



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

JERUZA FERRAZ FILGUEIRAS DI MICELI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULA
CONTENDO ÓLEO DO FRUTO DE *Pterodon emarginatus* Vogel
(SUCUPIRA-BRANCA) EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR CISPLATINA.**

**Macapá
2021**

JERUZA FERRAZ FILGUEIRAS DI MICELI	DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULA CONTENDO ÓLEO DO FRUTO DE <i>Pterodon emarginatus</i> Vogel (SUCUPIRA-BRANCA) EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR CISPLATINA.	UNIFAP 2021
--	--	--------------------------------------

JERUZA FERRAZ FILGUEIRAS DI MICELI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULA
CONTENDO ÓLEO DO FRUTO DE *Pterodon emarginatus* Vogel
(SUCUPIRA-BRANCA) EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR CISPLATINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Raquel Silva
Araújo

Macapá
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

Di Miceli, Jeruza Ferraz Filgueiras.

Desenvolvimento e avaliação de nanocápsula contendo óleo do fruto de *Pterodon emarginatus* vogel (sucupira-branca) em modelo de mucosite intestinal induzida por cisplatina. / Jeruza Ferraz Filgueiras Di Miceli; orientadora, Raquel Silva Araújo. – Macapá, 2021.
97 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Cisplatina. 2. Mucosite intestinal. 3. *Pterodon emarginatus* Vogel. 4. Nanocápsulas. I. Araújo, Raquel Silva, orientadora. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

615.321 D536d
CDD. 22 ed.

JERUZA FERRAZ FILGUEIRAS DI MICELI

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULA
CONTENDO ÓLEO DO FRUTO DE *Pterodon emarginatus* Vogel
(SUCUPIRA-BRANCA) EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL
INDUZIDA POR CISPLATINA.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Data de Aprovação: 28 / 05 / 2021

Raquel Silva Araújo .

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Silva Araújo (UNIFAP)

Maria Emília Rabelo Andrade

Examinador 1: Prof^a. Dr^a. Maria Emília Rabelo Andrade (UFMG)

Francisco Fábio Oliveira de Sousa

Examinador 2: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa (UNIFAP)

*Dedico esta dissertação a toda minha
história de vida, família e amigos.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças e sabedoria principalmente nos momentos mais difíceis, como nessa pandemia.

À minha mãe Eliana Di Miceli por me ajudar, pelo amor e por ter me proporcionado coisas boas.

Aos meus tios, Enrico Di Miceli e Clícia Di Miceli, pelo acolhimento e carinho durante todos esses anos e me possibilitarem correr atrás dos meus sonhos através dos estudos, pois estudar é um privilégio.

Aos meus irmãos, Alexandre Di Miceli e Bruno Di Miceli, pelo apoio motivacional, pela ajuda para poder estudar, ainda, por vocês servirem de inspiração.

Ao Lucas Ventura, pelo amor, carinho e aconselhamentos, com certeza você foi meu refúgio durante esses dois anos.

À minha família, sogros e cunhada, pelo incentivo e acreditarem em mim.

À profa. Dra. Raquel Silva Araújo pela orientação impecável, me mostrando onde melhorar e crescer como pesquisadora. És inspiração e exemplo de mulher-Cientista-determinada que faz tudo com muita dedicação. Obrigada por compartilhar ensinamentos.

Às amigas, Yasmin Cardoso, Hellen Loureiro e Deiseane Bastos, por também fazerem parte desse processo, escutando, aconselhando e realçando melhorar sempre.

Ao professor Valbert Nascimento Cardoso do Laboratório de Radiosíótopos-UFMG, pelo suporte para desenvolver o experimento in vivo e por nos indicar soluções benéficas referentes ao presente trabalho.

Ao professor Geovanni Dantas Cassali do Laboratório de Patologia- UFMG, pela ajuda na histologia.

Às pesquisadoras, Maria Emília Rabelo Andrade e Paula Lopes Armond Carvalho do Laboratório de Radiosíótopos, pela assistência nos experimentos e recomendações prestadas.

Ao professor Rodrigo Alves Soares Cruz do Laboratório de Nanofito- UNIFAP, pelo auxílio e contribuições na caracterização química do oleorresina de sucupira.

À professora Lilian Grace da Silva Solon, por disponibilizar o Laboratório de Controle de Qualidade e Bromatologia para execução de testes e ao Técnico do Laboratório Fernando Santos pelo apoio prestado.

Aos Professores José Carlos Tavares (Laboratório Fármacos- UNIFAP) e Caio Fernandes (Laboratório Nanofito- UNIFAP) por disponibilizarem equipamentos que colaboraram para a realização de parte deste trabalho.

Ao professor Irlon Ferreira Maciel, coordenador do PPGCF, e a secretária Kelciane Cordeiro por prestarem assistência.

Aos meus colegas de turma 2019, pelos momentos alegres e de desespero, agradeço a convivência mesmo que breve.

À Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e seus docentes, pela garantia do ensino, pesquisa e aprendizagem de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que mais uma vez participaram direta ou indiretamente dessa etapa acadêmica. Obrigada!

“A crise da educação no Brasil não é uma crise, é um projeto”.

(Darcy Ribeiro)

“Na universidade se ensina porque se pesquisa”

(Carlos Chagas Filho)

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANOCÁPSULA CONTENDO ÓLEO DO FRUTO DE *Pterodon emarginatus* Vogel (SUCUPIRA-BRANCA) EM MODELO DE MUCOSITE INTESTINAL INDUZIDA POR CISPLATINA.

Introdução: A mucosite intestinal é uma complicação comum associada à terapia do câncer, como o uso do quimioterápico cisplatina (CDDP). É caracterizada por dano ao epitélio gastrointestinal que debilita o paciente e prejudica o tratamento. Apesar de sua importância clínica, não existe tratamento até o momento. Na literatura, o óleo de sucupira (OS) (*Pterodon emarginatus* Vogel) mostrou atividade anti-inflamatória, porém não há relatos para mucosite intestinal. O OS possui caráter lipofílico e viscoso dificultando sua aplicação *in vivo*. O desenvolvimento de nanoestruturas como as nanocápsulas (NC) representam uma estratégia inovadora para contornar esses inconvenientes. **Objetivo:** Desenvolver e avaliar a ação de nanocápsulas poliméricas contendo o óleo de sucupira (NC OS) na mucosite intestinal induzida por cisplatina em camundongos. **Metodologia:** O OS foi caracterizado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. As NC de OS foram produzidas empregando diferentes tensoativos pelo método de nanoprecipitação e caracterizadas físico-quimicamente em relação à distribuição de tamanho e potencial zeta. Os animais foram distribuídos em grupos: Controle (sem mucosite + água), Mucosite (com mucosite + água), Pré-tratado 1 (com mucosite + OS por 7 dias antes e durante a indução da doença) e Pré-tratado 2 (com mucosite + NC OS por 7 dias antes e durante a indução da doença). A mucosite foi induzida através da administração i.p. de 10 mg/kg de CDDP no 5º dia. Para verificar a permeabilidade intestinal, no 8º dia os animais receberam solução de ^{99m}Tc -dietilenotriaminopentacético. O íleo foi coletado para análise histológica, dosagem de citocinas (IL-10 e TNF- α) e infiltrado inflamatório (NAG e MPO). **Resultados e discussão:** O diâmetro médio calculado por espalhamento dinâmico da luz foi inferior a 350 nm e o potencial zeta apresentou valores negativos. NC OS apresentaram adequada estabilidade. O tratamento com NC OS produzidas com os tensoativos Tween e Span na mucosite intestinal demonstrou aumento da permeabilidade intestinal, diminuição de NAG, porém não alterou MPO e as citocinas. Já o tratamento com as NC OS produzidas com tensoativo lecitina, demonstrou diminuição da permeabilidade intestinal, não alterou infiltrado inflamatório, porém aumentou níveis de TNF- α . A avaliação dos tensoativos frente a mucosite intestinal confirmam a piora da inflamação promovida pela administração de Tween e Span devido ao aumento da permeabilidade intestinal e de TNF- α . **Conclusão:** A avaliação das NC OS produzidas em modelo de mucosite intestinal induzida, apresentou melhora parcial de alguns parâmetros avaliados dependendo dos tensoativos empregados. Contudo, a formulação de NC OS produzida com lecitina promoveu melhores resultados frente a mucosite intestinal quando comparado a OS, sugerindo cautela na escolha de tensoativos em uma formulação.

Palavras-Chave: Cisplatina. Mucosite intestinal. *Pterodon emarginatus* Vogel. Nanocápsulas.

Agradecimentos: CAPES/FAPEAP; CNPq.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF NANOCAPSULE CONTAINING FRUIT OIL OF *Pterodon emarginatus* Vogel (SUCUPIRA-BRANCA) IN A CISPLATIN-INDUCED INTESTINAL MUCOSITIS MODEL.

Introduction: Intestinal mucositis is a common complication associated with cancer therapy, such as the use of the chemotherapy drug cisplatin (CDDP). It is characterized by damage to the gastrointestinal epithelium that debilitates the patient and impairs treatment. Despite its clinical importance, there is no treatment so far. In the literature, sucupira oil (SO) (*Pterodon emarginatus* Vogel) showed anti-inflammatory activity, but there are no reports of intestinal mucositis. SO has a lipophilic and viscous character, making it difficult to apply *in vivo*. The development of nanostructures such as nanocapsules (NC) represents an innovative strategy to overcome these drawbacks. **Objectives:** Develop and evaluate the action of polymeric nanocapsules containing sucupira oil (SO-NC) on cisplatin-induced intestinal mucositis in mice. **Methodology:** SO was characterized by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. SO-NC were produced using different surfactants by the nanoprecipitation method and physicochemically characterized in relation to size distribution and zeta potential. The animals were divided into groups: Control (without mucositis + water), Mucositis (with mucositis + water), Pre-treated 1 (with mucositis + SO for 7 days before and during disease induction) and Pre-treated 2 (with mucositis + SO-NC for 7 days before and during disease induction). Mucositis was induced by i.p. 10 mg/kg CDDP on the 5th day. To check the intestinal permeability, on the 8th day the animals received a ^{99m}Tc-diethylenetriaminepentaacetic solution. The ileum was collected for histological analysis, cytokine assay (IL-10 and TNF- α) and inflammatory infiltrate (NAG and MPO). **Results and discussion:** The average diameter calculated by dynamic light scattering was less than 350 nm and the zeta potential showed negative values. SO-NC showed adequate stability. Treatment with SO-NC produced with the surfactants Tween and Span in intestinal mucositis demonstrated an increase in intestinal permeability, a decrease in NAG, but it did not alter MPO and cytokines. The treatment with SO-NC produced with lecithin surfactant, demonstrated a decrease in intestinal permeability, did not alter inflammatory infiltrate, but increased levels of TNF- α . The evaluation of surfactants against intestinal mucositis confirms the worsening of the inflammation promoted by the administration of Tween and Span due to the increase in intestinal permeability and TNF- α . **Conclusion:** The evaluation of SO-NC produced in a model of induced intestinal mucositis showed partial improvement in some parameters evaluated depending on the surfactants used. However, the SO-NC formulation produced with lecithin promoted better results against intestinal mucositis when compared to SO, suggesting caution when choosing surfactants in a formulation.

Keywords: Cisplatin. Intestinal mucositis. *Pterodon emarginatus* Vogel. Nanocapsules.

Acknowledgements: CAPES/FAPEAP; CNPq.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química da CDDP.	04
Figura 2-	Interação da CDDP com o DNA: (I) interação interfitas; (II) interação intrafita; (III) ligação cruzada intrafita e (IV) interação com DNA e proteína.	05
Figura 3-	Estágios da fisiopatologia da mucosite.	07
Figura 4-	Substâncias β -cariofileno e ácido $6\alpha,7\beta$ -dihidroxivouacapan- 17β -óico.	12
Figura 5-	Representação das nanocápsulas.	14
Figura 6-	Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas.	15
Figura 7-	Esquema do protocolo experimental.	21
Figura 8-	Caracterização físico-química da NC OS1. Tamanho da NC após armazenamento em TA (A) e 4°C (B) . Índice de polidispersão da NC em TA (C) e 4°C (D) . Potencial zeta da NC em TA (E) e 4°C (F) . Os resultados foram comparados com o dia 0 (inicial). * indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA <i>One-way</i> e pós-teste de <i>Tukey</i>). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.	26
Figura 9-	Caracterização físico-química da NC OS2. Tamanho da NC e índice de polidispersão após armazenamento em TA (A) e geladeira (B) . Potencial zeta da NC em TA (C) e geladeira (D) . Os resultados foram comparados com o dia 0 (inicial). * indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA <i>One-way</i> e pós-teste de <i>Tukey</i>). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.	28

- Figura 10-** Caracterização físico-química da NC OS1 em meio gastrointestinal simulado. Estabilidade da NC em fluido gástrico (**A, B**) e fluido intestinal (**C, D**) simulados, após 2 e 6 h, respectivamente. Dados analisados pelo teste ANOVA *One-way* e pós-teste de *Tukey*. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Os resultados foram comparados com tempo 0 h (inicial). 29
- Figura 11-** Consumo alimentar e variação do peso dos animais antes e após a indução da mucosite. Os dados foram analisados por ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Tukey* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). Abreviaturas: CTL (controle); MUC (mucosite); OS1 (mucosite tratado com OS1); NC OS1 (mucosite tratado com NC OS1). 31
- Figura 12-** Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de ^{99m}Tc -DTPA no sangue de animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; *One-way* ANOVA e pós teste de *Newman-Keuls*). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=6). 33
- Figura 13-** Análise histológica do íleo. Grupo - CTL (**A**); MUC (**B**); OS1 (**C**); NC OS1 (**D**). (**A**) Aspecto histológico normal com arquitetura da parede intestinal preservada e sem inflamação. (**B**) Perda da arquitetura tecidual e encurtamento das vilosidades (seta) com presença de infiltrado inflamatório. (**C e D**) Preservação parcial das vilosidades e da arquitetura tecidual. Barra 100 μm (Objetiva de 20X). Coloração HE (n=6). 34
- Figura 14-** Análise morfométrica do íleo. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; *One-way* ANOVA e pós teste de

- Newman-Keuls*). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=10). 35
- Figura 15-** Escore histológico do íleo. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$; teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunns*). Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=6).). 35
- Figura 16-** Avaliação das atividades das enzimas MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) e NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo. **(A)** Mieloperoxidase (MPO) **(B)** N-acetilglucosaminidase (NAG). Os dados foram analisados por ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls*. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). Letras diferentes representam diferença estatística ($p<0,05$). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). 37
- Figura 17-** Produção de citocinas no íleo. **(A)** TNF e **(B)** IL-10. Dados analisados pelo teste ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls*. Em **(A)** e **(B)** foram observadas diferença estatística significativa ($p<0,05$) representadas pelas letras diferentes. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=6). 39
- Figura 18-** Variação do peso **(A e B)** e consumo alimentar **(C e D)** dos animais antes e após a indução da mucosite. Variação do peso dos animais antes (dias 3 e 5) e após a indução da mucosite (dia 7). Os dados foram analisados por ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Tukey* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). * indica que houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$). Abreviaturas: CTL (controle); MUC (mucosite); OS2 (mucosite tratado com OS2); NC OS2 (mucosite tratado com NC OS2). 41

- Figura 19-** Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de ^{99m}Tc -DTPA no sangue de animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; *One-way* ANOVA e pós teste de *Newman-Keuls*). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$). 42
- Figura 20-** Análise histológica e morfométrica do íleo. Grupo - CTL (**A**); MUC (**B**); OS2 (**C**); NC OS2 (**D**). (**A**) Aspecto histológico normal com arquitetura da parede intestinal preservada e sem inflamação. (**B**) Perda da arquitetura tecidual e encurtamento das vilosidades com presença de infiltrado inflamatório. (**C e D**) Alteração da arquitetura tecidual e atrofia dos vilos. Barra 100 μm (Objetiva de 20X). Coloração HE ($n=6$). Análise morfométrica do íleo (**E**). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; *One-way* ANOVA e pós teste de *Newman-Keuls*). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=10$). Escore histológico do íleo (**F**). Letras iguais: sem diferença estatística ($p > 0,05$; teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunns*). Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$). 43
- Figura 21-** Avaliação das atividades das enzimas MPO e NAG e citocinas no íleo. (**A**) Mieloperoxidase (MPO) (**B**) N-acetilglucosaminidase (NAG). Produção de citocinas no íleo em (**C**) TNF e (**D**) IL-10. Dados analisados pelo teste ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls*. Em (**C**) foram observadas diferença estatística significativa ($p < 0,05$) representadas pelas letras diferentes. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$). 44
- Figura 22-** Variação do peso (**A**) e consumo de ração (**B**) dos animais antes e após a indução de mucosite. Os dados foram analisados por ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Tukey* e representados como média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

- ($p < 0,05$). Abreviaturas: CTL (controle); MUC (mucosite); T (mucosite tratado com Tween 80); TS (mucosite tratado com tween e span 80); LEC (mucosite tratado com lecitina). 48
- Figura 23-** Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de ^{99m}Tc -DTPA no sangue de animais. Dados analisados pelo teste ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls* e representados como média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). 49
- Figura 24-** Análise histológica do íleo. Grupo - CTL (**A**); MUC (**B**); T (**C**); TS (**D**); LEC (**E**). (**A**) Aspecto histológico normal com arquitetura da parede intestinal preservada e sem inflamação. (**B**) Perda da arquitetura tecidual e encurtamento das vilosidades com presença de infiltrado inflamatório. (**C, D, E**) Preservação parcial das vilosidades e da arquitetura tecidual. Barra 100 μm (Objetiva de 20X). Coloração HE ($n=6$). 51
- Figura 25-** Análise morfométrica do íleo. Os dados foram analisados por ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls* e representados como média $\pm$ erro padrão da média ($n=10$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). 52
- Figura 26-** Escore histológico do íleo. Os dados foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunns* e representados como média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). 52
- Figura 27-** Avaliação das atividades das enzimas MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) e NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo. (**A**) Mieloperoxidase (MPO) (**B**) N-acetilglucosaminidase (NAG). Os dados foram analisados por

ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$).

54

Figura 28- Produção de citocinas no íleo. **(A)** TNF e **(B)** IL-10. Dados analisados por ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Em (A) foram observadas diferença estatística significativa ($p<0,05$). Em (B) * diferença estatisticamente significativa (Teste t de Student).

55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição e esquema de tratamento dos grupos experimentais.	20
Tabela 2-	Classificação dos escores histopatológicos.	23
Tabela 3-	Compostos identificados no OS por LC-HRMS/MS.	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-Fluouroracil
^{99m}Tc	Pertecnetato ou tecnécio
CDDP	Cis-diamino-dicloro-platina II ou cisplatina
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
Cpm	Contagem por minuto
CTL	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDL	Espalhamento dinâmico de luz
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FGS	Fluido gástrico simulado
FIS	Fluido intestinal simulado
HETAB	Brometo de hexadecil trimetil amônio
ID	Identificado
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina 1
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IP ou i.p.	intraperitoneal
IPd	Índice de polidispersão
LC-MS /MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LEC	Lecitina
Lipoid® S75	Lecitina
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

MFA	Microscopia de força atômica
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MUC	Mucosite
n	Número ou quantidade
NAG	N-Acetilglucosaminidase
NC	Nanocápsulas
NC OS	Nanocápsulas biodegradáveis contendo oleorresina de sucupira
NC OS1	Mucosite tratado com NC OS1
NC OS2	Mucosite tratado com NC OS2
NF-kB	Fator de transcrição da família kappa-B
NO	Óxido nítrico
o/a	Óleo em água
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	Oleorresina de sucupira
OS1	Mucosite tratado com OS1
OS2	Mucosite tratado com OS2
PBS	Tampão fosfato-salino
PCL	poli-ε-caprolactona
Ph	potencial Hidrogeniônico
PI	Permeabilidade Intestinal
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
ppm	Partes por milhão
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
R_t	Tempo de retenção
Span 80 ou S80	Monooleato de sorbitano
T	Mucosite tratado com Tween 80
TA	Temperatura ambiente
TGI	Trato gastrointestinal
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
TS	Mucosite tratado com tween e span 80
Tween 80 ou T80	Polisorbato 80

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

UNIFAP

Universidade Federal do Amapá

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
+	Mais
±	Mais ou menos
x	Vezes
µg	Micrograma
µL	Microlitro
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
kV	Quilovolt
M	Mol por litro
MBq	Megabecquerel
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama por quilo de peso
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mV	Milivolt
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanômetro
°C	Grau Celsius
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
v/v	Volume por volume
ζ	Potencial zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
2	OBJETIVOS.....	03
2.1	OBJETIVO GERAL.....	03
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	03
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	04
3.1	CISPLATINA.....	04
3.2	EFEITO TÓXICO INTESTINAL CAUSADO POR ANTINEOPLÁSICOS: MUCOSITE.....	06
3.2.1	Fase de iniciação.....	07
3.2.2	Fase de resposta ao dano primário.....	08
3.2.3	Fase de amplificação de sinal.....	08
3.2.4	Fase ulcerativa.....	08
3.2.5	Fase de cicatrização.....	09
3.2.6	Tratamento.....	09
3.3	ÓLEO DE SUCUPIRA.....	11
3.4	NANOESTRUTURAS.....	12
3.4.1	Nanocápsulas.....	13
3.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	16
3.5.1	Avaliação morfológica.....	16
3.5.2	Tamanho da partícula.....	16
3.5.3	Potencial zeta.....	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	PRODUTOS QUÍMICOS.....	18
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO OLEORRESINA DE SUCUPIRA.....	18
4.3	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS.....	18
4.4	ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS EM MEIO GASTROINTESTINAL SIMULADO.....	19
4.5	ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS DURANTE ESTOCAGEM.....	20

4.6	ANIMAIS.....	20
4.7	DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	20
4.7.1	Variação Ponderal e consumo alimentar.....	21
4.7.2	Permeabilidade Intestinal (PI).....	22
4.7.3	Análise histomorfométrica.....	22
4.7.4	Atividades de Mieloperoxidase (MPO) E N-Acetilglucosaminidase (NAG).....	23
4.7.5	Análise das concentrações de citocinas.....	24
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE SUCUPIRA.....	25
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS.....	26
5.2.1	Nanocápsulas 1 (NC OS1)	26
5.2.2	Nanocápsulas 2 (NC OS2)	28
5.3	ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS EM MEIO GASTROINTESTINAL SIMULADO.....	29
5.4	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NC OS1 EM MODELO DE MUCOSITE.....	30
5.4.1	Variação ponderal antes e após indução da mucosite.....	31
5.4.2	Avaliação da permeabilidade intestinal (PI).....	32
5.4.3	Análise histopatológica e morfométrica do íleo.....	34
5.4.4	Avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG.....	36
5.4.5	Dosagem de citocinas no íleo.....	38
5.5	AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NC OS2 EM MODELO DE MUCOSITE.....	40
5.5.1	Variação ponderal antes e após indução da mucosite.....	40
5.5.2	Avaliação da permeabilidade intestinal (PI).....	41
5.5.3	Análise histopatológica e morfométrica do íleo.....	43
5.5.4	Avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG e citocinas no íleo.....	44
5.6	AVALIAÇÃO DE TENSOATIVOS EM MODELO DE MUCOSITE.....	46
5.6.1	Variação ponderal antes e após indução da mucosite.....	47
5.6.2	Avaliação da permeabilidade intestinal (PI).....	49

5.6.3	Análise histopatológica e morfométrica do íleo.....	50
5.6.4	Avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG.....	53
5.6.5	Dosagem de citocinas no íleo.....	55
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	57
	REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO I	Comprovante de submissão do artigo.....	72

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado de células com tendência a invadir tecidos e órgãos vizinhos. As Américas possuem 21,0% da incidência e representam 14,4% da mortalidade em todo o mundo, sendo no Brasil a segunda causa de óbito na população, com tendência de crescimento nos próximos anos, retratando um grave problema de saúde pública visto a sua importância epidemiológica, social e econômica (INCA, 2019; BRAY *et al.*, 2018). Uma das formas de tratamento do câncer é o uso de quimioterápicos, tal como a cisplatina (Cis-diamino-dicloro-platina II) (CDDP). Este fármaco é utilizado no tratamento de cânceres de testículo, ovário metastático, e os do trato genital-urinário (DEVARAJAN *et al.*, 2004). A cisplatina exerce seu efeito citotóxico através da formação adutos de platina-DNA que impedem a síntese e replicação de DNA, interrompendo o ciclo celular. Além disso, afeta vias de transdução de sinal, induzindo a célula a apoptose (MANOHAR; LEUNG, 2018). O uso da CDDP está associado à nefrotoxicidade assim como toxicidade gastrointestinal, tal como a mucosite (LEITE *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2017).

A mucosite intestinal é uma complicação comum associada a terapia do câncer com impacto significativo na saúde e qualidade de vida dos pacientes, uma vez que a dose do quimioterápico muitas vezes é reduzida para o paciente suportar a terapia. Além disso, sua ocorrência aumenta os gastos com hospitalizações causando um importante impacto econômico (SONIS *et al.*, 2001, 2004b; PETERSON *et al.*, 2011). É caracterizada por dano do epitélio gastrintestinal que pode causar dor intestinal e/ou oral, vômito, diarreia contribuindo para a má absorção de nutrientes e promovendo perda de peso. Apesar de sua importância clínica, não há tratamento específico para mucosite intestinal, e sim existem cuidados paliativos (KEEFE, 2007; LALLA *et al.*, 2014).

A literatura reporta o uso de imunomoduladores (ANDRADE *et al.*, 2015), probióticos (OH *et al.*, 2017; TRINDADE *et al.*, 2018) e de substâncias de origem vegetal com bioatividade na tentativa de descobrir novos tratamentos para a mucosite intestinal (CHEN *et al.*, 2018; DE FREITAS-BLANCO *et al.*, 2019; CECHINEL-ZANCHETT *et al.*, 2019; DE MIRANDA *et al.*, 2019). A planta *Pterodon emarginatus*

Vogel, popularmente conhecida no Brasil como sucupira, é uma espécie vegetal aromática, tendo também domínio fitogeográfico na Amazônia e Cerrado, e amplamente utilizada pela medicina popular (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2019). Dentre as diversas ações biológicas, o efeito anti-inflamatório desta planta é reportado na literatura (HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010; GALCERAN *et al.*, 2011). Das sementes/frutos pode ser extraído o oleorresina da sucupira que possui coloração âmbar. Sua composição fitoquímica demonstra a presença de sesquiterpenos e diterpenos que podem estar associados à sua atividade anti-inflamatória (HOSCHIED; CARDOSO, 2015; GALCERAN *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de uma formulação oral com o óleo de sucupira é difícil, uma vez que este apresenta caráter lipofílico e viscoso, dificultando sua administração. Dessa forma, os nanocarreadores poliméricos oferecerem uma estratégia importante de viabilização, pois otimiza as propriedades terapêuticas e pode diminuir efeitos adversos da substância encapsulada (WILCZEWSKA *et al.*, 2012). Dentre esses nanocarreadores encontram-se as nanocápsulas. Estas são constituídas por um fino invólucro de polímero e uma cavidade central oleosa, onde substância(s) ativa(s) podem estar dissolvida(s) e/ou adsorvida(s) na parede polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003), viabilizando desta forma a administração do óleo de *P. emarginatus*.

Uma vez que o óleo de sucupira possui característica lipofílica, constitui ótimo candidato a ser incorporado em nanocápsula. Assim, o presente trabalho tem por finalidade desenvolver e avaliar a ação de nanocápsulas poliméricas contendo o óleo de sucupira na presença de mucosite intestinal induzida por cisplatina, com intuito de estabelecer um adjuvante ou complementar para prevenir e/ou aliviar essa condição clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir nanocápsulas poliméricas de poli- ϵ -caprolactona contendo óleo de sucupira (OS) e avaliar a ação frente à mucosite intestinal induzida pelo quimioterápico cisplatina em modelo *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

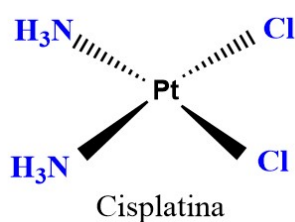
- a) Desenvolver nanocápsulas poliméricas de poli- ϵ -caprolactona contendo óleo de sucupira;
- b) Caracterizar físico-quimicamente as NC de OS em relação ao tamanho, índice de polidispersão e carga superficial.
- c) Avaliar o efeito da NC OS e de seus tensoativos sobre a integridade da mucosa intestinal mediante a avaliação do consumo alimentar e evolução ponderal, permeabilidade intestinal, infiltrado inflamatório, histomorfometria e quantificação de citocinas do epitélio intestinal.

3.1 CISPLATINA

Os complexos de platina (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina e satraplatina) formam um grupo de agentes quimioterápicos com amplo espectro de atividade antitumoral e fazem parte do tratamento de inúmeras neoplasias, como: câncer de testículo, ovário, bexiga, de colo/corpo de útero, cabeça e pescoço, pulmão, esôfago, estômago e melanoma (HOFF *et al.*, 2013).

A cisplatina teve sua atividade citotóxica reconhecida por Rosenberg e colaboradores na década de 1960, embora já fosse conhecida como cloreto de Peyrone em homenagem ao químico Michele Peyrone que o sintetizou pela primeira vez em 1847. Sua estrutura foi proposta corretamente, em 1893, por Alfred Werner. É um composto inorgânico, de coordenação planar, que contém um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e dois grupos amônia (HOFF *et al.*, 2013; KAUFFMAN *et al.*, 2010) (**Figura 1**).

Figura 1- Estrutura química da CDDP.

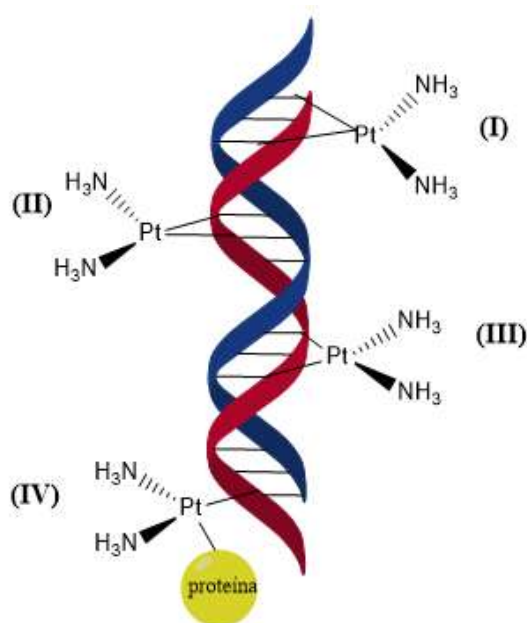


Fonte: Autora (2021).

A cisplatina pode ser administrada por via intravenosa, intra-arterial ou intraperitoneal, com eliminação predominantemente renal (> 90%). É o fármaco mais potente e o mais tóxico dessa classe, sendo muito ativo e utilizada em tumores testiculares, gastrintestinais, geniturinários, câncer de pulmão e de cabeça e pescoço (REED, 2006; DE VITA, HELLMAN, ROSEMBERG, 2008). Mais de 90% dos tumores iniciais e de 70 a 80% dos tumores avançados são curados com quimioterapia

baseada em cisplatina (HOFF *et al.*, 2013). Seu mecanismo de ação citotóxico decorre das complexas interações com o ambiente celular convertê-lo em um eletrófilo com alta afinidade ao DNA. Isso resulta na formação de ligações cruzadas da platina ao DNA celular, podendo ocorrer com outros componentes celulares, incluindo proteínas, RNA e DNA mitocondrial. O DNA “platinado” (adutos de platina) das ligações intra e interfitas provoca distorções significativas na dupla hélice do DNA, causando desenovelamento e torção da sua estrutura, interrompendo o ciclo celular através da interferência na síntese e replicação do DNA (HOFF *et al.*, 2013; MANOHAR, LEUNG, 2018) (**Figura 2**). A formação dos adutos com a cisplatina são responsáveis pela indução de apoptose (morte celular programada) geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e afeta a proteína supressora de tumor p53 (JUNG, LIPPARD, 2007; MANOHAR, LEUNG, 2018).

Figura 2- Interação da CDDP com o DNA: **(I)** interação interfitas; **(II)** interação intrafita; **(III)** ligação cruzada intrafita e **(IV)** interação com DNA e proteína.



Fonte: Adaptado de Neves; Vargas (2011).

A maioria dos agentes quimioterápicos não atua de forma seletiva, danificando tanto as células malignas quanto as normais, particularmente as de crescimento rápido como as gastrintestinais, as capilares e as imunológicas (SONIS *et al.*, 2001; KWON, 2016). Além disso, a toxicidade do agente antitumoral depende do modo de

ação, da dose e das interações do fármaco em um determinado protocolo de tratamento (SURESH *et al.*, 2010).

Os principais efeitos adversos devido ao uso da cisplatina são mielotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal como a mucosite (ENGEL *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019; RYBAK, MUKHERJEA, RAMKUMARA, 2019; HE *et al.*, 2019; SHAHID, FAROOQUI, KHAN, 2018). Assim, muitas vezes seu uso é limitado por causa da toxicidade e, novas estratégias de profilaxia e tratamento são necessárias para melhorar a tolerância a CDDP nos pacientes oncológicos.

3.2 EFEITO TÓXICO INTESTINAL CAUSADO POR ANTINEOPLÁSICOS: MUCOSITE

A mucosite é uma condição/complicação clínica decorrente da terapia antineoplásica, caracterizada por inflamação e/ou ulceração da mucosa do trato gastrointestinal (TGI). Representa um dos efeitos adversos mais importantes da farmacoterapia antitumoral, como no uso da cisplatina, podendo levar à modificação do tratamento ou até interrupção do mesmo, impactando de forma direta na qualidade de vida e/ou na sobrevida do paciente (SONIS *et al.*, 2004b; LALLA *et al.*, 2014).

A mucosite intestinal é uma resposta inflamatória caracterizada por inflamação e ulceração do epitélio intestinal, uma vez que é um tecido altamente proliferativo, a quimioterapia pode resultar em lesão celular intestinal direta. Essa condição é uma das principais causas de morbimortalidade em pacientes em quimioterapia (KEEFE, 2007). Apesar de avanços no que tange a mucosite, os mecanismos, condições e impacto na estrutura e função intestinal são escassos. A quimioterapia pode exercer um efeito citotóxico através da geração de ERO; de vias enzimáticas ou ativação de fatores de transcrição (NF- κ B) cujas ações promovem a lesão tecidual e apoptose, especialmente no intestino delgado (SONIS, 2004a; KEEFE, 2007; LEVIT *et al.*, 2018).

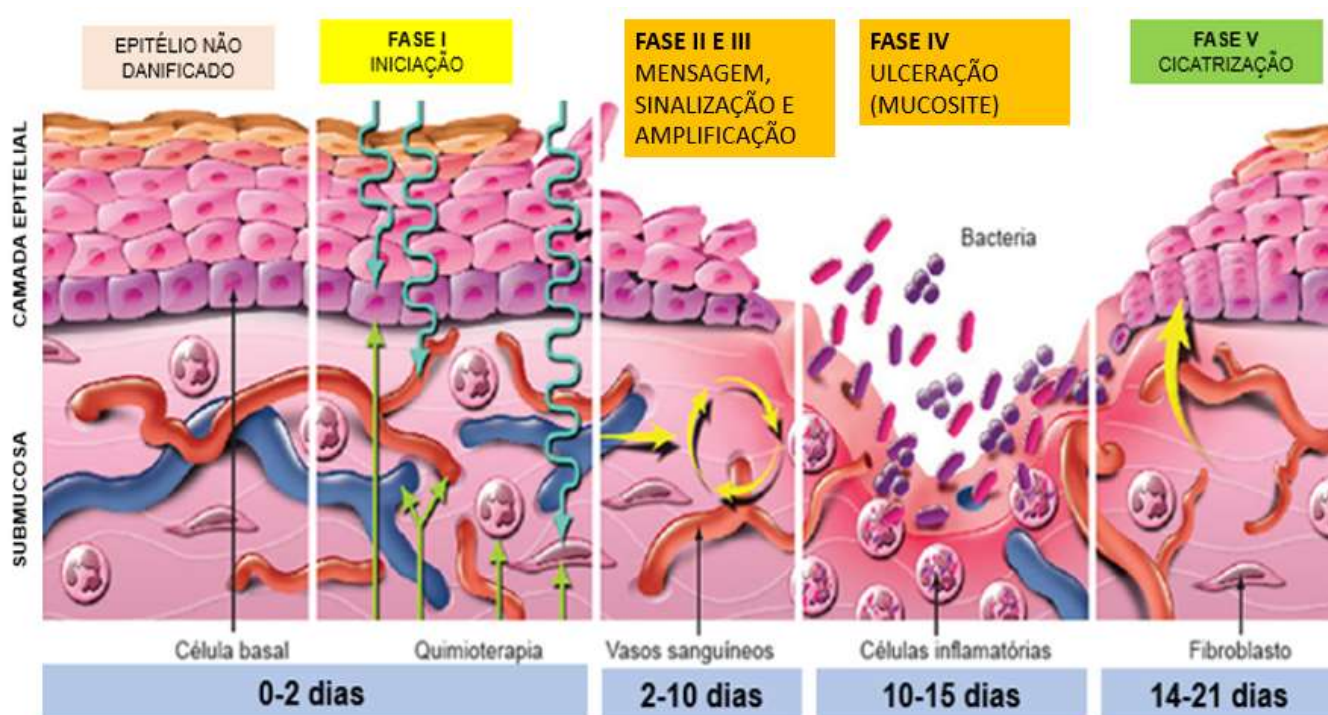
As manifestações clínicas da mucosite podem variar de leves a severas. A manifestação clínica leve caracteriza-se por lesão atrófica, eritematosa e mucosa intacta, podendo o paciente apresentar sensibilidade, sendo essa condição de fácil manejo. A manifestação severa apresenta ulcerações que penetram profundamente na submucosa e causam dor intensa, exigindo uso de analgésicos potentes na prática clínica (SONIS *et al.*, 2004b).

Os sintomas gerais que acompanham a disfunção da mucosa incluem: náuseas, vômitos, diarreia associada a dor, aumento do desconforto causando

insônia, anorexia, perda de peso e redução absorção de nutrientes (LEVIT *et al.*, 2018). Ainda, a perda da integridade epitelial, aumenta o risco de bacteremia, fungemia e sepse, pelos microrganismos oportunistas presentes nas mucosas. De acordo com o sistema de graduação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a mucosite pode variar de grau 0 ao 4 conforme critérios adotados (HOFF *et al.*, 2013).

A descrição e classificação dos cinco estágios principais do processo da mucosite (**Figura 3**) foi relatada por SONIS (2004a).

Figura 3- Estágios da fisiopatologia da mucosite.



Fonte: Adaptado de Sonis (2004a).

3.2.1 Fase de iniciação

Ocorre após o contato dos tecidos com a radioterapia e/ou a quimioterapia evidenciando-se dano tecidual. As células da camada basal do epitélio e da submucosa são as células-alvo da injúria celular direta sofrendo dano de DNA. Ou indiretamente uma vez que simultaneamente são gerados radicais livres derivados de oxigênio. Entretanto, clinicamente, a mucosa apresenta aspecto de normalidade (SONIS *et al.*, 2004b).

3.2.2 Fase de resposta ao dano primário

Nessa fase, os danos causados ao DNA e a outras moléculas direta ou indiretamente iniciam uma série complexa de eventos, que possivelmente agem na ativação dos fatores de transcrição da família kappa-B (NF-kB) afetando a regulação da apoptose, síntese de citocinas (TNF- α , IL-1 β , e IL-6) e de metaloproteinases de matriz (MMPs) (SONIS *et al.*, 2004b). O NF-kB tem sido sugerido como um dos mais importantes, em relação à toxicidade e à resistência a terapia tumoral. Pode ter ações pró-apoptóticas e antiapoptóticas, determinante no que acontecerá com o tecido normal após a radioterapia e a quimioterapia. As citocinas pró-inflamatórias na mucosa estimulam o dano precoce do tecido conjuntivo e do endotélio, e iniciam as sinalizações entre epitélio e mesênquima, reduzindo a oxigenação epitelial e levando a morte e injúria das células da camada basal do epitélio. Fibroblastos da mucosa também são alvos do dano causado pela radiação e pela quimioterapia com a destruição do colágeno (SONIS *et al.*, 2004b).

3.2.3 Fase de amplificação de sinal

Uma amplificação do sinal ocorre pela presença de citocinas pró-inflamatórias que ativam os fatores de transcrição de vias como a de produção de citocinas e estresse oxidativo piorando o dano tecidual. Em particular citocinas pró-inflamatórias, danificam o tecido como também fazem um efeito feedback positivo para amplificar o dano primário. Clinicamente o panorama é assintomático ou pouco sintomático. Apesar de existir algum eritema durante esses estágios, os pacientes relatam pouca sintomatologia e integridade tecidual (SONIS *et al.*, 2004b).

3.2.4 Fase ulcerativa

É a mais sintomática na farmacoterapia do paciente. Nessa fase, há perda da integridade da mucosa (ulceração) devido à inibição da replicação celular e atrofia do epitélio o que pode levar à alteração da permeabilidade intestinal. Adesão de colônias bacterianas na superfície e a entrada de numerosos microrganismos pode ser facilitada podendo levar complicações ao paciente, incluindo sepse. Ainda, a atuação do sistema imune contra os antígenos dos microrganismos, estimula as células

inflamatórias mononucleares a produzirem e sintetizarem outras citocinas pró-inflamatórias que promove a expressão de genes pró-apoptóticos e potencializam o dano tecidual. Células inflamatórias então migram por quimiotaxia para o epitélio injuriado na qual elas produzem enzimas danificadoras (SONIS *et al.*, 2004b).

3.2.5 Fase de cicatrização

Na fase de cicatrização, ocorre o reparo tecidual por meio da proliferação e da migração epitelial, e no conjuntivo adjacente, com diferenciação do tecido de granulação (fibroplasia e angiogênese), regidos pelos sinais da matriz extracelular e dos fibroblastos da submucosa (SONIS *et al.*, 2004b). Na maior parte dos casos, a mucosite é um fenômeno agudo que se autorresolve quando a terapia para o câncer acaba. O curso do comportamento tecidual depende do tipo de tratamento de câncer (radioterapia versus quimioterapia), do agente selecionado e da dose e do tempo da terapia (HOFF *et al.*, 2013).

3.2.6 Tratamento

Não existe na literatura diagnóstico e/ou tratamento para a mucosite intestinal induzida por quimioterápicos. Medidas paliativas são empregadas como o uso de antieméticos e analgésicos. Por isso, inúmeras terapias vêm sendo propostas com intuito de prevenir ou tratar a mucosite intestinal, tendo como finalidade evitar a redução nas doses de fármacos quimioterápicos e a não interrupção do tratamento, aumentando, assim, as chances de cura para o paciente (TREISTER, SONIS, 2007; LALLA *et al.*, 2014).

Tratamentos paliativos incluem cuidados básicos como a manutenção de hidratação e alimentação adequada evitando assim quadros de diarreia e desnutrição. Antidiarreicos opióides como a loperamida reduzem os movimentos peristálticos aumentando o tempo de trânsito intestinal sendo indicada na diarreia induzida por quimioterapia em dose padrão ou em altas doses. Porém, caso não seja eficaz recomenda-se a utilização de octreotida por via subcutânea duas vezes ao dia (KEEFE *et al.*, 2007; LALLA *et al.*, 2014). Ainda, o uso de probióticos contendo espécies de *Lactobacillus* é sugerido para prevenir diarreia em pacientes recebendo quimioterapia. Já, a utilização de antibiótico sulfassalazina (500 mg) por via oral duas vezes ao dia é indicada para prevenir enteropatia na mucosite gastrointestinal (LALLA

et al., 2014). Novas evidências foram identificadas para antimicrobianos (ciprofloxacino e metronidazol), contudo nenhuma diretriz foi possível para esses agentes devido a evidências incongruentes (ELAD *et al.*, 2020).

Assim, a busca por novos agentes terapêuticos faz-se necessária. No cenário atual, estudos empregando imunonutrientes (BODIGA *et al.*, 2012; CAI *et al.*, 2018), probióticos (TRINDADE *et al.*, 2018; CORDEIRO *et al.*, 2018) e produtos de origem animal e vegetal (MASHTOUB, TRAN, HOWARTH, 2013; BASTOS *et al.*, 2016; BAJIC *et al.*, 2016) obtiveram resultados promissores para o tratamento da mucosite intestinal.

Os produtos vegetais possuem diversos compostos químicos farmacologicamente relevantes tais como flavonoides e terpenóides apresentando atividades antitumorais, imunoestimulante e anti-inflamatória (DUTRA *et al.*, 2009, 2012; ALBERTI *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2018). O uso de produtos vegetais tem sido proposto para aliviar condições inflamatórias intestinais tais como a mucosite (BAJIC *et al.*, 2016) provocada pelos tratamentos quimioterápico e antibioticoterapia. Embora alguns estudos pré-clínicos tenham demonstrado efeitos benéficos do uso de produtos vegetais para a redução dos efeitos decorrentes da mucosite intestinal (WU *et al.*, 2020), seu estudo ainda é muito escasso diante da enorme biodiversidade mundial, especialmente a brasileira. *Aloe vera* (Babosa) e *Matricaria chamomilla* (Camomila) encontram-se em fase clínica II de avaliação em indivíduos com mucosite oral (CINAUSERO *et al.*, 2017), mas não da intestinal. O uso de folhas da espécie *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann (Pariri) é relatado pela população brasileira no tratamento de cólica e diarreia intestinal (BEHRENS, TELLIS, CHAGAS, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2012; TAKENAKA, 2017) e seu extrato apresentou efetividade em modelo de mucosite intestinal (TAKENAKA *et al.*, 2020). Em estudo realizado por De Ávila e colaboradores (2015) com formulação mucoadesiva de *Bidens pilosa* L. demonstrou redução de forma geral dos danos provocados pelo quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) na mucosite intestinal induzida em camundongos. Outro estudo, de Bastos *et al.* (2016) pertencente ao mesmo grupo de pesquisa, evidenciou atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e modulação da atividade proliferativa e apoptótica da estrutura intestinal através da formulação mucoadesiva de *Bidens pilosa* L. e *Curcuma longa* L. administrada por gavagem durante 6 dias em camundongos Swiss com mucosite intestinal induzida por 5-FU. Bajic e colaboradores (2016) relataram melhora parcial da integridade da mucosa intestinal e redução da inflamação ileal,

induzida por 5-FU, pela administração oral do extrato vegetal de *Rheum spp* (Ruibarbo) na dose de 20 mg/kg durante sete dias.

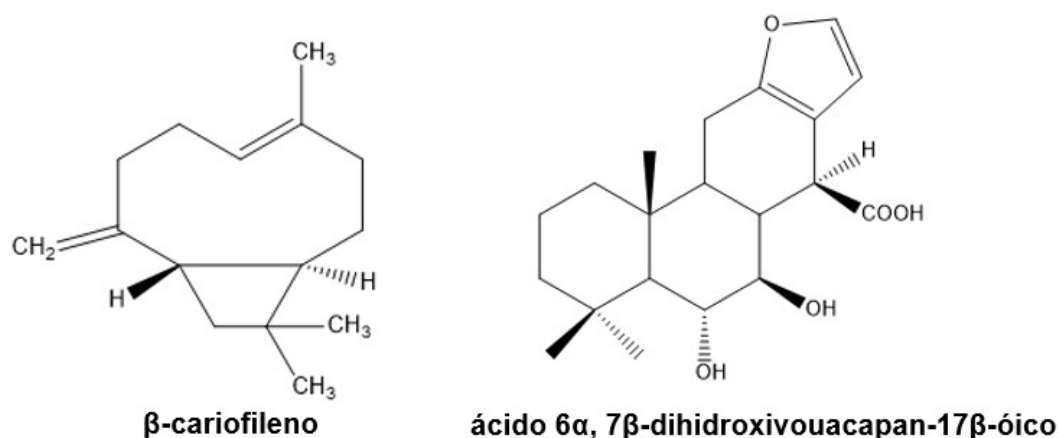
3.3 ÓLEO DE SUCUPIRA

A espécie vegetal *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae (Leguminosae), é uma árvore de grande porte e possui ampla distribuição em algumas regiões do país, incluindo os estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais, possuindo também domínio fitogeográfico na Amazônia e Cerrado. Popularmente conhecida no Brasil como sucupira, sucupira-branca ou faveira é amplamente utilizada pela medicina popular para tratar inflamações, reumatismo, dor de garganta e distúrbios respiratórios (CARVALHO *et al.*, 1999; HANSEN, HARAGUCHI, ALONSO, 2010; PACHECO *et al.*, 2019).

O oleorresina de *P. emarginatus* pode ser obtido por prensagem de sementes apresentando cor âmbar. Este óleo tem sido considerado uma fonte rica em terpenóides. Dados da literatura demonstram que os terpenos do tipo vouacapânicos (6 α ,7 β -diacetovouacapano; 6 α ,7 β -dihidroxivouacapano-17 β -oato de metila e o ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico), diterpeno (geranilgeraniol) e o sesquiterpeno (β -cariofileno), (**Figura 4**), estejam envolvidos com as propriedades anti-inflamatórias e antinociceptiva do óleo dos frutos de *Pterodon* em modelos de edema de pata induzido por carragenina (CARVALHO *et al.*, 1999; SPINDOLA *et al.*, 2009; GARCERAN, *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018). Apesar de praticamente não haver estudos de mecanismo de ação do óleo de sucupira e/ou de seus constituintes majoritários, Carvalho *et al.* (1999) e Santos *et al.* (2018) relatam que a ação anti-inflamatória do extrato hexânico de sucupira em modelo inflamatório de edema de pata induzido por carragenina pode ser capaz de bloquear a resposta à prostaglandina E2 sugerindo a ligação com o ácido 6 α , 7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico, (**Figura 4**).

Sesquiterpenos majoritários tais como β -cariofileno, germacreno, β -elemeno e γ -muuroleno foram identificados no óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* (ORTIZ-ZAMORA *et al.*, 2020; ALVES *et al.*, 2013) e estão associados à atividade anti-inflamatória (CHAIBUB *et al.*, 2013; BENTO *et al.*, 2011). Dutra *et al.* (2009), avaliou ação antiulcerogênica de óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* (composto majoritário β -cariofileno, 35,9%) pela modulação de óxido nítrico (NO) e Interleucina 1 (IL-1).

Figura 4- Substâncias β -cariofileno e ácido 6 α ,7 β -dihidroxivouacapan-17 β -óico.



Fonte: Autora (2021).

Essas características bioativas atribuem ao óleo de sucupira branca um potencial produto adjuvante para prevenir e aliviar sintomas da mucosite. Porém, os óleos são lipofílicos, não apresentam solubilidade em água e consequentemente nos fluidos biológicos. Ao serem administrados via oral são emulsionados no TGI para permitir sua absorção. Ao empregar óleos com potencial atividade farmacológica faz-se necessário o emprego de tecnologias para melhor veiculação de substâncias oleosas. Nesta perspectiva, o uso de sistemas coloidais de tamanhos nanométricos são uma estratégia inovadora para criar um sistema transportador direcionado e controlado na liberação de substâncias ativas (WILCZEWSKA *et al.*, 2012).

3.4 NANOESTRUTURAS

A utilização de sistemas de liberação controlada de fármacos tem sido uma área de intensa pesquisa. Neste contexto destacam-se as nanoestruturas como estratégias estudadas para a administração de fármacos (WILCZEWSKA *et al.*, 2012; ORTIZ-ZAMORA *et al.*, 2020). Os nanocarreadores são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetros em nanoescala (inferiores a 1 μ m) e possuem características físico-químicas adequadas ao direcionamento das moléculas dos fármacos no organismo vivo (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Nanoestruturas utilizadas para aplicações farmacêuticas necessitam ser biocompatíveis e não tóxicas. Algumas das vantagens que esses sistemas possuem são referentes à proteção de substâncias

lábéis e voláteis como os óleos essenciais (PRAKASH *et al.*, 2018); direcionamento a alvos específicos (sítio-especificidade) (VERMA *et al.*, 2017); incorporação de substâncias hidrofílicas e lipofílicas (ANTON; SAULNIER; BENOIT, 2016); proteção contra inativações químicas ou enzimáticas de peptídeos (BRAUN *et al.*, 2016); melhoria na biodisponibilidade e redução da dose terapêutica e toxicidade (JAIN *et al.*, 2018).

Apesar das vantagens alguns desses sistemas apresentam algumas desvantagens, como: toxicidade, ausência de biocompatibilidade de alguns materiais utilizados e elevado custo de obtenção, comparado com as formulações farmacêuticas convencionais. Além disso, o direcionamento de substâncias ativas pelos nanosistemas convencionais é limitada pela sua rápida opsonização após administração intravenosa. Para contornar este último inconveniente, modificações na superfície de nanocarreadores com polímeros hidrofílicos têm sido desenvolvidas com o intuito de aumentar a liberação da substância ativa no local de ação e/ou diminuir ou retardar a adsorção de proteínas plasmáticas e, conseqüentemente prolongar o tempo de circulação das nanopartículas no organismo (OWENS, PEPPAS, 2006; AI *et al.*, 2011).

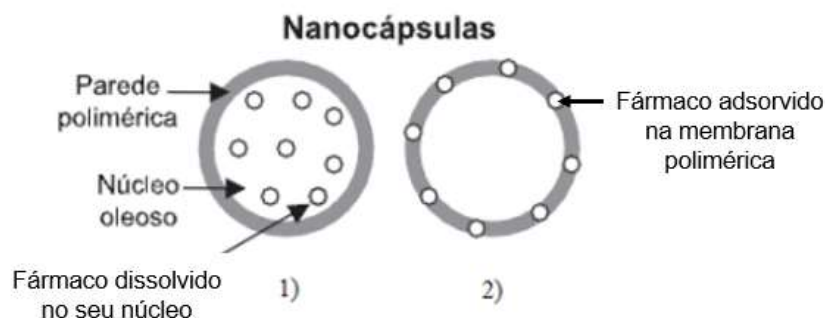
Ultimamente, os sistemas de liberação controlada de fármacos vêm recebendo atenção especial com o desenvolvimento de estratégias para a veiculação de fármacos e produtos vegetais bioativos anti-inflamatórios em nanosistemas tais como nanopartículas lipídicas sólidas (CARBONE *et al.*, 2018) nanoemulsões (OLIVEIRA *et al.*, 2017), lipossomas (RISALITI *et al.*, 2019) e nanocápsulas (LAMMARI *et al.*, 2021).

3.4.1 Nanocápsulas

As nanocápsulas são um tipo de nanopartícula polimérica vesicular, (**Figura 5**), constituídas por um fino invólucro de polímero e uma cavidade central com núcleo oleoso, no interior da qual a substância ativa pode estar dissolvida e/ou adsorvida na parede polimérica (DÚRAN, 2006; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; SOPPIMATH, 2001). Podem ser constituídas de diferentes polímeros, dependendo da via a ser empregada. O emprego de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis tal como a poli- ϵ -caprolactona (PCL) é desejável principalmente para a via parenteral. Eles são utilizados na concentração de 0,2 a 2% (p/p), assim como os diferentes tensoativos empregados na sua produção. Estes últimos podem ser de origem natural ou

sintéticos como o polisorbato (tensoativo hidrofílico não-iônico) (LEGRAND *et al.*, 1999).

Figura 5- Representação das nanocápsulas.

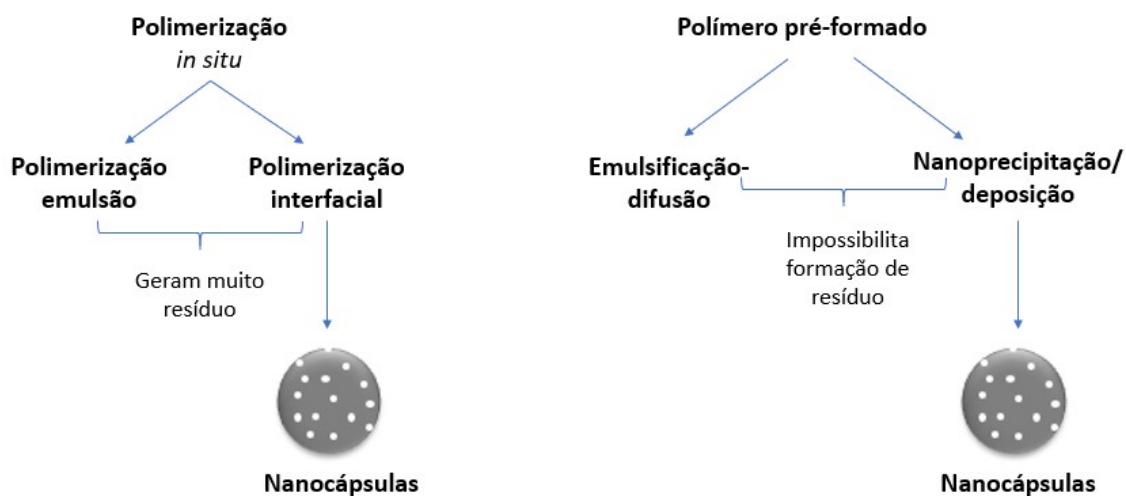


Fonte: Adaptado de Schaffazick e colaboradores (2003).

São vários os métodos desenvolvidos para a preparação de nanocápsulas descritos na literatura. Podem ser classificados em duas grandes categorias: a primeira que requer uma reação de polimerização interfacial de monômeros dispersos (polimerização *in situ*) e a segunda utiliza um polímero pré-formado (SOPPIMATH *et al.*, 2001), como apresentado na **Figura 6**. Independentemente do método de preparação, os produtos são obtidos como suspensões coloidais aquosas.

Os métodos que envolvem reações de polimerização *in situ*, frequentemente requerem processos adicionais de purificação do material coloidal obtido, de forma a eliminar moléculas residuais do meio de polimerização que podem ser eventualmente tóxicas, tais como monômeros, oligômeros ou surfactantes (COUVREUR *et al.*, 1995; REIS *et al.*, 2006). Já a utilização de métodos baseados em polímeros pré-formados tem a vantagem de evitar estes problemas e podem ser divididos em quatro métodos; emulsificação evaporação, *salting out*, emulsificação-difusão e nanoprecipitação. Durante a preparação destas técnicas uma solução orgânica constitui a fase interna das nanopartículas e uma fase aquosa contendo agentes estabilizadores constitui a fase externa. Geralmente apresentam baixa taxa de encapsulação de substâncias hidrossolúveis, sendo preferencialmente empregados para fármacos lipofílicos (QUINTANAR-GUERRERO *et al.*, 1998; FESSI *et al.*, 1989; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Figura 6- Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas.



Fonte: Adaptado de Jager (2008).

Uma técnica bastante empregada para encapsulamento de ativos é o método proposto por Fessi *et al.* (1989), um processo relativamente simples baseado na deposição de um polímero pré-formado e biodegradável, denominado como nanoprecipitação. A fase orgânica/oleosa é constituída de um polímero dissolvido num solvente orgânico (acetona, por exemplo) associado com o óleo (se necessário), tensoativo lipofílico (impedir a coalescência das nanogotículas) e a substância terapêutica. A fase aquosa é composta por água e um tensoativo do tipo óleo em água (o/a). Após a mistura das duas fases, o polímero precipita na interface pela redução da sua solubilidade. A difusão mútua dos solventes fornece uma energia favorável para a formação de nanogotas de óleo ao redor das quais ocorre a precipitação do polímero. Nota-se, imediatamente o aparecimento de uma suspensão leitosa devido à formação das nanocápsulas. Em seguida, o solvente é removido sob pressão reduzida e a formulação é concentrada através da evaporação de solventes obtendo-se partículas de tamanho entre de 100 a 500 nm (Fessi *et al.*, 1989).

3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

3.5.1 Avaliação morfológica

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de força atômica (MFA) têm sido empregadas na obtenção de informações relativas à forma nanocápsulas. A MET consegue determinar o tamanho e a espessura da parede das nanocápsulas. A técnica de criofratura também tem sido empregada para auxiliar a análise morfológica destes sistemas. Já MFA, uma sonda extremamente fina varre a superfície da amostra e fornece informações com alta resolução em três dimensões, em escala nanométrica, sendo capaz ainda de resolver detalhes de superfície em nível atômico (ANTON, SAULNIER, BENOIT, 2016; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

3.5.2 Tamanho da partícula

O diâmetro médio das nanocápsulas é uma importante determinação, uma vez que o tamanho das partículas representa um aspecto essencial na sua biodistribuição e depuração sanguínea (OWENS, PEPPAS, 2006). É desejável que as nanopartículas após sua obtenção, apresentem pequeno tamanho, distribuição unimodal e baixo índice de polidispersão. O tamanho das nanocápsulas varia geralmente entre 100 e 500 nm e depende de vários fatores: o método de preparação, a natureza e a concentração do polímero e do material encapsulado, a concentração de óleo na solução orgânica, além da velocidade de difusão da fase orgânica na aquosa, entre outros (LEGRAND *et al.*, 1999). Ainda, a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O método usual para a determinação da distribuição de tamanho das nanopartículas consiste no espalhamento dinâmico da luz (EDL) que utiliza a taxa de mudança das flutuações da luz geradas pela movimentação das partículas para determinar a distribuição de tamanho das partículas. A microscopia de força atômica (MFA) também vem sendo utilizada para determinação de tamanho e estudo da morfologia das nanopartículas (LAMMARI *et al.*, 2021; ALI *et al.*, 2015).

3.5.3 Potencial zeta

O potencial zeta reflete o potencial de superfície das partículas, o qual é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. O potencial zeta pode ser uma maneira efetiva de controlar o comportamento de nanopartículas, já que indica mudanças no potencial de superfície e na força de repulsão entre as partículas. A intensidade da carga pode ser determinada pela medida da mobilidade eletroforética das partículas em um campo elétrico aplicado. Assim, seus valores podem ser positivos ou negativos, dependendo da natureza do polímero e dos tensoativos empregados (SOPPIMATH *et al.*, 2001). Enquanto polímeros do tipo poliéster e lecitinas favorecem uma carga negativa na interface, a quitosana, um polímero natural produz partículas de carga positiva (LEGRAND *et al.*, 1999). Em módulo, um valor de potencial zeta relativamente alto é importante para uma boa estabilidade físico-química da suspensão coloidal. (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUTOS QUÍMICOS

A cisplatina (CDDP) e o polímero de poli- ϵ -caprolactona (PCL, 42.500 Da) foram obtidos da Sigma (St Louis, MO, EUA), lecitina (Lipoid® S75) da Lipoid (GmbH, Alemanha), cloreto de sódio da Synth (São Paulo, SP), Brasil). O ^{99m}Tc (pertechnetato) foi obtido como solução salina de um gerador de ^{99}Mo à base de alumina (IPEN/Brasil). O oleorresina de sucupira foi obtido previamente dos frutos de *Pterodon emarginatus* Vogel por prensagem a frio e doado pelo Prof. Edemilson da Universidade Federal de Goiás (Brasil). Todos os outros produtos químicos tais como, acetona, polisorbato 80, monooleato de sorbitano, cloreto de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio, fosfato de potássio monobásico, acetonitrila, isopropanol, utilizados neste estudo foram de grau analítico. A água foi purificada por osmose reversa (Simplicity 185, Millipore, Bedford, EUA).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO OLEORRESINA DE SUCUPIRA

O oleorresina de sucupira (OS) foi analisado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS / MS) usando um sistema UPLC-Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por eletropulverização no modo de íon negativo a uma tensão de 2,9 kV. A coluna utilizada foi uma Thermo Synchronis C18 (50 mm x 2,1 mm, i.d. 1,7 μm) mantida a 40 °C. A fase móvel consistiu de acetonitrila e água (7: 3) a uma vazão de 400 $\mu\text{L min}^{-1}$. Uma alíquota de OS foi dissolvida em isopropanol (1 mg mL^{-1}) e depois diluída com uma pequena quantidade da fase móvel (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (DEMUNER *et al.*, 1996; ARRIAGA *et al.*, 2000; MIRANDA *et al.*, 2014).

4.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

As nanocápsulas biodegradáveis contendo oleorresina de sucupira (NC OS) foram preparadas por deposição interfacial de um polímero pré-formado seguido da

evaporação do solvente conforme Fessi e colaboradores (1989). Para o preparo de NC OS, diferentes tensoativos e proporções foram empregados a fim de otimizar a proporção e os constituintes da formulação. Para o preparo da NC OS1, 5 mL de uma fase orgânica contendo 0,6 % de PCL, monooleato de sorbitano (Span 80 ou S80) 0,75% p/v e 2,5% v/v de OS em acetona foi preparada. Em seguida, a solução orgânica foi vertida em 10 mL de solução aquosa contendo de 0,75% p/v de polisorbato 80 (Tween 80 ou T80) (1:2). Seguiu-se agitando em agitador magnético por dez minutos para promover a formação das nanocápsulas. Em seguida, o solvente foi evaporado sob rotaevaporador para 5 mL mantendo-se a temperatura do banho em 40°C (Quimis, Brasil).

Para produção de NC OS2 com o tensoativo lecitina, o mesmo procedimento foi seguido, porém o Span 80 foi substituído por Lipoid S75 (0,75% p/v) na fase orgânica e a fase aquosa não continha nenhum tensoativo.

O diâmetro hidrodinâmico e a polidispersão das NC foram determinados a 25 °C pelo método de espalhamento dinâmico de luz (EDL) usando um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, UK) em três lotes diferentes. O potencial zeta (ζ) foi determinado por microeletroforese acoplada à anemometria laser Doppler no mesmo equipamento. As amostras foram analisadas após diluição de 1:25 em água. As medições foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como o diâmetro médio $\pm$ erro padrão da média.

4.4 ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS EM MEIO GASTROINTESTINAL SIMULADO

Para comprovar o efeito protetor da parede polimérica de nanocápsulas, fluidos gástrico e intestinal simulados foram usados de acordo com Ünal *et al.* (2015). A formulação de NC OS1 foi incubada em fluido gástrico simulado (FGS) pH 1,2 por 2 horas e fluido intestinal simulado (FIS) pH 6,8 por 6 horas com agitação a 37 °C. O FGS foi preparado dissolvendo 100 mg de cloreto de sódio (NaCl) em 50 mL de água deionizada contendo 0,35 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. FIS foi preparado dissolvendo 340,25 mg de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) em 50 mL de água. Em seguida, 44,8 mg de hidróxido de sódio (NaOH) foram adicionados para ajustar o pH do meio. Para cada meio, 1 mL de NC OS1 foi adicionado a 9 mL de meios simulados (em triplicata) e incubados conforme mencionado anteriormente. A

distribuição de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das nanoestruturas foram determinados antes e após a incubação.

4.5 ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS DURANTE ESTOCAGEM

O estudo de estabilidade foi realizado para NC OS1 e NC OS2. Após a produção das NC elas foram armazenadas à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, protegidas da luz. Foram avaliadas suas características físico-químicas, como tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta nos tempos inicial 0, 7, 14, 21 e 30 dias após o preparo.

4.6 ANIMAIS

Camundongos Swiss machos foram utilizados pesando entre 25-31 g, com 4 semanas de idade. Os animais foram alojados em condição padrão em uma área com ciclo claro/escuro e receberam água e alimentos *ad libitum* no biotério da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo nº. 66 / 2018.

4.7 DELINEAMENTO DOS EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos seguintes (n= 6/ grupo):

Tabela 1- Distribuição e esquema de tratamento dos grupos experimentais.

GRUPOS	TRATAMENTOS
CTL (controle)	água por gavagem + IP salina estéril
MUC (mucosite)	água por gavagem + mucosite
OS1	(OS + 0.75% T80 e S80 + 10 mL água) por gavagem + mucosite
NC OS1	NC OS (0.75% T80 e S80) por gavagem + mucosite
T	(0.75% T80 + 10 mL água) por gavagem + mucosite
TS	(0.75% T80 + 0.75% S80 + 10 mL água) por gavagem + mucosite
LEC	(0.75% Lipoid S75 + 10 mL água) por gavagem + mucosite
OS2	(OS + 0.75% Lipoid S75 + 10 mL água) + mucosite

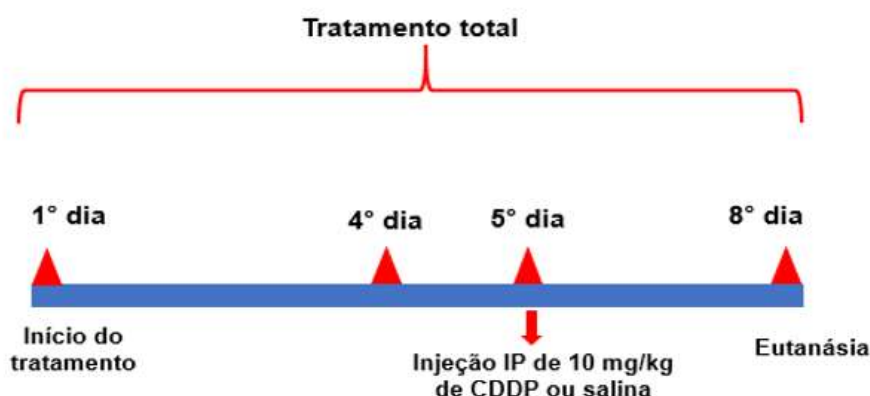
NC OS2

NC OS (0.75% Lipoid S75) + mucosite

Abreviaturas: IP (injeção intraperitoneal); OS1 (mucosite tratado com OS1); OS2 (mucosite tratado com OS2); NC OS1 (mucosite tratado com NC OS1); NC OS2 (mucosite tratado com NC OS2); T (mucosite tratado com Tween 80/T80); TS (mucosite tratado com Tween 80 e Span 80/S80); LEC (mucosite tratado com lecitina/Lipoid S75).

Água, tensoativos, OS e NC OS (50 mg/kg/dia de OS) foram administrados diariamente por gavagem durante 7 dias, antes e após indução da mucosite. A dose de OS foi baseada em dados da literatura (ALBERTI *et al.*, 2014). A mucosite foi induzida pela administração de uma dose única de CDDP (10 mg/kg) por via intraperitoneal (IP) 5 dias após o início do tratamento (ARAÚJO *et al.*, 2017) (**Figura 7**). O grupo controle recebeu a mesma dose intraperitoneal de solução salina estéril. Os animais foram monitorados quanto à variação ponderal e consumo de ração. O modelo de mucosite intestinal foi baseado em modelo previamente descrito por Bajic e colaboradores (2016). No 8º dia os animais foram anestesiados e sacrificados para a coleta do íleo e realização das análises.

Figura 7- Esquema do protocolo experimental.



Fonte: Autora (2021).

4.7.1 Variação Ponderal e consumo alimentar

A verificação do consumo alimentar e variação do peso corporal foram realizados durante os oito dias de experimento. A pesagem da ração e dos animais foi executada através do uso de balança semianalítica (Filizola-MF, São Paulo, Brasil). Para a avaliação do consumo alimentar, a ração foi pesada em balança diariamente

e foi feito o cálculo da diferença entre o peso da ração ofertada e a sobra. A variação de peso e alimentar foi avaliada em gramas (g) antes e após a indução da mucosite.

4.7.2 Permeabilidade Intestinal (PI)

Para avaliar a permeabilidade intestinal, foi empregada uma solução contendo ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) radiomarcado com tecnécio-99m (^{99m}Tc). No 8º dia do experimento, os animais receberam 0,1 mL por gavagem de ^{99m}Tc -DTPA contendo 18,5 MBq de atividade. Após quatro horas, os camundongos foram anestesiados e o sangue coletado, pesado e colocado em tubos apropriados para determinação da radioatividade. A radioatividade da dose padrão e das amostras de sangue foi determinada em um cintilador automático (Wizard, Perkin Elmer, Finlândia). Uma dose padrão correspondente a 0,1 mL da solução com ^{99m}Tc -DTPA também foi submetida à determinação da radiação para a correção do decaimento do ^{99m}Tc (ARAÚJO *et al.*, 2017). Os resultados foram comparados com a dose padrão e os dados foram expressos como % dose/g de sangue, usando a seguinte equação:

$$\%dose = \frac{(cpm \text{ de sangue})}{(cpm \text{ de dose administrada})} \times 100$$

Onde cpm é contagem por minuto.

4.7.3 Análise histomorfométrica

Os segmentos de íleo foram processados para análise histológica, conforme descrito anteriormente (ARAÚJO *et al.*, 2017). Resumidamente, os tecidos foram enrolados, fixados em solução de formalina tamponada a 10% e as seções histológicas (4-5 μm) foram coradas com hematoxilina e eosina para interpretação histológica de rotina de acordo com escore histológico (**Tabela 2**), sendo escore 0 (sem alteração). Escore 3 (alteração grave) (SOARES *et al.*, 2008). As medições das vilosidades do íleo foram realizadas por microscopia e a altura de dez vilosidades (6 campos microscópicos por amostra e n = 6 / grupo) foi determinada com uma objetiva de 20 $\times$. As imagens fotográficas foram realizadas em microscópio Olympus BX51 acoplado à câmera digital por meio do programa SPOT Advanced. As imagens

digitalizadas foram analisadas usando o software Image J 1.52a (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). O resultado foi expresso como a média de dez vilosidades em $\mu\text{m}/\text{animal}$ por grupo.

Tabela 2- Classificação dos escores histopatológicos.

ESCORE	AVALIAÇÃO DOS ACHADOS HISTOLÓGICOS
0	Histologia normal
1	Perda moderada da arquitetura das criptas e vilosidades, escassa infiltração de células inflamatórias, vacuolização e edema.
2	Considerável encurtamento de vilosidades e criptas com células achatadas, necrose, intenso infiltrado inflamatório, vacuolização e edema.
3	Mesmas alterações do anterior acrescido acometimento da camada muscular com presença de edema e vacuolização.

Fonte: adaptado de Soares e colaboradores (2008).

4.7.4 Atividades de Mieloperoxidase (MPO) E N-Acetilglucosaminidase (NAG)

A extensão da infiltração de neutrófilos e macrófagos no tecido do íleo foi mensurada pelo teste das atividades enzimáticas da mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG), respectivamente (ARAÚJO *et al.*, 2017; LEONEL *et al.*, 2013).

Em resumo, uma porção do íleo dos animais foi removida, homogeneizada e congelada a -80°C até o momento da análise. As amostras de tecido foram homogeneizadas e centrifugadas. Os pellets foram dissolvidos em brometo de hexadecil trimetil amônio (HETAB) a 0,5% em tampão fosfato e, após homogeneização e sessões de congelamento / descongelamento, as suspensões foram centrifugadas e os sobrenadantes foram utilizados para a quantificação das enzimas. A atividade MPO foi avaliada pela adição de tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich) ao sobrenadante seguida de incubação a 37°C por 5 min. A reação foi interrompida com 50 μL de 1 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e a absorvância lida a 450 nm. Os resultados foram expressos em unidades relativas de acordo com a absorvância obtida. Para a atividade NAG, os precipitados foram dissolvidos em Triton X-100 (0,1%, Sigma-Aldrich) e centrifugados antes que o sobrenadante (100 μL) fosse

adicionado à solução de p-nitrofenil-N-acetil b-D-glucosamina (100 µL) em tampão citrato-fosfato. A reação foi parada pela adição de tampão de glicina (100 µL) e lida a 400 nm. O teor de proteínas das amostras foi determinado pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Após a quantificação de proteínas, os resultados obtidos para as atividades enzimáticas de MPO e NAG foram corrigidos e expressos por mg de proteína.

4.7.5 Análise das concentrações de citocinas

Para avaliar a concentração de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10), 100 mg do íleo de cada animal foram coletados e homogeneizados em solução de extração de citocinas (PBS suplementado com inibidores de protease: PMSF 0,1 mM, cloreto de benzetônio 0,1 mM, EDTA 10 mM e 20 KI de aprotinina A), na proporção de 1 mL de solução para 100 mg de tecido, utilizando-se homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T10 basic). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior dosagem por ELISA utilizando kits comerciais (R & D Systems, Minneapolis, EUA).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Os resultados foram avaliados pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* quanto à normalidade. Os dados com distribuição normal foram analisados por ANOVA *one-way* e/ou *two-way* e pós teste de *Newman-Keuls*, *Tukey* e/ou teste t de Student, enquanto os dados não paramétricos foram testados usando *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunn's*. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE SUCUPIRA

Foram identificados seis diterpenos (14,15-epoxigeranilgeraniol, ácido vouacapan-17-óico, ácido vouacapandioico, 6 α -hidroxivouacapano, ácido vouacapanóico e ácido p-hidroxibenzóico) e duas lactonas (Vouacapan-17 β , 7 β – lactona e 6 α -hidroxivouacapano-7 β -17 β -lactona).

Tabela 3- Compostos identificados no OS por LC-HRMS/MS.

R _t (min)	Experimental m/z	MS/MS	Fórmula molecular	Erro (ppm)	Composto ID
1.93	329.17479	285.18481 267.17448	C ₂₀ H ₂₅ O ₄	-1.04	6 α -hydroxyvouacapano-7 β - 17 β -lactona
1.97	305.24872	-	C ₂₀ H ₃₃ O ₂	0.12	14,15-epoxigeranilgeraniol
2.08	377.23238	331.19298 315.19482 287.20140	C ₂₂ H ₃₃ O ₅	-0.97	Desconhecido
2.15	315.19660	271.20694	C ₂₀ H ₂₇ O ₃	0.03	Ácido vouacapan-17-óico
2.15	313.18138	269.19229	C ₂₀ H ₂₅ O ₃	0.46	Vouacapan-17 β , 7 β – lactona
2.20	347.18579	303.19644 259.20731	C ₂₀ H ₂₇ O ₅	-0.61	Ácido vouacapandioico
2.20	331.19231	287.20087 259.20630	C ₂₀ H ₂₇ O ₄	0.83	Desconhecido
2.36	301.21820	-	C ₂₀ H ₂₉ O ₂	0.90	6 α -Hidroxivouacapano
2.51	317.21153	273.22212	C ₂₀ H ₂₉ O ₃	-0.69	Ácido vouacapanóico
3.75	137.02380	93.03422	C ₇ H ₅ O ₃	-0.62	Ácido p-Hidroxibenzóico

R_t: tempo de retenção

ID: identificado

ppm: partes por milhão

Os constituintes comuns dos frutos das espécies do gênero *Pterodon* são diterpenos lineares, derivados de geranilgeraniol e/ou diterpenos tetracíclicos com esqueletos de vouacapano (HOSCHEID, CARDOSO, 2015; FAVARETO *et al.*, 2017), estando de acordo com nossos dados. Dentre as atividades de tais compostos, o diterpeno 14,15-epoxygeranilgeraniol foi identificado como uma substância ativa no

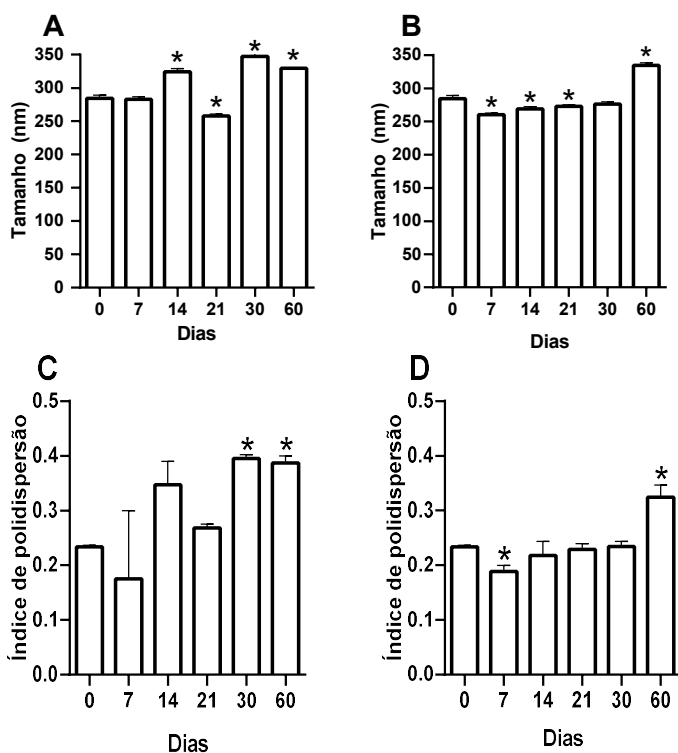
óleo dos frutos de *Pterodon pubescens* Benth, possuindo atividade profilática contra infecções por cercárias de *Schistosoma mansoni* (SAGAMI, SWIEZEWSKA, SHIDOJI, 2018). Os diterpenos vouacapanos são reportados na literatura como substâncias promissoras em desempenhar ação anti-inflamatória e antinociceptiva em óleo de sucupira (SANTOS *et al.*, 2018; GALCERAN *et al.*, 2011).

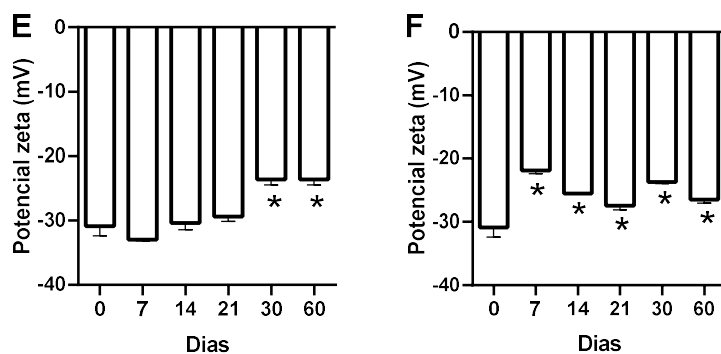
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

5.2.1 Nanocápsulas 1 (NC OS1)

Foram produzidas nanocápsulas poliméricas contendo óleo de sucupira utilizando-se os tensoativos Tween 80 e Span 80 (denominada NC OS1) e a sua estabilidade avaliada durante 60 dias após armazenamento em temperatura ambiente (TA) (25°C) e em geladeira (4°C). Os dados obtidos para as características físico-químicas das NC produzidas estão apresentados na **Figura 8**.

Figura 8- Caracterização físico-química da NC OS1. Tamanho da NC após armazenamento em TA (**A**) e 4°C (**B**). Índice de polidispersão da NC em TA (**C**) e 4°C (**D**). Potencial zeta da NC em TA (**E**) e 4°C (**F**). Os resultados foram comparados com o dia 0 (inicial). * indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA *One-way* e pós-teste de *Tukey*). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.





O tamanho inicial apresentado pela nanocápsula polimérica contendo OS foi inferior a 300 nm e estável até 30 dias de armazenamento a 4 °C. Além disso, os resultados demonstram que a NC OS1 apresentou maior variação de tamanho quando armazenada a TA em relação a 4 °C.

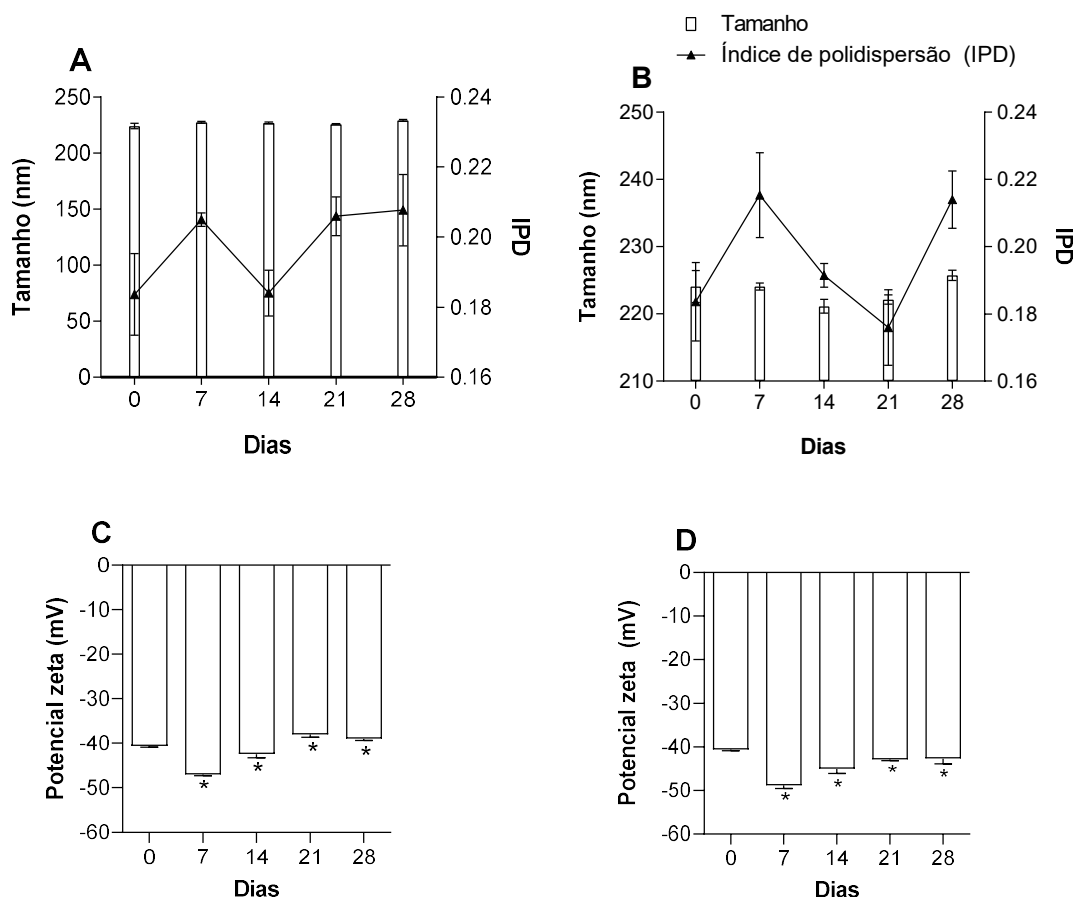
O índice de polidispersão (IPd) obtido inicialmente para a formulação foi inferior a 0,3, **Figura 8**. O mesmo comportamento observado para o tamanho pode ser encontrado em relação ao IPd na NC quando armazenada a temperatura ambiente. A NC OS1 apresentou maior estabilidade do IPd a 4°C até o 30º dia. Valores menores que 0,3 indicam sistemas monodispersos.

Em relação ao potencial zeta, foram determinados valores iniciais negativos, sendo que o valor inicial para NC OS1 é superior em módulo (~ -30 mV). Nota-se que em ambas as condições o potencial zeta diminuiu ao longo dos 30 dias.

5.2.2 Nanocápsulas 2 (NC OS2)

Foram produzidas nanocápsulas poliméricas contendo óleo de sucupira utilizando-se o tensoativo lecitina (denominada NC OS2) e a estabilidade avaliada durante 30 dias após armazenamento em temperatura ambiente (25°C) e em geladeira (4°C). Os dados obtidos para as características físico-químicas da NC produzida estão demonstrados na **Figura 9**.

Figura 9- Caracterização físico-química da NC OS2. Tamanho da NC e índice de polidispersão após armazenamento em TA **(A)** e geladeira **(B)**. Potencial zeta da NC em TA **(C)** e geladeira **(D)**. Os resultados foram comparados com o dia 0 (inicial). * indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$; ANOVA One-way e pós-teste de Tukey). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média.



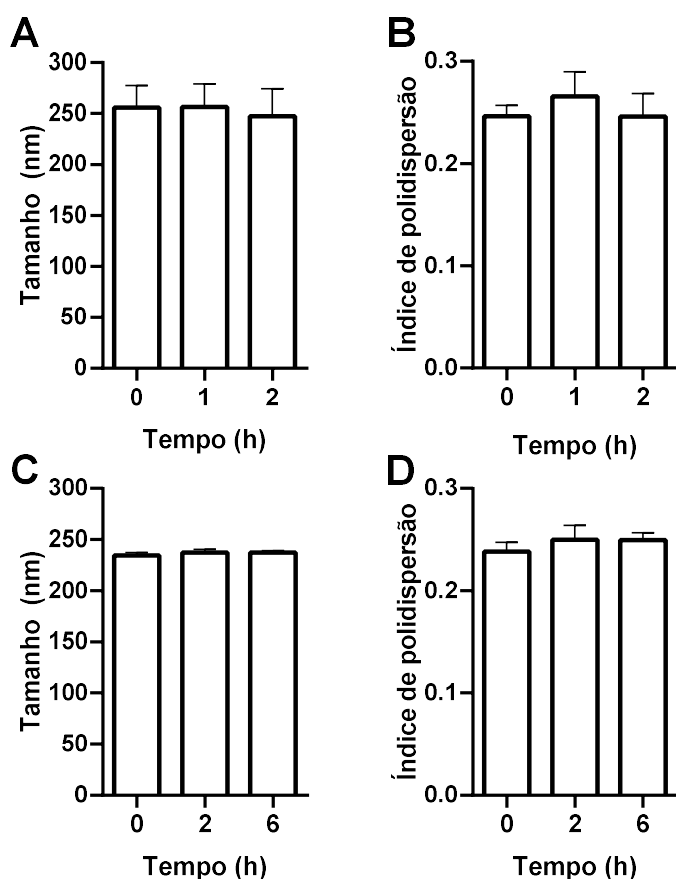
O tamanho inicial apresentado pela NC OS2 foi inferior a 250 nm e estável até 30 dias de armazenamento tanto em TA como a 4 °C. Além disso, os resultados demonstram que a NC OS2 comparada a NC OS1 não apresentou maior variação de tamanho quando armazenada a TA.

O índice de polidispersão obtido inicialmente para a formulação foi inferior a 0,3, **Figura 9**. A NC OS2 apresentou estabilidade do IPd da mesma maneira em TA e 4°C até o 30º dia, indicando mais uma vez a característica de sistema monodisperso. Além disso, o potencial zeta obteve valores iniciais negativos e manteve-se durante 30 dias em ambas as temperaturas de armazenamento, sendo que o valor inicial para NC OS2 foi superior em módulo (~ -30 mV) e não se alterou no decorrer dos dias de avaliação.

5.3 ESTABILIDADE DAS NANOCÁPSULAS EM MEIO GASTROINTESTINAL SIMULADO

Para investigar o efeito protetor da parede polimérica da nanocápsula em sua estabilidade, fluidos gástrico e intestinal simulados foram empregados. O tamanho das partículas e IPd foram determinados durante 2 h (FGS) e 6h (FIS) de incubação a 37 °C e os resultados estão apresentados a seguir.

Figura 10– Caracterização físico-química da NC OS1 em meio gastrointestinal simulado. Estabilidade da NC em fluido gástrico (A, B) e fluido intestinal (C, D) simulados, após 2 e 6 h, respectivamente. Dados analisados pelo teste ANOVA *One-way* e pós-teste de *Tukey*. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Os resultados foram comparados com tempo 0 h (inicial).



De acordo com a **Figura 10**, não houve alteração de tamanho nem de IPd ($p > 0,05$) no decorrer do estudo após incubação de NC OS1 em ambos os meios simulados. Além disso, o IPd foi inferior a 0,3 indicando um sistema monodisperso. Em vista disso, pode-se inferir que a metodologia de obtenção das nanopartículas por nanoprecipitação foi eficaz na produção de nanocápsula polimérica contendo OS para

administração por via oral, uma vez que suas características físico-químicas não sofreram alterações.

Os dados relativos as propriedades físico-químicas das NC OS1 e NC OS2 apresentadas nas **Figuras 8, 9 e 10** demonstram a distribuição de tamanho entre 200 e 300 nm, IPd menor que 0,3 e potencial zeta negativo, que estão de acordo com a literatura para nanocápsulas poliméricas (ARAÚJO *et al.*, 2019; VILLALBA *et al.*, 2016). As características dessas formulações indicaram que elas poderiam ser usadas oralmente para alcançar epitélio intestinal inflamado, evidenciado também pela estabilidade da NC OS1 em fluido gástrico e intestinal simulado, estando de acordo com Ünal e colaboradores (2015).

5.4 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NC OS1 EM MODELO DE MUCOSITE

A mucosite é uma condição/complicação clínica decorrente da terapia antineoplásica, caracterizada por inflamação e/ou ulceração da mucosa do TGI. Não existe na literatura diagnóstico ou tratamento para a mucosite intestinal induzida por quimioterápicos. A planta *Pterodon emarginatus* Vogel, dentre as diversas ações biológicas possui propriedade anti-inflamatória em modelos de artrite e edema (CARVALHO *et al.*, 1999; HANSEN, HARAGUCHI, ALONSO, 2010; GALCERAN *et al.*, 2011; PASCOA *et al.*, 2015). Sua composição fitoquímica demonstra a presença de sesquiterpenos e diterpenos que podem estar associados com atividade anti-inflamatória (HOSCHEID, CARDOSO, 2015; GALCERAN *et al.*, 2011), detendo potencial tratamento na mucosite intestinal.

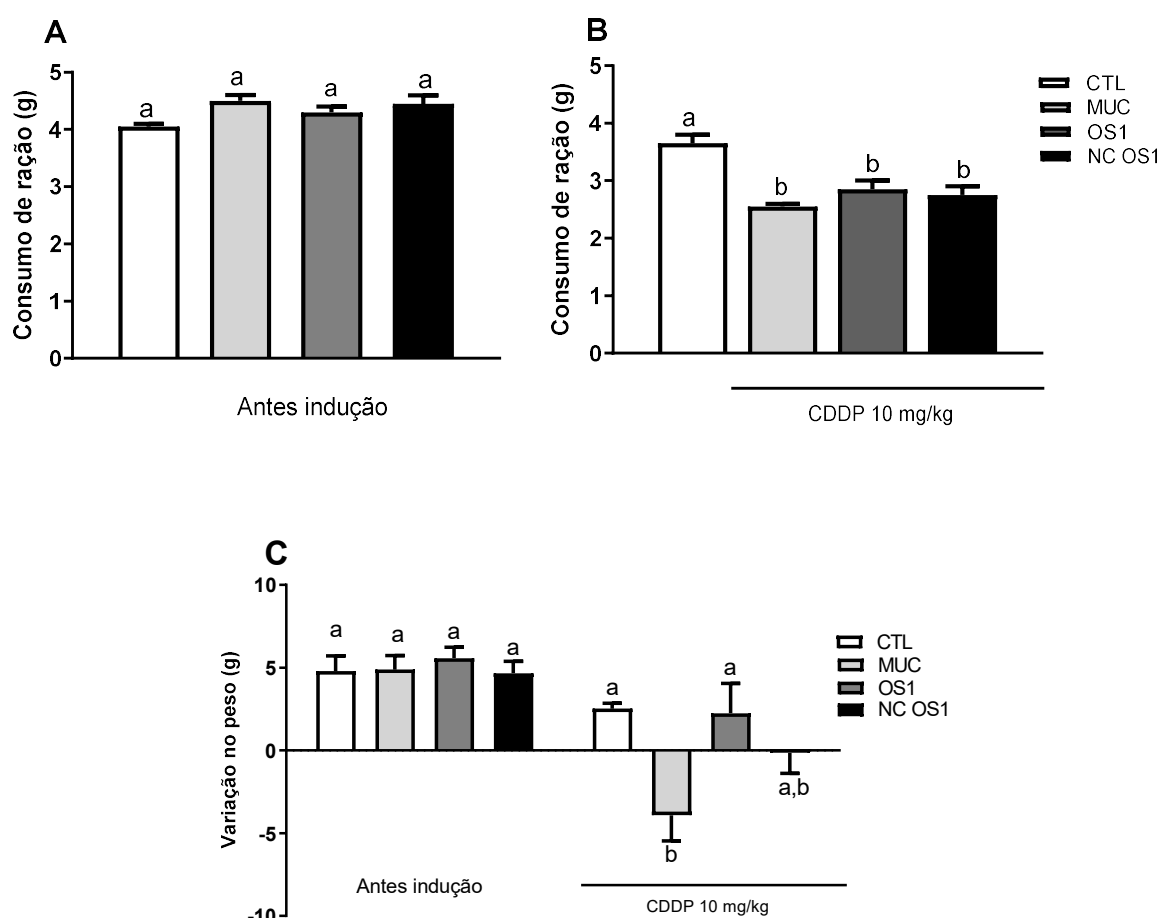
A dose do quimioterápico cisplatina teve como base os resultados publicados pelo nosso grupo de pesquisa onde a administração de CDDP 10 mg/kg via IP foi capaz de induzir mucosite intestinal em modelo experimental (ARAÚJO *et al.*, 2017). Desta forma, prosseguiu-se com a avaliação do efeito anti-inflamatório de OS livre e encapsulado em nanocápsulas (NC OS) em modelo experimental de mucosite intestinal. Os resultados desse trabalho confirmaram que a administração IP de CDDP foi capaz de induzir perda de peso nos animais e lesões significativas na mucosa intestinal. Isto refletiu, perceptível alteração da arquitetura tecidual e encurtamento das vilosidades, ainda com aumento da permeabilidade intestinal e presença de infiltrado inflamatório. Além disso, não há na literatura estudo abordando uso do OS como forma de tratamento ou manejo nessa condição. À vista disso, o modelo utilizou

a CDDP em dose única e tratamento via oral com óleo de sucupira a 50 mg/kg. A dose de OS foi baseada em dados da literatura onde concentrações de 50 e 100 mg/kg de óleo essencial de sucupira foram administrados via oral em modelo de encefalomielite (ALBERTI *et al.*, 2014).

5.4.1 Variação ponderal antes e após indução da mucosite

Durante todo o período experimental, os animais foram monitorados quanto ao peso e consumo de ração, como forma de avaliar os sinais clínicos dos animais antes e após indução de mucosite. A **Figura 11** mostra a variação ponderal dos animais durante os sete dias do protocolo experimental.

Figura 11- Consumo alimentar e variação do peso dos animais antes e após a indução da mucosite. Os dados foram analisados por ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Tukey* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$). Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$). Abreviaturas: CTL (controle); MUC (mucosite); OS1 (mucosite tratado com OS1); NC OS1 (mucosite tratado com NC OS1).



No presente trabalho, observa-se que o peso dos animais dos quatro grupos experimentais, não apresentou diferenças estatísticas ($p>0,05$) antes da indução de mucosite. Após indução de mucosite, pode-se observar perda de peso significativa ($p<0,05$) dos animais do grupo MUC quando comparados aos grupos CTL. A administração de OS não induziu perda de peso, porém a administração de NC OS1 induziu perda de peso sendo que seu valor ficou intermediário entre CTL e MUC.

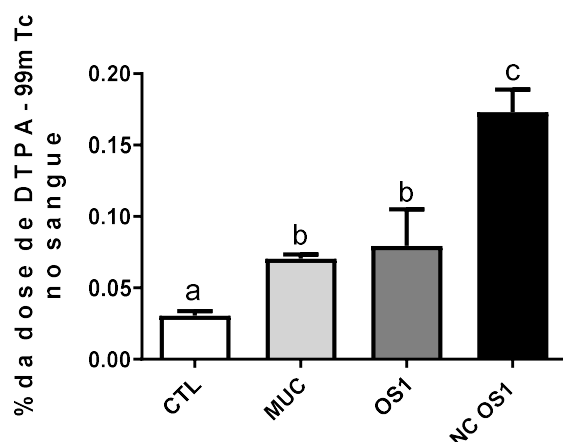
A redução no consumo de ração e a perda de peso pode ser explicada pelos mecanismos envolvidos na patogênese da mucosite intestinal, como processo inflamatório e liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- α , que induzem danos e ulcerações no epitélio e, conseqüentemente disfunção da barreira intestinal prejudicando a absorção dos nutrientes (WU *et al.*, 2020; BARROS, 2018; GALDINO *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2017; LEOCÁDIO *et al.*, 2015).

Dados da literatura sobre mucosite intestinal mostram alguns estudos que avaliaram a atividade anti-inflamatória de óleos. Mashtoub, Tran e Howarth (2013) avaliaram em modelo de mucosite, 5-FU via IP em dose única (150 mg/kg) no 5º de protocolo experimental, o efeito do óleo de Emu (*Dromaius novaehollandiae*) durante 11 dias. Não houve alteração do peso entre os grupos antes da indução da mucosite. Entretanto, após a indução, o peso corporal foi significativamente menor nos animais tratados com óleo de Emu em relação aos controles. Em outro estudo, realizado por Galdino e colaboradores (2018) a mucosite foi induzida com dose única de 5-FU no 7º dia do protocolo experimental e o tratamento consistiu na suplementação com 240 mg de fruto-oligossacarídeos por gavagem, diariamente, em grupos pré-tratamento e tratamento. Após a indução de mucosite, ocorreu perda de peso em todos os grupos em comparação ao grupo controle. Os dados descritos convergem com a investigação atual.

5.4.2 Avaliação da permeabilidade intestinal (PI)

A avaliação da PI foi realizada 3 dias após a indução da mucosite. Foi verificada aumento de PI nos animais do grupo MUC e OS1 em relação ao CTL ($p<0,05$) (**Figura 12**). Além disso, verificou-se maior PI no grupo NC OS1 em relação a todos os grupos experimentais ($p<0,05$).

Figura 12 - Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de ^{99m}Tc -DTPA no sangue de animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; *One-way ANOVA* e pós teste de *Newman-Keuls*). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$).



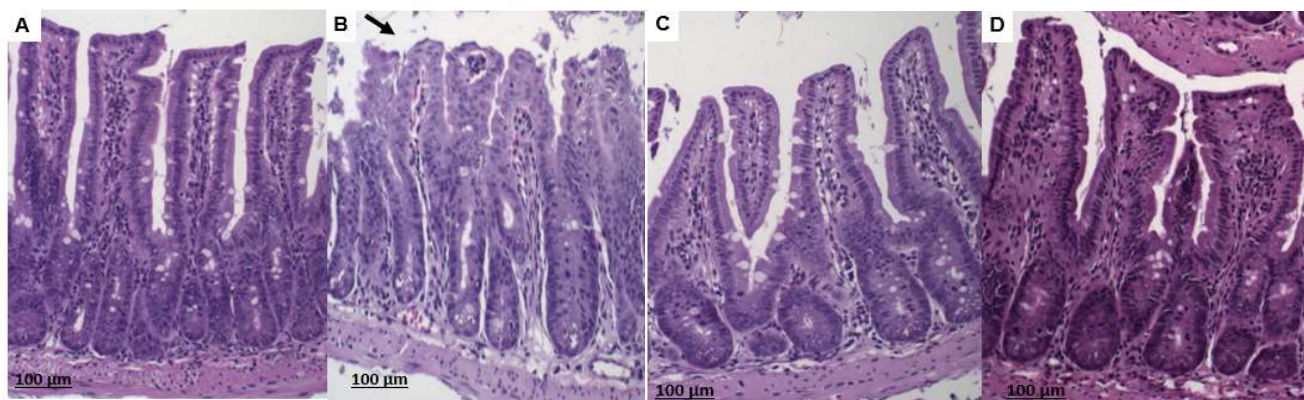
Além disso, uma característica importante da mucosite é a alteração da barreira intestinal que pode levar ao aumento da PI. Assim, para a análise da PI utilizou-se ^{99m}Tc -DTPA, administrado por gavagem, com o propósito de detectar sua passagem do lúmen intestinal para a corrente sanguínea. Este radiofármaco é minimamente absorvido pelo intestino delgado em condições fisiológicas normais, porém níveis elevados no sangue indicam dano de epitélio intestinal, mostrando-se como uma ferramenta útil no estudo de doenças inflamatórias intestinais (GALDINO *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2015). Estudo relatado na literatura, em modelo de mucosite induzido por CDDP demonstrou aumento significativo dos níveis de PI através de ^{99m}Tc -DTPA na corrente sanguínea (ARAÚJO *et al.*, 2017). Outrossim, os resultados obtidos para o grupo MUC do presente estudo também mostraram aumento significativo dos níveis de ^{99m}Tc -DTPA no sangue. De modo análogo, o grupo OS também apresentou aumento de permeabilidade indicando que nessa concentração OS não foi capaz de reduzir a PI associada aos efeitos tóxicos da CDDP. Barros e colaboradores (2017) mostraram aumento significativo da PI dos animais tratados com dieta enriquecida com ácido linoléico conjugado em modelo de mucosite induzida por 5-FU comparado com grupo MUC, similarmente ao resultado encontrado neste trabalho. Já o grupo NC OS1 demonstrou PI significativamente maior quando comparado aos grupos MUC e OS. Isto pode estar relacionado com maior superfície de contato das nanoestruturas no epitélio intestinal em relação ao óleo não encapsulado, o que aumenta a absorção de nutrientes (DE MELLO *et al.*, 2016) e nesse estudo contribuiu para aumento da PI. Lamson e colaboradores (2020) demonstraram que nanopartículas aniônicas após administração oral aumentaram a

PI através de alterações nas junções firmes de forma reversível e não-tóxica permitindo uma maior absorção de proteínas. Não foram encontrados estudos na literatura que avaliassem permeabilidade intestinal associada ao uso de plantas medicinais ou de seus derivados para o tratamento da mucosite intestinal.

5.4.3 Análise histopatológica e morfométrica do íleo

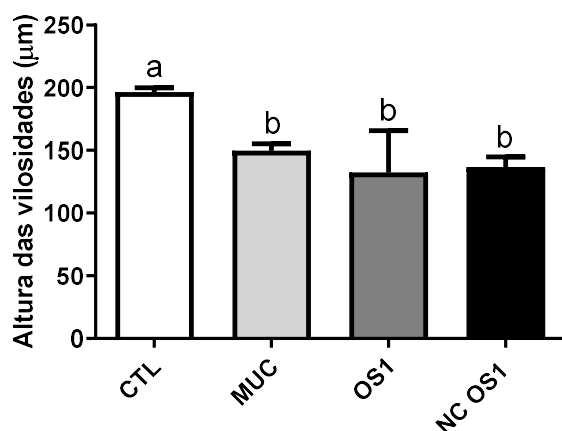
A **Figura 13** exibe as alterações histopatológicas observadas no íleo dos animais dos 4 grupos avaliados. Em (A) observa-se que o grupo controle apresenta estrutura morfológica dentro dos parâmetros de normalidade, com preservação das vilosidades, epitélio íntegro e camada muscular. Em contraste, no grupo MUC (B) pode-se observar alteração da arquitetura tecidual e camada muscular com ulceração e redução do tamanho das vilosidades além da presença de processo inflamatório. Os grupos OS1 (C) e NC OS1 (D) apresentaram menor dano tecidual, indicado pela preservação parcial das vilosidades intestinais e das criptas e diminuição do infiltrado inflamatório. Além disso, a camada muscular da mucosa encontra-se relativamente conservada.

Figura 13 - Análise histológica do íleo. Grupo - CTL (A); MUC (B); OS1 (C); NC OS1 (D). (A) Aspecto histológico normal com arquitetura da parede intestinal preservada e sem inflamação. (B) Perda da arquitetura tecidual e encurtamento das vilosidades (**seta**) com presença de infiltrado inflamatório. (C e D) Preservação parcial das vilosidades e da arquitetura tecidual. Barra 100 μ m (Objetiva de 20X). Coloração HE (n=6).



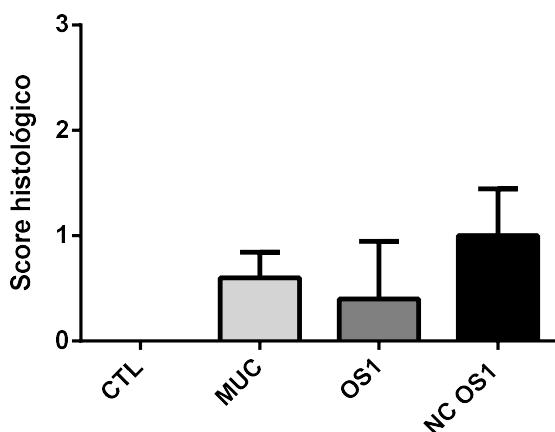
A **Figura 14** mostra os dados morfométricos das vilosidades do íleo. Os resultados demonstram que a injeção IP de CDDP provocou redução significativa das vilosidades no grupo MUC quando comparado ao grupo CTL ($p < 0,05$). O grupo OS1 e NC OS1 apresentaram redução de vilosidades semelhante ao grupo MUC ($p > 0,05$).

Figura 14 - Análise morfométrica do íleo. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; *One-way ANOVA* e pós teste de *Newman-Keuls*). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=10$).



No sistema de escore foi observado escore 0 no grupo CTL, indicando ausência de alterações na mucosa dos animais. Nos grupos MUC, OS1 e NC OS1 foram encontrados escores próximos de 1 indicando presença de inflamação, o que pode ser observado pelas vilosidades atrofiadas, perda moderada da arquitetura epitelial (**Figura 15**). Os escores 0 e 1 foram atribuídos aos quatros grupos experimentais sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$).

Figura 15 - Escore histológico do íleo. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p > 0,05$; teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunns*). Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$).



No presente estudo, a indução de mucosite intestinal por CDDP promoveu alterações morfométricas e histopatológicas evidentes com prejuízo da arquitetura tecidual e encurtamento das vilosidades, além da presença de infiltrado inflamatório, semelhante aos trabalhos descritos na literatura (URANGA *et al.*, 2017; ARAÚJO *et al.*, 2017; SHAHID *et al.*, 2017). O tratamento com OS1 e NC OS1 diminuiu significativamente as vilosidades. Desse modo, a análise microscópica do íleo

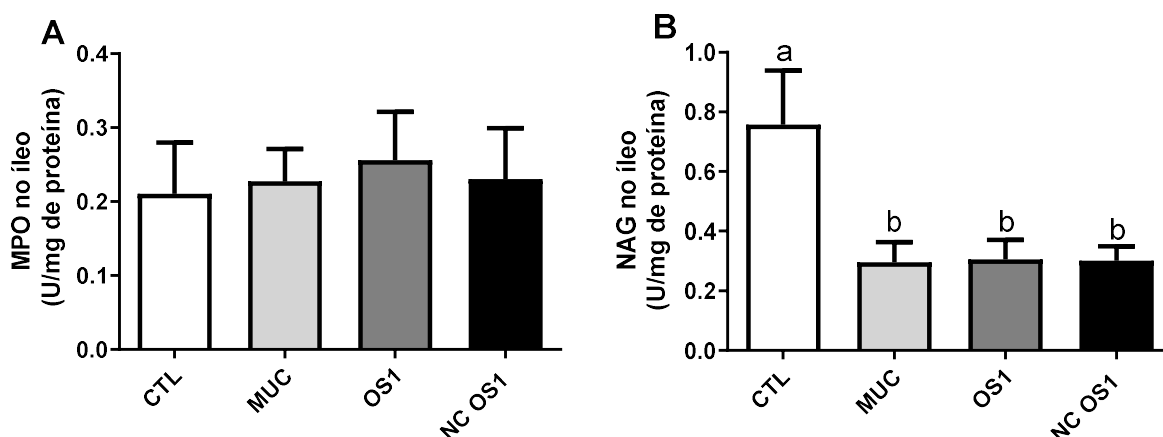
corroborar com a PI, demonstrando pouca proteção destes tratamentos sobre o epitélio intestinal. Todos esses danos pormenorizados na mucosa levam ao decorrente aumento da permeabilidade intestinal (LEOCÁDIO *et al.*, 2015; GALDINO *et al.*, 2018). Lindsay e colaboradores (2010) utilizando animais Dark Agouti em modelo de mucosite induzida por IP de 5-FU (150 mg/kg) no 5º de protocolo experimental e tratamento orogástrico com óleo de Emu durante 9 dias, demonstraram que 72 h após a administração de 5-FU, o óleo de emu não teve efeito aparente sobre a altura das vilosidades no íleo em relação aos controles de 5-FU, apenas 96 h após a indução de mucosite a maior dose de óleo de emu (1 mL) aumentou significativamente a altura das vilosidades em relação ao controle normal. Ainda assim, o óleo de emu não foi capaz de manter o peso corporal e/ou diminuir o escore histológico, no entanto foi capaz de diminuir a inflamação associada à IP de 5-FU no intestino delgado e alterar a arquitetura da mucosa na fase de recuperação da mucosite. O presente estudo se assemelha com dado da literatura, devido melhora parcial promovida pelo óleo de sucupira em alguns parâmetros como preservação parcial da arquitetura da mucosa intestinal e diminuição da inflamação, exposto mais adiante.

Os resultados obtidos pelas análises histológicas puderam ser parcialmente confirmados pelo sistema de escore histológico do íleo, que mostrou escores próximo de 1 para todos os grupos experimentais indicando presença de inflamação, vilosidades atrofiadas, perda moderada da arquitetura epitelial e edema conforme Soares e colaboradores (2008).

5.4.4 Avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG

A determinação indireta do infiltrado de neutrófilos e macrófagos no íleo foi avaliada através da atividade das enzimas MPO e NAG, respectivamente (**Figura 16**). Conforme em (16A), não houve alteração na atividade de MPO entre os grupos ($p>0,05$). Em relação a atividade de NAG (16B), os grupos MUC, OS1 e NC OS1 apresentaram uma diminuição dos seus valores em comparação ao grupo CTL ($p<0,05$).

Figura 16 - Avaliação das atividades das enzimas MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) e NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo. **(A)** Mieloperoxidase (MPO) **(B)** N-acetilglucosaminidase (NAG). Os dados foram analisados por ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls*. Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$). Letras diferentes representam diferença estatística ($p<0,05$). Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$).



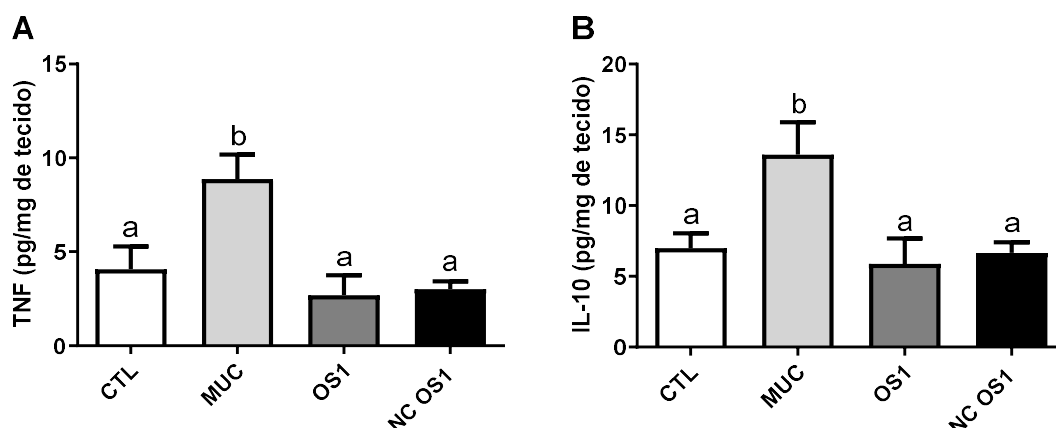
A infiltração inflamatória é uma característica da mucosite e tem relação direta com as alterações provocadas no epitélio intestinal. A modulação inflamatória também é responsável por danos indiretos devido ao recrutamento de células (leucócitos) e liberação de citocinas pró-inflamatórias na tentativa de conter a substância estranha e viabilizar sua eliminação. Dentre esses leucócitos estão os neutrófilos e macrófagos os quais possuem grânulos contendo as enzimas MPO e NAG, respectivamente liberados durante a resposta inflamatória. Isto posto, a infiltração inflamatória no íleo pode ser medida indiretamente por meio da dosagem dessas enzimas (GALDINO *et al.*, 2018; BARROS *et al.*, 2017, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2017). Semelhante aos dados apresentados na literatura, que também utilizou modelo de mucosite, a dosagem de MPO no íleo dos grupos tratados não teve diferença estatística. Já a dosagem de NAG diminuiu com a administração de cisplatina e estão semelhantes aos dados na literatura em relação ao jejuno (LEOCÁDIO *et al.*, 2015). Alberti *et al.* 2014, relata os efeitos e alguns mecanismos de ação anti-inflamatória do óleo essencial de *Pterodon emarginatus* administrado por via oral (50 e 100 mg / kg) durante 25 dias em modelo murino de encefalomielite autoimune. A dose mais alta do óleo obteve efeito imunomodulador pela regulação negativa das células imunológicas e inibição da expressão de mediadores pró-inflamatórios, através da modulação do equilíbrio imunológico Th1/Treg. O autor especula o efeito imunossupressor do óleo devido a presença dos constituintes sesquiterpenos: β -elemeno e β - cariofileno, além da possibilidade de sinergia entre outros constituintes presentes no óleo. Dutra e

colaboradores (2009) demonstraram a cicatrização de queimaduras cutâneas em coelhos com aplicação tópica de cremes à base de óleo essencial e fração hexânica obtidos das sementes de *Pterodon emarginatus*. As duas preparações atestaram atividade cicatrizante com significativa diminuição no número de células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares). O autor considera o efeito cicatrizante devido a ação anti-inflamatória dos constituintes majoritários presentes no óleo essencial, como: trans-cariofileno; beta-elemeno; germacreno-D; alfa-humuleno; espatulenol e biciclogermacreno. Santos *et al.* 2018 demonstrou o efeito anti-inflamatório do óleo do fruto de *Pterodon emarginatus* administrado via oral (498 mg/ kg) em modelo animal e *in sílico*. Em teste de permeabilidade vascular em ratos, o tratamento com óleo do fruto foi capaz de bloquear a resposta de mediadores da inflamação: prostaglandina E2, serotonina e bradicinina. Já na avaliação do ensaio combinado da potência anti-inflamatória e dano gástrico (induzida por estresse), o grupo tratado com o óleo inibiu o edema de carragenina em 47% e produziu um menor número de lesões gástricas, sem ocorrência de lesão ulcerativa. O autor sugere que o constituinte majoritário o ácido 6 α ,7 β -dihidroxiouacapan-17 β -óico e outros presentes no óleo como β -cariofileno, aumentam a atividade das células da mucosa e como efeito a proteção gástrica. Ainda, a substância majoritária demonstra no estudo seletividade para ciclo-oxigenase 2 (COX-2), sugerindo que a inibição de COX-2 seja responsável pela atividade anti-inflamatória do óleo de sucupira e pela não ocorrência de gastrotoxicidade.

5.4.5 Dosagem de citocinas no íleo

Na **Figura 17**, foi possível quantificar as citocinas pró-inflamatória e anti-inflamatória TNF e IL-10, respectivamente. Pode-se observar níveis aumentados de TNF e IL-10 ($p < 0,05$) apenas no grupo MUC em comparação aos demais grupos estudados ($p > 0,05$).

Figura 17 - Produção de citocinas no íleo. **(A)** TNF e **(B)** IL-10. Dados analisados pelo teste ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls*. Em (A) e (B) foram observadas diferença estatística significativa ($p < 0,05$) representadas pelas letras diferentes. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=6).



O rompimento da barreira intestinal e as alterações causadas pelo dano epitelial promovem a indução da liberação de citocinas inflamatórias. Diante disso, avaliou-se a concentração das citocinas TNF- α e IL-10 no íleo dos animais. No presente trabalho observou-se aumento na expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α no grupo MUC, semelhante a literatura (ARAÚJO *et al.*, 2017) sugerindo que a CDDP induziu mucosite intestinal. A modulação inflamatória também é responsável por danos indiretos podendo resultar em aumento da permeabilidade intestinal (LEE, LEE, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2017). Já a administração de OS1 e NC OS1 manteve níveis fisiológicos, podendo estar relacionado a ação benéfica destas formulações no epitélio intestinal. Em relação à citocina anti-inflamatória IL-10, seus níveis foram elevados no grupo MUC contrariamente aos dados relatos da literatura (ARAÚJO *et al.*, 2017). Porém, níveis aumentados de IL-10 podem estar associados a uma resolução da mucosite intestinal (ARAÚJO *et al.*, 2017). Os tratamentos com OS1 e NC OS1 foram capazes de manter os níveis fisiológicos dessa citocina anti-inflamatória, indicando que o OS possa ter efeito anti-inflamatório.

Shahid, Farooqui e Khan (2018) salientam que as citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 estão associadas à toxicidade gastrointestinal induzida por CDDP. Em relação às citocinas de perfil anti-inflamatório na mucosite, destaca-se a IL-10 que contribui para a redução dos danos ao epitélio intestinal causado pela cisplatina (WU *et al.*, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2017). Um estudo de Wu e colaboradores (2019) utilizando animais Wistar em modelo de mucosite induzida por IP de CDDP (5 mg/kg) mostrou maior produção de TNF- α pelo grupo mucosite em relação aos demais grupos

estudados incluindo o tratamento com D-metionina, semelhante aos dados do presente trabalho. Wu e colaboradores (2020), mostraram níveis elevados de TNF- α no jejuno dos animais do grupo mucosite (induzido por 5-FU) e redução de IL-10. Após tratamento com extrato de Patchouli (*Pogoste moncablin*) observou-se redução significativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e aumento significativo de IL-10. Chen e colaboradores (2020) utilizando princípio ativo Berberina, um alcalóide isoquinolina, em modelo de mucosite induzido por 5-FU também mostraram níveis elevados de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias no íleo. Alberti e colaboradores (2014) usando óleo essencial de *P. emarginatus*, em modelo de encefalomielite autoimune, evidencia a inibição da citocina imunomoduladora IFN- γ pela resposta Th1, o pré-tratamento com óleo essencial (100mg/kg) diminui a ativação microglial na medula espinhal e consequentemente a expressão de TNF- α . O tratamento com óleo essencial aumentou os níveis de IL-10, corroborando sua ação protetora.

Desse modo, o grupo OS1 promoveu melhorias em alguns parâmetros da mucosite intestinal nos animais, por exemplo, não alterou o peso, não alterou citocinas e diminuiu NAG. Entretanto, aumentou permeabilidade intestinal e reduziu as vilosidades. O grupo NC OS1 também promoveu melhoras parciais dos parâmetros da mucosite intestinal, pois não alterou citocinas e diminuiu NAG mas promoveu perda de peso nos animais, atrofia dos vilos e exarcebou a permeabilidade intestinal. As ações benéficas frente a mucosite intestinal podem ser devido aos compostos bioativos detectados por LC-HRMS / MS no oleorresina de sucupira do presente estudo. Contudo, no intuito de desenvolver uma nanoestrutura com resultados mais promissores que a NC OS1, decidiu-se utilizar nanocápsula formulada com tensoativo lecitina (denominada NC OS2) em modelo de mucosite para fazer uma comparação com NC OS1.

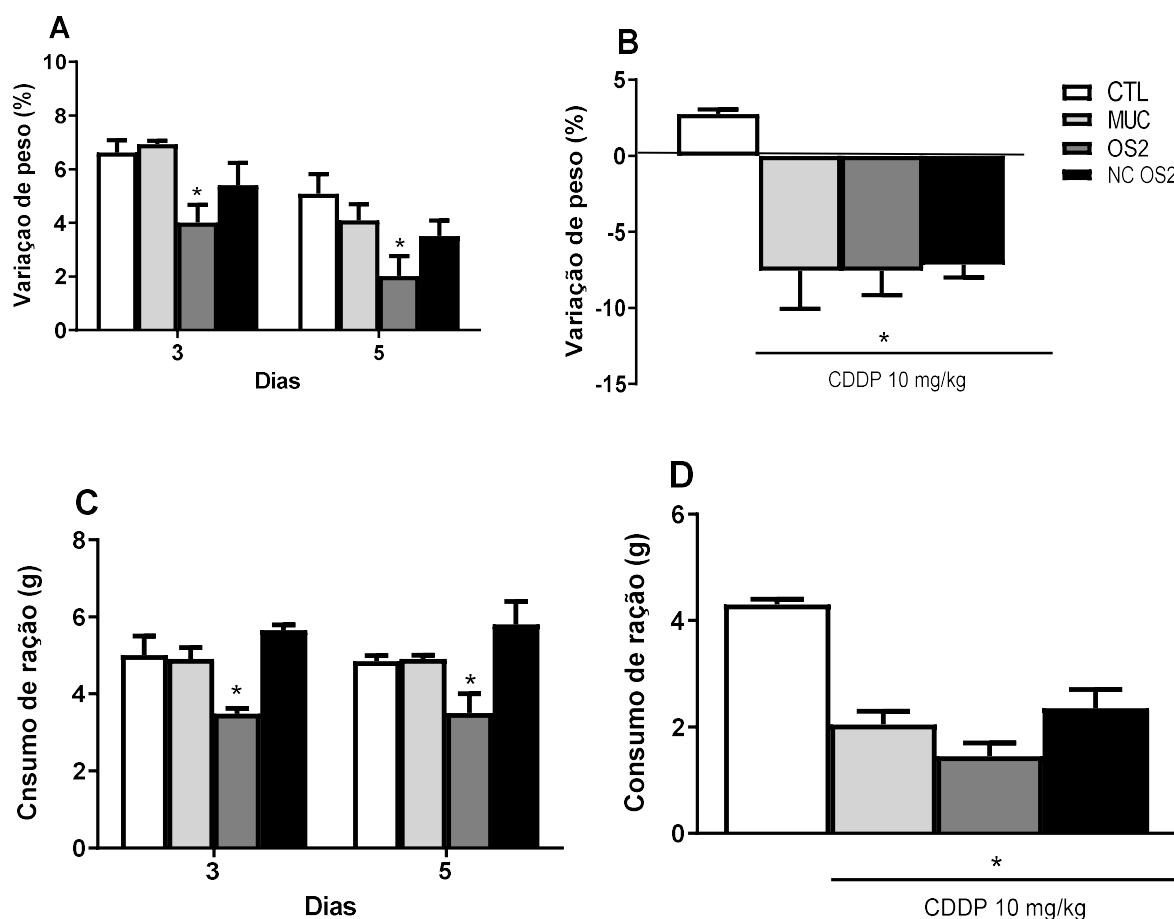
5.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NC OS2 EM MODELO DE MUCOSITE

5.5.1 Variação ponderal antes e após indução da mucosite

Conforme observado na Figura 18A e 18C, a administração oral de NC OS2 não teve efeito significativo no peso corporal e no consumo de ração antes da indução da mucosite ($p>0,05$) quando comparado ao grupo controle. O grupo OS2 obteve resultados significativos na perda de peso e no consumo de ração antes da indução

da mucosite ($p < 0,05$) quando comparado aos demais grupos. Após a indução da mucosite, foi observada perda de peso e diminuição do consumo alimentar em todos os grupos com mucosite em (B) e (D), (**Figura 18**), quando comparados ao grupo controle, demonstrando que a mucosite foi efetivamente induzida ($p < 0,05$). Assim, não houve diferenças significativas entre os grupos OS2, NC OS2 e MUC.

Figura 18 - Variação do peso (A e B) e consumo alimentar (C e D) dos animais antes e após a indução da mucosite. Variação do peso dos animais antes (dias 3 e 5) e após a indução da mucosite (dia 7). Os dados foram analisados por ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Tukey* e representados como média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$). * indica que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Abreviaturas: CTL (controle); MUC (mucosite); OS2 (mucosite tratado com OS2); NC OS2 (mucosite tratado com NC OS2).



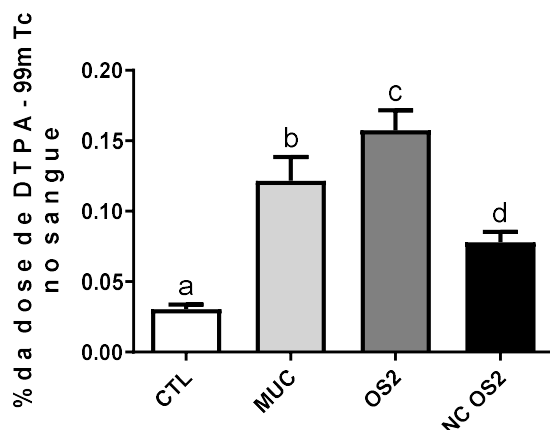
Este resultado está em de acordo com Alberti *et al.* (2014) que demonstrou perda de peso dos animais após administração oral de 100 mg/kg de óleo essencial de sucupira em modelo experimental de encefalomielite autoimune.

5.5.2 Avaliação da permeabilidade intestinal (PI)

A PI foi maior no grupo MUC em comparação com o grupo de controle (**Figura 19**), sugerindo toxicidade intestinal após injeção intraperitoneal de CDDP. Uma maior

permeabilidade intestinal foi observada no grupo CDDP tratado com OS2 em comparação com os outros grupos ($p < 0,05$). Por outro lado, a administração oral de NC OS2 na mucosite induzida por CDDP reduziu a permeabilidade intestinal quando comparada com os grupos MUC e o grupo OS2.

Figura 19 - Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de ^{99m}Tc -DTPA no sangue de animais. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; *One-way ANOVA* e pós teste de *Newman-Keuls*). Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$).

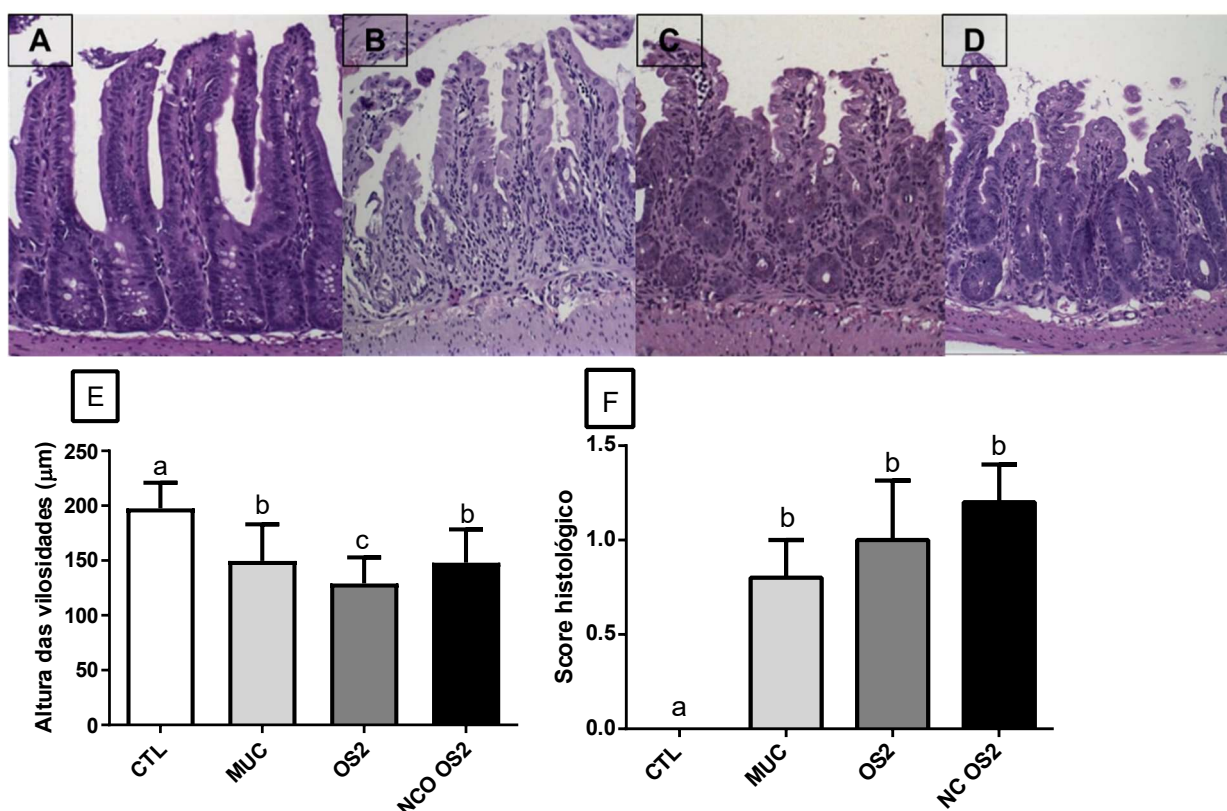


Uma possível explicação para a falta de eficácia do tratamento com OS pode ser a dosagem, duração do tratamento ou incapacidade deste oleorresina de interferir na patogênese causada pela droga CDDP. Apesar de não haver dados sobre OS e mucosite intestinal ou outra inflamação relacionada ao intestino, a literatura demonstra para outros modelos experimentais, como edema e artrite, que a administração oral de extrato hexano de sucupira apresentou propriedades anti-inflamatórias diminuindo o edema (CARVALHO *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2018). No entanto, parece que a ação da sucupira depende do modelo utilizado para induzir a inflamação. Contudo, notou-se que a NC OS2 protegeu parcialmente o epitélio intestinal dos efeitos da CDDP e toxicidade do OS2 demonstrada neste trabalho. Isso pode ser devido a nanocápsula polimérica que impediu o contato direto do OS com o epitélio do intestino, reduzindo a PI como demonstrado, estando de acordo com Villalba *et al.* (2016) que evidenciou redução de gastrotoxicidade associada ao meloxicam, devido ao encapsulamento em NC de PCL. Além disso, a menor toxicidade do OS2 encapsulado também pode ser atribuída a provável liberação prolongada e lenta dos diversos compostos químicos do seu núcleo oleoso.

5.5.3 Análise histopatológica e morfométrica do íleo

A estrutura morfológica do íleo no grupo controle apresentou limites normais, com preservação das vilosidades intestinais e do epitélio (**Figura 20A**). No entanto, o grupo MUC apresentou arquitetura epitelial intestinal modificada (**Figura 20B**) e redução do tamanho das vilosidades intestinais (**Figura 20E**). Os grupos OS2 e NC OS2 também apresentaram arquitetura tecidual alterada (**Figura 20C e 20D**). Os piores dados de atrofia foram observados para o grupo CDDP tratado com OS2 (**Figura 20E**). O tratamento com NC OS2 apresentou valor semelhante quando comparado com grupo MUC (**Figura 20E**). A pontuação histopatológica foi elevada e semelhante em todos os grupos tratados com CDDP em comparação com o controle (**Figura 20F**).

Figura 20 - Análise histológica e morfométrica do íleo. Grupo - CTL (**A**); MUC (**B**); OS2 (**C**); NC OS2 (**D**). (**A**) Aspecto histológico normal com arquitetura da parede intestinal preservada e sem inflamação. (**B**) Perda da arquitetura tecidual e encurtamento das vilosidades com presença de infiltrado inflamatório. (**C e D**) Alteração da arquitetura tecidual e atrofia dos vilos. Barra 100 μ m (Objetiva de 20X). Coloração HE (n=6). Análise morfométrica do íleo (**E**). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$; *One-way ANOVA* e pós teste de *Newman-Keuls*). Dados expressos como média $\pm$ erro padrão da média (n=10). Escore histológico do íleo (**F**). Letras iguais: sem diferença estatística ($p > 0,05$; teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunns*). Os valores foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (n=6).

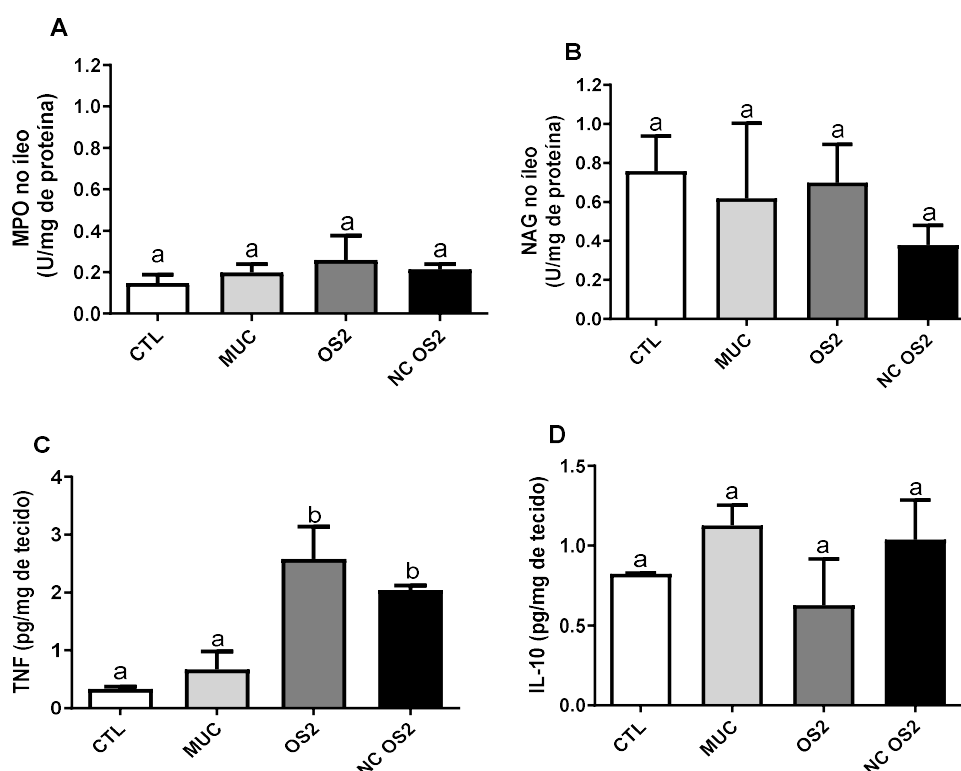


Os dados da altura das vilosidades intestinais apresentaram níveis semelhantes entre os grupos NC OS2 e MUC ($p>0,05$). No entanto, o maior dano viloso visto para o grupo OS2 pode ter contribuído para promover maior valor de permeabilidade intestinal visto no item anterior. Além disso, a análise histológica mostrou que o tratamento com OS2 e NC OS2 está associado a um escore inflamatório intestinal semelhante ao do grupo MUC. Esses dados são consistentes com Maioli *et al.* (2014) que também não encontrou efeitos benéficos no escore histológico, quando os probióticos foram empregados em um modelo de mucosite induzida por 5-FU.

5.5.4 Avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG e citocinas no íleo

A atividade de MPO não teve diferença no íleo entre os grupos em (A). A atividade NAG não obteve diferença entre os grupos experimentais em (B). Em relação às citocinas, os grupos OS2 e NC OS2 apresentaram níveis elevados de TNF- α em (C). Não foram observadas diferenças para IL-10 em todos os grupos ($p>0,05$) em (D) (**Figura 21**).

Figura 21 - Avaliação das atividades das enzimas MPO e NAG e citocinas no íleo. (A) Mieloperoxidase (MPO) (B) N-acetilglucosaminidase (NAG). Produção de citocinas no íleo em (C) TNF e (D) IL-10. Dados analisados pelo teste ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls*. Em (C) foram observadas diferença estatística significativa ($p<0,05$) representadas pelas letras diferentes. Resultados expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$).



Os resultados do presente trabalho mostraram que o processo inflamatório medido pela infiltração de neutrófilos por meio da atividade de MPO foi semelhante entre todos os grupos experimentais. Apesar de não haver relato sobre OS e MPO, Carvalho *et al.* (1999) demonstraram inibição da migração de neutrófilos induzida pela carragenina para a cavidade peritoneal de ratos tratados com 500 mg/kg por via oral de extrato hexânico de sucupira. Apesar de não haver dados sobre os mecanismos de inflamação da mucosite, Hoscheid *et al.* (2017), relataram que a administração intramuscular de nanoemulsão de OS reduziu leucócitos na peritonite induzida por carragenina em camundongos suíços, possivelmente com conteúdo vouacapânico. Pascoa *et al.* (2015) demonstraram o potencial anti-inflamatório da microemulsão do OS quando aplicado topicamente poderia diminuir o peso de edema de orelha no modelo experimental.

Em relação à atividade NAG, não houve diferença entre todos os grupos. Apesar de não haver dados de NAG e CDDP intestinal, resultado semelhante foi encontrado por Ferreira *et al.* (2012) após a administração oral do composto lipofílico butirato em outro quimioterápico, 5-FU induziu mucosite intestinal. Além disso, Leocádio *et al.* (2015) não demonstrou diferença entre os valores de NAG após o tratamento oral com o aminoácido L-Arginina na mucosite intestinal induzida por 5-FU em camundongos. Isso pode ser explicado pelo fato de os macrófagos serem geralmente vistos em estágios inflamatórios posteriores, dependendo do tempo de sacrifício do animal e do modelo de mucosite, empregados (XAVIER, PODOLSKY, 2007).

Em relação à citocina pró-inflamatória TNF- α , seus níveis foram aumentados para os grupos OS2 e NC OS2, porém nenhuma diferença foi detectada entre os grupos controle e MUC. Essa falta de detecção também pode ser explicada pelo tempo de pico da produção dessa citocina pelo intestino. É relatado na literatura que a produção de citocinas tem um perfil cinético ao longo do tempo. O pico de produção de TNF- α no intestino foi cerca de 6h após a administração de 5-fluorouracil e metotrexato (LOGAN *et al.*, 2008) e 24h após administração i.p. de CDDP (ARAÚJO *et al.*, 2017). É provável que os altos níveis de TNF- α estejam ligados ao papel dessa citocina em recrutar e / ou ativar outras células inflamatórias não medidas aqui que poderiam lidar com o cenário inflamatório. Além disso, níveis elevados de TNF- α também podem estar associados aos resultados histológicos observados para grupos OS2 e NC OS2. Por outro lado, nenhuma alteração nos níveis de IL-10 foi detectada

entre os grupos. Essa falta de detecção também pode ser explicada pelo tempo de pico de produção dessa citocina, uma vez que Araújo *et al.* (2017) detectou uma diminuição em seus níveis após 72h da administração intraperitoneal de CDDP.

Portanto, o grupo OS2 não evidenciou evolução da maioria dos parâmetros frente a mucosite intestinal, visto que promoveu perda de peso antes e após indução a mucosite, exacerbou a permeabilidade intestinal, reduziu as vilosidades e elevou a citocina TNF- α . Contudo, não alterou infiltrado inflamatório e citocina IL-10. Tais implicações podem ser devido ao tensoativo utilizado (lecitina) e/ou ainda ter sido capaz de solubilizar substâncias do óleo de sucupira com ação tóxica. O grupo NC OS2 obteve melhora parcial de alguns parâmetros, uma vez que não diminuiu o peso corporal antes da indução da mucosite, não alterou infiltrado inflamatório, não alterou IL-10 e atenuou a permeabilidade intestinal, sendo dados satisfatórios e mais promissores em relação a NC OS1. Entretanto, promoveu perda de peso após a indução a mucosite e elevou a citocina TNF- α .

5.6 AVALIAÇÃO DE TENSOATIVOS EM MODELO DE MUCOSITE

Devido a avaliação de diferentes formulações (NC OS1 e NC OS2) e os resultados parciais obtidos, viu-se a necessidade de avaliar a ação dos tensoativos livres e seu impacto na mucosite intestinal.

Tensoativos são moléculas anfifílicas muito utilizadas na indústria farmacêutica e alimentar para solubilizar ou dispersar substâncias. É também utilizada para aumentar a absorção de fármacos pouco solúveis em água. Porém, alguns estudos têm demonstrado que os tensoativos podem aumentar a permeabilidade intestinal transitoriamente após administração oral e ainda induzir danos intestinais dependendo da duração e frequência do uso (CSÁKI, 2011; SWENSON, MILISEN, CURATOLO, 1994). Conforme relatado na literatura, o Span 80 e Tween 80 são tensoativos seguros, compatíveis, não irritantes e aprovados para uso em produtos farmacêuticos (MAHDI *et al.*, 2011). Ainda, são frequentemente usados em investigação científica (VIENNOIS *et al.*, 2017; ALBERTI *et al.*, 2014; CSÁKI, 2011). O tensoativo lecitina demonstra ação anti-inflamatória na literatura, ainda, é muito utilizado em produtos alimentares e farmacêuticos (DIAL *et al.*, 2008; FABIA *et al.*, 1992). Em vista disso, o nosso grupo de estudo procedeu a investigação da utilização de tensoativos e suas inferências na mucosite intestinal induzida por CDDP.

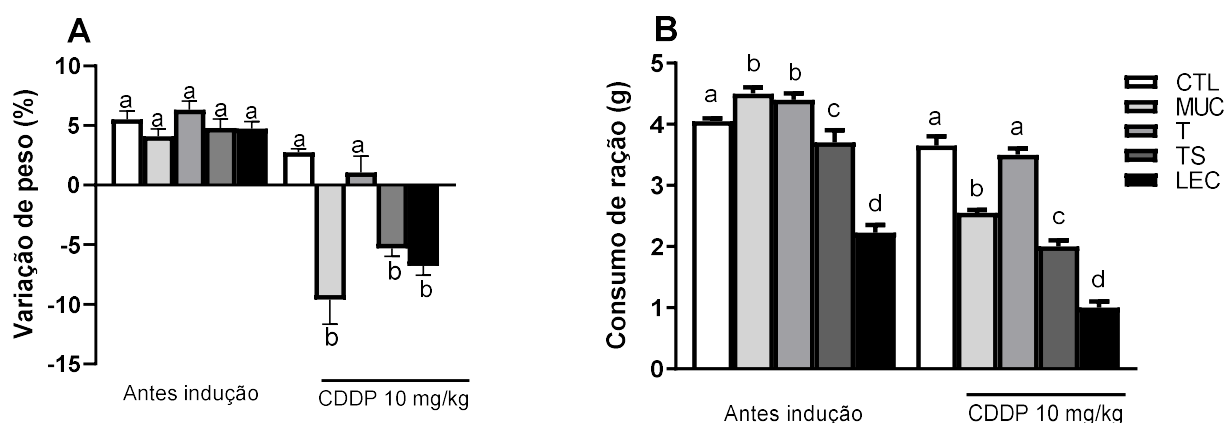
Os dados do presente trabalho mostram que a toxicidade proveniente da administração de CDDP foi observada nos camundongos com a dose de 10 mg/kg de peso por via intraperitoneal, como anteriormente relatado por Araújo *et al.* (2017). Os efeitos da administração de quimioterápicos em modelos animais são citados na literatura, com impacto na redução do consumo alimentar (BARROS *et al.*, 2018; BAJIC *et al.*, 2016) e a perda de peso (BARROS *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2017; BAJIC *et al.*, 2016; LEOCÁDIO *et al.*, 2015). Outros parâmetros que comprovam a indução da mucosite intestinal no presente estudo são a redução do comprimento das vilosidades intestinais, o elevado escore histopatológico da mucosa e o aumento na produção de citocina pró-inflamatória TNF- α , condições também observadas em outras investigações (ARAÚJO *et al.*, 2017, WU *et al.*, 2019; BARROS *et al.*, 2018). A administração de CDDP também promoveu perda de peso, processo inflamatório com redução da altura das vilosidades, alterando a arquitetura tecidual da mucosa intestinal do íleo, resultados convergentes com os estudos de Araújo *et al.* (2017) e Shahid *et al.* (2017) que utilizaram doses de 10 mg/kg de peso e 6 mg/kg de peso, respectivamente.

Em investigações de Yamamoto *et al.* (2013) e Araújo *et al.* (2017) observaram que as alterações na mucosa são percebidas com maior intensidade a partir do 3º dia (72 horas) após a administração do quimioterápico CDDP. A partir do 7º dia inicia-se a recuperação da mucosa (YAMAMOTO *et al.*, 2013).

5.6.1 Variação ponderal antes e após indução da mucosite

A **Figura 22** apresenta a variação ponderal dos animais antes e após a indução de mucosite. Nota-se que não houve diferença na variação de peso dos animais entre os grupos investigados antes da indução de mucosite ($p > 0,05$). Após a indução de mucosite, pode-se observar perda de peso dos animais do grupo MUC, T e TS quando comparados aos grupos CTL e T ($p < 0,05$). Porém, a perda de peso dos animais dos grupos TS e LEC foi semelhante do grupo MUC ($p > 0,05$).

Figura 22 - Variação do peso (**A**) e consumo de ração (**B**) dos animais antes e após a indução de mucosite. Os dados foram analisados por ANOVA *Two-way* seguido do pós-teste de *Tukey* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Abreviaturas: CTL (controle); MUC (mucosite); T (mucosite tratado com Tween 80); TS (mucosite tratado com tween e span 80); LEC (mucosite tratado com lecitina).



Na avaliação dos tensoativos empregados na produção de NC OS e OS apresentados nos pareceres anteriores, os grupos que receberam T, TS e LEC não tiveram alteração no peso quando comparado com o grupo controle antes da indução de mucosite. Diminuição do consumo foi observado para o grupo LEC e TS. Após a indução de mucosite por CDDP, todos os grupos apresentaram perda de peso e diminuição do consumo alimentar quando comparados ao controle, exceto o grupo T. Pode-se relacionar a perda de peso com a redução do consumo alimentar. O uso de tensoativo Tween 80 (grupo T) evitou a perda de peso dos animais sendo similar ao controle. Em investigação de Chassaing e colaboradores (2016) relataram que a presença de síndrome metabólica está associada inflamação de baixo grau induzida por ingestão dos emulsionantes carboximetilcelulose e/ou Tween 80 (1,0% p/v ou v/v, respectivamente) por 12 semanas por camundongos saudáveis. Contudo, ambos emulsionantes promoveram ganhos significativos no peso corporal e na adiposidade, estando relacionada ao aumento de consumo alimentar, convergindo com o presente estudo.

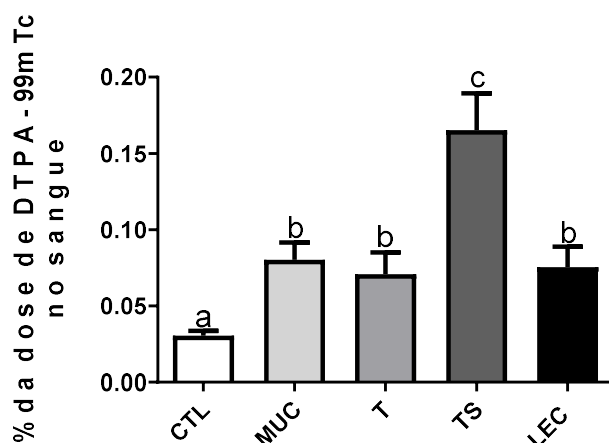
Esses resultados podem explicar em parte os dados obtidos para os grupos OS1 e NC OS1 (formuladas com tween 80 e span 80), OS2 e NC OS2 (formuladas com lecitina) em relação a variação ponderal e consumo de ração, pois nota-se que os grupos TS e LEC (tensoativos na mesma concentração das formulações) acentuam essa perda de peso e diminuem o consumo de ração após indução da mucosite, convergindo com os capítulos anteriores. Observa-se que o tensoativo tween 80

(grupo T) obteve melhor resultado nos parâmetros de variação ponderal e consumo de ração, pois se manteve semelhante ao grupo controle, demonstrando preferivelmente ser utilizado sozinho do que associado ao span 80 (grupo TS).

5.6.2 Avaliação da permeabilidade intestinal (PI)

Os resultados da PI dos animais de todos os grupos mostraram aumento da PI quando comparados ao grupo CTL ($p < 0,05$). O grupo TS obteve o maior valor de PI em comparação aos demais grupos experimentais ($p < 0,05$) (**Figura 23**), indicando que a associação do span foi o responsável por este efeito.

Figura 23 - Permeabilidade intestinal avaliada pela presença de ^{99m}Tc -DTPA no sangue de animais. Dados analisados pelo teste ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls* e representados como média $\pm$ erro padrão da média ($n=6$). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$).



Com base nas características gerais dos surfactantes eles diminuem a hidrofobicidade da camada de muco intestinal estando associada ao aumento da permeabilidade intestinal. Em modelo de inflamação relatados na literatura, Chassaing *et al.* (2016) evidencia que o tratamento com emulsificante Tween 80 aumentou a permeabilidade intestinal em camundongos selvagens e modificados, convergindo com o presente estudo. Ainda, monooleato de sorbitano (Span) pode aumentar a permeabilidade de membrana pela alteração da estrutura lipídica e das proteínas incorporadas. Dessa maneira, tensoativos empregados em conjunto podem ter efeito combinado por mecanismos distintos de aumento da permeabilidade (CSÁKI, 2011). Dial e colaboradores (2008), usando ratos Sprague-Dawley em modelo murino de inflamação induzida por administração i.p. de LPS (5 mg/kg), notou que o pré-tratamento com lecitina oral (100 mg/kg) bloqueou significativamente os aumentos de permeabilidade no tecido ileal. O grupo LEC não foi capaz de bloquear o aumento da

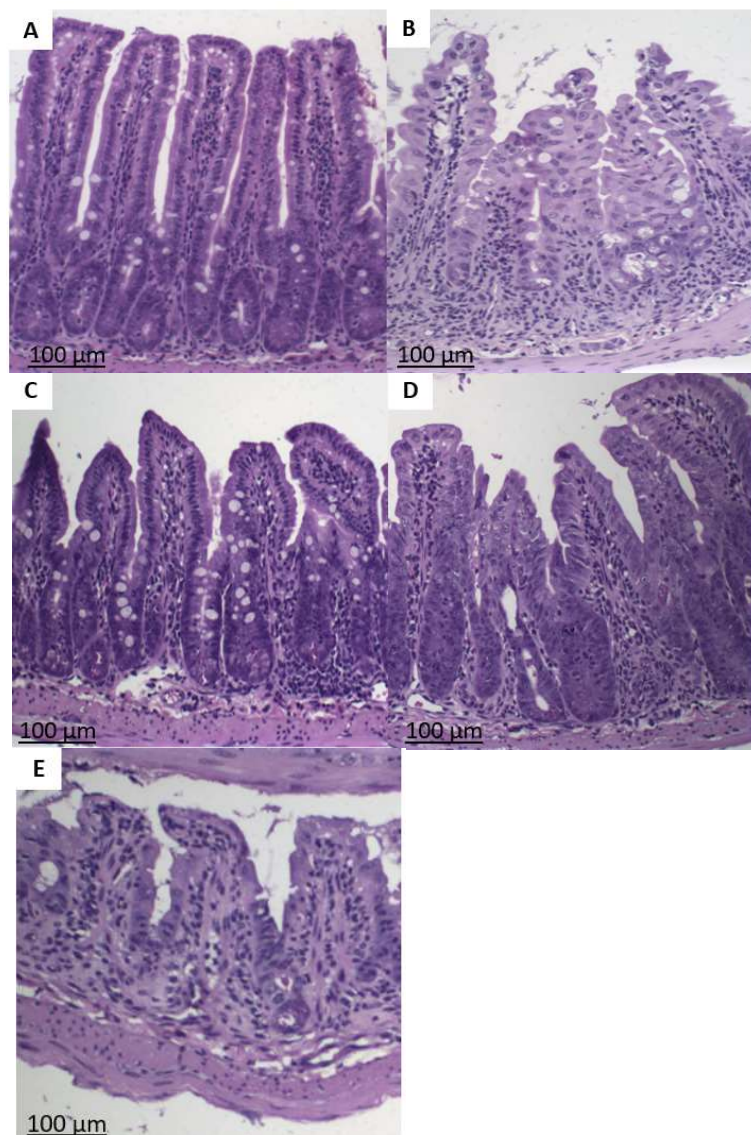
PI provavelmente devido a concentração que utilizamos de 15 mg/kg de lecitina, sendo quase 10 vezes menor que tal estudo. Fabia *et al.* (1992) verificou que a administração de 50 mg de lecitina logo após a indução da colite por ácido acético resultou na prevenção completa da colite e uma diminuição significativa na permeabilidade da mucosa sugerindo uma ação anti-inflamatória da lecitina. Portanto, pode-se inferir que dependendo da dose de lecitina administrada e do modelo de inflamação intestinal o efeito preventivo sobre o tecido inflamado é variado.

Os resultados para PI de NC OS1 e NC OS2 também podem ser esclarecidos, parcialmente, através dos dados de tensoativos isolados. O grupo TS evidenciou o maior aumento de PI, convergindo com o grupo NC OS1 que demonstrou acentuação da PI em comparação aos demais grupos. A piora do parâmetro pode ser devido a associação de tween e span por mecanismos diferentes de aumento da permeabilidade intestinal, ainda, a nanocápsula aumenta a superfície de contato com o epitélio intestinal e tudo está interagindo (polímero, tensoativo, óleo de sucupira na formulação). O grupo LEC atenuou a PI em comparação ao grupo TS, convergindo com os resultados de NC OS2 que obteve a menor PI dos grupos tratados com CDDP, porém não se assemelhou ao controle, supostamente em razão da concentração de lecitina utilizada (15mg/kg). Portanto, os dados mais promissores são para a formulação NC OS2 e quanto aos tensoativos livres são para os grupos T e LEC.

5.6.3 Análise histopatológica e morfométrica do íleo

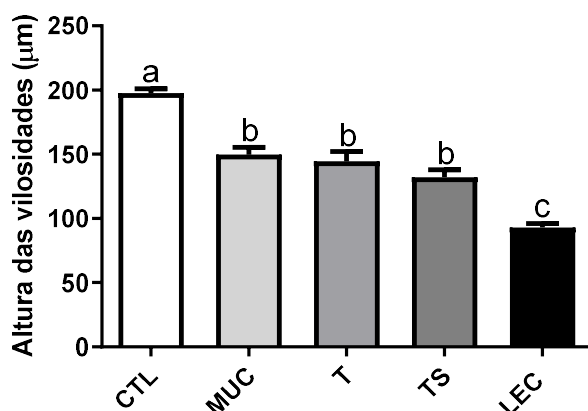
A **Figura 24** exibe as alterações histopatológicas observadas no íleo dos animais. Na fotomicrografia em (A) observa-se a estrutura morfológica dentro dos parâmetros de normalidade, com preservação das vilosidades, epitélio íntegro e camada muscular. Em oposição, na fotomicrografia representada em (B) grupo MUC, pode-se observar perda da arquitetura tecidual com vacuolização, encurtamento das vilosidades e processo inflamatório no epitélio intestinal e camada muscular. Em (C) e (D) estão demonstrados os animais que receberam tratamento com os veículos tween e tween+span. Nesses grupos, nota-se menor dano tecidual no grupo T, indicado pela melhor preservação parcial das vilosidades intestinais e das criptas. Na fotomicrografia representada em (E) estão os animais que receberam tratamento com LEC (Lipoid S75), no qual observa-se histologia com dano moderado do epitélio intestinal e camada muscular da mucosa moderadamente conservada.

Figura 24 - Análise histológica do íleo. Grupo - CTL (**A**); MUC (**B**); T (**C**); TS (**D**); LEC (**E**). (**A**) Aspecto histológico normal com arquitetura da parede intestinal preservada e sem inflamação. (**B**) Perda da arquitetura tecidual e encurtamento das vilosidades com presença de infiltrado inflamatório. (**C, D, E**) Preservação parcial das vilosidades e da arquitetura tecidual. Barra 100 μ m (Objetiva de 20X). Coloração HE (n=6).



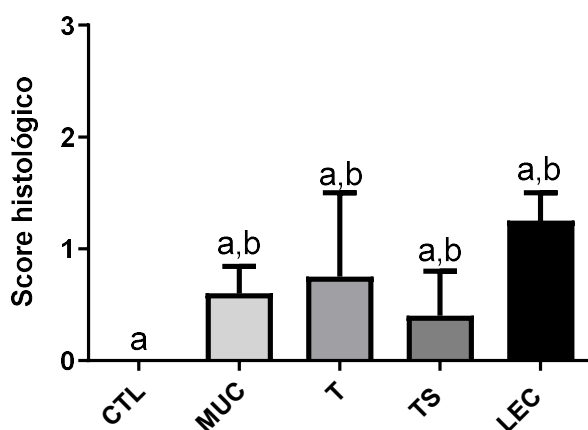
A **Figura 25** mostra os dados morfométricos das vilosidades do íleo. Os resultados demonstram que a injeção IP de CDDP provocou redução significativa das vilosidades no grupo MUC, T e TS ($p < 0,05$) em relação ao CTL. A administração de T e TS não alterou a vilosidade em relação ao grupo MUC ($p > 0,05$). Já o grupo LEC que recebeu Lipoid S75 apresentou a maior redução de vilosidade em comparação com os demais grupos estudados ($p < 0,05$).

Figura 25 - Análise morfométrica do íleo. Os dados foram analisados por ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=10). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$).



As alterações histológicas não puderam ser confirmadas através do sistema de escore (**Figura 26**). Os escores 0 e 1 que indicam inexistência de lesão, foram atribuídos aos grupos experimentais MUC, T, TS e LEC com ausência de diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao grupo CTL.

Figura 26- Escore histológico do íleo. Os dados foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo pós-teste de *Dunn's* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$). Letras iguais representam ausência de diferença estatística ($p > 0,05$).



A altura das vilosidades intestinais pela análise morfométrica do íleo também auxiliam no entendimento sobre a perda de peso nos animais e aumento de permeabilidade intestinal. Observou-se que a administração de T ou TS não foi benéfica uma vez que as vilosidades intestinais foram semelhantes ao grupo MUC. A administração de LEC foi a que mais diminuiu a altura das vilosidades, porém não esteve associada a maiores valores de PI. Essas alterações morfológicas promovem

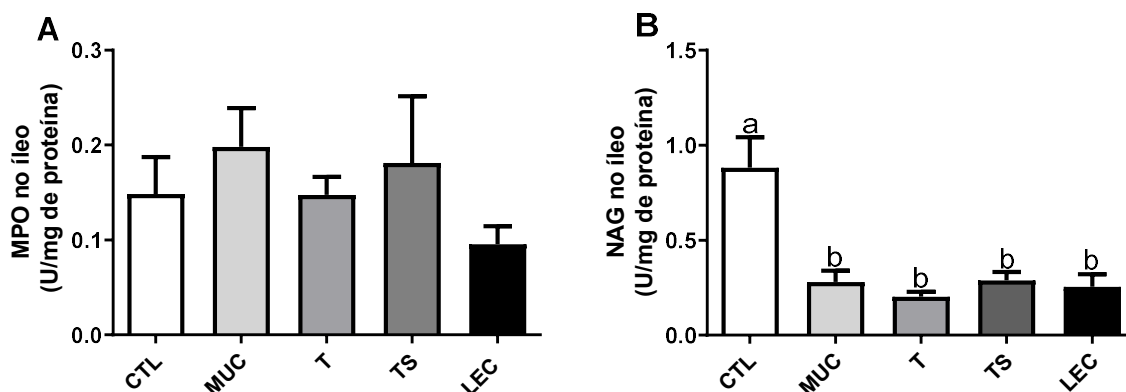
deficiência na absorção de nutrientes e consequentemente perda de peso, uma vez que reduzem a área total da superfície das vilosidades, além de facilitar o aparecimento de ulcerações e inflamação no epitélio intestinal (SHAHID *et al.*, 2018). Estudo demonstra que o uso de Tween 80 não induziu colite evidente em camundongos selvagens, mas resultou em sutil evidência histopatológica e inflamação intestinal crônica, incluindo dano epitelial e cólon encurtado (CHASSAING *et al.*, 2016), podendo explicar os resultados do grupo T e TS se assemelharem ao grupo MUC. Fabia *et al.* (1992) relatando modelo de colite induzida por ácido acético, verificou que a menor dose (12,5 mg) de lecitina administrada uma vez ao dia por via oral após a indução de colite e durante 2 dias foi capaz de recuperar parcialmente o desenvolvimento de colite por meio do reparo parcial da mucosa. Já a administração de 50 mg de lecitina duas vezes ao dia durante 3 dias resultou na prevenção completa da colite de acordo com os achados histológicos.

Os dados de histologia, altura das vilosidades e score histológico dos tensoativos livres ajudam a explicar parcialmente esses mesmos parâmetros para os grupos OS1, OS2, NC OS1 e NC OS2, pois também evidenciaram alteração da arquitetura da mucosa, atrofia das vilosidades e score histológico sem significância estatística em relação ao grupo MUC.

5.6.4 Avaliação da atividade das enzimas MPO e NAG

A atividade das enzimas MPO e NAG foram avaliadas no íleo (**Figura 27**), para determinação indireta do infiltrado de neutrófilos e macrófagos, respectivamente. Em (A) a atividade de MPO foi semelhante entre os grupos, ($p > 0,05$). Em (B) a atividade de NAG também foi análoga entre os grupos experimentais, exceto para o grupo CTL ($p < 0,05$).

Figura 27 - Avaliação das atividades das enzimas MPO (medida indireta da infiltração de neutrófilos) e NAG (medida indireta da infiltração de macrófagos) no íleo. **(A)** Mieloperoxidase (MPO) **(B)** N-acetilglucosaminidase (NAG). Os dados foram analisados por ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls* e representados como média $\pm$ erro padrão da média (n=6). Ausência de letras: sem diferença estatística ($p>0,05$).



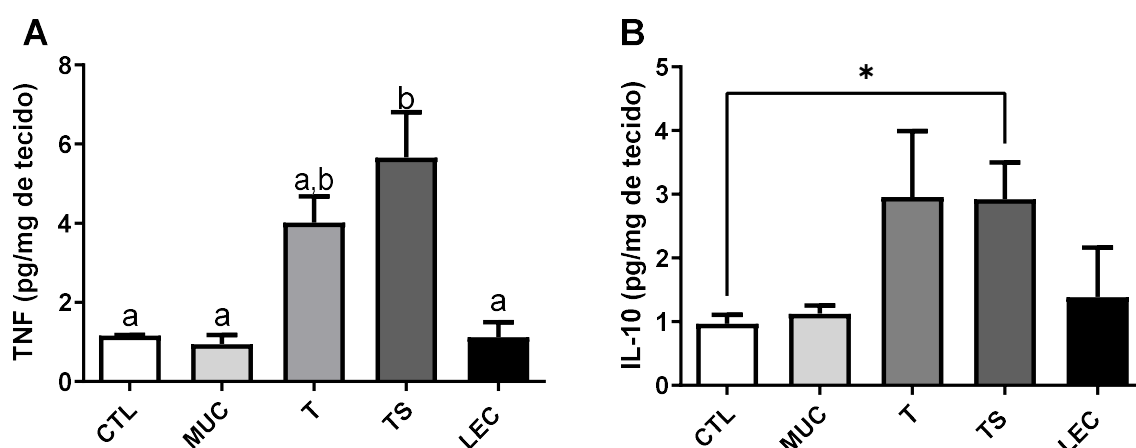
A infiltração de neutrófilos e macrófagos tem sido relatada em trabalhos que avaliaram a mucosite, como o de Leocádio *et al.* (2015). O papel dos neutrófilos no epitélio intestinal é de primeira barreira na fase inicial da resposta imune. No TGI, ocorre recrutamento ativo dessas células para o local da lesão seguido do reconhecimento e eliminação de substâncias estranhas por fagocitose que romperam a barreira epitelial. No decorrer de um evento inflamatório, neutrófilos infiltram a lâmina própria da mucosa intestinal causando lesão à mucosa e aumento da permeabilidade, por exemplo (LEITE *et al.*, 2016). A enzima MPO está presente nos grânulos de neutrófilos e reflete a atividade inflamatória no intestino (RODRIGUES *et al.*, 2016). No trato gastrointestinal, os macrófagos residentes também estão na lâmina própria do intestino, servindo de regulação do microbioma resposta inflamatória intestinal (LEITE *et al.*, 2016). Tais células expressam citocinas com atividade anti-inflamatória, incluindo IL-10. A enzima NAG é principalmente produzida por macrófagos, e representa a avaliação indireta da concentração ou ativação de macrófagos durante processo inflamatório (BARROS *et al.*, 2018).

No presente estudo a medida indireta do infiltrado de neutrófilos (atividade de MPO) no íleo foi semelhante aos níveis fisiológicos entre todos os grupos experimentais. Apesar de não haver estudos em modelo de mucosite, Viennois e colaboradores (2017) observaram que a administração oral de carboximetilcelulose ou Tween 80 diluído em água potável (1,0%) em camundongos com colite promoveu moderada inflamação intestinal com aumento significativo de MPO em comparação aos controles.

5.6.5 Dosagem de citocinas no íleo

Na **Figura 28**, foi possível analisar as citocinas TNF e IL-10, que exibem perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente. Em (A) foi observado aumento dos níveis de TNF no grupo TS ($p < 0,05$) comparados aos demais grupos investigados. O grupo T obteve valor intermediário. Em (B) relacionado a IL-10, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) em nenhum grupo experimental. Foi realizado o teste T de Student para comparar as médias dos testes entre os grupos. Os resultados indicam que apenas o grupo TS apresentou diferenças significantes ($p = 0,03$).

Figura 28 - Produção de citocinas no íleo. **(A)** TNF e **(B)** IL-10. Dados analisados por ANOVA *One-way* e pós teste de *Newman-Keuls* e representados como média $\pm$ erro padrão da média ($n = 6$). Em (A) foram observadas diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Em (B) * diferença estatisticamente significativa (Teste t de Student).



Além da resposta proveniente dos infiltrados celulares, a presença de citocinas também tem sido relatada em trabalhos na resposta a lesão no epitélio intestinal como estudo de Barros *et al.* (2017, 2018), Viennois *et al.* (2017), Dial *et al.* (2008) e Treede *et al.* (2007). No presente estudo, níveis elevados da citocina pró-inflamatória TNF- α no íleo foram observados nos grupos T e TS em comparação aos demais grupos experimentais. Este dado está de acordo com a literatura onde a administração do tensoativo Tween 80 (1,0%) elevou o nível de expressão da citocina TNF- α em epitélio pré-danificado causando inflamação intestinal (Viennois *et al.* 2017). Treede *et al.* (2007) avaliando as propriedades anti-inflamatórias de fosfatidilcolina, um tipo de lecitina, em três modelos de inflamação, incluindo células Caco-2 humanas tratadas com TNF- α para indução de processo pró-inflamatório, demonstrou que após tratamento com tal fosfolípido houve inibição significativa da resposta pró-inflamatória por meio de NFk-B, o que pode explicar a não elevação do nível de TNF- α pelo grupo

LEC, sendo um dado satisfatório. Ademais, a avaliação da citocina anti-inflamatória (IL-10) no presente estudo, apresentou-se níveis semelhantes para todos os grupos experimentais, exceto para o grupo TS.

Em geral a administração oral dos tensoativos isolados não foi capaz de agravar todos os parâmetros da mucosite induzida por CDDP. Porém, nota-se que a administração de Tween foi capaz de aumentar TNF- α e a administração de lecitina diminuiu a altura das vilosidades intestinais quando comparados ao grupo MUC. A associação de Tween e Span (1:1, 0.75%) agravou a mucosite em quase todos os parâmetros uma vez que além de induzir a perda de peso dos animais, acentuou a PI e os níveis de TNF- α comparado ao grupo MUC. Desse modo, deve-se ter cautela com a utilização de produtos que tenham tensoativos, em acometimento do epitélio gastrointestinal.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- A análise química do oleorresina dos frutos de *Pterodon emarginatus* revelou a presença de diterpenos.
- As características físico-químicas das NCs contendo OS mostraram serem adequadas para sua administração via oral.
- A avaliação das NC OS com tensoativo tween e span (NC OS1) na mucosite intestinal induziu maior perda de peso e aumento da permeabilidade intestinal quando comparado a OS1. Apesar de não ter alterado os níveis de citocinas, reduziu níveis de NAG apontando para uma baixa eficiência desta formulação no tratamento da mucosite.
- O encapsulamento do OS em NC produzida com lecitina (NC OS2) atenuou a permeabilidade intestinal quando comparado com os grupos OS2 e NC OS1. Além disso, a administração de NC OS2 não alterou infiltrado inflamatório, porém aumentou níveis de TNF- α , demonstrando resultado parcial positivo desta formulação no tratamento de mucosite intestinal induzida por CDDP, pois foi capaz de melhorar alguns parâmetros, estando de acordo com a literatura, visto que dificilmente um adjuvante melhora todos os parâmetros da mucosite intestinal.
- A administração oral de OS na dose de 50 mg/kg não resultou em efeitos benéficos sobre a mucosite intestinal na maior parte dos parâmetros avaliados.
- A avaliação dos tensoativos empregados frente a mucosite intestinal confirmam a piora da inflamação promovida pelo grupo TS devido diminuição do peso dos animais, aumento da permeabilidade intestinal e TNF- α .

PERSPECTIVAS

- Investigar a atividade anti-inflamatória de OS e NC OS em um modelo de tratamento mais curto e/ou com doses mais altas;
- Investigar a retenção de NC OS no intestino após administração oral;
- Investigar outros parâmetros na mucosa intestinal: Junções firmes, produção de muco entre outros.
- Investigar a ação de outros polímeros na parede polimérica.

- Investigar outras vias de administração como a retal.

REFERÊNCIAS

ALBERTI, T. B.; MARCON, R.; BICCA, M. A.; RAPOSO, N. R.; CALIXTO, J. B.; DUTRA, R. C. Essential oil from *Pterodon emarginatus* seeds ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating Th1/Treg cell balance. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 1, p. 485-494, 2014.

ALI, H.; WEIGMANN, B.; COLLNOT, E. M.; KHAN, S. A.; WINDBERGS, M.; LEHR, C. M. Budesonide loaded PLGA nanoparticles for targeting the inflamed intestinal mucosa—Pharmaceutical characterization and fluorescence imaging. **Pharmaceutical research**, v. 33, n. 5, p. 1085-1092, 2015.

ALVES, S. F.; BORGES, L. L.; DE PAULA, J. A.; VIEIRA, R. F.; FERRI, P. H., DO COUTO, R. O.; DE PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Chemical variability of the essential oils from fruits of *Pterodon emarginatus* in the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 224-229, 2013.

ANDRADE, M. E. R.; ARAÚJO, R. S.; BARROS, P. A. V.; SOARES, A. D. N.; ABRANTES, F. A.; GENEROSO, S. V.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1080–1087, 2015.

ANTON, N.; SAULNIER, P.; BENOIT, J. Aqueous-core lipid nanocapsules for encapsulating hydrophilic and/or lipophilic molecules. U.S. Patent n. 9,522,121, 20 dez. 2016.

ARAÚJO, R. S.; SILVEIRA, A. L. M.; E SOUZA, É. L. D. S.; FREIRE, R. H.; DE SOUZA, C. M.; REIS, D. C.; COSTA, B. R. C.; SUGIMOTO, M. A.; SILVEIRA, J. N.; MARTINS, F. S.; CASSALI, G. D.; LEITE, J. I. A.; SOUSA, L. P.; FERREIRA, A. V. M.; OLIVEIRA, M. C.; CARDOSO, V. N. Intestinal toxicity evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes loaded with cisplatin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 106, n. January, p. 142–151, 2017.

ARAÚJO, R. S.; GARCIA, G. M.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; OLIVEIRA, L. A. M.; KANO, E. K.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRANDÃO, H. M.; MOSQUEIRA, V. C. F. Cloxacillin benzathine-loaded polymeric nanocapsules: Physicochemical characterization, cell uptake, and intramammary antimicrobial effect. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 110006, 2019.

ARRIAGA, A. M. C.; DE CASTRO, M. A. B.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenoids Isolated from *Pterodon polygalaeflorus*, **J. Braz. Chem. Soc.** 11 642 (2000) 187–190.

BAJIC, J. E.; EDEN, G. L.; LAMPTON, L. S.; CHEAH, K. Y.; LYMN, K. A.; PEI, J. V.; YOOL, A. J.; HOWARTH, G. S. Rhubarb extract partially improves mucosal integrity

in chemotherapy-induced intestinal mucositis. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 37, p. 8322, 2016.

BARROS, P. A.V. D.; GENEROSO, S.D.V.; ANDRADE, M.E.R.; DA GAMA, M.A.S.; LOPES, F.C.F.; DE SALES E SOUZA, É. L.; MARTINS, F. S.; MIRANDA, P. E. M.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N. Efeito da manteiga enriquecida com ácido linoléico conjugado após 24 horas de indução da mucosite intestinal. **Nutrição e câncer**, v. 69, n. 1, pág. 168-175, 2017.

BARROS, P. A. V.; ANDRADE, M. E. R.; DE VASCONCELOS GENEROSO, S.; MIRANDA, S. E. M.; DOS REIS, D. C.; LEOCÁDIO, P. C. L.; SALES E SOUZA, E. L.; MARTINS, F.S.; GAMA, M.A.S.; CASSALI, G.D.; LEITE, J.I.A.; FERNANDES, S.O.A.; CARDOSO, V. N. Conjugated linoleic acid prevents damage caused by intestinal mucositis induced by 5-fluorouracil in an experimental model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1567-1576, 2018.

BASTOS, C. C. C.; DE ÁVILA, P. H. M.; FILHO, E. X. DOS S.; DE ÁVILA, R. I.; BATISTA, A. C.; FONSECA, S. G.; LIMA, E. M.; MARRETO, R. N.; DE MENDONÇA, E. F.; VALADARES, M. C. Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: toxico-pharmacological evaluations. **Toxicology reports**, v. 3, p. 279-287, 2016.

BEHRENS, M. D. D. D.; TELLIS, C. J. M.; CHAGAS, M. D. S. *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 4, p. 236-244, 2012.

BENTO, A. F.; MARCON, R.; DUTRA, R. C.; CLAUDINO, R. F.; COLA, M.; LEITE, D. F. P.; CALIXTO, J. B. β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 3, p. 1153-1166, 2011.

BODIGA, V. L.; BODIGA, S.; SURAMPUDI, S.; BOINDALA, S.; PUTCHA, U.; NAGALLA, B.; SUBRAMANIAM, K.; MANCHALA, R. Effect of vitamin supplementation on cisplatin-induced intestinal epithelial cell apoptosis in Wistar/NIN rats. **Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 572-580, 2012.

BRAUN, K.; POCHERT, A.; LINDÉN, M.; DAVOUDI, M.; SCHMIDTCHEN, A.; NORDSTRÖM, R.; MALMSTEN, M. Membrane interactions of mesoporous silica nanoparticles as carriers of antimicrobial peptides. **Journal of colloid and interface science**, v. 475, p. 161-170, 2016.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CAI, BINGN.; WAN, P.; SUN, H.; CHEN, D.; CHEN, H.; CHEN, X.; PAN, J. Protective effects of enteral nutrition supplemented with *Crassostrea hongkongensis* polysaccharides against 5-fluorouracil-induced intestinal mucosal damage in rats. **Journal of medicinal food**, v. 21, n. 4, p. 348-355, 2018.

CARBONE, C.; MARTINS-GOMES, C.; CADDEO, C.; SILVA, A. M.; MUSUMECI, T.; PIGNATELLO, R.; PUGLISI, G.; SOUTO, E. B. Mediterranean essential oils as precious matrix components and active ingredients of lipid nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 548, n. 1, p. 217-226, 2018.

CARVALHO, J. C.; SERTIÉ, J. A.; BARBOSA, M. V.; PATRÍCIO, K. C.; CAPUTO, L. R.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 2, p. 127-133, 1999.

CARVALHO, C.S. *Pterodon* in Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29842>>. Acesso em: 29 set. 2019.

CECHINEL-ZANCHETT, C. C., BOEING, T., SOMENSI, L. B., STEIMBACH, V. M. B., CAMPOS, A., KRUEGER, C. D. M. A.; SCHULTZ, C.; SANT'ANA, D.M.G.; CECHINEL-FILHO, V.; MOTA DA SILVA, L.; FALONI DE ANDRADE, S. Flavonoid-rich fraction of *Bauhinia forficata* Link leaves prevents the intestinal toxic effects of irinotecan chemotherapy in IEC-6 cells and in mice. **Phytotherapy research**, v. 33, n. 1, p. 90-106, 2019.

CHAIBUB, B. A.; OLIVEIRA, T. B.; FIUZA, T. D. S.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Composição química do óleo essencial e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extrato etanólico bruto e frações das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. St.-Hil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 2, p. 225-229, 2013.

CHASSAING, B.; KOREN, O.; GOODRICH, J.K.; POOLE, A.C.; SRINIVASAN, S.; LEY, R.E.; GEWIRTZ, A.T. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. **Nature**, v. 536, n. 7615, p. 238-238, 2016.

CHEN, X. X.; LAM, K. K. H.; FENG, Y. B.; XU, K.; SZE, S. C. W.; TANG, S. C. W.; LEUNG, G.P.; LEE, C.K.; SHI, J.; YANG, Z.J.; LI, S.T.; ZHANG, Z.J.; ZHANG, K.Y. Ellagitannins from pomegranate ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats while enhancing its chemotoxicity against HT-29 colorectal cancer cells through intrinsic apoptosis induction. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 27, p. 7054-7064, 2018.

CHEN, H.; ZHANG, F.; LI, R.; LIU, Y.; WANG, X.; ZHANG, X.; XU, C.; LI, Y.; GUO, Y.; YAO, Q. Berberine regulates fecal metabolites to ameliorate 5-fluorouracil induced intestinal mucositis through modulating gut microbiota. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 124, p. 109829, 2020.

CINAUSERO, M., APRILE, G., ERMACORA, P., BASILE, D., VITALE, M. G., FANOTTO, V., PARISI, G.; CALVETTI, L.; SONIS, S. T. New frontiers in the pathobiology and treatment of cancer regimen-related mucosal injury. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 354, 2017.

CORDEIRO, B. F.; OLIVEIRA, E. R.; DA SILVA, S. H.; SAVASSI, B. M.; ACURCIO, L. B.; LEMOS, LUISA.; ALVES, J. L.; ASSIS, H. C.; VIEIRA, A. T.; FARIA, A. M. C.; FERREIRA, ENIO.; LOIR, Y. L.; JAN, G.; GOULART, L. R.; AZEVEDO, V.; CARVALHO, R. D. O.; DO CARMO, F. L. R. Whey protein isolate-supplemented beverage, fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the prevention of mucositis in mice. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics**, v. 41, n. 1, p. 2-13, 1995.

CSÁKI, K. F. Aditivos alimentares com surfactantes sintéticos podem causar disfunção da barreira intestinal. **Hipóteses médicas**, v. 76, n. 5, pág. 676-681, 2011.

DE ÁVILA, P. H. M.; DE ÁVILA, R. I.; DOS SANTOS FILHO, E. X.; BASTOS, C. C. C.; BATISTA, A. C.; MENDONÇA, E. F.; SERPA, CRUZ, R. C.; MARRETO, R.N.; A. F.; LIMA, E.M.; VALADARES, M. C. Mucoadhesive formulation of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) reduces intestinal injury from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice. **Toxicology reports**, v. 2, p. 563-573, 2015.

DE FREITAS-BLANCO, V. S.; MONTEIRO, K. M.; DE OLIVEIRA, P. R.; DE OLIVEIRA, E. C. S.; DE OLIVEIRA BRAGA, L. E.; DE CARVALHO, J. E.; RODRIGUES, R. A. F. Spilanthol, the Principal Alkylamide from *Acmella oleracea*, Attenuates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Mice. **Planta médica**, v. 85, n. 03, p. 203-209, 2019.

DE MELLO, C. G. C.; BRANQUINHO, R. T.; OLIVEIRA, M. T.; MILAGRE, M. M.; MOSQUEIRA, V. C. F.; DE LANA, M. Efficacy of lychnopholide polymeric nanocapsules after oral and intravenous administration in murine experimental Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5215-5222, 2016.

DE MIRANDA, J. A. L., BARRETO, J. E. F., MARTINS, D. S., DE SOUZA PIMENTEL, P. V., DA SILVA COSTA, D. V., SILVA, R. R., SILVA, D. A.; MIRANDA DE SOUZA, L. K.; DE CARVALHO LIMA, C. N.; ROCHA, J. A.; DE FREITAS, A. P. F.; DA SILVA, D. A.; SCAFURI, A. G.; DE CARVALHO LEITÃO, R. F.; DE CASTRO BRITO, G. A.; MEDEIROS, J. V. R.; CERQUEIRA, G. S. Protective Effect of Cashew Gum (*Anacardium occidentale* L.) on 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 2, p. 51, 2019.

DEMUNER, A.J; DE ALMEIDA BARBOSA, L.C; VELOSO, D.P; ALVES, D.L.F; HOWARTH, O.W. Structure and plant growth regulatory activity of new diterpenes from *Pterodon polygalaeflorus*, **J. Nat. Prod.** 59 (1996) 770–772.

DE VITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer: principles and practice of oncology**. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

DEVARAJAN, P.; TARABISHI, R.; MISHRA, J.; MA, Q.; KOURVETARIS, A.; VOUGIOUKA, M.; BOULIKAS, T. Low renal toxicity of Lipoplatin compared to cisplatin in animals. **Anticancer Res.**, v. 24, p. 2193-2200, 2004.

DIAL, E. J.; ZAYAT, M.; LOPEZ-STOREY, M.; TRAN, D.; LICHTENBERGER, L. Oral phosphatidylcholine preserves the gastrointestinal mucosal barrier during LPS-induced inflammation. **Shock**, v. 30, n. 6, p. 729-733, 2008.

DOS SANTOS, C. B. R.; DA SILVA RAMOS, R.; ORTIZ, B. L. S.; DA SILVA, G. M.; GIULIATTI, S.; BALDERAS-LOPEZ, J. L.; NAVARRETE, A.; CARVALHO, J. C. T. Oil from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog.: A traditional anti-inflammatory. Study combining in vivo and in silico. **Journal of ethnopharmacology**, v. 222, p. 107-120, 2018.

DÚRAN, N. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Artliber, 2006.

DUTRA, R. C.; PITTELLA, F.; FERREIRA, A. S.; LARCHER, P.; FARIAS, R. E.; BARBOSA, N. R. Efeito cicatrizante das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel em modelos de úlceras dérmicas experimentais em coelhos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 375-382, 2009.

DUTRA, R. C.; SILVA, P. S.; PITTELLA, F.; VICCINI, L. F.; LEITE, M. N.; RAPOSO, N. R. B. Caracterização fitoquímica e citogenética das sementes de *Pterodon emarginatus* VOGEL. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 1, n. 2, p. 99, 2012.

ELAD, S.; CHENG, K. K. F.; LALLA, R. V.; YAROM, N.; HONG, C.; LOGAN, R. M.; BOWEN, J.; GIBSON, R.; SAUNDERS, D.P.; ZADIK, Y.; ARIYAWARDANA, A.; CORREA, M. E.; RANNA, V.; BOSSI, P. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 126, n. 19, p. 4423-4431, 2020.

ENGEL, N. W.; SCHLIFFKE, S.; SCHÜLLER, U.; FRENZEL, C.; BOKEMEYER, C.; KUBISCH, C.; LESSEL, D. Fatal myelotoxicity following palliative chemotherapy with cisplatin and gemcitabine in a patient with stage IV cholangiocarcinoma linked to post mortem diagnosis of Fanconi anemia. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 420, 2019.

FABIA, R.; AR'RAJAB, A.; WİLLÉN, R.; ANDERSSON, R.; AHRÉN, B.; LARSSON, K.; BENGMARK, S. Effects of Phosphatidylcholine and Phosphatidylinositol on Acetic-Acid-Induced Colitis in the Rat. **Digestion**, v. 53, n. 1-2, p. 35-44, 1992.

FAVARETO, R.; TEIXEIRA, M. B.; SOARES, F. A. L.; BELISÁRIO, C. M.; CORAZZA, M. L.; CARDOZO-FILHO, L. Study of the supercritical extraction of *Pterodon* fruits (Fabaceae). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 128, p. 159-165, 2017.

FERREIRA, T. M.; LEONEL, A. J.; MELO, M. A.; SANTOS, R. R.; CARA, D. C.; CARDOSO, V. N.; CORREIA, M.I.T.D.; ALVAREZ-LEITE, J. I. Oral supplementation of butyrate reduces mucositis and intestinal permeability associated with 5-fluorouracil administration. **Lipids**, v. 47, n. 7, p. 669-678, 2012.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int J Pharm** 55:R1–R4, 1989.

GALCERAN, C.B; SERTIE, J.A.A.; LIMA, C.S.; CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory and analgesic effects of 6a,7b-dihydroxy-vouacapan-17b-oic acid isolated from *Pterodon emarginatus* Vog. Fruits. **Inflammopharmacol.** v. 19, p.139–143, 2011.

GALDINO, F. M. P.; ANDRADE, M. E. R.; DE BARROS, P. A. V.; DE VASCONCELOS GENEROSO, S.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; DE ALMEIDA-LEITE, C. M.; PELUZIO, M. C. G.; FERNANDES, S. O. A.; CARDOSO, V. N. Pretreatment and treatment with fructo-oligosaccharides attenuate intestinal mucositis induced by 5-FU in mice. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 485-492, 2018.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of 'sucupira' (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 46, p. 607-616, 2010.

HE, L.; ZHANG, Y.; KANG, N.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; ZHA, Z., YANG, S.; XU, Q.; LIU, Y. Anemoside B4 attenuates nephrotoxicity of cisplatin without reducing anti-tumor activity of cisplatin. **Phytomedicine**, v. 56, p. 136-146, 2019.

HOFF, P. M. G. **Tratado de oncologia**. SÃO PAULO: ATHENEU. p. 28-29, 2013.

HOSCHEID, J.; CARDOSO, M.L.C. Sucupira as a potential plant for arthritis treatment and other diseases. **Arthritis**. 2015:379459, 2015.

HOSCHEID, J.; OUTUKI, P. M.; KLEINUBING, S. A.; DE GOES, P. R.; LIMA, M. M.; CUMAN, R. K.; CARDOSO, M. L. *Pterodon pubescens* oil nanoemulsions: physiochemical and microbiological characterization and in vivo anti-inflammatory efficacy studies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 3, p. 375-383, 2017.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer**. 5. ed. rev. atual. ampl. – Rio de Janeiro: Inca, 2019. 111 p.

JAGER, E. **Controle da liberação do éster etílico de indometacina a partir de nanocápsulas poliméricas através da variação da concentração do monoesterato de sorbitano**. 2008. 113 p. Dissertação – Programa de Pós-graduação em ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

JAIN, S.; HEERALAL, B.; SWAMI, R.; SWARNAKAR, N. K.; KUSHWAH, V. Improved oral bioavailability, therapeutic efficacy, and reduced toxicity of tamoxifen-loaded liquid crystalline nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 1, p. 460-469, 2018.

JUNG, Y.; LIPPARD, S. J. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. **Chemical reviews**, v. 107, n. 5, p. 1387-1407, 2007.

KAUFFMAN, G. B. *et al.* Michele Peyrone (1813-1883), Discoverer of Cisplatin. **Platinum Metals Review**, v. 54, n. 4, p. 250-256, 2010.

KEEFE, D.M.K. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Curr. Opin. Oncol.**, v.19, p.323-327, 2007.

KWON, Y. Mechanism-based management for mucositis: option for treating side effects without compromising the efficacy of cancer therapy. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 2007, 2016.

LALLA, R. V.; BOWEN, J.; BARASCH, A.; ELTING, L.; EPSTEIN, J.; KEEFE, D. M.; MCGUIRE, D.B.; MIGLIORATI, C.R.N.; NICOLATOU-GALITIS, O.; PETERSON, D. E.; RABER-DURLACHER, J. E.; SONIS, S. T.; ELAD, S. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. **Cancer**, v. 120, n. 10, p. 1453-1461, 2014.

LAMMARI, N.; DEMAUTIS, T.; LOUAER, O.; MENIAI, A. H.; CASABIANCA, H.; BENSOUICI, C.; DEVOUASSOUX, G.; FESSI, H.; BENTAHER, A.; ELAISSARI, A. Nanocapsules containing Saussurea lappa essential oil: Formulation, characterization, antidiabetic, anti-cholinesterase and anti-inflammatory potentials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 593, p. 120138, 2021.

LAMSON, N. G.; BERGER, A.; FEIN, K. C.; WHITEHEAD, K. A. Anionic nanoparticles enable the oral delivery of proteins by enhancing intestinal permeability. **Nature biomedical engineering**, v. 4, n. 1, p. 84-96, 2020.

LEE, K. N.; LEE, O. Y. Intestinal microbiota in pathophysiology and management of irritable bowel syndrome. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 27, p. 8886, 2014.

LEITE, E.A., LANA, A.M.Q., CARVALHO JUNIOR, A.D., COELHO, L.G.V., OLIVEIRA, M.C. Acute Toxicity Study of Cisplatin Loaded Long-Circulating and pH-Sensitive Liposomes Administered in Mice. **J. Biomed. Nanotechnol.** 8, 228-239, 2012.

LEITE, C. A. V. G.; RIBEIRO, R. A.; LIMA JÚNIOR, R. C. P.; SOUZA, M. H. L. P.; WANDERLEY, C. W. S. **Bases da Resposta Inflamatória do Trato Gastrointestinal, Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**, Volume, 2016, p. 763-808. Disponível em: (openaccess.blucher.com.br/article-details/bases-da-resposta-inflamatoria-do-trato-gastrointestinal-20138). Acesso em: 02 jan. 2021.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems. A review. **STP Pharma sciences**, v. 9, n. 5, p. 411-418, 1999.

LEOCÁDIO, P. C.; ANTUNES, M. M.; TEIXEIRA, L. G.; LEONEL, A. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; MACHADO, D. C.; GENEROSO, S. V.; CARDOSO, V. N.; CORREIA, M. I. T. L-arginine pretreatment reduces intestinal mucositis as induced by 5-FU in mice. **Nutrition and cancer**, v. 67, n. 3, p. 486-493, 2015.

LEONEL, A. J.; TEIXEIRA, L. G.; OLIVEIRA, R. P.; SANTIAGO, A. F.; BATISTA, N. V.; FERREIRA, T. R.; ROSANA, R.C.; CARDOSO, V.N.; CARA, D.C.; FARIA, A.M.C.; ALVAREZ-LEITE, J. Antioxidative and immunomodulatory effects of tributyrin

supplementation on experimental colitis. **British journal of nutrition**, v. 109, n. 8, p. 1396-1407, 2013.

LEVIT, R.; DE GIORI, G. S.; DE LEBLANC, A. D. M.; LEBLANC, J. G. Protective effect of the riboflavin-overproducing strain *Lactobacillus plantarum* CRL2130 on intestinal mucositis in mice. **Nutrition**, v. 54, p. 165-172, 2018.

LI, Y.; ZHENG, M.; SAH, S. K.; MISHRA, A.; SINGH, Y. Neuroprotective influence of sitagliptin against cisplatin-induced neurotoxicity, biochemical and behavioral alterations in Wistar rats. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 455, n. 1-2, p. 91-97, 2019.

LINDSAY, R. J.; GEIER, M. S.; YAZBECK, R.; BUTLER, R. N.; HOWARTH, G. S. Orally administered emu oil decreases acute inflammation and alters selected small intestinal parameters in a rat model of mucositis. **British Journal of Nutrition**, v. 104, n. 4, p. 513-519, 2010.

LOGAN, R. M.; STRINGER, A. M.; BOWEN, J. M.; GIBSON, R. J.; SONIS, S. T.; KEEFE, D.M.K. Serum levels of NF- κ B and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. **Cancer biology & therapy**, v. 7, n. 7, p. 1139-1145, 2008.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4^a ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo. 368-370 p. 2002.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Medição de proteína com o reagente de fenol Folin. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.

MAHDI, E. S.; SAKEENA, M. H.; ABDULKARIM, M. F.; ABDULLAH, G. Z.; SATTAR, M. A.; NOOR, A. M. Effect of surfactant and surfactant blends on pseudoternary phase diagram behavior of newly synthesized palm kernel oil esters. **Drug design, development and therapy**, v. 5, p. 311, 2011.

MAIOLI, T. U.; DE MELO SILVA, B.; DIAS, M. N.; PAIVA, N. C.; CARDOSO, V. N.; FERNANDES, S. O.; CARNEIRO, C.M.; MARTINS, F.S.; DE VASCONCELOS GENEROSO, S. Pretreatment with *Saccharomyces boulardii* does not prevent the experimental mucositis in Swiss mice. **Journal of negative results in biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2014.

MANOHAR, S.; LEUNG, N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. **Journal of nephrology**, v. 31, n. 1, p. 15-25, 2018.

MASHTOUB, S.; TRAN, C. D.; HOWARTH, G. S. Emu oil expedites small intestinal repair following 5-fluorouracil-induced mucositis in rats. **Experimental biology and medicine**, v. 238, n. 11, p. 1305-1317, 2013.

MIRANDA, M.L.D; GARCEZ, F.R; ABOT, A.R; GARCEZ, W.S. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (leguminosae), **Quim. Nova**. 37 (2014) 473–476.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

OH, N. S., LEE, J. Y., LEE, J. M., LEE, K. W., & KIM, Y. Mulberry leaf extract fermented with *Lactobacillus acidophilus* A4 ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. **Letters in applied microbiology**, v. 64, n. 6, p. 459-468, 2017.

OLIVEIRA, A.E.; DUARTE, J.L.; CRUZ, R.A.; SOUTO, R.N.; FERREIRA, R.M.; PENICHE, T.; DA CONCEIÇÃO, E.C.; DE OLIVEIRA, L.A.; FAUSTINO, S.M.; FLORENTINO, A.C.; CARVALHO, J.C.; FERNANDES, C.P. *Pterodon emarginatus* oleoresin-based nanoemulsion as a promising tool for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) control. **Journal of nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 2, 2017.

ORTIZ-ZAMORA, L.; BEZERRA, D. C.; DE OLIVEIRA, H. N. S.; DUARTE, J. L.; GUIZADO-BOURZAC, F.; CHIL-NÚÑEZ, I.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; BARROSO, A.; MOURÃO, R. H. V.; DE FARIA MOTA OLIVEIRA, A. E. M.; CRUZ, R. A. S.; CARVALHO, J. C. T.; SOLANS, C.; FERNANDES, C. P. Preparation of non-toxic nano-emulsions based on a classical and promising Brazilian plant species through a low-energy concept. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 112989, 2020.

OWENS, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International journal of pharmaceutics**, v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

PACHECO, M. T.; SILVA, A. C.; NASCIMENTO, T. L.; DINIZ, D. G.; VALADARES, M. C.; LIMA, E. M. Protective effect of *Sucupira* oil nanoemulsion against oxidative stress in UVA-irradiated HaCaT cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 10, p. 1532-1543, 2019.

PASCOA, H.; DINIZ, D. G. A.; FLORENTINO, I. F.; COSTA, E. A.; BARA, M. T. F. Microemulsion based on *Pterodon emarginatus* oil and its anti-inflammatory potential. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 1, p. 117-125, 2015.

PETERSON, D. E.; BENSADOUN, R. J.; ROILA, F.; ESMO. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. **Annals of oncology**, v. 22, n. suppl_6, p. vi78-vi84, 2011.

PRAKASH, B.; KUJUR, A.; YADAV, A.; KUMAR, A.; SINGH, P. P.; DUBEY, N. K. Nanoencapsulation: An efficient technology to boost the antimicrobial potential of plant essential oils in food system. **Food Control**, v. 89, p. 1-11, 2018.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMAN, E.; FESSI, H.; DOELKER, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 24, n. 12, p. 1113-1128, 1998.

REED, E. Cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. **Cancer chemotherapy and biotherapy—principles and practice**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, v. 332, 2006.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

RIBEIRO, A.F.C.; TELLES, T.C.; FERRAZ, T.C.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CASSALI, G.D.; CARVALHO, A.T. Effect of Arrabidaea chica extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22(2), p. 364-373, 2012.

RISALITI, L.; KEHAGIA, A.; DAOULTZI, E.; LAZARI, D.; BERGONZI, M. C.; VERGKIZI-NIKOLAKAKI, S.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; BILIA, A. R. Liposomes loaded with Salvia triloba and Rosmarinus officinalis essential oils: In vitro assessment of antioxidant, antiinflammatory and antibacterial activities. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 51, p. 493-498, 2019.

RODRIGUES, F.A.P.; MEDEIROS, P.H. Q. S.; PRATA, M. M. G.; LIMA, A. Â. M. **Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal, Sistema Digestório: Integração Básico-Clinica**, Volume, 2016, p. 441-478. Disponível em: (openaccess.blucher.com.br/article-details/fisiologia-da-barreira-epitelial-intestinal-20127). Acesso em: 02 jan. 2021.

RYBAK, L. P.; MUKHERJEA, D.; RAMKUMAR, V. Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. In: **Seminars in hearing**. Thieme Medical Publishers, 2019. p. 197-204.

SAGAMI, H.; SWIEZEWSKA, E.; SHIDOJI, Y. The history and recent advances in research of polyprenol and its derivatives. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 82, n. 6, p. 947-955, 2018.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L. D. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, 2003.

SHAHID, F.; FAROOQUI, Z.; RIZWAN, S.; ABIDI, S.; PARWEZ, I.; KHAN, F. Oral administration of Nigella sativa oil ameliorates the effect of cisplatin on brush border membrane enzymes, carbohydrate metabolism and antioxidant system in rat intestine. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 69, n. 5, p. 299-306, 2017.

SHAHID, F.; FAROOQUI, Z.; KHAN, F. Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. **European journal of pharmacology**, v. 827, p. 49-57, 2018.

SOARES, P. M.; MOTA, J. M. S.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, R. B.; ASSREUY, A. M. S.; BRITO, G. A. C.; SANTOS, A. A.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M. H. Gastrointestinal

dysmotility in 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis outlasts inflammatory process resolution. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 63, n. 1, p. 91-98, 2008.

SONIS, S. T., OSTER, G., FUCHS, H., BELLM, L., BRADFORD, W. Z., EDELSBERG, J., HAYDEN, V.; EILERS, J.; EPSTEIN, J. B.; LEVEQUE, F. G.; MILLER, C.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M. M.; SPIJKERVET, F. K.L.; HOROWITZ, M. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. **Journal of clinical oncology**, v. 19, n. 8, p. 2201-2205, 2001.

SONIS, S.T. The pathobiology of mucositis. *Nat. Cancer Reviews*, v.4, p.277-284, 2004a.

SONIS, S. T.; ELTING, L. S.; KEEFE, D.; PETERSON, D. E.; SCHUBERT, M.; HAUER-JENSEN, M.; BEKELE, N.; RABER-DURLACHER, J.; DONNELLY, P.; RUBENSTEIN, E. B. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 100, n. S9, p. 1995-2025, 2004b.

SONIS, S. T. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. **J Support Oncol**, v. 5, n. 9 Suppl 4, p. 3-11, 2007.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

SPINDOLA, H. M.; CARVALHO, J. E. D.; RUIZ, A. L. T.; RODRIGUES, R. A.; DENNY, C.; SOUSA, I. M.O.; TAMASHIRO, J.Y.; FOGLIO, M. A. Furanoditerpenes from *Pterodon pubescens* Benth with selective in vitro anticancer activity for prostate cell line. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 569-575, 2009.

SURESH, A. V. S., VARMA, P. P., SINHA, S., DEEPIKA, S., RAMAN, R., SRINIVASAN, M., MANDAPAL, T.; REDDY, C. O.; ANAND, B. B. Risk-scoring system for predicting mucositis in patients of head and neck cancer receiving concurrent chemoradiotherapy. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 448, 2010.

SWENSON, E. S.; MILISEN, W. B.; CURATOLO, W. Intestinal permeability enhancement: efficacy, acute local toxicity, and reversibility. **Pharmaceutical research**, v. 11, n. 8, p. 1132-1142, 1994.

TAKENAKA, I. K. T. M. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot em mucosite murina e sua composição química**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

TAKENAKA, I. K. T. M.; AMORIM, J. M.; DE BARROS, P. A. V.; BRANDÃO, G. C.; CONTARINI, S. M. L.; DE ALMEIDA-LEITE, C. M.; MARTINS, F.S.; CARDOSO, V.N.; CASTILHO, R.O.; FERNANDES, S. O. A. Chemical Characterization and Anti-

inflammatory Assessment of the Hydroethanolic Extract of *Fridericia chica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, n. 4, p. 559-567, 2020.

TREEDE, I.; BRAUN, A.; SPARLA, R.; KÜHNEL, M.; GIESE, T.; TURNER, J. R.; ANES, E.; KULAKSIZ, H.; FÜLLEKRUG, J.; STREMMEL, W.; GRIFFITHS, G.; EHEHALT, R. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 27155-27164, 2007.

TREISTER, N.; SONIS, S. Mucositis: biology and management. **Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery**, v. 15, n. 2, p. 123-129, 2007.

TRINDADE, L. M.; MARTINS, V. D.; RODRIGUES, N. M.; SOUZA, E. L. S.; MARTINS, F. S.; COSTA, G. M. F.; ALMEIDA-LEITE, C.M.; FARIA, A.M.C.; CARDOSO, V.N.; MAIOLI, T.U.; GENEROSO, S.V. Oral administration of Simbioflora®(synbiotic) attenuates intestinal damage in a mouse model of 5-fluorouracil-induced mucositis. **Beneficial microbes**, v. 9, n. 3, p. 477-486, 2018.

ÜNAL, H.; D'ANGELO, I.; PAGANO, E.; BORRELLI, F.; IZZO, A.; UNGARO, F.; QUAGLIA, F.; BILENSOY, E. Core-shell hybrid nanocapsules for oral delivery of camptothecin: formulation development, in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 1, p. 42, 2015.

URANGA, J. A.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. M.; GARCÍA-JIMÉNEZ, C.; VERA, G.; MARTÍN-FONTELLES, M. I.; ABALO, R. Alterations in the small intestinal wall and motor function after repeated cisplatin in rat. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 29, n. 7, p.13047, 2017.

VERMA, G.; RAJAGOPALAN, M. D.; VALLURU, R.; SRIDHAR, K. A. Nanoparticles: A Novel Approach to Target Tumors. In: **Nano-and Microscale Drug Delivery Systems**. Elsevier, 2017. p. 113-129.

VIENNOIS, E.; MERLIN, D.; GEWIRTZ, A. T.; CHASSAING, B. Dietary emulsifier-induced low-grade inflammation promotes colon carcinogenesis. **Cancer research**, v. 77, n. 1, p. 27-40, 2017.

VILLALBA, B.T.; IANISKI, F.R.; VOGT, A.G.; PINZ, M.P.; ELICA, A.; REIS, S.; VAUCHER, R.A.; SOARES, M.P.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Polymeric nanocapsules as a technological alternative to reduce the toxicity caused by meloxicam in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 316-321, 2016.

WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.; CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological reports**, v. 64, n. 5, p. 1020-1037, 2012.

WU, C. H.; KO, J. L.; LIAO, J. M.; HUANG, S. S.; LIN, M. Y.; LEE, L. H.; CHANG, L.Y.; OU, C. C. D-methionine alleviates cisplatin-induced mucositis by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal inflammation. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 11, p. 1758835918821021, 2019.

WU, J.; GAN, Y.; LI, M.; CHEN, L.; LIANG, J.; ZHUO, J.; LUO, H.; XU, N.; WU, X.; WU, Q.; LIN, Z.; SU, Z.; LIU, Y. Patchouli alcohol attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis via TLR2/MyD88/NF- κ B pathway and regulation of microbiota. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 124, p. 109883, 2020.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 427-434, 2007.

YAMAMOTO, H.; ISHIHARA, K.; TAKEDA, Y.; KOIZUMI, W.; ICHIKAWA, T. Changes in the mucus barrier during cisplatin-induced intestinal mucositis in rats. **BioMed research international**. 2013, 2013, 276186.

ANEXO I – Comprovante de submissão do artigo

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Pterodon emarginatus oil-resin encapsulated in nanocapsules partially attenuates intestinal mucositis induced by cisplatin. --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	COLSUB-D-20-02211
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	cisplatin; nanocapsules; Pterodon emarginatus; intestinal permeability; mucositis
Corresponding Author:	RAQUEL ARAUJO BRAZIL
First Author:	Jeruza Ferraz Filgueiras Di Miceli
Order of Authors:	Jeruza Ferraz Filgueiras Di Miceli Maria Emilia Rabelo Andrade Paula Lopes Armond Carvalho Elandia Aparecida Santos Anna Eliza Maciel de Faria Mota Oliveira Rodrigo Alves Soares Cruz Rafael Garrett Vanessa Carla Furtado Mosqueira Geovanni Dantas Cassali Cecile D'Haese Bernard Nysten Jacqueline Isaura Alvarez Leite Valbert Nascimento Cardoso RAQUEL SILVA ARAÚJO
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Intestinal mucositis (IM) is a frequent adverse effect in anticancer therapy without currently effective treatment. Local delivery of bioactive substances for the treatment of IM remains a challenge and nanocarriers could be a promising strategy. The oil obtained from the seeds of sucupira (Pterodon emarginatus) is an anti-inflammatory agent, which presents water insolubility. For this reason, we evaluated if the nanoencapsulation of sucupira oil-resin (SO) in nanocapsules (SO-NC) could be a therapeutically effective system for the treatment of IM in a murine model cisplatin (CDDP)-induced intestinal mucositis model. SO-NC was prepared by nanoprecipitation and characterized using DLS, HPLC and AFM. SO-NC was examined for in vivo potential mucositis model. Swiss mice were gavaged daily with water, SO (50 mg/kg) or SO-NC (50 mg/kg) for eight days. Intestinal mucositis was induced (day 5) with CDDP (10 mg/kg) via intraperitoneal injection. The animals were euthanized and intestinal permeability, inflammatory mediators, and intestinal histology were performed. SO-NC demonstrated adequate characteristics for oral administration as size under 300 nm, IP < 0.3, high EE and spherical shape. The administration of SO to CDDP-mucositis animals induced weight loss, increased intestinal permeability, and inflammatory response. However, the encapsulation of SO into NC demonstrated beneficial effects by the reduction of the intestinal permeability and the MPO levels. In conclusion, nanoencapsulation of SO can positively impact intestinal mucositis by promoting partial mucosal recovery. This is a promising strategy for the development of a new treatment of intestinal inflammation diseases, like mucositis.
Suggested Reviewers:	Stringer Andrea

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation