



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020025761-7 A2



(22) Data do Depósito: 16/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 28/06/2022

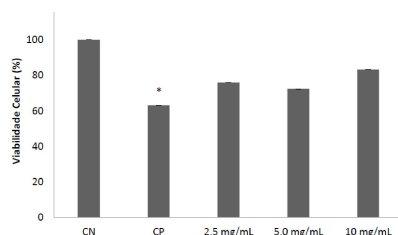
(54) **Título:** MÉTODO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTO DE GEL ANTI-INFLAMATÓRIO CONTENDO EXTRATO DE AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) ENCAPSULADO EM QUITOSANA E GEL ANTI-INFLAMATÓRIO RESULTANTE

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/88; A61P 29/00.

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

(72) **Inventor(es):** LUCINÉIA DOS SANTOS; LETÍCIA YURIE KUAE; MARIANA BITTENCOURT IBE; MYRIAM EMIKO TAKAHASHI.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTO DE GEL ANTI-INFLAMATÓRIO CONTENDO EXTRATO DE AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) ENCAPSULADO EM QUITOSANA E GEL ANTI-INFLAMATÓRIO RESULTANTE. Trata de método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório contendo extrato de Agave sisalana Perrine (sisal) encapsulado em quitosana que apresenta compostos ativos de origem natural associado a nanotecnologia, que permite a melhoria da formulação revelando potencial anti-inflamatórios do extrato de sisal encapsulado em quitosana in vitro e do gel contendo o mesmo in vivo, bem como ausência de toxicidade do gel.



“MÉTODO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTO DE GEL ANTI-INFLAMATÓRIO CONTENDO EXTRATO DE AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) ENCAPSULADO EM QUITOSANA E GEL ANTI-INFLAMATÓRIO RESULTANTE”.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata de método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório contendo extrato de *‘Agave sisalana Perrine’* (sisal) encapsulado em quitosana e gel anti-inflamatório resultante onde, notadamente, dito composto em forma de gel destaca-se em relação aos demais produtos no mercado, por apresentar compostos ativos de origem natural associado a nanotecnologia, que permite a melhoria da formulação revelando potenciais toxicológicos e anti-inflamatórios do extrato de sisal encapsulado em quitosana, bem como o potencial anti-inflamatório *‘in vivo’* do gel.

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[002] O Brasil é o maior produtor e exportador mundial do sisal, *‘Agave sisalana’*, cujo estado com maior produção de sisal 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. 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.

[003] Diante de situações como essa, existe uma preocupação mundial quanto à busca de estratégias inovadoras para o reaproveitamento de grande perda de resíduos agrícolas. Entende-se a necessidade de reaproveitar esses resíduos para promover a sustentabilidade ambiental e o incremento social e econômico de famílias de baixa renda. Desta 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, onde os pequenos produtores rurais dificilmente

alcançam uma renda mensal de um salário mínimo.

[004] A base de evidências químicas e fitoquímicas para a utilização dos extratos e frações da *Agave sisalana* Perrine (sisal) em ensaios farmacológicos se fundamenta em estudos científicos que relatam o isolamento e a determinação estrutural de cinco saponinas esteroidais presentes nas folhas desta planta. Isto porque, são numerosas as ações terapêuticas apresentadas pelas saponinas esteroidais, tais como: antifúngica, antialérgica, anti-inflamatória, antibióticas, antitumorais e cicatrizante. Além disso, as sapogeninas esteroidais, porção lipofílica das saponinas, são as precursoras dos esteroides farmacologicamente ativos presentes nos anti-inflamatórios glicocorticoides, principalmente a diosgenina. Como o processo de obtenção das sapogeninas esteroides para a produção de glicocorticoides baseia-se quase que exclusivamente no extrativismo das espécies do gênero *Dioscorea*, essas espécies estão tornando-se cada vez mais raras em algumas áreas.

[005] Portanto, ao considerar a importância econômica desses medicamentos, bem como o grande número de efeitos colaterais promovido pelos glicocorticoides faz-se necessário a busca de novas fontes de sapogeninas esteroidais, bem como o desenvolvimento de novos fitoterápicos com ações anti-inflamatórias mais potentes e menores efeitos colaterais.

ANÁLISE DO ESTADO DA TÉCNICA

[006] Em pesquisa realizada em bancos de dados especializados foram encontrados documentos referentes à método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório, tal como, apresentado no documento de nº. CN101537126 que se refere a um extrato de medicamento chinês, que é preparado tomando *Agave sisalana* como matéria-prima e contém uma pluralidade de componentes ativos, bem como um método de preparação do mesmo. O extrato é caracterizado por conter 40 a 90% do componente saponina total.

[007] O documento de nº. EP1604647 revela uma composição cosmética contendo polímero epsilon-polilisina contendo poliorganossiloxano e álcool poli-hídrico e sua produção. É fornecida uma composição cosmética que compreende um ou uma combinação de dois ou mais compostos de epsilon-polilisina contendo

poliorganossiloxano obtidos pela reação de epsilon-polilisina com poliorganossiloxano ou um sal fisiologicamente aceitável do mesmo, e álcool poli-hídrico.

[008] Os documentos supracitados, apesar de pertencerem ao mesmo campo de aplicação diferenciam-se do presente invento em questão, como se verá adiante, garantindo, assim, que o mesmo atenda, plenamente, aos requisitos legais de patenteabilidade.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[009] É objetivo da invenção apresentar método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório contendo extrato de '*Agave sisalana* Perrine' (sisal) encapsulado em quitosana que se destaca em relação aos demais produtos no mercado, por apresentar compostos ativos de origem natural, sendo um grande diferencial na área farmacêutica. Além disso, pelo fato dos compostos ativos serem obtidos do resíduo do sisal, cujo Brasil é o maior produtor mundial, a fonte desta matéria-prima é abundante e barata, contribui para o menor custo da formulação.

[010] É objetivo da invenção apresentar método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório contendo extrato de '*Agave sisalana* Perrine' (sisal) encapsulado em quitosana colaborar socialmente, uma vez que, o cosmético é desenvolvido à base do resíduo do sisal.

[011] É objetivo da invenção apresentar método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório contendo extrato de '*Agave sisalana* Perrine' (sisal) encapsulado em quitosana cujas etapas de exclusão do ácido sulfúrico, preparo do extrato e o encapsulamento do mesmo em nanopartículas de quitosana, visa a maior estabilidade e qualidade da formulação.

[012] É objetivo da invenção apresentar gel anti-inflamatório contendo extrato de '*Agave sisalana* Perrine' (sisal) encapsulado em quitosana de origem natural, com uma fonte abundante de matéria-prima, eficaz e seguro tendo como consequência menor custo para produção.

[013] É objetivo da invenção apresentar gel anti-inflamatório contendo extrato de '*Agave sisalana* Perrine' (sisal) encapsulado em quitosana que viabiliza a introdução terapêutica de medicamentos anti-inflamatórios, mais potentes e com menos efeitos

colaterais.

[014] É objetivo da invenção apresentar gel anti-inflamatório contendo extrato de '*Agave sisalana* Perrine' (sisal) encapsulado em quitosana desenvolvido a partir de uma fonte renovável e obtido por meio de processos de baixo impacto ambiental.

[015] É objetivo da invenção apresentar gel anti-inflamatório contendo extrato de '*Agave sisalana* Perrine' (sisal) encapsulado em quitosana que visa contribuir para o desenvolvimento sustentável e de promoção social da região produtora do sisal, situada entre as mais pobres do país (o sertão da Bahia), onde os pequenos produtores rurais dificilmente alcançam uma renda mensal de um salário mínimo.

TESTES

[016] Foram utilizados camundongos machos da linhagem *Swiss*, com 50 dias de idade. Os animais permaneceram alojados no Biotério da UNESP - Campus de Assis, sendo mantidos em condições padrões de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) 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 pelo SBCAL - *Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*". Os procedimentos experimentais somente ocorreram após apreciação e aprovação do projeto pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da FCL - UNESP/Campus de Assis, Registro no 01/2018.

[017] O suco bruto da *Agave sisalana* (sisal) foi obtido por meio da prensagem e filtração de suas folhas. As folhas do sisal foram obtidas a partir das mudas que foram plantadas na Unesp de Assis.

[018] Preparação do extrato do resíduo do sisal onde o extrato do resíduo do sisal resultou dos seguintes processos: 1) Filtração do suco bruto do sisal; 2) Acidificação do suco com ácido clorídrico até pH 1, numa proporção de 1 mL para 1 L de suco do sisal; 3) Agitação da solução a 100 rpm por 24 horas; 4) Autoclavagem da solução a 120°C durante 2 horas; 5) Centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos para obtenção do precipitado; 6) Descarte do sobrenadante e secagem do precipitado em estufa a 50°C em placas de Petri; 7) Adição de 10 mL de NaOH a 5% para cada 1 grama do extrato seco; 8) Maceração estática por 1 hora; 9) Centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos; 10)

Descarte do sobrenadante e adição de 10 ml de água destilada; 11) Medição do pH e se necessária a sua correção com Ácido Acético 0,1M até atingir pH 6; 12) Centrifugação a 200 rpm por 5 minutos para obtenção do precipitado; 13) Secagem do precipitado em estufa a 50°C em placas de Petri e 14) Trituração do precipitado em cadinho até virar pó.

[019] Após segue para o Encapsulamento do extrato do resíduo do sisal em nanopartículas de quitosana (QTS) utilizada neste trabalho foi o produto comercial (CAS 9012-76-4, Sigma Aldrich). Dissolveu-se 200 mg de QTS em 100 mL de solução de ácido acético (0,2 mol/L). Depois, a solução foi agitada por 1 hora e posteriormente foi sonicada durante 30 minutos. Após este período, a solução teve seu pH aumentado para 4,5 com NaOH 0,1 M e foi filtrada por filtração à vácuo. O extrato foi incorporado na solução de QTS. Adicionou-se 10 mL da solução de tripolifosfato de sódio (1mg/mL) com auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL a 20 mL de solução de QTS enriquecida com o extrato, nas diferentes concentrações. Após a adição de da solução de tripolifosfato de sódio, as soluções foram mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente durante 1 hora. O armazenamento das nanopartículas foi feito em frasco com tampa envolto em papel alumínio.

[020] A seguir inicia-se a determinação da toxicidade do extrato do resíduo do sisal encapsulado em quitosana.

[021] Teste de citotoxicidade MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

[022] Este teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações (TSUBOY et al., 2010) e compreendeu as seguintes etapas:

- 1° Passo: semear as células

[023] Em uma microplaca de cultivo celular com 96 poços foram semeados 100 µL de fibroblastos, na concentração de 3300 células/mL, por poço obtidos a partir do isolamento feito com as orelhas de camundongos Swiss machos. As células foram incubadas em meio de cultura por um período de 24 horas a 37°C, 5% de CO₂.

- 2° Passo: Tratamento das células

[024] Foram testadas três diferentes concentrações (m/v) do extrato encapsulado em

QTS, 2,5 mg/mL, 5,0 mg/mL e 10 mg/mL, além do controle negativo e positivo. O controle negativo constitui o meio de cultura sem adição do extrato, e o controle positivo, meio de cultura acrescido do Tween 80 a 2%. O tempo de tratamento foi de 24h.

- 3º Passo: Adição do MTT e leitura das placas

[025] Após o término dos tratamentos, o meio foi retirado e foi adicionado 10 µL de solução de MTT (CAS 298-93-1; Sigma Aldrich - 0,005g de MTT; 1 mL de PBS) em cada um dos poços. Em seguida este foi incubado por 4h a 37°C, 5% CO₂. Após este período, o MTT foi descartado e foi adicionado DMSO a cada um dos poços para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (560 nm).

[026] A viabilidade celular foi calculada de acordo com a seguinte fórmula (HUANG et al., 2005):

$$VC (\%) = \frac{A_A}{A_{CN}} .100$$

[027] Onde: VC é viabilidade celular (%); A_A é a absorbância das amostras; A_{CN} é a absorbância do controle negativo.

[028] A Figura 1 mostra que após 24 de tratamento que os resultados obtidos com o extrato do sisal encapsulado em QTS, nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10 mg/mL não diferiram de forma significativa em relação ao controle negativo. Assim, o teste post-hoc de 'Tukey' mostra que as taxas de sobrevivência das células não foram afetadas pelo extrato nas concentrações inferiores. Diferente, o controle positivo diferiu de forma significativa do controle negativo, indicando que o Tween 80 a 2% é capaz de diminuir a viabilidade celular.

[029] Determinação da Atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato do resíduo do sisal encapsulado em quitosana

[030] Para o teste anti-inflamatório foi utilizado o extrato encapsulado em nanopartículas de QTS nas concentrações de 1, 2 e 3% (m/v), como controle positivo foi utilizado o anti-inflamatório comercial cetoprofeno a 2% e como controle negativo foi utilizada solução fisiológica.

[031] Obtenção das células - O fluido peritoneal é o líquido retirado após a lavagem da cavidade peritoneal com PBS, as células obtidas nestes ensaios foram retiradas de camundongos Swiss, com peso médio de 25g, respectivamente. Para obtenção deste fluido foi usado o protocolo original do trabalho de '*Alan M Stall em Leon and Lenore Herzenberg's Lab at Stanford*', 1988.

[032] Seguindo o protocolo descrito por '*Alan M Stall*' em Leon e '*Lenore Herzenberg's Lab at Stanford*' (1988) obteve-se macrófagos numa quantidade suficiente para a realização dos testes de espreamento, fagocitose e retenção de lisossomos (Figura 2).

Seleção dos Macrófagos - A seleção dos macrófagos foi realizada por adesão, processo que permite obter culturas em monocamada de células aderentes, das quais pelo menos 98% são macrófagos. As células contidas no lavado peritoneal foram contadas na Câmara de Neubauer e centrifugadas a 850 rpm durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em meio de cultura, de forma atingir a concentração desejada para cada experimento (PIEMONTE; BUCHI, 2002).

[033] Fagocitose - Foi utilizado o método descrito por Pipe *et al.* (1995). Foram depositados 100 µL da solução de macrófagos, com concentração 2×10^6 células/mL em eppendorf. Após isso, foram adicionados 10 µL das doses de extrato e incubado por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 10 µL de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubado por mais 2 horas. Após este procedimento, a placa foi lavada duas vezes com PBS e, posteriormente, centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm, a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitado pelos macrófagos. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando 100 µL de solução de extração (1% de ácido acético, 50% de álcool etílico anidro e água destilada q.s.p.). Após 30 minutos, foi realizada a leitura das placas a 560 nm utilizando leitora de ELISA.

[034] Por meio da análise estatística, foi possível estimar diferenças significativas ($p < 0,05$) para os valores médios das absorbâncias dos tratamentos em comparação com o controle negativo. Percebe-se pelo gráfico da Figura 3 que o extrato em 1% (m/v) encapsulado em QTS não apresentou uma atividade anti-inflamatória significativa. Já o extrato a 2 e 3% (m/v) encapsulado em QTS apresentaram uma atividade anti-

inflamatória significativa assim como o controle positivo. Além disso, nota-se que a melhor atividade anti-inflamatória obtida foi com o extrato a 2% encapsulado em quitosana, que apresentou uma atividade melhor do que o anti-inflamatório comercial cetoprofeno a 2%, utilizados como controle positivo. Devido a esse resultado a formulação em forma de gel foi preparada com o extrato encapsulado em QTS a 2%.

[035] Espraçamento de macrófagos - O teste de espraçamento reflete o estado de estimulação de macrófagos e se fundamenta na propriedade que essas células têm de se aderirem ao vidro e apresentarem espraçamento quando estimuladas. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão celular do lavado peritoneal foram distribuídas sobre lâminas de vidro e deixadas em repouso por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas com solução salina estéril para a remoção das células não aderidas e, então incubadas em 100 µL do meio '*Dulbecco's Modified Eagle Medium*' (DMEM) com 10 µL das doses do extrato em diferentes concentrações e de 10 µL do controle positivo, durante 1 hora à temperatura de 37 °C. 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 e eosina. Em cada lâmina foram contados no mínimo 100 macrófagos, determinando-se o número e porcentagem de macrófagos espraçados. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

[036] Foram utilizados os macrófagos obtidos do fluido peritoneal dos camundongos para fazer as lâminas. Com as lâminas prontas, foram padronizados quais macrófagos seriam considerados como não espraçados (Figura 4) e como espraçados (Figura 5) para que se pudesse fazer a contagem das células.

[037] Após a contagem de todas as lâminas, obteve-se a porcentagem de espraçamento em cada um dos grupos como mostrado no quadro 1. O extrato nas concentrações de 1, 2 e 3% assim como o Cetoprofeno, anti-inflamatório já comercializado, apresentaram uma porcentagem baixa de espraçamento diferindo significativamente ($p < 0,05$) do controle negativo.

[038] Quadro 1 – Porcentagem de espraçamento de macrófagos em cada um dos grupos.

Grupos	Porcentagem de espraçamento
Controle negativo	48.00%
Cetoprofeno 2%	33.64%*
Extrato 1% encapsulado em QTS	37.50%*
Extrato 2% encapsulado em QTS	26.17%*
Extrato 3% encapsulado em QTS	11.05%*

*p<0,05 quando comparado com o grupo controle negativo. Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey.

[039] Retenção de lisossomos - Foi realizado de acordo o método descrito por Pipe *et al.* (1995) da seguinte forma: Em 100 µL da solução peritoneal com concentração de 2×10^6 células/mL foram adicionados 10 µL do controle e de cada dose do extrato, este foi incubado por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) e incubado por mais 30 minutos. Após, foram adicionados 20 µL de vermelho neutro e incubado novamente pelo mesmo tempo. Foi realizada a centrifugação por 5 minutos a 1.500 rpm e as células lavadas com solução de PBS por três vezes. Por último foi adicionada a solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Isto é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular, assim fica aprisionado no lisossomo devido à mudança de cargas causadas pelo pH ácido do sistema lisossomal. Por fim, foi incubado novamente por mais 30 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em ELISA no comprimento de onda de 490 nm. Este teste foi realizado em quadruplicata com três repetições experimentais.

[040] Neste teste também foram utilizados os macrófagos obtidos a partir do fluido peritoneal dos camundongos. Os resultados podem ser observados na Figura 6, que mostra que tanto o controle positivo, neste caso o Cetoprofeno a 2%, tanto os grupos com o extrato encapsulado nas concentrações de 1, 2 e 3% (m/v) apresentam uma diferença significativa em relação ao controle negativo, indicando a resposta anti-inflamatória. Dentro dos grupos dos extratos, o que apresentou melhor atividade foi o extrato a 2% que mostra uma resposta superior ao anti-inflamatório comercial testado.

[041] Preparo da formulação do gel contendo o extrato do resíduo do sisal encapsulado em quitosana

[042] Para o preparo da formulação, foi utilizado parabeno (conservante) a 1% (m/m), carbopol (agente viscoso) a 2% (m/m) e água. A água foi colocada dentro de um béquer e foi adicionado o parabeno e o carbopol. A mistura ficou em repouso por 24 horas. Após isso, a mistura foi agitada e o extrato encapsulado em QTS foi incorporado na concentração de 2% (m/m). Essa concentração foi definida a partir da avaliação da anti-inflamatória realizada *in vitro*.

[043] Foram testadas muitas formulações de gel para se conseguir chegar em uma com viscosidade adequada, dessa forma, variou-se principalmente a concentração de carbopol que é o agente que confere viscosidade para a formulação. Depois de muitos testes, foi possível chegar numa formulação com uma consistência adequada como pode ser observado na Figura 7.

[044] - Determinação da Atividade Anti-inflamatória *in vivo* do gel contendo o extrato do resíduo do sisal encapsulado em quitosana

[045] Foi usado o teste do edema de pata induzido por carragenina (EPC) de acordo com o modelo proposto por *Winter, Risley e Nuss, 1962*, com algumas adaptações. O efeito anti-inflamatório do gel com o extrato encapsulado em QTS foi avaliado após aplicação de 50 mg da formulação por via tópica, na concentração de 2% (m/m). O gel enriquecido com extrato encapsulado em QTS foi friccionado na pata por 30 segundos. O mesmo procedimento foi realizado com o grupo controle negativo que recebeu somente o gel base, e o grupo positivo que recebeu gel com cetoprofeno não encapsulado a 2% (m/m). No início do tratamento, os ratos machos foram aleatoriamente distribuídos em diferentes grupos, (n=6/ grupo). Uma hora após os diferentes tratamentos, ocorreu a injeção subplatar na pata posterior direita do animal com 0,1 mL de carragenina a 1% (m/m). Para avaliar o efeito anti-inflamatório o volume da pata posterior direita foi mensurado com auxílio do aparelho pletismômetro (Ugo Basile®) antes da administração da carragenina, bem como nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após a primeira administração de cada tratamento. O valor do edema resultou da diferença entre o volume da pata após a injeção com carragenina a 1% (Vf), nos diferentes tempos de avaliação e o volume da pata antes da injeção com carragenina (Vi), ou seja, Vf-Vi.

[046] A % de inibição foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{E_0 - E_T}{E_0} * 100$$

[047] Onde: E_0 representa o valor médio do edema de pata observado no grupo controle E_T representa o valor médio do edema de pata observado nos grupos tratados. Ainda para avaliar a atividade anti-inflamatória do gel, a quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) foi realizada de acordo com 'Brandley' e colaboradores (1982), com algumas modificações. Os fragmentos do tecido inflamado do coxim plantar dos camundongos 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 (50 mM, pH 6, com 0,5% (m/v) 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 e 0,002% de H₂O₂ em tampão fosfato) foram adicionados à preparação. Para o branco foram utilizados 270 µL do tampão substrato. A placa foi incubada a 37 °C por 5 minutos. A leitura foi realizada a 450 nm em espectrofotômetro.

[048] No teste do edema de pata por carragenina, a atividade anti-inflamatória foi determinada nos tempos de 1 hora, 2 horas, 4 horas e 6 horas após a aplicação de carragenina.

[049] Por meio da ANOVA de uma via os valores médios do edema gerado para o grupo tratado com o gel contendo o extrato encapsulado em QTS a 2% e para o grupo controle positivo, tratado com o gel contendo o cetoprofeno a 2%, foram comparados com o do grupo controle negativo, somente o gel base (Figura 8). Foi possível observar que o gel contendo o extrato encapsulado e o gel com o cetoprofeno foram capazes de reduzir o edema de pata de forma significativa ($p < 0.05$), em relação ao grupo controle negativo, após 4 horas da aplicação da carragenina e que este efeito antiedematogênico foi também significativo na sexta hora de avaliação.

[050] Tabela 1 - Porcentagem de inibição do edema de pata decorrente de cada tratamento para a atividade anti-inflamatória aguda.

Tratamento	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas
Gel com cetoprofeno 2%	11.85%	22.33%	25.13%	36.31%
Gel com o extrato encapsulado em QTS 2%	5.89%	14.10%	20.64%	31.36%

[051] Ainda para avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo*, foi feito o teste da MPO. Os resultados podem ser observados na Figura 9 que mostra que o gel com o extrato encapsulado em quitosana (QTS) diferiu significativamente em relação ao controle negativo, mostrando uma atividade anti-inflamatória superior ao do cetoprofeno.

- Testes de irritabilidade ocular *in vitro* do gel contendo o extrato do resíduo do sisal encapsulado em quitosana em membrana cório-alantóide (MCA) de ovos de galinha.

[052] Neste teste, a metodologia utilizada foi baseada no método oficial de avaliação do potencial irritante descrito no *Journal Officiel de La Republique Française - Arrêtédu 29 Novembre 1996*. Foi aplicado gel com o extrato nas concentrações de 1, 2 e 3% (m/m) sobre a membrana cório-alantóide (MCA) do ovo de galinha, e no décimo dia de incubação, foi observada a presença ou não de efeitos irritantes como hiperemia, hemorragia e coagulação ou opacidade.

[053] Foram utilizados 4 ovos fertilizados de galinha, com peso entre 50 e 60 gramas. Foram utilizados 4 ovos como controle, sobre os quais foi adicionada solução fisiológica. Os ovos foram adquiridos, pesados, identificados e incubados por 10 dias a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ com umidade relativa de aproximadamente 70 %.

[054] Após esse procedimento, os ovos foram colocados em posição vertical, sobre um suporte, com a câmara de ar voltada para cima, a casca foi retirada com o auxílio de um disco de lixa num motor de baixa rotação odontológico, expondo a membrana da casca, a qual foi umidificada com solução salina a 0,9% a 37°C .

[055] Com o auxílio de uma pinça, a membrana da casca foi removida. Ao realizar esse procedimento, foi exposta a MCA que foi observada quanto a quaisquer alterações, que implicariam o descarte do ovo. Foi aplicada sobre a MCA 300 μL do gel com o extrato

encapsulado e esta foi mantida à 37°C, após 20 segundos de contato foi lavado com 5 mL de solução salina à 37°C, para a retirada da formulação. A análise visual da MCA foi realizada com o auxílio de uma lupa (Figura 10).

[056] Após análise visual, foi injetada solução de tiopental nos ovos fertilizados. A graduação de cada fenômeno foi determinada no período de 5 minutos, conforme o modelo da escala descrita na Tabela 2. Os fenômenos irritantes observados foram graduados em valores numéricos (1, 3, 5, 7 e 9) dependentes do tempo.

[057] Tabela 2 - Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos em função do tempo decorrido (segundos) para sua ocorrência.

Fenômeno	Menos de 30 segundos	Entre 30 e 60 segundos	Entre 60 e 300 segundos
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

[058] A classificação do gel com o extrato encapsulado foi obtida com a média dos valores de graduação dos 4 ovos, o grau de irritação foi dividido em quatro categorias descritas na Tabela 3. Os ensaios foram realizados em triplicata.

[059] Tabela 3 - Média da graduação dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação do gel com o extrato encapsulado.

Média dos valores de graduação dos fenômenos irritantes	Classificação Final do grau de irritação do gel com o extrato
0,0 a 0,99	Não irritante (NI)
1,0 a 4,99	Irritante leve (IL)
5,0 a 8,99	Irritante Moderado (IM)
9,0 a 21	Irritante severo (IS)

[060] Após a aplicação do gel com o extrato encapsulado sobre a MCA, foi feita a análise visual para verificar a ocorrência de hiperemia, hemorragia e coagulação. Os resultados obtidos mostram que o gel com extrato encapsulado em quitosana (QTS) em

concentrações mais baixas, 1 e 2% não é irritante. Porém, o extrato encapsulado em QTS na concentração de 3% e o gel contendo o cetoprofeno não encapsulado a 2% se mostraram levemente irritantes. Assim, o gel que foi proposto a 2% não é irritante.

- Avaliação preliminar da qualidade do gel contendo o extrato do resíduo do sisal encapsulado em quitosana.

- Teste de estabilidade acelerada ou teste da centrifugação

[061] Esse ensaio foi realizado com o objetivo de constatar possíveis instabilidades no sistema pelo aumento da mobilidade das partículas em consequência do aumento da força da gravidade em associação com a força centrípeta da centrifugação (BRASIL, 2004), causando coalescência ou cremeação.

[062] Após 24 horas de sua produção, foram pesados cerca de 5,0 g da formulação em tubos de centrífuga. O Teste da Centrifugação foi realizado a temperatura ambiente (25°C), com velocidade de rotação de 3.000 rpm (210 G), durante 30 min e em triplicata. Após este tempo, a formulação foi analisada macroscopicamente quanto ao seu aspecto (VELASCO et al., 2012; FERREIRA; ZATTI, 2013).

[063] A Figura 11 mostra o gel base antes (à esquerda) de ser submetido e após (à direita) ser submetido ao processo de centrifugação indicando ausência de qualquer sinal de instabilidade. A Figura 12 mostra que o gel com extrato do sisal a 2% não encapsulado antes (à esquerda) e após (à direita) ser submetida ao processo de centrifugação e revela a presença de sinal de instabilidade e cremeação após a centrifugação. A Figura 13 apresenta o gel com extrato do sisal a 2% encapsulado em quitosana antes (à esquerda) de ser submetida e após (à direita) ser submetida ao processo de centrifugação indicando a ausência de qualquer sinal de instabilidade e cremeação.

[064] O quadro 2 mostra a ocorrência da cremeação em porcentagem, e revela para a formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado um valor de cremeação de 3,608%.

[065] Quadro 2 – Valores do índice de cremeação (%).

Formulação	Cremeação (%)
------------	---------------

Gel base	0
Formulação enriquecida com o extrato do resíduo do sisal não encapsulado	3,608
Formulação enriquecida com o extrato do resíduo do sisal encapsulado	0

[066] - Teste do estresse térmico

[067] Foram pesados 5,0 g da formulação transferidos para tubos de ensaio. As amostras foram submetidas ao estresse térmico em triplicata, em banho-maria termostatzado, no intervalo de temperatura entre 40 a 80°C, com elevação de 10°C a cada 30 minutos até 80°C. As formulações foram analisadas macroscopicamente quanto ao aspecto após atingirem a temperatura ambiente de 25°C (FERREIRA; ZATTI, 2013).

[068] As formulações foram analisadas macroscopicamente quanto ao aspecto antes (Figura 14) e após serem submetidas ao estresse térmico de 40, 50, 60, 70 e 80°C e voltarem a temperatura ambiente de 25°C. As Figuras 15, 16, 17, 18 e 19 mostram que as 3 formulações permaneceram estáveis, mesmo com todo o estresse térmico sofrido.

[069] - Determinação dos aspectos organolépticos

[070] As características organolépticas avaliadas foram: aspecto e cor (visualmente) e odor (através do olfato). As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente de 25°C, a 45°C na estufa e a 4°C na geladeira. Semanalmente, por um período de 30 dias, uma alíquota de cada formulação foi colocada em vidro relógio para comparação com o grupo controle, que consistiu da preparação de um gel base sem a adição do extrato. (VELASCO et al., 2012; FERREIRA; ZATTI, 2013).

[071] As características organolépticas avaliadas semanalmente foram: cor (Tabela 4), odor (Tabela 5) e aspecto (Tabela 6). As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente de 25°C (TA), a 40°C na estufa e a 4°C na geladeira.

[072] Para avaliar a variação da cor em função do tempo e condições de exposição as colorações foram classificadas em: Br – Branco, Be – Bege, M – Marrom, ME – Marrom Escuro. Pode-se observar, na Tabela 4, que os padrões de cores ao longo das semanas se mantiveram.

[073] Tabela 4 – Distribuição da presença de cor conforme a formulação, o

armazenamento e a semana.

Semana																	
		1				2				3				4			
	Cor	Br	Be	M	ME	Br	Be	M	ME	Br	Be	M	ME	Br	Be	M	ME
	TA	X				X				X				X			
F1	Estufa	X				X				X				X			
	Geladeira	X				X				X				X			
	TA				X				X				X				X
F2	Estufa				X				X				X				X
	Geladeira				X				X				X				X
	TA		X				X				X				X		
F3	Estufa		X				X				X				X		
	Geladeira		X				X				X				X		

[074] TA – Temperatura ambiente Br – Branco, Be – Bege, M – Marrom, ME – Marrom Escuro, F1 - gel base; F2 - formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado; F3 - formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado com quitosana.

[075] Na análise de odor das formulações foi utilizada a seguinte classificação: OEB – Odor Emulsão Base; LOS – Leve Odor de Sisal; OS – Odor de Sisal; FOS – Forte Odor de Sisal. Os resultados podem ser observados na tabela 5, onde pode-se perceber que houveram pequenas variações nas formulações F2 (formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado) e F3 (formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado) ao longo das semanas em que o odor de sisal se tornou mais suave com o passar do tempo.

[076] Tabela 5 – Distribuição da presença de odor conforme a formulação, a condição de exposição e a semana.

Semana																	
		1				2				3				4			
	Odor	OEB	LOS	OS	FOS	OEB	LOS	OS	FOS	OEB	LOS	OS	FOS	OEB	LOS	OS	FOS
F1	TA	X				X				X				X			
	Estufa	X				X				X				X			
	Geladeira	X				X				X				X			
F2	TA				X			X	X		X	X			X	X	
	Estufa				X				X		X				X		
	Geladeira				X				X		X					X	

F3	TA			X				X				X			X		
	Estufa		X					X			X				X		
	Geladeira			X				X			X				X		

[077] TA – Temperatura ambiente; OEB – Odor Emulsão Base; LOS – Leve Odor de Sisal; OS – Odor de Sisal; FOS – Forte Odor de Sisal. F1 - gel base; F2 - formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado; F3 - formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado com quitosana.

[078] Na análise dos aspectos das formulações foi utilizada a seguinte classificação em: B - Brilhosa, BPG – Brilhosa com poucos grumos, BCG – Brilhoso com Grumos e O - Opaco. Pode-se notar na Tabela 6 que o aspecto das formulações ao longo das semanas se manteve.

[079] Tabela 6 – Distribuição de aspecto conforme a formulação, a condição de exposição e a semana.

Semana																	
		1				2				3				4			
	Aspecto	B	BPG	BCG	O	B	BPG	BCG	O	B	BPG	BCG	O	B	BPG	BCG	O
F1	TA	X				X				X				X			
	Estufa	X				X				X				X			
	Geladeira	X				X				X				X			
F2	TA		X				X				x			X			
	Estufa		x				X				X			X			
	Geladeira		x				X				X			x			
F3	TA			X				X				X			X		
	Estufa			X				X				x			X		
	Geladeira			X				X				x			X		

[080] TA – Temperatura ambiente; B – Brilhosa; BPG – Brilhosa com poucos grumos; BCG – Brilhoso com Grumos; O – Opaca. F1 - gel base; F2 - formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado; F3 - formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado com quitosana.

[081] Avaliação do pH do gel

[082] A avaliação do pH foi realizada semanalmente por um período de 30 dias, por meio de um acompanhamento do valor do pH da formulação, sendo o valor

determinado com pHmetro calibrado. As medições foram realizadas em solução diluída a 1:10 com água destilada e em triplicata. As variações do pH das formulações podem ser observadas na Tabela 7 e não mostram variações significativas em todas as condições analisadas.

[083] Tabela 7 – Distribuição das médias de pH conforme a formulação, a condição de armazenamento e a semana.

pH									
	F1			F2			F3		
	Geladeira	TA	Estufa	Geladeira	TA	Estufa	Geladeira	TA	Estufa
1ªsemana	4.80	4.20	4.10	4.46	4.41	4.39	4.02	4.01	4.02
2ªsemana	4.33	4.33	4.21	4.34	4.40	4.37	4.16	4.08	4.04
3ªsemana	4.51	4.56	5.53	4.41	4.42	4.62	4.14	4.05	4.16
4ªsemana	4.05	4.14	4.10	4.41	4.42	4.38	4.02	4.00	4.01

[084] Determinação da espalhabilidade do gel

[085] Uma placa molde circular de vidro com um orifício central foi colocada sobre uma placa suporte de vidro. Sob essa placa, foi posicionada uma folha de papel milimetrado e uma fonte luminosa. A amostra foi introduzida no orifício da placa e nivelada com uma espátula. Em seguida, a placa-molde foi retirada. Após um minuto, foi calculada a superfície abrangida, através da medição do diâmetro em duas posições opostas. Este procedimento foi repetido acrescentando-se novas placas, registrando-se a cada determinação a superfície abrangida pela amostra e o peso da placa adicionada até um número máximo de 5 placas (VELASCO et al., 2012). A espalhabilidade (E_i), determinada a 25°C, foi calculada através da equação:

$$E_i = (d^2 \cdot \pi) / 4$$

[086] Onde: E_i = espalhabilidade da amostra para peso i (mm²) / d = diâmetro médio (mm).

[087] Nas figuras 20, 21 e 22, as siglas 1G, 2G, 3G e 4G representam as amostras que permaneceram na geladeira na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª Semana respectivamente. Já as siglas 1TA, 2TA, 3TA e 4TA representam as amostras que permaneceram em temperatura ambiente na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª Semana respectivamente. Por fim, as siglas 1E, 2E, 3E e 4E

representam as amostras que permaneceram na estufa (40°C) na 1ª, 2ª, 3ª e 4ª semana respectivamente.

[088] A Figura 20 mostra a distribuição da espalhabilidade da formulação F1 ao longo das 4 semanas, onde pode-se notar que a amostra que permaneceu na geladeira e a amostra que ficou na estufa apresentaram padrões decrescentes de espalhabilidade.

[089] A Figura 21 mostra a distribuição da espalhabilidade da formulação F2, formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado, ao longo das 4 semanas, onde pode-se notar que a amostra que permaneceu a temperatura ambiente apresentou um padrão decrescente até a 3ª semana e na última o valor da espalhabilidade voltou a subir. Já a amostra que foi armazenada na estufa apresentou valores crescentes de espalhabilidade até a 2ª semana, nas semanas seguintes os valores decaíram. Em adição, em comparação a figura anterior é possível constatar que a presença do extrato não encapsulado na formulação prejudicou de modo geral a espalhabilidade.

[090] A Figura 22 mostra a distribuição da espalhabilidade da formulação F3, formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado, ao longo das 4 semanas, onde pode-se notar que a amostra que permaneceu na geladeira se manteve praticamente constante da 1ª para 2ª semana, depois apresentou um padrão decrescente de espalhabilidade. As amostras que estavam a temperatura ambiente e na estufa apresentaram um padrão crescente de espalhabilidade da 1ª para 2ª semana e nas semanas seguintes os valores decaíram.

[091] Análise estatística

[092] As análises estatísticas foram realizadas através do software *BioEstat* 5.0. Em todos os testes o nível de significância foi de 5%. Os dados foram submetidos à ANOVA de uma via, tendo como fator independente o tratamento. Quando apropriado, foram realizadas comparações múltiplas pelo Teste de *Tukey*.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[093] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de

figuras, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou:

[094] a figura 1 mostra um gráfico da média $\pm$ EPM do valor da taxa da viabilidade celular dos diferentes grupos de tratamento. O extrato encapsulado em quitosana foi analisado nas concentrações de 2,5, 5,0 e 10,0 mg/mL (m/v) que correspondem ao EEQTS 2,5, EEQTS 5,0 e EEQTS 10,0 mg/mL, respectivamente. O grupo CP - controle positivo, representa o meio de cultura adicionado de Tween 80 na concentração de 2% e o grupo CN - controle negativo, corresponde ao meio de cultura com solução fisiológica. ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Tukey. O asterisco (*) indica se existiu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo;

[095] a figura 2 revela uma imagem fotográfica dos macrófagos isolados do fluido peritoneal de camundongos 'Swiss' machos;

[096] a figura 3 representa um gráfico dos Valores das absorbâncias x Grupos de tratamento. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo. Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

[097] a figura 4 revela macrófago não espreado. (Aumento de 400x). Coloração: Hematoxilina-eosina;

[098] a figura 5 mostra macrófago espreado. (Aumento de 400x). Coloração: Hematoxilina-eosina;

[099] a figura 6 representa um gráfico da média $\pm$ EPM do valor de leitura das absorbâncias dos diferentes grupos de tratamento. O extrato encapsulado foi analisado nas concentrações de 1, 2 e 3%. ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Tukey. O asterisco (*) indica se existiu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle negativo;

[100] a figura 7 mostra imagens fotográficas, sendo gel base (à esquerda), gel com extrato de sisal a 2% encapsulado em nanopartículas de quitosana (centro) e gel com extrato de sisal a 2% não encapsulado (à direita);

[101] a figura 8 mostra um gráfico da média $\pm$ EPM dos valores do edema por grupo de tratamento para avaliação da atividade anti-inflamatória aguda. CN – Controle negativo – gel base, CET 2 – gel com cetoprofeno 2% e EEQTS 2 – gel com o extrato encapsulado em quitosana 2%. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle ($n=6$ para todos os

grupos). Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

[102] a figura 9 representa um gráfico do resultado do teste da mieloperoxidase. Média $\pm$ EPM dos valores de absorbância por grupo de tratamento. CN – Controle negativo, CET 2 – cetroprofeno 2% e EEQTS 2 – extrato encapsulado em quitosana 2%. * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo controle. Teste de ANOVA seguido por teste de Tukey;

[103] a figura 10 mostra uma imagem fotográfica do ovo fertilizado com a câmara de ar voltada para cima sem a casaca da parte superior e com a MCA exposta;

[104] a figura 11 revela uma imagem fotográfica do gel base antes (à esquerda) de ser submetido e após (à direita) ser submetido ao processo de centrifugação indicando ausência de qualquer sinal de instabilidade;

[105] a figura 12 apresenta uma imagem fotográfica do gel com extrato do sisal a 2% não encapsulado antes (à esquerda) e após (à direita) ser submetida ao processo de centrifugação indicando a presença de sinal de instabilidade e cremeação após a centrifugação;

[106] a figura 13 mostra imagens fotográficas do gel com extrato do sisal a 2% encapsulado em quitosana antes (à esquerda) de ser submetida e após (à direita) ser submetida ao processo de centrifugação indicando a ausência de qualquer sinal de instabilidade e cremeação;

[107] a figura 14 revela imagens fotográficas do gel base (à direita), formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado (à esquerda) e formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado em quitosana (centro) à temperatura ambiente (25°C);

[108] a figura 15 revela imagens fotográficas do gel base (à direita), formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado (à esquerda) e formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado em quitosana (centro) após serem aquecidas no teste do estresse térmico a 40°C e retornarem à temperatura ambiente;

[109] a figura 16 mostra imagens fotográficas do gel base (à direita), formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado (à esquerda) e formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado em quitosana (centro) após serem

aquecidas no teste do estresse térmico a 50°C e retornarem à temperatura ambiente;

[110] a figura 17 mostra imagens fotográficas do gel base (à direita), formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado (à esquerda) e formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado em quitosana (centro) após serem aquecidas no teste do estresse térmico a 60 °C e retornarem à temperatura ambiente;

[111] a figura 18 revela imagens fotográficas do gel base (à direita), formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado (à esquerda) e formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado em quitosana (centro) após serem aquecidas no teste do estresse térmico a 70°C e retornarem à temperatura ambiente;

[112] a figura 19 revela imagens fotográficas do gel base (à direita), formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado (à esquerda) e formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado em quitosana (centro) após serem aquecidas no teste do estresse térmico a 80°C e retornarem à temperatura ambiente;

[113] a figura 20 mostra um gráfico da distribuição da espalhabilidade da formulação F1 - gel base;

[114] a figura 21 revela um gráfico da distribuição da espalhabilidade da formulação F2 - formulação enriquecida com o extrato do sisal não encapsulado; e

[115] a figura 22 mostra um gráfico da distribuição da espalhabilidade da formulação F3 - formulação enriquecida com o extrato do sisal encapsulado com quitosana.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[116] A presente patente de invenção se refere à “MÉTODO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTO DE GEL ANTI-INFLAMATÓRIO CONTENDO EXTRATO DE AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) ENCAPSULADO EM QUITOSANA E GEL ANTI-INFLAMATÓRIO RESULTANTE”, mais precisamente trata-se de método de obtenção de composto de gel fitoterápico com potenciais anti-inflamatórios para área farmacêutica.

[117] Segundo a presente invenção, dito método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório utiliza como fonte primária o extrato vegetal proveniente da mucilagem – resíduos sólidos e líquidos – da *Agave Sisalana* Perrine (sisal) seguido de encapsulamento em quitosana, sendo que as etapas que compõe o método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório compreendem:

- i) Obtenção do material de origem vegetal – nesta etapa o suco bruto da *Agave sisalana* (sisal) foi obtido por meio do reaproveitamento da mucilagem proveniente do processamento das folhas *Agave sisalana* Perrine (sisal);
- ii) Preparação do extrato do resíduo do sisal - nesta etapa, o extrato do resíduo do sisal é resultado das sub-etapas de:
 - a) Filtração do suco bruto do sisal;
 - b) Acidificação do suco com ácido clorídrico até pH 1 numa proporção de para 1 L de suco do sisal;
 - c) Agitação da solução a 100 rpm por 24 horas;
 - d) Autoclavagem da solução a 120°C durante 2 horas;
 - e) Centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos para obtenção do precipitado;
 - f) Descarte do sobrenadante e secagem do precipitado em estufa a 50°C em placas de Petri;
 - g) Adição de 10 mL de NaOH a 5% para cada 1 grama do extrato seco;
 - h) Maceração estática por 1 hora;
 - i) Centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos;
 - j) Descarte do sobrenadante e adição de 10 ml de água destilada para cada 1 grama do extrato;
 - k) Medição do pH e se necessária à sua correção com Ácido Acético 0,1M até atingir pH 6;
 - l) Centrifugação a 200 rpm por 5 minutos para obtenção do precipitado;
 - m) Secagem do precipitado em estufa a 50°C em placas de Petri.
 - n) Trituração do precipitado em cadinho até obtenção de pó.
- iii) Encapsulamento do extrato do resíduo do sisal em nanopartículas de quitosana – esta etapa é compreendida por um conjunto de sub-etapas, quais sejam:
 - aa) Dissolução de 200 mg de quitosana (QTS) em 100 mL de solução de ácido acético (0,2 mol/L);
 - bb) Agitação da solução por 1 hora e posteriormente sonicada durante 30 minutos;
 - cc) Após este período, a solução tem pH aumentado para 4,5 com NaOH 0,1 M e

filtrada por filtração à vácuo;

dd) Incorporação do extrato na solução de quitosana (QTS);

ee) Adição de 10 mL da solução de tripolifosfato de sódio (1mg/mL) com auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL a 20 mL de solução de quitosana (QTS) enriquecida com o extrato, nas diferentes diluições;

ff) Após a adição da solução de tripolifosfato de sódio, as soluções são mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente durante 1 hora;

gg) Obtenção de nanopartículas de gel com o extrato do resíduo do sisal encapsulado em quitosana.

[118] As proporções do composto de gel anti-inflamatório contendo extrato de *Agave sisalana* Perrine (sisal) encapsulado em quitosana no gel anti-inflamatório de 2 % (m/m).

A composição do gel compreende:

- Extrato do sisal encapsulado em quitosana - 2%;
- Carbopol - 2%;
- Parabeno (conservante) - 1%;
- Água – qsp 100%.

[119] O gel anti-inflamatório contendo extrato de *Agave sisalana* Perrine (sisal) encapsulado em quitosana compõe um fitoterápico com atividade anti-inflamatória, sem sinais de toxicidade e a exclusão do ácido sulfúrico, no preparo do extrato e o encapsulamento do em nanopartículas de quitosana compõe estabilidade e qualidade da formulação.

[120] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substantiados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

Referências

[121] BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. 1. ed. v. 1, 52 p. Brasília, 2004.

- [122] FERREIRA, R. M; ZATTI, R. A. **Protocolo para ensaios de estabilidade físico-química de fitocosméticos**. ANAIS V SIMPAC, v. 5, n. 1, p. 493-500, 2013.
- [123] PIEMONTE, M.R.; BUCHI, D.F. ***Analysis of IL-2, IFN- γ and TNF- α production, $\alpha 5 \beta 1$ integrins and actin filaments distribution in peritoneal mouse macrophages treated with homeopathic medicament***. J. Submicrosc. Cytol. and Pathol., v. 3, 2002.
- [124] VELASCO, M. V. R et al. ***Influences of bioactive substances on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions***. Biomedical and Biopharmaceutical Research, v. 9, n. 1, p. 119-130, 2012.

REIVINDICAÇÕES

1) **“MÉTODO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTO DE GEL ANTI-INFLAMATÓRIO CONTENDO EXTRATO DE AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) ENCAPSULADO EM QUITOSANA E GEL ANTI-INFLAMATÓRIO RESULTANTE”**, mais precisamente trata-se de método de obtenção de composto de gel fitoterápico com potenciais anti-inflamatórios para área farmacêutica; caracterizado por método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório utiliza como fonte primária o extrato vegetal proveniente da mucilagem – resíduos sólidos e líquidos – da *Agave Sisalana* Perrine (sisal) seguido de encapsulamento em quitosana, sendo que as etapas que compõe o método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório compreendem:

- i) obtenção do material de origem vegetal – nesta etapa o suco bruto da *Agave sisalana* (sisal) é obtido por meio do reaproveitamento da mucilagem proveniente do processamento das folhas da *Agave Sisalana* Perrine (sisal);
- ii) preparação do extrato do resíduo do sisal - nesta etapa, o extrato do resíduo do sisal é resultado das sub-etapas de:
 - a) filtração do suco bruto do sisal através;
 - b) acidificação do suco com ácido clorídrico até pH 1 numa proporção de 1 mL para 1 L de suco do sisal;
 - c) agitação da solução a 100 rpm por 24 horas;
 - d) autoclavagem da solução a 120°C durante 2 horas;
 - e) centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos para obtenção do precipitado;
 - f) descarte do sobrenadante e secagem do precipitado em estufa a 50°C em placas de Petri;
 - g) adição de 10 mL de NaOH a 5% para cada 1 grama do extrato seco;
 - h) maceração estática por 1 hora;
 - i) centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos;
 - j) descarte do sobrenadante e adição de 10 ml de água destilada para cada 1 grama do extrato;
 - k) medição do pH e se necessária à sua correção com Ácido Acético 0,1M até atingir pH 6;

- l) centrifugação a 200 rpm por 5 minutos para obtenção do precipitado;
- m) secagem do precipitado em estufa a 50°C em placas de Petri;
- n) trituração do precipitado em cadinho até obtenção de pó;
- iii) encapsulamento do extrato do resíduo do sisal em nanopartículas de quitosana – esta etapa é compreendida por um conjunto de sub-etapas, quais sejam:
 - aa) dissolução de 200 mg de quitosana (QTS) em 100 mL de solução de ácido acético (0,2 mol/L);
 - bb) agitação da solução por 1 hora e posteriormente sonicada durante 30 minutos;
 - cc) após este período, a solução tem pH aumentado para 4,5 com NaOH 0,1 M e filtrada por filtração à vácuo;
 - dd) incorporação do extrato na solução de quitosana (QTS);
 - ee) adição de 10 mL da solução de tripolifosfato de sódio (1mg/mL) com auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL a 20 mL de solução de quitosana (QTS) enriquecida com o extrato, nas diferentes concentrações;
 - ff) após a adição da solução de tripolifosfato de sódio, as soluções são mantidas sob agitação magnética, a temperatura ambiente durante 1 hora;
 - gg) obtenção de nanopartículas de gel com o extrato do resíduo do sisal encapsulado em quitosana.

2) **“COMPOSTO DE GEL ANTI-INFLAMATÓRIO CONTENDO EXTRATO DE AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) ENCAPSULADO EM QUITOSANA”**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por proporções do composto de gel anti-inflamatório contendo extrato de *Agave sisalana* Perrine (sisal) encapsulado em quitosana a 2% (m/m) apresentar:

- extrato do sisal encapsulado em quitosana - 2%;
- carbopol - 2%;
- parabeno (conservante) - 1%;
- água – qsp 100%.

3) **“GEL ANTI-INFLAMATÓRIO RESULTANTE”**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por gel anti-inflamatório conter extrato de *Agave sisalana* perrine (sisal) encapsulado em quitosana e ser um fitoterápico com atividade anti-inflamatória, sem

sinais de toxicidade.

FIG.1

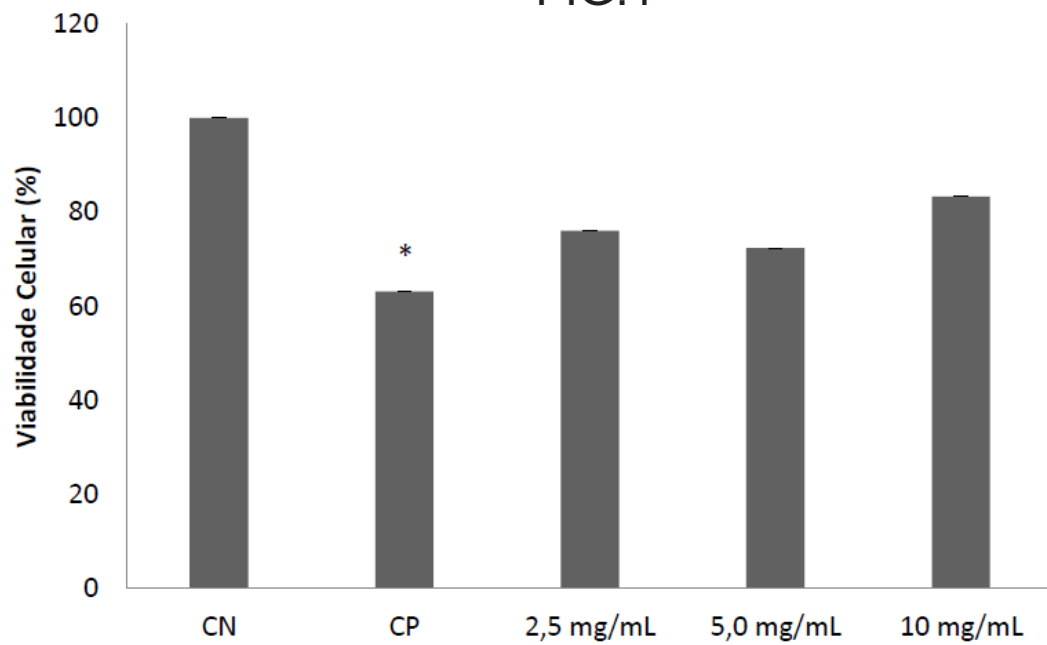


FIG.2

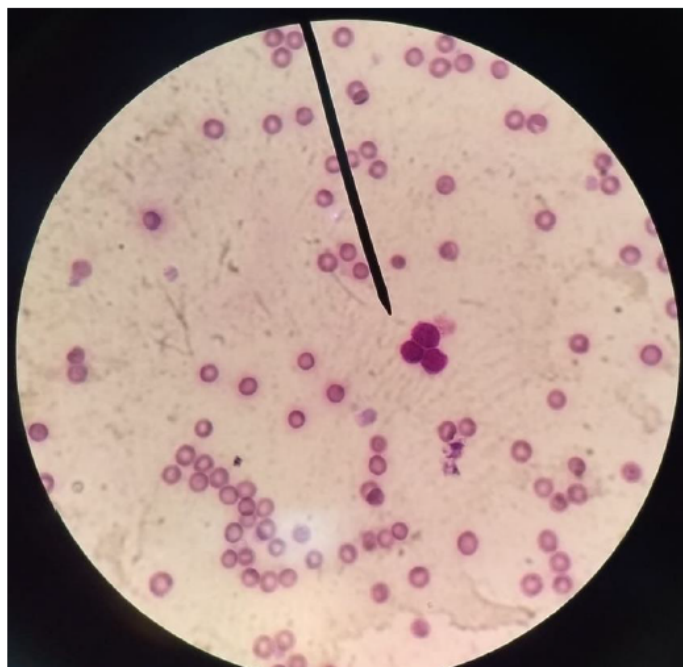


FIG.3

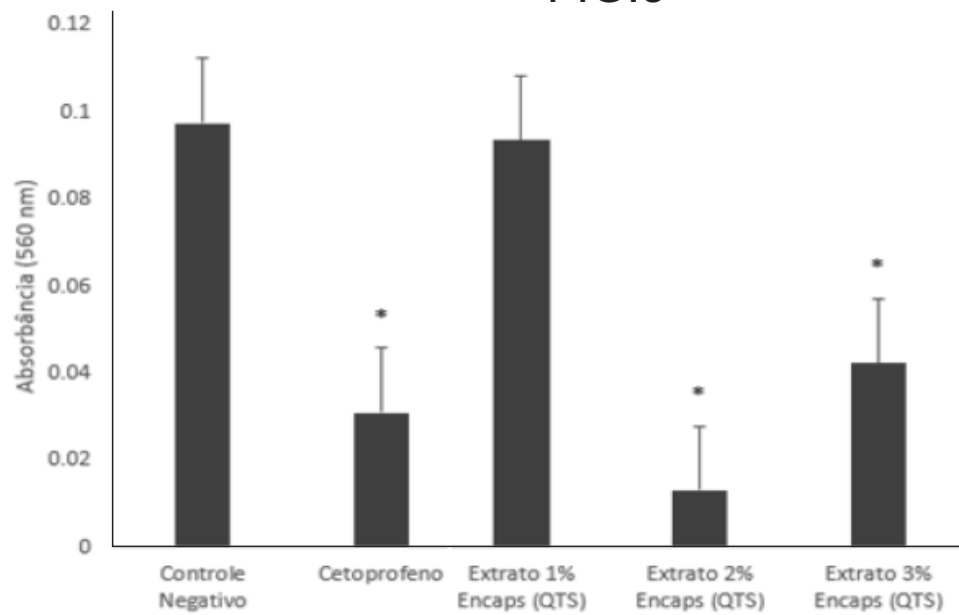


FIG.4

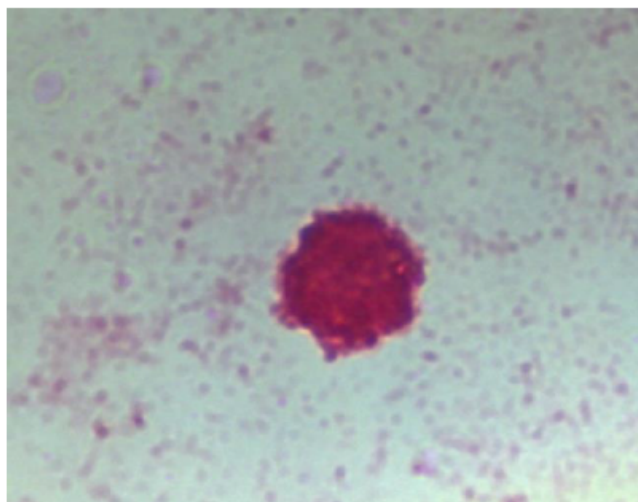


FIG.5

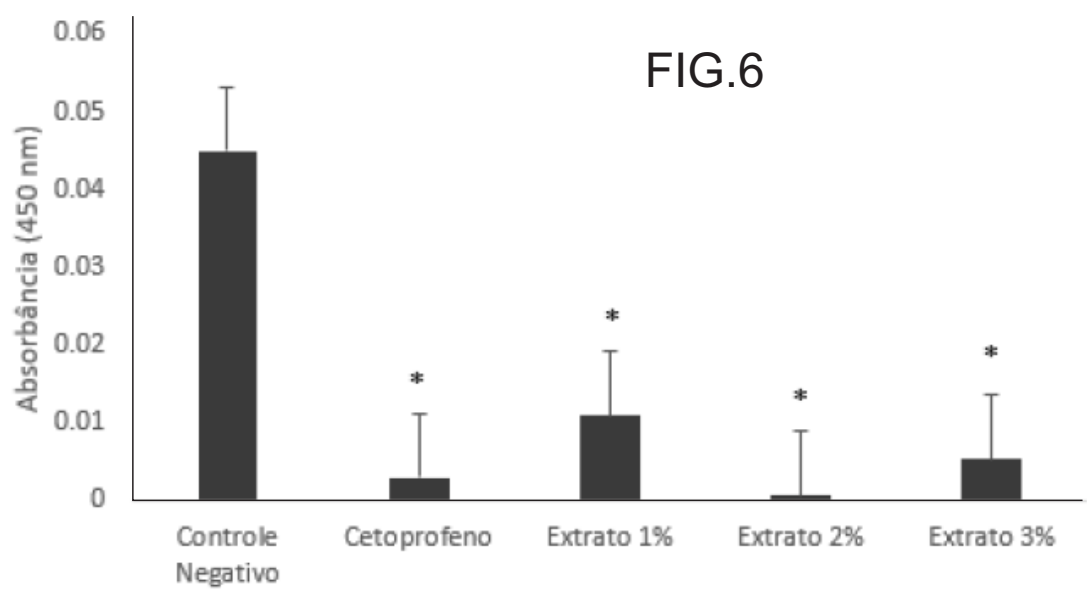
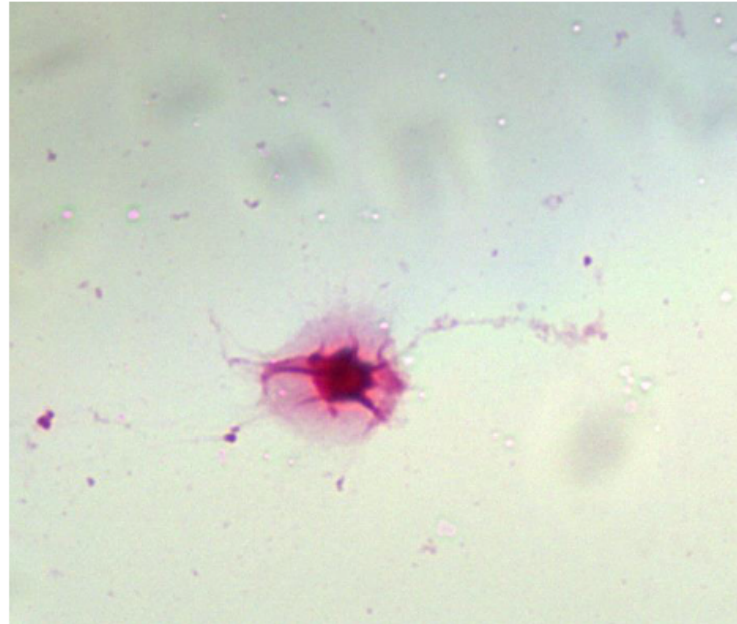


FIG.7



FIG.8

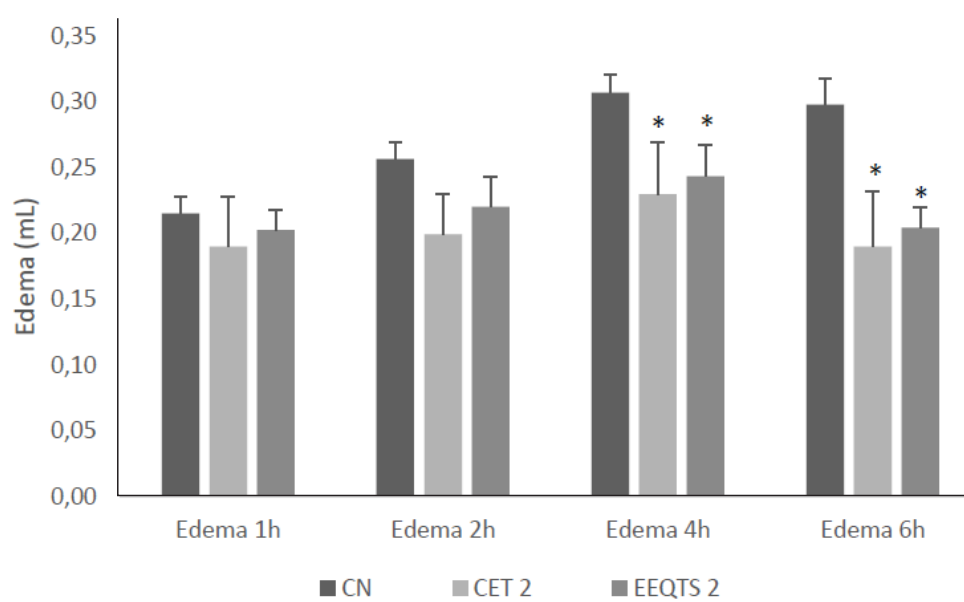


FIG.9

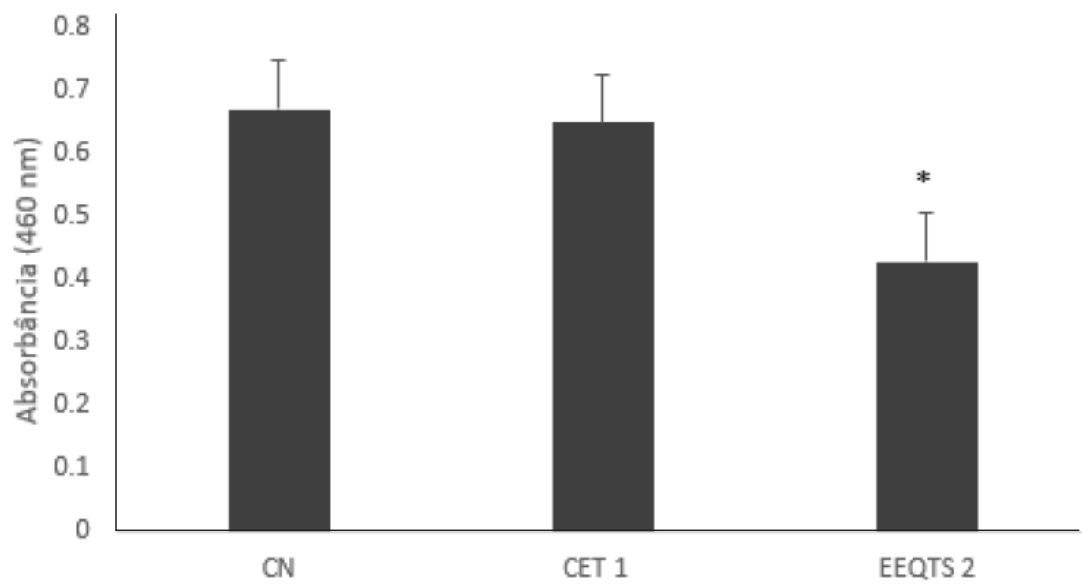


FIG.10



FIG.11

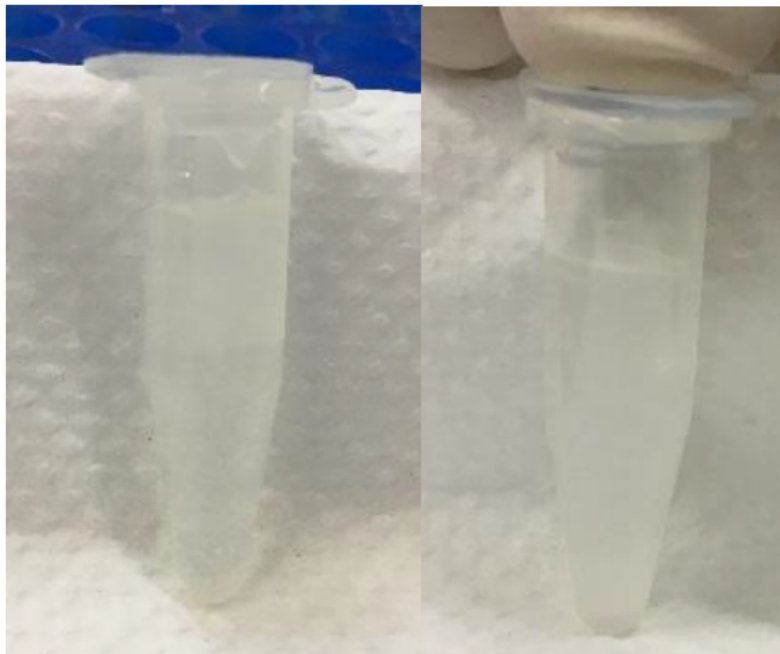


FIG.12

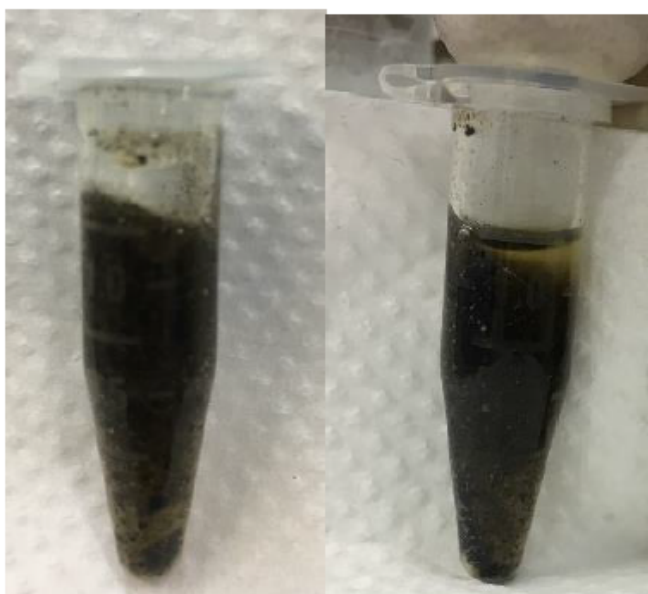


FIG.13

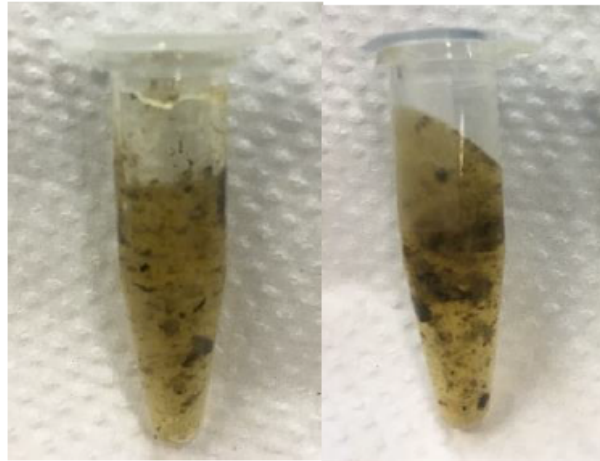


FIG.14



FIG.15

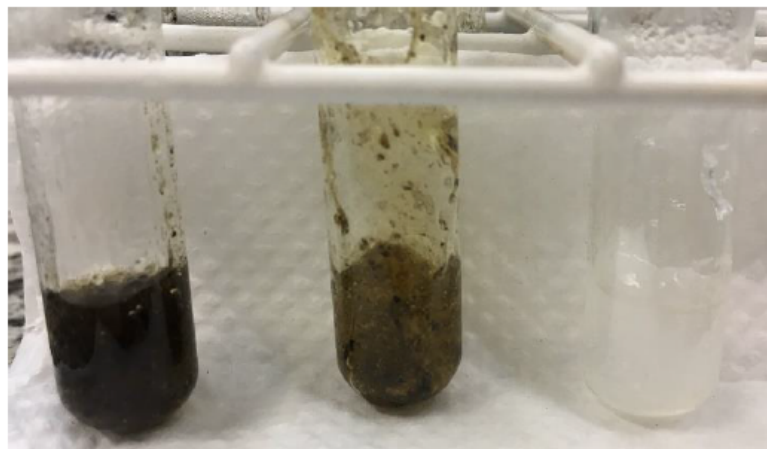


FIG.16

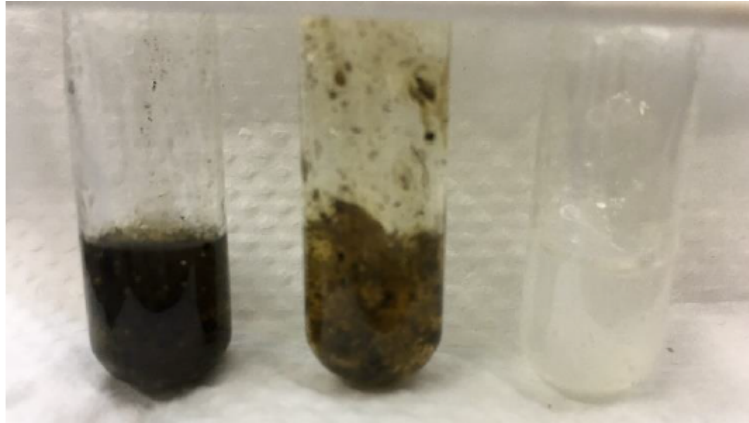


FIG.17

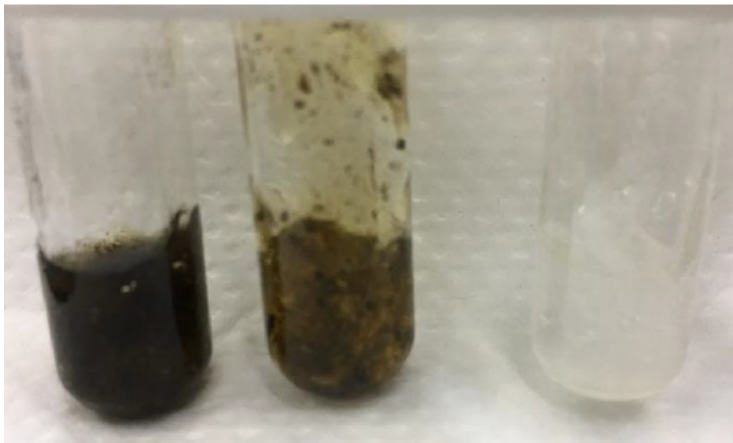


FIG.18

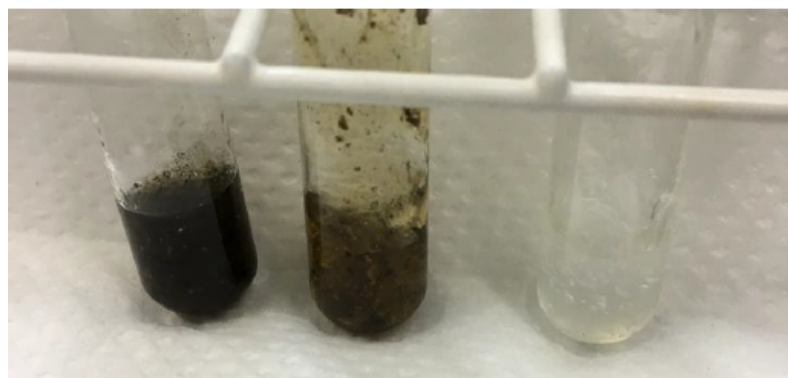


FIG.19

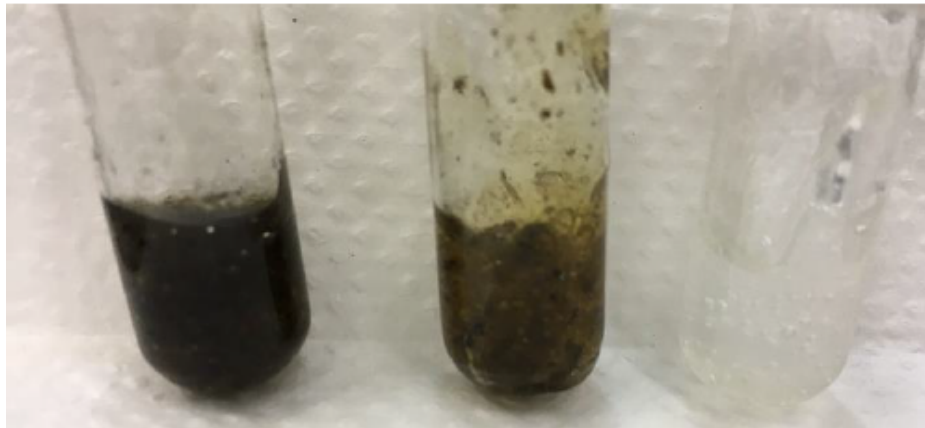


FIG.20

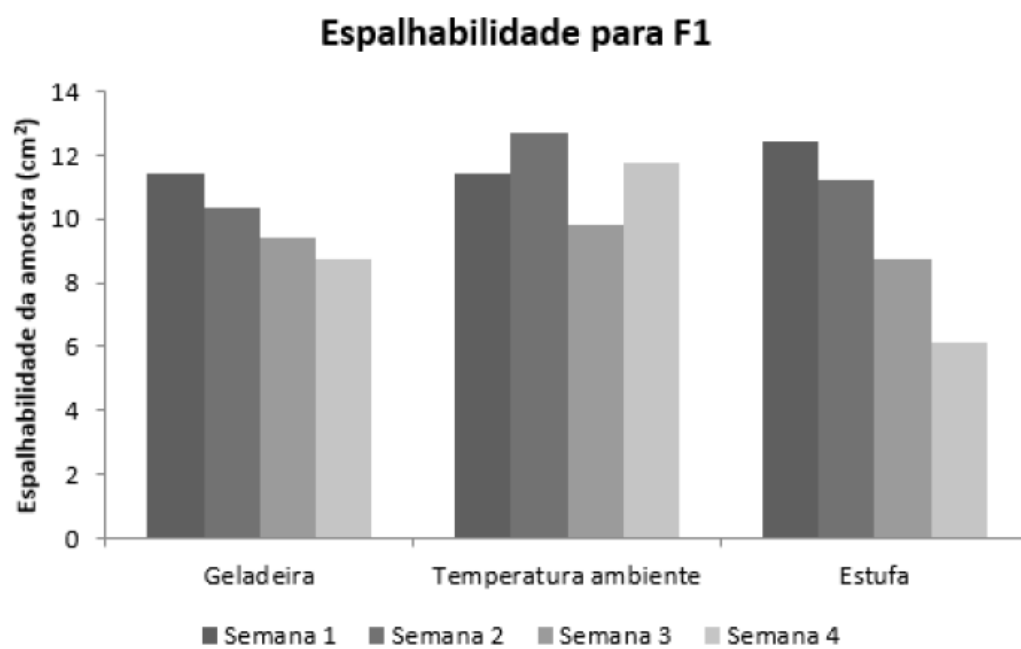


FIG.21

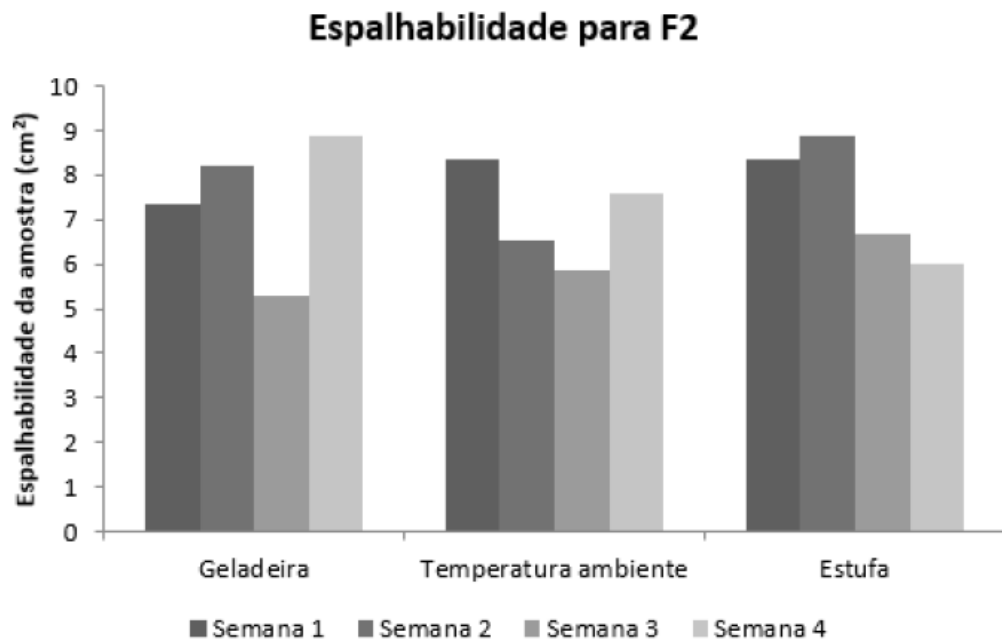
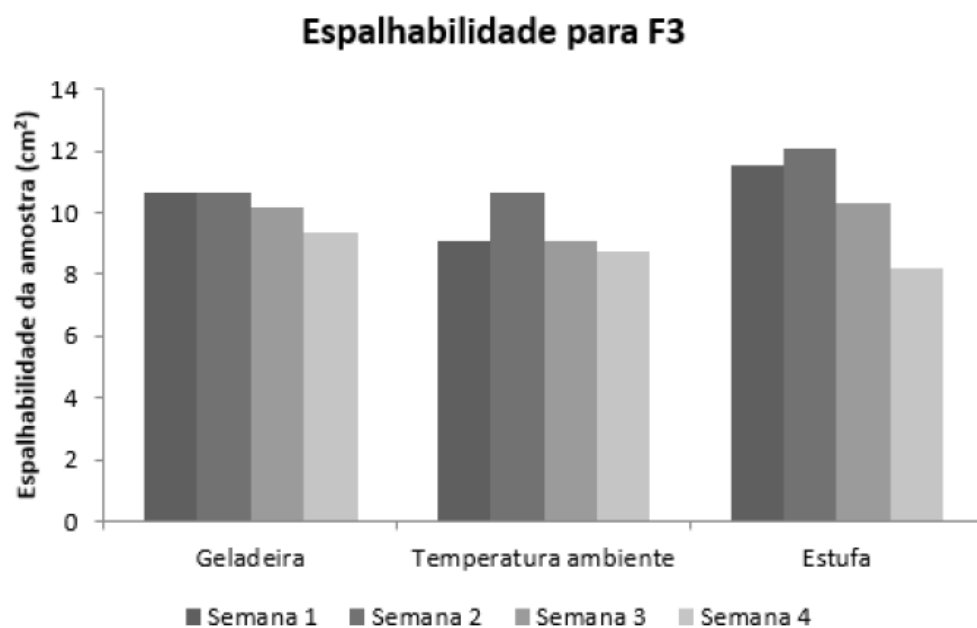


FIG.22



RESUMO

“MÉTODO DE OBTENÇÃO DE COMPOSTO DE GEL ANTI-INFLAMATÓRIO CONTENDO EXTRATO DE AGAVE SISALANA PERRINE (SISAL) ENCAPSULADO EM QUITOSANA E GEL ANTI-INFLAMATÓRIO RESULTANTE”.

Trata de método de obtenção de composto de gel anti-inflamatório contendo extrato de *Agave sisalana* Perrine (sisal) encapsulado em quitosana que apresenta compostos ativos de origem natural associado a nanotecnologia, que permite a melhoria da formulação revelando potencial anti-inflamatórios do extrato de sisal encapsulado em quitosana *in vitro* e do gel contendo o mesmo *in vivo*, bem como ausência de toxicidade do gel.