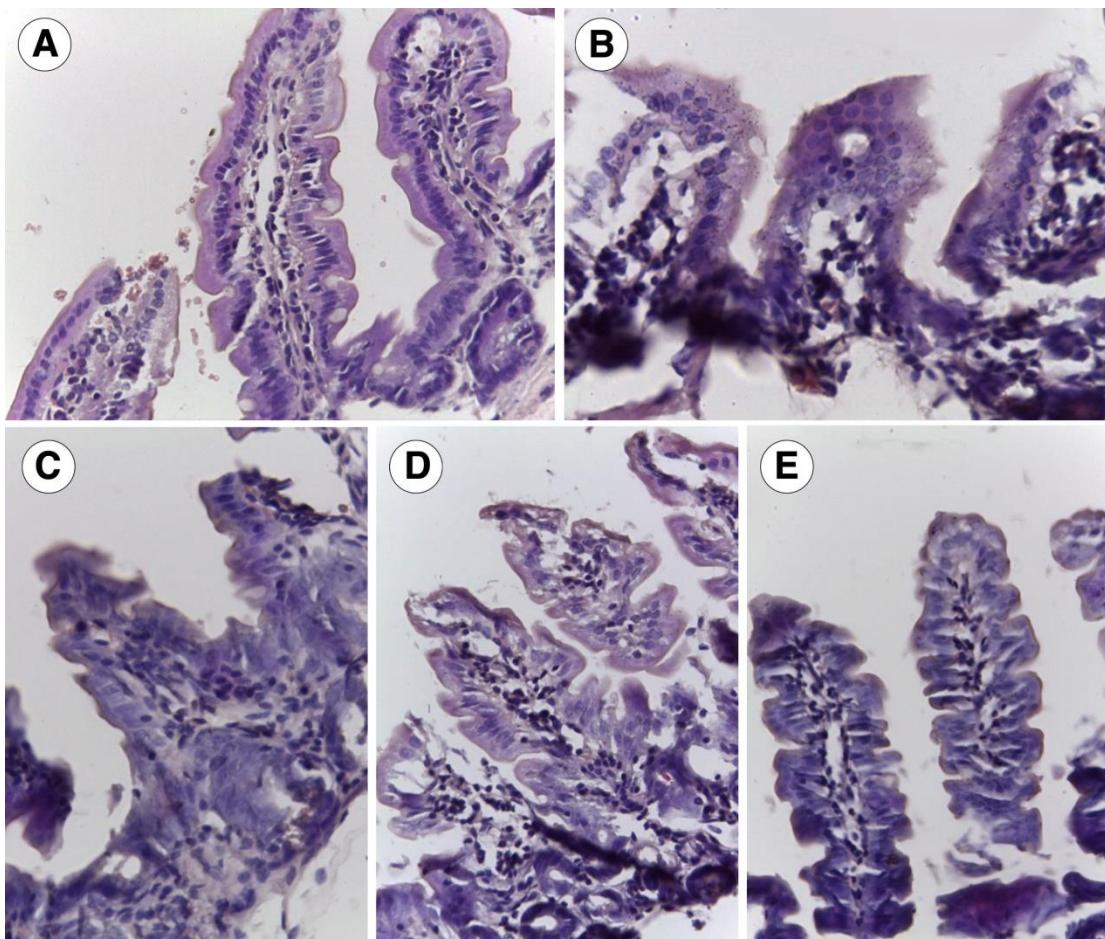


Figura 18 – Secções histológicas do intestino delgado de camundongos em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com diferentes concentrações de espilantol. Controle Negativo (A); Controle Positivo 5-FU (B); Espilantol 10 mg (C); Espilantol 20 mg (D); Espilantol 30 mg (E). 50 μm de aumento.

Através da análise histológica é possível observar que o grupo tratado com 10 mg de espilantol (Figura 18 – C) já começa a apresentar modificações em comparação ao grupo controle positivo, com camada muscular maior que a do grupo controle e submucosa mais organizada.

Nos animais tratados com 20 mg de espilantol (Figura 18 – D), o intestino mostra vilosidades e criptas maiores do que aquelas encontradas no grupo controle e no grupo tratado com 10 mg de espilantol. No entanto, as vilosidades são delimitadas por membrana muito irregular com várias pregas e reentrâncias.

Os animais tratados com 30 mg de espilantol (Figura 18 – E) apresentaram diversos indícios de recuperação intestinal com vilosidades menos irregulares e em maior número.

A altura da vilosidade do grupo tratado com 30 mg/kg de espilantol também foi estatisticamente maior, quando comparada ao grupo controle positivo (5-FU), como pode ser observado na Figura 19.

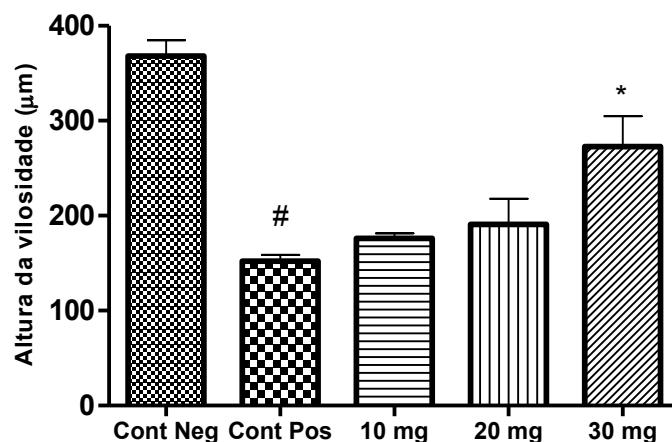


Figura 19 – Variação na altura das vilosidades do intestino delgado de camundongos com mucosite intestinal induzida por 5-FU e tratados com espilantol em diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/kg). Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn # $P < 0,0068$ quando comparado ao grupo controle negativo. * $P < 0,0044$ quando comparado ao grupo controle positivo. Média \pm desvio padrão.

5.5 – Avaliação dos bioadesivos

A combinação de polímeros (3,5 % de HPMC e 2 % de CMC), bem como a adição dos coadjuvantes propilenoglicol e transcutol nas proporções de 2,5 % cada, se mostrou ideal na obtenção de uma formulação em gel com boa viscosidade, permitindo um uniforme e fácil espalhamento pela placa.

Após secagem, o bioadesivo foi facilmente removido da placa, apresentou bom aspecto visual (Figura 20) e se mostrou resistente e flexível à manipulação.



Figura 20 – Aspecto de bioadesivo contendo espilantol após corte.

O pH obtido foi de $6,48 \pm 0,09$, a espessura foi de $0,170 \pm 0,004$ mm e a massa de $0,0200 \pm 0,0004$ g, indicando boa homogeneidade do filme obtido.

A estabilidade da formulação foi avaliada pelo período de 120 dias e o teor de espilantol, bem como o pH, foram aferidos nos dias 0, 30 e 120 e os resultados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação do pH e do teor de espilantol nos bioadesivos de jambu .

Bioadesivo com espilantol	Dias		
	0	30	120
pH	$6,48 \pm 0,09$	$6,50 \pm 0,04$	$6,52 \pm 0,03$
Teor de Espilantol ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	$9,17 \pm 0,39$	$8,70 \pm 0,22$	$7,20 \pm 0,49^*$

(n=4) Média \pm desvio padrão. ANOVA de único fator, seguida do teste de Dunnet *(p-valor = 0,0001) quando comparado com o tempo 0.

Durante o período de tempo investigado, o pH manteve-se estável, porém o teor de espilantol apresentou redução significativa (ANOVA de único fator, seguida do teste de Dunnet p=0,0001), após 120 dias de armazenamento em estufa a 40 °C, quando comparado ao teor inicial (tempo 0).

6 DISCUSSÃO

Uma série de operações é necessária para separar os princípios ativos desejados de uma matriz vegetal. Estudos feitos com o intuito de desenvolver métodos de extração que resultem em produtos de melhor qualidade, livres de solventes tóxicos, obtidos por tecnologias de separação ditas “limpas” ou “verdes” estão em grande demanda e são de grande apelo comercial (Cavalcanti, 2008; Bernardo-Gil, 2013).

Nesse contexto, a utilização de fluidos supercríticos na extração de compostos bioativos é uma alternativa promissora. Um fluido supercrítico apresenta densidade e viscosidade diferenciadas e por essa razão consegue penetrar no material sólido de maneira mais efetiva que solventes líquidos, o que resulta em maior difusão, extrações mais rápidas e sem resíduos tóxicos no extrato final (Pereda et al., 2007; Bernardo-Gil, 2013).

A extração da *Acmella oleracea* utilizando dióxido de carbono supercrítico já foi descrita previamente (Cavalcanti et al., 2008; Dias et al., 2012, Dias et al., 2017), porém, até o momento, a extração seguida de fracionamento ainda não foi relatada.

A extração seguida de fracionamento por fluido supercrítico é um conceito conhecido e que pode ser útil para melhorar a seletividade das extrações. Esta técnica explora as diferentes solubilidades de compostos extraídos por fluido supercrítico, uma vez que esta seletividade pode ser manipulada variando-se as condições de temperatura e pressão de separadores em série acoplados ao sistema extractivo (Reverchon e De Marco, 2006).

Baldino et al. (2018) utilizaram extração seguida de fracionamento com dióxido de carbono supercrítico para concentrar princípios ativos de interesse presentes na arruda (*Ruta graveolens*) de maneira seletiva e com melhor rendimento, quando comparado a extração tradicional feita com acetato de etila. Processo semelhante é utilizado para extração e fracionamento do gengibre (*Zingiber officinale*) e também do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (Yodung et al., 2000; Zibetti et al., 2013).

O espilantol encontra-se distribuído de maneira variável em toda a parte aérea do jambu, porém, em maior concentração nas flores (Dias et al., 2012; Cheng

et al. 2015). Neste trabalho, optou-se pela utilização de toda a parte aérea ao invés de somente as flores, pois estaria mais próximo de uma possível aplicação industrial, já que a separação do material implicaria em aumento de custos.

Outro aspecto importante e que também deve ser levado em conta é o tamanho da partícula utilizada, pois esta desempenha um papel determinante nos processos de extração e, partículas muito pequenas ou muito grandes podem resultar em perda de eficiência e rendimento do processo. O tamanho das partículas utilizadas neste trabalho ($290 \pm 10 \mu\text{m}$) encontra-se dentro dos valores recomendados por outros autores para extração supercrítica (Reverchon e De Marco, 2006; Cavalcanti, 2008).

O rendimento global dos tratamentos com dióxido de carbono supercrítico obtidos no presente trabalho foram semelhantes entre os diferentes tratamentos ($3,65\% \pm 0,8$; $3,92\% \pm 0,16$ e $3,13\% \pm 0,04$; tratamento 1, 2 e 3, respectivamente), e encontram-se próximos aos valores relatados por outros autores.

Cavalcanti (2008) obteve rendimento de 4,53% utilizando as partes aéreas de jambu nas condições de 276 bar e 40°C, enquanto Dias et al. (2012) obtiveram rendimento global de 4,82% para as flores e de 1,59% para as folhas de jambu nas condições de 250 bar e 50°C.

Estes resultados revelam que os valores de rendimento para o jambu podem variar de acordo com a parte da planta empregada, temperatura e também conforme as diferentes condições de pressão, como pode ser visto nos resultados presentes na Tabela 4, onde, alterações de pressão e temperatura resultaram em diferenças expressivas no rendimento. Modificações nestes parâmetros abrem espaço para otimização do processo de extração seguida de fracionamento do jambu e devem ser exploradas em trabalhos futuros.

Quanto ao teor de espilantol, o tratamento 2 apresentou rendimento superior aos outros dois tratamentos avaliados, com $0,25\% \pm 0,02$ de espilantol em base seca. Cavalcanti (2008) obteve rendimento de espilantol similar, 0,27% nas condições de pressão de 276 bar e 40°C, porém, este valor foi obtido somente após um período de 600 minutos de extração, comparado aos 120 minutos aqui avaliados, indicando que o processo de extração seguido de fracionamento por

dióxido de carbono supercrítico pode ser uma alternativa para obtenção de extratos enriquecidos em espilantol.

Outro aspecto importante e que deve ser levado em conta, além do rendimento e do teor de espilantol, é a aparência do extrato obtido. Extratos com coloração verde escura apresentam menor valor mercadológico, já que possuem aplicação industrial limitada (Cavalcanti, 2008). A fração com maior teor de espilantol obtida no presente trabalho (Figura 12 – Fração 2/Tratamento 2) apresentou coloração amarelo claro, o que a torna desejável e com maior valor agregado.

As frações enriquecidas em espilantol foram então submetidas a isolamento por meio de Cromatografia Flash, técnica amplamente utilizada para separação de substâncias de uma mistura complexa, que emprega ar pressurizado na eluição do solvente pela coluna. Esta técnica foi descrita pela primeira vez em 1978 por Still et al., e permite a utilização de quantidades maiores de amostra e redução significativa do tempo na purificação, uma vez que a separação ocorre de maneira mais rápida que a cromatografia em coluna convencional (Roge et al., 2011).

Inicialmente empregada na purificação de compostos provenientes da síntese orgânica, a cromatografia Flash vem também sendo utilizada no isolamento de bioativos contidos em diferentes espécies vegetais, tais como a *Curcuma zanthorrhiza*, *Piper nigrum*, *Salvia milthiorrhiza* (Weber et al., 2011), *Aloe barbadensis* (Zhong et al., 2014) ou *Taxus wallichiana* (Tao et al., 2017).

A utilização da cromatografia Flash para purificação de compostos presentes na *Acmella oleracea* já foi descrita por outros autores. Prachayasittikul et al. (2009), utilizando como eluente misturas de clorofórmio e metanol, isolaram compostos com atividade antimicrobiana e antioxidante presentes em extrato metanólico de *Acmella oleracea*.

No que tange o isolamento do espilantol, López-Martínez et al. (2011), utilizaram a cromatografia Flash para isolar diversas alquilamidas, dentre elas o espilantol, provenientes de extrato acetônico das raízes de *Heliospisia longipes*. Neste trabalho, os autores empregaram *n*-hexano e diclorometano (70:30) como eluentes para obtenção do espilantol.

Mbeunkui et al. (2011) também fizeram uso da cromatografia Flash para isolar o espilantol proveniente de frações obtidas por cromatografia de partição centrífuga, utilizando um gradiente de *n*-hexano e acetato de etila.

Spelman et al. (2011) relataram também o isolamento do espilantol em equipamento CombiFlash, porém utilizando como eluentes ácido acético 1% e acetonitrila (50:50) de maneira isocrática, e obtiveram espilantol com pureza estimada em 84%.

Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez em que o espilantol é isolado por meio de Cromatografia Flash utilizando água e etanol como eluentes. Vale ressaltar ainda que o processo se deu de maneira rápida (35 min) e resultou em alta pureza do composto (97% por HPLC), mantendo os princípios da química verde.

Logo após a administração de quimioterápicos ou da radioterapia, é possível observar apoptose aguda de fibroblastos na submucosa, antes mesmo de qualquer sinal clínico externo, como eritema ou ulceração. Dessa forma, a apoptose de fibroblastos está diretamente envolvida nos primeiros estágios do desenvolvimento da mucosite oral (Sonis, 2007).

Diante da importância dos fibroblastos para o desenvolvimento da mucosite oral, optou-se pela utilização desta linhagem celular para avaliação da citotoxicidade do espilantol.

Experimentos de viabilidade celular *in vitro* com espilantol foram relatados previamente por Wu et al. (2008) em linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7), nos quais, a viabilidade celular foi maior que 90% em doses de até 180 µM por 24h.

Gerbino et al. (2006) observaram, em células embrionárias de tecido renal (HEK-293), viabilidade aproximada a 80% em células expostas a espilantol na concentração de até 100 µg/mL (aproximadamente 450 µM) por 24 h. Nas concentrações acima deste valor, os autores observaram redução de 50% até 90% (900 a 1800 µM, respectivamente) na viabilidade celular.

Esta é a primeira vez em que se avalia o efeito do espilantol na viabilidade de fibroblastos humanos orais. Foi possível observar alterações significativas na viabilidade celular somente após 48 h de exposição ao espilantol e somente na

concentração mais alta testada (1000 µM), demonstrando a baixa citotoxicidade do espilantol ao tecido humano oral.

Uma vez que a mucosite provocada por quimioterápicos e radioterápicos resulta em diversas alterações celulares, inclusive nos níveis de quimiocinas e citocinas inflamatórias (Sultani et al., 2012) é interessante avaliar os efeitos do espilantol sobre os genes envolvidos neste processo.

Dentre os genes com alteração na expressão, o gene referente à Selectina E foi o que apresentou o maior hipoexpressão (*fold change* de -5,67). A proteína codificada por este gene é encontrada em células endoteliais estimuladas por citocinas e tem papel importante no processo de rolagem, sinalização celular e quimiotaxia, mediando à adesão de leucócitos sanguíneos nos locais de inflamação (Barthel et al., 2007; Zarbock e Ley, 2009).

Foi possível observar também alterações na expressão gênica das quimiocinas CCL17 e CXCL1. As quimiocinas pertencentes à família CC estimulam principalmente monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos e, por essa razão, são importantes na inflamação crônica e alérgica. As quimiocinas CXC, também conhecidas como as alfa-quimiocinas, estimulam principalmente a quimiotaxia de neutrófilos e são potentes angiogênicos (Guerreiro et al., 2011; Palomino e Marti, 2015).

A proteína codificada pelo gene TNFSF14, também conhecida como LIGHT, é um membro da superfamília de Fator de Necrose Tumoral (TNF) e atua na regulação da resposta imune, através da ativação de células T e também na indução de células tumorais (Wang et al., 2009).

A IL-9, citocina descrita pela primeira vez no final da década de 80, atua de maneira pleiotrópica em mastócitos e linfócitos, tem papel especial na asma e também em infecções provocadas por parasitas (Renauld e Snick, 2003; Goswami e Kaplan, 2011).

Essas alterações provocadas pelo espilantol na expressão de alguns genes podem servir como um indicativo de seu mecanismo de ação e deverão ser exploradas em maior profundidade em estudos futuros.

As alterações nos níveis dessas citocinas foram observadas por Wu et al. (2008) somente nos macrófagos estimulados com LPS, e encontram-se de acordo com os resultados observados no presente trabalho, no qual os fibroblastos expostos ao espilantol (20 e 200 µM) e que não sofreram estimulação prévia com LPS ou outra endotoxina, não tiveram seus níveis de citocinas alterados.

Esses resultados demonstram que o espilantol parece não modificar de maneira intrínseca os níveis de algumas proteínas inflamatórias *in vitro*, atuando somente após estimulação prévia.

Para a avaliação *in vivo* do espilantol, utilizou-se o modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU. O 5-Fluorouracil, fármaco descoberto na década de 1950, atua ao interferir com a síntese proteica e de DNA, alterando dessa forma o metabolismo e divisão celular. Ainda hoje é considerado um fármaco de extrema importância para o tratamento de diversos tipos de cânceres, tais como o de mama, cabeça, pescoço, estômago, colorretal e de pâncreas (Longley et al., 2003; Lee et al., 2016).

A monoterapia com o 5-FU ou sua combinação com outros quimioterápicos em pacientes oncológicos geralmente resulta em diversos efeitos colaterais, tais como náusea, vômito, mucosite oral e intestinal e também diarreia (Peterson et al., 2011; Soveri et al., 2014).

Diversos estudos empregaram o 5-FU como fármaco indutor de mucosite em modelos *in vivo*, seja com o intuito de avaliar diferentes tratamentos para a mucosite, ou para um maior entendimento da mesma (Bastos et al., 2015; Pereira et al., 2016; Kato et al., 2017).

No presente trabalho foi possível observar que todos os animais expostos ao 5-FU apresentam diminuição no consumo de ração, perda de peso e também diarreia, o que também foi observado por outros autores em modelos de indução de mucosite (Song et al., 2013; Whittaker et al., 2016). O processo inflamatório severo gerado pela mucosite induzida pelo 5-FU pode afetar a ingestão alimentar, que, associado à perda na capacidade de absorção intestinal, resulta em perda de peso e diarreia (Maioli et al., 2014).

Os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ estão frequentemente elevados após a administração de quimioterápicos. Desta forma, a redução na atividade destas citocinas pode servir como um marcador confiável da recuperação tecidual e do efeito anti-inflamatório de um determinado tratamento. (Chen et al., 2006; Logan et al., 2007).

Estas citocinas são algumas das que estão implicadas na complexa fisiopatologia da mucosite, e contribuem com o aumento da severidade da mesma, ao aumentar, por exemplo, a permeabilidade intestinal, o que leva à maior exposição deste tecido a patógenos e consequentemente a maior toxicidade (Wardill et al., 2012).

Yeung et al. (2015) observaram aumento significativo nos níveis séricos do IFN- γ , IL-6 e TNF- α em camundongos Balb/c submetidos a 5 dias de tratamento com 5-FU (30 mg/kg/dia, via ip). Resultados semelhantes foram descritos por Chen et al. (2016), onde os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-1 β de camundongos da linhagem kunming estavam aumentados após 4 dias de administração de 5-FU (60 mg/kg/dia, via ip).

No presente trabalho, onde um esquema de indução de mucosite semelhante foi utilizado (50 mg/kg/dia, por 4 dias, via ip), não foi possível detectar nenhuma das quatro citocinas avaliadas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) no plasma de camundongos Swiss, o que levanta a hipótese de uma menor susceptibilidade desta linhagem quando comparada as linhagens Balb/c ou kunming na inflamação sistêmica provocada pelo 5-FU.

A mieloperoxidase, enzima encontrada em neutrófilos e, com menor frequência em monócitos e macrófagos, é comumente utilizada como marcador do processo inflamatório intestinal, uma vez que sua atividade está diretamente relacionada ao número de neutrófilos presentes no tecido inflamado (Masoodi et al., 2011).

Chang et al. (2012) observaram níveis elevados de MPO em modelo de mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos da linhagem Balb/c, e aumento nos níveis desta enzima também foram observados em tecido lingual de ratos F344 com mucosite induzida por radioterapia (Miyamoto et al., 2015).

Neste estudo, o grupo tratado com 5-FU (controle positivo) também apresentou níveis elevados de MPO quando comparado ao grupo controle negativo. Foi possível observar também que o espilantol, na dosagem de 30 mg/kg, foi capaz de reduzir a atividade da mieloperoxidase, quando comparada ao grupo controle positivo (5-FU), o que indica, que nesta dosagem, o espilantol se mostrou capaz de reduzir a inflamação provocada pelo 5-FU.

Quanto ao estudo histológico, foi possível observar que no grupo tratado com 5-FU (controle positivo) houve diminuição significativa na altura das vilosidades intestinais. Estas alterações provocadas pelo 5-FU também foram observadas por outros autores e indicam injúria intestinal intensa característica da mucosite (Dos Santos Filho et al., 2015; Kato et al., 2017).

A administração diária do espilantol exerceu efeito protetor contra os danos intestinais induzidos pelo 5-FU, ao atenuar a redução na altura das vilosidades intestinais, sendo que, este efeito se mostrou mais evidente nos animais tratados com 30 mg/kg de espilantol.

Este efeito protetor ou curativo apresentado pelo espilantol pode ser devido a sua atividade inibitória em citocinas pró-inflamatórias chaves no processo fisiopatológico da mucosite (Wu et al., 2008), que em conjunto, reduzem a toxicidade intestinal provocada pelo 5-FU.

A escolha do bioadesivo como forma farmacêutica adequada para o tratamento da mucosite oral está ligada a diversas vantagens apresentadas pelo mesmo. Além de atuar como uma barreira física, protegendo a superfície ulcerada e consequentemente, reduzindo a dor, o bioadesivo também tem a vantagem de permanecer por maior tempo no local aplicado, reduzindo a frequência de aplicação e proporcionando maior controle da dose, o que não ocorre, por exemplo, com formulações em gel ou pomadas, que tendem a se espalhar pela boca com maior facilidade (Gilhotra et al., 2014).

Outras vantagens de fármacos bucoadesivos são sua fácil aplicação, devido a seu pequeno tamanho e espessura, podendo ser administrados tanto para pacientes geriátricos quanto pediátricos, de forma não invasiva. Além disso, o rápido início de ação e menor efeito de primeira passagem proporcionado pela mucosa oral resultam

na redução de efeitos gastrointestinais adversos provocados por alguns fármacos (Morales e McConville, 2011).

Para que um bioadesivo seja considerado adequado, este deve ser flexível, elástico, se adequar aos movimentos bucais sem causar desconforto ao paciente e deve possuir bioadesividade suficiente para permanecer na boca pelo tempo de ação desejado (Bruschi e Freitas, 2005).

Um polímero é geralmente utilizado como agente mucoadesivo, e atua de forma a proporcionar a retenção da forma farmacêutica com a mucosa oral. Dentre os polímeros mucoadesivos comumente utilizados em formulações deste tipo, estão o álcool polivinílico (PVA), a carboximetilcelulose (CMC), a hidroxipropilmelcelulose (HPMC), a hidroxietilcelulose (HEC), o alginato de sódio, a quitosana, dentre outros (Salamat-Miller et al., 2005; Puratchikody et al., 2011).

Apesar de os polímeros serem os principais componentes em uma formulação oral, a adição de excipientes algumas vezes se faz necessária (Borges et al., 2015). Plastificantes, como glicerina, propilenoglicol ou polietilenoglicol, são excipientes que suavizam a rigidez estrutural do filme bioadesivo, aumentando sua maleabilidade. Os plastificantes devem ser adicionados, quando necessário, de maneira criteriosa, uma vez que, em excesso, podem resultar em diminuição da adesividade da formulação oral (Karki et al. 2016).

A carboximetilcelulose (CMC) e hidroxipropilmelcelulose (HPMC) são derivados da celulose muito utilizados como aditivos na indústria alimentícia, pois atuam como emulsificantes e espessantes em molhos, caldos e xaropes. Por possuírem a capacidade de produzir soluções transparentes exigidas nessa categoria de produtos, atuam melhorando as propriedades organolépticas de diversos produtos alimentícios, proporcionando sensação bucal agradável e aumentando a percepção de sabor (Coffey et al., 2006).

Além do seu uso na indústria alimentícia, os polímeros HPMC e CMC são também empregados na manufatura de fármacos bucoadesivos que englobam desde o tratamento de náusea e vômito, esquizofrenia, disfunção erétil e Alzheimer até o manejo da dor crônica ou provocada pelo câncer (Borges et al., 2015; Silva et al., 2015).

Diante disto, a formulação desenvolvida neste estudo apresentou características desejáveis para uma possível aplicação na mucosite oral, uma vez que se mostrou de fácil manipulação e com bom aspecto visual. Além disso, os níveis de pH obtidos encontram-se dentro do pH fisiológico da mucosa oral (Pather et al., 2008) e se mostraram estáveis durante todo o período de observação (120 dias).

Quanto ao espilantol presente na formulação, foi possível observar que por pelo menos 30 dias, o teor de espilantol se manteve estável e dentro dos padrões aceitáveis (até 5% de variação do teor inicial) havendo redução significativa no teor quando a formulação foi avaliada no tempo de 120 dias.

O estudo de estabilidade acelerada, além de dar subsídios para estabelecimento de um prazo de validade e sugerir as condições de armazenamento, é um parâmetro imperativo para avaliar o comportamento do produto em determinado espaço de tempo. Dentre os fatores que influenciam a degradação de um produto, a temperatura pode ser considerada como o fator ambiental mais importante, e na maior parte dos casos, aumentos de temperatura resultam em maior degradação química (Castro e Chinchilla, 2009).

Estudos anteriores mostraram boa estabilidade do espilantol contido na planta ou em extrato etanólico em diferentes condições de temperatura (Bae et al., 2012; Freitas-Blanco et al., 2016; Barbosa et al., 2017), porém, quando isolado, a estabilidade do espilantol é diminuída consideravelmente (Albin e Simons, 2010), o que nos leva a crer que a inclusão de um conservante deve ser mandatória em etapas futuras no desenvolvimento farmacotécnico.

Uma vez que a formulação desenvolvida neste estudo manteve-se íntegra e com pH estável durante o período estudado, a adição de conservantes em formulações futuras deve ser considerada para que não haja degradação do espilantol, mantendo assim suas características originais por maior período de tempo.

7 CONCLUSÃO

A combinação da extração e fracionamento com dióxido de carbono supercrítico e cromatografia Flash, possibilitou a obtenção de espilantol com alto grau de pureza cromatográfica (teor por HPLC em 97,22%) mantendo-se os princípios da química verde.

Os estudos *in vitro* com fibroblastos orais (HGF-1) permitiram determinar que, em dosagens inferiores a 200 µM, o espilantol não apresentou toxicidade por até 72h. Foi possível observar que não houve alterações significativas nos níveis de algumas citocinas e quimiocinas envolvidas no processo inflamatório nas concentrações de 20 e 200 µM. No entanto, a expressão de alguns genes (por exemplo, Selectina E e IL-9) foi significativamente reduzida pelo espilantol, apontando um possível papel deste composto no processo de regulação inflamatória e imunológica.

Nos estudos *in vivo*, o espilantol (30 mg/kg), foi capaz de atenuar de maneira significativa os efeitos deletérios provocados pelo 5-FU em modelo de mucosite intestinal em camundongos Swiss, através da supressão do processo inflamatório.

Por fim, foi possível desenvolver uma formulação promissora para uso no tratamento da mucosite oral, embora mais testes devam ser feitos incluindo ajustes na formulação para que não haja degradação do espilantol na formulação.

REFERÊNCIAS

- Al-Ansari S, Zecha JA, Barasch A, de Lange J, Rozema FR, Raber-Durlacher JE. Oral Mucositis Induced By Anticancer Therapies. *Curr Oral Health Rep.* 2015;2(4):202-211.
- Albin KC, Simons CT. Psychophysical evaluation of a sanshool derivative (alkylamide) and the elucidation of mechanisms subserving tingle. *PLoS One.* 2010 Mar 3;5(3):e9520. doi: 10.1371/journal.pone.0009520.
- Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, Bateman E, Blijlevens N, Gibson RJ, et al.; Mucositis Study Group of Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer.* 2013 Jul;21(7):2075-83.
- Andrade CKZ. Solventes alternativos. In: Correa AG, Zuin VG, editores. Química verde: fundamentos e aplicações. 1. reimpressão. SP: EdUFSCar; 2012. p.44-7.
- Andrade LC, Rotta IW, Chaves SR, Uchida DT, Gazim ZC, Ferreira FBP et al. Effectiveness of *Acmella oleracea* for topical anesthesia on buccal mucosa. *Rev Odonto Cienc* 2013; 28(3) :61-5.
- Anholeto LA, Oliveira PR, Rodrigues RA, Spindola CD, Labruna MB, Pizano MA, Castro KN, Camargo-Mathias MI. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017 Jan;8(1):65-72.
- Armenta S, Guardia ML. Green chromatography for the analysis of foods of animal origin. *Trends Analyt Chem.* 2016; 80:517-30
- Bae SS, Ehrmann BM, Ettefagh KA, Cech NB. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. *Phytochem Anal.* 2010 Sep-Oct;21(5):438-43.
- Baldino L, Adamo R, Reverchon E. Concentration of *Ruta graveolens* active compounds using SC-CO₂ extraction coupled with fractional separation. *J Supercrit Fluids.* 2018; 131:82-86

Barbas LAL, Stringhetta GR, Garcia LD, Figueiredo MRC, Sampaio LA. Jambu, *Spilanthes acmella* as a novel anaesthetic for juvenile tambaqui, *Colossoma macropomum*: Secondary stress responses during recovery. *Aquaculture*. 2016; 456:70-5.

Barbosa AF, de Carvalho MG, Smith RE, Sabaa-Srur AUO. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2016a; 26(1):128-33.

Barbosa AF, Pereira CDSS, Mendes MF, De Carvalho Junior RN, De Carvalho MG, Maia JGS, Sabaa-Srur AUO. Spilanthol Content in the Extract Obtained by Supercritical CO₂ at Different Storage Times of *Acmella Oleracea* L. *Journal of Food Process Engineering*, 2017 40: n/a, e12441. doi:10.1111/jfpe.12441

Barthel SR, Gavino JD, Descheny L, Dimitroff CJ. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Nov;11(11):1473-91.

Bastos CCC, Ávila PHM, Filho EXDS, Ávila RI, Batista AC, Fonseca SG, Lima EM, Marreto RN, Mendonça EF, Valadares MC. Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: Toxicopharmacological evaluations. *Toxicol Rep*. 2015 Oct 30;3:279-287.

Bauter, M.R. Final report. Spilanthol: A 90-day dietary study in rats. Product Safety Labs. Study no. 33621. October 23, 2012. Unpublished report submitted by Flavour Industry to FLAVIS Secretariat, 2012.

Bernardo-Gil MG. Supercritical Extraction. In: Teixeira JA, Vicente AA, editores. *Engineering Aspects of Food Biotechnology*. 1. ed. CRC Press; 2013. p. 215-250.

Boonen J, Baert B, Burvenich C, Blondeel P, De Saeger S, De Spiegeleer B. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. *J Pharm Biomed Anal*. 2010b Nov 2;53(3):243-9. doi: 10.1016/j.jpba.2010.02.010.

Boonen J, Baert B, Roche N, Burvenich C, De Spiegeleer B. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. *J Ethnopharmacol.* 2010a Jan 8;127(1):77-84.

Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simões S. Oral films: Current status and future perspectives: I - Galenical development and quality attributes. *J Control Release.* 2015a 28;206:1-19. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.03.006.

Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simões S. Oral films: Current status and future perspectives II - Intellectual property, technologies and market needs. *J Control Release.* 2015b 28;206:108-21. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.03.012.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº1, de 29 de julho de 2005. Guia para a realização de estudos de estabilidade. Diário Oficial da União. 2005 ago 01.

Bruschi ML, Freitas O. Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems. *Drug Dev Ind Pharm.* 2005; 31(3): 293-310.

Castro KN, Lima DF, Vasconcelos LC, Leite JR, Santos RC, Paz Neto AA, Costa-Júnior LM. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitol Res.* 2014;113(10):3697-701.

Castro PA, Chinchilla I. Estudo de estabilidade para pedido de registro e pós-registro de medicamentos genéricos e similares. 8^a Mostra de produção científica da pós-graduação latu sensu da PUC Goiás. Ciência, Saúde e Esporte, Editora da PUC Goiás, 2009.

Caívaldi VMS. Extração de espilantol de *Spilanthes acmella* var *oleracea* com dióxido de carbono supercrítico [tese]. Campinas:UNICAMP/FEQ; 2008.

Chakraborty A, Devi BR, Sanjeebam R, Khumbong S, Thokchom IS. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. *Indian J Pharmacol.* 2010 Oct;42(5):277-9.

Chakraborty A, Devi RKB, Rita S, Sharatchandra Kh, Singh, Th I. Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. Indian J Pharmacol. 2004; 36(3):148-150.

Chang CT, Ho TY, Lin H, Liang JA, Huang HC, Li CC, Lo HY, Wu SL, Huang YF, Hsiang CY. 5-Fluorouracil induced intestinal mucositis via nuclear factor- κ B activation by transcriptomic analysis and in vivo bioluminescence imaging. PLoS One. 2012;7(3):e31808. doi: 10.1371/journal.pone.0031808.

Chen Y, Zheng H, Zhang J, Wang L, Jin Z, Gao W. Protective effect and potential mechanisms of Wei-Chang-An pill on high-dose 5-fluorouracil induced intestinal mucositis in mice. J Ethnopharmacol. 2016 Aug 22;190:200-11.

Cheng YB, Liu RH, Ho MC, Wu TY, Chen CY, Lo IW, Hou MF, Yuan SS, Wu YC, Chang FR. Alkylamides of *Acmella oleracea*. Molecules. 2015, 16;20(4):6970-7.

Cho YC, Bach TT, Kim BR, Vuong HL, Cho S. *Spilanthes acmella* inhibits inflammatory responses via inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages. Mol Med Rep. 2017 May 9.

Cilia-López VG, Juárez-Flores BI, Aguirre-Rivera JR, Reyes-Agüero JA. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. Pharm Biol. 2010 Feb;48(2):195-200. doi: 10.3109/13880200903078495.

Cinausero M, Aprile G, Ermacora P, Basile D, Vitale MG, Fanotto V, Parisi G, Calvetti L, Sonis ST. New Frontiers in the Pathobiology and Treatment of Cancer Regimen-Related Mucosal Injury. Front Pharmacol. 2017 Jun 8;8:354.

CMS - Centers for Medicare and Medicaid Services. Medicare Part B drug average sales price. www.cms.gov/mcrpartbdrugavgsalesprice/ [acesso em junho de 2017].

Correa AG, Zuin VG. Princípios fundamentais da química verde. In: Correa AG, Zuin VG, editoras. Química verde: fundamentos e aplicações. 1. reimpressão. São Paulo: EdUFSCar; 2012. p.9-22.

Cruz PB, Barbosa AF, Zeringóta V, Melo D, Novato T, Fidelis QC, Fabri RL, de Carvalho MG, Oliveira Sabaa-Srur AU, Daemon E, Monteiro CMO. Acaricidal activity

of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 2016 Sep 15;228:137-143.

De Spiegeleer B, Boonen J, Malysheva SV, Mavungu JD, De Saeger S, Roche N, et al. Skin penetration enhancing properties of the plant N-alkylamide spilanthol. *J Ethnopharmacol.* 2013 Jun 21;148(1):117-25. doi: 10.1016/j.jep.2013.03.076.

Dias A, Silva A, Botelho J, Junior R, Sousa H, Braga M. Temperature and density effects of the scCO₂ extraction of spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers. *The Journal of Supercritical Fluids [Internet]*. 2017; 121:[32-40 pp.].

Dias AMA, Santos P, Seabra IJ, Junior RNC, Braga MEM, de Sousa HC. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Supercritical Fluids*. 2012;61:62-70.

Dios PD, Scully C, Almeida OP, Bagán JV, Taylor AM, editores. Red and purple lesions: Desquamative gingivitis, mucositis. In: *Oral Medicine and Pathology at a Glance*. 2. ed. Winchester: John Wiley & Sons; 2016. p. 35.

Dos Santos Filho EX, Ávila PHM, Bastos CCC, Batista AC, Naves LN, Marreto RN, Lima EM, Mendonça EF, Valadares MC. Curcuminoids from *Curcuma longa*L. Reduced intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in mice: Bioadhesive,proliferative, anti-inflammatory and antioxidant effects. *Toxicol Rep.* 2015 Oct 23;3:55-62. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.10.010.

Dubey S, Maity S, Singh M, Saraf SA, Saha S. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. *Adv Pharmacol Sci.* 2013;2013:423750.

Duncan M, Grant G. Oral and intestinal mucositis - causes and possible treatments. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 Nov 1;18(9):853-74.

Dunn PJ. The importance of Green Chemistry in process research and development. *Chem Soc Rev*, 2012; 41: 1452-61.

EFSA - European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 303, Revision 1 (FGE.303Rev1): Spilanthol from chemical group 30. EFSA Journal 2015; 13(1):3995.

Erkey C. Fundamental aspects of supercritical fluids. In: Erkey C. (editor). Supercritical Fluids and Organometallic Compounds. 1. ed. Elsevier; 2011 p.11-9.

Escobedo-Martínez C, Guzmán-Gutiérrez SL, Hernández-Méndez MM, Cassani J, Trujillo-Valdivia A, Orozco-Castellanos, LM et al. Heliopsis longipes: anti-arthritis activity evaluated in a Freund's adjuvant-induced model in rodents. Rev. bras. Farmacogn. 2017; 27(2): 214-9. doi: 10.1016/j.bjp.2016.09.003.

Favoreto R, Gilbert B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. Rev Fitos. 2010; 5(1):83-91.

Fema - Flavors and Extracts Manufacturers of the United States. Safety Assessment of Jambu Oleoresin. FEMA:Washington, D.C.,2000; pp. 12.

Filippou O, Bitas D, Samanidou V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2017 Feb 1;1043:44-62.

Freitas-Blanco VS, Franz-Montan M, Groppo FC, de Carvalho JE, Figueira GM, Serpe L, et al. Development and Evaluation of a Novel Mucoadhesive Film Containing *Acmella oleracea* Extract for Oral Mucosa Topical Anesthesia. PLoS One. 2016 Sep 14;11(9):e0162850. doi: 10.1371/journal.pone.0162850.

Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. Trends Anal. Chem. 2013; 50: 78-84.

Gerbino A, Schena G, Milano S, Milella L, Barbosa AF, Armentano F et al. Spilanthol from *Acmella Oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney. PLoS One. 2016 May 23;11(5):e0156021. doi:10.1371/journal.pone.0156021.

Gilhotra RM, Ikram M, Srivastava S, Gilhotrab N. A clinical perspective on mucoadhesive buccal drug delivery systems. *J Biomed Res.* 2014; 28(2): 81–97.

Goswami R, Kaplan MH. A Brief History of IL-9. *J Immunol* 2011; 186:3283-88.

Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azedo-Pereira JM. As quimiocinas e os seus receptores. *Acta Med Port.* 2011; 24(S4):967-976.

Gupta N, Patel AR, Ravindra RP. Design of akkalkara (*spilanthes acmella*) formulations for anti-microbial and topical anti-inflammatory activities. *Int J Pharm Bio Sci.* 2012; 3(4): 161-170.

Hamouda N, Sano T, Oikawa Y, Ozaki T, Shimakawa M, Matsumoto K, et al. Apoptosis, Dysbiosis and Expression of Inflammatory Cytokines are Sequential Events in the Development of 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017 Apr 4. doi: 10.1111/bcpt.12793.

Henderson RK, Jimenez-Gonzalez C, Constable DJC, Alston SR, Inglis GGA, Fisher G et al. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. *Green Chem.* 2011; 13:854-62.

Ing JW. Head and Neck Cancer Pain. *Otolaryngol Clin North Am.* 2017 Aug;50(4):793-806. doi: 10.1016/j.otc.2017.04.001.

Jasmin L, Wu MV, Ohara PT. GABA puts a stop to pain. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2004 Dec;3(6):487-505.

Jirovetz L, Buchbauer G, Wobus A, Shafi MP, Abraham GT. Essential oil analysis of *Spilanthes acmella* Murr. fresh plants from southern India. *J Essent Oil Res.* 2005; 17: 429-31.

Karki S, Kim H, Na SJ, Shin D, Jo K, Lee J, Thin films as an emerging platform for drug delivery. *AJPS* 2016; 11(5):559-74. doi: 10.1016/j.ajps.2016.05.004.

Kato S, Hamouda N, Kano Y, Oikawa Y, Tanaka Y, Matsumoto K, Amagase K, Shimakawa M. Probiotic *Bifidobacterium bifidum* G9-1 attenuates 5 fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice via suppression of dysbiosis-related secondary inflammatory responses. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017 Oct;44(10):1017-1025.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology*. 1984 Dec;87(6):1344-50.

Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, et al.; Mucositis Guidelines Leadership Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014 May 15;120(10):1453-61.

Lee JJ, Beumer JH, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016 Sep;78(3):447-64. doi: 10.1007/s00280-016-3054-2.

Lenardão EJ, Freitag RA, Dabdoub MJ, Batista ACF, Silveira CC. "Green chemistry" – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quim. Nova*, 2003; 26(1):123-9.

Ley JP, Krammer G, Loofit J, Reinders G, Bertram HJ. Structure-activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkamides related to spilanthol. *Flavour Science Recent Advances and Trends*. 2006; 21-4.

Lim, TK. *Acmella oleracea*. In: Lim, TK. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 7, Flowers*. 1. Ed. Springer Netherlands; 2014. P.163-74.

Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh AS, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DM. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Rev*. 2007 Aug;33(5):448-60.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):330-8.

López-Martínez S, Aguilar-Guadarrama AB, Rios MY. Minor alkamides from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. *Phytochem Lett*. 2011, (4)3: 275-9.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda; 2008.

MacMillan DS, Murray J, Sneddon HF, Jamieson C, Watson AJB. Replacement of dichloromethane within chromatographic purification: a guide to alternative solvents. *Green Chem.* 2012;14: 3016-3019.

Maioli TU, de Melo Silva B, Dias MN, Paiva NC, Cardoso VN, Fernandes SO, Carneiro CM, Dos Santos Martins F, de Vasconcelos Generoso S. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. *J Negat Results Biomed.* 2014 Apr 11;13:6.

Maria-Ferreira D, da Silva LM, Mendes DA, Cabrini Dde A, Nascimento AM, Iacomini M, Cipriani TR, Santos AR, Werner MF, Baggio CH. Rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen: gastroprotective and ulcer healing properties in rats. *PLoS One.* 2014 Jan 8;9(1):e84762. doi: 10.1371/journal.pone.0084762.

Masoodi I, Tijjani BM, Wani H, Hassan NS, Khan AB, Hussain S. Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review. *Ger Med Sci.* 2011 Feb 16;9:Doc03.

Mbeunkui F, Grace MH, Lategan C, Smith PJ, Raskin I, Lila MA. Isolation and identification of antiplasmodial N-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011 Jul 1;879(21):1886-92.

Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, Alteri R, Jemal A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jul;66(4):271-89. doi: 10.3322/caac.21349.

Miyamoto H, Kanayama T, Horii K, Kawai T, Tsuchimochi T, Shigetomi T, Shibamoto Y, Shibuya Y. The relationship between the severity of radiation induced oral mucositis and the myeloperoxidase levels in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015 Sep;120(3):329-36.

Modarai M, Yang M, Suter A, Kortenkamp A, Heinrich M. Metabolomic profiling of liquid *Echinacea* medicinal products with in vitro inhibitory effects on cytochrome P450 3A4 (CYP3A4). *Planta Med.* 2010 Mar;76(4):378-85.

Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 Feb;77(2):187-99.

Moreira VM, Maia JG, de Souza JM, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Characterization of convulsions induced by a hexanic extract of *Spilanthes acmella* var. *oleracea* in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1989;22(1):65-7.

Nakatani N, Nagashima M. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1992 Jan;56(5):759-62.

Nascimento AM, de Souza LM, Baggio CH, Werner MF, Maria-Ferreira D, da Silva LM, et al. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. *Phytochemistry.* 2013 Jan;85:137-42.

Nicolatou-Galitis O, Sarri T, Bowen J, Di Palma M, Kouloulias VE, Niscola P, et al.; Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of amifostine for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer.* 2013 Jan;21(1):357-64. doi: 10.1007/s00520-012-1613-6.

Nigrinis LSO, Olarte J, Olarte EM. Estudio fitofarmacológico de La fraccion liposoluble de las flores de *Spilanthes americana* (mutis). Parte II: Estudio Farmacológico. *Rev Colomb Cienc Quim Farm.* 1987; 16: 3-10.

Nomura EC, Rodrigues MR, da Silva CF, Hamm LA, Nascimento AM, de Souza LM, et al. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. *J Ethnopharmacol.* 2013 Nov 25;150(2):583-9.

O'Brien CP. Management of stomatitis. *Can Fam Physician.* 2009; 55(9):891-2.

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 2000 Sep;267(17):5421-6.

Palomino DC, Marti LC. Quimiocinas e imunidade. *Einstein.* 2015;13(3):469-73

Pandey V, Agrawal V, Raghavendra K, Dash AP. Strong larvicidal activity of three species of *Spilanthes* (Akarkara) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston,

Anopheles culicifacies, species C) and filaria vector (Culex quinquefasciatus Say). Parasitol Res. 2007; 102(1):171-4.

Pandey V, Agrawal V. Efficient micropropagation protocol of *Spilanthes acmella* L. possessing strong antimalarial activity. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2009; 45: 491.

Panjwani M. Efficacy of palifermin in the hematopoietic stem cell transplant setting. J Adv Pract Oncol. 2013 Mar;4(2):89-100.

Pather SI, Rathbone MJ, Senel S. Oral Transmucosal Drug Delivery. In: Rathbone MJ, Hadgraft J, Roberts MS, Lane ME, editores. Modified-Release Drug Delivery Technology. 2. ed. CRC Press; 2008. p. 53-73.

Paulraj J, Govindarajan R, Palpu P. The genus spilanthes ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties: a review. Adv Pharmacol Sci. 2013;2013:510298. doi: 10.1155/2013/510298.

Peach J, Eastoe J. Supercritical carbon dioxide: a solvent like no other. Beilstein J Org Chem. 2014; 10:1878-95

Pereda S, Bottini SB, Brignole EA. Fundamentals of Supercritical Fluid Technology. In: Martínez JL.editor. Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds. 1. ed. 2007. p. 1-24.

Pereira VB, Melo AT, Assis-Júnior EM, Wong DV, Brito GA, Almeida PR, Ribeiro RA, Lima-Júnior RC. A new animal model of intestinal mucositis induced by the combination of irinotecan and 5-fluorouracil in mice. Cancer Chemother Pharmacol. 2016 Feb;77(2):323-32. doi: 10.1007/s00280-015-2938-x.

Peterson EA, Dillon B, Raheem I, Richardson P, Richter D, Schmidt R, Sneddon HF. Sustainable chromatography (an oxymoron?). Green Chem. 2014; 16:4060

Plotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupska M, Górecki T, Namieśnik J. Green chromatography. J Chromatogr A. 2013 Sep 13;1307:1-20.

Prachayasittikul S, Suphapong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, et al. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. Molecules. 2009 Feb 19;14(2):850-67. doi: 10.3390/molecules14020850.

Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. EXCLI J. 2013; (4)12:291-312.

Preis M, Woertz C, Kleinebudde P, Breitkreutz J. Oromucosal film preparations: classification and characterization methods. Expert Opin Drug Deliv. 2013 Sep;10(9):1303-17. doi: 10.1517/17425247.2013.804058.

Puratchikody A, Prasanth VV, Sam TM, Ashok KB. Buccal Drug Delivery: Past, Present and Future-A Review. Int. J. Drug Deliv. 2011; 3(2): 171-184.

Raber-Durlacher JE, von Bültzingslöwen I, Logan RM, Bowen J, Al-Azri AR, Everaus H, et al.; Mucositis Study Group of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASCC/ISOO). Systematic review of cytokines and growth factors for the management of oral mucositis in cancer patients. Support Care Cancer. 2013 Jan;21(1):343-55.

Ramsewak RS, Erickson AJ, Nair MG. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. Phytochemistry. 1999; 51(6):729-32.

Ramsey E, Sun Q, Zhang Z, Zhang C, Gou W. Mini-review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. J Environ Sci. 2009; 21(6):720-726.

Rana P, Murthy RS. Formulation and evaluation of mucoadhesive buccal films impregnated with carvedilol nanosuspension: a potential approach for delivery of drugs having high first-pass metabolism. Drug Deliv. 2013 Jun-Jul;20(5):224-35.

Ratnasooriya WD, Pieris KP, Samaratunga U, Jayakody JR. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. J Ethnopharmacol. 2004 Apr;91(2-3):317-20.

Ratnasooriya WD, Pieris KPP. Attenuation of Persistent Pain and Hyperalgesia by *Spilanthes acmella* Flowers in Rats. Pharmaceutical Biol. 2005; 43(7): 614-9.

Regatas, RP. Efeito do creme de jambu (*Acmeless oleracea*) sobre a função sexual masculina e feminina [dissertação]. Ceará: Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Departamento de Cirurgia; 2008.

Renauld JC , Snick JV. Interleukin-9. In: Thomson AW, Lotze MT, editores. The citokine Handbook. 4 ed. Academic Press; 2003. p. 347-62.

Reverchon E, De Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J Supercrit Fluids* 2006; 38(2):146-166.

Riley P, Glenny AM, Worthington HV, Littlewood A, Clarkson JE, McCabe MG. Interventions for preventing oral mucositis in patients with cancer receiving treatment: oral cryotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Dec 23;(12):CD011552.

Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB, Gutiérrez Mdel C. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). *J Ethnopharmacol*. 2007 Mar 21;110(2):364-7.

Rodrigues, RAF, Foglio MA, Boaventura Jr S, Santos AS, Rehder VLG. Otimização do processo de extração e isolamento do antimalárico artemisinina a partir de *Artemisia annua* L. *Quim Nova*. 2006; 29(2): 368-72.

Roge AB, Firke SN, Kawade RM, Sarje SK, Vadvalkar SM. Brief Review on: Flash Chromatography. *IJPSR*, 2011; Vol. 2(8): 1930-1937.

Rozzi NL, Singh RK. Supercritical Fluids and the Food Industry. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2002; 1: 33–44. doi:10.1111/j.1541-4337.2002.tb00005.x

Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57(11): 1666-91.

Schlosser PM, Bale AS, Gibbons CF, Wilkins A, Cooper GS. Human health effects of dichloromethane: key findings and scientific issues. *Environ Health Perspect*. 2015. 123(2):114-9. doi: 10.1289/ehp.1308030.

Sharma V, Boonen J, Chauhan NS, Thakur M, De Spiegeleer B, Dixit VK. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. *Phytomedicine*. 2011 Oct 15;18(13):1161-9.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan;68(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21442.

Silva BM, Borges AF, Silva C, Coelho JF, Simões S. Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. *Int J Pharm*. 2015 Oct 15;494(1):537-51.

Silva VO, Pereira LJ, Murata RM. Oral microbe-host interactions: influence of β -glucans on gene expression of inflammatory cytokines and metabolome profile. BMC Microbiol. 2017 Mar 7;17(1):53. doi: 10.1186/s12866-017-0946-1.

Song MK, Park MY, Sung MK. 5-Fluorouracil-induced changes of intestinal integrity biomarkers in BALB/c mice. J Cancer Prev. 2013 Dec;18(4):322-9.

Sonis ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. Oral Oncol. 1998 Jan;34(1):39-43.

Sonis ST. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. J Support Oncol. 2007 Oct;5(9 Suppl 4):3-11.

Sonis ST. The pathobiology of mucositis. Nat Rev Cancer. 2004 Apr;4(4):277-84.

Soveri LM, Hermunen K, de Gramont A, Poussa T, Quinaux E, Bono P, André T, Österlund P. Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: Is efficacy an impact of toxicity? Eur J Cancer. 2014

Spelman K, Depoix D, McCray M, Mouray E, Grellier P. The traditional medicine Spilanthes acmella, and the alkylamides spilanthol and undeca-2E ene-8,10-dienoic acid isobutylamide, demonstrate in vitro and in vivo antimalarial activity. Phytother Res. 2011 Jul;25(7):1098-101. doi: 10.1002/ptr.3395.

Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, Heaivilin N, Zumsteg ZS. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradiation necrosis. Cancer Med. 2017 Oct 25.

Stevens WC Jr, Hill DC. General methods for Flash chromatography using disposable columns. Mol Divers. 2009, 13(2):247-52.

Still WC, Kahn M, Mitra A. Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. J Org Chem. 1978; 43(14):2923-5.

Sultani M, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ. Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemother Res Pract.* 2012;2012:490804.

Tao J, Yan R, Zhao L, Wang D, Xu X. Separation and purification of two taxanes and one xylosyl-containing taxane from *Taxus wallichiana* Zucc.: A comparison between high-speed countercurrent chromatography and reversed-phase Flash chromatography. *J Sep Sci.* 2017; 40(6):1273-1282. doi: 10.1002/jssc.201601066.

Taygerly JP, Miller LM, Yee A, Peterson EA. A convenient guide to help select replacement solvents for dichloromethane in chromatography. *Green Chem.* 2012, 14:3020

Tobiszewski M, Sulej AM, Kupska M, Górecki T, Namieśnik J. Green chromatography. *J Chromatogr A.* 2013 13;1307:1-20.

Treister N, Sonis S. Mucositis: biology and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007 Apr;15(2):123-9.

Urrankar M, Desai A, Bhat R. Review on medicinal herb genus spilanthes and its applications in oral hygiene. *UJP.* 2013, 02(6): 25-33.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. Green Chemistry. [acesso 2017 novembro] Disponível em: <http://www2.epa.gov/green-chemistry>

Van Sebille YZ, Stansborough R, Wardill HR, Bateman E, Gibson RJ, Keefe DM. Management of Mucositis During Chemotherapy: From Pathophysiology to Pragmatic Therapeutics. *Curr Oncol Rep.* 2015 17(11):50.

Veryser L, Taevernier L, Joshi T, Tatke P, Wynendaele E, Bracke N, et al. Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. *BMC Complement Altern Med.* 2016 Jun 13;16:177.

Villa A, Sonis ST. Mucositis: pathobiology and management. *Curr Opin Oncol.* 2015 May;27(3):159-64. doi: 10.1097/CCO.0000000000000180.

Wang Y, Zhu M, Miller M, Fu YX. Immunoregulation by tumor necrosis factor superfamily member LIGHT. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):232-43.

Wardill HR, Bowen JM, Gibson RJ. Chemotherapy-induced gut toxicity: are alterations to intestinal tight junctions pivotal? *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012 Nov;70(5):627-35. doi: 10.1007/s00280-012-1989-5.

Weber P, Hamburger M, Schafroth N, Potterat O. Flash chromatography on cartridges for the separation of plant extracts: rules for the selection of chromatographic conditions and comparison with medium pressure liquid chromatography. *Fitoterapia.* 2011;82(2):155-61.

Welton T. Solvents and sustainable chemistry. *Proc Math Phys Eng Sci.* 2015; 8;471(2183):20150502.

Whittaker AL, Lynn KA, Wallace GL, Howarth GS. Differential Effectiveness of Clinically-Relevant Analgesics in a Rat Model of Chemotherapy-Induced Mucositis. *PLoS One.* 2016;11(7):e0158851.doi:10.1371/journal.pone.0158851.

WHO handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva: World Health Organization; 1979.

WHO World Cancer Report 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.

Wu LC, Fan NC, Lin MH, Chu IR, Huang SJ, Hu CY, et al. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *J Agric Food Chem.* 2008, 9;56(7):2341-9.

Yadav R, Yadav N, Kharya MD, Savadi R. Preliminary studies on diuretic effect of *spilanthes acmella* leaves extracts in rats. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011; 3(3): 245-7.

Yamane LT, de Paula E, Jorge MP, de Freitas-Blanco VS, Junior ÍM, Figueira GM, et al. *Acmella oleracea* and *Achyrocline satureoides* as Sources of Natural Products in Topical Wound Care. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016; 2016:3606820.

Yeung CY, Chan WT, Jiang CB, Cheng ML, Liu CY, Chang SW, Chiang Chiau JS, Lee HC. Amelioration of Chemotherapy-Induced Intestinal Mucositis by Orally Administered Probiotics in a Mouse Model. *PLoS One.* 2015 25;10(9):e0138746.doi: 10.1371/journal.pone.0138746.

Yudong Y, Bo Jin, Hancha Liu. Process for supercritical carbon dioxide extracting and separating effective components of ginger. China Patent 1251367. 2000 Apr 26.

Zarbock A, Ley K. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation*. 2009 Jan;16(1):31-42. doi: 10.1080/10739680802350104.

Zecha JA, Raber-Durlacher JE, Nair RG, Epstein JB, Sonis ST, Elad S, Hamblin MR, Barasch A, Migliorati CA, Milstein DM, Genot MT, Lansaat L, van der Brink R, Arnabat-Dominguez J, van der Molen L, Jacobi I, van Diessen J, de Lange J, Smeele LE, Schubert MM, Bensadoun RJ. Low level laser therapy/photobiomodulation in the management of side effects of chemoradiation therapy in head and neck cancer: part 1: mechanisms of action, dosimetric, and safety considerations. *Support Care Cancer*. 2016 Jun;24(6):2781-92.

Zelioli IAM, Freitas VS, Rodrigues RAF, Cabral FA. Extração supercrítica de espilantol em leito fixo a partir de jambu (*acmella oleracea* (j.) R.k. jansen). p. 1884-1889 . In: Anais do XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica [=Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n.3]. São Paulo: Blucher, 2015.

Zibetti AW, Aydi A, Livia MA, Bolzan A, Barth D. Solvent extraction and purification of rosmarinic acid from supercritical fluid extraction fractionation waste: Economic evaluation and scale-up. *J Supercrit Fluids*. 2013 83:133-145

Zhong JS, Wan JZ, Ding WJ, Wu XF, Xie ZY. One-step separation and purification of two chromones and one pyrone from *Aloe barbadensis* Miller: a comparison between reversed-phase Flash chromatography and high-speed counter current chromatography. *Phytochem Anal*. 2014;25(3):282-8.

Chung YL, Pui NNM. Confounding factors associated with oral mucositis assessment in patients receiving chemoradiotherapy for head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 2017 Sep;25(9):2743-2751. doi: 10.1007/s00520-017-3684-x.

ANEXO 1 – Certificado Comitê de Ética Animal Unicamp - CEUA 4534-1



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada Extração de espilantol no contexto da química verde e sua aplicação no tratamento da mucosite oral, registrada com o nº 4534-1/2017, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Joao Ernesto de Carvalho e Veronica Santana de Freitas Blanco, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 11 de abril de 2017.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	15/09/2014-15/12/2018	
Vigência da autorização para manipulação animal:	11/04/2017-15/12/2018	
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo heterogênico / Unib:SW (Swiss)	
No. de animais:	58	
Peso / Idade:	08 semanas / 30g	
Sexo:	machos	
Origem:	CEMIB/UNICAMP	

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 11 de abril de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.