

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUISA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS, ÁREA DE BIOMATERIAIS
MESTRADO ACADÊMICO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO E TOXICOLÓGICO
DE UM GEL MUCOADESIVO PARA USO ODONTOLÓGICO ELABORADO A
PARTIR DOS EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE RESÍDUOS DA AGAVE
SISALANA E *PUNICA GRANATUM***

JULIA AMANDA RODRIGUES FRACASSO

ORIENTADORA: Prof. Dra. Lucinéia dos Santos

ARAÇATUBA – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUISA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS, ÁREA DE BIOMATERIAIS
MESTRADO ACADÊMICO

JULIA AMANDA RODRIGUES FRACASSO

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PERFIL ANTI-INFLAMATÓRIO E TOXICOLÓGICO DE
UM GEL MUCOADESIVO PARA USO ODONTOLÓGICO ELABORADO A PARTIR
DOS EXTRATOS VEGETAIS OBTIDOS DE RESÍDUOS DA *AGAVE SISALANA* E
PUNICA GRANATUM

Dissertação à Faculdade de Odontologia de
Araçatuba da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Ciência Odontológica – Área de
concentração em Biomateriais.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Lucinéia dos Santos

ARAÇATUBA - SP

2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F797a Fracasso, Júlia Amanda Rodrigues.
Avaliação in vitro do perfil anti-inflamatório e toxicológico de um gel mucoadesivo para uso odontológico elaborado a partir dos extratos vegetais obtidos de resíduos da *Agave sisalana* e *Punica granatum* / Júlia Amanda Rodrigues Fracasso. - Araçatuba, 2023
27 f. :il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Lucinéia dos Santos

1. Biomassa 2. Saponinas 3. Usos terapêuticos I. T

Black D15
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, Rodovaldo Fracasso, por tudo o que tenho e por tudo aquilo que desfrutarei. Obrigada por tudo que o senhor fez em vida para eu ser quem eu sou. Hoje, eu sinto a sua falta, mas o meu trabalho agora é trazer o bem-estar para aqueles que sofrem com o que o senhor sofreu.

A minha mãe, Susete R. A. Fracasso, obrigada por todo amor, dedicação e por ser a minha melhor amiga.

Aos meus irmãos, Roger e Carol, agradeço por sempre cuidarem de mim.

Aos meus tios, Ernesto e Augusta, por sempre se fazerem presente na minha vida desde criança e me incentivarem nos meus sonhos.

À minha querida tia Dirce e ao meu tio Álvaro, as minhas maiores saudades.

À Ciência, que traz verdade aos ignorantes, e a pesquisa por retirar as vendas dos olhos daqueles que se fazem de cegos mesmo com as evidências em cheque.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, que por intermédio da concessão da bolsa, neste período de 24 meses, permitiu que conseguisse me aventurar na pesquisa e fazer aquilo que amo, muito obrigada.

Ao Projeto CAPES PrInt Unesp: Explorando Abordagens Multidisciplinares para o Desenvolvimento de Produtos Fitoterápicos, pela oportunidade de trabalhar com dois resíduos agroindustriais no Brasil, compreendendo em seu reaproveitamento para novas tecnologias e renda aos que mais precisam, principalmente, no sertão baiano. Honestamente, espero que daqui a dez anos eu leia isto e me lembre que estive nos primeiros passos de desenvolvimento.

À toda equipe da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Unesp. Primeiramente, ao Departamento de Biotecnologia, por todo amparo e ajuda que sempre recebi. Ao técnico de laboratório, Alan, pela ajuda e ensinamentos, eu aprendi e aprenderei em todas as oportunidades que aparecerem. A técnica, Eliana, por sempre ajudar e participar das atividades propostas. Às tias da limpeza, tia Dani, muito obrigada por sempre me socorrer. Aos porteiros, Sivaldo e Alessandro, e ao segurança, Jorge, gratidão pela gentileza, carinho, respeito, tenho um apreço muito grande por vocês.

Ao cursinho pré-vestibular da Unesp-Assis pela oportunidade de egresso e pelas oportunidades que tenho hoje dentro da universidade.

À Prof^a. Dra. Lucinéia dos Santos por me convidar a participar como estagiária do seu grupo de pesquisa em 2019 e por hoje contribuir tanto com o desenvolvimento da Ciência no

Brasil. Agradeço pela orientação, incentivo, oportunidade, aprendizado e pela graciosa amizade.

À minha grande amiga e irmã de alma e de vida, Thayná Ruyz, pelas grandes histórias e por todo amor durante esses anos, sem você eu não chegaria no que sou hoje, os meus mais sinceros agradecimentos.

À minha outra irmã de alma, Francine Cardoso, pelas loucuras e por ser minha confidente.

À Luísa Taynara Silvério da Costa, por todo apoio, amparo e amor durante esses anos de convivência.

À Alessandra Dias, minha pequena grande mulher e amiga que tanto amo.

À Beatriz Mello, Karina Tissato, Eduardo O. Rocha e Giovanni Duarte pela amizade de sete anos, por me conhecerem desde o início e trilharem este lindo caminho de amizade.

Ao Luís Fernando Silva meu grande amigo de loucuras e da vida.

À minha querida amiga por todos os conselhos e ajuda Kimberly V. A. Bernardo.

À minha segunda família, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica em Fitoprodutos (FITOTEC). Agradeço a Mariana Ibe por ser meu primeiro contato, pela paciência e ajuda. A Marianinha (Mariana Parron), pela amizade e pelo trabalho em equipe. A Luísa Taynara Silvério da Costa pela amizade, pelo crescimento profissional e pelo conhecimento, que este ninguém tirará de mim. Ao Estevam Nogueira pelas piadas, risadas e soluções. Agradeço aos estagiários - Laura Akiê, Júlia Vitória Miranda, Ingrid Yuri, Fernando Yutaka, Guilherme Jardim, Carlos Guilherme, Ryan Peixoto, Caio Maurício, Nathália Zoppe e Camila Pimentel – sou extremamente grata por tê-los conhecido e por saber que participei da formação de pessoas boas e capacitadas.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro-Paes pela infraestrutura do Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel), minha extrema estima e admiração – antes, a ideia abstrata de participar do laboratório com 16 anos, hoje com 24, tornou-se realidade. Aos meus amigos e parceiros do laboratório GenTe Cel - Maria Malagutti, Lucas Guarnier, Lincoln Moro, Kyara Oliveira Costa Conceição, Yasmim Soares Pereira Julia Gomes, Maurício Fogaça e Carol Azevedo - foi um imenso prazer conhecê-los e poder contar com pessoas sinceras e íntegras.

Às Profa. Dra. Débora de Barros Barbosa, Profa. Dra. Cassia Malacrida e Profa. Dra. Karina Alves de Toledo pela disponibilidade dos equipamentos e ensinamentos.

A todos aqueles que passaram pela minha vida e que me ensinaram o que eu nunca devo ser.

Julia Amanda Rodrigues Fracasso.

Que c4ncer um dia seja s3 um signo, Pai.

RESUMO

As espécies *Agave sisalana* (sisal) e *Punica granatum* (romã) são ricas em saponinas, metabólitos secundários com relevantes atividades terapêuticas, entre elas a anti-inflamatória. O Brasil é o maior produtor de sisal, porém, 95% do peso de sua folha é desprezado após a retirada das fibras. A casca da romã também é um resíduo produzido em abundância em território brasileiro. Assim, buscando suprir a demanda por anti-inflamatórios eficazes e seguros nos tratamentos odontológicos, em especial da mucosite, o presente estudo objetivou desenvolver um gel mucoadesivo, de uso tópico, contendo a associação dos extratos dos resíduos do sisal (RS) e da romã (RR). Para isso, foram realizados os seguintes estudos *in vitro* dos extratos isolados e associados, assim como, da formulação resultante: i) fitoquímicos (dosagem de saponinas totais); ii) citotoxicidade (MTT) e iii) farmacológicos - atividade anti-inflamatória (fagocitose, espraçamento de macrófagos e estabilidade de membrana). Os resultados fitoquímicos mostraram as seguintes concentrações de saponinas, expressas em grama de saponinas por 100 gramas de extrato seco: RS – 29.91 ± 0.33 ; RR – 15.83 ± 0.93 ; Associação (A) – 22.99 ± 0.01 ; Gel Base (G1) – 0.00 ± 0.00 e Gel Associação (G2) – 0.52 ± 0.05 . No teste do MTT para os extratos isolados os valores das concentrações letais medianas ($\mu\text{g/mL}$) foram de 3757.00 para o RS e de 2064.91 para o RR. Para a A e o G2 foi verificada ausência de citotoxicidade e aumento da viabilidade celular em função do tempo de tratamento. Nos três testes anti-inflamatórios os resultados obtidos com o RS, RR e A comprovaram esta atividade biológica. O G2 apresentou efeito anti-inflamatório semelhante ao do medicamento dexametasona. Desta forma, o gel contendo RS e RR (G2) se apresenta como um candidato em potencial para o desenvolvimento e introdução de um novo fitoterápico anti-inflamatório na terapêutica medicamentosa em odontologia e poderá agregar valor econômico, social e ambiental aos resíduos que são desprezados no Brasil.

Palavras-chave: Biomassa, Saponinas, Terapêutica.

ABSTRACT

The species *Agave sisalana* (sisal) and *Punica granatum* (pomegranate) are rich in saponins, secondary metabolites with relevant therapeutic activities, including anti-inflammatory activity. Brazil is the largest producer of sisal, however, 95% of its leaf weight is discarded after the fibers are removed. Pomegranate peel is also a waste produced in abundance in Brazil. Thus, considering the demand for effective and safe anti-inflammatories in dental treatments, especially mucositis, the present study aimed to develop a mucoadhesive gel, for topical use, containing the association of sisal (RS) and pomegranate residue extracts (RR). In addition, the *in vitro* studies were carried out with isolated and associated extracts, as well as a gel formulation containing both RS and RR, following: i) phytochemicals analysis (dosage of total saponins); ii) cytotoxicity (MTT) and iii) anti-inflammatory activity (phagocytosis, macrophage spreading and membrane stability). The phytochemical results showed the following saponin concentrations, expressed in grams of saponins per 100 grams of dry extract: RS - 29.91 ± 0.33 ; RR - 15.83 ± 0.93 ; Association (A) - 22.99 ± 0.01 ; Gel Base (G1) - 0.00 ± 0.00 and Association Gel (G2) - 0.52 ± 0.05 . In the MTT test for isolated extracts, median lethal concentration values ($\mu\text{g/mL}$) were 3757.00 for RS and 2064.91 for RR. Then, A and GA, there was not cytotoxicity and an increase in cell viability as a function of treatment time. In the three anti-inflammatory tests, the results obtained with RS, RR and A confirmed this biological activity. G2 showed an anti-inflammatory effect similar to dexamethasone. Furthermore, the gel containing RS and RR (G2) presents itself as a potential candidate for the development and introduction of a new anti-inflammatory herbal medicine in dentistry and may add economic, social and environmental value to waste that is discarded in Brazil.

Keywords: Biomass, Saponins, Therapeutics

Sumário

1. Introdução	10
2. Material e métodos	11
2.1 Material vegetal	11
2.2 Preparo do extrato	12
2.3 Associação dos extratos do resíduo da romã e do sisal	15
2.4 Preparo do gel mucoadesivo	15
2.5 Determinação de saponinas totais.....	16
2.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro	18
2.7.1 Delineamento experimental	18
2.7.2 Cultura Celular.....	18
2.7.3 Seleção de macrófagos.....	19
2.7.4 Fagocitose	19
2.7.5 Espreadimento de macrófagos	20
2.8 Análise estatística	22
3. Resultados	23
3.1 Saponinas totais	23
3.2 Viabilidade celular	23
3.3 Fagocitose	25
3.4 Espreadimento	27
3.5 Estabilização de membrana.....	30
4. Discussão	32
5. Conclusão	37
6. Referências	37

1. Introdução

A inflamação é uma reação natural de proteção do organismo contra danos endógenos e exógenos, tais como: lesões teciduais, trauma, infecções, reações imunológicas e necrose tecidual, de modo que é sustentada por cinco pilares, sendo eles: edema, calor, rubor, dor e perda da função (Arulselvan et al., 2016). Diversas células do sistema imunológico participam de forma ativa nos processos inflamatórios, dentre elas os macrófagos. Estes são conhecidos como fagócitos, intimamente ligados à imunidade inata e responsáveis pela produção, em conjunto com outros leucócitos, de mediadores químicos que promovem a cascata inflamatória e o reparo do dano gerado (Cebenelli, 2019).

Porém, quando a resposta inflamatória ocorre de forma exacerbada e imprópria ao invés de sanar o dano que a deu origem ela promove no organismo novas lesões. Um exemplo claro é o que acontece na mucosite oral (Figueiredo et al., 2013). Esta doença é resultante de uma cascata complexa de eventos frequentemente provenientes da toxicidade ocasionada pelo uso por agentes antineoplásicos e da radioterapia na região de cabeça e pescoço (Al-Azri et al., 2015). Trata-se de uma resposta inflamatória gerada, mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1, interleucina-11 e interleucina-6, que causa lesão nas células da mucosa, reduzindo a espessura epitelial. Essa alteração resulta em úlceras que não ficam restritas somente ao epitélio, mas envolvem células da mucosa oral e componentes da matriz extracelular no tecido conjuntivo (Gomes et al., 2018)

Assim, quando exacerbada, quanto aos sinais e sintomas, a resposta inflamatória necessita ser tratada com o uso de anti-inflamatórios. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), representam no mundo o principal tratamento da inflamação, dor e febre. Todavia, os AINEs, em sua maioria, por não apresentarem total especificidade em relação a enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), também inibem a enzima ciclooxigenase 1 (COX-1) e com isso, promovem vários efeitos adversos (Walker, 2019). Ademais, o emprego indiscriminado desta classe farmacológica, que pode ser facilmente adquirida sem apresentação de prescrição médica, gera um importante fator de risco a saúde de indivíduos que se automedicam (Radi; Khan, 2019).

Na busca por tratamentos medicamentosos alternativos que apresentem efetiva atividade anti-inflamatória e ausência dos efeitos adversos gerados pelos AINEs, destacam-se as pesquisas farmacológicas com plantas medicinais. Os efeitos terapêuticos das plantas podem ser atribuídos à presença de diferentes metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais (Im, 2020). Assim, as saponinas representam uma importante classe de metabólitos

secundários que apresentam relevantes atividades biológicas, como atividade hemolítica, molusquicida, anti-helmíntica, espermicida, hipocolesterolemiantes e anti-inflamatória (Dunder et al. 2010; Dunder et al., 2013; Araldi et al., 2018; Viel et al., 2016; Zhu et al., 2017). Além disso, as saponinas esteroidais são utilizadas na indústria de esteroides como matéria-prima para síntese de anti-inflamatórios corticosteroides (Hashim et al., 2014) e plantas ricas em saponinas são utilizadas na medicina popular para o tratamento da inflamação (Silva, 2014).

Espécies ricas em saponinas podem ser largamente encontradas no Brasil, como é o caso da *Agave sisalana* (sisal) (Dunder, 2013) e da *Punica granatum* (romã) (Viera, 2014). O Brasil é o maior produtor de sisal e exportador de sua fibra dura, entretanto, a fibra presente na folha de sisal corresponde a aproximadamente 4% do seu peso e todo o resíduo vegetal restante rico em saponinas é desprezado (Araldi, 2018; Viel, 2016; Dunder, 2013). A casca da romã também é um resíduo produzido em abundância em território brasileiro e estudos científicos realizados *in vitro* e *in vivo*, com as diferentes partes desta espécie, relatam suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, em decorrência de seus metabólitos secundários, particularmente de saponinas (Viera, 2014).

Diante dessas premissas, visando o desenvolvimento de um novo anti-inflamatório, de uso tópico, a partir dos resíduos vegetais de duas plantas ricas em saponinas, esta pesquisa avaliou, por meio de estudos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos *in vitro*, os extratos desenvolvidos a partir dos resíduos do sisal e da romã, de forma isolada e associada, bem como de um gel mucoadesivo contendo a associação dos extratos. Além da importância de um novo anti-inflamatório nos tratamentos odontológicos, vale destacar que o aproveitamento de resíduos vegetais para o desenvolvimento de fitoterápicos pode constituir em uma importante prática para a promoção econômica e social de trabalhadores pertencentes a regiões fragilizadas do país.

2. Material e métodos

2.1 Material vegetal

As folhas do sisal (*Agave sisalana*) foram obtidas por meio do cultivo realizado na Faculdade de Ciências e Letras – Unesp - Campus Assis. Município: Assis. Latitude: 22° 39' 0.42" S, Longitude: 50° 24' 0.44" W. Estado de São Paulo. Brasil. A espécie foi identificada como *Agave sisalana* no herbário assisense (HASSI) localizado na Universidade Estadual de São Paulo, campus Assis, Estado de São Paulo, sendo o voucher depositado no número: 2597.

A casca da romã (*Punica granatum*), já desidratada, triturada e esterilizada, foi obtida em lote único da Companhia Santos Flora (Santos Flora Com. De Ervas, Mairiporã, SP – Brasil).

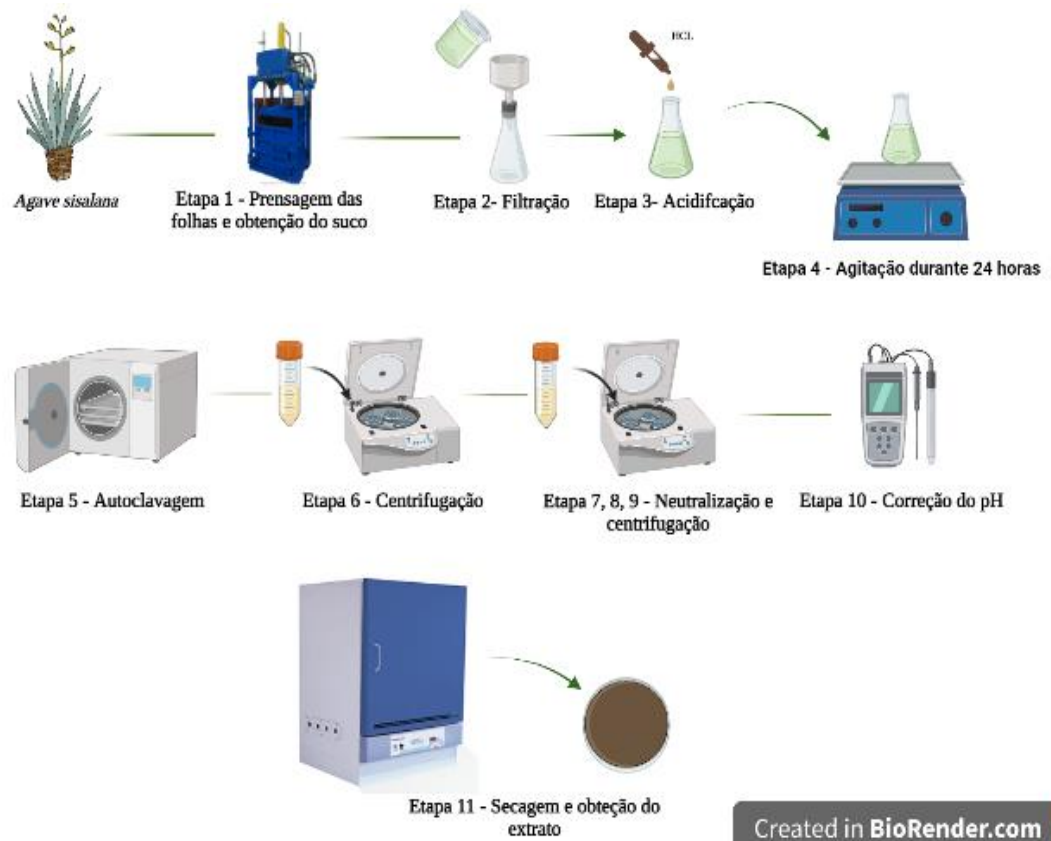
O uso do sisal e da romã foi regulamentado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) por meio do protocolo do Projeto CAPES PrInt Unesp: Explorando Abordagens Multidisciplinares para o Desenvolvimento de Produtos Fitoterápicos sob o número de certidão de registro: A1266B4.

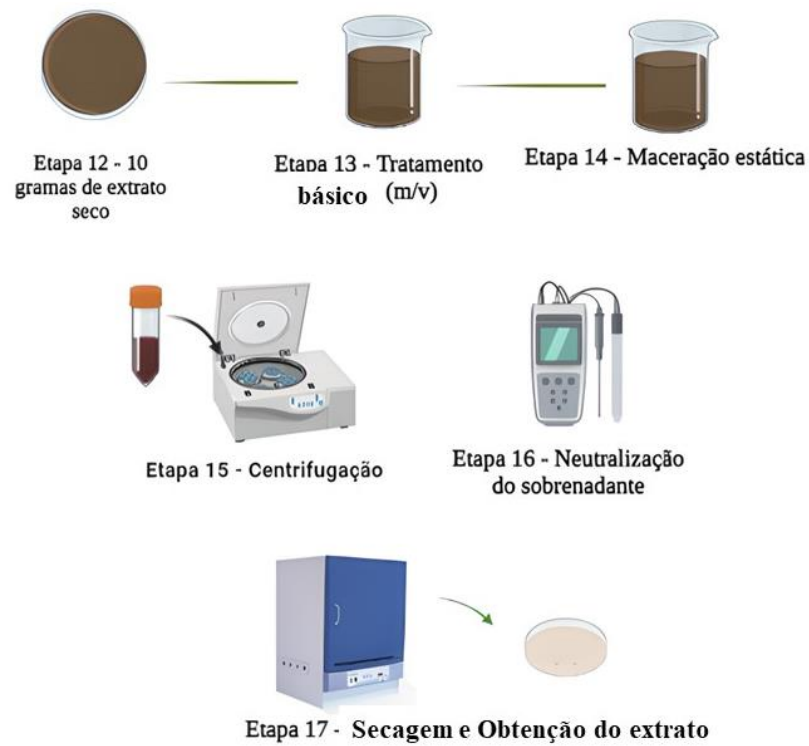
2.2 Preparo do extrato

Para o preparo do extrato do sisal foi utilizada a metodologia descrita por Dunder et al. 2013, com algumas adaptações. Inicialmente a mucilagem composta por resíduos sólidos e líquidos, resultante do processo de desfibramento das folhas de sisal, foi prensada e o resíduo líquido obtido após filtração foi denominado suco do sisal. Em seguida, a partir desse suco, o extrato do resíduo do sisal (RS) foi preparado por meio da seguinte metodologia: (1) hidrólise ácida com aquecimento do suco em autoclave a 120 °C por 60 min, com ácido clorídrico 30% (Synth, SP, Brasil); (2) centrifugação da solução a 4000 rpm por 20 min, para obtenção do conteúdo precipitado; (3) neutralização do precipitado com hidróxido de sódio 5% (Exodus, SP, Brasil), (4) liofilização do precipitado. A hidrólise básica foi realizada de acordo com Haas (2015) para aumentar a solubilidade do extrato em água; (5) do precipitado seco, 10 gramas foram dissolvidos em 100 mL de hidróxido de sódio a 5% (Anidrol, Diadema, SP, Brasil); (6) a solução foi agitada por 1 hora, filtrada a vácuo (Fisatom, modelo 803, São Paulo, SP, Brasil); (7) a substância líquida foi neutralizada com ácido acético 0,1 Molar (Synth, SP, Brasil); E (8) a fração líquida filtrada obtida do extrato foi liofilizada e armazenada a 4 °C (Figura 1).

Para o preparo do extrato do resíduo da romã (RR) (Figura 2) 10 g do pó de cascas de romãs foram submetidos ao processo de maceração com 30 mL de etanol a 70 °G, por 24 h, seguido por filtração. Este processo de extração por maceração foi repetido por 5 vezes, com o resíduo sólido proveniente de cada filtração, até que não foi possível observar a presença de sólidos solúveis no extrato. Os volumes resultantes dessas 5 extrações foram reunidos e concentrados em rotoevaporador a 60 °C, até obtenção do extrato mole. Esse extrato foi preparado na proporção de 30:70 (p/v) em propilenoglicol PA (Synth, SP, Brasil), posteriormente mantido em banho-maria a 40 °C, sob agitação até completa homogeneização (Curti, 2020).

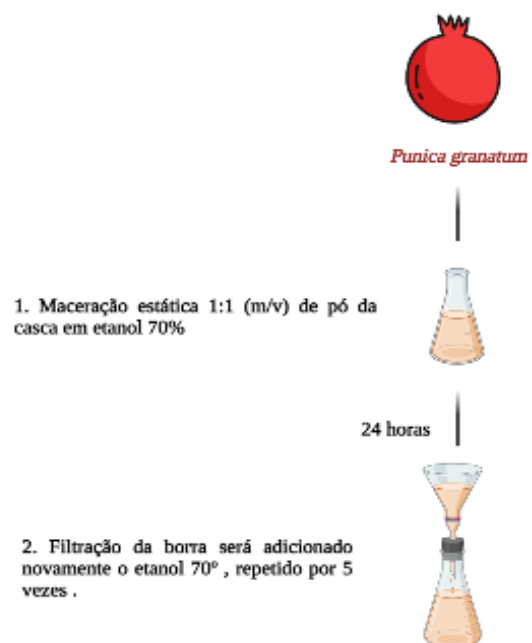
Figura 1. Preparo do extrato do resíduo do sisal

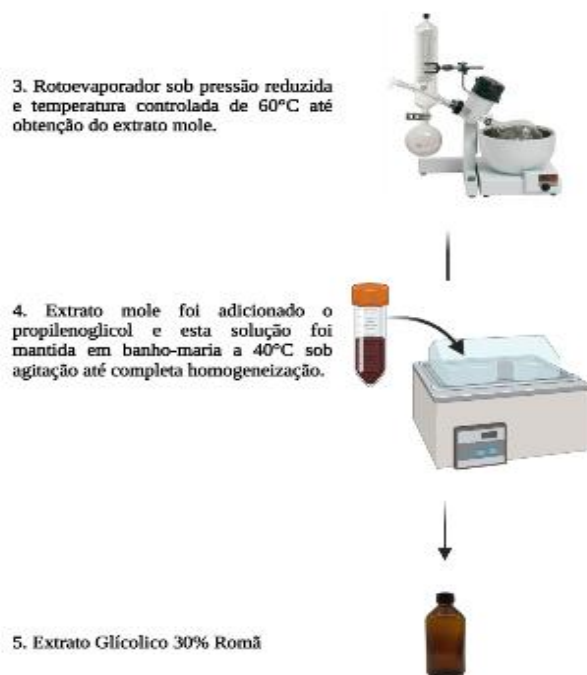




Fonte: Autora, 2022.

Figura 2. Preparo do extrato do resíduo da romã.





Fonte: Autora, 2022.

2.3 Associação dos extratos do resíduo da romã e do sisal

Com o objetivo de potencializar os efeitos isolados dos extratos de resíduos de sisal e romã, eles foram associados (A). As concentrações de cada extrato utilizado na associação correspondem aos valores de Dose Efetiva 50 (DE50) obtidos no ensaio de Fagocitose (Item 2.6.4), ou seja, os extratos foram associados nas concentrações de 600 µg do RS e 600 µg do RR por mL de solução.

2.4 Preparo do gel mucoadesivo

Para o preparo da formulação, foi utilizado o carboximetil sódico (Êxodo, SP, Brasil) a 1,6% (m/v), glicerina (Synth, SP, Brasil) 1,2% (m/v), metilparabeno (Synth, SP, Brasil) a 0,1% (m/v) e trietanolamina (Sigma, SP, Brasil) 1,4% (m/v) como corretor de pH. Durante a preparação, todos os reagentes foram dissolvidos em água e a solução foi agitada até obter uma formulação em forma de gel. A formulação permaneceu em repouso por 24 h. Após esse tempo, a formulação foi agitada novamente e a associação dos extratos de romã e sisal foi adicionada nas concentrações de 0,6% do RS e 0,6% do RR (Figura 3).

Figura 3. Gel base (G1) e gel mucoadesivo com a associação dos extratos nas concentrações de 0,6% do RS e 0,6% do RR (G2).

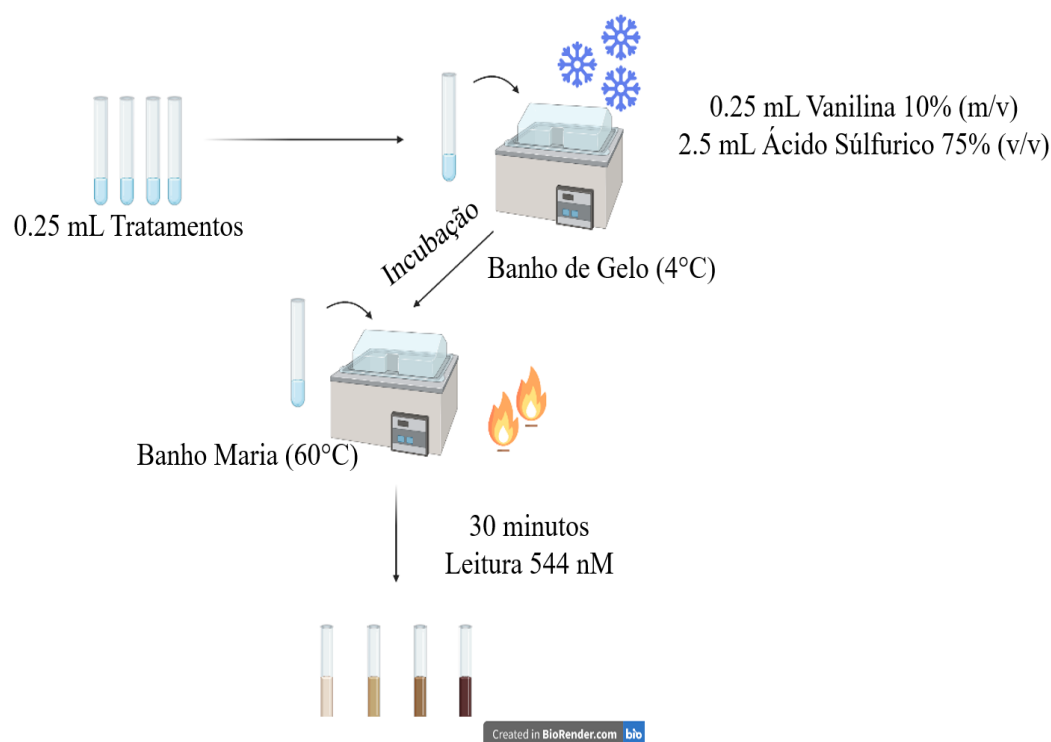


Fonte: Autora, 2022.

2.5 Determinação de saponinas totais

O teor de saponinas foi medido de acordo com Hiai et al. (1976). Em um tubo de ensaio foram pipetados 0,25 mL de extrato isolado (RS ou RR) ou extratos combinados (A) na mesma proporção, 0,25 mL de reagente vanilina 10% (m/v) e 2,5 mL de H_2SO_4 72% (v/v), em banho de gelo a 4 °C. Após, a mistura foi aquecida em banho-maria por 10 min a 60 °C e posteriormente resfriada. A absorvância da mistura foi medida a um comprimento de onda de 544 nm. Saponina Equijala (Sigma Aldrich cas 8047152) foi usada como padrão de referência e análise expressa em grama equivalente do padrão saponina em 100 gramas de extrato seco. Além disso, também foram avaliadas as concentrações de saponinas na formulação base do gel (G1) e na formulação base contendo a associação dos dois extratos (G2). O resultado foi expresso na concentração de saponinas equivalente do padrão para 100 gramas de gel. Considerando que cada grama do gel contém 0,006 g de cada extrato (Figura 4).

Figura 5. Método de quantificação de saponinas

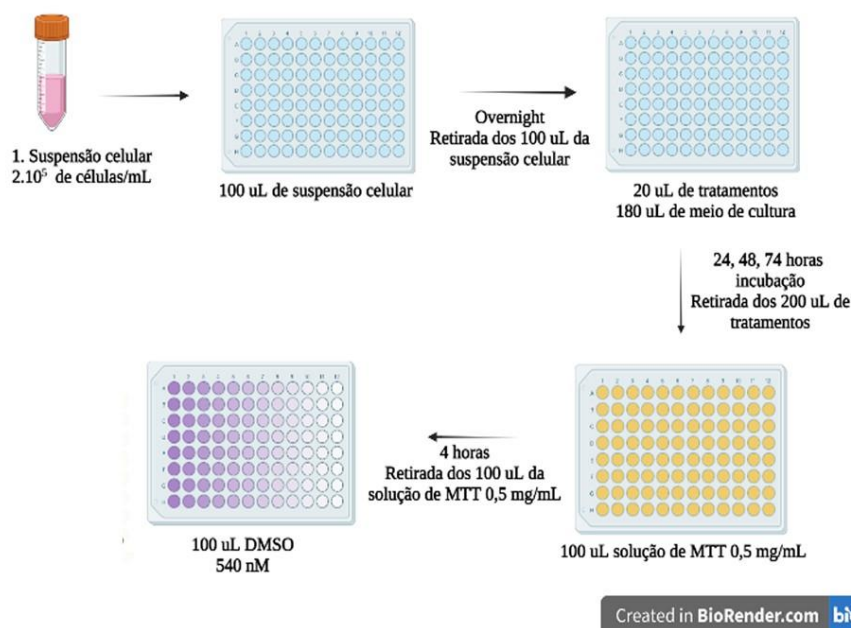


Fonte: Autora, 2022.

2.6 Determinação da citotoxicidade pelo MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

O ensaio de citotoxicidade do MTT foi realizado conforme descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações (Tsuboy et al., 2010). Para este ensaio, fibroblastos de camundongos de origem dérmica saudável (NIH/3T3, ATCC® CRL-1658™) foram inoculados em placas de microtitulação de 96 poços e incubados em meio de cultura por um período de 24 h a 37°C, 5% CO₂. Após uma confluência de aproximadamente 75% (24 h), essas células foram expostas a cinco concentrações diferentes de RS e RR (100 µg/mL, 200 µg/mL, 400 µg/mL, 600 µg/mL, 800 µg/mL e 1600 µg/mL), A (600 µg/mL RS e 600 µg/mL RR), G (sem os ativos) e GA (600 µg/mL RS e 600 µg/mL RR), ao controle negativo (solução fisiológica) e ao controle positivo (2% (v/v) Tween 80). O tempo de tratamento foi de 24 h, 48 h e 72 h (Figura 6). No tempo de 72 horas de acordo com a ISO 10993-5:2009, as cinco concentrações de RS e RR foram utilizadas para calcular a concentração letal mediana (CL50). A CL50 representa a concentração de cada extrato necessária para causar a mortalidade da metade das células vivas de fibroblastos.

Figura 6. Metodologia do ensaio de citotoxicidade do MTT



Fonte: Autora, 2022.

2.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro

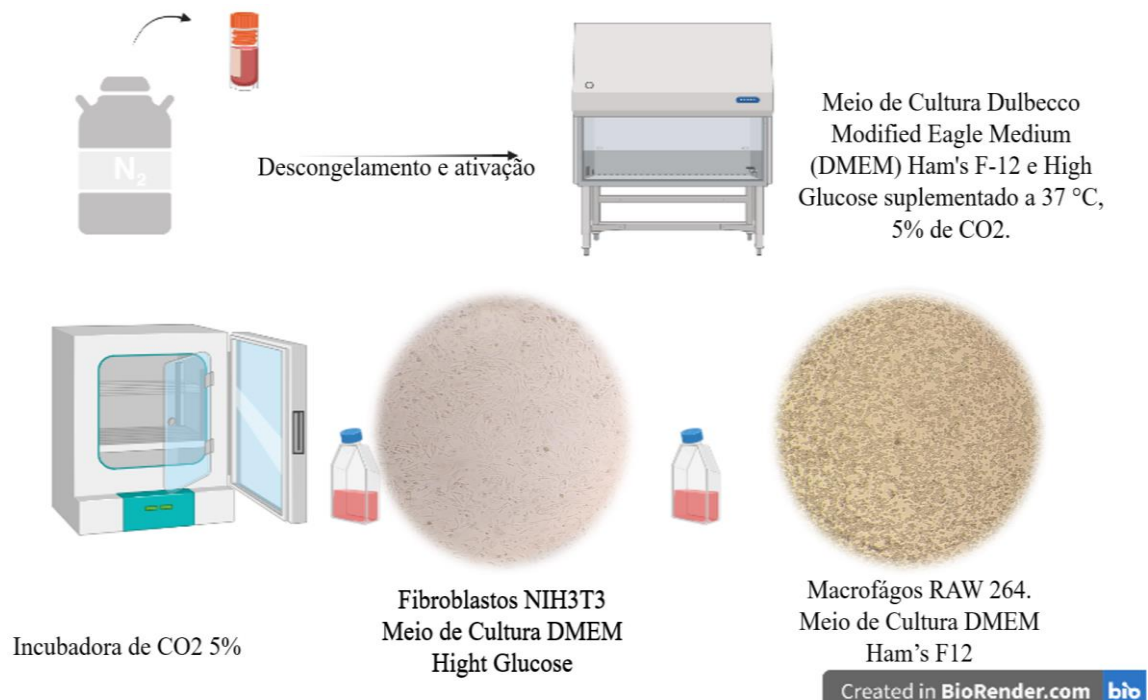
2.7.1 Delineamento experimental

Para avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos de sisal (RS) e romã (RR), foram utilizadas quatro concentrações (200 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL e 2000 µg/mL). Para avaliar a atividade anti-inflamatória da associação dos extratos do resíduo de sisal e romã (A) foram utilizados 600 µg/mL de RS e 600 µg/mL de RR. As concentrações utilizadas na formulação do gel contendo a associação de extratos de sisal e romã (G2), foram de 600 µg de RS e 600 µg de RR por grama de gel. A dexametasona (100 µg/g - Merck) foi usada como controle positivo. Solução salina (NaCl 0,9%) e gel de base (G1) como controles negativos.

2.7.2 Cultura Celular

Macrófagos murinos da linhagem imortalizada Raw 264.7 (ATCC TIB-71) foram descongelados e cultivados em um frasco de cultura de células com meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium Ham's F-12 (Sigma, São Paulo, Brasil) a 37 °C, 5% de CO₂. A eficácia anti-inflamatória e o ensaio de citotoxicidade foram realizados quando a cultura atingiu cerca de 70-80% de confluência (Figura 7).

Figura 7. Cultura Celular RAW 264 e Fibroblastos NIH3T3



Fonte: Autora, 2022.

2.7.3 Seleção de macrófagos

As células foram desaderidas usando um raspador de células, contadas na câmara de Neubauer e centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura para atingir a concentração desejada para cada experimento.

2.7.4 Fagocitose

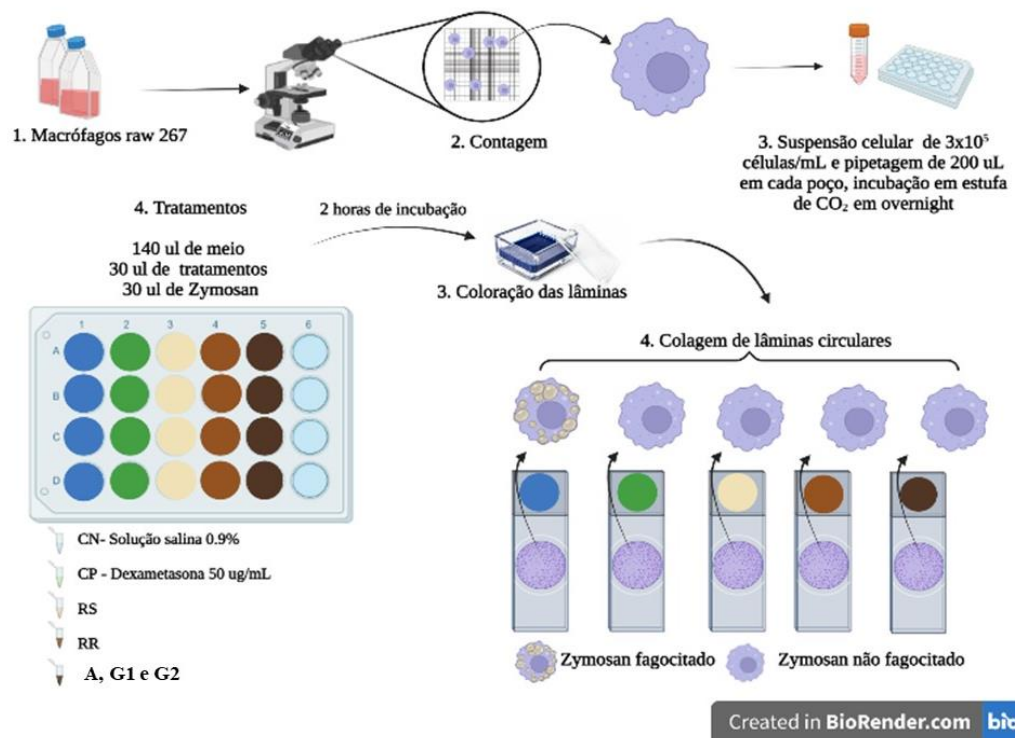
O ensaio foi realizado seguindo o método descrito por Azedo et al. (2011) com poucas modificações. Uma vez que as lâminas estavam prontas, foram lidas em triplicata em microscópio óptico com aumento de 400 x, realizando uma contagem total de 100 células (Figura 7).

A inibição da fagocitose (IP) foi calculada usando a seguinte equação:

$$IP (\%) = \frac{E_0 - E_T}{E_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde: E_0 representa o valor médio do número de células no grupo controle negativo que fagocitaram as partículas de Zymosan; E_T representa o valor médio do número de células dos grupos tratados que fagocitaram as partículas de Zymosan.

Figura 8. Fagocitose em lâmina



Fonte: Autora, 2022.

2.7.5 Espraçamento de macrófagos

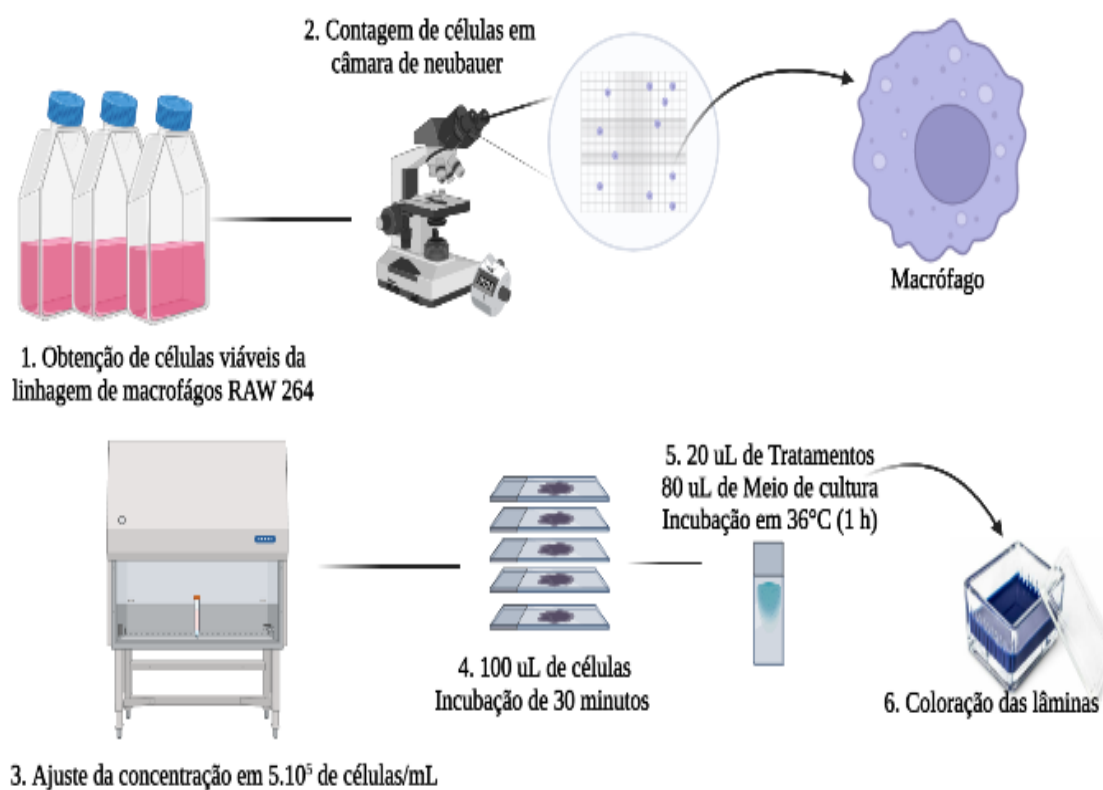
Para o ensaio de espraçamento de macrófagos foi empregado o método descrito por Basto et al. (2012). Com as lâminas prontas, foram lidas em triplicadas em microscópio óptico com aumento de 400 x, totalizando 100 células (Figura 8).

A inibição de espraçamento (IE) foi calculada usando a seguinte equação:

$$IS (\%) = \frac{E_0 - E_T}{E_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde E_0 representa o valor médio do número de células espalhadas no grupo controle negativo; E_T representa o valor médio do número de células espalhadas nos grupos tratados.

Figura 8. Espraçamento



Fonte: Autora, 2022.

2.7.6 Estabilização de Membrana

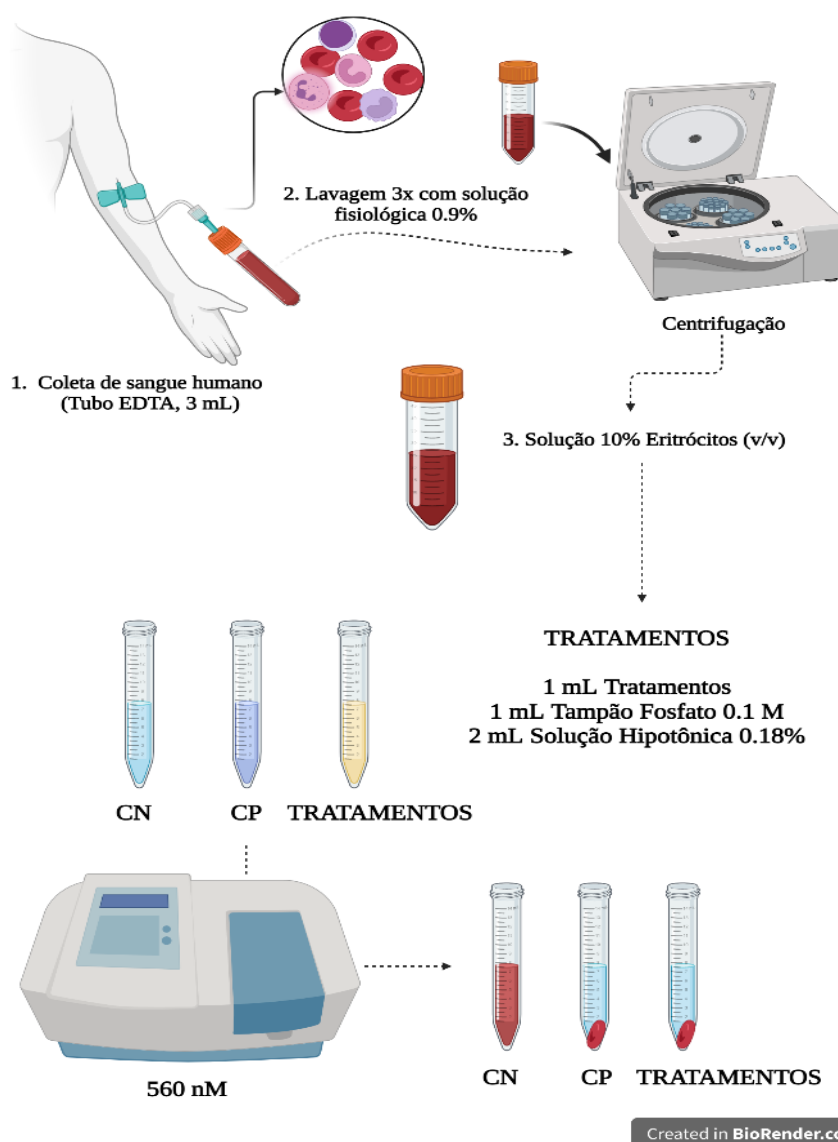
Para a avaliação da estabilização da membrana de hemácias humanas (HRBC) foi empregado o método proposto por Ananthi e Chitra (2013), com algumas modificações. A reação teste foi realizada com a adição de 2 mL de solução hipossalina (NaCl 0,18%) para induzir hemólise, 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7.4), 1 mL das amostras analisadas e 0,5 mL de solução de HRBC. O teor de hemoglobina na suspensão foi estimado usando um espectrofotômetro (KASVI) a 560 nm (Figura 9).

A porcentagem de proteção das hemácias foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Proteção (\%)} = \frac{E_0 - E_T}{E_0} \times 100 \quad (3)$$

Onde E_0 representa o valor médio de absorbância do grupo controle negativo; E_T representa o valor médio de absorbância nos grupos tratados.

Figura 9. Estabilização de membrana



Fonte: Autora, 2022.

2.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 7. A análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias foi realizada de acordo com o protocolo experimental, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey. Para todas as análises um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados

3.1 Saponinas totais

Conforme apresentado na Tabela 1, na análise dos extratos isolados foi constatado a presença de saponinas em RR, RS, A e G2, ao contrário de G1 não apresentou presença de saponinas.

Tabela 1. Dosagem em gramas de saponinas totais presentes em 100 gramas de extrato seco de RR e RS, extratos em associação (A) e formulações G e GA em 100 gramas do gel.

Amostras	Saponinas Totais (g/100g)
Extrato RR	15.83 ± 0.93
Extrato RS	29.91 ± 0.33
Extrato A	22.99 ± 0.01
Formulação G1	0.00 ± 0.00
Formulação G2	0.52 ± 0.05

3.2 Viabilidade celular

A Figura 10A apresenta a viabilidade celular apresentada para o RS nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h. As concentrações de 100 µg/mL ($92.95 \pm 0.03\%$, $109.46 \pm 0.31\%$ e $130.14 \pm 0.28\%$) e 200 µg/mL ($88.90 \pm 0.63\%$, $96.06 \pm 0.31\%$ e $114.90 \pm 0.28\%$) promoveram viabilidade celular crescente em função do tempo. Os tratamentos e o controle positivo (CP) apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (CN), $p < 0.05$. Com exceção da concentração de 1600 µg/mL ($66.56 \pm 0.31\%$, $32.86 \pm 0.31\%$ e $31.76 \pm 0.13\%$), todas as concentrações testadas apresentaram uma viabilidade celular superior a 70%.

A viabilidade celular apresentada para o RR nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h está disposta na Figura 10B. Em semelhança ao que ocorreu com RS, os tratamentos e o controle positivo (CP) apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (CN), $p < 0.05$. Ademais, pode-se constatar que as concentrações de 800 µg/mL e 1600 µg/mL, nos intervalos de 48 e 72 h, apresentaram viabilidade celular inferior a 70% ($49.31 \pm 0.19\%$, $53.91 \pm 0.19\%$ e $31.30 \pm 0.81\%$, $23.65 \pm 1.55\%$, respectivamente), não promovendo proliferação fibroblástica.

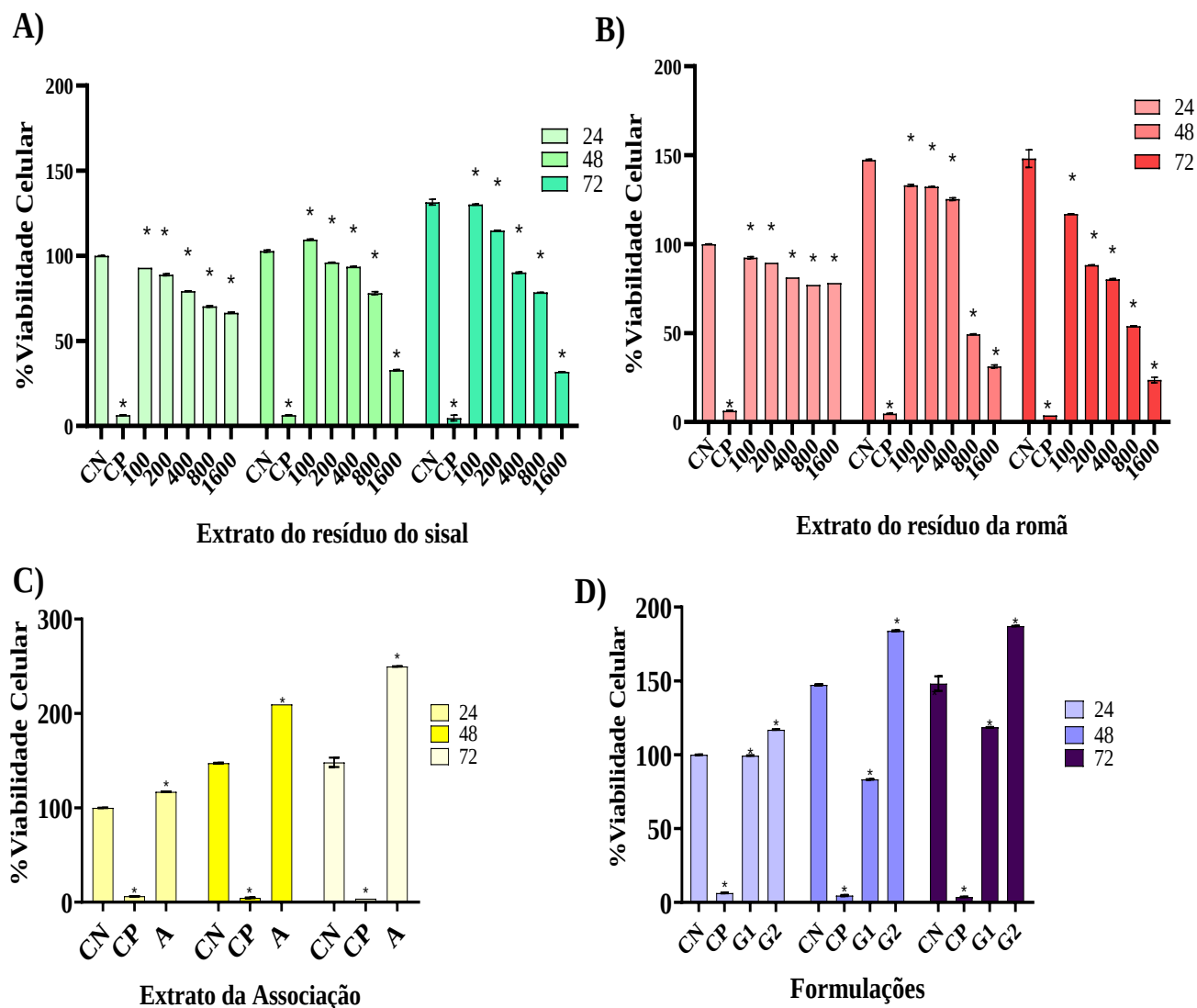
Ainda no MTT, por meio de regressão linear, estabeleceu-se o valor de CL50 para os extratos isolados no tempo de 72 h. A partir dos dados coletados as retas foram obtidas por

meio das seguintes equações: RS ($Y = 0.11 + 177.05$) e RR ($Y = 0.05 + 165.01$). Foram obtidas as concentrações de 3757.00 µg/mL para o RS e de 2064.91 µg/mL para o RR.

A Figura 10C apresenta os resultados obtidos para associação dos extratos (A) nos intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h para a concentração de 600 µg/mL de ambos os extratos ($116.93 \pm 0.05\%$, $209.61 \pm 0.05\%$ e $249.79 \pm 0.02\%$, respectivamente). Verificou-se a existência de diferença significativa para o tratamento e CP em relação a CN ($p < 0.05$). Ademais, a taxa de proliferação celular foi superior ao CN ($100.00 \pm 0.13\%$, $147.32 \pm 0.44\%$ e $148.12 \pm 4.96\%$), demonstrando assim, que A é um potente estimulador de ciclo celular fibroblástico.

Já a Figura 10D apresenta a taxa de viabilidade celular decorrente do tratamento com o gel base (G1) e com o gel contendo a associação dos extratos (G2). Ambas as formulações apresentaram diferença significativa comparada ao CN ($p < 0.05$). A formulação G1 apresentou viabilidade celular acima de 70% em 24, 48 e 72 h ($99.45 \pm 0.11\%$, $83.29 \pm 0.21\%$ e $118.58 \pm 0.16\%$, respectivamente). Para o G2, a viabilidade celular foi crescente nos intervalos de tempo analisados ($116.93 \pm 0.05\%$ para 24 h, $183.94 \pm 0.32\%$ para 48 h e $187.10 \pm 0.11\%$ para 72 h), assim como superior à do CN ($100.00 \pm 0.13\%$ para 24 h, $147.32 \pm 0.44\%$ para 48 h, $148.12 \pm 4.96\%$ para 72 h).

Figura 10. Média $\pm$ DP dos valores em % referente a taxa de viabilidade celular em fibroblastos NIH 3T3 nos diferentes tempos de avaliação (24, 48 e 72 h) após a realização dos seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Tween 80 a 2% - controle positivo (CP); extrato do resíduo do sisal (RS) e extrato do resíduo da romã (RR) (Figuras A e B, respectivamente) nas concentrações de 100, 200, 400, 800 e 1600 µg/mL; extrato associado (A) contendo RS e RR, cada um na concentração de 600 µg/mL (Figura C) e formulações G1 (base) e G2 contendo RS e RR nas concentrações de 0,6% (Figura D). O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo CN ($p < 0.05$).



3.3 Fagocitose

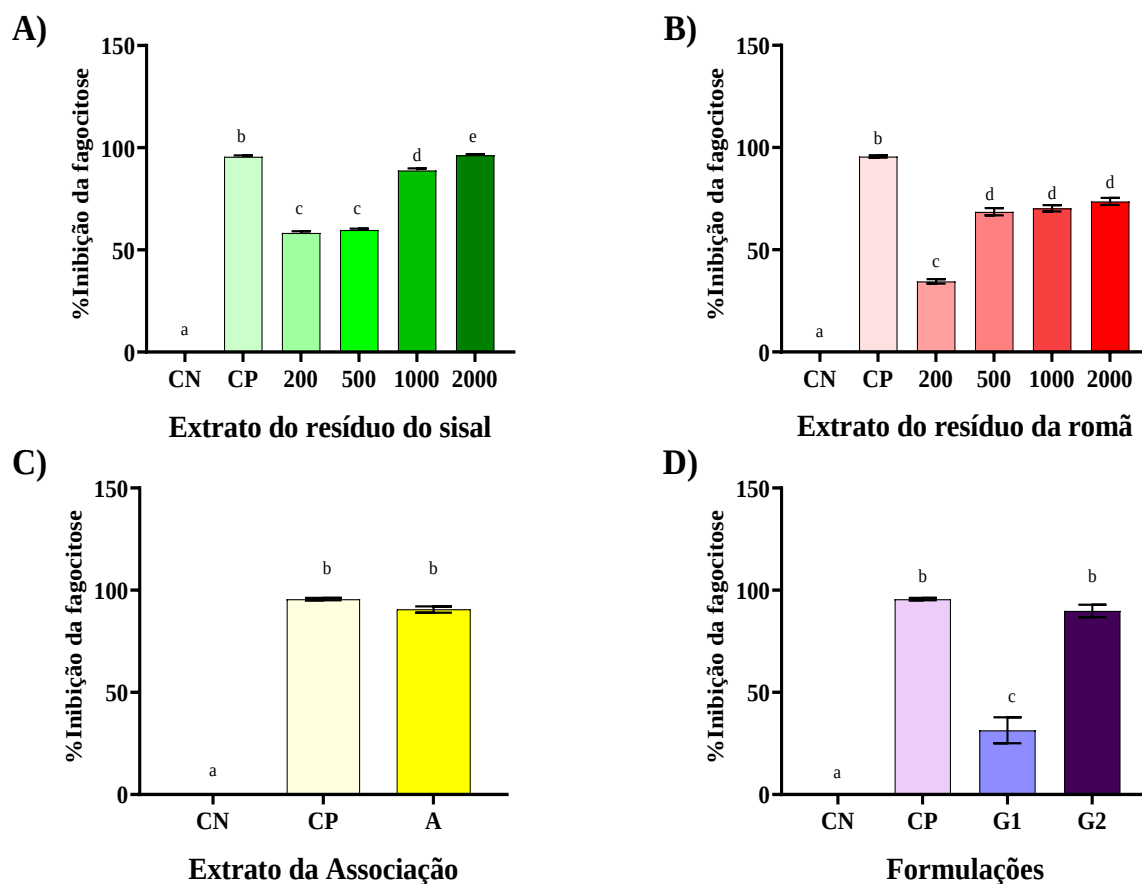
Os resultados de inibição da fagocitose (IF) do RS estão apresentados na Figura 11 A. Este extrato inibiu a fagocitose em $58.26 \pm 0.88\%$ na concentração de $200 \mu\text{g/mL}$, $59.80 \pm 0.58\%$ em $500 \mu\text{g/mL}$, $88.85 \pm 1.01\%$ em $1000 \mu\text{g/mL}$ e $96.28 \pm 0.58\%$ em $2000 \mu\text{g/mL}$. A dexametasona na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ usada como controle positivo (CP), inibiu a fagocitose em $95.61 \pm 0.58\%$. Todas as concentrações de RS apresentaram diferença significativa em relação ao CN e CP ($p < 0.05$). As concentrações de 200 e $500 \mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0.05$), já a concentração de $2000 \mu\text{g/mL}$ apresentou diferença estatística das três concentrações testadas (200 , 500 e $1000 \mu\text{g/mL}$) do RS ($p < 0.05$).

Para RR, os resultados estão apresentados na Figura 11B. É possível observar que RR inibiu a fagocitose em $34.50 \pm 1.07\%$ na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, $68.58 \pm 1.75\%$ em 500 $\mu\text{g/mL}$, $70.27 \pm 1.55\%$ em 1000 $\mu\text{g/mL}$ e $73.65 \pm 1.75\%$ em 2000 $\mu\text{g/mL}$. Em todas as concentrações RR diferiram do CN e CP, de forma significativa ($p < 0.05$). A concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ apresentou diferença significativa das três concentrações ensaiadas de RR (500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$). Já as concentrações de 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0.05$).

A partir dos resultados obtidos com os extratos isolados no teste da fagocitose, foi possível calcular a dose efetiva 50 (DE50) para cada extrato. A DE50 para o RS foi de 460 $\mu\text{g/mL}$ (equação da reta $y = 22.767x + 54.739$; $R^2 = 0.839$) e a DE50 para o RR foi de 596 $\mu\text{g/mL}$ (equação da reta: $y = 16.215x + 46.752$; $R^2 = 0.4894$). Devido a pequena diferença entre os valores obtidos de DE50 para os dois extratos e objetivando padronizar as concentrações em um único valor, foi definida para a associação (A) a concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ para o RS e para o RR. Em seguida, a eficiência da A foi analisada, gerando uma inibição da fagocitose em $90.54 \pm 1.55\%$, valor próximo ao obtido por RS isolado na concentração de 2000 $\mu\text{g/mL}$ (96.28%) e pelo CP isolado na mesma concentração (95.60%). O extrato associado e o CP diferiram do CN, de forma significativa e não diferiram entre si, ($p < 0.05$), conforme descrito na Figura 11C.

A Figura 11D mostra que a inclusão dos extratos associados em uma formulação na forma de gel (G2) promoveu uma inibição de $89.86 \pm 3.04\%$ da fagocitose. O gel contendo o extrato associado, o gel base e o gel contendo a dexametasona (50 $\mu\text{g/mL}$), apresentaram diferença significativa de CN ($p < 0,05$). Entretanto, o gel contendo o extrato associado e o gel contendo a dexametasona não apresentaram diferença significativa entre si.

Figura 11. Média $\pm$ DP dos valores em % referente a inibição da fagocitose em macrófago RAW 264 após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Dexametasona 50 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo (CP); extrato do resíduo do sisal (RS) e extrato do resíduo da romã (RR) (Figuras A e B, respectivamente) nas concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$; extrato associado contendo RS e RR, cada um na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ (Figura C) e formulações G1 (base) e G2 contendo RS e RR cada um na concentração de 0,6% (Figura D). A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas (a, b, c e d), ($n = 3$), ANOVA seguida de Tukey.



3.4 Espreadimento

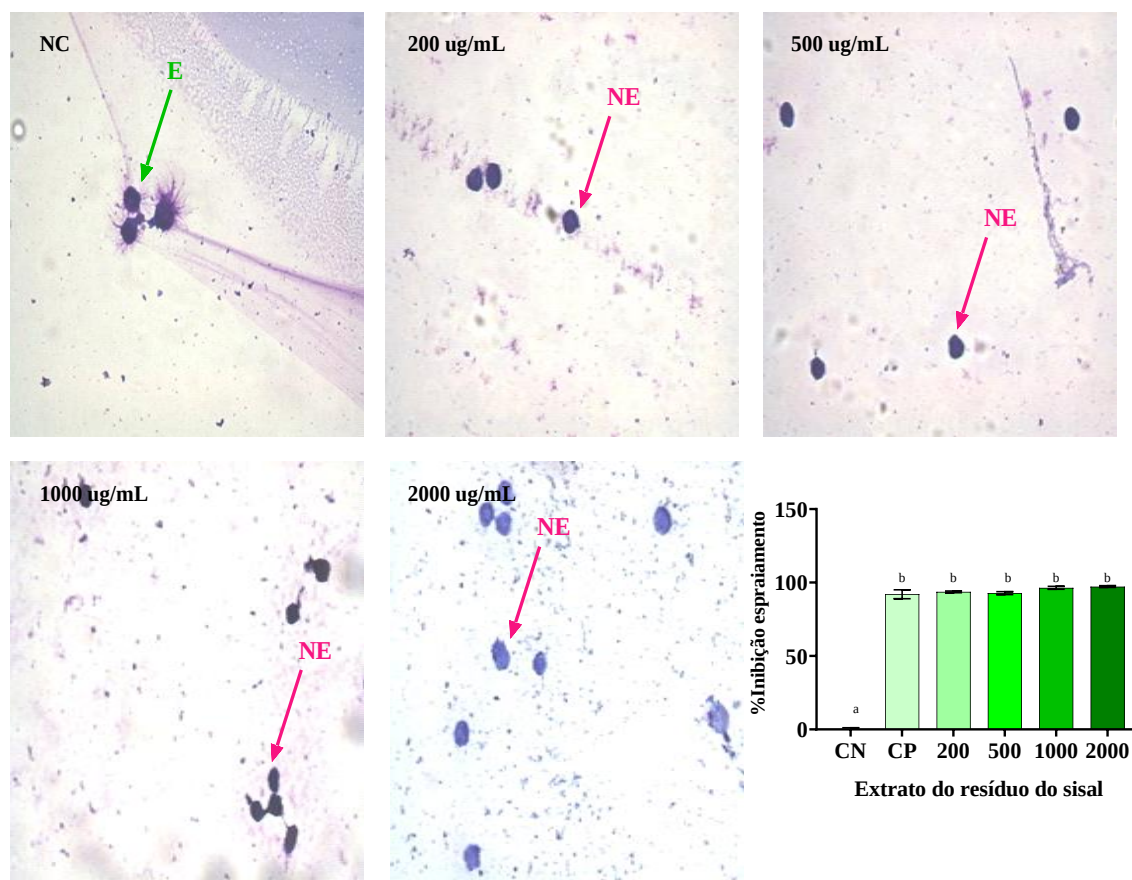
A Figura 12 apresenta as células espreiadas (E) no CN e células não espreiadas (NE) após tratamento com RS. Por meio da contagem de células em todas as lâminas calculou-se a porcentagem de inibição do espreiamento resultante dos tratamentos. O RS isolado promoveu inibições em diferentes concentrações: 200 $\mu\text{g/mL}$ – $93.66 \pm 0.58\%$, 500 $\mu\text{g/mL}$ – $92.83 \pm 1.00\%$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ – $96.41 \pm 1.00\%$ e 2000 $\mu\text{g/mL}$ – $97.25 \pm 0.58\%$. O CP inibiu o espreiamento em $92.03 \pm 3.05\%$. O extrato em todas as concentrações analisadas e o CP apresentaram diferença significativa em relação a CN e não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si ($p < 0.05$).

Figura 12. Médias $\pm$ DP dos valores em % da inibição do espreiamento em macrófago RAW 264 após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Dexametasona 50 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo (CP) e extrato isolado do resíduo do sisal (RS) nas concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas (a e b), ($n = 3$), ANOVA

seguida

de

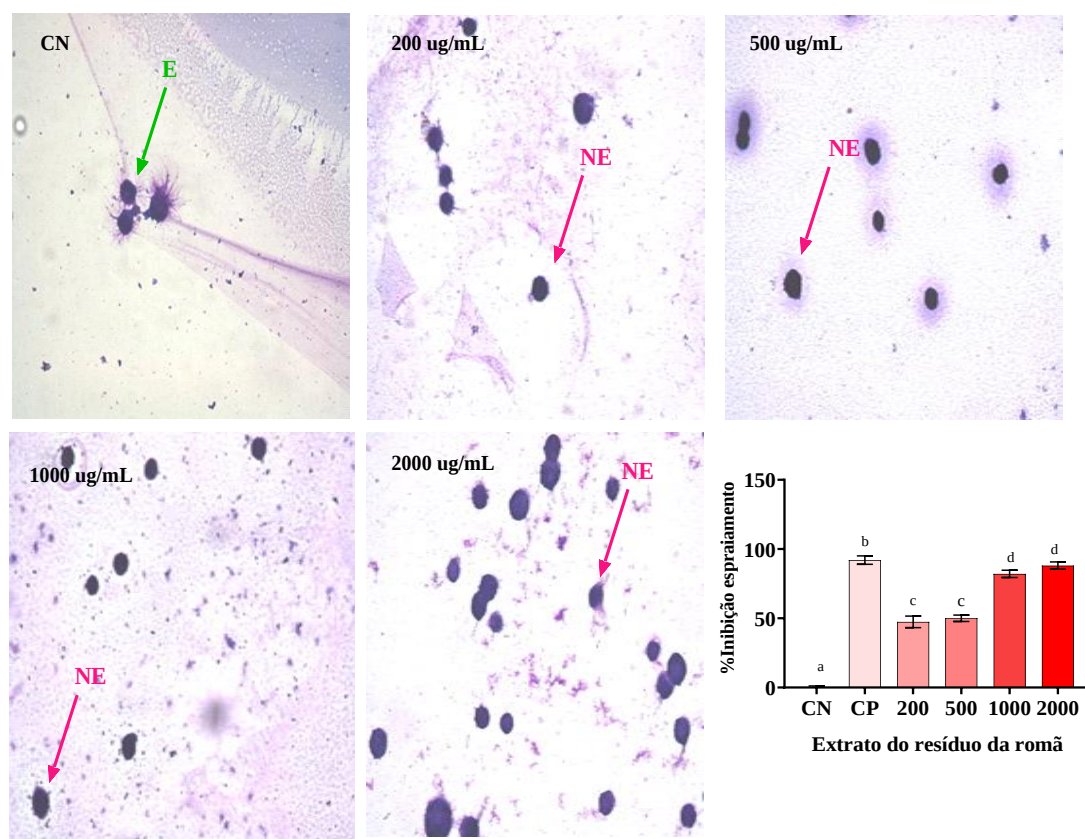
Tukey.



O RR isolado (Figura 13) também promoveu inibições em diferentes concentrações: 200 µg/mL – $47.41 \pm 4.20\%$, 500 µg/mL – $50.00 \pm 2.33\%$, 1000 µg/mL – $82.07 \pm 2.64\%$ e 2000 µg/mL – $88.04 \pm 2.64\%$. O CP inibiu o espraçamento em $92.03 \pm 3.05\%$. O extrato em todas as concentrações analisadas apresentou diferença significativa em relação a CN e CP ($p < 0.05$). As concentrações de 200 e 500 µg/mL não apresentaram diferença significativa entre si, entretanto, apresentaram diferença significativa das concentrações de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL ($p < 0.05$).

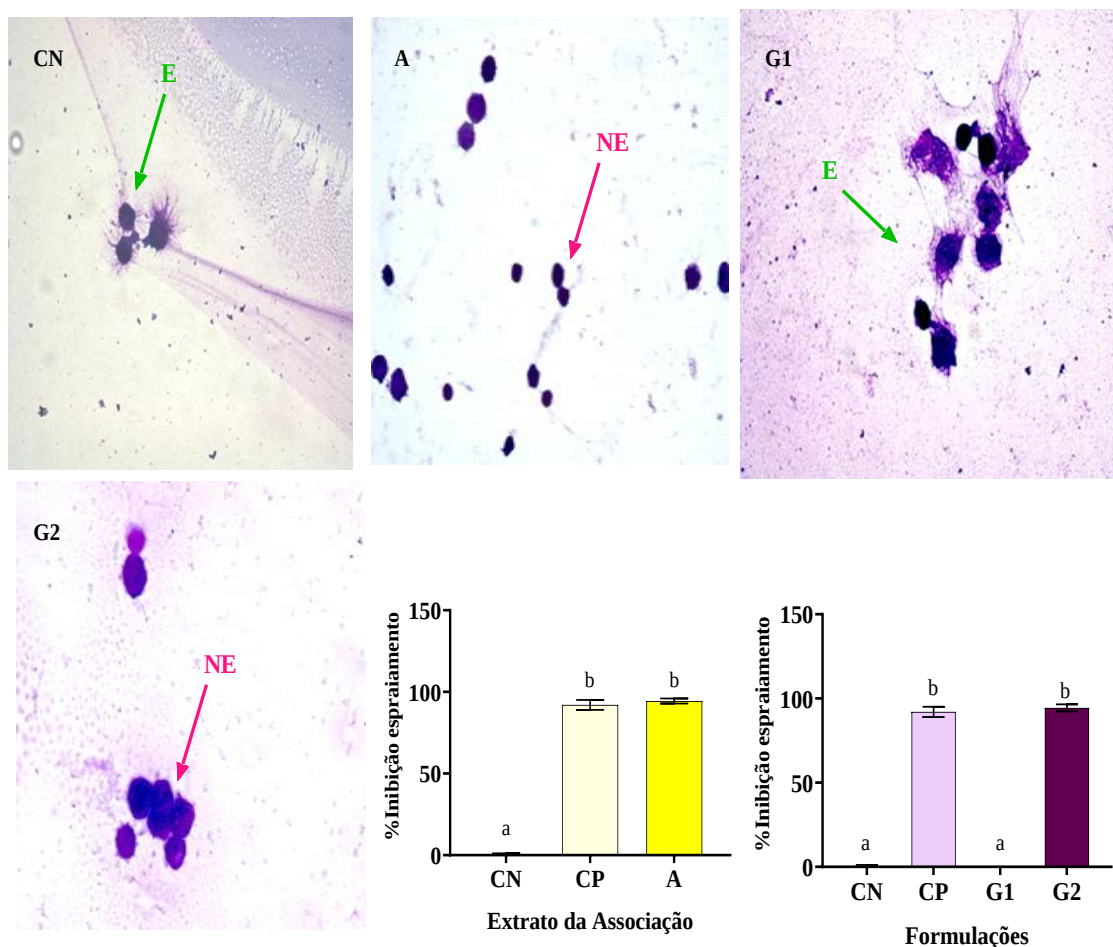
Figura 13. Médias $\pm$ DP dos valores em % da inibição do espraçamento em macrófago RAW 264 após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Dexametasona 50 µg/mL - controle positivo (CP) e extrato isolado do resíduo da romã (PR) nas concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 µg/mL. A diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas (a, b, c e d), ($n = 3$),

ANOVA seguida de Tukey.



A Figura 14 apresenta células espiadas no CN e G e das células não espiadas em A e GA. É possível observar ainda a inibição do espraiamento em macrófagos. O extrato associado promoveu $94.42 \pm 1.53\%$ de inibição. Para as formulações somente o G2 inibiu o espraiamento em 94.44 ± 2.08 . O G1 e CN não foram capazes de promover inibição. O extrato associado apresentou diferença significativa em relação ao CN ($p < 0.05$), mas não em relação ao CP. O G2 apresentou diferença significativa em relação ao CN e G1 ($p < 0.05$), mas não em relação ao CP.

Figura 14. Médias $\pm$ DP dos valores em % da inibição do espraiamento em macrófago RAW 264 após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Dexametasona 50 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo (CP); extrato associado contendo extratos dos resíduos do sisal (RS) e da romã (RR), cada um na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ e formulações G1 (base) e G2 contendo RS e RR nas concentrações de 0,6%. A diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas (a e b), ($n = 3$), ANOVA seguida de Tukey.



3.5 Estabilização de membrana

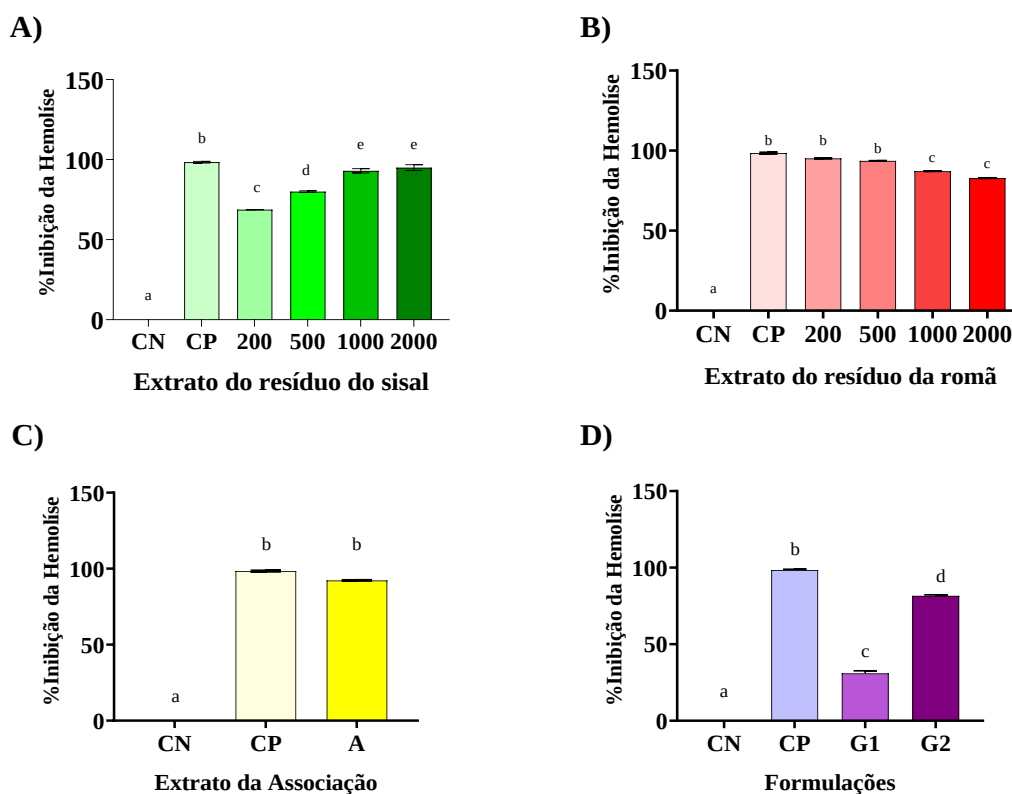
A Figura 15A demonstra que o CP sendo um corticoide padrão (dexametasona) na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ promoveu $98.39 \pm 0.53\%$ de proteção contra a hemólise. Os tratamentos com o RS promoveram proteção em diferentes concentrações: 200 $\mu\text{g/mL}$ – $68.74 \pm 0.08\%$, 500 $\mu\text{g/mL}$ – $79.99 \pm 0.49\%$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ – $93.00 \pm 1.32\%$ e 2000 $\mu\text{g/mL}$ – $95.00 \pm 1.81\%$. Todas os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação a CN e CP ($p < 0.05$). As concentrações de 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferença significativa das concentrações de 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$).

Os tratamentos com RR, apresentados na Figura 15B, também demonstraram atividade anti-hemolítica nas concentrações de 200 $\mu\text{g/mL}$ – $95.13 \pm 0.15\%$, 500 $\mu\text{g/mL}$ – $93.61 \pm 0.08\%$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ – $87.19 \pm 0.14\%$ e 2000 $\mu\text{g/mL}$ – $82.84 \pm 0.14\%$. Todas os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação a CN ($p < 0.05$). As concentrações de 200 e 500 $\mu\text{g/mL}$ não apresentaram diferença significativa em relação a CP ($p < 0.05$). Já as

concentrações de 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferença significativa em relação a CP e das concentrações citadas anteriormente ($p < 0.05$).

A Figura 15C mostra que a associação dos extratos foi capaz de inibir $92.25 \pm 0.41\%$ da hemólise e entre as formulações analisadas, apresentadas na Figura 15D, o G1 foi capaz de inibir $31.00 \pm 1.61\%$ da hemólise e o G2 conferiu proteção de $81.64 \pm 0.66\%$. O extrato associado apresentou diferença significativa em relação a CN e não em relação a CP ($p < 0.05$). As formulações analisadas apresentaram diferenças significativas em relação a CN e CP ($p < 0.05$).

Figura 15. Médias $\pm$ DP dos valores em % da Inibição da hemólise após os seguintes tratamentos: salina - controle negativo (CN); Dexametasona 50 $\mu\text{g/mL}$ - controle positivo (CP); extratos isolados dos resíduos do sisal (RS) e da romã (RR) (Figuras A e B, respectivamente) nas concentrações de 200, 500, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$; extrato associado contendo RS e RR, cada um na concentração de 600 $\mu\text{g/mL}$ (Figura C) e formulações G1 (base) e G2 contendo RS e RR cada um na concentração de 0,6% (Figura D). A diferença estatística significativa ($p < 0.05$) entre os grupos experimentais pode ser observada pelas letras diferentes sobrescritas (a, b, c, d e e), ($n = 3$), ANOVA seguida de Tukey.



4. Discussão

Identificar os benefícios dos fitoquímicos para a saúde é um passo essencial no desenvolvimento de medicamentos e alimentos funcionais. Nesse sentido, a triagem de saponinas, um metabólito secundário utilizado na síntese de corticoides, é de extrema importância para o reaproveitamento residual proposto nesse estudo, uma vez que o objetivo foi o desenvolvimento de um gel tópico para possível uso na mucosa oral, em pacientes acometidos por inflamações nesta região (Yu et al., 2020; Wang et al., 2021).

Neste estudo a concentração de saponinas encontrada no extrato do resíduo do sisal (RS) foi de 29.91 g de saponinas para cada 100 g de extrato seco. Ribeiro et al. (2015) obteve uma concentração de saponinas de 20.6 g/100g na análise da porção aquosa do resíduo de sisal quando utilizou de extração micelar com solução hidroalcoólica. Assim, apesar dos valores das concentrações encontradas de saponinas no resíduo do sisal estarem próximas é possível constatar que a técnica utilizada para o preparo do extrato é fundamental para a separação e quantificação desse metabólito. Quanto a presença de saponinas no extrato do resíduo da casca da romã, foi constatado neste estudo um valor médio de 15.83 g/100 g. Na literatura, as pesquisas realizadas por Silva (2021) e Vieira (2014) detectaram a presença de saponinas na casca da romã somente por meio de ensaios qualitativos, mas estas não foram quantificadas.

A associação dos extratos dos resíduos do sisal e da romã (A) promoveu uma concentração de saponinas de 22.99 g por 100 g de extrato seco. Este valor está próximo ao da somatória das concentrações de saponinas presentes em 50 gramas de cada extrato, que seria de 22.86 gramas. O gel contendo a associação dos extratos (G2), ambos a 0.6%, apresentou uma concentração de saponinas de 0.52 g por 100 g de gel, ou seja, uma maior concentração de saponinas quando comparado a simples somatória dos valores desse metabólito nos extratos isolados na concentração de 0.6%, que seria de 0,27 g por 100 g de gel. Este valor sugere que a concentração de saponinas não foi prejudicada pela formulação, ao contrário esta favoreceu a detecção de saponinas.

A ausência de estudos fitoquímicos com o sisal e casca da romã, isolados e associados, impedem uma maior discussão dos dados obtidos com as saponinas. Mas, estes já comprovam que as altas concentrações de saponinas provavelmente estão respondendo pelas atividades farmacológicas analisadas neste estudo. Isto porque, as saponinas apresentam atividades anti-inflamatórias e são dentro da química medicinal, utilizadas para a produção de fármacos anti-inflamatórios esteroidais (Li et al., 2018; Yu et al., 2020; Wang et al., 2021).

Para avaliar o efeito citotóxico causado pelos extratos dos resíduos do sisal e da romã (RS e RR) bem como dos extratos associados, do gel base e do gel com a associação, o ensaio escolhido foi o MTT. De acordo com os parâmetros utilizados por Amaral (2014) é possível classificar o grau de toxicidade do extrato por meio do teste do MTT usando a seguinte relação em função da porcentagem de viabilidade celular obtida: acima de 90% - não citotóxico; de 80 a 90% - levemente citotóxico; de 50 a 79% - modernamente citotóxico e menor que 50% - citotóxico. Como neste estudo foi estabelecida uma faixa larga de concentração para os extratos isolados, de 100 a 1600 µg/mL, foi possível observar que as menores concentrações dos dois extratos se comportaram como não citotóxicos ou moderadamente citotóxicos, em função do tempo analisado. Já, as maiores concentrações de RS e RR, se comportaram, em função do tempo, desde moderadamente citotóxicos até citotóxicos.

Assim, para estabelecer uma classificação geral dos extratos isolados, foram definidas as CL50 do RS e RR no maior tempo de avaliação, 72 horas. Seguindo a ISO 10993-5:2009 também, foi calculada a CL50, foram obtidos os valores da CL50 para o RS de 2063 µg/mL e para o RR de 3130 µg/mL, pela alta concentração, esses extratos são categorizados como não citotóxicos. Em complemento, esta análise também se enquadra na legislação de citosegurança, deste modo, essa padronização está de acordo com as normativas, respectivamente.

De acordo com a literatura, Dunder et al. (2013) relataram que no mesmo teste do MTT, a fração hexânica do sisal, nas concentrações de 50-500 µM, não prejudicou a viabilidade na mesma linhagem celular deste estudo. Favato (2020) usando a concentração de 50 µg/mL de extrato da hidrólise ácida do sisal relatou o efeito de citotoxicidade às células de melanoma e baixa genotoxicidade sistêmica, sugerindo que o extrato poderia reduzir o risco do surgimento de neoplasias secundárias aos tratamentos quimioterápicos. Em consonância, Teixeira (2020) relatou que na concentração de 400 µg/mL, o extrato da hidrólise ácida do sisal promoveu a morte de 42.73% das células pequenas de câncer de pulmão. Deste modo, neste estudo o RS mostrou-se isento de toxicidade para células normais de fibroblastos 3T3 e a partir dos relatos da literatura, a análise futura da atividade antitumoral do RS deverá ser direcionada para linhagens tumorais.

Já para o extrato da romã, Lorenzoni (2015) relatou o aumento da viabilidade celular em linhagem de fibroblastos 3T3, como não sendo tóxico. A citotoxicidade verificada neste estudo para as maiores concentrações do RR, pode ser relacionada ao fato deste extrato estar

dissolvido em solução glicólica. Desta forma, novas análises serão realizadas somente com o solvente utilizado no processo de preparo do extrato.

A associação de metabólitos secundários de plantas é de interesse para a potencialização de efeitos farmacológicos, mas a citotoxicidade gerada deve ser analisada. Assim, neste estudo foi verificado que associação do RS e RR não prejudicou a viabilidade celular, ao contrário, a viabilidade foi crescente em função do tempo. Na literatura não existem relatos sobre a citotoxicidade gerada pela associação do RS e RR, mas analisando outras associações foi constatado por meio do estudo de Botan (2018) que a associação de *Morus nigra*, *Ziziphus joazeiro* e *Vitis vinifera* aumentou a viabilidade celular no tempo de 24 h em linhagem de macrófagos RAW 264. Camilli et al. (2020) relatou que a associação de *A. chica* com a fração enriquecida de geranilgeraniol da *B. orellana* não foi tóxica. Cordeiro (2015) avaliou a citotoxicidade da associação de três extratos vegetais de *T. impetiginosa*, *N. officinale* e *P. major*, constatou a viabilidade celular de 100% em macrófagos Raw 264. Em síntese, as associações de compostos bioativos vegetais mostram-se promissoras.

Estudos realizados *in vitro* para análise da citotoxicidade de formulações tem se mostrado atualmente como uma alternativa aos ensaios toxicológicos com animais. Assim, a análise da G2 também foi realizada por meio do teste do MTT. Os resultados mostraram que a formulação do gel contendo a associação aumentou a viabilidade celular em função do tempo de análise. Igualmente, Fernandes et al. (2022) constatou que formulações da associação de *Punica granatum* com um enxaguatório bucal não reduziram a viabilidade celular de macrófagos extraídos de células tronco da medula óssea de camundongos.

Os macrófagos são células derivadas de monócitos. Estes são lançados na corrente sanguínea após sua formação na medula óssea e posteriormente saem do sangue para se diferenciar em macrófagos nos tecidos. Os macrófagos são encontrados em todos os locais de tecido conjuntivo e, além disso, se concentram em vários órgãos como por exemplo o fígado, baço, linfonodos, onde estão relacionados com a defesa do organismo. Assim, desempenham papel fundamental na imunidade inata, participando efetivamente nos mecanismos inflamatórios e na modulação do sistema imunológico (Eto, 2016).

A fagocitose inicia-se com o espreadimento do macrófago e a alteração morfológica da célula corrobora com o aumento da sua membrana plasmática, dando uma maior proximidade com o substrato, como também, a ativação dos lisossomos e produção de espécies reativas de oxigênio (Takahashi, 2020). Deste modo, o fagócito utiliza os receptores de superfície para se ligar a um microrganismo e envolvê-lo, formando uma vesícula chamada fagossomo. Os receptores de superfície também liberam sinais que estimulam a fusão dos fagossomos com os

lisossomos originando os fagolisossomos e os sinais ativadores da inflamação. Esses desencadeiam o “burst” respiratório e a produção de óxido nítrico com o objetivo de destruir e eliminar os elementos fagocitados (Chavasco, 2010).

Assim, nesse estudo, avaliando a capacidade dos extratos em inibir a fagocitose foi constatado que o RS e o RR promoveram inibição significativa desse processo em todas as concentrações analisadas. Entretanto, o RS apresentou uma maior capacidade de inibir a fagocitose nas concentrações de 1000 e 2000 µg/mL. Com a associação de RS e RR foi possível constatar a ocorrência de um sinergismo farmacológico que potencializou o efeito anti-inflamatório, pois a associação dos extratos, cada um na concentração de 600 µg/mL, promoveu uma inibição da fagocitose próxima a apresentada pelo RR na concentração 2000 µg/mL. A inclusão dos extratos associados em uma formulação na forma de gel (G2) promoveu inibição da fagocitose semelhante à do gel contendo a dexametasona, um produto largamente utilizado na clínica médica.

Na literatura não existem relatos de análises dos extratos de sisal e romã neste teste de fagocitose. Analisando outras plantas, Silveira (2010) constatou que *Chorisia speciosa* e *Hymenaea courbaril* A. diminuiu capacidade fagocítica de macrófagos RAW264 em 49.80%. Já Sansone (2017) verificou que a capacidade de inibição fagocítica de polissacarídeos solúveis de não-amido da banana na concentração de 200 µg /mL foi de 49,3%.

O processo de fagocitose pode ser avaliado *in vitro* de forma direta pela visualização dos fagócitos contendo partículas ou microrganismos ou de forma indireta, pela manifestação de aderência e espraiamento de macrófagos em lamínula de vidro, configurando uma tentativa frustrada de fagocitose (Libera et al., 2006). Assim, a avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória por meio da técnica do espraiamento de macrófagos Raw 264 tem sido realizada em razão dos macrófagos se aderirem ao vidro quando estimulados, tornando-se espraiados. Em adição, na presença de compostos anti-inflamatórios o espraiamento de macrófagos em lâminas se apresenta reduzido (Duarte, 2019).

Neste estudo, o tratamento com RS nas quatro concentrações analisadas resultou em valores de inibição do espraiamento de macrófagos semelhantes a dexametasona, CP, enquanto o RR somente em sua maior concentração (2000 µg/mL) promoveu inibição semelhante a dexametasona. A associação de RS e RR, assim como o gel contendo os extratos promoveu inibição semelhante ao gel contendo a dexametasona. Assim, o RR não prejudicou a capacidade do RS em inibir o espraiamento de macrófagos e a associação apresentou efetiva atividade anti-inflamatória. Analisando outra planta com essa metodologia, Ota et al. (2010) verificou que o extrato hidroalcólico do alho não apresentou capacidade em inibir o

espraiamento de macrófagos, resultado bem diferente do que os encontrado neste estudo com o RS e RR.

Outro método muito utilizado para análise da atividade anti-inflamatória de extratos vegetais é o de estabilização de membrana de eritrócitos (Ananthi; Chitra, 2013). Isto porque, durante o processo inflamatório as membranas dos lisossomos são lisadas e os medicamentos anti-inflamatórios são capazes de inibir esse processo. A membrana de glóbulos vermelhos humanos foi analisada neste teste por ser semelhante a membrana dos lisossomos, que em meio hipotônico sofrem lise, de forma semelhante ao que ocorre no processo inflamatório. Assim, a capacidade de inibição da hipotonicidade e da lise da membrana dos glóbulos vermelhos induzida por solução hipotônica foi validada como um método de avaliação da atividade anti-inflamatória (Anosike; Obidoa; Ezeanyika, 2012).

Os resultados obtidos mostraram que o RS somente nas concentrações de 1000 e 2000 µg/mL promoveram estabilização da membrana das hemácias semelhante ao CP, enquanto o RR, nas concentrações de 200 e 500 µg/mL, promoveu a mesma proteção do CP. A associação dos extratos apresentou capacidade de inibição semelhante ao CP, ou seja, o RS não prejudicou a atividade anti-inflamatório do RR neste teste. Quanto ao gel contendo esta associação dos extratos, este apresentou menor porcentagem de inibição, mas também reduziram a hemólise das hemácias de forma efetiva em 81.64%.

Utilizando do mesmo método, Silva (2015), analisando outra espécie vegetal, verificou que o extrato de *Solanum paniculatum* L. em todas as concentrações do extrato de (15, 30 e 60 µg/ml), protegeu de forma significativa as hemácias contra a ruptura da membrana eritrocitária. Em adição, Nagaharika et al., (2013) observou que na concentração de 100 µg/mL o extrato vegetal alcóolico de *Jatropha gossypifolia* L. inibiu a hemólise em 56,8%. As folhas e o caule *C. cujete* também apresentaram grande potencial para estabilização da membrana, a concentração de 100 µg/mL apresentou 78,81% (Parvin et al., 2015).

Os resultados obtidos sinalizam a possibilidade de desenvolvimento de um novo anti-inflamatório de uso tópico, na forma de gel, a partir dos extratos dos resíduos vegetais de sisal e romã, duas plantas ricas em saponinas. Em uma etapa futura, com o propósito de comprovar a eficácia e segurança do produto no tratamento da mucosite oral serão realizados testes *in vivo* com animais.

5. Conclusão

Visando o desenvolvimento futuro de um novo fitoterápico anti-inflamatório, de uso tópico, a ser utilizado em tratamentos odontológicos, este estudo mostrou que a concentração de saponinas presente nos extratos dos resíduos do sisal e da romã se mantem na formulação. No teste do MTT o gel contendo a associação dos extratos não apresentou citotoxicidade em todos os intervalos de tempos de tratamento avaliados, ao contrário, a viabilidade celular foi aumentada em função do tempo de tratamento. Nos três testes *in vitro*, utilizados para avaliar a atividade anti-inflamatória, o gel contendo a associação dos extratos apresenta resultados semelhantes ao do gel com a dexametasona, um medicamento largamente utilizado na clínica médica. Em suma, este estudo demonstrou que o gel contendo a associação dos extratos dos resíduos do sisal e da romã se apresenta como um candidato em potencial para o desenvolvimento de um novo fitoterápico, pois, além de permitir a introdução de uma nova opção terapêutica, irá agregar valor econômico, social e ambiental aos resíduos que são desprezados no Brasil.

6. Referências

- Al-Azri AR, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Keefe DM, Logan RM Envolvimento de metaloproteinases de matriz (MMP-3 e MMP-9) na patogênese da mucosite oral induzida por irinotecano. *Jornal de Patologia Oral e Medicina* . 2015; 44 (6):459–467. doi: 10.1111/jop.12255.
- Alves FS. *Estudo fitoquímico e avaliação de toxicidade dos extratos de Furcraea cubensis frente a Artemia salina Leach*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba; 2017.
- Ananthi T, Chitra M. Screening of in vitro anti-inflammatory activity of *Michelia champaca* linn. flowers. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2013;6(5):71-72.
- Anosike CA, Obidoa O, Ezeanyika LU. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;20(1). doi:10.1186/2008-2231-20-76
- Araldi RP, dos Santos MO, Barbon FF et al. Analysis of antioxidant, cytotoxic and mutagenic potential of *Agave sisalana* Perrine extracts using Vero cells, human lymphocytes and mice polychromatic erythrocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;98:873-885. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.022
- Arulselvan P, Fard MT, Tan WS et al. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:1-15. doi:10.1155/2016/5276130

Azedo MR, Blagitz MG, Souza FN, Benesi FJ, Della Libera AM. Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2011;63(5):1131-1140. doi:10.1590/s0102-09352011000500013

Bastos CR, Blagitz MG, Souza FN et al. Viabilidade celular, fagocitose e espraçamento de fagócitos mononucleares, e liberação de peróxido de hidrogênio por leucócitos de glândulas mamárias bovinas saudáveis e infectadas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012;32(9):850-854. doi:10.1590/s0100-736x2012000900006

Botan AG. *Citotoxicidade e ação anti-inflamatória in vitro dos extratos glicólicos de Morus nigra (amora), Ziziphus joazeiro (juá) e Vitis vinifera (uva)*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT); 2018.

Camilli J, Júnior RJM, Souza IMO, Ruiz ALT, Basting RT, Zago PMW. Efeito citoprotetor do extrato de Arrabidaea chica associado a fração do extrato de *Bixa orellana* rica em geraniol em queratinócitos tratados com bisfosfonato. In: *Livro de Resumos do XXVIII Congresso de Iniciação científica da Unicamp*. Universidade Estadual de Campinas; 2020.

Cebinelli GCM. *Papel dos monócitos inflamatórios na sepse*. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2019.

Chassot JM. *Desenvolvimento de nanocápsulas poliméricas para liberação pulmonar do dipropionato de beclometasona*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria; 2013.

Curti WA. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-BIOFILME EM UM ENXAGUATÓRIO CONTENDO EXTRATO DA CASCA DE ROMÃ (*PUNICA GRANATUM*), TRIMETAFOSFATO DE SÓDIO E FLÚOR.. In: Anais do XXXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Anais...Sao Paulo(SP) Online, 2020.

Chavesco LS. *Regulação da atividade Nox2 de neutrófilos por nitróxidos*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alfenas; 2009.

Cordeiro CHG. *Atividade biológica de gel dentifrício e enxaguatório bucal contendo extratos vegetais*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2005.

Costa MF. *Aproveitamento do resíduo líquido industrial do sisal (Agave sisalana Perr.) para obtenção de um inseticida biológico*. Universidade Estadual de Feira de Santana; 2012.

Silva RR. *Investigação do Potencial anti-inflamatório in vitro da Solanum paniculatum L. (Jurubeba)*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Bahia; 2015.

Silva SF, Dias Ferreira-Romanichen FM, Antonelli-Ushirobira TM. Atividade antimicrobiana in vitro da *Punica granatum* sobre bactérias gram negativas e gram positivas. *Brazilian Journal of Development*. 2021;7(11):104581-104591. doi:10.34117/bjdv7n11-196

Andrade CRB. *Avaliação da atividade antimicrobiana e perfil químico do extrato de sisal (Agave Sisalana Perrine)*. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade Maria Milza; 2017.

Lima NTR. *Estudo fitoquímico e avaliação citotóxica do caule de Varronia globosa Jacq. (Boraginaceae sensu lato)*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual da Paraíba; 2017.

Diniz AC. *Avaliação do efeito sinérgico no Fator de Proteção Solar de emulsões contendo filtros químicos e matérias primas vegetais*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCFAR); 2020.

Duarte T. *Influência do polimorfismo genético Val16Ala-SOD2 e da matriz química do guaraná no estado oxidativo-inflamatório in vitro do cloridrato de ziprasidona*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria; 2019.

Dunder RJ, Luiz-Ferreira A, Almeida AC et al. Applications of the hexanic fraction of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Asparagaceae): control of inflammation and pain screening. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013;108(3):263-271. doi:10.1590/s0074-02762013000300002

Dunder RJ, Quaglio AE, Maciel RP et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of hydrolyzed extract of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm., Asparagaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010;20(3):376-381. doi:10.1590/s0102-695x2010000300014

Eto C. *Identificação de uma subpopulação de macrófagos derivados de medula óssea com alta capacidade de adesão à Mycobacterium tuberculosis*. Universidade Federal de Santa Catarina; 2016.

Favato RA. *Análise dos Efeitos Tóxicos do Extrato da Hidrólise Ácida da Agave Sisalana Perrine (Ehaas), em Linhagens Celulares de Melanoma Metastático*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza; 2020.

Fernandes GL, Vieira APM, Danelon M, Emerenciano NG, Berretta AA, Buszinski AFM, Hori JI, Lima MHFd, Reis TFd, Lima JAd, Delbem ACB, Silva SCMd, Barbosa DB. O Extrato de romã potencializa as ações antidesmineralizante, antibiofilme e antiinflamatória do colutório não alcoólico quando associado ao trimetafosfato de fluoreto de sódio. *Antibióticos* . 2022; 11(11):1477. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111477>

Figueiredo ALP, Lins L., Cattony AC, Falcão AFP Laserterapia no controle da mucosite oral: uma meta-análise. *Revista Da Associação Médica Brasileira* . 2013; 59 (5):467–474.

Garcia CSC. *Caracterização e determinação in vitro da viabilidade de células estromais associadas a gel de plasma e filmes de Hevea brasiliensis com própolis vermelha*. Dissertação de mestrado. Universidade de Caxias do Sul; 2020.

Gomes VTS, Nonato Silva Gomes R, Gomes MS, Joaquim WM, Lago EC, Nicolau RA. Effects of *Matricaria Recutita* (L.) in the Treatment of Oral Mucositis. *Scientific World Journal*. 2018 ;2018:4392184. doi: 10.1155/2018/4392184.

Hashim S, Bakht T, Bahadar Marwat K, Jan A. Medicinal properties, phytochemistry and pharmacology of *Tribulus terrestris* L. (*Zygophyllaceae*). *Pakistan Journal of Botany*. Fevereiro de 2014;399-404.

Kummer CL, Coelho TC. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. 2002;52(4). doi:10.1590/s0034-70942002000400014

Libera AM, Birgel EH, Kitamura SS et al. Macrófagos lácteos de búfalas hígdas: avaliações da fagocitose, espraimento e liberação de H₂O₂ / Milk macrophages from healthy female buffaloes: evaluation of phagocytosis test, spreading and hydrogen peroxide release assays. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* 2006;43(3):412-419.

Lorenzoni AS. *Desenvolvimento de nanocápsulas para a liberação controlada de crisina: avaliação da atividade antioxidante e da citotoxicidade in vitro*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria; 2015.

Luciano MR. *Enxaguatório bucal contendo extrato da casca de romã (Punica granatum), trimetafosfato de sódio e flúor: avaliação de seu potencial anticariogênico*. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2020.

Magnelli RF. *Avaliação dos efeitos genotóxicos e citogenéticos da proteína L1 do papilomavírus associada a saponinas obtidas do resíduo de Agave sisalana Perrine (sisal)*. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo; 2019.

Morzelle MC. *Efeito neuroprotetor da casca de romã (Punica granatum)*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo (USP), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz; 2016.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4

Ogbole, O. O.; Segun, P. A.; Adeniji, a. J. *In vitro* cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 17, n. 1, p. 494, 22 nov. 2017.

Pannunzio A, Coluccia M. Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-1 Inhibitors in Cancer: A Review of Oncology and Medicinal Chemistry Literature. *Pharmaceutics*. 2018;11(4):101. doi:10.3390/ph11040101

Parvin MS, Das N, Jahan N, Akhter MA, Nahar L, Islam ME. Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *BMC Research Notes*. 2015;8(1). doi:10.1186/s13104-015-1384-5

Piza ART. *Avaliação e caracterização proteica do muco de Phyllocaulis boraceiensis sobre a capacidade proliferativa de fibroblastos, células endoteliais e em modelos de cicatrização*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo (USP); 2012.

Radi ZA, Khan KN. Cardio-renal safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2019;44(6):373-391. doi:10.2131/jts.44.373

Ribeiro BD, Barreto DW, Coelho MA. Use of micellar extraction and cloud point preconcentration for valorization of saponins from sisal (*Agave sisalana*) waste. *Food and Bioproducts Processing*. 2015;94:601-609. doi:10.1016/j.fbp.2014.07.004

Salles THC, Foglio MA, Zanutto FV, Souza IMO, D'ávila MA, inventores; Universidade Estadual de Campinas, titular. Processo para obtenção de membranas poliméricas por electrospinning, membranas poliméricas contendo extratos de *Pterodon pubescens benth* e *Arrabidaea chica verlot* e seus usos. Patente brasileira WO2018102895A1. 14 de junho de 2018.

Sansone M. *Avaliação do perfil imunomodulador de frações polissacarídicas não-amido isoladas de banana*. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2017.

Santos EP, Rodrigues FS, Santos IC et al. *Punica Granatum L.* (Romã) e Atividade Antimicrobiana Contra o Biofilme Dental: uma Revisão Bibliográfica. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. 2019;23(2):88. doi:10.17921/1415-6938.2019v23n2p88-93

Silva DN. *Avaliação do mecanismo de ação anti-inflamatória do extrato metanólico e fração hexânica de Cariniana rubra Gardner ex Miers*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Medicina; 2014.

Silva-Silva JV. *Estudos Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividade Antileishmania de Espécies Geissospermum (Apocynaceae)*. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Programa de PósGraduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2016.

Silveira JC. *Avaliação dos efeitos imunomoduladores e citotóxicos de polissacarídeos de Chorisia Speciosa e Hymenaea Courbaril*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná; 2010.

Sousa Gomes M, Diógenes Alves Uchoa Lins R, Zucolotto Langassner SM, Dantas da Silveira ÉJ, Gomes de Carvalho T, Diniz de Sousa Lopes ML, de Souza Araújo L, Addison Carvalho Xavier de Medeiros C, Ferreira de Carvalho Leitão R, Coelho Bernardo Guerra G, Fernandes de Araújo Junior R, Antunes de Araújo A. Anti-inflammatory and antioxidant activity of hydroethanolic extract of *Spondias mombin* leaf in an oral mucositis experimental model. *Arch Oral Biol*. 2020 Mar;111:104664. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104664.

Takahashi ME. *Análise das atividades anti-inflamatória e toxicológica do extrato alcoólico da Agave sisalana: um estudo in vitro*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras; 2020.

Teixeira MR. *Efeitos Tóxicos do Extrato de Hidrólise Ácida da Agave Sisalana Perrine (EHAAS) em Linhagens de Células Não Pequenas de Câncer de Pulmão*. Dissertação de mestrado. Instituto Latino Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana; 2020.

Tsuboy MS, Marcarini JC, Luiz RC et al. In vitro evaluation of the genotoxic activity and apoptosis induction of the extracts of roots and leaves from the Medicinal Plant *Coccoloba mollis*(*Polygonaceae*). *Journal of Medicinal Food*. 2010;13(3):503-508. doi:10.1089/jmf.2009.0119

Vieira ACS. *Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de Punica granatum L. (romã)*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alagoas; 2014.

Viel AM, Pereira AR, Neres WE et al. Effect of *Agave sisalana* Perrine extract on the ovarian and uterine tissues and fetal parameters: comparative interventional study. *Int. J. Multispeciality Health*. 2016;3(5):129-138.

Walker C. Are All Oral COX-2 Selective Inhibitors the Same? A Consideration of Celecoxib, Etoricoxib, and Diclofenac. *International Journal of Rheumatology*. 2018;2018:1-12. doi:10.1155/2018/1302835

Wang R, Wang M, Zhou J et al. Saponins in Chinese Herbal Medicine Exerts Protection in Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury: Possible Mechanism and Target Analysis. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;11. doi:10.3389/fphar.2020.570867

Yu JS, Sahar NE, Bi YR et al. The Effects of Triterpenoid Saponins from the Seeds of *Momordica cochinchinensis* on Adipocyte Differentiation and Mature Adipocyte Inflammation. *Plants*. 2020;9(8):984. doi:10.3390/plants9080984

Zhang LH, Li LL, Li YX, Zhang YH. In vitro antioxidant activities of fruits and leaves of pomegranate. *Acta Horticulturae*. 2008;(765):31-34. doi:10.17660/actahortic.2008.765.3

Zhu W, Du Y, Meng H, Dong Y, Li L. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Tribulus terrestris*. *Chemistry Central Journal*. 2017;11(1). doi:10.1186/s13065-017-0289-x