



VERONICA SANTANA DE FREITAS

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE  
UM BIOADESIVO CONTENDO EXTRATO DE *SPILANTHES  
ACMELLA* L. MURRAY PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL  
COMO ANESTÉSICO TÓPICO**

PIRACICABA

2014





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

**VERONICA SANTANA DE FREITAS**

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE  
UM BIOADESIVO CONTENDO EXTRATO DE *SPILANTHES*  
*ACMELLA* L. MURRAY PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL  
COMO ANESTÉSICO TÓPICO**

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

Orientador: Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues  
Coorientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho  
Coorientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Veronica Santana de Freitas e orientada pelo Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

---

Assinatura do Orientador

PIRACICABA  
2014

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

F884d Freitas, Veronica Santana de, 1983-  
Desenvolvimento e avaliação da eficiência de um bioadesivo contendo extrato de *Spilanthes acmella* L. Murray para administração oral como anestésico tópico / Veronica Santana de Freitas. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.  
Coorientadores: João Ernesto de Carvalho e Francisco Carlos Groppo.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Spilanthes oleracea*. 2. Anestesia. 3. Quitosana. I. Rodrigues, Rodney Alexandre Ferreira. II. Carvalho, João Ernesto de. III. Groppo, Francisco Carlos, 1966-. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Development and evaluation of the efficiency of a bioadhesive containing extract of *Spilanthes acmella* L. Murray for oral administration as topical anesthetic

**Palavras-chave em inglês:**

*Spilanthes oleracea*

Anesthesia

Chitosan

**Área de concentração:** Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

**Titulação:** Mestra em Odontologia

**Banca examinadora:**

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues [Orientador]

Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi

Michelle Franz Montan Braga Leite

**Data de defesa:** 29-04-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 29 de Abril de 2014, considerou a candidata VERÔNICA SANTANA DE FREITAS aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rodney", written over a horizontal line.

Prof. Dr. RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Fernanda", written over a horizontal line.

Profa. Dra. FERNANDA OLIVEIRA DE GASPARI DE GASPI

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Michelle", written over a horizontal line.

Profa. Dra. MICHELLE FRANZ MONTAN BRAGA LEITE



## RESUMO

Um dos procedimentos que mais causa ansiedade no tratamento odontológico é a punção da agulha durante a injeção anestésica na mucosa oral, e até o momento não há um anestésico tópico capaz de eliminar totalmente o desconforto provocado por este procedimento. A *Spilanthes acmella* L. Murray é uma planta originária da América do Sul, conhecida popularmente como jambu e muito utilizada pela população na culinária e no tratamento de dores de dente. Um dos compostos ativos presentes nesta espécie que contribui com o efeito anestésico, é o espilantol. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e avaliação da eficiência de um bioadesivo de quitosana contendo extrato de jambu para uso como anestésico tópico oral. Foi utilizado etanol 96º GL para a preparação dos extratos das partes aéreas do jambu e carvão ativo para remoção de pigmentos. O teor de espilantol nos extratos e nas formulações foi monitorado por CG-EM. Os bioadesivos foram submetidos a estudo de estabilidade acelerada pelo período de até 120 dias. Foram realizados testes *in vitro* para determinar a permeação do espilantol contido nos bioadesivos, utilizando célula vertical do tipo Franz e a atividade antinociceptiva dos bioadesivos foi avaliada pelo modelo de retirada de cauda (*tail flick*) em camundongos. O bioadesivo de quitosana com Transcutol® como coadjuvante foi o que apresentou o melhor aspecto físico e visual. No estudo de permeação *in vitro*, foi possível observar que o espilantol contido nos bioadesivos permeou a mucosa de esôfago de porco e que a formulação que continha extrato bruto tratado com carvão ativo apresentou maior coeficiente de permeabilidade e teor de espilantol permeado, em relação às demais formulações testadas ( $p < 0,05$ ). Na avaliação da atividade antinociceptiva através do experimento de *tail flick*, a formulação com extrato bruto tratado com carvão ativo foi superior a todas as demais ( $p < 0,05$ ) com tempo de anestesia médio de 49,2 ( $\pm 27,6$ ) min. No estudo de estabilidade acelerada, todas as formulações testadas se mostraram estáveis até 120 dias, sem alterações significativas de pH e de teor de espilantol. Os resultados obtidos com os

bioadesivos contendo o extrato bruto de jambu são encorajadores e podem se tornar uma alternativa em potencial como anestésico tópico oral.

**Palavras-chave:** Jambu. *Spilanthes acmella*. Quitosana. Anestesia tópica oral. Administração transmucosa. Bioadesivo.



## ABSTRACT

The pricking of a needle during the anesthetic injection in the oral mucosa is the procedure that causes more anxiety during dental treatment. So far, there is no topical anesthetic able to totally eliminate the discomfort caused by this procedure. *Spilanthes acmella* L. Murray, a native plant of South America popularly known as “jambu”, is used by the population in cooking and to treat toothaches. One of the active compounds present in this species, and believed to be responsible for the anesthetic effect, is spilanthol. The aim of this study was to develop and evaluate the effectiveness of a chitosan bioadhesive containing crude extract of jambu for use as topical oral anesthetic. Ethanol 96° GL was used for the preparation of extracts and activated carbon was used to remove pigments. The content of spilanthol was monitored by GC-MS in the extracts and also in the formulations. Bioadhesives also were submitted to accelerated stability study for a period of 120 days. *In vitro* permeation study of spilanthol contained in the bioadhesives was performed using Franz type diffusion cells and the antinociceptive activity of bioadhesives was assessed by tail flick model in mice. The chitosan bioadhesive with transcutol® as adjuvant showed the best physical and visual aspect. *In vitro* permeation study showed that spilanthol contained in bioadhesives permeated porcine esophageal mucosa while formulation containing activated carbon treated crude extract presented the higher permeability coefficient compared to other formulations ( $p < 0,05$ ). In the evaluation of antinociceptive activity by tail flick model, the formulation with crude extract treated with activated carbon was superior to all others ( $p < 0,05$ ) with a mean ( $\pm$  sd) of the anesthesia duration of 49.2 ( $\pm$  27.6) minutes. In accelerated stability study, all formulations tested were stable for up to 120 days without significant changes in pH and spilanthol content. The results obtained with the bioadhesive of chitosan containing crude extract of jambu are encouraging and may become a potential alternative to oral topical anesthetic.

**Key words:** paracress, *Spilanthes acmella*, chitosan, oral topical anesthesia, transmucosal delivery, bioadhesive.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	XV
Agradecimentos.....	XVII
Lista de Ilustrações.....	XXI
Lista de tabelas.....	XXIII
1 Introdução.....	1
2 Revisão de Literatura.....	3
2.1 Ansiedade no tratamento odontológico.....	3
2.2 Anestesia local.....	4
2.3 A <i>Spilanthes acmella</i> L. Murray.....	9
2.3.1 Estudo fitoquímico e de toxicidade da <i>Spilanthes acmella</i> L. Murray.....	9
2.3.1.2 Estudo farmacológico do espilantol e do extrato de <i>Spilanthes acmella</i> L. Murray.....	12
3 Proposição.....	17
3.1 Objetivos Específicos.....	17
4 Material e Métodos.....	19
4.1 Material.....	19
4.1.1 Reagentes e solventes.....	19
4.1.2 Equipamentos.....	19
4.2 Obtenção do material vegetal.....	20
4.3 Secagem e moagem do material vegetal.....	21
4.4 Preparação do extrato etanólico.....	21
4.4.1 Extrato bruto.....	21
4.4.2 Extrato tratado com carvão ativo.....	22
4.5 Preparo do bioadesivo.....	23
4.5.1 Maximização da formulação contendo quitosana e extrato de jambu ..	23
4.5.2 Propriedades físicas dos bioadesivos.....	24
4.6 Monitoramento do espilantol por CG/EM.....	24

4.7 Ensaio de permeação <i>in vitro</i> do espilantol contido nos bioadesivos através do epitélio de mucosa de esôfago de porco em célula de difusão vertical tipo <i>Franz</i> .....	25
4.8 Avaliação <i>in vivo</i> da atividade antinociceptiva do bioadesivo de jambu .	27
4.8.1 Animais .....	27
4.8.2 Avaliação da atividade antinociceptiva do bioadesivo pelo modelo de remoção de cauda.....	28
4.9 Fracionamento dos extratos brutos e isolamento do espilantol por meio de Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC).....	29
4.9.1 Escolha do sistema de solventes .....	29
4.9.2 Isolamento do espilantol por meio do CPC .....	31
4.10 Construção da curva analítica empregando-se o espilantol obtido no fracionamento por CPC .....	32
4.11 Estudo de estabilidade acelerada do bioadesivo contendo extrato de jambu .....	33
4.11.1 Avaliação do pH dos bioadesivos .....	33
4.11.2 Avaliação do teor de espilantol durante estudo de estabilidade .....	34
4.12 Análise estatística .....	34
5 Resultados .....	35
5.1 Rendimento do extrato bruto etanólico.....	35
5.1.1 Extrato bruto etanólico .....	35
5.1.2 Extrato bruto etanólico tratado com carvão ativo .....	35
5.2 Preparo do Bioadesivo .....	38
5.2.1 Maximização da formulação contendo quitosana e extrato de jambu ..	38
5.2.2 Propriedades físicas dos bioadesivos .....	39
5.3 Monitoramento do espilantol por CG/EM.....	40
5.4 Ensaio de permeaçãp <i>in vitro</i> do espilantol contido nos bioadesivos através do epitélio de mucosa de esôfago de porco em célula de difusão vertical tipo <i>Franz</i> .....	41
5.5 Avaliação da atividade antinociceptiva do bioadesivo de jambu em camundongos.....	43

<b>5.6 Purificação do espilantol por meio de Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC) .....</b>	<b>44</b>
<b>5.6.1 Escolha do sistema de solventes .....</b>	<b>44</b>
<b>5.6.2 Separação do espilantol por meio do CPC .....</b>	<b>44</b>
<b>5.7 Construção de curva de analítica do espilantol .....</b>	<b>47</b>
<b>5.8 Estudo de estabilidade acelerada .....</b>	<b>47</b>
<b>5.8.1 Aspecto físico .....</b>	<b>47</b>
<b>5.8.2 Avaliação do pH e do teor de espilantol.....</b>	<b>48</b>
<b>6 Discussão .....</b>	<b>49</b>
<b>6.1 Rendimento do extrato bruto etanólico.....</b>	<b>49</b>
<b>6.2 Extrato bruto etanólico tratado com carvão ativo .....</b>	<b>50</b>
<b>6.3 Preparo do Bioadesivo .....</b>	<b>51</b>
<b>6.3.1 Maximização da formulação contendo quitosana e extrato de jambu ..</b>	<b>51</b>
<b>6.3.2 Propriedades físicas dos bioadesivos .....</b>	<b>54</b>
<b>6.4 Monitoramento do espilantol por CG/EM.....</b>	<b>54</b>
<b>6.5 Ensaio de permeação <i>in vitro</i> do espilantol a partir dos bioadesivos de jambu através de epitélio de mucosa de esôfago de porco em célula de difusão vertical tipo Franz.....</b>	<b>55</b>
<b>6.6 Avaliação da atividade antinociceptiva do bioadesivo de jambu em camundongos.....</b>	<b>57</b>
<b>6.7 Purificação do espilantol por meio de Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC) .....</b>	<b>58</b>
<b>6.8 Estudo de estabilidade acelerada.....</b>	<b>59</b>
<b>6.9 Perspectivas futuras .....</b>	<b>60</b>
<b>7 Conclusão .....</b>	<b>61</b>
<b>Referências .....</b>	<b>63</b>
<b>Anexo I – Comitê de ética.....</b>	<b>81</b>



## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos  
pelo apoio e incentivo na realização deste sonho.*





## AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao *Felipe*, meu amor, pela paciência, pelo apoio, pelas noites insones preparando aulas e por manter minha sanidade. Obrigada por fazer meu sonho possível.

Agradeço a minha mãe, *Mara*, por sempre ter a palavra certa para consolar, fortalecer e por não me deixar desistir diante das dificuldades.

Ao meu pai, *João*, que infelizmente não está mais aqui para me ver alcançar este objetivo tão sonhado. Pai, onde quer que esteja, espero que sinta orgulho de mim.

Às minhas irmãs, *Nayara* e *Mariana* e ao meu irmão *Flávio*, por acreditarem em mim e na minha capacidade.

Aos meus amigos, *Rafael*, *Gerotto*, *Nava*, *Andreza*, *Bianca*, *Bruna* e *Rodrigo*, que torceram por mim desde o começo e me apoiaram em todas as etapas.

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia, na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Unicamp.

Ao CPQBA – Unicamp, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. *Ivo Milton Raimundo Jr*, por ceder toda sua estrutura para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Dr. *Rodney*, meu orientador e amigo, por acreditar na minha capacidade e por me dar a liberdade para ir sempre mais longe. Agradeço a sua paciência, sua disponibilidade e por não medir esforços em me ajudar nos momentos mais difíceis.

À querida Profa. *Fernanda Gaspi*, por ter dado início a tudo isto através do curso de Fitoterapia na Uniararas.

Aos meus co-orientadores, *João Ernesto e Francisco Groppo*, pelos ensinamentos e disponibilidade em me esclarecer todas as dúvidas.

À Profa. Dra. *Eneida* e a doutoranda *Viviane Guilherme* do Instituto de Biologia da Unicamp, pela disponibilidade do laboratório e pela ajuda na realização do experimento de *tail flick*.

À Profa. Dra. *Michelle Franz* e ao doutorando *Luciano Serpe*, pela paciência e disponibilidade em me ajudar a realizar o experimento de permeação.

Às Dras. *Mary Ann e Carmen*, pelos conselhos e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas queridas *Ilza, Laís e Leila G.*, pela amizade, pelo apoio, sugestões e por toda ajuda que vocês me deram para que eu conseguisse finalizar tudo a tempo.

Aos queridos *Ícaro* e *Katyri*, que desde o começo me ajudaram no laboratório, e que responderam com muita paciência as minhas infinitas perguntas.

À francesa mais brasileira que eu conheço, *Céline Le Quémener*, que me ensinou todo o procedimento do CPC. Agradeço também à *Armen Instrument* e à *SINC* pela oportunidade em utilizar este equipamento.

Às Professoras *Maria Cristina Volpato*, *Carina Denny*, *Ana Lúcia Ruiz* que com seu conhecimento, conselhos e sugestões melhoraram este trabalho de maneira significativa.

À Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica, em especial à Dra. *Marili*, que se dispôs a me ajudar com seus sábios conselhos e tornou minhas análises muito mais eficientes. Agradeço também à MSc. *Adriana* e Dr. *Adilson* que não mediram esforços na concretização deste trabalho.

À Divisão de Agrotecnologia, Dra. *Glyn*, Dr. *Marcos*, Dr. *Pedro*, biólogo *Benício*, Dr. *Ílio* e todos os trabalhadores do campo.

À Divisão de Farmacologia, MSc. *Karin*, Dra. *Michelle* e *Sirlene* pela ajuda, conselhos e sugestões.

Aos meus queridos truqueiros que estão ao meu lado nesta incrível jornada, Bruna, Jonny, Marcelinho, Natália, Núbia, Priscila, Larissa, Giovanna F., Rogério, Rosanna, Fabrício, Vanessa, Leila S., Leilane e Patrícia.

Ào CNPq, Fapesp e FAEPEX/Unicamp pelo suporte financeiro.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Folhas de jambu ( <i>Spilanthes acmella</i> L. Murray) .....	10
Figura 2 - Estrutura química do espilantol.....	10
Figura 3 – Antirrugas com extrato de jambu.....	13
Figura 4 - Ilustração do processo de tratamento do extrato bruto com diferentes porcentagens de carvão ativo. ....	22
Figura 5 - Ilustração do processo de preparação de bioadesivo com extrato de jambu. ...	23
Figura 6 - Furador utilizado para corte dos bioadesivos. ....	24
Figura 7 - Célula de difusão vertical tipo Franz. ....	26
Figura 8 - Embalagens utilizadas para armazenamento dos bioadesivos para teste de estabilidade acelerada.....	33
Figura 9 - Cromatograma em camada delgada de extratos brutos etanólicos de <i>Spilanthes acmella</i> .....	35
Figura 10 - Despigmentação do extrato bruto etanólico de jambu após o tratamento com carvão ativo em diferentes porcentagens.....	36
Figura 11 - Volume em mL de extrato bruto tratado com carvão ativo recolhido após filtração em leito de Celite®, sob vácuo. ....	36
Figura 12 - Rendimento de extrato após tratamento com carvão ativo.....	37
Figura 13 - Bioadesivos com extrato bruto de jambu preparados com Brij 30 (A) e triacetina (B). ....	38
Figura 14 - Bioadesivos com extrato bruto de jambu preparados com propilenoglicol (A) e Transcutol® (B).....	39
Figura 15 - Aparência dos bioadesivos após corte com furador. ....	39
Figura 16 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos com as triplicatas dos extratos bruto etanólicos de jambu .....	40
Figura 17 - Cromatograma expandido entre os tempos 41 e 43 min, mostrando pico do espilantol.....	41
Figura 18 - Permeação do espilantol através da mucosa de esôfago de porco. ....	42
Figura 19 - Fluxo (A), time lag (B) e coeficiente de permeabilidade (C). .. <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Figura 20 - Porcentagem de animais anestesiados em função do tempo (min). ....	43
Figura 21 - Cromatógrafo de Partição Centrífuga utilizado na purificação do espilantol....	45
Figura 22 - Cromatograma durante separação por CPC.....	45
Figura 23 - Cromatogramas em camada delgada de frações obtidas por CPC. ....	46
Figura 24 - Cromatograma da fração reunida (41 a 43) obtida por CG-FID.....	46
Figura 25 - Cromatograma expandido entre os tempos de 38 a 46 minutos. ....	46
Figura 26 - Ilustração dos bioadesivos empregados no estudo de estabilidade com diferentes porcentagens de extrato bruto e extrato bruto tratado com carvão ativo. ....	48



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação de possíveis combinações de solventes para CPC .....	30
Tabela 2 - Parâmetros físicos dos bioadesivos desenvolvidos.....	40
Tabela 3 - Parâmetros de permeação do espilantol aplicado em condição de dose finita através de epitélio da mucosa de esôfago de porco. ....	42
Tabela 4 - Avaliação do pH e do teor de espilantol nos bioadesivos de jambu desenvolvidos. ....	48





## 1 Introdução

No tratamento odontológico, um dos principais agentes desencadeadores do medo é o desconforto provocado pela injeção anestésica, visto que este procedimento está, na maioria das vezes, associado à dor. Isso pode comprometer a procura pelo tratamento odontológico resultando em baixa saúde oral do paciente. Por essa razão, a procura e a utilização de outros métodos que provoquem menor desconforto no paciente são extremamente válidos, visto que, não há, até o presente momento, uma formulação medicamentosa tópica capaz de eliminar completamente a dor provocada pela punção da agulha na injeção anestésica, especialmente na região palatina (Hmud & Walsh, 2009; Ogle & Mahjoubi, 2012).

O uso de plantas na medicina popular tem sido uma prática frequente e antiga, empregada pelo homem no tratamento de enfermidades de quase todos os tipos. Esta utilização se baseia muito na sabedoria popular, uma vez que isso acontece, via de regra, inserida num contexto histórico (Oliveira & Araújo, 2007).

Existe um enorme potencial terapêutico nas plantas medicinais e em seus metabólitos secundários, sendo que somente 5% deste universo foi submetido a um estudo fitoquímico e biológico. Estima-se que cerca de 75% de todos os fármacos utilizados são derivados diretamente ou indiretamente de produtos naturais (Filho & Yunes, 1997; Newman & Cragg, 2013).

A *Spilanthes acmella* L. Murray, sinonímia *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, conhecida popularmente no Brasil como jambu ou agrião-do-pará, é uma planta utilizada tradicionalmente pela população do norte do Brasil na culinária e também no tratamento de dores de dente e de outros males que afetam a gengiva e a garganta (Lorenzi & Matos, 2008; Dubey et al., 2013).

Um diverso grupo de compostos bioativos está presente no jambu, tais como óleos voláteis, fitoesteróis, polissacarídeos e alquilamidas, sendo esta última, de grande importância para a atividade anti-inflamatória e anestésica apresentada por esta espécie (Prachayasittikul et al., 2013). O espilantol ou afinina é a alquilamida presente em maior quantidade no jambu, e quando ingerida provoca sensação de formigamento, dormência e aumento de salivagem na boca (Ley et al., 2006).

A atividade anestésica do jambu se mostrou promissora em trabalhos publicados por alguns autores (Chakraborty et al., 2010; Fosquiera et al., 2012). Estes resultados aliados a sua baixa toxicidade (Chackraborty et al., 2004; Sharma et al., 2011 e Nomura et al., 2013) e amplo uso popular, tornam o jambu um bom candidato no desenvolvimento de um anestésico tópico para uso oral.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar a eficiência de uma formulação para uso anestésico tópico, a partir de uma planta empregada tradicionalmente na culinária regional do norte do Brasil, corroborando suas propriedades relatadas popularmente.

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1 Ansiedade no tratamento odontológico**

O tratamento odontológico é para muitos pacientes uma fonte geradora de medo e ansiedade. É um problema relativamente comum que atinge até 30% da população mundial (Gordon et al., 2013).

A ansiedade ao tratamento dentário pode estar relacionada a diversos fatores, tais como o medo da dor provocada pelo procedimento ao qual o paciente será submetido, medo de procedimentos que envolvam sangue, ou pode ser devido a experiências traumáticas prévias no consultório odontológico, principalmente na infância (Hmud & Walsh, 2009; Oosterink et al., 2009).

Foi estabelecida uma ligação entre a ansiedade ao tratamento odontológico com uma saúde oral pobre, o que pode representar um problema de saúde pública (Taani et al., 2005; Armifield et al., 2007). Pacientes ansiosos também tendem a experimentar, durante procedimentos odontológicos, maior dor por um período maior de tempo do que pacientes pouco ansiosos (Wijk & Hoogstraten, 2009).

Estudos relacionam diretamente a ansiedade no tratamento odontológico com a dor provocada pela punção da agulha durante a aplicação do anestésico local, independente do procedimento realizado ou da faixa etária avaliada (Siqueira et al., 2006; Wijk & Hoogstraten, 2009; Medeiros et al., 2013).

Vika et al. (2008), por meio de questionário aplicado a 1385 estudantes noruegueses na faixa etária de 18 anos, obtiveram resultado semelhante. Entre os estudantes com maior grau de ansiedade, 11% evitariam um procedimento odontológico em que houvesse o emprego da injeção anestésica.

Estes resultados indicam que a utilização de métodos capazes de diminuir a dor provocada pela punção da agulha durante a injeção anestésica ou de outros

procedimentos invasivos na mucosa bucal, resultaria em uma diminuição da ansiedade no paciente e conseqüentemente melhores índices de saúde oral.

## **2.2 Anestesia local**

Antes da descoberta da anestesia, procedimentos odontológicos invasivos, tais como a exodontia, eram realizados sem que houvesse nenhum medicamento eficaz para amenizar a severa dor experimentada pelo paciente (Lópes-Valverde et al., 2011).

Este cenário começou a mudar em 1844, quando o Cirurgião Dentista Horace Wells, notou o efeito analgésico provocado pelo óxido nitroso e o utilizou durante procedimentos odontológicos realizados em seu consultório. No entanto, quando fez uma demonstração pública deste efeito para a classe médica e odontológica, o paciente demonstrou dor durante a exodontia, o que gerou grande descrédito quanto ao uso do óxido nitroso na época. Horace Wells foi reconhecido como inventor da anestesia, somente alguns anos depois. (Haridas, 2013).

Em 16 de outubro de 1846, o Cirurgião Dentista William T. G. Morton fez uma demonstração pública da cúpula de éter no Massachusetts General Hospital. Morton foi convidado a demonstrar sua técnica pelo cirurgião John Collins Warren, que realizou a remoção de um tumor no pescoço de um paciente. A cirurgia foi bem sucedida e transcorreu sem que o paciente expressasse qualquer sensação dolorosa (Penski, 1993).

Por sua vez, a cocaína também desempenhou papel de grande importância na odontologia e seu uso se tornou popular ao ser utilizada em 1885 pelos cirurgiões William Stewart Halsted e Richard John Hall. Ambos desenvolveram uma técnica de bloqueio do nervo alveolar inferior através da infiltração de

cocaína, possibilitando a realização de cirurgias bucais indolores (Lopez-Valverde et al., 2011).

Uma vez que os cirurgiões Halsted e Hall se tornaram dependentes químicos da cocaína, seu uso como anestésico foi descontinuado com o passar dos anos. A busca alternativa por anestésicos mais seguros resultou na descoberta da procaína em 1905 e de vários outros anestésicos, tais como lidocaína, prilocaína, mepivacaína, articaína e bupivacaína, dentre outros (Yagiela et al., 2011).

Os anestésicos locais provocam uma perda de sensibilidade ao atuarem na membrana celular dos nervos, impedindo a geração e condução de impulsos nervosos. Isto ocorre através da ligação dos anestésicos locais em receptores específicos de canal de sódio, diminuindo ou impedindo a permeabilidade destes íons na membrana e conseqüentemente a despolarização por estes provocada. De acordo com Malamed (2004) é desejável que um anestésico local tenha ação rápida, baixa toxicidade sistêmica e não seja irritante e nem provoque alterações permanentes no tecido ao qual é aplicado.

Quando o anestésico é aplicado topicamente na mucosa oral, geralmente produz anestesia nos 2 ou 3 mm mais superficiais deste tecido e por essa razão é utilizado na odontologia para reduzir a dor provocada pela inserção da agulha ou em outros procedimentos pouco invasivos. Sua eficácia é determinada pelo tempo de aplicação na mucosa, sendo recomendada a aplicação por no mínimo dois min (Malamed, 2004; Ogle & Mahjoubi, 2012).

Os anestésicos tópicos estão disponíveis em diversas formas farmacêuticas e também em vários sabores, tais como morango, laranja e menta. A concentração de anestésico é tipicamente maior do que quando utilizado na forma injetável, uma vez que são incapazes de atravessar a mucosa intacta, desta forma a concentração maior facilita a difusão do anestésico no tecido (Ogle & Mahjoubi, 2012).

A benzocaína, geralmente na concentração de 20%, é um dos anestésicos tópicos mais utilizados na Odontologia e por ser pouco hidrossolúvel permanece no tecido onde é aplicada (Ogle & Mahjoubi, 2012).

Alguns cuidados, no entanto, devem ser tomados na utilização da benzocaína, uma vez que, é um éster metabolizado pela enzima pseudocolinesterase em ácido para-aminobenzóico (PABA) e que produz reações alérgicas em algumas pessoas. A benzocaína também não deve ser utilizada em crianças com idade inferior a de dois anos pelo risco de provocar metemoglobinemia, uma síndrome que resulta em hipóxia tecidual e em casos mais graves pode levar a óbito (Malamed, 2004; FDA, 2011).

A lidocaína também é utilizada como anestésico tópico, em concentrações que geralmente variam entre 2 e 10%, ou em combinações com outros anestésicos locais. Essas combinações são misturas eutéticas, ou seja, quando juntas em concentrações específicas apresentam um ponto de fusão inferior ao seu próprio ponto de fusão, resultando em uma forma líquida que melhora a penetração tecidual (Catterall & Machie, 2012).

O creme EMLA<sup>®</sup> (Eutetic Mixture of Local Anesthetics) é uma mistura de lidocaína (2,5%) e prilocaína (2,5%) e foi desenvolvido com o intuito de diminuir ou eliminar a dor durante procedimentos realizados superficialmente na pele intacta, como enxertos de pele ou punções venosas (Ehrenstrom Reiz & Reiz, 1982).

Apesar de não possuir indicação como anestésico tópico oral, o EMLA<sup>®</sup> foi testado inicialmente na odontologia com a intenção de reduzir a dor provocada pela punção da injeção durante a anestesia por Holst & Evers em 1985. A eficácia do EMLA<sup>®</sup> também foi avaliada em diferentes procedimentos odontológicos, e se mostrou superior a outros anestésicos tópicos, tais como a lidocaína 5% e a benzocaína 20% (Donaldson et al., 1995; McMillan et al., 2000; Al-Melh & Andersson, 2007, AstraZeneca, 2010).

Uma vez que o EMLA<sup>®</sup> não possui indicação para uso oral, estudos foram conduzidos com o intuito de verificar a segurança do seu uso em pacientes odontológicos. Vickers et al. (1997) não detectaram níveis plasmáticos tóxicos de lidocaína e prilocaína em voluntários adultos que receberam curativos oclusivos com 8 gramas de EMLA<sup>®</sup> na mucosa oral por 30 min. Resultados semelhantes foram obtidos com a utilização de uma formulação em gel, (Oroqix) contendo lidocaína 2,5% e prilocaína 2,5% em pacientes adultos que receberam tratamento periodontal (Herdevall et al., 2003). Apesar dos resultados obtidos atestarem a segurança dessa mistura de anestésicos, a possibilidade de ocorrência de metemoglobinemia devido a prilocaína não deve ser descartada, bem como a possibilidade de ulcerações na mucosa gengival (Franz-Montan et al., 2008; Trapp & Will, 2010).

A efetividade dos anestésicos tópicos em amenizar o desconforto provocado pela punção da agulha durante a injeção da solução anestésica foi alvo de estudo de alguns autores.

Fukayama et al. (2002) compararam o efeito tópico anestésico de benzocaína 20% e de lidocaína 60% em um grupo de 20 voluntários. Foi estabelecido o tempo de 20 min de aplicação do anestésico na mucosa alveolar vestibular dos ápices incisivos superiores e após sua retirada foi feita a inserção da agulha com 2 mm de profundidade na gengiva. Os autores não observaram diferença estatística entre a benzocaína e o grupo placebo, já a lidocaína 60% foi estatisticamente superior.

Em estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado conduzido por Paschos et al. (2006) em um grupo de 104 crianças com idade média de 6 anos de idade, não foi possível verificar diferença estatística no alívio da dor provocada pela inserção da agulha entre o grupo placebo e os diversos anestésicos tópicos avaliados (tetracaína spray 1,16%; benzocaína gel 20%; benzocaína solução 11%; benzocaína 2% e EMLA<sup>®</sup>).

Nayak & Sudha (2006), em estudo duplo cego com um grupo de 90 crianças com idade entre 6 e 12 anos, avaliaram qual o tempo inicial de ação de três anestésicos tópicos aplicados na gengiva do incisivo superior direito (EMLA<sup>®</sup> 5%, gel de benzocaína 18% e pomada de lidocaína 5%), bem como sua eficácia no alívio da dor da injeção da solução anestésica. Os autores observaram que a benzocaína foi o anestésico que apresentou início de ação mais rápido (75 s), seguido pela lidocaína (105 s) e EMLA<sup>®</sup> (138 s). Quanto ao alívio da dor da punção, o EMLA<sup>®</sup> foi superior quando comparado a benzocaína e a lidocaína. Os autores ressaltaram, no entanto, que nenhum dos três tratamentos foi eficaz em eliminar completamente a dor deste procedimento.

A forma farmacêutica do anestésico tópico não influenciou na eficácia do mesmo no alívio da dor da injeção da solução anestésica, de acordo com estudo conduzido por Bagesund & Tabrizi, em 2008. Um adesivo transdérmico com 20% de lidocaína se mostrou similar ao gel de lidocaína 5% na redução da dor da punção na mucosa bucal do primeiro pré-molar em um grupo de 31 pacientes com idade média de 13 anos.

Em estudo realizado por Parirokh et al. (2012) cruzado duplo-cego e placebo controlado, em um grupo de 25 voluntários com idade média de 27 anos, não foi observada diferença estatística na dor da injeção da solução anestésica aplicada na mucosa labial que recobre o dente incisivo central maxilar entre o grupo placebo e o controle (benzocaína 20%).

Franz-Montan et al. (2012) avaliaram a eficácia de formulações lipossomais de ropivacaína 1 e 2% no alívio da inserção da agulha e da injeção anestésica no palato de 40 voluntários. Os anestésicos tópicos permaneceram por 5 min na mucosa antes de serem removidos e foi então injetada uma solução de 2% de lidocaína contendo epinefrina. As formulações com ropivacaína não reduziram a dor da punção e nem a da injeção anestésica no palato quando comparados com o grupo placebo. O EMLA<sup>®</sup>, utilizado como controle positivo no estudo, somente



foi eficaz em reduzir a dor da inserção da agulha, sem qualquer efeito significativo na dor provocada pela injeção da solução do anestésico.

Esses resultados conflitantes referentes à eficácia dos anestésicos tópicos em amenizar a dor da punção e da injeção anestésica, podem ser devido a diversos fatores, tais como a diferença entre o local de aplicação, o tipo de anestésico utilizado, o tempo de aplicação, a agulha utilizada e o método utilizado para avaliar a dor. É interessante observar que até o momento não há um anestésico tópico capaz de eliminar totalmente o desconforto provocado pela injeção da solução anestésica (Meechan, 2000; Bhalla et al., 2009; Franz-Montan et al., 2012).

## **2.3 A *Spilanthes acmella* L. Murray**

### **2.3.1 Estudo fitoquímico e de toxicidade da *Spilanthes acmella* L. Murray**

A *Spilanthes acmella* L. Murray; sinonímia *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen é uma planta originária da América do Sul (Figura 1) e muito comum em todo sudoeste asiático. No Brasil é popularmente conhecida como agrião-do-pará, agrião-do-mato (SP), pimenta-d'água (PE), agriãozinho, pimenteira, pimenta-do-pará (RJ), jambu (RJ), agrião-do-Brasil (BA), agrião, jambu-rana, erva-de-malaca, jambu-assú, mastruço ou abecedaria. A *Spilanthes acmella* é utilizada na culinária, principalmente na região norte do Brasil, e popularmente para tratar dores de dente e de garganta, tuberculose, anemia e como estimulante do apetite (Di-Stasi et al. 2002; Lorenzi & Matos, 2008).



Figura 1- Flor e folhas de jambu (*Spilanthes acmella* L. Murray)

Fonte: <http://webdrm.cpqba.unicamp.br/cpma/fotos/731.jpg>

Diversos compostos já foram identificados nos extratos de diferentes partes do jambu, tais como óleos voláteis (beta cariofileno, limoneno e timol), fenólicos (ácido vanílico e ácido trans-ferulico), fitoesteróis (stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol), polissacarídeos (ramnogalacturonana), cumarina (escopoletina) e alquilamidas (Lemos et al., 1991; Baruah & Leclercq., 1995; Ramsewak et al., 1999; Jirovetz et al., 2005; Prachayasittikul et al., 2009)

Dentre as alquilamidas encontradas no jambu, a que se encontra em maior quantidade é o espilantol (Figura 2). Esse composto não é exclusivo desta espécie e ocorre também em outras plantas das famílias Asteraceae, Solanaceae e Piperaceae (Nakatani & Nagashima, 1992; Dubey et al., 2013; Prachayasittikul et al., 2013).

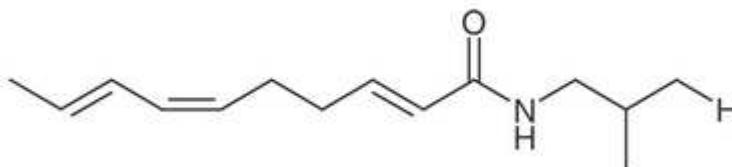


Figura 2 - Estrutura química do espilantol

Fonte: Biblioteca Nist

A toxicidade do espilantol e do extrato de jambu foi investigada por alguns autores. Cilia-Lopez et al. (2010), observaram que o espilantol (1 mg/kg, via intraperitoneal) provocou efeito estimulante em camundongos, tais como aumento de atividade motora e irritabilidade. Este efeito perdurou por cerca de 180 min, após o qual os animais retornaram a níveis normais. O espilantol mostrou-se arritmogênico em experimentos feitos em coração isolado de coelho, na dosagem de 40 mg/L (Herdy & Carvalho, 1984a, 1984b).

Chackraborty et al. (2004) não observaram qualquer efeito adverso ou mortalidade em ratos, na dose máxima de 3000 mg/kg de extrato aquoso das partes aéreas de jambu, por via oral. O extrato etanólico das flores de jambu (2000 mg/kg, via oral) também não provocou nenhum efeito tóxico em ratos (Sharma et al., 2011). Os extratos obtidos com éter de petróleo, clorofórmio e etanol, a partir das folhas de jambu, foram testados até 5000 mg/kg por via oral sem que houvesse qualquer sinal de toxicidade ou mortalidade entre os animais (Yadav et al., 2011).

Em artigo publicado recentemente por Nomura et al. (2013), o extrato etanólico das flores frescas de jambu se mostrou seguro nas doses de 5, 50 e 500 mg/kg por via intraperitoneal em camundongos, sem mortes ou sintomas de toxicidade pelo período de 7 dias de observação. Estes autores relataram, porém, que na dosagem de 5000 mg/kg os animais apresentaram alterações respiratórias e convulsões. Esse efeito adverso também foi relatado em outro estudo (Moreira et al., 1989) no qual o extrato n-hexânico de jambu, injetado por via intraperitoneal, induziu a ocorrência de convulsões tônico-clônicas em ratos. Estes autores observaram o aparecimento das convulsões de maneira dose-dependente (100 a 150 mg/kg) em 90% dos animais testados. Nigrinis et al. observaram efeito semelhante em estudo feito com a *Spilanthes americana* (Mutis), em 1986. Estas reações são provavelmente devido à via de administração do extrato, uma vez que

quando administrado por via oral o extrato não provocou qualquer sintoma de intoxicação.

### **2.3.1.2 Estudo farmacológico do espilantol e do extrato de *Spilanthes acmella* L. Murray**

Em 2011, Yadav et al. verificaram que o extrato etanólico das folhas de jambu (500 mg/kg por via oral) provocou diurese e perda de eletrólitos em ratos, de maneira semelhante a furosemida, sendo esta a provável razão da população também o utilizar como anti-hipertensivo.

O jambu é considerado um afrodisíaco e o extrato etanólico de suas flores (100 e 150 mg/kg, via oral, por 28 dias) elevou os níveis do hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e da testosterona em ratos (Sharma et al., 2011). Quando testado em humanos, uma pomada contendo jambu provocou aumento no desejo, excitação e satisfação sexual em homens e mulheres de maneira estatisticamente significativa comparado com grupo placebo (Regatas, 2008).

Diversos outros estudos demonstraram também propriedade vasodilatador, antioxidante, imunoestimulante, antimalárica, inseticida, larvicida, gastroprotetora e antipirética (Chakraborty et al., 2004; Rani & Murty, 2006; Wongsawatkul et al., 2008; Savadi et al., 2009; Pandey et al., 2011; Spelman et al., 2011; Nascimento et al., 2013).

O jambu foi classificado como seguro (GRAS nº3783) pela Associação dos Fabricantes de Extratos e Flavorizantes (FEMA – Flavor and Extract Manufactures Association) e é utilizado como flavorizante em diversos produtos, tais como sopas, vegetais processados, condimentos, goma de mascar e em dentifrícios (Fema, 2000).

O jambu encontra-se também presente em diversas formulações para a estética humana, vendidas no mercado, devido a seu suposto “efeito botox” ao reduzir as rugas nas áreas aplicadas sem a necessidade de injeções (Artaria et al., 2011). Tanto no Brasil quanto no exterior, é possível encontrar cremes com o extrato de jambu em sua fórmula, que prometem reduzir em até 80% as rugas na testa e ao redor dos olhos. A empresa francesa Gattefossé depositou uma patente de um antirrugas tópico a base de espilantol (Dermane & Passaro, 2005) e também comercializa dois produtos sob o nome de Gatuline<sup>®</sup> Expression e Gatuline<sup>®</sup> In-tense com este mesmo propósito. Alguns exemplos de produtos vendidos no exterior e no Brasil, com essa intenção, podem ser vistos na Figura 3.



Figura 3 – Antirrugas com extrato de jambu.

Da esquerda para direita: Etat Pur (França), Human and Kind (Irlanda) e Natura (Brasil).

Fonte: Sites das empresas Etat Pur, Humand and Kind e Natura.

O espilantol demonstrou capacidade como promotor de absorção de algumas substâncias como cafeína, testosterona e ibuprofeno, através da derme de maneira dose dependente (Spiegeleer et al., 2013). O espilantol também foi capaz de permear a mucosa e a derme em modelos experimentais com célula vertical do tipo Franz (Boonen et al., 2010a; Boonen et al., 2010b)

A atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do jambu foi investigada em diversos experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Estudo conduzido por Chakraborty et al. (2004) avaliou a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato aquoso das partes aéreas da *Spilanthes acmella* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg por via oral, utilizando os modelos experimentais de edema de pata induzido por carragenina, teste de retirada de cauda (*tail flick*) e o modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético. Os autores observaram efeito anti-inflamatório e analgésico significativo nos modelos testados de maneira dose-dependente.

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 administrado 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, por via intraperitoneal), isolado da espécie *Heliopsis longipes* reduziu em 95% o número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos comparado ao grupo controle. Foi observado também o efeito antinociceptivo no teste de placa quente (1 mg/kg, por via intraperitoneal) durante os sessenta min do experimento (Cilia-Lopez et al., 2010).

A atividade anti-inflamatória do jambu foi semelhante à apresentada pelo diclofenaco de sódio em gel, no modelo de edema de pata induzido por carragenina. A formulação em gel desenvolvida com 1% de extrato de éter de petróleo a partir das flores de jambu, para uso tópico, não provocou qualquer sinal de irritação ou eritema em modelo de irritação de pele em ratos (Gupta et al., 2012).

Nomura et al. (2013) relataram a atividade antinociceptiva orofacial do extrato etanólico das flores frescas de jambu nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg (via

intraperitoneal) em camundongos. Estes autores injetaram formalina, capsaicina e cinamaldeído no lábio superior direito de camundongos, após meia hora da administração oral do extrato de jambu. A formalina foi utilizada com o intuito de verificar a atividade antinociceptiva na fase neurogênica (0 – 5 min após a injeção) e anti-inflamatória (15 a 30 min após a injeção); a capsaicina e o cinamaldeído foram utilizados para verificar o efeito nociceptivo provocado por ação nos receptores de calor e frio, respectivamente. Os autores relataram uma redução na nocicepção em todos os modelos testados e sugeriram que o efeito analgésico na região orofacial estivesse ligado a 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 o 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, efeito inibitório do espilantol sobre a produção de mediadores pró-inflamatórios, como óxido nítrico, ciclo-oxigenase 2 (COX-2), interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Os autores sugeriram que o efeito supressor se deve, em parte, a uma diminuição na ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) provocada pelo espilantol, uma vez que esse fator está associado a expressão de diversos mediadores pró-inflamatórios.

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 em porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*), que permite estimar o grau e a duração da anestesia de maneira simultânea. Os animais foram divididos em grupos, e

tiveram o pelo do dorso próximo a linha média, removido em quatro áreas diferentes, no dia anterior ao experimento. Foram feitas então, injeções intracutânea de 0,2 mL nestas áreas, das seguintes soluções: lidocaína 2% (controle positivo), solução salina 0,9% (controle negativo) e extrato aquoso das partes aéreas de jambu nas concentrações de 10 e 20%. As áreas onde a injeção foi aplicada foram marcadas e seis picadas de agulha foram feitas uniformemente nesta região, a cada 5 min, pelo período de 30 min. A contração localizada da pele, geralmente acompanhada de guincho, foi considerada como resposta normal do animal à picada da agulha e quando esta reação não foi observada, uma resposta negativa foi registrada. Ao final do experimento, os autores observaram efeito anestésico de 70,36% e 87,02% do extrato aquoso do jambu, respectivamente nas concentrações de 10 e 20% ( $p < 0,001$ ).

Fosquiera et al. (2012) reportaram efeito anestésico de formulação contendo jambu. Os autores inseriram uma agulha na mucosa bucal de voluntários e avaliaram a resposta à dor por meio de escala visual e do batimento cardíaco. Não houve diferença estatística no efeito anestésico entre o grupo que utilizou a pomada contendo jambu e o grupo controle, que utilizou benzocaína 20%.

O uso popular, associado aos resultados obtidos nesses estudos, demonstra que o jambu pode ter um futuro promissor como anestésico tópico, abrindo um campo de estudo para o desenvolvimento de formulações tendo como base esse extrato e seus componentes. Esses resultados levaram à realização do presente trabalho.



### **3 Proposição**

Desenvolvimento e avaliação da eficiência de bioadesivo contendo extrato de *Spilanthes acmella* L. Murray para aplicação oral como anestésico tópico.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

- Obtenção de extratos etanólicos a partir de suas partes aéreas secas e moídas;
- Monitoramento do teor de espilantol em extratos brutos e formulações;
- Produção de um bioadesivo contendo quitosana e extrato bruto e pré-purificado em diferentes concentrações;
- Determinação das propriedades físicas das diferentes formulações;
- Avaliação da permeação do espilantol presente no bioadesivo em modelo *in vitro* empregando epitélio de mucosa de esôfago de porco em célula de difusão vertical do tipo Franz;
- Avaliação da atividade antinociceptiva, em modelo animal, da formulação contendo extrato bruto em diferentes concentrações.



## **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 os seguintes reagentes: Quitosana (Grau de desacetilação >75%, Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos), Transcutol<sup>®</sup> (Etoxidiglicol, Gattefossé, Lyon, França), Propilenoglicol, Metilparabeno (Nipagin<sup>®</sup>) ácido acético glacial (Synth, São Paulo, Brasil), Glicerina (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil), Triacetina<sup>®</sup> (Neugel, São Paulo, Brasil), Brij 30<sup>®</sup> (Polietilenoglicol dodeciléter, Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos), Carvão ativo (Carbomafra, Curitiba, Brasil), Terra diatomácea (Celite<sup>®</sup> 545, Nuclear, Diadema, Brasil), embalagem tipo sachê (Tradpouch<sup>®</sup> modelo 60MZ, Tradbor, São Paulo, Brasil), mistura eutética de lidocaína e prilocaína 5% (EMLA<sup>®</sup> creme, AstraZeneca, São Paulo, Brasil). Os solventes utilizados foram etanol, n-hexano, acetato de etila e metanol (Synth, São Paulo, Brasil) e metanol grau cromatográfico (J.T. Baker, Pensilvânia, Estados Unidos).

#### **4.1.2 Equipamentos**

Os equipamentos empregados foram: deionizador (modelo Simplicity, Millipore<sup>®</sup>, Massachusetts, US) estufa com ventilação forçada (Fabbe, São Paulo, Brasil), estufa (modelo Precision, GCA, Chicago, Estados Unidos), moinho de facas (Primotécnica, São Paulo, Brasil), sistema de evaporação rotativo (modelo R-215, Büchi, Flawil, Suíça), liofilizador (modelo Sentry, VirTis, Pensilvânia, Estados Unidos), cromatógrafo à gás com detector seletivo de massas (CG-EM, Hewlett Packard 5890, série II, detector seletivo de massas Hewlett Packard 5970 EI 70 eV, Califórnia, Estados Unidos), cromatógrafo a gás com detector de

ionização em chama (CG – FID, modelo Trace GC Ultra, Massachusetts, Estados Unidos) cromatógrafo de partição centrífuga (modelo SCPC-250/Spot Prep II<sup>®</sup>, equipado com bomba quaternária, detector UV/Vis, coletor de frações, Armen, Saint-Avé, França), ultrassom (modelo Branson 220, Branson, Conecticute, Estados Unidos), câmara escura ultra violeta (modelo SL-204, Solab, São Paulo, Brasil), pHmetro (modelo B474, Micronal, São Paulo, Brasil), balança analítica (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), câmara climática (modelo TE-4003, Tecnal, São Paulo, Brasil), homogeneizador (modelo T10 basic Ultra Turrax<sup>®</sup>, Staufen, Alemanha), agitador de tubo tipo vórtex (modelo AP 56, Phoenix, São Paulo, Brasil), paquímetro digital (modelo Cal II, Tesa, Renens, Suíça). As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas de alumínio (sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, Alemanha), microseringa de 10 µL (Hamilton, Nevada, Estados Unidos).

#### **4.2 Obtenção do 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"). As sementes foram gentilmente doadas pela empresa Centroflora (Botucatu, São Paulo, Brasil). A coleta da parte aérea foi realizada no mês de abril de 2012 e a exsicata está depositada no Herbário do CPQBA/UNICAMP, sob nº1349. Também foi obtida autorização de acesso e de remessa de patrimônio genético (CGEN) sob nº 010594/2012-4.

### **4.3 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 - 0,297 mm. Após secagem e moagem, o material foi mantido em embalagem de papel craft com revestimento de polipropileno com fechamento simples e armazenado em freezer - 20 °C até utilização.

### **4.4 Preparação do extrato etanólico**

#### **4.4.1 Extrato bruto**

O material seco e moído foi extraído com etanol 96° GL (1:5, p/v) em tanque de aço inox com agitação mecânica por 1,5 h, ao final do qual o resíduo foi separado por filtração. Este processo foi repetido por mais duas vezes (Rodrigues et al., 2006). Os extratos parciais obtidos foram filtrados, reunidos e concentrados sob vácuo em sistema de evaporação rotativo na temperatura de 40 °C. O extrato foi então liofilizado até massa constante para cálculo de rendimento, 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 (CCDs) com todos os extratos preparados, utilizando como fase móvel n-hexano:acetato de etila na proporção 70:30 (v:v). O extrato foi aplicado em banda com ajuda de microseringa e a detecção dos compostos foi feita sob lâmpada UV a 254 nm e com o revelador solução de p-anisaldeído.

#### 4.4.2 Extrato tratado com carvão ativo

Com o intuito de obter um extrato isento de pigmentos foram feitos diversos tratamentos com carvão ativo. O processo de extração foi feito conforme descrito no item 4.4.1, porém logo após a reunião dos filtrados, volumes pré-determinados de extrato foram pesados e colocados em balões de fundo redondo. Acrescentou-se carvão ativo em porcentagens que variaram de 2,5 a 10% (m/m) em relação ao extrato bruto e levou-se a banho aquecido à 40 °C com agitação por uma hora. Em seguida, realizou-se filtragem a vácuo, em funil de placa porosa nº 3, com pré-capa de terra diatomácea (12 g). O volume de extrato obtido foi aferido em cada um dos diferentes tratamentos com carvão. Posteriormente, os extratos foram concentrados sob vácuo em sistema de evaporação rotativo na temperatura de 40 °C e liofilizados. A massa seca do extrato foi quantificada para cálculo de rendimento, acondicionada em frasco âmbar e armazenada em geladeira. A Figura 4 ilustra o processo de tratamento com carvão ativo.

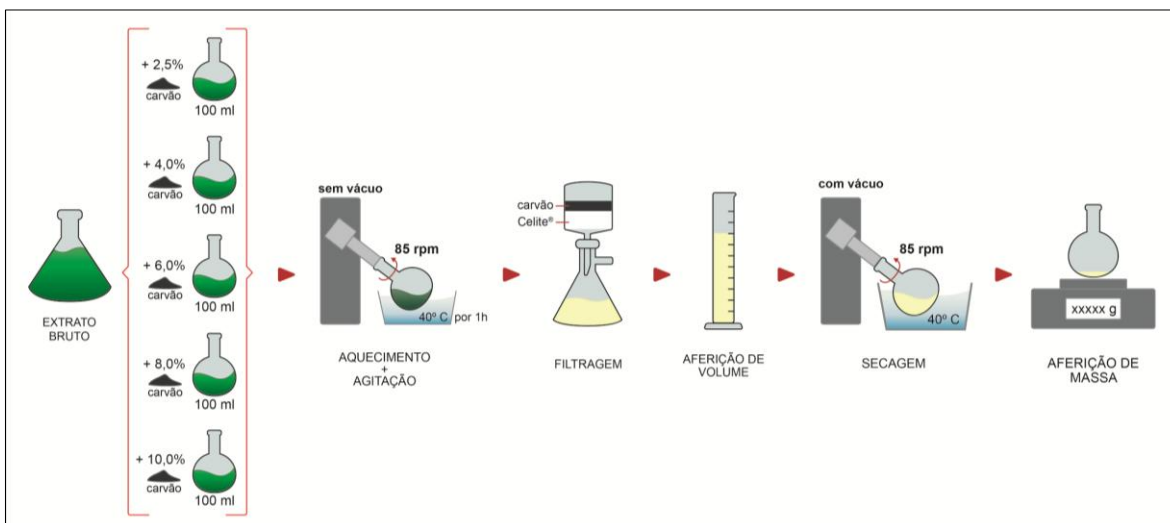


Figura 4 - Ilustração do processo de tratamento do extrato bruto com diferentes porcentagens de carvão ativo.

## 4.5 Preparo do bioadesivo

### 4.5.1 Maximização da formulação contendo quitosana e extrato de jambu

O gel de quitosana foi preparado dissolvendo-se um grama de quitosana em 100 mL de solução de ácido acético 1% (v/v) com o auxílio de homogeneizador. O gel foi então levado a ultrassom, até completa eliminação de bolhas e reservado. Em um béquer, colocou-se o extrato de jambu nas concentrações de 10 ou 20%, adicionou-se 0,1 g de metilparabeno e 5 g de coadjuvante para melhorar a plasticidade e o aspecto visual e auxiliar na liberação do princípio ativo. Foram testados como coadjuvantes o propilenoglicol, triacetina, Brij 30<sup>®</sup> e Transcutol<sup>®</sup>. Após a adição dos componentes mencionados, completou-se com o gel de quitosana preparado anteriormente até atingir 100 g. Foi utilizado homogeneizador e ultrassom até completa incorporação do extrato e formação de solução homogênea. Em placas de poliestireno com 55,4 cm<sup>2</sup> foram despejados 20 g desta solução e levadas a estufa à 40 °C, por 30h, para secagem. A Figura 5 ilustra o processo de preparação do bioadesivo de maneira simplificada.

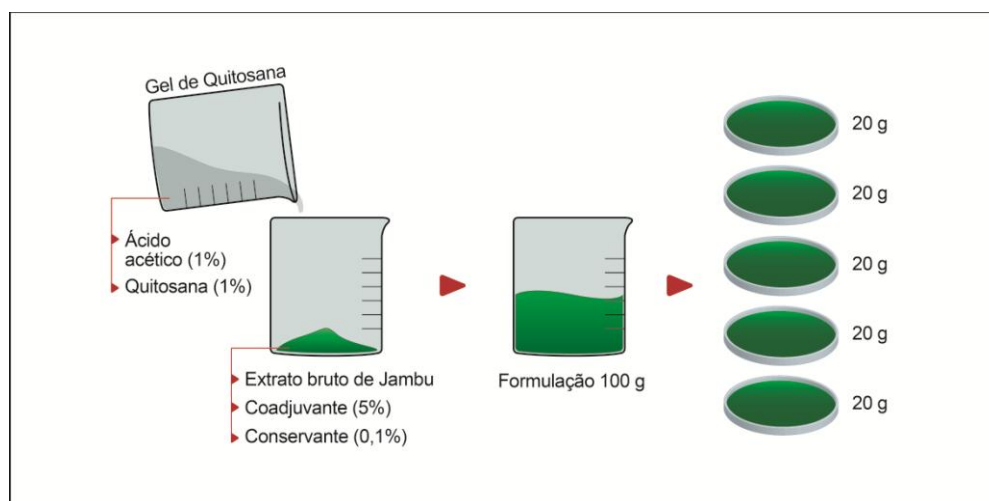


Figura 5 - Ilustração do processo de preparação de bioadesivo com extrato de jambu.

#### 4.5.2 Propriedades físicas dos bioadesivos

Após completa secagem, os bioadesivos foram cortados em círculos de  $2,68 \text{ cm}^2$  (15 mm de diâmetro) utilizando um furador ilustrado na Figura 6.



Figura 6 - Furador utilizado para corte dos bioadesivos.

As medidas de espessura foram feitas com paquímetro digital em quatro pontos diferentes dos bioadesivos ( $n = 7$ ) para determinação da média da espessura e seu desvio padrão.

Também foram feitas medidas da massa dos bioadesivos ( $n = 7$ ) em balança analítica para obtenção da média e desvio padrão.

#### 4.6 Monitoramento do espilantol por CG/EM

O monitoramento analítico do espilantol foi realizado por cromatografia gasosa, empregando-se um cromatógrafo gasoso com detector de massas (CG-EM, Hewlett Packard 5890, série II, detector seletivo de massas Hewlett Packard 5970 EI 70 eV) equipado com coluna de sílica fundida WCOT, HP5-MS, marca Agilent de dimensões 30m x 0,25mm DI, 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de fase estacionária. As condições de análise foram: temperatura de injeção: 220°C,



temperatura do detector: 250°C, programa de temperatura: 60-240°C, (3°C/min), com divisor de amostra na razão 1:40, gás de arraste He 0,7 bar, 1mL/min. Os extratos, 15 mg, foram dissolvidos em 1 mL de metanol e mantidos em freezer -20 °C até o momento da análise. A identificação do espilantol foi feita com o auxílio do banco de dados do National Institute of Standard Technology (NIST®) presente no software de análise MSD ChemStation da Agilent® com concordância mínima de 90%.

#### **4.7 Ensaio de permeação *in vitro* do espilantol contido nos bioadesivos através do epitélio de mucosa de esôfago de porco em célula de difusão vertical tipo *Franz***

Os esôfagos de porco foram comprados em um abatedouro devidamente certificado pela Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (Frigar® Abatedouro Ind. e Com. de Conservas, Campinas-SP), logo após o sacrifício dos animais e foram transportados em tampão fosfato (pH 7,4). Para a separação do epitélio do esôfago foi utilizada a metodologia descrita por Diaz Del Consuelo et al., (2005). A mucosa foi separada cuidadosamente do tecido adjacente com o auxílio de um bisturi. O epitélio foi separado do tecido conjuntivo (lâmina própria) com uma espátula após a imersão da mucosa em água destilada em banho aquecido a 60 °C durante dois min e foi utilizado imediatamente.

O experimento de permeação através do epitélio de mucosa de esôfago de porco foi realizado na célula de difusão vertical tipo Franz com área de permeação de 0,6 cm<sup>2</sup>, conforme Figura 7. Foram utilizadas as formulações contendo 10 e 20% de extrato bruto e também a formulação com 10% de extrato bruto tratado com carvão ativo cortadas em círculos com 15 mm de diâmetro.

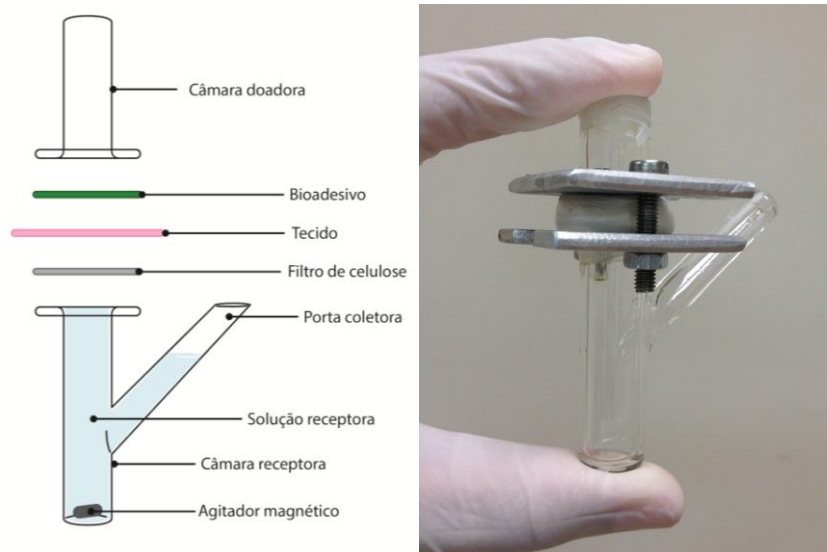


Figura 7 - Célula de difusão vertical tipo Franz.

Fonte: Autora.

O epitélio foi posicionado com o lado conjuntivo sobre o filtro de celulose regenerada (poros de diâmetro de  $0,45 \mu\text{m}$ ) e com o epitélio voltado para o compartimento doador. A função do filtro de celulose é dar suporte a este tecido, devido à sua grande fragilidade. O epitélio, o filtro e o bioadesivo foram posicionados juntos na célula de Franz, entre os compartimentos doador e receptor, e o compartimento receptor foi preenchido com cerca de 4 mL de solução fisiológica com 30% de metanol, a fim de garantir as condições sink, isto é, a quantidade permeada do ativo não atingiu 10% de sua solubilidade.

A célula de Franz foi então colocada em um banho aquecido a  $37^\circ \text{C}$ , sob agitação magnética constante. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 e 300 min) foram retiradas alíquotas da solução receptora ( $300 \mu\text{L}$ ) e estas foram analisadas por CG-EM. Após a retirada de cada alíquota foi repostado um volume correspondente ao retirado.

Após a quantificação por CG-EM foram calculados os parâmetros de permeação do espilantol tais como: tempo necessário para permeação inicial ou *time lag*; fluxo e coeficiente de permeabilidade. Os experimentos foram realizados em sextuplicatas.

Para cada célula, foi construído um gráfico a partir da quantidade de espilantol acumulado no compartimento receptor em função do tempo (intervalos de tempo de cada coleta). A inclinação da porção linear dos gráficos representa o fluxo de penetração do espilantol através da mucosa e a sua intersecção com o eixo das abscissas permitiu determinar o valor do tempo de latência (*time lag*). Dessa forma, os dados obtidos a partir dos experimentos de permeação foram expressos em quantidades cumulativas de espilantol permeado em função do tempo, em um intervalo de 5 h e analisados de acordo com a equação 1:

$$\text{Equação 1 : } J = P \times C_d$$

Onde: J é o fluxo de espilantol através da mucosa, P é o coeficiente de permeabilidade e  $C_d$  é a concentração de espilantol presente no bioadesivo utilizado no compartimento doador.

Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n = 6).

## **4.8 Avaliação *in vivo* da atividade antinociceptiva do bioadesivo de jambu**

### **4.8.1 Animais**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-40g) obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) mantidos a  $25 \pm 2$  °C em ciclos claro-escuro de 12 h (fase clara iniciando às 7 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 Animal da UNICAMP sob nº 2851-1

e em conformidade com as boas práticas de experimentação animal preconizadas pelo Guia de cuidados veterinários de animais de laboratório de Voipio *et al.* (2008). Os animais foram divididos em grupos de 5-6 animais e cada animal foi utilizado somente uma vez no experimento.

#### **4.8.2 Avaliação da atividade antinociceptiva do bioadesivo pelo modelo de remoção de cauda**

A avaliação da atividade antinociceptiva foi realizada pelo modelo de remoção da cauda (*tail flick*) conforme descrito por de Araújo *et al.*, (2010). Inicialmente, os camundongos foram mantidos em contêntores em acrílico cristal, mantendo a porção distal da cauda livre (10 cm) e o tempo necessário para remoção da cauda (latência) foi considerado como resposta aversiva ao calor gerado por lâmpada incandescente. O valor basal (linha basal) de cada animal foi registrado antes do início do experimento e somente os que apresentaram valor basal de até 4 s foram considerados aptos para o experimento. Para evitar lesões por injúria térmica, foi estabelecido o tempo máximo de 10 s para contato com a fonte de calor (*cut-off*). Após a determinação da resposta aversiva, a cauda dos animais foi novamente exposta ao calor gerado por uma lâmpada incandescente (55 °C) e o tempo de resposta determinado. Este estudo foi composto por cinco grupos: grupo 1: bioadesivo com 10% de extrato bruto de jambu (10% EB); grupo 2: bioadesivo com 20% de extrato bruto de jambu (20% EB); grupo 3: bioadesivo com 10% de extrato bruto de jambu tratado com 4% de carvão ativo (10% EBTC); grupo 4: controle positivo 150 mg EMLA<sup>®</sup>/animal ; grupo 5: controle negativo, apenas o bioadesivo.

O bioadesivo foi aplicado a 2 cm da base da cauda do animal com o auxílio de fita adesiva durante dois min e após sua retirada aplicado o estímulo nociceptivo na mesma região. A primeira medida foi realizada logo após a retirada

do bioadesivo e as seguintes foram feitas a cada 15 min até que o animal retornasse ao seu valor basal de resposta ao estímulo nociceptivo. Após o manuseio dos animais no ensaio de *tail flick*, os mesmos foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical, e acondicionados em freezer em sacos plásticos, para posterior incineração. O procedimento foi realizado de acordo com normas específicas e como preconizado pelo Programa Institucional de Gerenciamento de Resíduos Biológicos, Químicos e Radioativos da UNICAMP, baseado na Deliberação CONSU-UNICAMP n.º 351 de 01/10/2003 de sua criação e na Resolução n.º 358, de 29/04/2005 do Ministério do Meio Ambiente e Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA.

#### **4.9 Fracionamento dos extratos brutos e isolamento do espilantol por meio de Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC)**

Esta etapa foi feita sob a supervisão de uma pesquisadora da Armen Instruments, a Química Céline Le Quémener, e teve como objetivo fracionar e isolar o espilantol presente nos extratos brutos para utilização como padrão analítico, uma vez que o custo do padrão comercial é de US\$60,000/g.

##### **4.9.1 Escolha do sistema de solventes**

Utilizando a combinação de solventes proposta por Margraff (1994) e baseado em trabalho publicado por Mbeunkui et al. (2011) foram feitos testes com quatro sistemas de solventes diferentes para determinação do coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) e conseqüentemente escolha do mais adequado para a separação do espilantol. Os sistemas escolhidos para teste foram P, Q, R e S nas proporções apresentadas na Tabela 1 (proporções volumétricas)

Tabela 1 - Relação de possíveis combinações de solventes para CPC (v/v).

Sistema proposto por Margraff (1994). Destaque em cinza para os sistemas testados neste estudo.

<b>Sistema</b>	<b>n-hexano</b>	<b>Acetato de Etila</b>	<b>Metanol</b>	<b>Água</b>
<b>A</b>	0	1	0	1
<b>B</b>	1	19	1	19
<b>C</b>	1	9	1	9
<b>D</b>	1	6	1	6
<b>F</b>	1	5	1	5
<b>G</b>	1	4	1	4
<b>H</b>	1	3	1	3
<b>J</b>	2	5	2	5
<b>K</b>	1	2	1	2
<b>L</b>	2	3	2	3
<b>M</b>	5	6	5	6
<b>N</b>	1	1	1	1
<b>P</b>	6	5	6	5
<b>Q</b>	3	2	3	2
<b>R</b>	2	1	2	1
<b>S</b>	5	2	5	2
<b>T</b>	3	1	3	1
<b>U</b>	4	1	4	1
<b>V</b>	5	1	5	1
<b>W</b>	6	1	6	1
<b>X</b>	9	1	9	1
<b>Y</b>	19	1	19	1
<b>Z</b>	1	0	1	0

As misturas de solventes foram preparadas cuidadosamente em um tubo de ensaio até equilíbrio e as fases superior e inferior foram separadas com o auxílio de uma pipeta imediatamente antes de sua utilização. Quantidades pré-determinadas de extrato de jambu seco e bruto foram dissolvidas em 2 mL da fase superior e 2 mL da fase inferior de cada um dos sistemas testados com a ajuda de um agitador de tubo tipo vórtex.

Após completa dissolução do extrato e equilíbrio das fases, alíquotas das frações superiores e inferiores foram enviadas para análise em CG-EM para cálculo da área relativa referente ao pico de espilantol.

Os valores de área relativa do espilantol obtidos por meio de CG-EM foram utilizados para o cálculo do Kd de acordo com equação 2, descrita abaixo.

$$\text{Equação 2: } K_d = \frac{[\text{área}]_{\text{inf}}}{[\text{área}]_{\text{sup}}}$$

#### **4.9.2 Isolamento do espilantol por meio do CPC**

As injeções no cromatógrafo foram feitas com extrato de jambu bruto seco dissolvido na fase superior testada e filtrada em membrana 0,45 µm. As quantidades variavam entre 500 a 1500 mg por injeção. As frações monitoradas por CCD nas quais foi detectada a presença de espilantol foram também analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-FID) nas mesmas condições de análise descritas para o CG-EM.

A porcentagem de área relativa do espilantol obtida por este método foi utilizada em todas as frações provenientes do CPC.

#### 4.10 Construção da curva analítica empregando-se o espilantol obtido no fracionamento por CPC

Para determinação do teor de espilantol presente em frações coletadas no ensaio de liberação *in vitro* foi construída uma curva analítica. O espilantol isolado por meio de CPC foi utilizado como marcador analítico e sua pureza por normalização por CG-FID foi de 95,3% já que não tínhamos um padrão primário. Pesou-se 6,54 mg de espilantol em um balão volumétrico de 10 mL e solubilizou-se em metanol de grau cromatográfico, obtendo uma solução estoque de 654 µg/mL. As diluições foram realizadas com pipeta volumétrica em balões volumétricos obtendo concentrações de 52,30; 41,84; 31,50; 26,15; 15,69; 10,46 e 1,05 µg/mL.

O limite de detecção e de quantificação foi determinado após a realização de três curvas analíticas com soluções de espilantol na faixa de concentração descrita acima (Skoog et al., 2006).

O limite de detecção e de quantificação foi calculado de acordo com as equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{Equação 3: } LD = (DPa \times 3) / IC$$

Onde: LD é o limite de detecção estimado, DPa é o desvio padrão da intersecção com o eixo y das três curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.

$$\text{Equação 4: } LQ = (DPa \times 10) / IC$$

Onde: LQ é o limite de quantificação estimado, DPa é o desvio padrão da intersecção com o eixo y das três curvas de calibração e IC é a inclinação da curva de calibração.



#### **4.11 Estudo de estabilidade acelerada do bioadesivo contendo extrato de jambu**

Em acordo com a RE nº 1 de 2005 da ANVISA (Brasil, 2005) que trata das normativas para este tipo de estudo, os bioadesivos foram acondicionados em embalagens plásticas impermeáveis revestidas com alumínio com fechamento hermético tipo zip (Figura 8) e submetidos à estufa seca com temperatura de  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 120 dias. As amostras foram analisadas nos tempos 0, 90 e 120 dias nos quesitos aparência e pH. O teor de espilantol foi medido nos tempos 0 e 120 dias. Os testes foram realizados em triplicata.



Figura 8 - Embalagens utilizadas para armazenamento dos bioadesivos para teste de estabilidade acelerada

##### **4.11.1 Avaliação do pH dos bioadesivos**

Os bioadesivos foram pesados em balança analítica, adicionou-se água deionizada na proporção de 1% m/m e a mistura foi levada ao ultrassom por dois min. A medida do pH da solução resultante foi realizada em pHmetro calibrado previamente nos pHs 4 e 7, à temperatura ambiente (Farmacopéia Brasileira; 2010).

#### **4.11.2 Avaliação do teor de espilantol durante estudo de estabilidade**

Os bioadesivos foram pesados em balança analítica, adicionou-se metanol na proporção de 1% m/m e a mistura foi levada ao ultrassom por dez min. Ao final, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas e o teor de espilantol foi determinado através de CG-EM nas mesmas condições de análise descritas no item 4.6 – Monitoramento do espilantol por CG-EM.

#### **4.12 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância considerando nível de significância de 5%. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA, Tukey Kramer e Gehan-Breslow-Wilcoxon. Todas as análises foram feitas com o pacote estatístico GraphPad Prism, InStat (GraphPad Software, Inc.).

## 5 Resultados

### 5.1 Rendimento do extrato bruto etanólico

#### 5.1.1 Extrato bruto etanólico

O extrato bruto etanólico de jambu apresentou rendimento médio de  $7,7\% \pm 0,49$  em base seca. Cromatografias em camada delgada foram preparadas para a avaliação do perfil fitoquímico inicial em todos os extratos obtidos, conforme ilustrado pela Figura 9.

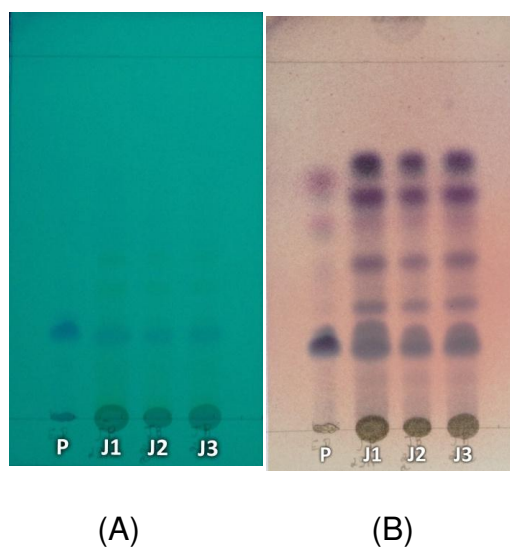


Figura 9 - Cromatograma em camada delgada de extratos brutos etanólicos de *Spilanthes acmella*.

Fase Móvel: n - hexano:acetato de etila 70:30; (v/v). (A) revelação em 254 nm; (B) revelação em p-anisaldeído. P: extrato purificado; J1, J2 e J3: extrato bruto de jambu.

#### 5.1.2 Extrato bruto etanólico tratado com carvão ativo

Após tratamento com carvão ativo houve mudança na coloração do extrato etanólico de jambu conforme pode ser observado na Figura 10.

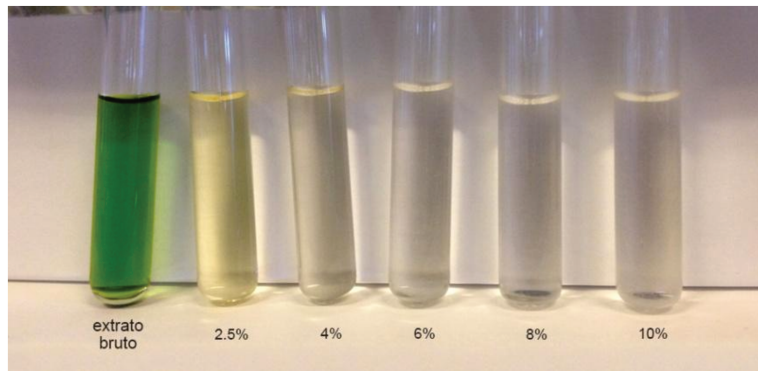


Figura 10 - Despigmentação do extrato bruto etanólico de jambu após o tratamento com carvão ativo em diferentes porcentagens.

Na etapa de filtragem com terra diatomácea (Celite<sup>®</sup>) verificou-se que houve diminuição do volume obtido e conseqüentemente perda em massa, como pode ser observado nas Figura 11 e 12.

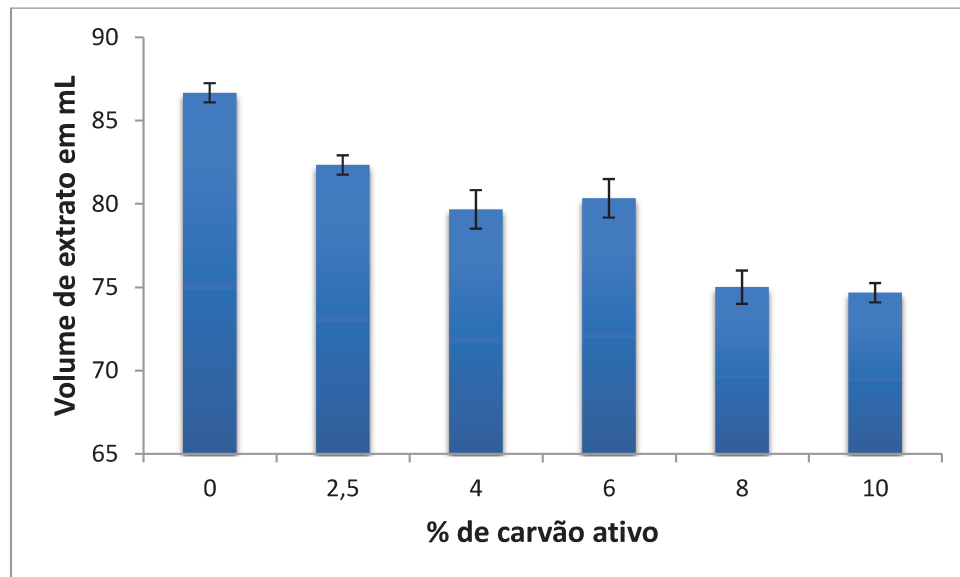


Figura 11 - Volume em mL de extrato bruto tratado com carvão ativo recolhido após filtragem em leito de Celite<sup>®</sup>, sob vácuo.

Verificou-se que o aumento da porcentagem de carvão ativo utilizada proporcionou uma diminuição no rendimento em massa, conforme ilustrado na Figura 12. Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

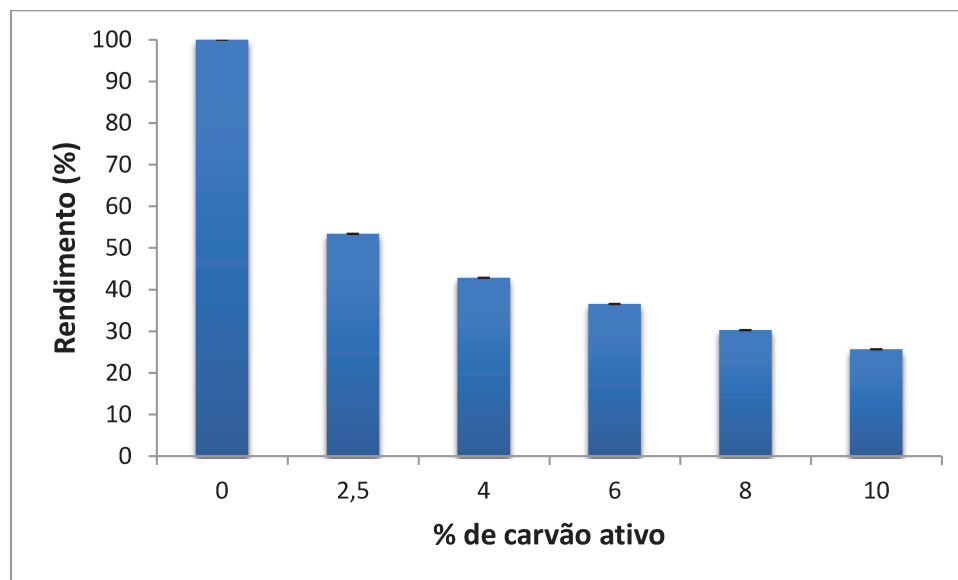


Figura 12 - Rendimento de extrato após tratamento com carvão ativo.

Levando-se em consideração fatores como rendimento (Figura 12) e teor de espilantol (item 5.3), o extrato etanólico de jambu tratado com carvão ativo na proporção de 4% foi o escolhido para continuação dos testes. O extrato tratado com essa porcentagem de carvão resultou em área de espilantol de  $64,6 \pm 1,15\%$  por CG-EM.

## 5.2 Preparo do Bioadesivo

### 5.2.1 Maximização da formulação contendo quitosana e extrato de jambu

Os testes iniciais tiveram como objetivo a produção de um bioadesivo resistente, de fácil manipulação e com bom aspecto visual.

Os bioadesivos produzidos com triacetina e Brij 30<sup>®</sup> foram descartados a *posteriori*, pois não apresentaram bom aspecto visual e também não secaram completamente, como pode ser observado na Figura 13, mesmo em diferentes concentrações.

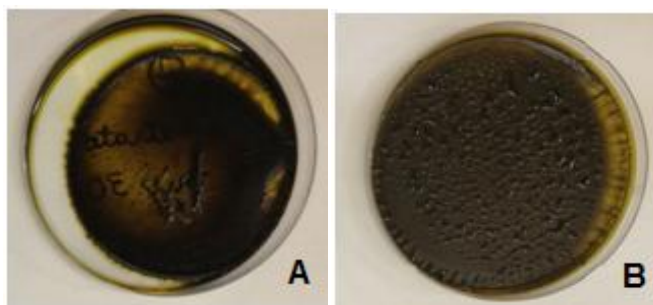


Figura 13 - Bioadesivos com extrato bruto de jambu preparados com Brij 30 (A) e triacetina (B).

Os bioadesivos que apresentaram melhor aspecto visual foram os obtidos com a incorporação de propilenoglicol e Transcutol<sup>®</sup> (Figura 14). Apesar de apresentarem aspecto visual bem semelhante, o bioadesivo com Transcutol<sup>®</sup> mostrou - se muito mais resistente à manipulação e se tornou então o coadjuvante de escolha para todas as formulações.

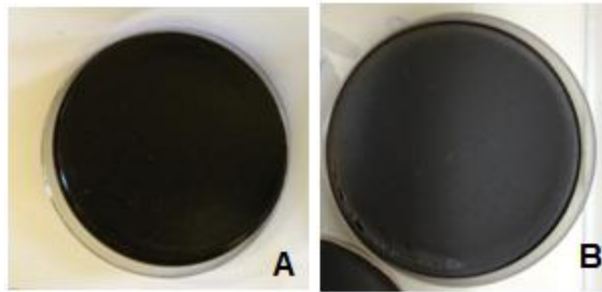


Figura 14 - Bioadesivos com extrato bruto de jambu preparados com propilenoglicol (A) e Transcutol<sup>®</sup> (B).

### 5.2.2 Propriedades físicas dos bioadesivos

Após o corte obtido com o furador (diâmetro de 15 mm), os bioadesivos se apresentaram com aspecto como ilustrado na Figura 15 e foram em seguida empregados para medida de espessura.

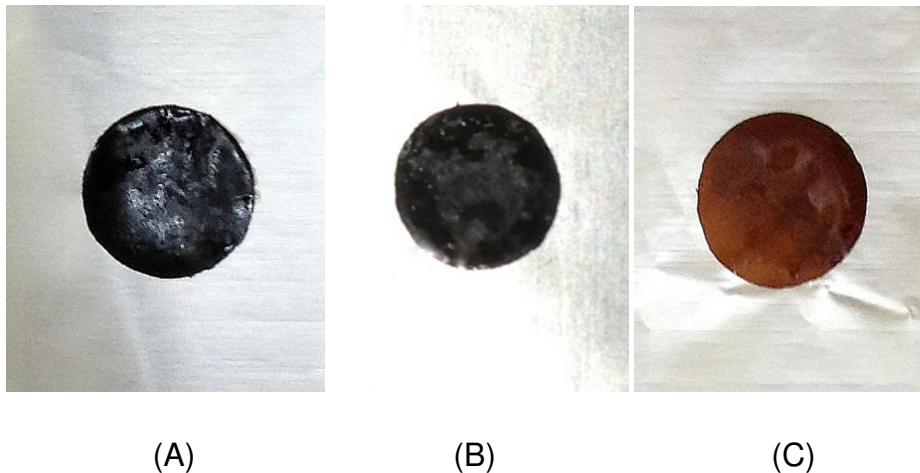


Figura 15 - Aparência dos bioadesivos após corte com furador.

(A) – bioadesivo com 10% de extrato bruto de jambu; (B) bioadesivo com 20% de extrato bruto de jambu; (C) bioadesivo contendo 10% de extrato tratado com carvão ativo (4%).

As medidas de espessura (mm) e massa (g) estão expressas em média e desvio padrão e apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros físicos dos bioadesivos desenvolvidos.

Porcentagem e tipo de extrato	Espessura (mm)	Massa (g)
10%, extrato bruto	0,45 ± 0,02	0,13 ± 0,01
20%, extrato bruto	0,53 ± 0,01	0,14 ± 0,01
10%, extrato bruto tratado com carvão 4%	0,52 ± 0,01	0,14 ± 0,01

(n=7) Média ± desvio padrão

### 5.3 Monitoramento do espilantol por CG/EM

Os cromatogramas obtidos a partir dos extratos de jambu estão ilustrados nas Figuras 16 e 17. Neles é possível verificar que o pico referente ao espilantol (tempo de retenção: 42 min), foi o majoritário em todos os ensaios realizados.

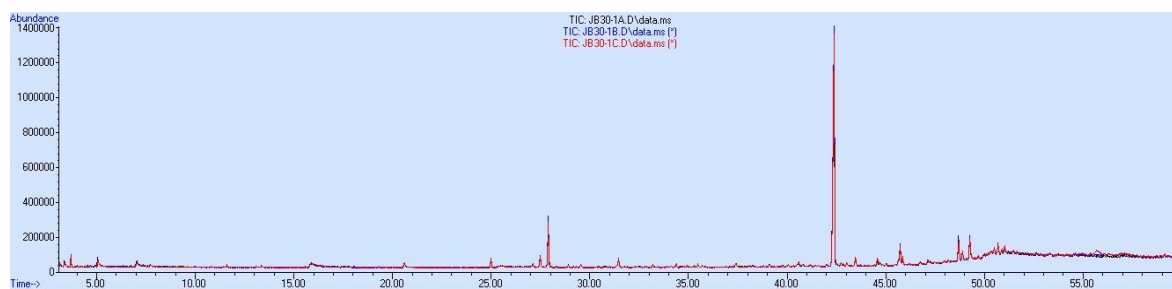


Figura 16 - Sobreposição dos cromatogramas obtidos com as triplicatas dos extratos bruto etanólicos de jambu



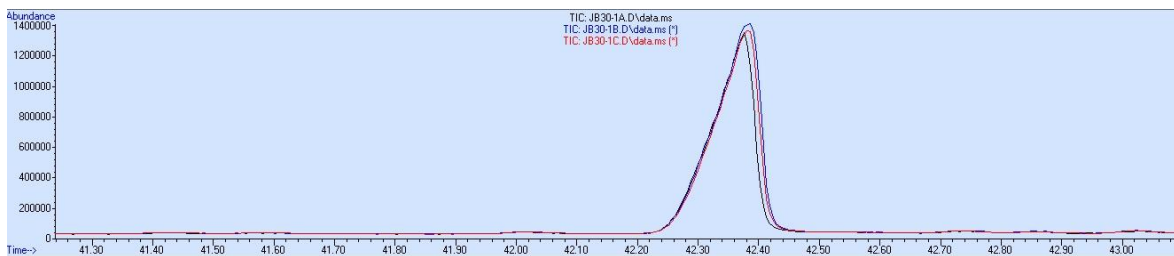


Figura 17 - Cromatograma expandido entre os tempos 41 e 43 min, mostrando pico do espilantol.

Confirmado por meio de comparação realizada com o respectivo espectro de massas disponível na biblioteca do NIST.

A área percentual normalizada de espilantol obtida para o extrato bruto foi de  $55 \pm 1\%$  e para o extrato após tratamento com 4% de carvão ativo foi de  $64,6 \pm 1,15\%$ . Desta forma, o extrato tratado com 4% de carvão ativo foi o escolhido dentre os diferentes tratamentos, pois houve um aumento relativo do teor de espilantol e perda de pigmentos, apesar da diminuição em massa quando comparada com o extrato bruto original.

#### **5.4 Ensaio de permeação *in vitro* do espilantol contido nos bioadesivos através do epitélio de mucosa de esôfago de porco em célula de difusão vertical tipo Franz**

A Figura 18 mostra o perfil da permeação do espilantol a partir dos diferentes bioadesivos avaliados. A análise estatística (ANOVA e Tukey-Kramer) das áreas sob as curvas individuais mostrou que a formulação de 10% extrato bruto tratado com carvão ativo (4%) mostrou maior área que as demais de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), sendo que não houve diferenças estatisticamente significantes entre as outras formulações.

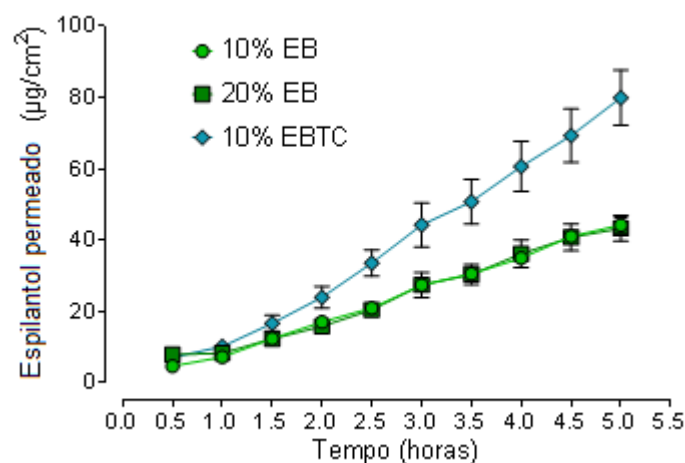


Figura 18 - Permeação do espilantol através da mucosa de esôfago de porco.

EB: Extrato bruto de jambu; EBTC: Extrato bruto de jambu tratado com 4% de carvão ativo; Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão; n=6. ANOVA e Tukey-Kramer.

Os parâmetros de permeação (fluxo, coeficiente de permeabilidade e *time lag*) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de permeação do espilantol aplicado em condição de dose finita através de epitélio da mucosa de esôfago de porco.

Formulação ([espilantol em mg])	Fluxo ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$ )	<i>Time lag</i> (h)	Coeficiente de permeabilidade ( $10^{-3}\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ )
<b>10% EB</b> (2,37)	9,18 $\pm$ 1,19	0,16 $\pm$ 0,04	3,86 $\pm$ 0,50
<b>20% EB</b> (5,13)	9,52 $\pm$ 1,97	0,25 $\pm$ 0,06	1,69 $\pm$ 0,38
<b>10% EBTC</b> (3,14)	17,70 $\pm$ 4,36	0,58 $\pm$ 0,15	5,17 $\pm$ 1,39

(média  $\pm$  DP; n=6; EB: Extrato bruto; EBTC: Extrato bruto tratado com carvão ativo).

A análise estatística (ANOVA e Tukey-Kramer) dos resultados revelou que não houve diferenças estatisticamente significantes entre as formulações EB10%

e EB20%, mas ambas apresentaram menores valores que o EBTC10% tanto para o fluxo como para o *time lag*. O coeficiente de permeabilidade foi maior para o EBTC10% que para os demais grupos, sendo que o EB20% apresentou menor coeficiente do que o EB10%.

### 5.5 Avaliação da atividade antinociceptiva do bioadesivo de jambu em camundongos

A Figura 20 mostra a porcentagem de animais anestesiados (tempo máximo de 10 s) ao longo do tempo para as formulações estudadas.

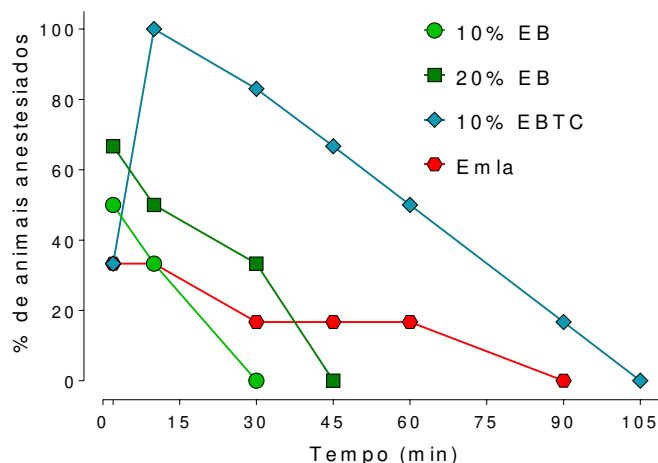


Figura 19 - Porcentagem de animais anestesiados em função do tempo (min).

EB: Extrato bruto; EBTC: Extrato bruto tratado com 4% de carvão ativo; EMLA®: Mistura eutética de lidocaína (2,5%) e prilocaína (2,5%). n=6. Análise estatística: Gehan-Breslow-Wilcoxon.

A análise estatística dos dados (teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon) mostrou que houve diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,0245$ ) entre as curvas. A comparação entre as curvas utilizando o mesmo teste revelou que a formulação

de EBTC 10% foi superior a todas as demais ( $p < 0,05$ ), sendo que não houve diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ) entre estas. A média ( $\pm$  desvio padrão) do tempo de anestesia (somente animais que responderam no tempo máximo) foi de 3,7 ( $\pm$  4,97) min para o EB10%, 12 ( $\pm$ 14,42) min para EB20% e de 49,2 ( $\pm$ 27,64) min para o EBTC10%.

Como esperado, não houve efeito antinociceptivo nos animais tratados com bioadesivos de quitosana sem adição de extrato de jambu uma vez que a quitosana não possui esta propriedade farmacológica (controle negativo – dado não exibido).

## **5.6 Purificação do espilantol por meio de Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC)**

### **5.6.1 Escolha do sistema de solventes**

Os coeficientes de distribuição, calculados de acordo com a equação 2 informada previamente, foram 0,32 para o sistema P, 0,90 para o sistema Q, 1,05 para o sistema R, e 2,08 para o sistema S.

### **5.6.2 Separação do espilantol por meio do CPC**

A condição determinada como ideal foi a que utilizou o sistema de solventes S com velocidade do rotor de 1800 rpm, vazão volumétrica de 10 mL por minuto com coleta de frações de 12 mL cada, pelo período de 150 min. A instrumentação empregada encontra-se na Figura 21.



Figura 20 - Cromatógrafo de Partição Centrífuga utilizado na purificação do espilantol.

Como o espilantol apresenta máximo de absorvência no comprimento de onda 254 nm, este foi o comprimento empregado durante o ensaio. Foi possível observar o pico referente ao espilantol por meio de detector UV presente no CPC conforme cromatograma apresentado na Figura 22.

A possibilidade de ser outro composto com característica de absorvência no mesmo comprimento de onda do espilantol foi descartada posteriormente por CG/EM.

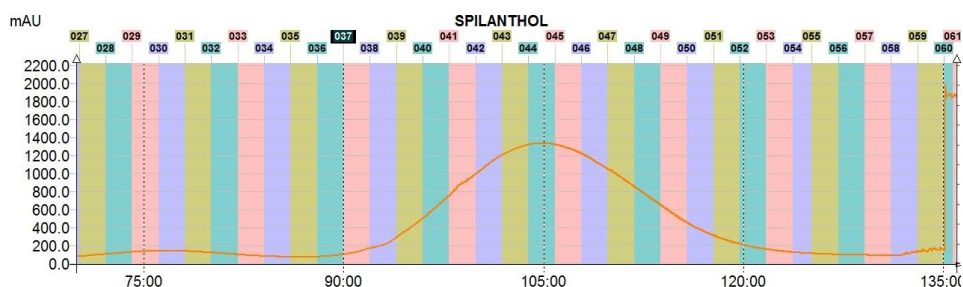


Figura 21 - Cromatograma durante separação por CPC.

Ilustrando a absorvência do espilantol por meio de detector UV na faixa de 254 nm, nas frações coletadas de números 37 a 52.

As frações foram também monitoradas por CCD pela praticidade e agilidade, conforme ilustrado na Figura 23.

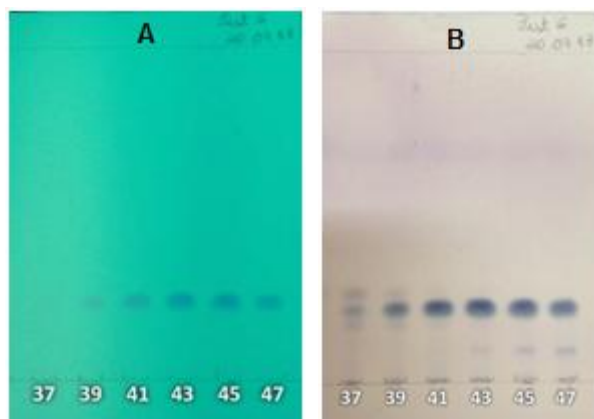


Figura 22 - Cromatogramas em camada delgada de frações obtidas por CPC.

Fase Móvel: n - hexano: acetato de etila 70:30; (v/v). (A) revelação em 254 nm; (B) revelação em p-anisaldeído.

Em razão de suas similaridades observadas por CCD, as frações 41 a 43 foram reunidas e na Figura 24 está apresentado o cromatograma resultante de injeção feita no CG - FID com o objetivo de verificar-se a pureza desta fração reunida, que apresentou pureza de 95,07% por normalização de áreas.

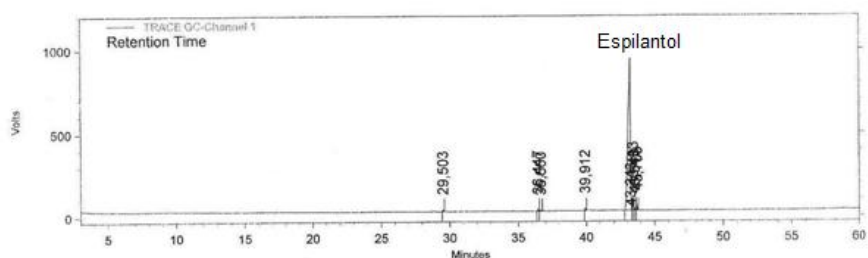


Figura 23 - Cromatograma da fração reunida (41 a 43) obtida por CG-FID.

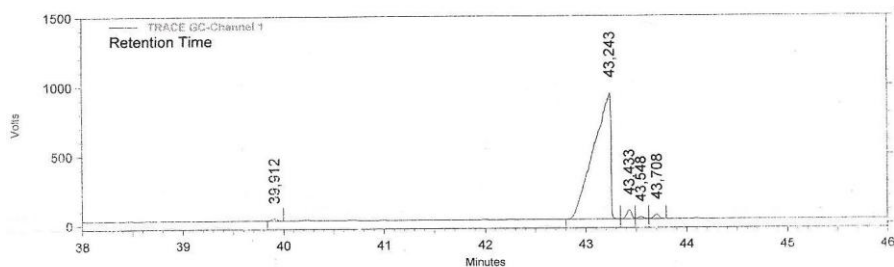


Figura 24 - Cromatograma da Figura 24, expandido entre os tempos de 38 a 46 min.

## **5.7 Construção de curva de analítica do espilantol**

A linearidade foi avaliada através de três curvas analíticas, com seis níveis de concentração que variavam de 1,05 a 52,3  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) foi de 0,9916 com coeficiente de correlação (R) igual a 0,9958 e atende aos critérios mínimos para aceitação estabelecidos pela Resolução nº899 da ANVISA (Brasil, 2003).

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com equações 3 e 4 apresentadas anteriormente e são 0,26  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (limite de detecção) e 0,86  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (limite de quantificação).

## **5.8 Estudo de estabilidade acelerada**

### **5.8.1 Aspecto físico**

Os bioadesivos mantiveram sua integridade física durante todo o período estudado; houve, no entanto escurecimento do bioadesivo tratado com carvão ativo, como pode ser observado na Figura 26. A representação fotográfica é individual, porém os testes foram realizados em triplicata, com concordâncias entre elas.

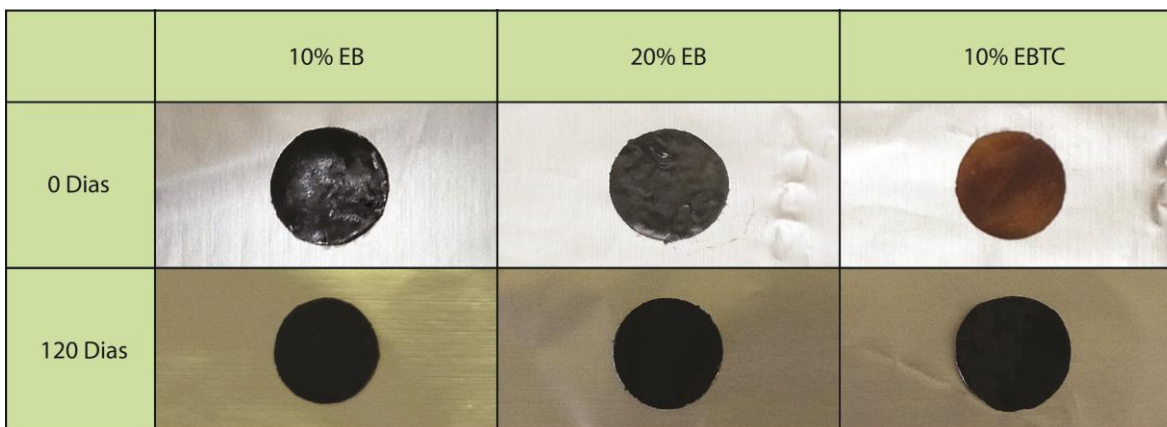


Figura 25 - Ilustração dos bioadesivos empregados no estudo de estabilidade com diferentes porcentagens de extrato bruto e extrato bruto tratado com carvão ativo.

### 5.8.2 Avaliação do pH e do teor de espilantol

Com o objetivo de verificar a compatibilidade do bioadesivo obtido com a mucosa oral, foi realizada a determinação do pH (Tabela 4), que permitiu evidenciar que durante o período de tempo investigado, o pH manteve-se estável, sem alterações significativas. Após 120 dias de armazenamento em estufa à 40 °C não houve degradação significativa do espilantol nas formulações testadas.

Tabela 4 - Avaliação do pH e do teor de espilantol nos bioadesivos de jambu .

Porcentagem e tipo de extrato	pH			Espilantol (mg/g)	
	Tempo em dias			Tempo em dias	
	0	90	120	0	120
<b>10%, EB</b>	5,29 ± 0,03	5,04 ± 0,02	5,44 ± 0,24	18,58 ± 1,92	17,13 ± 0,87
<b>20%, EB</b>	5,09 ± 0,02	5,05 ± 0,04	5,14 ± 0,05	36,76 ± 4,92	35,87 ± 4,02
<b>10%, EBTC</b>	4,93 ± 0,02	4,97 ± 0,13	5,33 ± 0,05	22,32 ± 2,61	22,66 ± 4,12

(n=3) Média ± desvio padrão. EB: Extrato bruto; EBTC: Extrato bruto tratado com carvão ativo (4%).



## **6 Discussão**

### **6.1 Rendimento do extrato bruto etanólico**

Durante o processo de preparação do material vegetal para conseqüente extração, a etapa de secagem é de grande importância, pois visa estabilizar o material vegetal, diminuindo a possibilidade de crescimento bacteriano e atuação enzimática, uma vez que ocorre a perda da água livre durante a secagem. Além disto, a secagem do material agrega facilidade na manipulação durante a extração, tendo em vista a redução do volume a ser trabalhado. Isto permite também a estocagem da planta e facilidade de uso, evitando-se trabalhar com a planta fresca cujo maior volume dificulta o processamento em escala industrial. Já a moagem, tem como objetivo a diminuição do tamanho de partícula em contato com o solvente e aumento da eficiência extrativa.

A escolha do etanol como solvente na produção do extrato de jambu levou em consideração sua segurança, sua menor toxicidade e baixo custo, uma vez que é largamente produzido no país. Além disso, é amplamente utilizado na extração de produtos naturais (Rodrigues et al., 2006; Zhao, 2011).

Outro fator levado em consideração foi a boa estabilidade do espilantol no extrato etanólico, em temperatura ambiente, por no mínimo seis meses. A capacidade extrativa do espilantol também foi maior em misturas hidroalcoólicas contendo mais de 75% de etanol (Bae et al., 2010).

O extrato obtido no presente trabalho apresentou consistência pastosa o que denota a presença de compostos graxos que tendem a dificultar o fracionamento por qualquer técnica empregada. O aumento na presença destes compostos graxos pode ser devido ao metabolismo secundário da planta nas condições de cultivo empregadas, uma vez que o etanol não é um solvente seletivo para esta classe de compostos. Esta ocorrência também foi verificada em outras experimentações com o preparo de extratos etanólicos, em condições

agronômicas experimentais similares no campo experimental do CPQBA, com a espécie *Artemisia annua* L. (Rodrigues et al., 2006).

O rendimento extrativo bruto obtido com o etanol neste trabalho foi de 7,7%  $\pm$  0,49 e está compatível com outros trabalhos encontrados na literatura que utilizaram etanol e método extrativo semelhante (Yadav et al. 2011; Dias et al., 2012).

O espilantol encontra-se distribuído por toda a parte aérea do jambu em concentração variável, sendo que o método extrativo e solventes utilizados influenciam na seletividade e rendimento de extração. O emprego de dióxido de carbono supercrítico, por exemplo, apresenta grande seletividade para o espilantol, resultando em pureza de até 90%. Essa seletividade também pôde ser observada na *Spilanthes americana* (Dias et al., 2012; Cavalcanti, 2008; Stashenko et al., 1996).

## **6.2 Extrato bruto etanólico tratado com carvão ativo**

Carvão ativo, ou carvão ativado, abrange uma gama de substâncias que possuem alto grau de porosidade e uma área superficial em torno de 800 a 1500 m<sup>2</sup>/g (Rodríguez-Reinoso, 2001; Bansal & Goyal, 2005b). Devido a sua ótima capacidade adsorvente, biocompatibilidade e por ser atóxico, é utilizado em diversas áreas, tais como, na remoção de cor, sabor, odor e impurezas da água (Bansal & Goyal, 2005a), no processamento de alimentos (Arslanoglu et al., 2005; Ozsoy & Leeuwen, 2010), na descoloração de xaropes e de algumas bebidas alcoólicas (Laksameethanasana et al., 2012; Duarte et al., 2012). Na fitoquímica, é utilizado para retirada de clorofila ou outros compostos que possam interferir em ensaios colorimétricos e também no isolamento de alguns bioativos (Ou et al., 2007; Peres et al., 2009; Scheepers et al., 2011; Naik et al., 2012).

No presente trabalho, o tratamento com carvão ativo foi efetivo na remoção de pigmentos. A eficiência do tratamento do extrato bruto com carvão ativo na retirada dos pigmentos foi avaliada sob os aspectos de rendimento mássico e teor de espilantol. Tendo em vista que o rendimento mássico do extrato após o tratamento com carvão diminuiu, foi realizado um estudo abrangendo uma faixa variada de carvão empregado entre 2,5 e 10% para avaliar qual tratamento era o mais apropriado em termos de cor, rendimento mássico e teor de espilantol.

O tratamento com 2,5 e 4% de carvão ativo resultou em extratos levemente amarelados, já nos extratos tratados com 6, 8 e 10% de carvão ativo houve completa remoção de pigmentos. O teste com diferentes porcentagens de carvão se faz necessário a fim de se evitar a remoção de compostos de interesse, sendo que a menor quantia efetiva de carvão deve ser utilizada (Vogel, 1996).

Dentre todas as condições testadas, a porcentagem de carvão ideal foi a de 4%, já que mesmo com a diminuição mássica do extrato, houve um aumento relativo no teor de espilantol, pois na somatória dos constituintes totais houve eliminação de grande parte dos pigmentos por este tratamento. Apesar da lavagem do carvão retido na filtração ser feita muitas vezes em processos industriais, optou-se por não realizá-la tendo em vista a possibilidade de arraste dos pigmentos retidos na filtração e, portanto uma ineficácia do processo (Soto, 2008). Esta etapa deverá ser maximizada no futuro, verificando-se se o rendimento pode ser aumentado com a lavagem do carvão retido na filtração.

## **6.3 Preparo do Bioadesivo**

### **6.3.1 Maximização da formulação contendo quitosana e extrato de jambu**

A quitosana é um biopolímero proveniente do exoesqueleto de crustáceos e apesar de sua descoberta ter ocorrido há cerca de 150 anos, somente nas últimas

décadas é que sua importância cresceu de maneira significativa, sendo atualmente fabricada em grande escala por vários países (Kumar et al., 2004; Craveiro, 2004).

A quitosana é biocompatível, inócua e biodegradável, o que lhe confere uma grande variedade de aplicações. Além disso, a quitosana exibe capacidade mucoadesiva na superfície do epitélio bucal, por meio de interações com grupos de carga negativa presentes neste tecido. Estes fatores a tornam candidata ideal no desenvolvimento de formulações para uso bucal e por essa razão foi utilizada como base das formulações desenvolvidas neste trabalho (Morris et al., 2010; Morales & McConville, 2011).

Diante da quantidade utilizada de extrato bruto de jambu na preparação dos bioadesivos, o emprego de um coadjuvante se torna necessário para facilitar a completa incorporação do extrato no gel de quitosana e contribuir com suas propriedades físicas. Para ser adequado ao uso, o bioadesivo deve ser flexível o suficiente para se adaptar bem ao tecido onde for aplicado sem se partir com facilidade (Ammar et al., 2009).

Além disso, alguns coadjuvantes também atuam como promotores de absorção do princípio ativo através da mucosa bucal (Naveen et al., 2011), propriedade esta de grande interesse na anestesia tópica odontológica, uma vez que se busca uma formulação que apresente efeito anestésico efetivo com rápido início de ação (Shin et al., 2003; Shin et al., 2004).

Dentre os coadjuvantes empregados, o propilenoglicol e o Brij também foram utilizados por outros autores com o intuito de aumentar a permeação tópica de anestésicos empregados comumente na prática odontológica (Miller et al., 1993; Shin et al.; 2003). A triacetina e o Transcutol<sup>®</sup> foram utilizados em outras formulações tópicas também com o propósito de facilitar a permeação de substâncias ativas (Naveen et al., 2011; Lane, 2013).

Estes compostos também foram associados ao gel de quitosana na confecção de formulações de liberação transdérmica ou transmucosa de fármacos (Langoth et al., 2006; Ahmed et al., 2007; Rasool et al., 2011; Can et al., 2013; Amasya et al., 2012).

Na avaliação visual, os bioadesivos que continham Brij e triacetina mostraram incompatibilidade com o extrato bruto de jambu e por essa razão foram descartados.

O bioadesivo com propilenoglicol, apesar de apresentar bom aspecto visual, partia-se facilmente quando manipulado, impossibilitando o seu uso. Essa maior friabilidade também foi observada em bioadesivos de quitosana com glicerina (Ammar et al., 2009; Leceta et al., 2013) e pode ter sido favorecida pelo efeito umectante do propilenoglicol somado à grande quantidade de extrato adicionada, o que pode ter resultado em alterações estruturais no bioadesivo (Suyatma et al., 2005; Zivanovic et al., 2005; Kouchak et al., 2014).

A formulação que apresentou os melhores resultados foi a que continha Transcutol<sup>®</sup> como coadjuvante, pois resultou em bioadesivos com bom aspecto visual e de fácil manipulação, sendo este, portanto o coadjuvante utilizado no desenvolvimento dos bioadesivos neste trabalho.

O Transcutol<sup>®</sup> ou etoxidiglicol é utilizado há anos como aditivo em diversas formulações tópicas cosméticas e também pela indústria farmacêutica, sendo incorporado em formulações de fármacos como atenolol e dexametasona (Osborne, 2011).

A atuação do Transcutol<sup>®</sup> como promotor de absorção cutânea está ligada ao poder de hidratação tecidual proporcionado por este composto e também a seu efeito solubilizante, que combinados, beneficiam a permeação do composto ativo através da pele ou mucosa (Ganem – Quintanar et al., 1997; Osborne, 2011; Javadzadeha & Hamishehkar; 2011).

### **6.3.2 Propriedades físicas dos bioadesivos**

A homogeneidade dos bioadesivos pode ser observada através dos parâmetros de espessura e massa (tabela 2) tendo ambos os parâmetros apresentado baixos desvio padrão e coeficiente de variação.

A espessura média dos bioadesivos (0,5 mm) produzidos no presente trabalho foi semelhante à encontrada por Aksungur et al. (2004), que desenvolveram bioadesivo de quitosana 1% com nistatina para o tratamento da mucosite oral. Este parâmetro, no entanto, está diretamente relacionado com o volume da solução de quitosana utilizado na preparação do bioadesivo, bem como na concentração dos aditivos utilizados (Zivanovic et al., 2005; Sebti et al., 2007).

### **6.4 Monitoramento do espilantol por CG/EM**

A cromatografia gasosa acoplada a detector seletivo de massas (CG/EM) é uma ferramenta útil na análise de misturas complexas, uma vez que combina a capacidade separativa da cromatografia gasosa com o detector de massas permitindo a identificação dos íons moleculares e, em alguns casos, a determinação da estrutura molecular de um composto mediante à comparação com uma biblioteca (Heinrich et al., 2004).

Outros autores já utilizaram esta técnica com sucesso na identificação do espilantol durante a investigação da atividade biológica do jambu e por essa razão esta mesma ferramenta foi utilizada neste estudo (Ramsewak et al., 1999; Santos, 2010; Leng et al., 2011; Simas et al., 2013; Costa et al., 2013).

É importante ressaltar que os valores obtidos de área percentual normalizada do espilantol não são necessariamente valores reais, uma vez que nesta etapa do estudo não dispúnhamos de um padrão analítico e entendemos que por se tratar de uma técnica que requer volatilização de todos os componentes da amostra, não há como inferir um valor exato, porém, para fins comparativos entre os tratamentos, a técnica foi bastante útil.

### **6.5 Ensaio de permeação *in vitro* do espilantol a partir dos bioadesivos de jambu através de epitélio de mucosa de esôfago de porco em célula de difusão vertical tipo Franz**

A célula de difusão vertical tipo Franz é comumente utilizada para avaliar a permeação de compostos através da pele ou mucosa (OECD, 2005).

O uso da mucosa de esôfago de porco como barreira neste estudo deve-se às características histológicas semelhantes entre este tecido e a mucosa bucal, tais como epitélio escamoso estratificado e não queratinizado. A maior área de superfície e o tecido tipicamente intacto também são fatores que favorecem sua utilização e manipulação durante a montagem da célula de Franz (Dias del Consuelo et al., 2005).

A permeação *in vitro* do espilantol já foi verificada por outros autores (Boonen et al., 2010a; Boonen et al., 2010b) em pele humana e em mucosa bucal de porco utilizando célula de difusão vertical tipo Franz. Os autores observaram influência do fluido receptor e também da composição da formulação, verificando que das formulações testadas as melhores foram as que continham um promotor de absorção (propilenoglicol). Segundo Spiegeleer et al. (2013) o espilantol também atua como promotor de absorção de maneira dose dependente.

Desta forma no presente trabalho optou-se por avaliar somente bioadesivos contendo promotor de absorção (transcutol).

No presente estudo, as três formulações permearam a mucosa do esôfago de porco, sendo que a que apresentou maior permeação de maneira estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) foi a que continha extrato tratado com carvão ativo.

A solubilidade do espilantol em água determinada por Tetko *et al.* (2001), apresentou o valor de 18,63 mg/L, o que, de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010) é um valor classificado como sendo de uma substância muito pouco solúvel. Este parâmetro de literatura nos direcionou para o uso de um álcool (metanol) como aditivo, para permitir a liberação do espilantol no modelo empregado *in vitro*, prática esta que foi também realizada por Caon & Simões (2011), neste caso em específico empregando etanol 50% em tampão com saliva simulada.

Nos outros parâmetros avaliados (fluxo, *time lag* e coeficiente de permeabilidade), o extrato tratado com 4% de carvão ativo foi superior aos demais tratamentos. Sugere-se que esta diferença possa ser devido ao fato deste extrato ter menos pigmentos ou outros compostos extraídos pelo carvão e que porventura poderiam interferir com a permeabilidade do espilantol através da mucosa, por agirem de forma antagônica. Este fato é corroborado por Boonen *et al.* (2010b) que observaram um *time lag* maior do espilantol quando compararam o extrato etanólico de jambu em relação a formulações aditivadas com propilenoglicol e também com relação a formulações comerciais, o que mostra que há uma correlação diretamente baseada na composição da formulação. Para efetivamente concluirmos esta hipótese, teríamos de testar diferentes agentes de permeabilidade neste ensaio, como por exemplo o Transcutol® em relação ao propilenoglicol.



## 6.6 Avaliação da atividade antinociceptiva do bioadesivo de jambu em camundongos

O teste de *tail flick* foi empregado por de Araujo et al. (2010) na avaliação da atividade antinociceptiva de filme tópicos contendo benzocaína, em ratos e foi possível através desta técnica mensurar o efeito antinociceptivo dos diferentes tratamentos. Esta mesma metodologia também foi utilizada por outros autores na avaliação da atividade antinociceptiva de diferentes formulações tópicas (Shin et al., 2004; Kolesnikov & Soritsa, 2008; Arrau et al., 2011) e por esta razão este foi o método adotado na avaliação das formulações desenvolvidas neste trabalho.

Além disso, não existe, até o presente momento, um modelo em animais para avaliar a eficácia de formulações tópicas em mucosas.

O efeito antinociceptivo do jambu no modelo de *tail flick* já foi relatado por Chakraborty et al. (2004), após administração intraperitoneal em ratos albinos do extrato aquoso nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e também por Barman et al. (2009) após administração oral a ratos albinos de extrato etanólico das folhas do jambu na dose de 100 mg/kg.

No presente trabalho, a atividade antinociceptiva do bioadesivo com 10% de extrato tratado com carvão ativo (4%) se mostrou estatisticamente superior aos demais, proporcionando maior tempo de anestesia, inclusive sendo superior ao controle positivo (EMLA<sup>®</sup>). É interessante observar que este efeito antinociceptivo foi obtido apenas com dois min de aplicação do bioadesivo na cauda do animal, mostrando a rapidez da ação pretendida na metodologia empregada.

Para confirmar os resultados obtidos em modelo animal, será realizado um estudo em humanos em projeto futuro, onde demais parâmetros importantes serão avaliados.

## **6.7 Purificação do espilantol por meio de Cromatografia de Partição Centrífuga (CPC)**

A cromatografia por partição centrífuga é caracterizada pela utilização de duas fases líquidas imiscíveis, sem o emprego de qualquer suporte sólido. A fase estacionária é mantida por um campo centrífugo, arranjado em canais ou celas, enquanto a fase móvel é bombeada através dele (Michel et al., 2014).

Existe uma grande diversidade de sistemas de solventes disponíveis para o CPC, e a escolha do mais adequado para a separação de um composto é de grande importância, já que esta técnica se baseia no coeficiente de partição da substância entre as duas fases de solventes utilizadas (Berthod, 2002).

O CPC tem sido muito utilizado no isolamento e purificação de compostos bioativos provenientes de produtos naturais. Uma das vantagens apresentadas é que, teoricamente, há a possibilidade de recuperação total da amostra ao final do experimento, situação que não ocorre nas técnicas convencionais, uma vez que compostos de interesse podem ficar retidos na fase estacionária da coluna (Yoon et al., 2010).

O CPC permite a cromatografia com utilização de extrato bruto ou de frações semi-purificadas em quantias que variam de miligramas a gramas com baixo consumo de solventes. Desta maneira, é possível isolar compostos para produção de padrões analíticos e para avaliações farmacológicas e biológicas de plantas de maneira econômica e ecológica (Marston & Hostettmann, 2006).

O sistema de solventes testado no presente trabalho que baseou-se nos experimentos conduzidos por Mbeunkui et al. (2011), que isolaram algumas alquilamidas de extratos das flores de jambu, dentre elas o espilantol, utilizando o CPC.

Para uma separação eficiente, recomenda-se que o coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) seja o mais próximo a um ou esteja entre 0,5 e 2, e por esta razão, os testes iniciais foram realizados utilizando o sistema R de solventes, pois este apresentou valor de  $K_d$  próximo ao ideal (Hu & Pan, 2012).

No entanto, ao utilizar este sistema, o espilantol foi coletado muito prematuramente e assim não houve uma separação satisfatória dele com os demais constituintes da amostra. Para contornar este problema, foram feitos testes com o sistema S de solventes, que se mostrou mais adequado e foi, portanto, o escolhido para dar continuidade no isolamento do espilantol.

Utilizando este sistema de solventes o espilantol foi isolado com grau de pureza de 95%, determinado por CG-FID, que foi o mesmo obtido por Mbeunkui et al. (2011), que utilizaram como sistema de solventes heptano: acetato de etila: metanol: água na proporção 3: 2: 3: 2, e tempo de corrida de 5 horas.

O valor de rendimento de espilantol, contudo, foi inferior ao obtido por Mbeunkui et al. (2011), e isso se deve provavelmente à diferença na composição do extrato utilizado. Mbeunkui et al. utilizaram flores maceradas por três dias em metanol enquanto o extrato utilizado no presente trabalho foi preparado com toda a parte aérea em agitação mecânica por 4 horas e meia e tendo como solvente, etanol. O espilantol também está presente em maior teor nas flores de jambu (Santos, 2010; Dias et al., 2012).

É interessante observar, porém, que o mesmo grau de pureza do espilantol foi obtido com a metade do tempo de corrida cromatográfica, e conseqüentemente com menor gasto de solventes. A maximização do processo para melhoria de rendimento poderá ser feita alterando-se algumas condições cromatográficas na prática, como descrito em literatura (Hu & Pan, 2012).

## **6.8 Estudo de estabilidade acelerada**

O propósito do estudo de estabilidade acelerada é, por meio de condições específicas de armazenamento, acelerar a degradação de um produto farmacêutico. Os dados obtidos por meio deste estudo permitem uma avaliação dos efeitos químicos e físicos prolongados em condições não aceleradas, permitindo estabelecer um prazo de validade e recomendações de armazenamento (Brasil, 2005).

No presente estudo, o armazenamento em estufa seca à 40 °C por 120 dias não resultou em alterações significativas no pH ou no teor do espilantol dos bioadesivos. A integridade física dos bioadesivos também foi mantida durante todo o experimento. Estes fatores são positivos e denotam boa estabilidade da formulação.

A alteração observada na coloração (de marrom claro para marrom escuro) do bioadesivo tratado com carvão ativo (4%) pode ser devida a combinação dos fatores tempo transcorrido e temperatura, durante o estudo, porém não resultou em uma diminuição do teor de espilantol e nem alteração do pH. De acordo com Singh et al. (2008), variações de coloração não são consideradas significativas em formulações fitoterápicas.

O pH observado nos bioadesivos é um pouco inferior ao pH bucal, que normalmente varia entre 6,2 e 7,0. Esta diferença, porém, não implica em uma contraindicação, já que a saliva possui excelente capacidade de tamponamento e este parâmetro pode ser corrigido, se for necessário (Pather et al., 2008).

## **6.9 Perspectivas futuras**

A partir dos resultados deste trabalho será delineado um estudo em humanos (Fase I), que após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, avaliará a eficácia anestésica da formulação. Será realizada, ainda, avaliação organoléptica, e se necessário, a adição de flavorizantes, com o intuito de tornar agradável ao paladar humano e conseqüentemente melhor aceitação.

## 7 Conclusão

Através deste estudo, foi possível desenvolver e avaliar a eficácia de bioadesivos contendo extrato bruto de *Spilanthes acmella* L. Murray.

Para a obtenção do extrato etanólico foram empregadas metodologias fitoquímicas clássicas. Uma vez que o espilantol manteve-se presente após as etapas de secagem e moagem em quantidades apropriadas para este estudo, conclui-se que a molécula do espilantol é suficientemente estável a temperatura de 40 °C.

Diante da média de rendimento mássico extrativo citado em literatura, conclui-se que a porcentagem extrativa de 7,7% foi boa, além do que se trata de uma metodologia segura, simples e barata, levando-se em conta a metodologia proposta (maceração) e o solvente de escolha, neste caso o etanol.

Dentre todas as condições testadas, a porcentagem de carvão ideal foi a de 4%, já que mesmo com a diminuição mássica do extrato, houve um aumento relativo no teor de espilantol, pois na somatória dos constituintes totais houve eliminação de grande parte dos pigmentos por este tratamento.

Os bioadesivos que apresentaram melhor aspecto visual foram os obtidos com a incorporação de propilenoglicol e Transcutol<sup>®</sup>, entretanto o bioadesivo com Transcutol<sup>®</sup> se mostrou muito mais resistente à manipulação. As medidas de espessura e massa demonstraram homogeneidade na produção do bioadesivo.

Na célula de difusão de Franz e no ensaio de *tail flick*, a formulação contendo extrato bruto de jambu tratado com carvão ativo (4%) foi a que apresentou maior coeficiente de permeabilidade do espilantol e proporcionou maior antinocicepção, respectivamente.

A técnica de cromatografia gasosa foi bastante útil para determinação comparativa do teor de espilantol nos diferentes tratamentos. Como esta técnica

requer volatilização dos constituintes da amostra, a área relativa do espilantol pode não ter sido exata, uma vez que nem todos os componentes podem ter sido detectados. Como não dispúnhamos de um padrão analítico, foi a técnica mais apropriada para o controle de qualidade.

## Referências

Ahmed SM, Ibrahim MA, Sarhan HA, Amin MA. Formulation and characterization of biodegradable chitosan films for topical application of terbinafine HCl. Bull. Pharm. Sci. 2007; 30(2):111-29.

Aksungur P, Sungur A, Unal S, Iskit AB, Squier CA, Senel S. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. J Control Release. 2004; 98:269-79.

Al-Melh MA, Andersson L. Comparison of topical anesthetics (EMLA/Oraqix vs. benzocaine) on pain experienced during palatal needle injection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103:e16-e20.

Amasya G, Karavana SY, Sem T, Baloglu E, Tarimci N. Bioadhesive and mechanical properties of triamcinolone acetonide buccal gels. Turk J Pharm Sci. 2012; 9(1):1-12.

Ammar HO, Ghorab M, El-Nahhas AS, Kameli R. Polymeric matrix system for prolonged delivery of tramadol hydrochloride, part I: physicochemical evaluation. AAPS PharmSciTech. 2009; 10(1):7-20.

Arrau S, Delporte C, Cartagena C, Rodriguez-Diaz M, Gonzalez P, Silva X. Antinociceptive activity of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract, quillaic acid and derivatives in mice. J Ethnopharmacol. 2011; 133(1) 164-67.

Arslanoglu FN, Kar F, Arskan N. Adsorption of dark coloured compounds from peach pulp by using granular activated carbon. J Food Eng. 2005; 68: 409-17.

Artaria C, Maramaldi G, Bonfigli A, Rigano L, Appendino G. Lifting properties of the alkamide fraction from the fruit husks of *Zanthoxylum bungeanum*. Int J Cosmet Sci. 2011; 33: 328-33.

AstraZeneca. Product Monograph for EMLA Cream and EMLA Patch. 2010

Bae S, Ehrmann BM, Etefagh KA, Cech NA. A validated liquid chromatography-electrospray ionization – mass spectrometry method for quantification of spilanthal in *Spilanthus acmella* (L.) Murr. *Phytochem. Anal.* 2010; 21: 438-43.

Bagesund M, Tabrizi P. Lidocaine 20% patch vs lidocaine 5% gel for topical anaesthesia of oral mucosa. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18: 452–460.

Bansal RC, Goyal M. Activated carbon and its surface structure. In: Bansal RC, Goyal M, autores. *Activated carbon adsorption*. 1. ed. CRC press, 2005a. p.1-65.

Bansal RC, Goyal M. Activated carbon adsorption applications. In: Bansal RC, Goyal M, autores. *Activated carbon adsorption*. 1. ed. CRC press, 2005b. p.243-96.

Barman S, Sahu N, Deka S, Dutta S, Das S. Anti-inflammatory and analgesic activity of leaves of *Spilanthus acmella* (ELSA) in experimental animal models. *Pharmacology online.* 2009; 1: 1027-34.

Baruah RN, Leclercq PA. Characterization of the essential oil from flower heads of *Spilanthus acmella*. *J Essent Oil Res.* 1993; 5(6) 693-5.

Berthod A. Fundamentals of countercurrent chromatography. In: Berthod A. (editor). *Countercurrent Chromatography The Support-Free Liquid Stationary Phase*. Elsevier: 2002; volume 38.

Bhalla J, Meechan JG, Lawrence HP, Grad HA, Haas D. Effect of Time on Clinical Efficacy of Topical Anesthesia. *Anesth Prog.* 2009; 56:36-41.

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



Boonem J, Baert B, Burvenich C, Blondeel P, Saeger SD, Spiegeleer BD. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behavior of its main bio-active spilanthol. J Pharm Biomed Anal. 2010b; 53: 243-9.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União. 2003.

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.

Can AS, Erdal MS, Gungor S, Ozsoy Y. Optimization and characterization of chitosan films for transdermal delivery of ondansetron. Molecules. 2013; 18(5): 5455-71.

Caon, T; Simões, C. M. O. Effect of Freezing and Type of Mucosa on Ex Vivo Drug Permeability Parameters. AAPS PharmSciTech. 2011. DOI: 10.1208/s12249-011-9621-2

Catterall WA, Mackie K. Anestésicos Locais. In: Brunton LL (organizador). As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12. ed. Porto Alegre: AMGH. 2012; p.575.

Cavalcanti VMS. Extração de espilantol de *Spilanthes acmela* var oleraceae com dióxido de carbono supercrítico [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química; 2008.

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.

Chakraborty, A, Devi RKB, Sanjebam, 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; 42(5):277-9.

Cilia-Lopez VG, Juarez-Flores BI, Aguirre-Rivera JR, Reyes-Aguero JA. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. Pharm Biol. 2010; 48(2): 195-200.

Costa SS, Arumugam D, Gariepy Y, Rocha SCS, Raghavan V. Spilanthol extraction using microwave: calibration curve for gas chromatography. Chem Eng Trans. 2013; 32: 1783-88.

Craveiro AA, Craveiro AC, Queiroz DC. Quitosana a fibra do futuro. 2 ed. Fortaleza: Padetec; 2004.

Craveiro AA. Óleos essenciais do nordeste do Brasil: do laboratório ao mercado. In: Dellacassa E. (organizador). Normalización de productos naturales obtenidos de espécies de La flora aromática latinoamericana: proyecto CYTED IV.20. Porto Alegre: ediPUCRS; 2010. p.85.

De Araujo DR, Padula C, Cereda CM, Tófoli GR, Brito RB, Paula E et al. Bioadhesive films containing benzocaine: correlation between in vitro permeation and in vivo local anesthetic effect. Pharm Res. 2010; 27, 1677-86.

Demarne F; Passaro G. Pedido de registro de patente nº PI0506449-0 A2 em 04/01/2005 [acesso 2011 ago 15]. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br>.

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

Diaz Del Consuelo I, Pizzolato GP, Falson F, Guy R H, Jacques Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. J Pharm Sci. 2005; 94: 2777-88.

Di-Stasi LC, Hiruma-Lima CA, Santos CM, Guimarães EM. Asterales medicinais In: Di-Stasi LC, Hiruma-Lima CL. Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica. 2. Ed. São Paulo: Editora Unesp; 2002. p. 472-3.

Donaldson D, Meechan JG. A comparison of the effects of EMLA® cream and topical 5% lidocaine on discomfort during gingival probing. Anesth Prog. 1995; 42: 7-10.

Duarte FC, Cardoso MG, Pinheiro ACM, Santiago WD, Carvalho LL. Physicochemical and sensory changes in aged sugarcane spirit submitted to filtering with activated carbon filter. Food Sci. Technol. 2012; 32(3): 471-77.

Dubey S, Maity S, Singh M, Saraf SA, Saha S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. Adv Pharmacol Sci. 2013; Epub 2013 Nov 26.

Ehrenstrom Reiz GME, Reiz SLA. EMLA - a Eutectic Mixture of Local Anaesthetics for Topical Anaesthesia. Acta Anaesth Scand. 1982; 26: 596-8.

Etat pur. França. [acesso 2014 janeiro]. Disponível em: <http://www.etatpur.com/index.php/actifs-purs-rides-expression-acmella.html>

Farmacopéia Brasileira. 5 ed. Ed. Fiocruz; 2010; v. 1, p. 56.

FDA. Food and Drug Administration. Benzocaine Topical Products: Sprays, Gels and Liquids - Risk of Methemoglobinemia. Safety report. Disponível em: <http://www.fda.gov/safety/medwatch/safetyinformation/safetyalertsforhumanmedicinalproducts/ucm250264.htm>

Filho VC & Yunes RA. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Quim Nova. 1998; 21(1): 99-105.

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

Fosquiera EC, Andrade LC, Rotta IW, Chaves SR, Uchida DT, Gazim ZC et al. Effectiveness of *Acmella oleracea* for topical anesthesia on buccal mucosa. International Association for Dental Research, 2012 jun 20-23; Foz do Iguaçu, Paraná: IADR [acesso em setembro 2013]. Disponível em: <https://iadr.confex.com/iadr/2012rio/webprogram/Paper160614.html>.

Franz-Montan M, Paula E, Groppo FC, Silva ALR, Ranali J, Volpato MC. Liposomal delivery system for topical anaesthesia of the palatal mucosa. Brit J Oral Max Surg. 2012, 50:60-4.

Franz-Montan M, Ranali J, Ramacciato JC, Andrade ED, Volpato MC, Groppo FC. Ulceration of gingival mucosa after topical application of EMLA: report of four cases. Br Dent J. 2008; 204: 133-4.

Fukayama H, Suzuki N, Umino M. Comparison of topical anesthesia of 20% benzocaine and 60% lidocaine gel. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94:157-61.

Ganem-Quintanar A, Lafforgue C, Falson-Rieg F, Buri P. Evaluation of the transepidermal permeation of diethylene glycol monoethyl ether and skin water loss. Int J Pharm. 1997; 147: 165-71.

Gattefossé. França. [acesso 2014 janeiro]. Disponível em: [www.gattefosse.com](http://www.gattefosse.com)

Gordon D, Heimberg RG, Tellez M, Ismail AI. A critical review of approaches to the treatment of dental anxiety in adults. *J Anxiety Disord.* 2013; 27:365-378.

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.

Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy.* Elsevier, 2004. 1 ed. p. 115-6.

Herdevall BM, Klinge B, Persson L, Huledal G, Abdel-Rehim M. Plasma levels of lidocaine, o-toluidine, and prilocaine after application of 8,5 g Oraqix<sup>®</sup> in patients with generalized periodontitis: effect on blood metemoglobin and tolerability. *Acta Odontol Scan.* 2003; 61:230-4.

Herdy G V, Carvalho AP. Ação do espilantol (extraído do jambu) sobre a atividade elétrica do coração do coelho. *Eletrocardiograma experimental.* *Arq Bras Cardiol.* 1984; 43(5): 315-20.

Herdy G V, Carvalho AP. Ação do espilantol (extraído do jambu) sobre o potencial de ação. *Registros elétricos em tira atrial.* *Arq Bras Cardiol.* 1984; 43(6): 423-8.

Haridas RP. Horace Wells demonstration of nitrous oxide in Boston. *Anesthesiology.* 2013; 119: 1014-22.

Hmud R, Walsh LJ. Dental Anxiety: causes, complications and management approaches. *Journal of minimal intervention in dentistry.* 2009; 2(1): 67-78.

Holst A, Evers H. Experimental studies of new topical anaesthetic on the oral mucosa. *Swed Dent J.* 1985; 9(5): 185-91.

Hu R, Pan Y. Recent trends in counter-current chromatography. *Trend Anal Chem.* 2012; 40: 15-27.

Human and Kind. Irlanda. [acesso 2014 janeiro]. Disponível em: <http://www.humanandkind.com/skin-shop/all-in-one-anti-ageing-cream/>

Jasmin L, Wu MV, Ohara PT. Gaba puts a stop to pain. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2004.3 (6): 487-505.

Javadzadeha Y, Hamishehkar H. Enhancing percutaneous delivery of methotrexate using different types of surfactants. *Colloids Surf. B.* 2011; 82: 422-6.

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.

Kolesnikov Y, Soritsa D. Analgesic synergy between topical opioids and topical non-steroidal anti-inflammatory drugs in the mouse model of thermal pain. *Eur J Pharmacol.* 2008; 579: 126-33.

Kouchak M, Ameri A, Naseri B, Boldaji SK. Chitosan and polyvinyl alcohol composite films containing nitrofurazone: preparation and evaluation. *Iran J Basic Med Sci.* 2014; 17:14-20.

Kumar MN, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem Rev.* 2004; 104(12): 6017-84.

Laksameethanasan P, Somla N, Janprem S, Phochuen N. Clarification of sugarcane juice for syrup production. *Procedia Engineering.* 2012; 32: 141-7.

Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* 2013; 447:12-21.

Langoth N, Kahlbacher H, Schoffmann G, Schmerold I, Schuc M, Franz S et al. Thiolated chitosans: design and in vivo evaluation of a mucoadhesive buccal peptide drug delivery system. *Pharm Res.* 2006; 23(3):573-9.

Leceta I, Guerrero P, Caba K. Functional properties of chitosan based films. *Carbohydr Polym.* 2013; 93: 339-346.

Lemos TLG, Pessoa ODL, Matos FJA, Alencar JW, Craveiro AA. The essential oil of *Spilanthes acmella* Murr. *J Essent Oil Res.* 1991; 3(5): 369-370.

Leng TC, Ping NS, Lim BP, Keng CL. Detection of bioactives compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various in vitro culture products. *J Meds Plants Res.* 2011; 5(3): 371-8.

Ley JP, Krammer G, Looft 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.

Lopez-Valverde A, De Vicente J, Cutando A. The surgeons Halsted and Hall, cocaine and the discovery of dental anaesthesia by nerve blocking. *Br Dent J.* 2011; 211(10): 458-87.

Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.* 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda; 2008. p. 113.

Malamed SF. *Manual de anestesia local.* 5. Ed. São Paulo: Elsevier; 2004. p.3-26.

Margraff R. In: Foucault A (editor), *Centrifugal partition chromatography (chromatography science series).* 1994; New York; 68: 331-350. Apud Berthod A. *Fundamentals of countercurrent chromatography.* In: Berthod A. (editor). *Countercurrent Chromatography The Support-Free Liquid Stationary Phase.* Elsevier: 2002; volume 38.

Marston A, Hostettmann K. Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *J Chromatogr A.* 2006; 1112: 181-194.

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. 2011; 879: 1886-92.

McMillan AS, Walshaw D, Meechan JG. The efficacy of EMLA® and 5% lignocaine gel for anaesthesia of human gingival mucosa. Br J Oral Maxillofac Surg. 2000; 38: 58-61.

Medeiros LA, Ramiro FMS, Lima CAA, Souza LMA, Fortes TMV, Groppo FC. Avaliação do grau de ansiedade dos pacientes antes de cirurgias orais menores. Rev Odontol UNESP. 2013; 42(5): 357-63.

Meechan JG. Intra-oral topical anaesthetics: a review. J Dent. 2000; 28: 3-14.

Michel T, Destandau E, Elfakir C. New advances in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography: focus on coupling strategy. Anal Bioanal Chem. 2014; 406(4): 957-69.

Miller KJ, Rao YK, Goodwin SR, Westermann-Clark GB, Shah DO. Solubility and in vitro percutaneous absorption of tetracaine from solvents of propylene glycol and saline. Int J Pharm. 1993; 98: 101-11.

Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. Eur J Pharm Biopharm. 2011; 77: 187-199.

Moreira VM, Maia JGS, 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.

Morris GA, Kök MS, Harding SE, Adams GG. Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan. Biotechnol Gen Eng Rev. 2010; 27: 257-84.

Naik AD, Menegatti S, Reese HR, Gurgel PV, Carbonell RG. Process for purification of monoclonal antibody expressed in transgenic Lemna plant extract



using dextran-coated charcoal and hexamer peptide affinity resin. J Chromatogr A. 2012; 1260: 61-6.

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

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

Natura. Brasil. [acesso janeiro 2014]. Disponível em: [http://www2.natura.net/Web/Br/Foryou/Hotsites/spilol\\_fps15/src/index\\_cf.asp](http://www2.natura.net/Web/Br/Foryou/Hotsites/spilol_fps15/src/index_cf.asp)

Naveen C, Kumar YK, Rao PV, Rao TR. Chemical enhancer in buccal and sublingual delivery. Int J Pharm Sci Nanotech. 2011; 4(1): 1307-19.

Nayak R, Sudha P. Evaluation of three topical anesthetic agents against pain: a clinical study. Indian J Dent Res. 2006; 17(4): 155-160.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochim. Biophys. Acta. 2013; 1830: 3670-95.

Nigrinis LSO, Olarte J, Olarte EM. Estudio fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las flores de *Spilanthes americana* (mutis). Rev Colomb Cienc Quim Farm. 1986; 16: 3-10.

Nomura ECO, Rodrigues MRA, Silva CF, Hamm LA, Nascimento AM, Souza LM et al. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen in mice. J Ethnopharmacol. 2013; 150(2): 583-9.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Test guideline 428: Skin absorption: in vitro method. 2004. OECD, Paris.

Ogle OE, Mahjoubi G. Local anesthesia: agents, techniques and complications. Dent Clin N Am. 2012; 56: 133-148.

Oliveira CJ & Araujo TL. Plantas medicinais: uso e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. REE. 2007; 9(1): 93-195. [acesso 2013 out 25]. Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/revista/>.

Oosterink FMD, Jongh A, Aartman IHA. Negative events and their potential risk of precipitating pathological forms of dental anxiety. J Anxiety Disord. 2009; 23: 451-457.

Osborne DW. Diethylene glycol monoethyl ether: an emerging solvent in topical dermatology products. J Cosmet Dermatol. 2011; 10: 324-29.

Ou S, Luo Y, Xue F, Huang C, Zhang N, Liu Z. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysate from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/anion macroporous resin exchange chromatography. J Food Eng. 2007; 78: 1298-1304.

Ozsoy HD, Leeuwen JHV. Removal of color from fruit candy waste by activated carbon adsorption. J Food Eng. 2010; 101: 106-12.

Pandey V, Chopra M, Agrawal V. In vitro isolation and characterization of biolarvicidal compounds from micropropagated plants of *Spilanthes acmella*. Parasitol Res. 2011; 108(2): 297-304.

Parirokh M, Sadegui AS, Nakhaee N, Pardakhty A, Abbott PV, Yosefi MH. Effect of topical anesthesia on pain during infiltration injection and success of anesthesia for maxillary central incisors. J Endod. 2012; 38(12): 1553-6.

Paschos E, Huth KC, Benz C, Reeka-Bardschmidt, Hickel R. Efficacy of intraoral topical anesthetics in children. J Dent. 2006; 34: 398-404.

Pather SI, Rathbone MJ, Senel S. Oral transmucosal drug delivery. In: Rathbone MJ, Hardgraft J, Roberts MS, Lane ME, editores. Modified- release drug delivery technology. 2. ed. CRC Press; 2008: 53-73.

Penski RM. Dentists and Anesthesia: historical and Contemporary Perspectives. *Anesth Prog.* 1993; 40: 1-13.

Peres RL, Moraes SCS, Carvalho CA, Nascimento PC, Carvalho LM, Silva MB et al. *Achillea millefolium* – asteraceae: estudo fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*Colletotrichum musae*). *REF*; 2009; 6(3):81-93.

Prachayasittikul S, Suphamong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules*; 2009; 14: 859-67.

Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: a review. *Excli J.* 2013; 12: 291:312.

Ramsewak RS, Erickson AJ, Nair MG. Bioactive N–isobutylamides from the flowers buds of *Spilanthes acmella*. *Phytochem.* 1999; 51: 729-732.

Rani SA, Murty SU. Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. *AJBR.* 2006; 9:67-9.

Rasool BKA, Aziz US, Sarheed O, Rasool AAA. Design and evaluation of a bioadhesive film for transdermal delivery of propranolol hydrochloride. *Acta Pharm.* 2011; 61:271-82.

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

Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB, Gutiérrez MDC. Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). J Ethnopharmacol. 2007; 110:364-367.

Rishton GM. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. Am J Cardiol. 2008; 101(1): 43D-49D.

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.

Rodriguez-Reinoso F. Activated carbon and adsorption. In: Buschow KHJ, Cahn R, Flemings M, Ilshner B, Kramer E, Mahajan S, editores. Encyclopedia of materials: science and technology. Elsevier; 2001. p. 22-34.

Santos DS. Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para determinação do espilantol em *Spilanthes acmella* (L.) Murray, Sergipe [dissertação]. Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Savadi RV, Yadav R, Yadav N. Study on immunomodulatory activity of ethanolic extract of *Spilanthes acmella* Murr. leaves. Indian J Nat Prod Resour. 2010; 1(2): 204-7.

Scheepers JC, Malan SF, Du Preez JL, Dyk SV. The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis of ultraviolet (UV) irradiated chlorophyll a and secondary plant compounds. Afr J Biothechnol. 2011; 10(74): 16976-85.

Sebti I, Chollet E, Degraeve P, Noel C, Peyrol E. Water Sensitivity, Antimicrobial, and Physicochemical Analyses of Edible Films Based on HPMC and/or Chitosan. J Agric Food Chem. 2007; 55: 693-99.

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; 18(13): 1161-9.

Shin SC, Cho CW, Yang KH. Development of lidocaine gels for enhanced local anesthesia action. *Int J Pharm*. 2004; 287: 73-8.

Shin SC, Lee JW, Yang KH, Lee CH. Preparation and evaluation of bioadhesive benzocaine gels for enhanced local anesthetic effects. *Int J Pharm*. 2003; 260: 77-81.

Simas NK, Dellamora EC, Schripsema J, Lage CLZ, Oliveira Filho AM, Wessjohann L et al. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. *Phytochem Lett*. 2013; 6: 67-72.

Singh MV, Dias LO, Baldini NLF, Silveira D, Zago R. Desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da estabilidade de gel com extrato aquoso de camomila para uso bucal. *Rev Bras Farm*. 2008; 89(2): 134-8.

Siqueira AMP, Oliveira PC, Shcaira VRL, Ambrosano GMB, Ranali J, Volpato MC. Relação entre ansiedade e dor em anestesia local e procedimentos periodontais. *Rev Odontol UNESP*. 2006; 35(2): 171-74.

Skoog DA, Holler FJ, West DM et al. *Fundamentos de química analítica*. 8 ed. Thomson Learning; 2006. p. 199-203.

Soto ML, Moure A, Dominguez H, Parajo JC. Charcoal adsorption of phenolic compounds present in distilled grape pomace. *J Food Eng*. 2008; 84:156-63.

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-

diynoic acid isobutylamide, demonstrate in vitro and in vivo antimalarial activity. *Phytother Res.* 2011; 25(7): 1098-1101.

Spiegeleer BD, Boonen J, Malysheva SV, Mavungu JDD, Saeger SD, Roche N et al. Skin penetration enhancing properties of the plant n-alkylamide spilanthol. *J Ethnopharmacol.* 2013; 148: 117-125.

Stashenko EE, Puertas MA, Combariza MY. Volatile by secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. *J Chromatogr A.* 1996; 752:223-32.

Suyatma NE, Tighzert L, Copinet A. Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 3950-57.

Taani DQ, El-Qaderi SS, Abu-Alhaji ESJ. Dental Anxiety in children and its relationship to dental caries and gingival condition. *Int J Dent Hygiene.* 2005; 3: 83-87.

Tetko IV, Tanchuk VY, Kasheva TN, Villa AEP. Estimation of aqueous solubility of chemical compounds using e-state indices. *J Chem Inf Comput Sci.* 2001; 41: 1488-93.

Trapp L, Will J. Acquired methemoglobinemia revisited. *Dent Clin North Am.* 2010; 54: 665-675.

Vickers ER, Marzbani N, Gerzina TM, McLean C, Punnia-Moorthy A, Mather L. Pharmacokinetics of EMLA cream 5% application to oral mucosa. *Anesth Prog* 1997; 44:32-37.

Vika M, Skaret E, Raadal M, Ost LG, Kvale G. Fear of blood, injury, and injections, and its relationship to dental anxiety and probability of avoiding dental treatment among 18-year-olds in Norway. *Int J Paediatr Dent.* 2008; 18(3): 163-69.

- Vogel AI. Textbook of practical organic chemistry. 5. ed. Prentice Hall; 1996. p. 140.
- Voipio HM, Baneux P, Gomez de Segura IA, Hau J, Wolfensohn S: Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. Lab Anim. 2008, 42(1): 1-11.
- Wijk AJ, Hoogstraten J. Anxiet and pain during dental injections. J Dent. 2009; 37: 700-4.
- Wongsawatkul O, Prachayasittikul S, Isarankura-Na-Ayudhya C, Satayavivad J, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. Int J Mol Sci 2008; 9(12): 2724-44.
- Wu, LC, Fan NC, Lin MH. 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; 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): 245-247.
- Yagiela JA. Anestésicos Locais. In: Yagiela JA, Dowd FJ, Johnson B, Mariotti A, autores. Farmacologia e terapêutica para dentistas. 6. Ed. São Paulo: Elsevier; 2011. p. 243-261.
- Yoon KD, Chin YW, Kim J. Centrifugal partition chromatography: application to natural products in 1994–2009. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2010; 33: 1208-1254.
- Zhao WM. Extraction and isolation of natural products. In: Rensheng X, Yang Y, Zhao W, editores. Introduction to natural products chemistry. 1. Ed. CRC Press; 2011. p. 5-25.

Zivanovic S, Chi S, Draughon AF. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oil. *J Food Sci.* 2005; 70(1): M45-M51.



## Anexo I – Comitê de ética



UNICAMP



CEUA/Unicamp

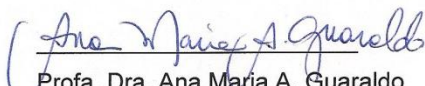
### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Desenvolvimento de um bioadesivo contendo extrato de *Spilanthes acmella* L. Murray para administração oral como anestésico tópico" (protocolo nº 2851-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues / Verônica Santana de Freitas, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de outubro de 2012.

Campinas, 15 de outubro de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>