



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102021021173-3 A2

(22) Data do Depósito: 22/10/2021

(43) Data da Publicação Nacional:
09/05/2023

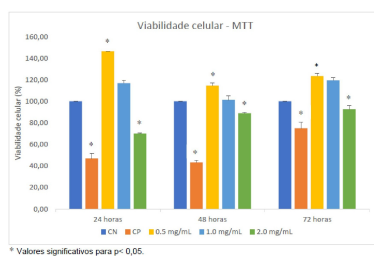
(54) **Título:** CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE AGAVE SISALANA (SISAL) E SEU USO

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/88; A61K 9/06; A61K 31/132; A61P 29/02.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** LUCINÉIA DOS SANTOS; BRUNO ARAUJO SOARES; MYRIAM EMIKO TAKAHASHI; MARIANA CONTI PARRON; MARIANA BITTENCOURT IBE; JOÃO TADEU RIBEIRO PAES; DARÍO ABEL PALMIERI; JÚLIA AMANDA RODRIGUES FRACASSO.

(57) **Resumo:** CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE Agave sisalana (SISAL) E SEU USO. A presente invenção se refere a uma formulação tópica de creme anti-inflamatório, analgésico e reparador para pés, contendo como ativo extrato de Agave sisalana (sisal), associado à ureia, para ser usada em afecções dos pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras, sendo obtida por meio de processo de baixo impacto ambiental e cujo ativo é proveniente do resíduo do sisal, uma fonte renovável e natural. Portanto, a presente invenção, por meio da associação do ativo com a ureia, viabilizou o desenvolvimento de uma formulação de melhor absorção dos ativos pela pele e disponibilizou um produto eficiente, que ainda contribui para o desenvolvimento sustentável e ambientalmente amigável de populações locais, por empregar um ativo proveniente de um resíduo agroindustrial.



CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL) E SEU USO

BREVE DESCRIÇÃO

[001] Trata a presente solicitação de patente de invenção de um “**CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL) E SEU USO**”, que se refere a uma formulação tópica de creme anti-inflamatório, analgésico e reparador para pés, contendo extrato de *Agave sisalana* (sisal) como ativo, associado à ureia, para ser usada em afecções dos pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras, sendo obtida por meio de processo de baixo impacto ambiental e cujo ativo é proveniente do resíduo do sisal, uma fonte renovável e natural.

CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] A presente invenção pertence à seção de necessidades humanas ao campo de saúde, mais especificamente, ao campo de preparações para finalidade médicas, odontológicas ou higiênicas, por se referir a uma formulação tópica de creme anti-inflamatório, analgésico e reparador para pés, contendo extrato de *Agave sisalana* (sisal) associado à ureia, a ser usada em afecções dos pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras, devido as suas efetivas propriedades anti-inflamatória, analgésica e reparadora de tecidos.

CONVENCIMENTO

[003] O Brasil é o maior produtor e exportador mundial do sisal, *Agave sisalana*, cujo estado com maior produção é a Bahia, que concentra 95,2% da produção nacional. Embora o sisal represente uma das poucas opções econômicas viáveis no clima semiárido do nordeste brasileiro, com a introdução no mercado da fibra sintética, sua cultura tem sofrido grandes perdas de mercado nos últimos anos por possuir baixo aproveitamento e, conseqüentemente, elevado custo.

[004] Após o desfibramento das folhas do sisal, apenas 5% de seu peso converte-se em produto rentável, ou seja, a fibra dura, usada na indústria automobilística, na produção de cordas, artesanato, entre outros produtos. O restante é descartado em

forma de mucilagem – resíduos sólidos e líquidos. Diante de situações como essa, existe uma preocupação mundial quanto à busca de estratégias inovadoras para o reaproveitamento de resíduos agrícolas para promover a sustentabilidade ambiental e o incremento social e econômico de famílias de baixa renda.

[005] Dessa forma, ao agregar valor ao resíduo do sisal, mucilagem, por meio do comércio de produtos desenvolvidos a partir dos mesmos, provavelmente ocorrerá uma melhoria da condição econômica e social das famílias que vivem na região sisaleira do Brasil, uma das mais pobres do país.

[006] Nessa direção, com o propósito de reaproveitar o resíduo do sisal para o desenvolvimento de novos fitoprodutos, foi possível constatar, por meio da literatura, o relato do isolamento e da determinação estrutural de cinco saponinas esteroidais presentes nas folhas dessa planta, as quais possuem ações de interesse, tais como antifúngica, antialérgica, anti-inflamatória, antibióticas, antitumorais e cicatrizante. Esse conhecimento prévio possibilitou a utilização de extratos e frações do sisal para a realização de ensaios fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. Além disso, as sapogeninas esteroidais, porção lipofílica das saponinas, são as precursoras dos esteroides farmacologicamente ativos presentes nos anti-inflamatórios glicocorticoides, principalmente, a diosgenina.

[007] Portanto, ao se considerar a importância econômica desses medicamentos, bem como o grande número de efeitos colaterais promovido pelos glicocorticoides faz-se necessária a busca de novas fontes de sapogeninas esteroidais, bem como o desenvolvimento de novos fitoterápicos com ações anti-inflamatórias mais potentes e com menores efeitos colaterais. Como resultado da realização de diversos experimentos e de inúmeras tecnologias empregadas, foi possível o desenvolvimento da formulação pleiteada na presente invenção, a qual possui propriedades anti-inflamatória, analgésica e reparadora a partir do resíduo do sisal, com potencial de ser utilizada no tratamento da fascite plantar e das rachaduras dos pés.

[008] A fascite plantar é um processo inflamatório que afeta a fáscia plantar, um tecido fibroso, pouco elástico, que recobre toda a musculatura da sola do pé, desde o osso calcâneo até os dedos dos pés. Geralmente, quem sofre com esse problema, sente

fortes dores na planta dos pés e na parte mais interna do calcanhar logo pela manhã, ao dar os primeiros passos e, além das dores, também pode ocorrer inchaço no local.

[009] Outro problema comum à região dos pés são as rachaduras, que podem estar associadas a ganho de peso, alterações hormonais e algumas doenças de pele, como psoríase e hiperqueratose, as quais, muitas vezes, podem ser acompanhadas de dor e sangramento.

[010] Dessa forma, ao se considerar que o cuidado local com a hidratação da pele do pé é muito importante, a formulação pleiteada na presente invenção, consiste na associação dos efeitos anti-inflamatório e analgésico do extrato do sisal ao efeito hidratante da ureia, a qual possibilitou o desenvolvimento de um creme, com propriedades anti-inflamatória, analgésica e reparadora, para ser utilizado no tratamento da fascite plantar e das rachaduras dos pés.

[011] A ureia é um umectante e emoliente com alto poder de hidratação e de restauração da maciez da pele, especialmente para pele seca e áspera, seu uso também possibilita o aumento efetivo da capacidade da pele em absorver e reter a umidade, agindo como um queratolítico suave e possibilitando a melhora da absorção de anti-inflamatórios tópicos na pele.

[012] A partir do exposto, é notável a necessidade de introduzir na terapêutica novos medicamentos com efetivas propriedades anti-inflamatória, analgésica e reparadora de tecidos para ser utilizado nas regiões dos pés, por pacientes que apresentam fascite plantar, ressecamento e/ou rachaduras. Além disso, há também a necessidade de agregar valor aos resíduos do sisal, por meio do comércio de produtos desenvolvidos a partir dos mesmos, para promover uma melhoria da condição econômica e social das famílias que vivem na região sisaleira do Brasil, uma das mais pobres do país.

[013] Portanto, a presente invenção disponibiliza uma formulação em forma de creme com o extrato do resíduo do sisal, o qual destaca-se em relação aos demais produtos no mercado, por apresentar compostos ativos de origem natural, com efetivas atividades anti-inflamatória e analgésica, um grande diferencial na área farmacêutica. Além disso, a associação desse ativo com a ureia permitiu o desenvolvimento de uma formulação de melhor absorção dos ativos pela pele, a ser utilizada em afecções dos

pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras, uma vez que, resultados de análises comparativas demonstraram a eficácia e segurança do produto, além de suas ações anti-inflamatória, analgésica e reparadora.

[014] Em adição, pelo fato de os compostos ativos serem obtidos do resíduo do sisal, cujo Brasil é o maior produtor mundial, e a fonte dessa matéria-prima ser abundante e barata, o custo da formulação é reduzido. Ademais, existe uma grande importância social em se possibilitar o desenvolvimento de um fitoterápico à base do resíduo do sisal, o que também é um fator a ser considerado.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[015] Atualmente, estão disponíveis no estado da técnica, algumas anterioridades patentárias que descrevem composições de uso tópico com atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora, proveniente de ativos naturais, bem como publicações científicas que avaliam atividade antibiótica do extrato das folhas do sisal. No entanto, nenhuma delas antecipa a presente invenção, conforme observado a seguir.

[016] Em sua dissertação, intitulada "Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e de citotoxicidade de produtos extraídos da *Agave sisalana* Perrine", Vieira (2014) determinou as atividades antimicrobianas e cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosae* e *C. albicans*, antioxidante e de citotoxicidade das *Agave sisalana* Perrine, em resíduos obtidos a partir da desfibrilação das folhas. Os resultados obtidos no estudo demonstraram que, os resíduos de decorticação, comumente desperdiçados, podem ser fonte de novos ativos terapêuticos. Ainda que a anterioridade traga ensinamentos à respeito de o resíduo das folhas de *A. sisalana* serem fontes de agentes terapêuticos, a presente invenção guarda importantes diferenças em relação à anterioridade, uma vez que disponibiliza um creme de uso tópico cujos ativos são da mucilagem do sisal os quais são associados à ureia, para que a atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora do produto seja potencializada, o que não é sugerido anteriormente, corroborando com a inventividade do produto pleiteado.

[017] Almeida (2013), em sua dissertação intitulada "Ação antifúngica do resíduo líquido integral e fracionado do desfibramento da folha do sisal (*Agave sisalana*) sobre

Malassezia pachydermatis, *Tricophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*", testou a atividade antifúngica do precipitado, parte sólida proveniente da centrifugação do suco extraído da mucilagem, resíduo obtido do desfibramento da folha do sisal. A mucilagem foi processada por prensagem ou trituração e o suco obtido foi submetido a diferentes técnicas de purificação através de extrações por solventes orgânicos. O precipitado foi avaliado quanto à atividade antimicrobiana tanto em sua forma úmida como seca; que após secagem, este foi reidratado em água para a obtenção de um concentrado. Assim como a publicação anteriormente mencionada, a dissertação de Almeida (2013) traz ensinamentos à respeito do resíduo das folhas de *A. sisalana*, mais especificamente sobre a atividade sobre *Malassezia pachydermatis*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*, enquanto a presente invenção disponibiliza um creme de uso tópico para a região dos pés cujos ativos são provenientes da mucilagem do sisal, a qual é associada à ureia, para que a atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora do produto seja potencializada, o que não é sugerido, corroborando com a inventividade do produto pleiteado.

[018] A anterioridade JP2009545582A, intitulada "*Sarsasapogenin-containing composition*", se refere a uma composição contendo salsasapogenina ou um extrato vegetal contendo salsasapogenina, dentre as opções descritas extrato de *Agave sisalana*, que pode melhorar os sintomas gerais da pele e, particularmente, melhorar aspectos causados por deficiência de lipídios. Ainda que a anterioridade mencione que pode ser utilizado o extrato de *Agave sisalana*, ela não antecipa o uso do extrato da mucilagem do sisal, um resíduo agroindustrial, nem seu emprego para obtenção de uma formulação de creme de uso tópico na região dos pés, associado à ureia para potencializar a atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora do produto, portanto, não proporciona meios para solucionar o problema técnico resolvido pela presente invenção.

[019] A anterioridade US7615546B2, intitulada "*Topical delivery system for phytosterols*", refere-se a ésteres de açúcar de fitoesteróis, obtidos por processos químicos, a partir de diversas fontes vegetais, dentre elas *Agave*, úteis para formulações tópica e para o tratamento de doenças da pele, incluindo: manchas senis,

acne, perda de antioxidantes celulares, perda de colágeno, perda de elasticidade da pele, perda de elasticidade da pele, rugas da pele incluindo linhas finas, oxidação, danos causados por radiação, mau funcionamento das metaloproteases da matriz, mau funcionamento das tirosinases, pele seca, xerose, ictiose, caspa, manchas acastanhadas, queratoses, melasma, lentigos, manchas, pele oleosa, verrugas, eczema, pele pruriginosa, psoríase, dermatoses inflamatórias, inflamação tópica, queratinização perturbada, unhas, couro cabeludo, cabelo ou pele que requerem produtos de limpeza, condicionamento ou tratamento e suas combinações. Portanto, a anterioridade não antecipa a presente invenção.

[020] A anterioridade US20190008747A1, intitulada "*External dermal composition for anti-ageing and method for producing the same*", refere-se a uma composição dérmica tópica anti-envelhecimento que pode conter em sua composição extrato de *Agave sisalana*, capaz de prevenir ou melhorar problemas de pele aparentes, tais como rugas, manchas e flacidez, causados pelo aumento da idade ou envelhecimento; mantendo ou melhorando a função de barreira e a produção de ácido hialurônico na pele. Portanto, a anterioridade não antecipa a presente invenção.

[021] A anterioridade KR102114286B1, intitulada "*Cosmetic composition comprising enzyme-treated extract of agave syrup as active ingredient*", refere-se a uma composição cosmética contendo extrato de xarope de agave, que é preparado pelo tratamento do xarope com enzima degradante da parede celular, glicose oxidase e enzima degradante de peróxido de hidrogênio, 0,02% a 12% em peso em relação ao peso total da composição cosmética. De acordo com a descrição da invenção, o extrato de xarope de agave pode ser usado como cosmético porque exibe um excelente efeito de esfoliação da pele, efeito hidratante e efeito de clareamento, sem causar irritação na pele. Portanto, a anterioridade também não antecipa a presente invenção.

[022] Além das anterioridades apontadas que embora não antecipem a presente invenção, são as que mais se aproximam dela, ainda estão presentes no atual estado da técnica, algumas anterioridades que se referem ao emprego de extratos vegetais devido as suas propriedades benéficas para o consumidor e de interesse do setor industrial, as quais são apresentadas a seguir.

[023] Leite e colaboradores (2015), em "Avaliação das atividades cicatrizante, anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (quixabeira)", avaliou as atividades do extrato, para tanto empregou um modelo de ferida e cicatrização, a migração de células para a região da ferida foi avaliada através da inserção de discos de esponjas de álcool polivinílico, conforme utilizado previamente por Muscará *et al.* (2000). Nesse estudo, o tratamento tópico dos ratos com 30 mg do extrato etanólico da *Sideroxylon obtusifolium* (EESO) por 0,4 mL de creme Lanette®, 2 vezes ao dia, diminuiu de forma significativa ($p < 0,01$) a atividade da enzima mieloperoxidase, um indicador de neutrófilos, após 48h da indução da ferida em ratos. A preparação comercial Novaderm® também foi capaz de diminuir ($p < 0,01$) a atividade da MPO, quando comparado ao grupo controle (veículo). Para confirmar o papel do EESO na migração de leucócitos, contagens total e diferencial de leucócitos presentes no exsudato retirado das esponjas foram realizadas, sendo observado que, com a aplicação tópica de 30 mg do EESO por 0,4 mL de creme Lanette®, 2 vezes ao dia, diminui significativamente o número de leucócitos totais ($p < 0,05$) e de células polimorfonucleares ($p < 0,01$). O grupo que recebeu aplicação tópica da preparação Novaderm®, quando comparado ao grupo de animais que recebeu apenas veículo, também apresentou diminuição de leucócitos totais ($p < 0,01$) e de polimorfonucleares ($p < 0,001$). Portanto, o EESO foi eficaz na redução do processo inflamatório.

[024] De Carli e colaboradores (2009), em "*Topical Anti-inflammatory Effect of Creams containing Kaurenoic Acid Isolated from Wedelia paludosa in Mice*", testaram os efeitos anti-inflamatórios (KA) do ácido caurenóico por meio de testes de edema em orelha de ratos, induzido por óleo de cróton. O efeito anti-inflamatório do creme contendo o extrato foi dependente da dose, sendo o KA possivelmente um dos principais componentes responsáveis por esse efeito.

[025] Camargo (2006), em "Efeito anti-inflamatório do extrato de *Zingiber officinale* aplicado por fonoforese sobre o edema de pata de ratos", observou redução do edema ao se utilizar o extrato de *Zingiber officinale* em gel de carbopol em concentração de 5%, a partir da segunda hora da aplicação.

[026] Queiroz (2008), em sua dissertação "Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de *Matricaria recutita* (L.) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico", obteve resultados da avaliação anti-inflamatória que indicam que o gel de carbopol com solução extrativa etanólica de camomila (SEEC) 5% sem LSS (Lauril Sulfato de Sódio), na 3ª hora apresentou-se mais efetivo que Voltaren Emugel® e na 4ª hora uma ação similar ao Voltaren Emulgel®. Em relação ao gel de carbopol, controle negativo, o gel SEEC 5% sem LSS apresentou melhor atividade anti-inflamatória no edema de pata induzido por carragenina. Assim, o gel de carbopol com solução extrativa etanólica de camomila (SEEC) 5% sem LSS apresentou uma tendência em reduzir o edema. A formulação com EBC (Extrato bruto de camomila) 3% com LSS e EBC 5% sem LSS ambos na 4ª hora quando comparado ao controle negativo (gel carbopol) apresentaram resultado significativo estatisticamente ($p < 0,001$), ou seja, atividade antiedematogênica.

[027] Marson e colaboradores (2009) em "Preparo de uma formulação tópica e avaliação anti-inflamatória do extrato *Blutaparon portulacoides*", descreveram que a formulação apresentou viscosidade desejada e reologia adequada, sendo observado características como coloração castanha devido ao extrato vegetal e textura suave ao toque. Após a realização dos testes de indução de edema por óleo de cróton na orelha de camundongos, pode-se observar que o controle positivo confirmou a ação da Dexametasona na redução da inflamação e consequente redução de edema. O controle negativo foi um parâmetro seguro da ação inflamatória causada pelo óleo de cróton, tornando a resposta inflamatória em seu nível máximo. O creme contendo o extrato de *B. portulacoides* foi efetivo em causar uma diminuição do edema na orelha de camundongo. A atividade anti-inflamatória do creme com extrato vegetal de *B. portulacoides* teve uma resposta significativa em relação ao creme base, no entanto menor quando comparado à ação de um tradicional anti-inflamatório, como a Dexametasona.

[028] A anterioridade BR102015017575-2, intitulada "Formulação farmacêutica fitoterápica na forma de creme anti-inflamatório contendo a partição hexânica do extrato metanólico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nobis)", trata-se de

uma formulação farmacêutica fitoterápica na forma de um creme contendo a partição hexânica do extrato metanólico das folhas de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae) – PHEX - a qual poderá ser indicada para o tratamento tópico de processos inflamatórios cutâneos induzidos por diferentes estímulos, principalmente quanto à inflamação desencadeada pela dermatite de contato. Observou-se que o tratamento tópico com as três diferentes doses de PHEX reduziu significativamente o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Foi notadamente expressiva a atividade observada para a dose de 1,0 mg/20 mL, que reduziu o edema em 75% ($p < 0,001$), muito próximo ao observado para a Dexametasona, utilizada como fármaco de referência (redução em 70% - $p < 0,001$). As doses de 0,5 mg/20 mL e 0,1 mg/20 mL reduziram o edema em 46% ($p < 0,01$) e 54% ($p < 0,01$), respectivamente. Além disso, ao contrário da Dexametasona, PHEX 1,0 mg/20 mL não foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 β no local da inflamação induzida pela aplicação única de óleo de cróton, mas, por outro lado, foram reduzidos significativamente os níveis de IL-6 e TNF- α , tanto por PHEX 1,0 mg/20 mL, quanto pela Dexametasona ($p < 0,001$).

[029] A anterioridade WO2016/065442, intitulada "Composições farmacêuticas anti-inflamatórias, proliferativas, protetoras e mucoadesivas, solúveis e estáveis; seu uso no tratamento dos quadros de mucosite e processo de obtenção; composição farmacêutica de base para o preparo das composições farmacêuticas e seu processo de obtenção", refere-se a uma composição farmacêutica com características mucoadesivas e de liberação prolongada contendo a associação complementar do extrato ou frações da *Curcuma longa* L. com teor de curcuminóide superior a 5% e extrato de *Bidens pilosa* (Bd) para o tratamento de doenças inflamatórias da cavidade oral (estomatites) e do trato gastrointestinal, como, por exemplo, mucosites induzidas por rádio e/ou quimioterapia e lesões aftosas. Adicionalmente, lesões cutâneas de caráter inflamatório e quadros de mucosite vaginal são alvos da terapia com as composições em questão.

[030] A anterioridade PI0514092-7, intitulada "Composição tópica compreendendo óleo de semente de Nim extrato de óleo de *Hypericum perforatum*, seu uso e formulação farmacêutica", descreve uma composição compreendendo substâncias naturais, óleo

de Nim e extrato de óleo de erva de São João (*Hypericum perforatum*), úteis para o tratamento e cura das lesões externas, de qualquer natureza, por combinar propriedades de restauração, antissépticas, antibacterianas, repelentes de dípteros miasigênicos e dípteros não miasigênicos, anti-inflamatórias e de aliviar a dor.

[031] De Araújo e colaboradores (2019) em "*Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing Kalanchoe brasiliensis and Kalanchoe pinnata leaf aqueous extract*", descreveram formulações contendo três concentrações de extrato aquoso de folha de *K. brasiliensis* (1,25, 2,5 e 5%) que reduziram significativamente o edema de orelha induzido por óleo de cróton quando comparado ao placebo ($P < 0,05$, $P < 0,01$ e $P < 0,01$, respectivamente). Por outro lado, a formulação contendo extrato aquoso de folha de *K. pinnata* apenas na concentração de 5% mostrou uma redução estatisticamente significativa do edema ($P < 0,01$) em comparação com o placebo. A Dexametasona, utilizada como anti-inflamatório padrão, apresentou uma porcentagem de inibição de $54,87 \pm 7,23\%$ ($P < 0,01$), enquanto as concentrações de 1,25%, 2,5% e 5% da espécie *K. brasiliensis* apresentaram uma porcentagem de edema redução de $38,09 \pm 13\%$ ($P < 0,5$), $53,14 \pm 5,28\%$ ($P < 0,01$) e $51,66 \pm 9,01\%$ ($P < 0,01$), respectivamente, sendo estatisticamente diferentes quando comparados ao placebo. Para *K. pinnata*, apenas a concentração de 5% apresentou uma porcentagem significativa de inibição do edema de orelha em comparação com o placebo, $53,64 \pm 5,05\%$ ($P < 0,01$).

[032] A administração subplantar de λ -carragenina causou um aumento na espessura das patas dos animais em placebo durante 4h de monitoramento. As formulações contendo extrato aquoso de folhas de *K. brasiliensis* nas concentrações de 1,25 e 2,5% apresentaram resultado significativo ($P < 0,05$) na diminuição do edema de pata induzido por carragenina no período de 4h. O grupo que recebeu a formulação na concentração de 5% apresentou efeito significativo na redução do edema nos tempos 1h ($P < 0,001$), 2 h ($P < 0,01$), 3h e 4h ($P < 0,01$). A formulação contendo extrato aquoso de folha de *K. pinnata* na concentração de 1,25% teve um resultado significativo na redução do edema no tempo de 1h ($P < 0,01$) e 2h ($P < 0,05$). A formulação na concentração de 5% mostrou um efeito significativo na redução do edema no tempo 1h

($P < 0,05$). O grupo tratado com Dexametasona apresentou redução do edema nos tempos 1, 2, 3 e 4h no teste com as duas espécies. A Dexametasona usada como medicamento padrão apresentou uma porcentagem de inibição de $40,84 \pm 6,09\%$ ($P < 0,001$) em comparação com o placebo. Somente a formulação contendo 5% do extrato aquoso das folhas de *K. brasiliensis* diminuiu o edema ($33,26 \pm 5,99\%$, $P < 0,001$), em comparação ao placebo. As três formulações contendo extrato aquoso de folha de *K. pinnata* diminuíram a porcentagem de inibição em comparação com o placebo.

[033] Xavier-Santos e colaboradores (2018) em "*Development of an effective and safe topical antiinflammatory gel containing Jatropha gossypifolia leaf extract: Results from a pre-clinical trial in mice*", observaram atividade anti-inflamatória aguda significativa no modelo de edema da orelha, sendo que essa atividade aumentou significativamente quando quantidades equivalentes de extrato foram aplicadas incorporadas nos géis de polaxâmero desenvolvidos. Os géis contendo diferentes quantidades de extrato reduziram significativamente os níveis de edema, nitrito e enzima MPO em orelhas de camundongos, com intensidade semelhante à droga padrão anti-inflamatória Dexametasona. O gel contendo 1,0% de extrato foi posteriormente avaliado e também mostrou atividade anti-inflamatória significativa no teste de inflamação crônica, reduzindo significativamente o edema da orelha, a peroxidação lipídica e a depleção da glutathiona reduzida, da mesma forma que a Dexametasona. A formulação de placebo e o extrato contendo gel apresentaram pH compatível com o da pele humana e exibiram ausência de sinais de toxicidade em camundongos, indicando a segurança do produto desenvolvido para uso tópico. A análise por HPLC confirmou a presença de C-glicosilflavonóides (orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina) como os principais compostos do extrato aquoso de folhas de *J. gossypifolia*.

[034] Em comparação aos trabalhos referenciados anteriormente, os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados com a presente invenção demonstram que o extrato do resíduo do sisal se mostrou como um excelente candidato para o desenvolvimento de um novo fitoterápico com atividades anti-inflamatória, analgésica e reparadora para o tratamento dos pés, uma vez que, nos testes *in vitro* e *in vivo* não apresentou

toxicidade, mas sim, potentes atividades anti-inflamatórias e analgésica. Cabe ressaltar que, nos testes *in vitro* e *in vivo*, a atividade anti-inflamatória foi maior ou igual ao dos anti-inflamatórios comerciais, usados como controle positivo. A formulação de uso tópico manteve a atividade anti-inflamatória observada com o extrato sozinho, reduzindo o edema e a enzima mieloperoxidase no local da inflamação. Em suma, como o extrato do resíduo do sisal e o creme enriquecido com esse ativo apresentaram efetiva atividade anti-inflamatória e não geraram sinais de toxicidade esse fitoterápico pode ser utilizado no tratamento da fascite plantar. Além disso, considerando as atividades hidratante, queratolítica e antibacteriana da ureia, associada ao ativo, a tecnologia empregada para o desenvolvimento da formulação pleiteada consiste na associação dos efeitos anti-inflamatório e analgésico do extrato do resíduo do sisal ao efeito hidratante da ureia, permitindo o seu uso também no tratamento das rachaduras dos pés, o que não foi antecipado pelas anterioridades, tendo em vista que não foi descrito um creme fitoterápico elaborado a partir de um resíduo vegetal para essas finalidades.

[035] Apesar de diversas anterioridades presentes no atual estado da técnica se referirem a formulações enriquecidas com extratos vegetais com reconhecidas propriedades farmacológicas e terapêuticas, nenhuma delas emprega a mucilagem do sisal, um resíduo agroindustrial, associado à ureia, de maneira a melhorar a absorção dos ativos presentes, como a presente invenção. Nesse contexto, a presente invenção, além de apresentar efetivas atividades anti-inflamatória e analgésica, contribui de forma efetiva para o bem-estar ambiental, econômico e social. Tendo em vista que o Brasil produz em média 435 mil toneladas de resíduo de sisal por ano e que a região sisaleira é uma das mais pobres do Brasil, o aproveitamento desse resíduo reflete positivamente na qualidade de vida das pessoas que dependem do sisal para sua subsistência.

[036] Por fim, vale destacar, que a tecnologia empregada no desenvolvimento do creme com o extrato do resíduo do sisal foi desenvolvida a partir de uma fonte renovável, obtida por meio de processos de baixo impacto ambiental, e possibilitará atender a necessidade de mercado, ou seja, um produto de baixo custo, com efetivas atividades terapêuticas a ser utilizado em afecções dos pés, devido as suas atividade

anti-inflamatória, analgésica e reparadora, de maneira eficaz e segura, o que corrobora com sua inventividade.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[037] A presente invenção tem como objetivo disponibilizar uma formulação de administração tópica, contendo extrato de *Agave sisalana*, ativo proveniente do resíduo do sisal, e com atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora, associada à ureia, para ser usada em afecções dos pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras.

DA INVENÇÃO

[038] A presente invenção descreve a obtenção de uma formulação na forma de creme de administração tópica, contendo *Agave sisalana*, ativo proveniente do resíduo do sisal, uma matéria-prima renovável e abundante, com excelente atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora, associado à ureia, a ser usada em afecções dos pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras, a partir de um processo de baixo impacto ambiental que converte um passivo ambiental em ativo de alto valor agregado, contribuindo, ainda, positivamente para melhora da qualidade de vida das pessoas que dependem do sisal para sua subsistência.

VANTAGENS DA INVENÇÃO

[039] A presente invenção apresenta como principais vantagens:

- ✓ Disponibilizar um creme com excelente atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora, que compreende extratos vegetais oriundos de resíduos vegetais associado à ureia;
- ✓ Disponibilizar um creme para a região dos pés que, devido à associação com a ureia, possibilita melhor absorção dos ativos provenientes da mucilagem do sisal, um resíduo agroindustrial, melhorando suas atividades anti-inflamatória, analgésica e reparadora;
- ✓ Disponibilizar um creme com atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora para ser usado em afecções dos pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras;

- ✓ Disponibilizar creme com atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora para a região dos pés, desenvolvido a partir de uma fonte renovável, obtido por meio de processos de baixo impacto ambiental;
- ✓ Disponibilizar creme com atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora para a região dos pés que contribui para o desenvolvimento sustentável e ambientalmente amigável de populações locais, por empregar ativos provenientes de um resíduo vegetal, por meio do aproveitamento da mucilagem do sisal, que é desprezada no replantio das mudas.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[040] A fim de possibilitar melhor o entendimento da presente invenção, serão feitas referências às figuras descritas a seguir:

- ✓ FIG. 1: Média $\pm$ EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste do MTT para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo (solução fisiológica), CP – Controle Positivo (Tween 80 a 2%) e o extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *two-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey;
- ✓ FIG. 2: Células viáveis que não foram coradas com azul de Trypan (A) e células não viáveis que se coraram com azul de Trypan (B). A visualização dessas células se deu em microscópio óptico binocular, a contagem foi realizada na câmara de Neubauer – aumento 400x;
- ✓ FIG. 3: Média $\pm$ EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste de exclusão do Azul de Trypan, para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo (solução fisiológica), CP – Controle Positivo (Tween 80 a 2%) e o extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. Teste de Kruskal-Wallis, seguida do teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls, comparado ao CN solução fisiológica;
- ✓ FIG. 4: Média $\pm$ EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no ensaio de incorporação do vermelho neutro para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN – Controle Negativo (solução fisiológica), CP – Controle Positivo (Tween 80 a

2%) e o Extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey;

✓ FIG. 5: Fotomicrografias do lavado peritoneal (em lâmina) expostos pela coloração de Wright, evidenciando a população de células e a presença de macrófagos (seta em preto) – aumento 100x;

✓ FIG. 6: Contagem diferencial das células encontradas no lavado do líquido peritoneal;

✓ FIG. 7: Média $\pm$ EPM dos valores das absorbâncias de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos no teste da Fagocitose. Onde CN - Controle Negativo (solução fisiológica), CP - Controle Positivo (Indometacina 1 mg/mL) e o extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey;

✓ FIG. 8: Média $\pm$ EPM dos valores das absorbâncias de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos no teste de Retenção de Lisossomos. Onde CN - Controle Negativo (solução fisiológica), CP - Controle Positivo (Indometacina 1 mg/mL) e o Extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey;

✓ FIG. 9: Média $\pm$ EPM da % de inibição de espraio para cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo (solução fisiológica), CP - Controle Positivo (Indometacina 1 mg/mL) e o extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey;

✓ FIG. 10: Fotos obtidas de macrófagos não-espraiados do grupo CP (A), de macrófagos espraiados e não-espraiados com o tratamento do extrato do sisal 2,0 mg/mL (B) e de macrófagos espraiados com o tratamento do extrato do sisal 0,5 mg/mL (C) – aumento 100x;

✓ FIG. 11: Valores médios em segundos $\pm$ EPM da manifestação dos sinais algícos nos primeiros 5 minutos (fase neurogênica) e a partir de 15 minutos (fase inflamatória), para cada grupo de tratamento, administrado pela via oral. Onde CN - Controle Negativo, CPT- Controle Positivo Tramal 10 mg/kg, CPI- Controle Positivo

Indometacina 10 mg/kg e o extrato do sisal nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (n=6 para todos os grupos).

Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

✓ FIG. 12: Média $\pm$ EPM dos valores do edema por grupo de tratamento, por via oral, para avaliação da atividade anti-inflamatória aguda. Onde CN - Controle Negativo, CPD- Controle Positivo Dexametasona 5 mg/kg, CPI- Controle Positivo Indometacina 10 mg/kg e o extrato do sisal nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/Kg. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (n=6 para todos os grupos).

Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

✓ FIG. 13: Média $\pm$ EPM dos valores do edema por grupo de tratamento, por via oral, para avaliação da atividade anti-inflamatória crônica. Onde CN - Controle Negativo, CPD- Controle Positivo Dexametasona 5 mg/kg, CPI- Controle Positivo Indometacina 10 mg/kg e o extrato do sisal nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/kg. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (n=6 para todos os grupos).

Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

✓ FIG. 14: Média $\pm$ EPM dos valores do edema de orelha por grupo de tratamento, por via oral, para avaliação da atividade anti-inflamatória. Onde CN - Controle Negativo, Controle Positivo Dexametasona 5 mg/kg, CPI- Controle Positivo Indometacina 10 mg/kg e o extrato do sisal nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/Kg * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (n=6 para todos os grupos).

Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

✓ FIG. 15: Média $\pm$ EPM dos valores do edema por grupo de tratamento, por via tópica, para avaliação da atividade anti-inflamatória aguda. Onde CN - Controle Negativo Creme Base, CPD- Controle Positivo Creme com Dexametasona 1 mg/g, CPI- Controle Positivo Creme com Indometacina 25 mg/g, 10 - creme com o extrato do sisal na concentração de 10 mg/g e 50- creme com o extrato do sisal na concentração de 50 mg/g. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (n=6 para todos os grupos). Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

✓ FIG. 16: Média $\pm$ EPM dos valores do edema por grupo de tratamento, por via tópica, para avaliação da atividade anti-inflamatória crônica. Onde CN - Controle

Negativo Creme Base, CPD- Controle Positivo Creme com Dexametasona 1 mg/g, CPI- Controle Positivo Creme com Indometacina 25 mg/g, 10 - creme com o extrato do sisal na concentração de 10 mg/g e 50 - creme com o extrato do sisal na concentração de 50 mg/g. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (n=6 para todos os grupos). Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

✓ FIG. 17: Média $\pm$ EPM dos valores do edema de orelha por grupo de tratamento, por via tópica, para avaliação da atividade anti-inflamatória. Onde CN - Controle Negativo Creme Base, CPD- Controle Positivo Creme com Dexametasona 1 mg/g, CPI- Controle Positivo Creme com Indometacina 25 mg/g, 10 - creme com o extrato do sisal na concentração de 10 mg/g e 50 - creme com o extrato do sisal na concentração de 50 mg/g. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (n=6 para todos os grupos). Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

✓ FIG. 18: Média $\pm$ EPM das medidas de absorbância para dosagem da enzima mieloperoxidase. Onde CN - Onde CN - Controle Negativo Creme Base, 10 - creme com o extrato do sisal na concentração de 10 mg/g e 50 - creme com o extrato do sisal na concentração de 50 mg/g. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (n=6 para todos os grupos). Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

✓ FIG. 19: Curva de regressão linear com a saponina Merck nas concentrações de 0,08 a 0,28 mg/ml;

✓ FIG. 20: Espectros obtidos na análise do extrato do sisal por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Picos identificados de hecogenina e tigogenina.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[041] Para a obtenção do creme anti-inflamatório, analgésico e reparador, foram constituídas duas fases: uma fase oleosa (A), compreendendo 19,05% p/p da formulação e uma fase aquosa (B), compreendendo 80,95% p/p da formulação. Como agentes ativos constam o extrato hidroalcoólico do sisal (*Agave sisalana*), avaliado em duas concentrações distintas no creme, de 1 e 5% p/p da formulação e a ureia, numa proporção de 10% p/p da formulação. Para o preparo do creme foi utilizada a técnica de inversão de fases: as fases aquosa e oleosa foram aquecidas separadamente à

temperatura de $75 \pm 5^\circ\text{C}$. Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa sob agitação constante de 600 rpm, com auxílio de um agitador mecânico (FISATON - 713D), e contínua, até que a emulsão atingisse a temperatura ambiente controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As fases aquosa e oleosa são constituídas de:

- ✓ Fase Oleosa (A): base auto-emulsionante não-iônica, numa proporção de 10% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregada cera Paramul J (álcool cetoestearílico à 70% e seu derivado etoxilado a 30%); emoliente primário ou auxiliar, numa proporção de 5% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado miristato de isopropila (éster de alta pureza, uma mistura de ésteres de álcool isopropílico com ácidos graxos saturados, principalmente o ácido mirístico); emoliente e hidratante, numa proporção de 4% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregada vaselina líquida (óleo mineral); conservante, numa proporção de 0,05% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado Nipazol (propil parabeno);
- ✓ Fase Aquosa (B): hidratante do tipo umectante, numa proporção de 5% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado propilenoglicol (propano-1,2-diol, composto orgânico classificado como álcool diol); agente ativo hidratante, queratolítico e antibacteriano, numa proporção de 10% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado ureia; agente ativo natural, numa proporção de 1 ou 5% p/p da formulação, a depender da variação, sendo empregado extrato hidroalcolico do sisal (*Agave sisalana*), com concentração de 0,1g/ml em etanol 95%; conservante, numa proporção de 0,1% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado Nipagin (metil parabeno); veículo, qsp 100%, sendo empregada água destilada.

[042] A composição da formulação encontra-se novamente descrita na tabela 1, a seguir. É importante ressaltar que, todos os componentes presentes na formulação são amplamente empregados nos setores cosmético e farmacêutico, portanto, farmacêutica e cosmeticamente aceitos.

Componente	Proporção	Função
------------	-----------	--------

Fase Oleosa (A)		
Cera paramul J (Álcool Cetoestearílico a 70% e seu derivado etoxilado a 30%)	10%	Base auto emulsionante não-iônica adequada ao preparo de emulsões do tipo O/A
Miristato de isopropila (éster de alta pureza, uma mistura de ésteres de álcool isopropílico com ácidos graxos saturados, principalmente o ácido mirístico)	5%	Emoliente primário ou auxiliar nas preparações do tipo O/A como doador de consistência
Vaselina líquida (óleo mineral)	4%	Emoliente e hidratante
Nipazol (Propil Parabeno)	0,05%	Conservante
Fase Aquosa (B)		
Propilenoglicol (propano-1,2-diol, composto orgânico classificado como álcool diol)	5%	Hidratante do tipo umectante
Ureia	10%	Hidratante, queratolítico e antibacteriano
Extrato hidroetanólico da mucilagem do sisal (<i>Agave sisalana</i>)	1 ou 5%	Agente ativo
Nipagin (Metil Parabeno)	0,1%	Conservante
Água destilada	QSP 100%	Veículo

Tabela 1: Composição da formulação do creme anti-inflamatório, analgésico e reparador.

[043] O extrato do sisal (ES) foi preparado em três etapas: 1) obtenção do suco do sisal; 2) hidrólise ácida do suco do sisal para obtenção de um precipitado e 3) solubilização do precipitado em etanol hidratado em 95%.

[044] Assim, na primeira etapa, o suco do sisal foi obtido a partir da prensagem mecânica manual da mucilagem do sisal, resíduo resultante do desfibramento das folhas desta planta. Na segunda etapa, o suco do sisal foi acidificado com ácido

clorídrico até pH 1. Em seguida, foi agitado a 500 rpm por 24 horas (TECNAL, TE-089) e depois aquecido a alta temperatura (120°C) por 120 minutos (Autoclave FABBE-PRIMAR, modelo 103). Posteriormente, a solução resultante foi centrifugada a 4000 rpm durante 20 minutos (Centrífuga refrigerada FANEM, FR 22) e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram adicionados 50 mL de NaOH a 5% e a solução foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 50 mL de água destilada. O pH da solução foi medido e, quando necessária, foi realizada sua correção com NaOH a 5% até atingir pH 6. A solução foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos para obtenção do precipitado, o qual foi seco em estufa a 50°C em placas de Petri (SOLAB, SL-100/81).

[045] Na última etapa, 10 gramas do precipitado seco foram dissolvidos em 100 mL de etanol hidratado a 95%. A solução foi agitada por 30 minutos a 1500 (TECNAL, TE-089), filtrada à vácuo e submetida à rotoevaporação (FISATOM, 803) para retirada do etanol 95%. O extrato obtido foi seco em estufa (SOLAB, SL-100/81) a 37°C por cerca de 3 dias, até obtenção de peso constante.

[046] Para avaliação das atividades farmacológicas *in vitro* foram utilizadas células obtidas de camundongos fêmeas da linhagem Swiss, com 50 dias de idade. Nas avaliações das propriedades farmacológicas e toxicológicas *in vivo* foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar, com 70 dias de idade. Os animais permaneceram alojados no Biotério da FCL/Unesp, Campus de Assis, sendo mantidos em condições-padrão de temperatura (22°C±2°C) e luminosidade (12h ciclo claro/escuro). Os recursos alimentar e hídrico foram fornecidos *ad libitum*. O manejo dos animais obedeceu aos “Princípios Éticos na Experimentação Animal” definidos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Os procedimentos experimentais somente ocorreram após apreciação e aprovação dos projetos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCL/Unesp, campus de Assis – Processos 002/2014 e 002/2018.

[047] Para os testes de toxicidade, foram empregadas células mononucleares do sangue total humano (*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMC), obtidas conforme descrito a seguir.

[048] A obtenção das PBMC se deu por meio do sangue total que foi fornecido pelo Laboratório de Análises Clínicas Bioanálise, da cidade de Cândido Mota (SP), que participa de programas de qualidade como o Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). As amostras recebidas como doação correspondiam às sobras de sangue humano total que seriam descartadas após a realização das análises pelo Laboratório de Análises Clínicas. Foram selecionados materiais de 12 pacientes hígidos, de ambos os sexos, entre 25 e 35 anos que não faziam uso de anti-inflamatórios e substâncias tóxicas. Os pacientes foram informados sobre o reaproveitamento do sangue e autorizaram o uso por meio de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A realização dos testes com sangue humano ocorreu após apreciação e aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista (FCL/Unesp), campus de Assis, sob o número de registro CAAE: 14382719.4.0000.5401.

[049] Para a extração de PBMC, foi utilizada a metodologia de separação em gradiente descontínuo de densidade e o reagente Histopaque 1077. O sangue total de humanos foi armazenado em tubos de EDTA e transferido cuidadosamente para um tubo Falcon contendo Histopaque 1077. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 400g por 30 minutos, para que ocorresse a separação das frações por diferença de densidade. A névoa que se formou entre o Histopaque e o plasma foi coletada e lavada com PBS para a obtenção de PBMC (QABAHA *et al.*, 2016).

[050] A partir da PBMC, foram confeccionadas três lâminas, para tanto o material foi fixado com metanol e corado com o emprego da coloração de Wright. Após a coloração, as lâminas foram montadas utilizando-se Entellan para visualização no microscópio óptico binocular (Olympus, Tóquio, Japão).

[051] Determinação de toxicidade *in vitro* do extrato do sisal.

[052] O estudo da toxicidade *in vitro* tem sido usado para definir o efeito tóxico de inúmeras substâncias, bem como permitir a identificação dos prováveis danos promovidos nas células. Além disso, esses ensaios permitem estimar a dose inicial a ser usada em testes de toxicidade *in vivo*. Dessa forma, a viabilidade celular das PBMC foi avaliada após o tratamento com o extrato do sisal, por três métodos já estabelecidos

no meio científico: teste do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]; teste de exclusão do azul de Trypan; e ensaio de incorporação do corante vermelho neutro.

[053] Os testes de toxicidade foram realizados com as PBMC obtidas do sangue total humano, em sua maioria triplicata, exceto o teste de exclusão do Azul de Trypan (quintuplicata), todos em uma única ocasião. As PBMC são amplamente utilizadas em estudos que avaliam os efeitos tóxicos de novos compostos químicos, medicamentosos e imunoterápicos (ST PIERRE et al., 2017; POURAHMAD; SALIMI, 2015).

[054] Os grupos utilizados nos testes toxicológicos estão expostos na tabela 2.

Grupos	Tratamentos – Concentração Final
Controle Negativo	Solução fisiológica – Cloreto de sódio 0,9% (LBS, Laborasa, São Paulo -SP, Brasil)
Controle Positivo	Tween 80 (Impex, Varginha -MG, Brasil) a 2% diluído em solução fisiológica
Extrato sisal em meio de cultura	0,5 mg/mL
Extrato sisal em meio de cultura	1,0 mg/mL
Extrato sisal em meio de cultura	2,0 mg/mL

Tabela 2: Descrição dos grupos para os testes toxicológicos de Teste do MTT (tempo 24, 48 e 72 horas), Teste de exclusão do azul de Trypan (24 horas) e Ensaio de incorporação do vermelho neutro (24 horas).

[055] Teste de toxicidade do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide].

[056] Foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações (TSUBOY *et al.*, 2010), para tanto, as PBMC na concentração de $2,0 \times 10^6$ células/mL foram diluídas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (LGC, Osasco, SP, Brasil) e 1% Penicilina-Anfotericina (LGC, Osasco, SP, Brasil) e Gentamicina (LGC, Osasco, SP, Brasil).

[057] As células foram semeadas em uma placa de 96 poços, submetidas aos diferentes tratamentos e incubadas por 24, 48 e 72 horas em estufa a 37°C a 5% de CO₂ (Panasonic, modelo MCO-19AIC-PA, EUA). Após o término dos tempos de tratamento, o meio foi retirado e foi adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL (p/v) em todos os poços. Em seguida, a placa foi incubada em estufa por 4 horas a 37°C, 5% CO₂ (Panasonic, modelo MCO-19AIC-PA, EUA). Após esse período, o MTT foi descartado e foi adicionado DMSO em todos os poços para solubilização dos cristais de formazan. Na sequência, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de Elisa (Multiskan FC Thermoscientific®) a 560nm. As amostras foram realizadas em triplicata.

[058] O cálculo da viabilidade celular foi realizado segundo a fórmula:

$$VC = (Abs A / Abs CN) * 100$$

Onde: VC = Viabilidade celular (%)

Abs A = absorbância da amostra

Abs CN = absorbância do controle negativo

[059] Resultados obtidos no teste do MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide].

[060] O teste de citotoxicidade *in vitro* pelo MTT foi realizado para avaliar se o extrato do sisal poderia interferir nas estruturas mitocondriais e, conseqüentemente, na viabilidade celular das PBMC. Neste teste, a reação para a formação do cristal de formazan só ocorre em células viáveis, com atividade mitocondrial preservada. O grupo controle negativo foi convencionado como 100% de viabilidade celular em 24 horas, 48 horas e 72 horas após incubação, os resultados obtidos são observados na tabela 3.

[061] O teste da ANOVA *two-way* mostrou efeito significativo dos tratamentos (F= 52,2723, p <0,0001), o que não ocorreu com o tempo (F=1,2741, p=0,2908). O teste *post-hoc* de Tukey mostrou que após 24 horas de incubação, o extrato do sisal na concentração 2,0 mg/mL reduziu de forma significativa a viabilidade celular das PBMC para 70,17% ± 0,70, quando comparados ao controle negativo (p<0,05). As concentrações 0,5 e 1,0 mg/mL apresentaram viabilidade celular acima de 100%

(146,50% $\pm$ 0,03 e 116,83% $\pm$ 2,90, respectivamente), mas somente a concentração 0,5 mg/mL aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular das PBMC quando comparada ao controle negativo.

[062] No tempo de 48 horas após a incubação das células com os tratamentos, o teste post-hoc de Tukey mostrou que a concentração 2,0mg/mL causou diminuição significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular (89,00% $\pm$ 0,44). Obtiveram valores de viabilidade celular maiores que 100% as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL (114,62% $\pm$ 2,44 e 101,27% $\pm$ 4,00, respectivamente). Neste tempo, novamente, somente a concentração 0,5 mg/mL aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular das PBMC quando comparada ao controle negativo.

[063] Em 72 horas, o teste *post-hoc* de Tukey demonstrou que o extrato do sisal na concentração 2,0 mg/mL não diminuiu de forma significativa ($p < 0,05$) a taxa da viabilidade celular das PBMC (92,62% $\pm$ 3,48). As concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL obtiveram viabilidade celular acima de 100%, 123,47% $\pm$ 2,56 e 119,45% $\pm$ 2,81, respectivamente. De forma similar aos outros tempos analisados, somente a concentração 0,5 mg/mL aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular das PBMC quando comparada ao controle negativo (tabela 3). O grupo controle positivo, Tween 80, reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade celular das PBMC em todos os tempos analisados.

Grupos	24 horas	48 horas	72 horas
CN	100,00 $\pm$ 0	100,00 $\pm$ 0	100,00 $\pm$ 0
CP	46.91 $\pm$ 4.62*	43.24 $\pm$ 1.90*	74.87 $\pm$ 5.55*
0,5 mg/mL	146.50 $\pm$ 0.03*	114.62 $\pm$ 2.44*	123.47 $\pm$ 2.56*
1,0 mg/mL	116.83 $\pm$ 2.90	101.27 $\pm$ 4.00	119.45 $\pm$ 2.81
2,0 mg/mL	70.17 $\pm$ 0.70*	89.00 $\pm$ 0.44*	92.62 $\pm$ 3.48*

Tabela 3: Média (%) $\pm$ EPM do valor da taxa de viabilidade celular das PBMC no teste do MTT para os diferentes grupos de tratamento. Onde: CN - Controle Negativo – solução fisiológica, CP - Controle Positivo - Tween 80 2% diluído em solução fisiológica

e Extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. * Valores significativos para $p < 0,05$. – ANOVA two-way seguido do teste post-hoc de Tukey

[064] O extrato do sisal 0,5 mg/mL aumentou de forma significativa a sua taxa de viabilidade celular em todos os tempos analisados. O extrato do sisal 1,0 mg/mL não interferiu taxa de viabilidade celular em todos os tempos analisados. O extrato do sisal 2,0 mg/mL reduziu de forma significativa a viabilidade celular em todos os tempos analisados (Fig. 1). Porém, de acordo com a ISO 10993 (*International Organization for Standardization*, 2009), o extrato do sisal não foi considerado citotóxico neste estudo. Pois, somente é considerada tóxica a substância que promover uma redução da viabilidade celular maior que 30% em relação ao controle negativo.

[065] Teste de toxicidade de exclusão do azul de Trypan.

[066] Foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Phillips (1973), com modificações. As PBMC foram diluídas na densidade celular de 1×10^6 células/mL em meio DMEM *high glucose* (LGC, Osasco, SP, Brasil), 10% de soro fetal bovino (LGC, Osasco, SP, Brasil), 1% de Penicilina-Estreptomicina, 1% de Anfotericina (LGC, Osasco, SP, Brasil). Células e extratos foram distribuídos em placa de 96 poços e incubados a 37°C em estufa 5% de CO₂ (Panasonic, modelo MCO-19AIC-PA, EUA) por 24 horas. Após esse tempo, uma alíquota da suspensão de células foi retirada, diluída em azul de Trypan 0,04% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e contada em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentaram aspecto translúcido e as células mortas, uma coloração arroxeada. A densidade de células viáveis (células/mL) foi expressa como a Média $\pm$ EPM (Erro Padrão Médio). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, em razão do tempo (24h). O experimento foi realizado em quintuplicata. O cálculo da viabilidade celular foi realizado segundo a fórmula:

$$VC (\%) = NCV / NTC * 100$$

Onde: VC = Viabilidade celular (%)

NCV = Número de células viáveis (não coradas) nos quatro quadrantes

NTC = Número total de células (coradas e não coradas) nos quatro quadrantes

[067] Resultados obtidos no teste de exclusão do azul de Trypan.

[068] O teste de exclusão do azul de Trypan teve como objetivo avaliar se o extrato do sisal poderia interferir na permeabilidade celular das PBMC no tempo de 24 horas, visto que, nesse tempo, no teste do MTT, os grupos controle positivo, 0,05 mg/mL e 2,0 mg/mL diferiram significativamente do controle negativo e mostraram um perfil bem claro da influência dos tratamentos sobre a viabilidade celular. O controle negativo foi padronizado como tendo viabilidade celular de 100%.

[069] No teste, as células viáveis apresentaram a membrana celular preservada e não se coraram de azul (Fig. 2A), ao passo que as células não viáveis tiveram a membrana celular rompida e se coraram de azul (Fig. 2B).

[070] A distribuição de normalidade foi avaliada através do teste Shapiro-Wilk. Como os dados não apresentaram normalidade, testes não paramétricos, Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls foram utilizados para realizar a análise estatística. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls indicou que não houve diferença significativa na viabilidade celular das PBMC tratadas com o extrato do sisal 0,5 e 1,0 mg/mL, quando comparados ao controle negativo ($p > 0,05$), após 24 horas de incubação. Esses resultados indicam que essas concentrações não interferiram na taxa de viabilidade celular. Por outro lado, o controle positivo Tween 80 e o extrato do sisal 2,0 mg/mL reduziram significativamente ($p < 0,05$) a taxa de viabilidade celular (Fig. 3), quando comparados ao controle negativo. Considerando que os valores de viabilidade celular das concentrações de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL ($90,78\% \pm 2,86$, $90,88\% \pm 1,25$, $85,54 \pm 2,19$, valores de média $\pm$ EPM, respectivamente) e não apresentou viabilidade celular menor que 70%, o extrato do sisal também não foi considerado tóxico.

[071] Ensaio de incorporação do vermelho neutro.

[072] Foi realizado conforme método descrito por Borenfreund com modificações (BORENFREUND; PUERNER, 1985). As PBMC isoladas do sangue total foram cultivadas no meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e uma associação de antibióticos contendo Penicilina - Estreptomicina 1% e Gentamicina 50

µg/mL e antifúngico Anfotericina 1%. As PBMC foram diluídas na concentração $2,0 \times 10^6$ células/mL e incubadas com os tratamentos por 24 horas a 37°C sob 5% de CO₂.

[073] Após o período de incubação, o meio contendo o extrato foi removido e o poço foi lavado com PBS. O corante vital vermelho neutro foi então adicionado à cultura e a placa foi incubada por mais 3 horas. Imediatamente após a incubação, o cristal formado foi solubilizado com solução aquosa de 50% de etanol e 1% de ácido acético. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Multiskan FC Thermoscientific®) a 540nm.

[074] O cálculo da viabilidade celular foi realizado segundo a fórmula:

$$VC = (Abs\ A / Abs\ CN) * 100$$

Onde: VC = Viabilidade celular (%)

Abs A = absorbância da amostra

Abs CN = absorbância do controle negativo

[075] Resultados obtidos no ensaio de incorporação do vermelho neutro.

[076] O ensaio de incorporação do vermelho neutro tem a finalidade de avaliar se o extrato do sisal poderia interferir na viabilidade celular das PBMC. Isso porque, por ligações eletrostáticas entre o corante vermelho neutro e os componentes da membrana celular de lisossomos, o corante fica retido no interior desta organela em células viáveis, o que garante coloração vermelha. Em células inviáveis, a interação não acontece.

[077] Em todas as concentrações de extrato do sisal analisadas – 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL –, os valores de viabilidade celular foram acima de 100%, após 24 horas de incubação, cujos valores obtidos foram $123,95\% \pm 1,92$, $109,30\% \pm 3,48$ e $101,29\% \pm 2,00$, respectivamente.

[078] A análise de ANOVA *one-way*, seguida de teste post-hoc de Tukey demonstrou que o extrato do sisal, 1,0 e 2,0 mg/mL, não apresentou diferenças significativas em relação ao controle negativo, ou seja, nestas concentrações o extrato não afetou a viabilidade celular ($p > 0,05$). Por outro lado, o controle positivo, Tween 80, reduziu de

forma significativa a viabilidade celular ($p < 0,05$), e o extrato do sisal 0,5 mg/mL promoveu um efeito contrário, aumentando-a significativamente, sempre em relação ao controle negativo (Fig. 4). De forma semelhante ao verificado nos dois testes anteriores, o extrato do sisal não se mostrou tóxico.

[079] Ensaios da atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato do sisal.

[080] Foram realizados com macrófagos obtidos do peritônio de camundongos. Os grupos utilizados para os testes anti-inflamatórios estão descritos na tabela 4.

Grupos	Tratamentos – Concentração Final
Controle Negativo	Solução fisiológica – Cloreto de sódio 0,9%
Controle Positivo	Indometacina - diluído em solução fisiológica a 1,0 mg/mL
Extrato sisal em meio de cultura	0,5 mg/mL
Extrato sisal em meio de cultura	1,0 mg/mL
Extrato sisal em meio de cultura	2,0 mg/mL

Tabela 4: Descrição dos grupos para os testes anti-inflamatórios Teste da fagocitose, Retenção de lisossomos e Espreadimento de macrófagos.

[081] Tomando por base os resultados obtidos nos três testes de toxicidade *in vitro*, - Teste do MTT, Teste de Exclusão do Azul de Trypan e Ensaio de incorporação do vermelho neutro - os quais comprovaram ausência de toxicidade do extrato do sisal, ou seja, valores de viabilidade celular acima de 70%, as mesmas concentrações foram utilizadas nos testes anti-inflamatórios *in vitro*.

[082] A célula empregada nesta etapa foi o macrófago obtido de camundongos, em virtude do papel central no processo de inflamação. Os macrófagos estão amplamente envolvidos em muitos eventos fisiopatológicos associados a esta resposta biológica, tais como no processo de fagocitose e na síntese de espécies reativas de oxigênio (óxido nítrico), os mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas), fatores do complemento e enzimas proteolíticas.

[083] Obtenção de macrófagos de camundongos.

[084] As células obtidas nestes ensaios foram retiradas de camundongos fêmeas Swiss. Para obtenção deste fluido foi utilizado o protocolo modificado do trabalho de Araújo-Jorge e De Souza (1986 apud BARBOSA; PEREIRA; MEIRELLES, 2000).

[085] Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, os pelos foram removidos e a região abdominal foi limpa com álcool 70% e Povidine (PVPI). O abdômen foi aberto com instrumentos cirúrgicos, o peritônio foi exposto, foi injetado PBS gelado e o lavado do líquido peritoneal foi retirado. Foram feitos esfregaços em lâmina em triplicata. Após essas etapas, o líquido de lavado peritoneal foi centrifugado (Excelsa II 206 BL, FANEM, Brasil) a 1200 rpm durante 5 minutos.

[086] Após a confecção de esfregaços do lavado do líquido peritoneal, as lâminas foram coradas pelo método de Wright. As lâminas foram lidas em microscópio óptico (Olympus, Tóquio, Japão). Foi realizada a identificação morfológica e contagem diferencial das células.

[087] Seleção dos macrófagos.

[088] A seleção dos macrófagos foi realizada por adesão, processo que permite obter culturas em monocamada de células aderentes. As células contidas no lavado peritoneal foram contadas na Câmara de Neubauer. As células foram diluídas em meio DMEM high glucose, 10% soro fetal bovino, 1% de Penicilina - Estreptomicina e 1% Anfotericina, de forma a atingir a concentração desejada de $2,0 \times 10^6$ células/mL (PIEMONTE; BUCHI, 2002).

[089] Contagem diferencial de leucócitos do lavado peritoneal.

[090] Inicialmente, o lavado peritoneal fresco obtido de camundongos foi analisado no microscópio óptico invertido. A confecção de lâminas tornou possível visualizar a morfologia em microscópio óptico binocular (Fig. 5) a predominância de macrófagos (72%), seguida da presença de linfócitos (25%) e mastócitos (2%), conforme a proporção apresentada na figura 6.

[091] Teste da fagocitose em cultura de macrófagos.

[092] O teste foi realizado em cultura de macrófagos, em triplicata, conforme o método descrito por Pipe, Coles e Farley (1995). Foram depositados 100µL de células, com

concentração $2,0 \times 10^6$ células/mL em placa de ELISA e foram adicionados 10µL de cada tratamento incubado por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 10µL de solução de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL), corado com vermelho neutro e incubado por mais 30 minutos. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando 100µL de solução de extração. Após 30 minutos, foi realizada a leitura das placas, a 550 nm utilizando leitora de ELISA (Multiskan FC Thermoscientific®).

[093] A taxa de inibição da fagocitose foi calculada por meio da fórmula:

$$\% \text{ inibição da fagocitose} = (\text{Média Abs CN} - \text{Média Abs A} / \text{Média Abs CN}) * 100$$

Onde: Média Abs CN = média da absorbância do controle negativo

Média Abs A = média da absorbância da amostra

[094] Resultados obtidos no teste da fagocitose.

[095] Os resultados obtidos no teste da fagocitose com macrófagos podem ser observados na figura 7. A ANOVA *one-way* seguida pelo *post-hoc* de Tukey demonstrou que o extrato do sisal, nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL e o controle positivo Indometacina 1,0 mg/mL, apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), indicando que esses tratamentos inibiram o processo de fagocitose dos macrófagos, constatando-se assim a atividade anti-inflamatória dessas células. Ainda nesse teste, quando comparado os valores obtidos com os tratamentos ao do controle positivo, o extrato do sisal, 1,0 mg/mL, diferiu significativamente ($p < 0,05$), ou seja, apresentou atividade anti-inflamatória maior do que a do controle positivo Indometacina. Observa-se, também, que não há uma relação dose dependente quando se compara os valores de absorbância entre os grupos 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL ($0,09 \pm 0,00$, $0,07 \pm 0,00$ e $0,08 \pm 0,00$, respectivamente). Não existiram diferenças significativas entre os grupos tratados com o extrato do sisal.

[096] Ainda neste teste, foram calculadas as taxas de inibição da fagocitose em % (tabela 5). De forma semelhante ao verificado acima, a ANOVA *one-way* demonstrou que as três concentrações do extrato do sisal (0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL) que foram

testadas mostraram diferença significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), sugerindo atividade anti-inflamatória do extrato. Porém, quando esses valores foram comparados ao do controle positivo, as concentrações de 0,5 e 2,0 mg/mL não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), o que demonstra que possui efeito anti-inflamatório semelhante ao controle positivo Indometacina. Somente o extrato do sisal 1,0 mg/mL apresentou efeito maior do que o Indometacina ($p < 0,05$), visto que a taxa de inibição da fagocitose foi maior. Não existiram diferenças significativas entre os grupos tratados com o extrato do sisal.

Parâmetro	CN	CP	0,5 mg/mL	1,0mg/mL	2,0 mg/mL
% da taxa de inibição	0	45,23*	56,66*	64,70* ^Φ	61,81*
EPM	0	6,27	5,83	4,65	1,80

Tabela 5: Média e EPM dos valores de inibição de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos no teste da fagocitose. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA *one-way* seguida do teste *post-hoc* de Tukey. * Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo; ^Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo.

[097] Retenção de lisossomos.

[098] A retenção foi realizada em cultura de macrófagos, de acordo com o método descrito por Pipe, Coles e Farley (1995). Em 100µL da solução peritoneal contendo 2×10^6 células de macrófagos/mL foram adicionados 10µL de solução de zimosan e incubados por 30 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com os extratos e controles por 30 minutos. Na sequência, foram adicionados 20µL de solução de vermelho neutro. Após a centrifugação, as células lavadas com solução de PBS uma única vez e posteriormente, foi adicionado solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos e por fim, foi realizada a leitura em ELISA (Multiskan FC ThermoScientific®) no comprimento de onda de 490nm. O teste foi realizado em triplicata e a taxa de inibição foi calculada por meio da fórmula:

$$\% \text{ inibição da retenção de lisossomos} = (\text{Média Abs CN} - \text{Média Abs A} / \text{Média Abs CN}) \times 100$$

Onde: Média Abs CN = média da absorbância do controle negativo

Média Abs A = média da absorbância da amostra

[099] Resultados obtidos no teste de retenção de lisossomos.

[100] A análise dos dados por meio da ANOVA *one-way* seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey mostrou que o controle positivo – Indometacina 1,0 mg/mL – e o extrato do sisal, em todas as concentrações analisadas, diferiram significativamente ($p < 0,05$) do controle negativo (Fig. 8), indicando uma resposta anti-inflamatória. Como foi observado no teste da fagocitose, as absorbâncias do teste de retenção de lisossomos não apresentam relação dose-dependência nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL ($0,001 \pm 0,000$, $0,008 \pm 0,000$ e $0,003 \pm 0,000$, respectivamente). Além disso, o extrato do sisal 1,0 mg/mL diferiu estatisticamente do grupo controle positivo ($p > 0,05$).

[101] Também no teste de retenção de lisossomos, a ANOVA *one-way* demonstrou que as taxas de inibição apresentadas pelo extrato do sisal nas três concentrações analisadas – 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL diferiram significativamente em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), o que sugere atividade anti-inflamatória. Quando comparado ao controle positivo, somente o extrato do sisal 1,0 mg/mL apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), inferindo que este possui efeito menor do que a Indometacina. Também, nas concentrações de 0,5 e 2,0 mg/mL a atividade anti-inflamatória do Extrato do sisal se mostrou semelhante a Indometacina ($p > 0,05$) (tabela 6).

Parâmetro	CN	CP	0,5 mg/mL	1,0mg/mL	2,0 mg/mL
% da taxa de inibição	0	93,03*	98,10*	84,73* ^Φ	94,88*
EPM	0	0,65	0,06	2,50	1,67

Tabela 6: Média e EPM dos valores de inibição de cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos no teste de retenção de lisossomos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA

one-way seguida do teste *post-hoc* de Tukey. * Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo; ^Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo.

[102] Espraiamento de macrófagos.

[103] Para o espraiamento de macrófagos foi usado o método descrito por Sampaio *et al.* (2001), com modificações. Alíquotas de 100µL de cada suspensão celular do lavado peritoneal a $5,0 \times 10^5$ células/mL, cultivada em meio DMEM high glucose, 10% de soro fetal bovino, e 1% de Penicilina – Estreptomicina, e 1% Anfotericina foram distribuídas sobre lâminas de vidro e deixadas em repouso por 15 minutos a 25°C. A seguir, as lâminas foram lavadas com solução salina estéril para a remoção das células não aderidas e, então, incubadas durante 1 hora à temperatura de 37°C em uma solução contendo 100µL do meio DMEM *high glucose* e 10µL dos diferentes tratamentos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em solução salina estéril e as células aderidas foram fixadas com solução de Glutaraldeído a 2,5% por 5 minutos. Após a fixação, as lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina. Os macrófagos foram fixados novamente com Entellan para o processo de montagem da lâmina permanente. Uma vez prontas, as lâminas foram lidas em microscópio óptico em aumento de 400x, realizando uma contagem total de 100 células e determinados o número e a porcentagem de inibição dos macrófagos espraiados (SAMPAIO *et al.*, 2001).

[104] Para calcular a porcentagem de inibição do espraiamento foi realizado o seguinte cálculo, em triplicata:

$$\% \text{ inibição do espraiamento} = (\%EC - \%ET / \%EC) \times 100\%$$

Sendo: % ET = porcentagem de espraiamento do grupo tratado.

% EC = porcentagem de espraiamento do grupo controle (PERES; CURI, 2005).

[105] Resultados obtidos no teste de espraiamento de macrófagos.

[106] A ANOVA *one-way*, seguido de teste *post-hoc* de Tukey demonstrou que os valores de inibição do espraiamento do controle positivo e do extrato do sisal em todas

as concentrações analisadas, 0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL, possuem diferenças significativas em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Esses dados permitem comprovar a atividade anti-inflamatória do extrato do sisal. Como foi observado nos demais testes da avaliação anti-inflamatória, os valores de inibição de espraçamento do teste não apresentam relação dose dependência nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL do extrato do sisal ($80,74\% \pm 1,88$, $80,24\% \pm 1,58$, $89,07\% \pm 1,68$, respectivamente) (Fig. 9). Já, nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL a atividade anti-inflamatória do extrato do sisal se mostrou semelhante a Indometacina ($p > 0,05$).

[107] Ainda neste ensaio, a ANOVA one-way seguido de teste *post-hoc* de Tukey demonstrou que o extrato do sisal (0,5 mg/mL, 1,0 mg/mL e 2,0 mg/mL) e o controle positivo Indometacina 1,0 mg/mL apresentam diferenças significativas na inibição do espraçamento, quando comparados ao controle negativo ($p < 0,05$), demonstrando a atividade anti-inflamatória do extrato (tabela 7). O extrato do sisal 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL não diferiram significativamente do controle positivo ($p > 0,05$), demonstrando que neste teste ambos apresentaram atividade anti-inflamatória semelhante.

Parâmetro	CN	CP	0,5 mg/mL	1,0mg/mL	2,0 mg/mL
% Inibição de espraçamento	0	81,25*	80,74*	80,24*	89,07* ^Φ
EPM	0	2,26	1,88	1,58	1,68

Tabela 7: Média e EPM dos valores da % de inibição do espraçamento para cada grupo de tratamento em cultura de macrófagos. Onde CN - Controle Negativo, CP - Controle Positivo e o extrato do sisal nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL. ANOVA one-way seguida do teste *post-hoc* de Tukey. * Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo; ^Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo.

[108] Na figura 10, é observada a diferença na morfologia entre os macrófagos não-espraçados e espraçados, obtidas durante a análise das lâminas em microscópio óptico.

[109] Testes de toxicidade *in vivo* do extrato do sisal (ES).

[110] Teste da toxicidade aguda do extrato administrado por via oral.

[111] O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo da OECD 420, com modificações. Foram utilizados somente ratos Wistar fêmeas, sempre com o número máximo de 5 animais por grupo (n=5). O extrato foi administrado por gavagem, em dose única, em um animal de cada vez, a partir de uma concentração inicial de 2000 mg/Kg de peso corpóreo. A dose foi determinada em consideração a classificação da Comunidade Comum Europeia, a qual estabelece como nociva uma substância capaz de promover a morte de 50% de uma população em teste (DL50) após uma administração aguda na dose de 200 a 2000 mg/Kg, a partir dessa concentração, doses sequenciais menores foram administradas para possibilitar a estimativa de uma faixa de DL50, sendo expressa pela quantidade administrada (mg) do extrato por quilo de peso corporal do animal. Como controle negativo, foi utilizado o veículo de dissolução da amostra. Além da análise do peso corporal, a fim de se constatar a manifestação de alguns sinais tóxicos nos animais, referentes ao seu controle motor e da sua consciência, foram avaliados continuamente por período de 4 horas, contados após a administração do extrato e então diariamente, por período de 14 dias com os seguintes parâmetros: frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central e contorções abdominais. No 14º dia de teste, os animais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento da anestesia e alguns órgãos como adrenais, fígado, estômago, rins e coração foram retirados, observados macroscopicamente e pesados. Caso fossem observadas alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos seriam realizados.

[112] No estudo da toxicidade aguda do extrato do sisal, realizado de acordo com o protocolo da OECD 420, com modificações, a administração da dose de 2000 mg/Kg por via oral, em dose única, mostrou-se inócua do ponto de incidência de óbitos, impossibilitando a realização do cálculo de DL50.

[113] Em complemento, na avaliação da manifestação de alguns sinais tóxicos do extrato do sisal, referentes ao controle motor e da consciência, constatou-se que nas primeiras 4 horas após a sua administração alguns animais manifestaram alterações

nos parâmetros relacionados à hiperexcitabilidade do SNC e hipnose. A partir da quarta hora da administração, bem como durante os 14 dias de observação a manifestação desses sinais não foi mais observada. Os demais parâmetros analisados não se mostraram alterados durante os 14 dias de observação. A Tabela 8 mostra os parâmetros que se mostraram alterados durante as primeiras quatro horas após a administração do extrato do sisal na dose de 2000 mg/Kg em dose única.

Aspecto gerais	Tempo de avaliação após a administração				
	30 minutos	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
Hiperexcitabilidade do SNC	0,20	0,20	0,20	0,20	0,00
Hipnose	0,60	0,60	0,80	0,80	0,40

Tabela 8: Parâmetro numérico usado para avaliar a manifestação de alguns aspectos toxicológicos, motores e da consciência decorrentes da administração do extrato do sisal, por via oral, em dose única. A escala varia de 0 a 4, onde 0 significou a ausência de observação do parâmetro analisado e 4 a observação total deste. O n foi de 5 animais por grupo, sendo todos fêmeas, portanto o paramétrico numérico apresentado corresponde ao da média do grupo.

[114] Para finalizar o estudo da toxicidade aguda do extrato do sisal, após 14 dias da sua administração em dose única, os animais foram sacrificados e exames anatomopatológicos macroscópicos das adrenais, fígado, estômago, rins e coração foram realizados. Não existiram diferenças significativas nos aspectos e pesos das estruturas analisadas (tabela 9), configurando ausência da toxicidade aguda do extrato do sisal.

Grupo	Adrenais	Rins	Estômago	Fígado	Coração
Controle	0,121±0,015	1,801±0,125	1,916±0,252	7,944±1,218	0,915±0,125
Extrato do sisal	0,103±0,026	2,049±0,168	1,768±0,202	8,463±1,149	1,064±0,073

Tabela 9: Peso médio dos órgãos (gramas) de ratos Wistar tratados com dose única do extrato do sisal.

[115] Determinação da Atividade Analgésica *in vivo* do extrato do sisal.

[116] Teste da Formalina.

[117] A fim de estabelecer as doses do extrato capazes de reduzir a sensação dolorosa, bem como a relação da dor com o processo inflamatório, a ação analgésica foi avaliada por meio do teste da formalina. O modelo, inicialmente descrito por Dubuison e Dennis (1977), consiste em injetar uma substância irritante, neste caso uma solução de formalina (formaldeído: PBS) na concentração de 2,5% no espaço subcutâneo da pata traseira de ratos, determinando o surgimento de alterações comportamentais que são traduzidas por respostas motoras características que permitem avaliar a intensidade da resposta nociceptiva ao estímulo químico. A resposta foi medida pelo tempo de observação que o animal permaneceu lambendo, agitando e/ou mordendo a pata que se injetou a solução de formalina. No início do tratamento, ratos machos da linhagem Wistar foram aleatoriamente distribuídos em diferentes grupos (n=6/grupo). O grupo controle negativo foi tratado com água destilada, 5 mL/Kg de peso corpóreo. Um grupo controle positivo foi tratado com Indometacina 10 mg/Kg, um anti-inflamatório não esteroide e outro grupo com Tramal na dose de 10 mg/Kg, um analgésico de ação central. Três grupos foram tratados com diferentes doses do extrato do sisal. Todos os tratamentos foram realizados por gavagem. A Indometacina e o Tramal foram administrados uma hora antes da injeção de formalina, e os demais tratamentos 30 minutos antes. Logo após a injeção da solução de formalina os animais foram colocados sob campânulas de vidro e observados individualmente. O tempo que o animal passou lambendo, mordendo e/ou agitando vigorosamente a pata que continha a solução de formalina foi cronometrado durante um período de 30 minutos. Os primeiros 5 minutos correspondem a fase de sensibilidade dolorosa de caráter neurogênico e a partir dos 15 minutos tem-se a fase de sensibilidade dolorosa de caráter inflamatório (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Os resultados foram obtidos comparando o tempo total das alterações comportamentais (lambida, agitação e

mordida na pata) dos grupos tratados com o extrato com os grupos controle, Indometacina e Tramal.

[118] Foram administradas por via oral, três diferentes doses do extrato do sisal: 25, 50 e 100 mg/Kg. Como controle positivo foram utilizados o anti-inflamatório não esteroidal, Indometacina, na dose de 10 mg/Kg, e o anestésico opioide, Tramal, na dose de 10 mg/Kg, também por via oral. O tempo que cada animal demonstrou alguma atividade nociceptiva foi cronometrado e dividido em duas fases. A primeira, durante os 5 primeiros minutos após a injeção de formalina, e a segunda, a partir dos 15 aos 30 minutos posteriores a injeção da substância irritante. O intervalo entre 5 e 15 minutos foi desconsiderado por ser considerado uma etapa de latência entre a fase neurogênica (primeiros 5 minutos) e a fase inflamatória (pós-15 minutos).

[119] Por meio da ANOVA foi analisado o tempo em segundos em que o animal passou lambendo, mordendo e/ou agitando vigorosamente a pata que continha a solução de formalina, e os resultados estão apresentados na Figura 11 na forma de média $\pm$ erro padrão médio (EPM). O teste de Tukey mostrou que somente o Tramal e o extrato do sisal na dose de 25 mg/kg apresentaram diferenças significativas em relação ao controle nas duas fases. Na fase inflamatória o extrato do sisal nas doses de 50 e 100 mg/Kg também reduziram de forma significativa a manifestação dos sinais algícos.

[120] A partir dos dados obtidos foi possível calcular a atividade inibitória (%) do extrato do sisal, da Indometacina e do Tramal sobre a manifestação dos sinais algícos (tabela 10).

Tratamentos (mg/kg)	Fase neurogênica (%)	Fase inflamatória (%)
Tramal – 10	68,34	99,20
Indometacina - 10	18,98	58,34
Extrato do sisal - 25	51,92	71,02
Extrato do sisal - 50	22,60	69,19
Extrato do sisal - 100	25,72	67,26

Tabela 10: Teste da formalina, representando a % de inibição da dor pelos diferentes tratamentos, administrados por via oral, nas duas fases (fase I, dor neurogênica; fase II, dor inflamatória).

[121] Teste de edema de pata por carragenina (EPC).

[122] Neste teste, o efeito anti-inflamatório do extrato do sisal administrado por via oral foi avaliado de acordo com o modelo proposto por Winter, Risley e Nuss, 1962, com algumas adaptações. No início do tratamento, os ratos machos foram aleatoriamente distribuídos em diferentes grupos, (n=6/ grupo). O extrato do sisal foi administrado em três diferentes doses, estabelecidas previamente no Teste da Formalina, empregado na avaliação analgésica. Seguindo as mesmas condições de administração, o grupo controle foi tratado com água destilada e dois grupos controles positivos foram tratados com Indometacina 10 mg/Kg ou Dexametasona 5mg/Kg, administrada por via intraperitoneal. Uma hora após os diferentes tratamentos ocorreu a injeção subplantar na pata posterior direita do animal com 0,1 mL de carragenina a 1%. Para avaliar o efeito anti-inflamatório agudo o volume da pata posterior direita foi mensurado com auxílio do aparelho pletismômetro (INSIGHT, EFF 370) antes da administração da carragenina, bem como nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após a primeira administração de cada tratamento. Para avaliar o efeito anti-inflamatório crônico a administração de cada tratamento foi repetida nos tempos de 24, 48, 72 e 96h após a primeira dose, sendo que a avaliação da inibição do edema ocorreu sempre na hora seguinte. O valor do edema resultou da diferença entre o volume da pata após a injeção com carragenina a 1% (V_f), nos diferentes tempos de avaliação e o volume da pata antes da injeção com carragenina (V_i), ou seja, $V_f - V_i$. A porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = (E_0 - E_T) / E_0 \times 100\%$$

Onde: E_0 representa o valor médio do edema de pata observado no grupo controle e o E_T representa o valor médio do edema de pata observado nos grupos tratados.

[123] No teste do edema de pata por carragenina a atividade anti-inflamatória aguda, foi determinada nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após a aplicação de carragenina e a atividade anti-inflamatória crônica foi observada repetindo-se os tratamentos por via oral nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após a primeira administração e mensurada 1 hora depois (Fig. 11).

[124] Por meio da ANOVA o valor médio do edema foi calculado para todos os grupos, tanto para a atividade anti-inflamatória aguda (Fig. 12), como a atividade anti-inflamatória crônica (Fig. 13) e foi possível observar que a partir da segunda hora a Dexametasona e o extrato do sisal nas doses de 25 e 50 mg/Kg reduziram o edema de pata de forma significativa em relação ao grupo controle em todas as horas analisadas, tanto na fase aguda, como crônica, exceto para o extrato do sisal na dose de 50 mg/Kg, nas 72 horas após a primeira administração. Sendo que o valor do edema foi obtido por meio da diferença $V_f - V_i$, onde V_f indica o volume da pata nos diferentes tempos de avaliação e V_i o volume da pata antes da injeção com carragenina.

[125] As tabelas 11 e 12 apresentam a porcentagem de inibição do edema promovida por cada tratamento nas fases aguda e crônica. A porcentagem de inibição foi calculada a partir da fórmula $(E_0 - E_T)/E_0$, onde E_0 é o valor médio do edema do grupo controle para cada tempo e E_T o valor médio do edema para cada grupo no respectivo tempo de avaliação.

Tratamentos (mg/kg)	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas
Dexametasona – 5	21,87%	52,64%	72,77%	73,77%
Indometacina - 10	31,66%	51,54%	63,44%	43,67%
Extrato do sisal - 25	2,08%	42,73%	47,19%	56,60%
Extrato do sisal - 50	24,16%	52,86%	65,67%	55,87%
Extrato do sisal - 100	-5,83%	22,46%	44,71%	42,85%

Tabela 11: Porcentagem de inibição do edema de pata decorrente de cada tratamento, realizado por via oral, para a atividade anti-inflamatória aguda.

Tratamentos (mg/kg)	24 hora	48 horas	72 horas	96 horas
---------------------	---------	----------	----------	----------

Dexametasona – 5	-19,04%	86,11%	43,01%	56,34%
Indometacina - 10	48,48%	55,88%	16,91%	-11,11%
Extrato do sisal - 25	76,19%	80,39%	85,29%	84,12%
Extrato do sisal - 50	67,53%	80,39%	60,29%	53,96%
Extrato do sisal - 100	34,19%	37,25%	-1,47%	-14,28%

Tabela 12: Porcentagem de inibição do edema de pata decorrente de cada tratamento, realizado por via oral, para a atividade anti-inflamatória crônica.

[126] Teste do edema de orelha (TEO).

[127] Neste teste, o efeito anti-inflamatório do extrato do sisal administrado por via oral foi avaliado em ratos machos (n=6 por grupo) conforme modelo descrito por Tubaro e colaboradores (1986), com modificações. O edema foi induzido na orelha direita de cada rato pela aplicação tópica, em ambas as superfícies, de 20 µL da suspensão de óleo de cróton diluído em solução de acetona 70% na orelha direita, em uma concentração de 5% (v:v). A orelha esquerda foi tratada apenas com o veículo. Uma hora antes da indução do edema na orelha, o extrato foi administrado em três diferentes doses estabelecidas na avaliação analgésica. Seguindo as mesmas condições de administração, o grupo controle foi tratado com água destilada e os grupos controles positivos foram tratados com Indometacina 10 mg/Kg ou Dexametasona 5 mg/Kg (esta foi administrada por via intraperitoneal). Após 5 horas, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia e fragmentos de 7 mm de diâmetro foram retirados de cada orelha. O edema induzido pelo óleo de cróton foi avaliado pela diferença de peso entre as orelhas.

[128] A porcentagem de inibição foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = (E_0 - E_T) / E_0 \times 100\%$$

Onde: E_0 representa o valor médio do edema de orelha observado no grupo controle e o E_T representa o valor médio do edema de orelha observado no grupo tratado.

[129] O teste do edema de orelha também foi empregado para a avaliação da atividade anti-inflamatória. A figura 14 apresenta a média $\pm$ EPM da diferença de peso entre as orelhas direita e esquerda de cada tratamento, por via oral. Os valores apresentados foram analisados por meio da ANOVA. O teste de Tukey mostrou que nesta avaliação, somente a Dexametasona reduziu o edema de orelha de forma significativa.

[130] A tabela 13 mostra a porcentagem de inibição do edema de orelha segundo a fórmula $(E_0 - E_T)/E_0$, onde E_0 é o valor médio do edema do grupo controle e E_T o valor médio do edema para cada grupo de tratamento.

Tratamento (mg/g)	% Inibição do edema
Indometacina – 10	16,86
Dexametasona – 5	89,31
Extrato do sisal – 25	10,04
Extrato do sisal – 50	3,17
Extrato do sisal – 100	61,57

Tabela 13: Porcentagem de inibição do edema de orelha decorrente de cada tratamento em relação a diferença de peso média entre as orelhas.

[131] Determinação da Atividade Anti-inflamatória da formulação contendo extrato do sisal.

[132] Na avaliação também foram empregados os testes de edema de pata por carragenina e de edema de orelha. Os protocolos experimentais obedeceram aos mesmos critérios estabelecidos para a administração por via oral do extrato do sisal. Entretanto, nesta etapa o efeito anti-inflamatório do creme do extrato foi avaliado após aplicação de 50 mg da formulação por via tópica, nas concentrações de 10 ou 50 mg/g. O creme enriquecido com o extrato foi friccionado na pata ou orelha, dependendo do teste, por 30 segundos. O mesmo procedimento foi realizado com o grupo controle negativo que recebeu somente o creme base, e os grupos positivos que receberam formulações de Indometacina, 25 mg/g ou de Dexametasona, 1 mg/g. No teste de edema de orelha estas formulações foram diluídas em solução de acetona.

[133] Ainda para avaliar a atividade anti-inflamatória dos cremes enriquecidos com o extrato do sisal a quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi realizada de acordo com Brandley e colaboradores (1982), com algumas modificações. Os fragmentos do tecido inflamado do coxim plantar dos ratos foram retirados com auxílio de uma tesoura cirúrgica, imediatamente pesados e colocados sobre refrigeração ou no gelo para a adição da solução tampão fosfato de potássio (50mM, pH 6, com 0,5% de brometo de hexadecil-trimetilamônio) na relação de 100 mg de tecido para cada 1 mL de solução tampão. As amostras de tecido foram homogeneizadas em triturador IKA (Disperser T 10 basic, Staufen, Germany) e posteriormente centrifugadas por 10 minutos 12.000 rpm a 4°C. Em placa de 96 poços, pipetou-se 30µL do sobrenadante da amostra em duplicata/triplicata e, em seguida, 270µL de tampão substrato (0,167 mg/mL de orto-dianisina - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA - e 0,002% de H₂O₂ - Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil - em tampão fosfato) foram adicionados à preparação. Para o branco utilizar 270 µL do tampão substrato. A placa foi incubada a 37°C, por 5 minutos. A leitura foi realizada a 450nm em espectrofotômetro UV-Vis (800 XI, FEMTO, Brasil).

[134] A partir da verificação das atividades anti-inflamatória e analgésica do extrato do sisal e análise do desempenho de cada dose, foram produzidas duas formulações enriquecidas com o extrato, nas concentrações de 10 mg/g e de 50 mg/g. Essas emulsões foram comparadas com formulações contendo Dexametasona (1mg/g) e Indometacina (10mg/g) nos modelos inflamatórios.

[135] A investigação da ação anti-inflamatória seguiu os mesmos princípios utilizados nos testes de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de Cróton, porém em cada teste, o creme empregado para o respectivo grupo (n=6) foi friccionado sobre a pata ou orelha dos animais durante 30 segundos.

[136] A figura 15 mostra os valores médios do edema de pata gerado para cada grupo na fase aguda, e na figura 16, para a fase crônica. A ANOVA revela que todos os tratamentos reduziram o edema de pata em relação ao grupo controle. De acordo com o teste de Tukey, na fase aguda, em todos os tempos analisados, essa redução foi significativa para os dois grupos tratados com o creme enriquecido com o extrato do

sisal, nas concentrações de 10 e 50 mg/g. Já, na fase crônica, a redução foi significativa, em relação ao grupo controle, somente na concentração de 10 mg/g, exceto nas 72 horas após a primeira administração.

[137] Os valores médios do edema foram utilizados para calcular a porcentagem de inibição de cada tratamento em relação ao grupo controle, segundo a fórmula $(E_0 - E_T)/E_0$, onde E_0 é o valor médio do edema do grupo controle para cada tempo e E_T o valor médio do edema para cada grupo no respectivo tempo de avaliação (tabelas 14 e 15).

Tratamento (mg/g)	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas
Creme Dexametasona – 1	36,95%	26,31%	35,18%	28,57%
Creme Indometacina – 10	47,82%	64,91%	31,48%	11,90%
Creme com extrato do sisal – 10	43,43%	50,87%	31,48%	26,19%
Creme com extrato do sisal – 50	67,39%	52,63%	46,29%	28,57%

Tabela 14: Porcentagem de inibição do edema de pata decorrente de cada tratamento, realizado por via tópica, para a atividade anti-inflamatória aguda.

Tratamento (mg/g)	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Creme Dexametasona – 1	32,14%	44%	77,77%	75,00%
Creme Indometacina – 10	71,42%	68%	33,33%	41,66%
Creme com extrato do sisal – 10	107,14%	88%	61,11%	75,00%
Creme com extrato do sisal – 50	42,85%	52%	44,44%	50,00%

Tabela 15: Porcentagem de inibição do edema de pata decorrente de cada tratamento, realizado por via tópica, para a atividade anti-inflamatória crônica.

[138] No teste de edema de orelha a média $\pm$ EPM da diferença de peso entre as orelhas direita e esquerda de cada tratamento, por via tópica, está apresentada na figura 17. Os valores apresentados foram obtidos por meio da ANOVA e revelaram que todos os tratamentos reduziram o edema de orelha. O teste de Tukey mostrou que para todos os tratamentos as diferenças foram significativas em relação ao grupo controle.

[139] Os valores médios dos edemas gerados foram, então, utilizados para o cálculo da porcentagem de inibição do edema, para cada grupo tratado, em relação ao grupo controle (tabela 16). Para isto, foi utilizada a fórmula $(E_0 - E_T)/E_0$, onde E_0 é o valor médio do edema do grupo controle para cada tempo e E_T o valor médio do edema para cada.

Tratamento (mg/g)	% Inibição do edema
Creme Dexametasona – 1	77,79
Creme Indometacina – 10	56,97
Creme com extrato do sisal – 10	51,16
Creme com extrato do sisal – 50	50,46

Tabela 16: Porcentagem de inibição do edema de orelha decorrente de cada tratamento, realizado por via tópica, em relação as diferenças de peso médias entre as orelhas por grupo.

[140] Para a dosagem da enzima mieloperoxidase, foi empregado o modelo de edema de pata por carragenina, a fim de induzir a inflamação e estimular a migração leucocitária. As emulsões foram aplicadas e friccionadas durante 30 segundos sobre a pata dos animais e, 1 hora após, foi realizada a injeção de carragenina.

[141] A figura 18 mostra, por meio da ANOVA, que os tratamentos com os cremes enriquecidos com o extrato do sisal, nas concentrações de 10 e 50 mg/g, promoveram redução na concentração da enzima mieloperoxidase. O teste de Tukey revela que a redução foi significativa para os dois tratamentos em relação ao grupo controle.

[142] Determinação das concentrações de saponinas e sapogeninas presentes no extrato do sisal.

[143] A fim de se avaliar a relação dos efeitos anti-inflamatórios do extrato com a presença de saponinas, este metabólito foi avaliado mediante análise espectrofotométrica, de acordo com as recomendações da literatura (VIGO; NARITA; MARQUES, 2003).

[144] A análise foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis. Uma alíquota de 1 mL do extrato foi adicionada em 1 mL do reagente cromogênico cloreto de cobalto 0,2% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. A leitura da solução ocorreu em 284nm após 20 minutos do início da reação para verificação das absorbâncias. Como padrão positivo foi empregada a saponina padrão solubilizada em água na concentração de 0,3 mg/mL.

[145] A detecção das sapogeninas presentes no extrato foi realizada por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Este procedimento foi realizado em parceria com a Divisão de Química de Produtos Naturais (CPQBA / Unicamp).

[146] Nesta análise, o extrato (aproximadamente 10 mg) foi dissolvido em 1 mL de metanol (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil) e 10 µL desta solução foi diluída em 990 µL de uma mistura de Metanol/H₂O (1:1) com 0,1 % de ácido fórmico (99%) (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil). A solução da amostra foi injetada por inserção direta via bomba seringa no espectrômetro de massas de configuração ESI-Obitrap (Q Exactive, Thermo Scientific, Alemanha). O tempo total para aquisição de cada espectro foi fixado em 1 minuto. Os espectros ESI-MS bem como os de ESI-MS/MS foram adquiridos no modo positivo de ionização; os espectros de full scan foram adquiridos na faixa de m/z 150 a 1800 e os espectros de ESI-MS/MS foram adquiridos em m/z 50 até um valor pouco acima do íon em estudo e com energia de colisão de 10 - 40 eV.

[147] As condições gerais de operação do espectrômetro foram: voltagem do spray de 3500 V, temperatura do capilar de 320 °C, pressão do sheath gas de 10 psi e nível de RF da S-Lens de 50 V.

[148] Os espectros foram tratados com o software Xcalibur 2.1.0 (Thermo Scientific, Alemanha), específico do espectrômetro de massas.

[149] Os experimentos foram finalizados com o estudo fitoquímico, no qual foi determinada a concentração de saponinas presentes na EHA, realizando leituras das absorbâncias em espectrofotômetro na faixa de 284 nm. Para o cálculo desta concentração foi empregada a equação da reta estabelecida pela curva de regressão linear com a saponina padrão – Merck, realizada nas doses de 0,08 a 0,28 mg/mL (Fig. 19).

[150] O extrato do sisal foi analisado na concentração de 0,25 mg/mL, e o teor de saponinas encontrado foi de 0,12 mg/mL, ou seja, este extrato possui uma concentração proporcional de saponinas de 48%.

[151] Após a detecção das saponinas no extrato, deu-se sequência à caracterização das sapogeninas presentes no extrato do sisal por emprego da espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Os resultados obtidos confirmaram a presença da hecogenina e tigogenina (Fig. 20). Também, os inúmeros picos gerados indicam a presença de outros metabólitos secundários nesta fração.

[152] A tabela 17 descreve a massa experimental da Tigogenina e Hecogenina, obtidas na análise do extrato do sisal por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS). Para fins de comparação, na referida tabela também constam as massas moleculares teóricas das respectivas sapogeninas.

Composto	Fórmula Molecular	Massa Teórica [M+ H] ⁺	Massa Experimental [M+ H] ⁺	Erro (ppm)
Tigogenina	C ₂₇ H ₄₅ O ₃	417,33678	417,33573	1,41
Hecogenina	C ₂₇ H ₄₃ O ₄	431,31613	431,31545	0,31

Tabela 17: Massa das moléculas de hecogenina e tigogenina presentes no extrato do sisal e obtidas por espectrometria de massas com alta resolução (HRESI-MS)

[153] Em relação à análise estatística, cabe ressaltar que os resultados foram expressos por média ± EPM (Erro Padrão Médio). As análises estatísticas foram realizadas por intermédio do software BioEstat 5.0 (Instituto Mamirauá, Tefe, AM, Brasil). Em todos os testes o nível de significância foi de 5%.

[154] Em todos os testes, os dados foram submetidos à ANOVA *one-way*, tendo como fator independente o tratamento, exceto para o teste do MTT, cujos dados foram submetidos a ANOVA *two-way*, tendo como fatores independentes o tratamento e o tempo. Quando apropriado, foram realizadas teste *post-hoc* de Tukey.

[155] No teste de exclusão do azul de Trypan, como a normalidade não foi confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste *post-hoc* de Student-Newman-Keuls.

[156] A partir do exposto, é notável a contribuição técnica da presente invenção, que disponibiliza uma formulação de administração tópica, em duas variações contendo extrato de *Agave sisalana* na proporção de 1 ou 5%, ativo proveniente do resíduo do sisal, e com atividade anti-inflamatória, analgésica e reparadora, associada à ureia, para ser usada em afecções dos pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras.

REIVINDICAÇÕES

1. **CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL) caracterizado por** ser constituído de uma fase oleosa (A), compreendendo 19,05% p/p da formulação; uma fase aquosa (B), compreendendo 80,95% p/p da formulação e possuir como agente ativo, o extrato hidroalcoólico do sisal (*Agave sisalana*), numa proporção de 1 ou 5% p/p da formulação, com concentração de 0,1g/ml em etanol 95%, em associação à ureia, numa proporção de 10% p/p da formulação, estando esses componentes presentes na fase aquosa.
2. **CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL),** de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** fase oleosa (A) e fase aquosa (B) compreenderem:
 - ✓ Fase Oleosa (A): base auto-emulsionante não-iônica, numa proporção de 10% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregada cera Paramul J (álcool cetosteárico à 70% e seu derivado etoxilado a 30%); emoliente primário ou auxiliar, numa proporção de 5% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado miristato de isopropila (éster de alta pureza, uma mistura de ésteres de álcool isopropílico com ácidos graxos saturados, principalmente o ácido mirístico); emoliente e hidratante, numa proporção de 4% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregada vaselina líquida (óleo mineral); conservante, numa proporção de 0,05% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado Nipazol (propil parabeno);
 - ✓ Fase Aquosa (B): hidratante do tipo umectante, numa proporção de 5% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado propilenoglicol (propano-1,2-diol, composto orgânico classificado como álcool diol); agente ativo hidratante, queratolítico e antibacteriano, numa proporção de 10% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado ureia;

agente ativo natural, numa proporção de 1 ou 5% p/p da formulação , sendo empregado extrato hidroalcólico do sisal (*Agave sisalana*); conservante, numa proporção de 0,1% p/p em relação à massa da formulação, sendo empregado Nipagin (metil parabeno); veículo, qsp 100%, sendo empregada água destilada.

3. **CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL)**, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, **caracterizado por** ser disponibilizado em duas variações: uma compreendendo 1% p/p da formulação de extrato hidroalcólico do sisal (*Agave sisalana*), como agente ativo natural e, a outra compreendendo 5% p/p da formulação de extrato hidroalcólico do sisal (*Agave sisalana*), como agente ativo natural.
4. **USO DE CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL)**, conforme descrito na reivindicação 1, **caracterizado por** ser tópico.
5. **USO DE CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL)**, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** ser como anti-inflamatório, analgésico e reparador para a região dos pés.
6. **USO DE CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL)**, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** ser em afecções dos pés, tais como fascite plantar, ressecamento e/ou rachaduras.

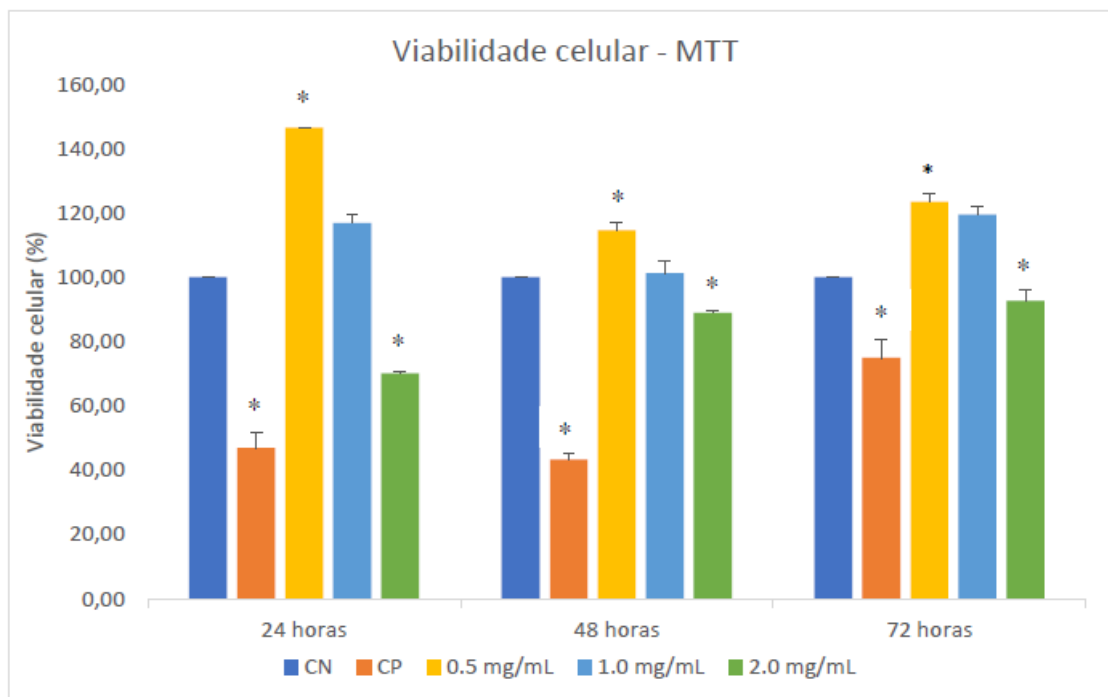


FIG. 1

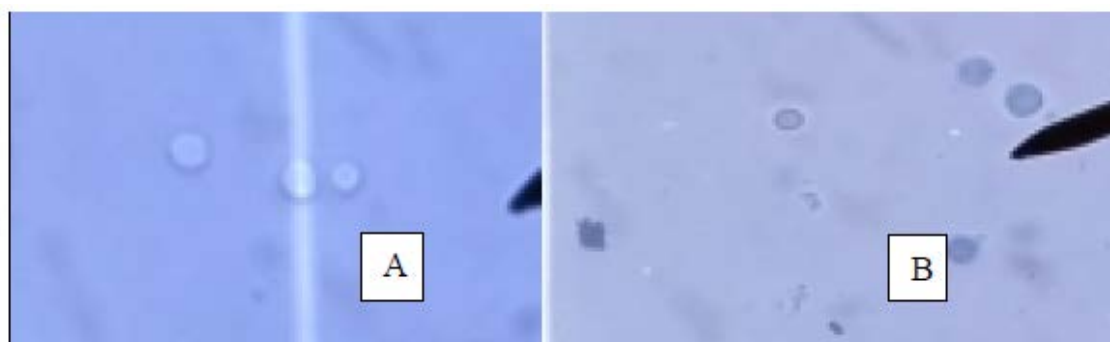
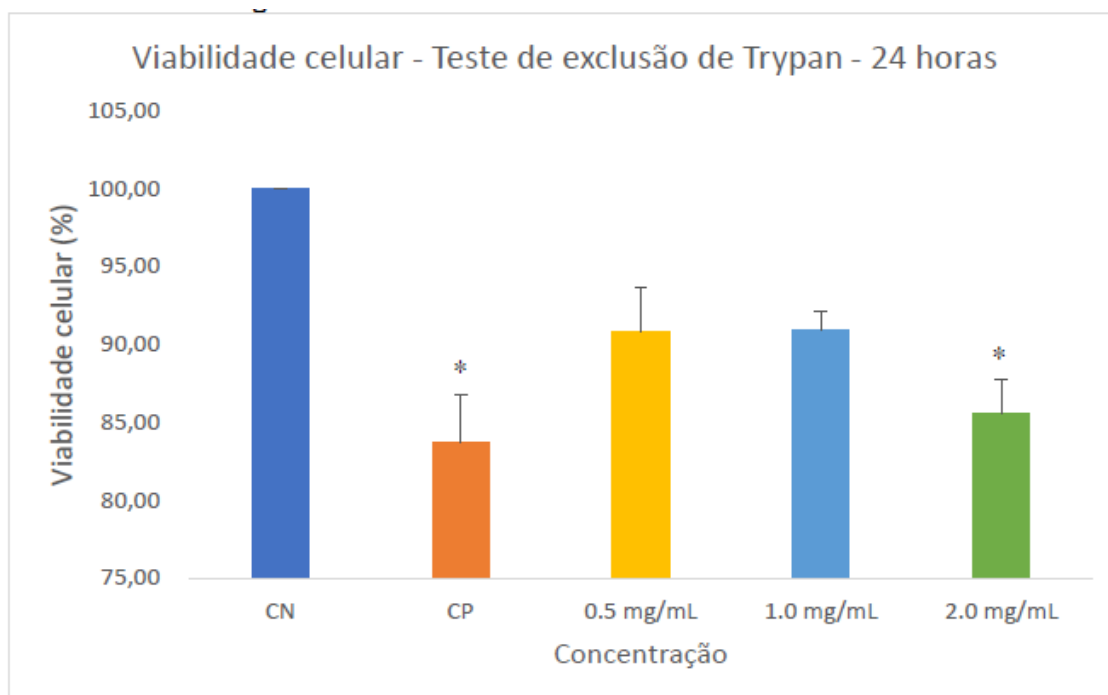
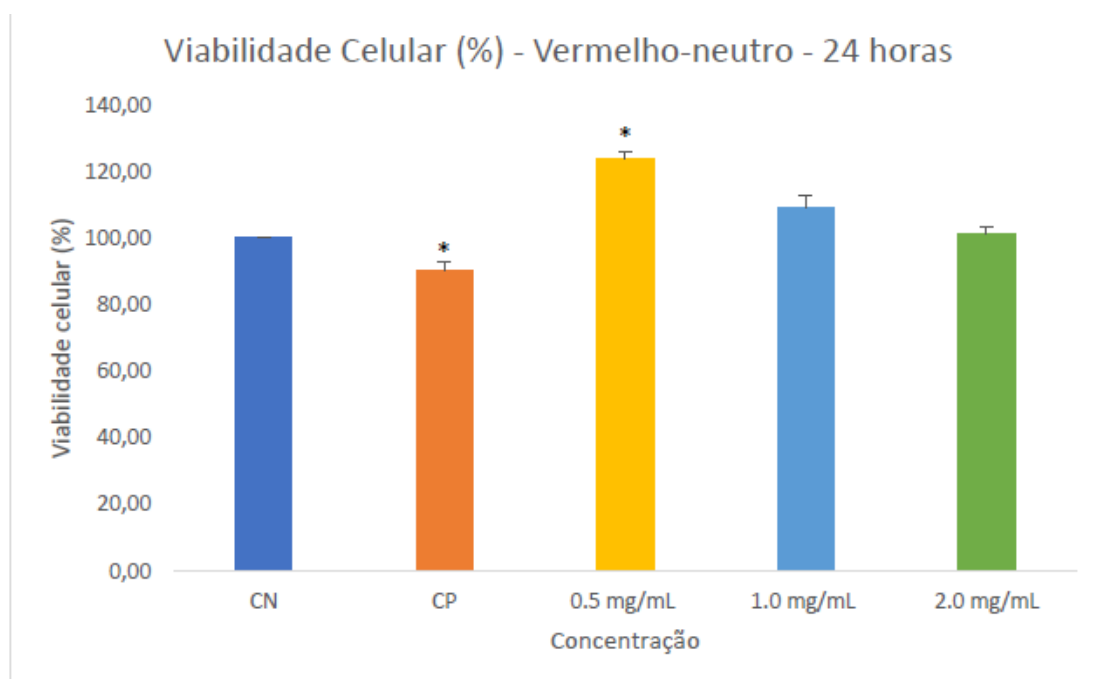


FIG. 2



* Valores significativos para $p < 0.05$.

FIG. 3



* Valores significativos para $p < 0,05$.

FIG. 4

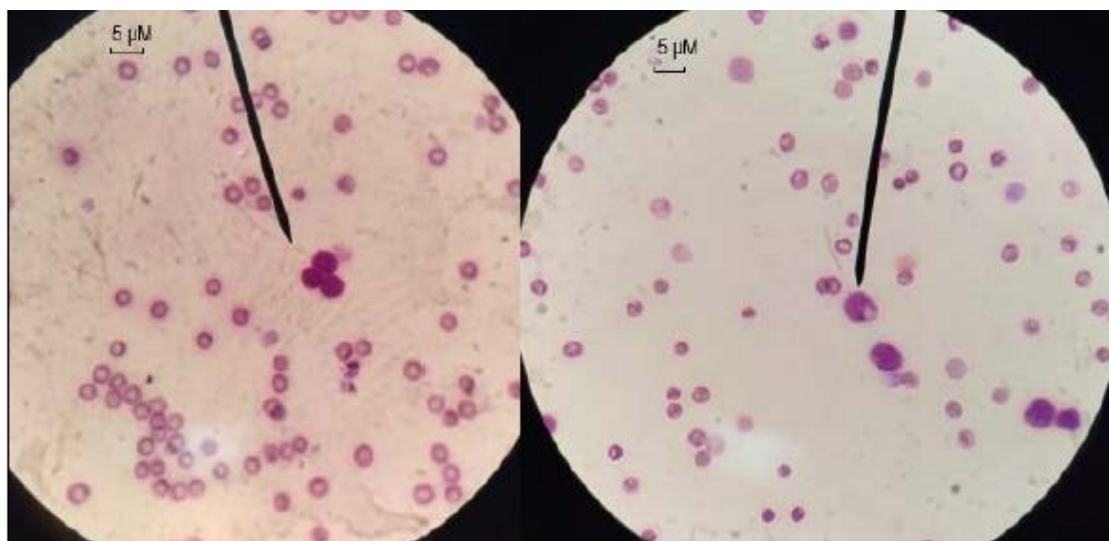


FIG. 5

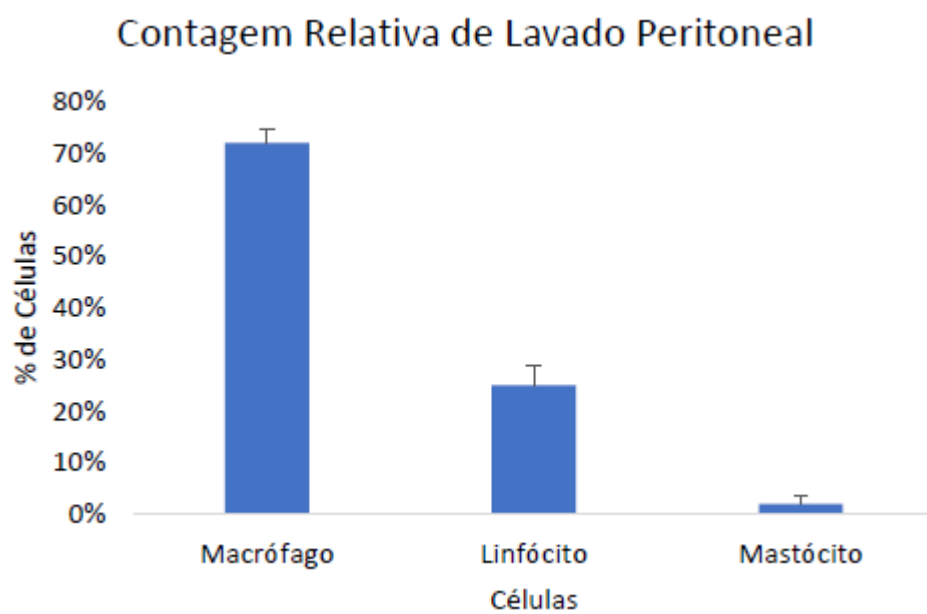
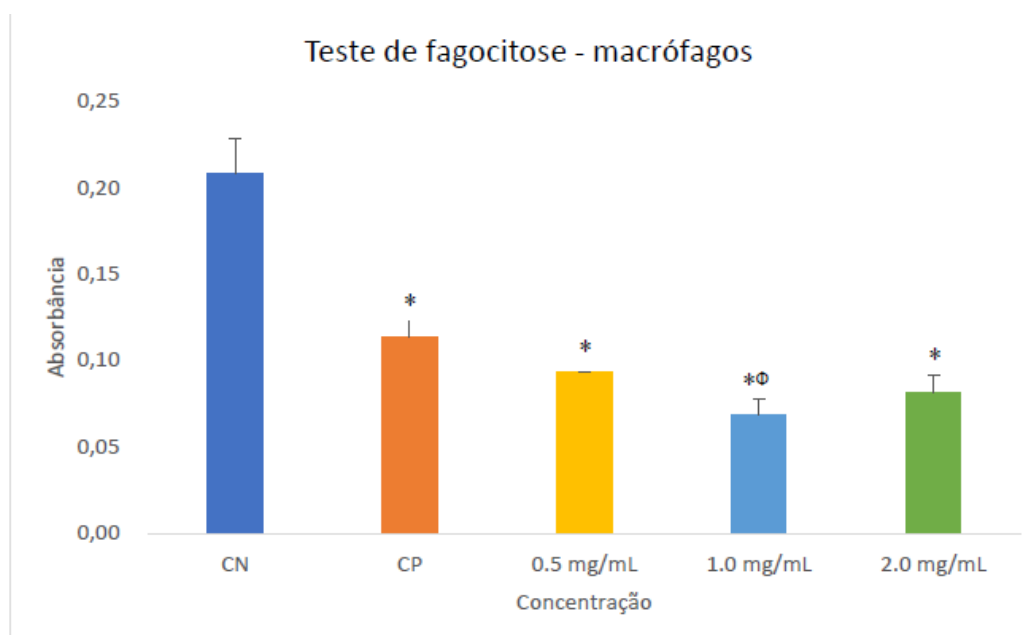


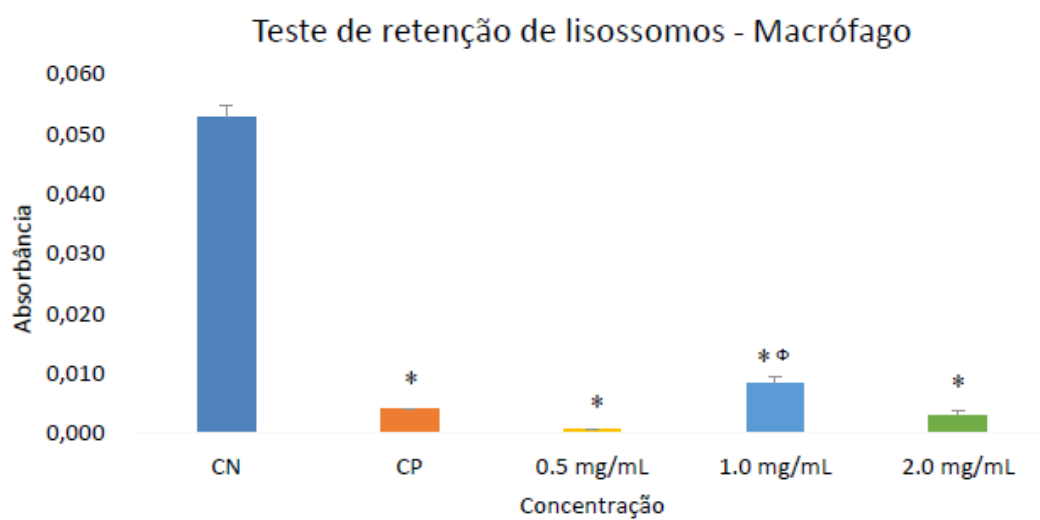
FIG. 6



* Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

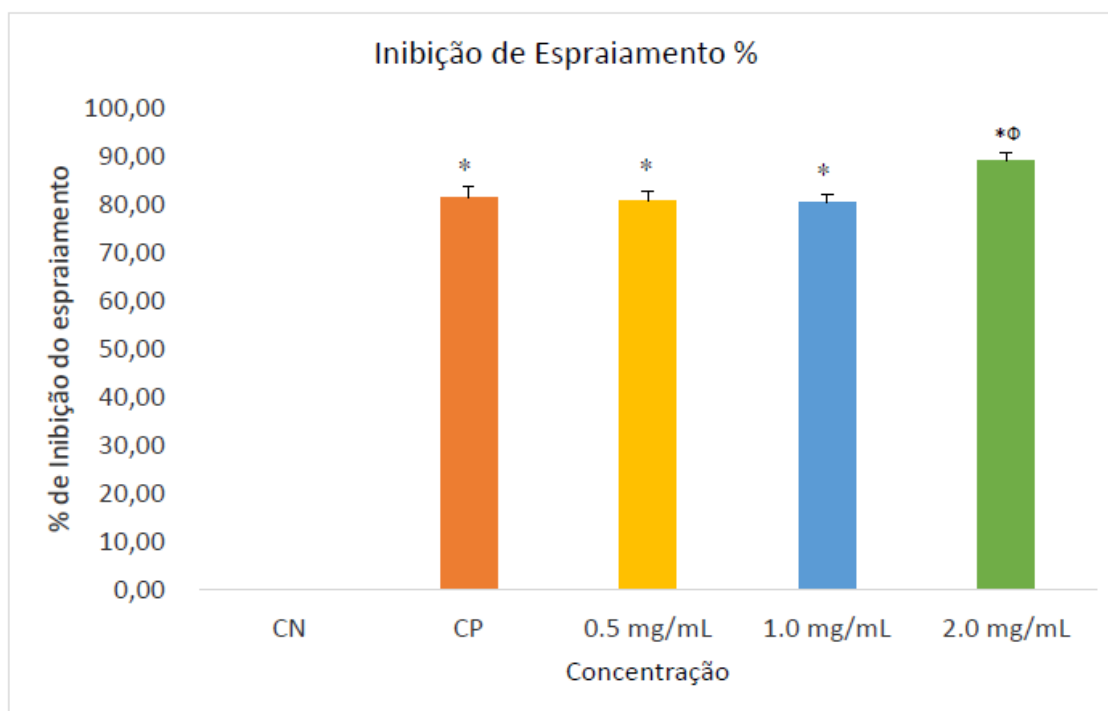
FIG. 7



* Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

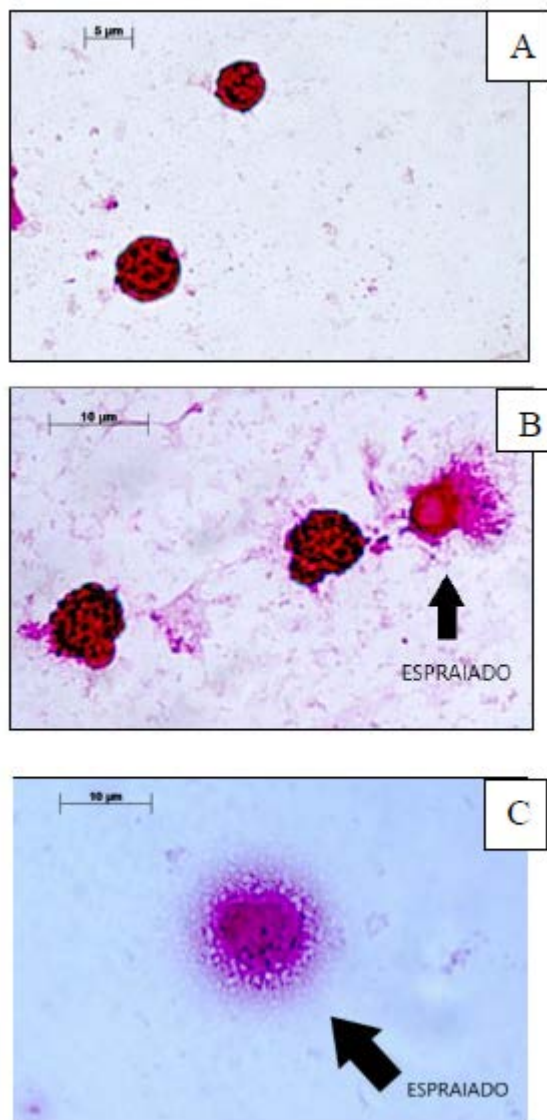
FIG. 8



* Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle negativo

Φ Valores significativos para $p < 0,05$ quando comparado com controle positivo

FIG. 9

**FIG. 10**

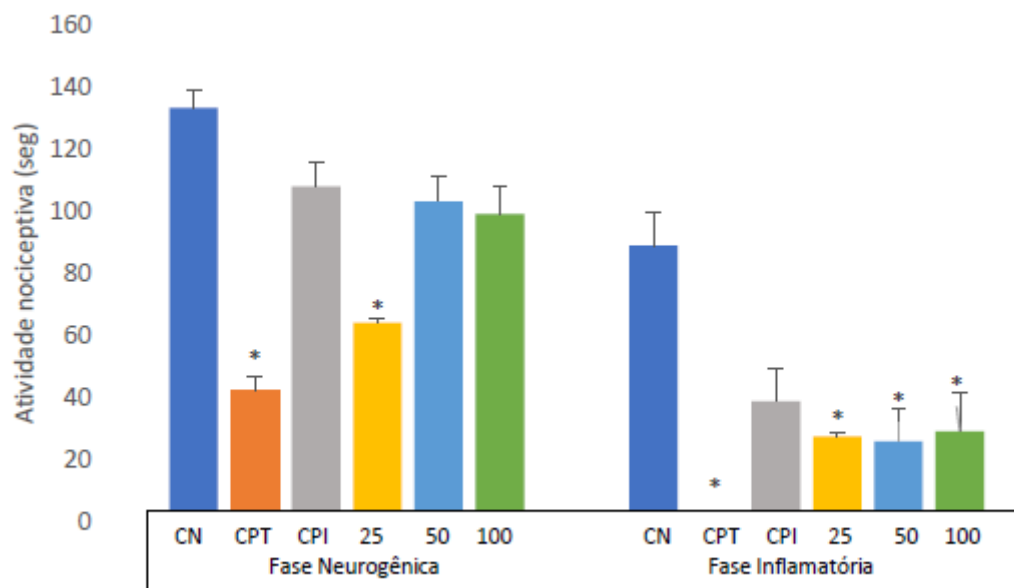


FIG. 11

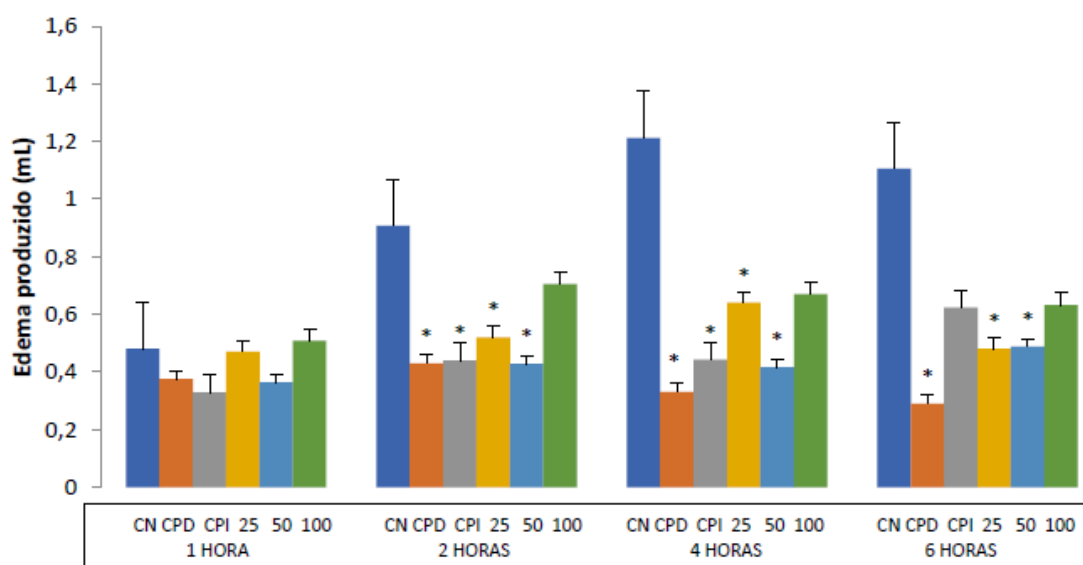


FIG. 12

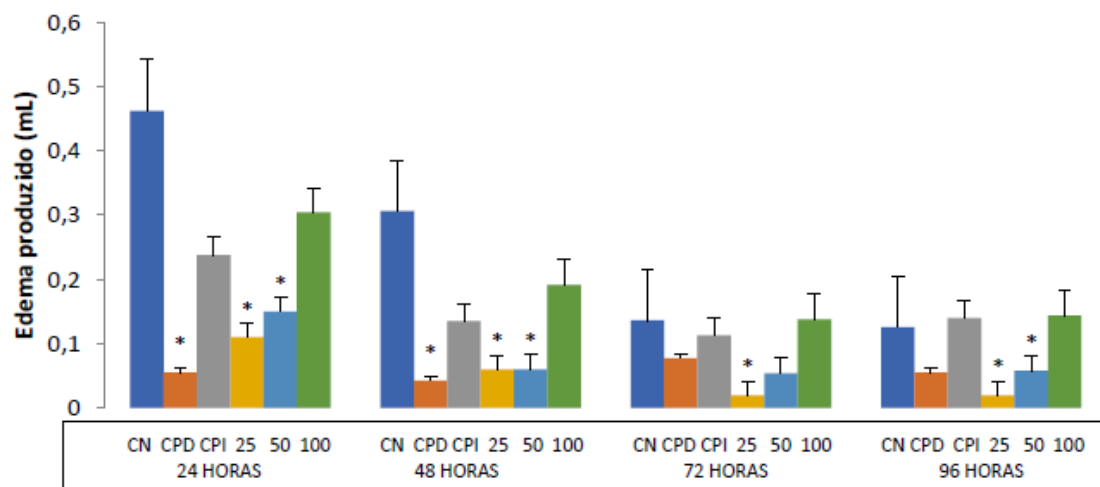


FIG. 13

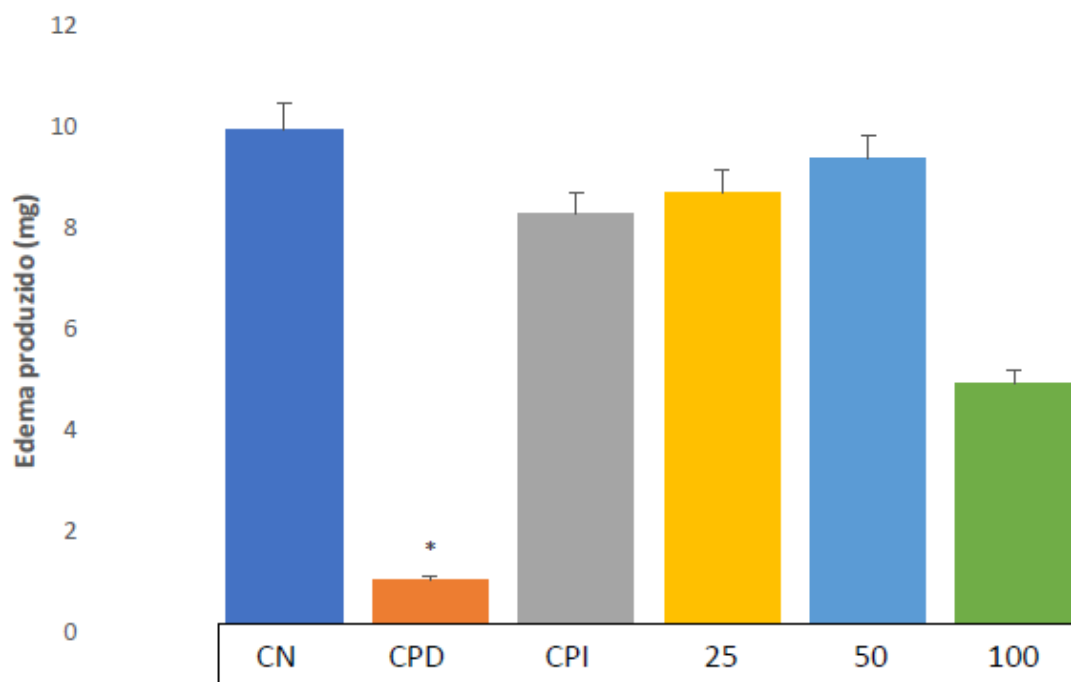


FIG. 14

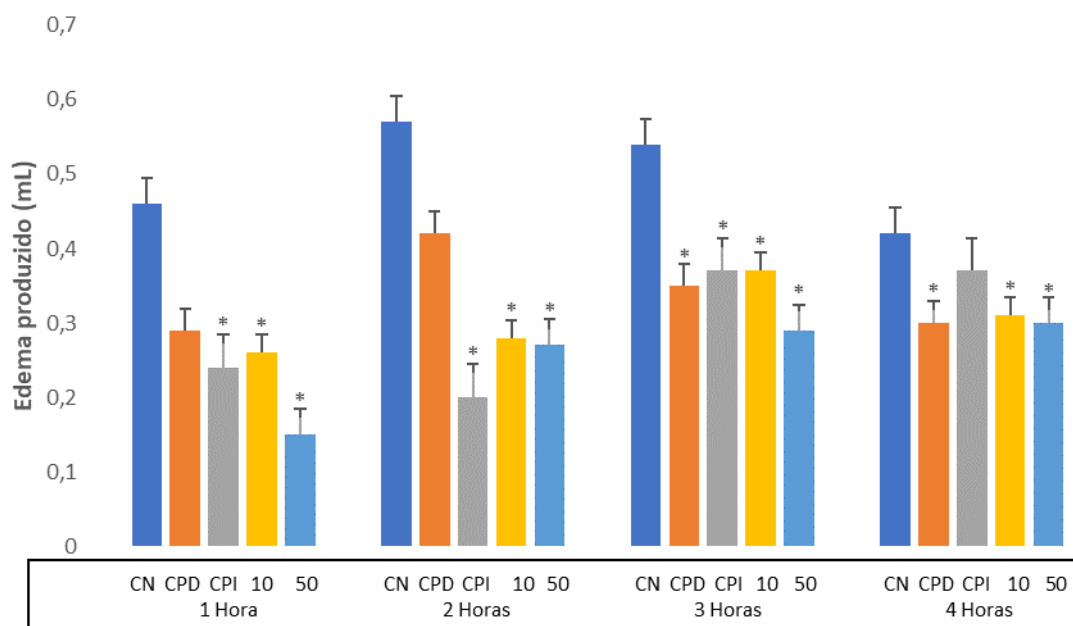


FIG. 15

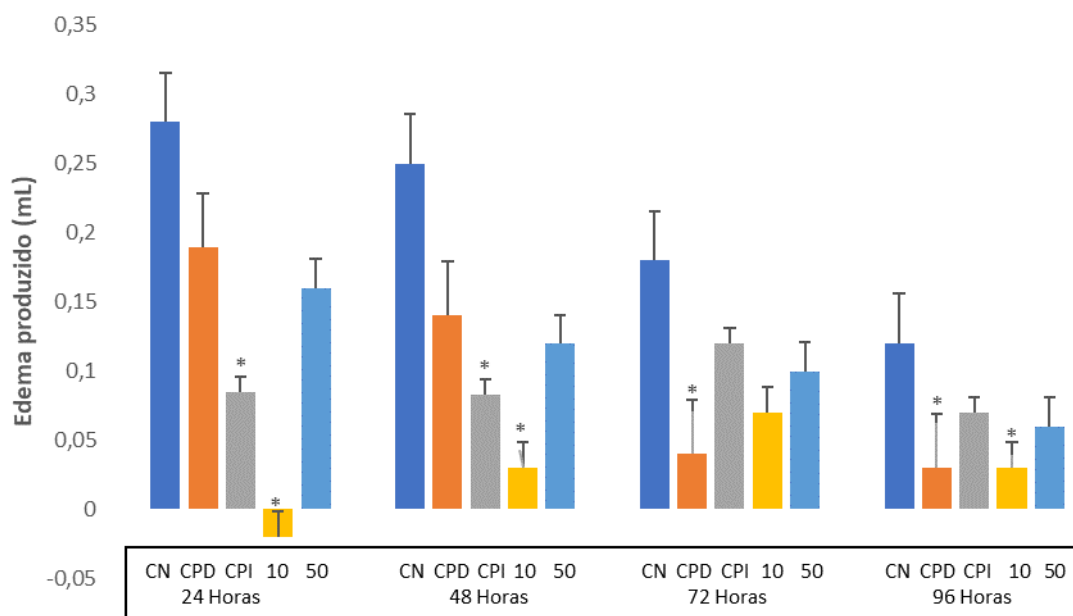
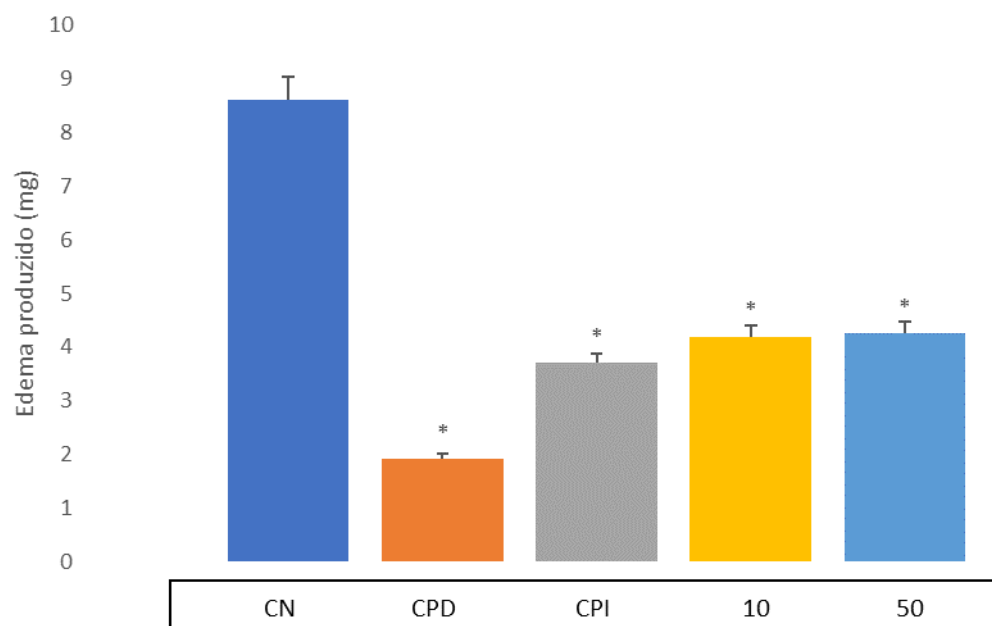
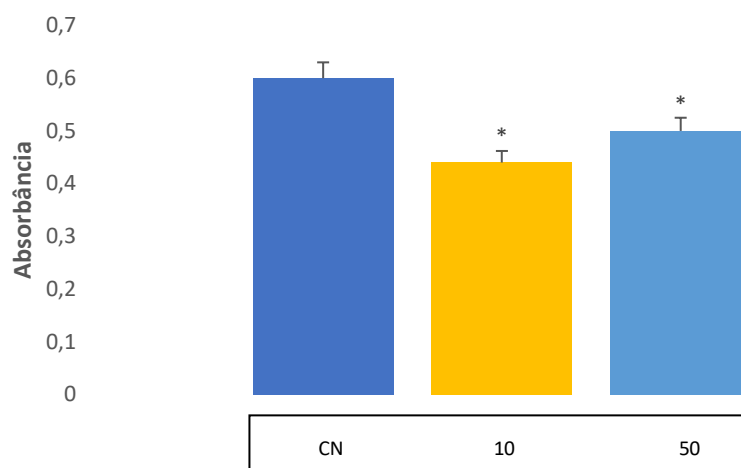


FIG. 16

**FIG. 17****FIG. 18**

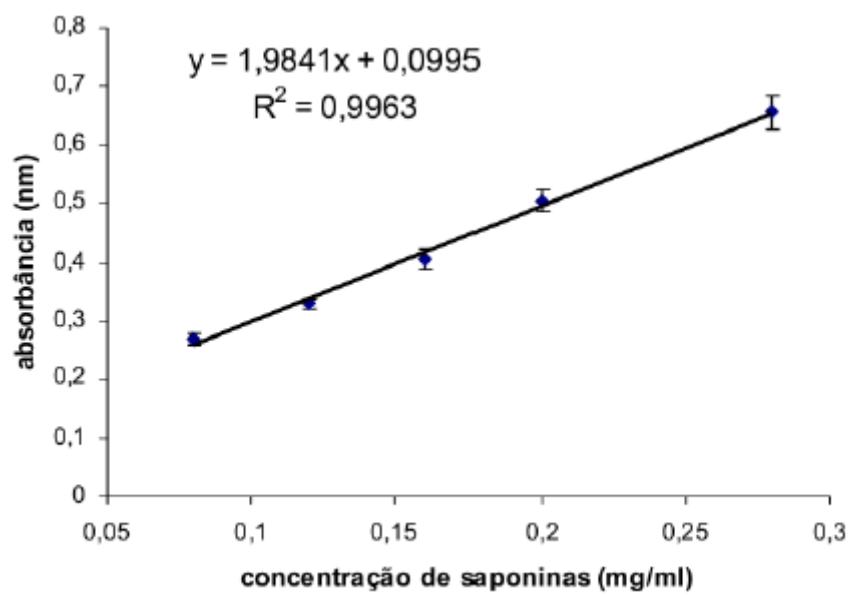
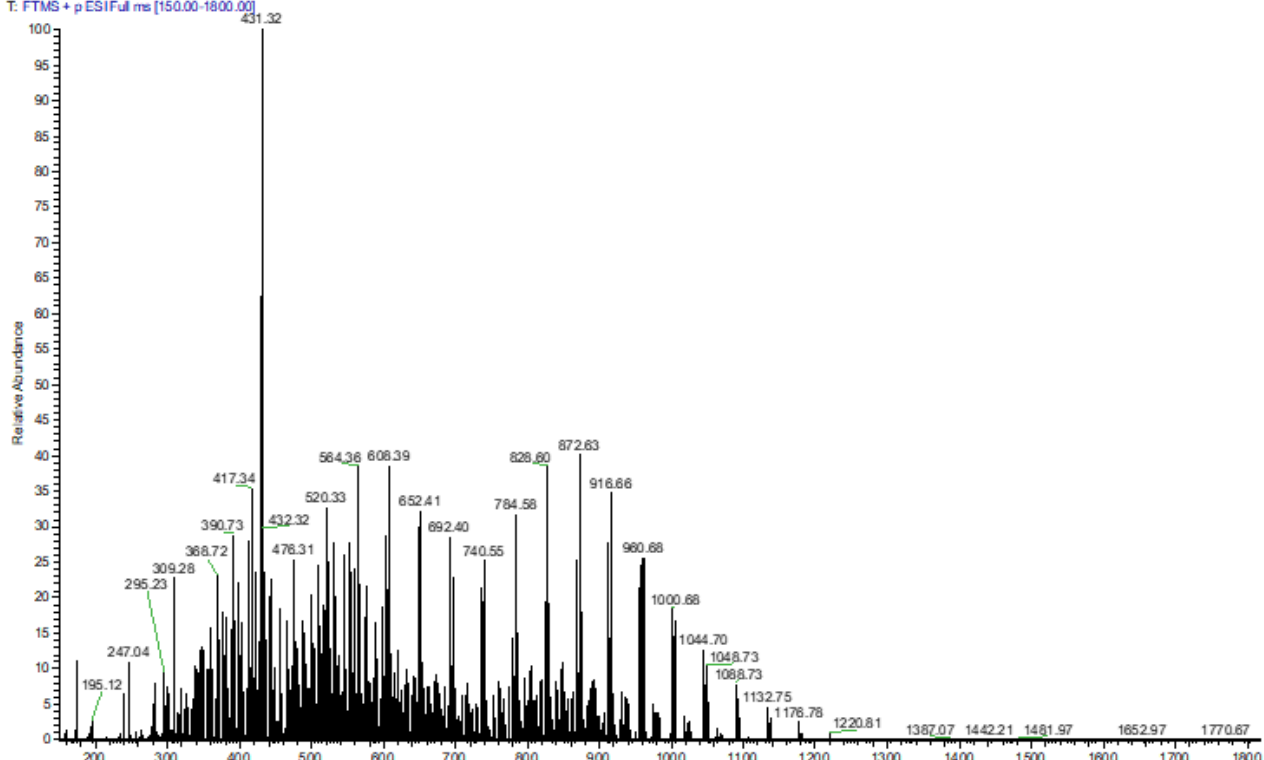


FIG. 19

060915-FAEHA #1154-1276 RT: 2.69-2.98 AV: 123 SB: 101 0.52-0.75 NL: 1.25E7
T: FTMS + p ESIFull ms [150.00-1800.00]



060915-FAEHA #1154-1276 RT: 2.69-2.98 AV: 123 SB: 101 0.52-0.75 NL: 1.25E7
T: FTMS + p ESIFull ms [150.00-1800.00]

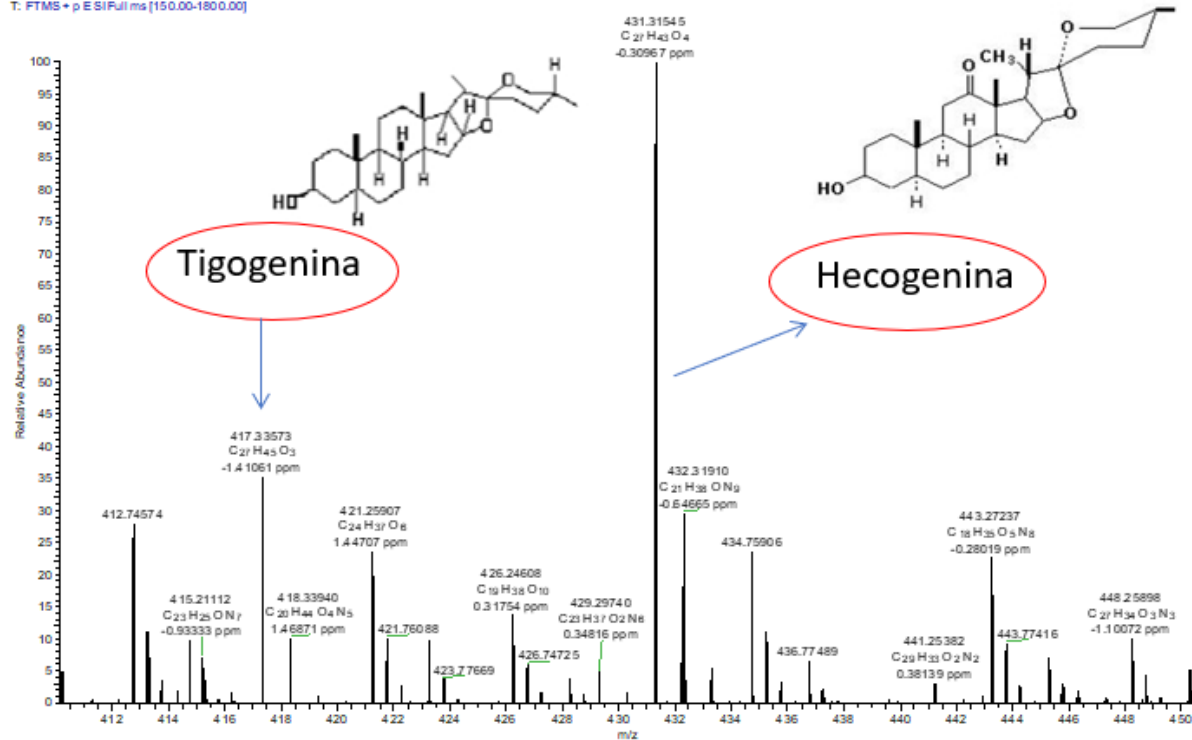


FIG. 20

RESUMO

CREME ANTI-INFLAMATÓRIO, ANALGÉSICO E REPARADOR PARA PÉS, CONTENDO EXTRATO DE *Agave sisalana* (SISAL) E SEU USO.

A presente invenção se refere a uma formulação tópica de creme anti-inflamatório, analgésico e reparador para pés, contendo como ativo extrato de *Agave sisalana* (sisal), associado à ureia, para ser usada em afecções dos pés, em lesões associadas à inflamação, como a fascite plantar, e à desidratação, como as rachaduras, sendo obtida por meio de processo de baixo impacto ambiental e cujo ativo é proveniente do resíduo do sisal, uma fonte renovável e natural. Portanto, a presente invenção, por meio da associação do ativo com a ureia, viabilizou o desenvolvimento de uma formulação de melhor absorção dos ativos pela pele e disponibilizou um produto eficiente, que ainda contribui para o desenvolvimento sustentável e ambientalmente amigável de populações locais, por empregar um ativo proveniente de um resíduo agroindustrial.