

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAMYRES CARLA PORTEGLIO DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOGEL DE *Copaifera reticulata*  
(COPAÍBA) E COMPARAÇÃO DA FONOFORESE E USO TÓPICO EM  
REPARO DE LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RATOS  
WISTAR**

Macapá/ AP

2017

**TAMYRES CARLA PORTEGLIO DE LIMA**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOGEL DE *Copaifera reticulata*  
(COPAÍBA) E COMPARAÇÃO DA FONOFORESE E USO TÓPICO EM  
REPARO DE LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RATOS  
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes

Co-orientador: Prof. Dr. Areolino Penna Matos

Macapá/ AP

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

616.46

L732d Lima, Tamyres Carla Porteglio.

Desenvolvimento de nanogel de *Copaifera reticulata* (copaíba) e comparação da fonoforese e uso tópico em reparo de lesão muscular esquelética de ratos wistar / Tamyres Carla Porteglio Lima; orientador, Madson Ralide Fonseca Gomes. – Macapá, 2017.

85 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Plantas medicinais. 2. Doenças. 3. Saúde. I. Gomes, Madson Ralide Fonseca, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

**TAMYRES CARLA PORTEGLIO DE LIMA**

**DESENVOLVIMENTO DE NANOGEL DE *Copaifera reticulata*  
(COPAÍBA) E COMPARAÇÃO DA FONOFORESE E USO TÓPICO EM  
REPARO DE LESÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA DE RATOS  
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Amapá, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ensaios Biológicos

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes  
(Orientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alessandra Azevedo Nascimento

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vania Tie Koga Ferreira

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvia Maria Mathes Faustino

Apresentado em: 13/04/2017  
Conceito: APROVADO

Macapá/ AP

2017

Ao meu filho Miguel, que me fortaleceu como mulher, me ensinou a melhor maneira de viver, e que a vida é simples, breve e feliz. Por quem me aperfeiçoarei, como ser humano, como pesquisadora e fisioterapeuta. A busca pelo novo na vida ganhou mais sentido, e a gratidão à Deus por tamanha benção.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que meu fortaleceu e não deixou sua filha esmorecer em meio as dificuldades, me ensinando que grandes conquistas, são lapidadas em nosso espírito gradativamente, e ao fim, o sucesso, será vivido com alegria e gratidão.

A todos os meus familiares, em especial minha mãe Eliete Porteglio, que sempre apresentou os estudos como um caminho de renovação, professora, do qual herdo tamanha dedicação aos estudos. Ao meu pai José Benedito que mesmo sem estudos, incentiva-nos a permanecer nesse caminho, meu esposo Pablo Souza, que é um grande exemplo de vitória pela incansável dedicação aos estudos, me apoia e me auxilia nos cuidados com nosso filho, sendo a base para ele nos momentos mais difíceis dos primeiros meses de sua vida, enquanto precisei me ausentar e me dedicar à pesquisa. Aos meus irmãos Alef e Josélia, que torcem e vibram em cada sonho realizado e sempre me encorajam nos maiores desafios. Ao meu Avô Aldemir Porteglio Calvo *in memoriam*, sempre buscarei honrar seus ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes, por me permitir ultrapassar os meus limites de conhecimentos, sair da “zona de conforto” e descobrir um novo horizonte envolvendo a pesquisa, a fisioterapia e as plantas medicinais. Proporcionou-me autonomia, conduzindo-me para que eu não esmorecesse nos momentos de maior fragilidade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Areolino Penna Matos, com suas sugestões enriquecedoras dentro da fisioterapia, da escrita, estatística e parceria em pesquisa experimental, minha eterna gratidão e admiração.

Ao pesquisador Dr. José Otávio Carrera Silva Jr., da Universidade Federal do Pará (UFPA) pelos esclarecimentos e experiência, proporcionando suporte para elaboração da nanoemulsão.

À pesquisadora Dra. Elaine, da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), pela imensa colaboração e fornecimento do óleo de copaíba. À colega de profissão, Mestre Marissol Rabelo de Almeida, pela colaboração com o equipamento de Ultrassom.

Aos professores Doutores Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto e Deyse de Souza Dantas, do qual tive o prazer de ter sido aluna no decorrer da formação, e pelas contribuições proporcionadas no exame de qualificação.

A todos os Professores com os quais tive a oportunidade de estudar no Mestrado que, mesmo sábios nas suas áreas específicas de estudo/pesquisa, labutam exemplarmente no âmbito da Educação, Pesquisa e Extensão.

A todos os colegas que ingressaram no Mestrado de Ciências da Saúde/UNIFAP, turma 2015, que me acolheram grávida, foram minha fortaleza nos momentos de maiores dificuldades e me motivaram a permanecer na luta frente às dificuldades: Zonia Reis, Eduardo Serrão, Tatiana Calandrini, Sônia Oliveira, Edna, Jemina, João, Mylner, Raquel, Sacid, Sergio, Gabbi, Naldo, Gardenia, Dianel, Bruno. A todos, meus votos de sucesso e sinceros agradecimentos.

Aos meus colaboradores e amigos de pesquisa e experimentação, Helison, Luan, Gisele, Nathália, que com seus conhecimentos foram fundamentais para desenvolvimento dos experimentos desta pesquisa. Às alunas de iniciação científica, voluntárias, Adriany, Camila e Dávyla, que diariamente se empenharam em cuidar dos animais e todo o apoio nos experimentos da pesquisa. À colega de profissão, Fisioterapeuta Mestre Marissol R. Almeida, pela fornecimento do equipamento de ultrassom e apoio, muito obrigada.

À minha ex-chefe, grande amiga, Larissa Santos Prazeres, pela compreensão e grande colaboração para que eu pudesse conciliar maternidade, trabalho, estudos, pesquisa e família. Que além de humana, compreende que a Mulher necessita de apoio para continuar sua qualificação, desejo a você a mesma sorte que tive por ter encontrado você em meu caminho.

**“A persistência é o menor caminho do êxito.”  
Charles Chaplin**

## RESUMO

O uso das plantas medicinais pelas populações tradicionais é rotineiro, sendo o óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) bastante utilizado no tratamento de inflamações. É difícil, contudo, sua permeação cutânea na forma *in natura*. A nanoemulsão do óleo de copaíba, por meio das propriedades hidrofílicas e partículas nanométricas, facilita a permeação do  $\beta$ -Cariofileno na barreira transdérmica. A baixa viscosidade da nanoemulsão, pode ser contornada pela associação de hidrogéis (Carbopol®) fortalecendo o uso tópico no tratamento inflamatório. A forma de apresentação do princípio ativo na formulação é determinante para a penetrabilidade dérmica, sendo as nanoemulsões mais eficazes quanto ao poder de penetração. O ultrassom de baixa frequência, por meio da fonoforese, é um importante recurso que facilita a permeabilidade cutânea de substâncias terapêuticas, tais como os óleos obtidos de plantas com propriedades anti-inflamatórias e nanoemulsões. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke, em sua forma *in natura*, e de sua nanoemulsão em gel (nanogel) associada à fonoforese e por via tópica na reparação muscular em ratos Wistar submetidos à lesão traumática. Elaborou-se uma nanoemulsão de copaíba, 5% óleo de copaíba, 5% Polissorbato 80 e 90% água. A nanoemulsão obtida em quintuplicata foi incorporada ao Carbopol® nas concentrações de 20% nanoemulsão e 80% Carbopol®. A pesquisa obedeceu a todos os aspectos éticos quanto ao uso de animais. Foram 24 animais (machos,  $\pm$  300g,  $\pm$  60 dias de vida) submetidos à prévia lesão do músculo gastrocnêmio direito por meio de impacto direto de um cilindro metálico (267g). Após esse procedimento, houve a divisão aleatoriamente em grupos, cada qual contendo quatro ratos: G1 (controle), G2 (óleo-resina tópico), G3 (nanogel tópico), G4 (ultrassom), G5 (fonoforese óleo-resina) e G6 (fonoforese nanogel). Foram realizadas cinco sessões nos grupos tratados. Para a análise da reparação muscular foram coletadas amostras sanguíneas para dosagem das enzimas plasmáticas Aspartato Aminotransferase (AST) e Creatina Quinase (CK), no 2º e no 6º dia após a lesão muscular. A análise estatística constou da aplicação do teste *t* de Student (intragrupo) e ANOVA, seguida do teste *a posteriori* de Tukey (intergrupo), ambos com significância de  $p \leq 0,05$ . Os resultados apontaram, quando comparados aos dados dos biomarcadores após a lesão, significativa redução de AST no G2 ( $p=0,0314$ ), G5 ( $p=0,0222$ ) e G6 ( $p=0,0314$ ), bem como da CK no G2 ( $p=0,0176$ ) e G6 ( $p=0,0396$ ). Quando comparado ao G1 no 6º dia após a lesão, G2, G5 e G6 apresentaram maiores reduções de AST ( $p=0,0155$ ). Assim, os tratamentos de aplicação tópica do óleo-resina, de sua associação à fonoforese e desta ao nanogel foram eficazes no experimento quanto à reparação da musculatura esquelética.

**Palavras-chave:** *Copaifera reticulata*, Fonoforese, inflamação muscular, nanoemulsão, óleo de copaíba.

## ABSTRACT

Medicinal plants are routinely used by traditional populations. Copaiba (*Copaifera reticulata* Ducke) oleoresin is often used to treat inflammations; however, it is not easily absorbed by the skin in its natural form. The nanoemulsion of copaiba oil, with its hydrophilic properties and nanometric particles, enhances  $\beta$ -Caryophyllene permeation through the transdermal barrier. The low viscosity of the nanoemulsion can be overcome by combining it with hydrogels (Carbopol<sup>®</sup>) to improve topical use to treat inflammation. The form of presentation of the active ingredient in the formulation determines skin permeation, with nanoemulsions being the most effective form. Low-frequency ultrasound, by means of phonophoresis, is an important resource that enhances skin permeability of therapeutic substances such as oils obtained from plants with anti-inflammatory properties and nanoemulsions. The objective of this study was to analyze the effect of the *C. reticulata* Ducke oleoresin in its natural form and of its nanoemulsion gel (nanogel), applied topically or combined with phonophoresis, on muscle repair in Wistar rats submitted to traumatic injury. A copaiba nanoemulsion was prepared with 5% copaiba oil, 5% Polysorbate 80, and 90% water. The nanoemulsion obtained in five replications was incorporated into the Carbopol<sup>®</sup> in concentrations of 20% nanoemulsion and 80% Carbopol<sup>®</sup>. The study adhered to all ethical principles regarding the experimental use of animals. Twenty-four animals (males,  $\pm$  300g,  $\pm$  60 days of life) were submitted to injury to the right gastrocnemius muscle by direct impact with a metal cylinder (267g). After this procedure, the animals were randomly divided into the following groups with 4 rats each: G1 (control), G2 (topical oleoresin), G3 (topical nanogel), G4 (ultrasound), G5 (oleoresin with phonophoresis) and G6 (nanogel with phonophoresis). The treated groups were submitted to five sessions. To analyze muscle repair, blood samples were collected for measurement of the plasma enzymes Aspartate Aminotransferase (AST) and Creatine Kinase (CK) on the 2<sup>nd</sup> and 6<sup>th</sup> days after muscle injury. Statistical analysis included Student's t test (intragroup) and ANOVA followed by Tukey's post hoc test (intergroup), both with significance of  $p \leq 0.05$ . The results showed a significant reduction in AST in G2 ( $p=0.0314$ ), G5 ( $p=0.0222$ ), and G6 ( $p=0.0314$ ) and in CK in G2 ( $p=0.0176$ ) and G6 ( $p=0.0396$ ). When compared to G1 on the 6<sup>th</sup> day after injury, G2, G5, and G6 presented greater AST reductions ( $p=0.0155$ ). Therefore, the topical application of the oleoresin and of the nanogel, combined with phonophoresis, were efficient in repairing skeletal muscle.

**Key words:** *Copaifera reticulata*, phonophoresis, muscle inflammation, nanoemulsion, copaiba oil.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A: Árvore da espécie <i>C. reticulata</i> ; B: Material botânico da espécie identificada como <i>C. reticulata</i> , coletado na FLONA, Belterra – Pa. ....	20
<b>Figura 2.</b> Esquematização das propriedades do óleo de copaíba. ....	20
<b>Figura 3.</b> A- Estrutura química do $\beta$ -Cariofileno; B – estrutura química do $\alpha$ -Copeno. ....	21
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática mostrando emulsões O/A e A/O. ....	27
<b>Figura 5.</b> A: Coleta do óleo-resina de copaíba na FLONA; B: Óleo-resina de <i>C. reticulata</i> Ducke ( <i>in natura</i> ). ....	36
<b>Figura 6.</b> Fluxograma das etapas de elaboração da formulação e análise físico-química do sistema final. ....	38
<b>Figura 7.</b> Fase aquosa e fase oleosa. ....	39
<b>Figura 8.</b> Aquecimento em agitação constante da fase oleosa. ....	39
<b>Figura 9.</b> A e B: Preparação da nanoemulsão de copaíba, após inversão da fase aquosa sobre a oleosa, controle da redução da temperatura em agitação constante; C: Emulsão final com aspecto leitoso e translúcido. ....	40
<b>Figura 10.</b> Manutenção do aspecto homogêneo e translúcido da formulação imediatamente após centrifugação, ausência de precipitados e separação de fases. ....	40
<b>Figura 11.</b> Amostra de cada nanoemulsão de copaíba identificada para leitura do potencial Zeta, índice de polidispersão e tamanho da partícula, no aparelho Zetasizer do Laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético. ....	41
<b>Figura 12.</b> A: Após zerada, a balança com o frasco para elaboração do nanogel. B: Pesou-se inicialmente a nanoemulsão de copaíba, seguida do gel de Carbopol® até completar 50g. C: Homogeneização dos componentes da formulação e aspecto final do nanogel. ....	43
<b>Figura 13.</b> Aspecto final das 4 formulações do piloto do nanogel de copaíba com distintas concentrações cada, identificadas de 1 a 4, qsp 50g, 25°C $\pm$ 2°C. ....	43
<b>Figura 14.</b> As quatro formulações obtidas de nanogel de copaíba, 24h após o preparo, mantidas em temperatura ambiente, após centrifugação. ....	44
<b>Figura 15.</b> Fluxograma das etapas e identificação dos procedimentos realizados com os animais. ....	46
<b>Figura 16.</b> Organização dos grupos da pesquisa (n=4/grupo) e procedimentos experimentais. ....	47
<b>Figura 17.</b> Equipamento para indução da lesão muscular traumática. ....	47
<b>Figura 18.</b> Posicionamento da pata centralizada (A) e momento do impacto sobre o ventre do músculo gastrocnêmio (B). ....	48
<b>Figura 19.</b> Visualização da pata posterior Direita lesionada: A - 24h após a lesão, com edema, ausência de fratura; B – 24h após o trauma, pata seccionada para visualização da presença de lesão muscular e hematoma. ....	48
<b>Figura 20.</b> Procedimentos realizados nas etapas que constituem a análise bioquímica dos marcadores de lesão muscular. ....	51
<b>Figura 21.</b> A: Formulação do nanogel de copaíba para utilização no experimento pré-clínico, com a concentração testada no piloto 2, qsp 25g. B: Aspecto gel branco translúcido com cheiro característico de copaíba. C: Nanogel de <i>C. reticulata</i> Ducke, piloto 2, em temperatura ambiente. ....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição das formulações utilizadas no ensaio para obtenção da nanoemulsão de copaíba por meio do método de inversão de fases O/A.....	38
<b>Tabela 2.</b> Formulação do nanogel de copaíba por meio da associação da nanoemulsão de <i>C. reticulata</i> com gel de Carbopol <sup>®</sup> .....	42
<b>Tabela 3.</b> Posologia utilizada de óleo-resina e nanogel de copaíba.....	48
<b>Tabela 4.</b> Caracterização química do óleo-resina de <i>C. reticulata</i> do período chuvoso – em destaque (*) os componentes majoritários.....	54
<b>Tabela 5.</b> Resultados da Nanoemulsão de <i>C. reticulata</i> Ducke, em quintuplicata: composição e PH, diâmetro da partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta.....	56
<b>Tabela 6.</b> Resultados estatísticos (em média, desvio padrão, variação percentual- $\Delta$ % e testes inferenciais) quanto aos valores de Aspartato Aminotransferase (AST) do 2º e 6º dias pós lesão muscular.....	63
<b>Tabela 7.</b> Resultados estatísticos (em média, desvio padrão, variação percentual- $\Delta$ % e testes inferenciais) quanto aos valores de Creatina Quinase (CK) do 2º e 6º dias pós lesão muscular.....	64

## LISTA DE ABREVEATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

FF: Fonoforese

US: Ultrassom

CK: Creatina kinase

*C.:* *Copaifera*

AST: Aspartato aminotransferase

FLONA: Floresta Nacional do Tapajós

PVC: Policloreto de Vinila

PdI: Índice de polidispersão

Pc: Peso corporal

W/cm<sup>2</sup>: Watts por centímetro quadrado

MHz: Megahertz

nm: nanômetro

PMF: Política de Medicamento Fitoterápico

OECD: Organization for Economic Co-Operation and Development

CB: receptores canabinóides

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$

IL-1 $\beta$ : interleucina-1-beta

U/L: unidades por litro

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

UFPA: Universidade Federal do Pará

Rpm: repetições por minuto

v/v: volume por volume

p/p: por peso

qsp: quantidade suficiente para

ERA: área de radiação efetiva

mm: milímetro

DMSO: dimetilsulfóxido

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1	PLANTAS MEDICINAIS .....	17
1.1.1	<i>Copaifera reticulata</i> Ducke: aspectos botânicos, químicos e farmacológicos .....	19
1.2	FONOFORESE .....	22
1.3	NANOEMULSÃO DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA .....	26
1.4	MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESÃO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1	MATERIAL BOTÂNICO .....	36
3.2	FORMULAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE COPAÍBA .....	37
<b>3.2.1</b>	<b>Preparação da nanoemulsão de <i>Copaifera reticulata</i></b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Teste de centrifugação da nanoemulsão de <i>Copaifera reticulata</i></b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Caracterização da nanoemulsão de <i>Copaifera reticulata</i></b> .....	<b>41</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Determinação do pH da nanoemulsão de <i>Copaifera reticulata</i></b> .....	<b>41</b>
3.3	NANOSEL DE <i>Copaifera reticulata</i> DUCKE .....	42
<b>3.3.1</b>	<b>Preparação nanogel de <i>Copaifera reticulata</i></b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Caracterização nanogel de <i>Copaifera reticulata</i></b> .....	<b>43</b>
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	45
<b>3.4.1</b>	<b>Animais utilizados na pesquisa</b> .....	<b>45</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Mecanismo da lesão muscular</b> .....	<b>47</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Protocolos terapêuticos empregados</b> .....	<b>49</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Eutanásia</b> .....	<b>50</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Análise bioquímica dos marcadores de lesão muscular</b> .....	<b>50</b>
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	51
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>
4.1	COLETA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA <i>Copaifera reticulata</i> .....	53
4.2	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE COPAÍBA .....	56
4.3	NANOSEL DE <i>Copaifera reticulata</i> DUCKE .....	59
<b>4.3.1</b>	<b>Preparação do nanogel de <i>Copaifera reticulata</i></b> .....	<b>59</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Caracterização do nanogel de <i>Copaifera reticulata</i></b> .....	<b>60</b>
4.4	ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS MARCADORES DE LESÃO MUSCULAR .....	63
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>

<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de elementos da natureza pelo homem é historicamente reconhecido como condição nata de sobrevivência da espécie, seja por meio da busca por alimentos, moradia e cura de enfermidades. Antes da realização dos estudos científicos, o conhecimento do senso comum das populações tradicionais já tratava como rica as possibilidades contidas na flora existente. Este conhecimento, tradicionalmente repassado de geração em geração, era aperfeiçoado de acordo com os relatos de resultados positivos diante do uso de plantas por enfermos.

O “remédio caseiro” estaria aprovado quando a queixa era solucionada, entretanto, quando apareciam efeitos colaterais, eram testados com outras doses e maneiras de apresentação, até ser encontrado uma “dose correta”. Das experiências vividas no conhecimento popular surge a necessidade de investigar, por meio de ensaios pré-clínicos, controlados, o uso das plantas medicinais. A partir de então, cabe à Ciência validar tais princípios ativos, formulações, indicações, efeitos.

A Ciência vem então complementar e desvendar o que já havia de indicações terapêuticas para as diversas formas e apresentações de óleos, chás, banhos, xaropes, géis provenientes da medicina tradicional e plantas medicinais.

As plantas medicinais tem sido alvo de pesquisas recorrentes em função da necessidade de comprovação da aplicação terapêutica de seus princípios ativos, até porque são utilizadas diante do conhecimento popular.

No Brasil, o Ministério da Saúde incentiva a participação da ciência e tecnologia para descobertas e comprovações de fitoterápicos e implantação destes no Sistema Único de Saúde (SUS), em razão da imensa biodiversidade encontrada no território nacional e a infinita gama de possibilidades terapêuticas descritas pelas populações tradicionais de cada região.

Como exemplo, elenca-se a literatura que aborda a propriedade anti-inflamatória da copaíba, comprovada e utilizada na prática clínica de profissionais da saúde, cujas propriedades terapêuticas foram inicialmente visualizadas nas comunidades tradicionais. Destacando-se suas propriedades anti-inflamatórias, na Fisioterapia, enquanto Ciência, a utilização deste fitoterápico é entendida como um recurso para acelerar os processos de reparação tecidual, além de associar à Fonoforese (FF) com ultrassom de baixa frequência para melhor penetração do produto, potencializado a penetração na barreira dérmica da pele (ALMEIDA, 2014; BRITO et al., 2006; LIMA, 2015; MAIA-FILHO et al., 2011).

Dados recentes destacam a vantagem do tratamento por via tópica com nanoemulsão de copaíba, visto que, o tamanho reduzido da partícula facilita a permeação da barreira transdérmica e causa maior retenção do princípio ativo  $\beta$ -Cariofileno na derme, portanto, ressalta-se esta formulação, como uma alternativa ao tratamento de inflamação por via tópica (LUCCA et al., 2015; DIAS et al., 2014; KELMANN, 2012).

A nanoemulsão, contudo, apresenta baixa viscosidade. Por ser de aspecto líquido, há dificuldade na sua aplicação cutânea. Por isso, a associação dela ao gel tem sido uma alternativa voltada à obtenção de maior viscosidade do sistema, proporcionando a sua aplicação tópica (KELMANN, 2012; LUCCA, 2013).

Lucca et al. (2015) realizaram um estudo *in vitro* de elaboração de nanoemulsão de copaíba e sua incorporação ao hidrogel de Carbopol®. Em orelha suína, testaram a permeação e retenção do  $\beta$ -Cariofileno. Estudos *in vivo* para testar a atividade anti-inflamatória da nanoemulsão de copaíba por via tópica, contudo, ainda não foram encontrados.

Quanto à FF, Lee e Zhou (2015), em estudo *in vitro*, investigaram os parâmetros de ultrassom para FF associados a partículas em escala nanométrica, a fim de constatarem qual atingiria maior permeação cutânea, sendo observado que a eficiência da FF aumentou com a intensidade acústica, o ciclo de trabalho e a duração da sonicação. Partículas menores obtiveram maior permeação cutânea ( $62,6\% \pm 5,4\%$  para 60nm e  $11,9\% \pm 1,1\%$  para nanoesferas de poliestireno 840nm, com 30 minutos de sonificação, a  $0,5 \text{ W/cm}^2$  e um ciclo de trabalho de 100%).

Nota-se ainda que não foi investigado o potencial da FF associado à nanoemulsão de copaíba incorporada em hidrogel. Por conta disso, é oportuno serem analisados os efeitos terapêuticos, *in vivo*, desta modalidade e comparar a estudos prévios que associaram a FF de óleo-resina na sua forma *in natura*.

Sobre a pele, a aplicação de medicamentos, fitoterápicos, óleos naturais, é uma alternativa não invasiva de introdução de fármacos em organismos vivos. Vale salientar, contudo, que a pele apresenta propriedades físicas que bloqueiam e dificultam a permeação e ação de determinados princípios ativos em decorrência da apresentação física deles (LUCCA, 2013).

O uso de plantas medicinais, dadas suas propriedades anti-inflamatórias, tem sido constante por comunidades tradicionais e essa característica tem sido gradativamente tomada como objeto de estudos científicos. O óleo-resina de *C. reticulata* Ducke apresenta

potente ação anti-inflamatória, porém sua permeação cutânea na forma *in natura* nem sempre é atingida com êxito.

Desta forma, neste estudo buscou-se desenvolver um nanogel de *C. reticulata* e comparar sua associação à fonoforese e ao uso tópico na reparação muscular em ratos Wistar submetidos à lesão traumática da musculatura esquelética.

## **1.1 PLANTAS MEDICINAIS**

---

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

No Brasil, o Ministério da Saúde, com a publicação da Política Nacional De Plantas Medicinais e Fitoterápicos, apresenta as diretrizes, objetivos e o incentivo à política pública do uso da medicina tradicional, plantas, fitoterapia, impulsionando instituições de pesquisa para a inserção de profissionais de saúde interligados ao usuário com a finalidade de desenvolver investigações (BRASIL, 2006).

A diretriz, Política de Medicamento Fitoterápico 7 (PMF 7), incluso na Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, descreve o incentivo à pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país. Adotando como medida, o incentivo à realização de pesquisas com protocolos envolvendo fitoterapia. Ressaltando a promoção da pesquisa e desenvolvimento tecnológico, com base no uso tradicional das plantas medicinais, priorizando as necessidades epidemiológicas da população, com ênfase nas espécies nativas e naquelas que estão sendo utilizadas no setor público e nas organizações dos movimentos sociais (BRASIL, 2006).

Como resgate a este cenário cabe citar o uso do óleo de copaíba por pessoas com inflamações, infecções, fungos, lesões de pele, traumas musculares entre outras enfermidades. Elas levavam ao uso empírico deste produto *in natura* e hoje suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, bactericidas, cicatrizantes, inseticida, fungicidas, entre outras, já estão comprovadas (LUCCA et al., 2015; MIRANDA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2014).

As equipes multidisciplinares de profissionais pesquisadores investigam, conforme sua especificidade de área do conhecimento, as propriedades medicinais de determinada espécie que, de forma direta ou indireta, são estimuladas pela cultura popular tradicional. As mais diversas áreas, como botânica, farmacologia, medicina, fisioterapia, química, nutrição, entre outras, trabalham na busca de valorar o amplo conhecimento proveniente da inestimável fonte mundial de medicina natural (MACIEL et al., 2002).

No Brasil destaca-se a região Amazônica com sua ampla diversidade de matérias primas renováveis do tipo óleos vegetais que podem ser extraídos da rica biodiversidade em espécie vegetal existente, de onde se extrai o produto *in natura* de caules e sementes oleaginosas com as mais variadas composições químicas e propriedades físico-químicas (PESCE, 2009).

Estudos com plantas medicinais da Amazônia devem ser ampliados e reavaliados, visto a notória importância destes produtos naturais para as populações. Coelho-Ferreira

(2009) argumenta que há de se refletir sobre o uso terapêutico de tais recursos, em especial nos países em que o principal meio de cura, prevenção e tratamento de saúde decorre de recursos vegetais. A importância de refletir sobre o uso desses produtos, estimulado pelo conhecimento popular, ultrapassa o campo econômico e amplia as possibilidades de se oferecer a biossegurança em relação ao uso medicinal das variadas espécies.

### 1.1.1 *Copaifera reticulata* Ducke: aspectos botânicos, químicos e farmacológicos

As copaíbas são árvores nativas da região tropical da América Latina e também da África Ocidental. Na América Latina são encontradas espécies na região que se estende do México ao norte da Argentina (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

A árvore de copaíba pertence ao gênero *Copaifera* L. e possui uma variedade de 72 espécies, destas, dezesseis são encontradas exclusivamente no Brasil. Segundo o sistema de classificação botânica de Engler, o gênero *Copaifera* L. pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Caesalpinoideae*, gênero *Copaifera*. Enquanto que no sistema de classificação de Cronquist, este gênero também pode ser classificado como da família *Caesalpiniaceae*, ou ainda *Fabaceae* (LUCCA, 2013; LUCCA et al., 2015; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; TAPPIN et al., 2004).

Dentre as espécies de copaíba mais frequentes no Brasil, elenca-se *C. officinalis* L. (norte do Amazonas, Roraima, Colômbia, Venezuela e San Salvador), *C. guianensis* Desf. (Guianas), *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazônia), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina e Paraguai), *C. coriacea* Mart. (Bahia), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará). Destas, a espécie *C. reticulata* corresponde à 70% do total de produção de óleo (MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008).

A espécie *C. reticulata* ocorre apenas no Brasil, em especial na Amazônia brasileira, localizada em mata de terra firme, como também às margens inundáveis de cursos d'água, ocorrendo tanto em solos argissolos como arenosos (CORREA, 1932). A maior prevalência desta espécie é no estado do Pará, encontra-se, ainda, à sudoeste do Amapá, sudeste de Roraima e norte de Mato Grosso (Figuras 1A e 1B) (MARTINS-DA-SILVA; PEREIRA; LIMA, 2008).

**Figura 1.** A: Árvore da espécie *C. reticulata*; B: Material botânico da espécie identificada como *C. reticulata*, coletado na FLONA, Belterra – Pa.

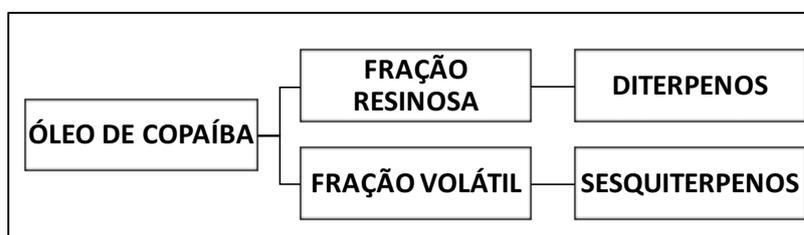


Fonte: Batista (2013).

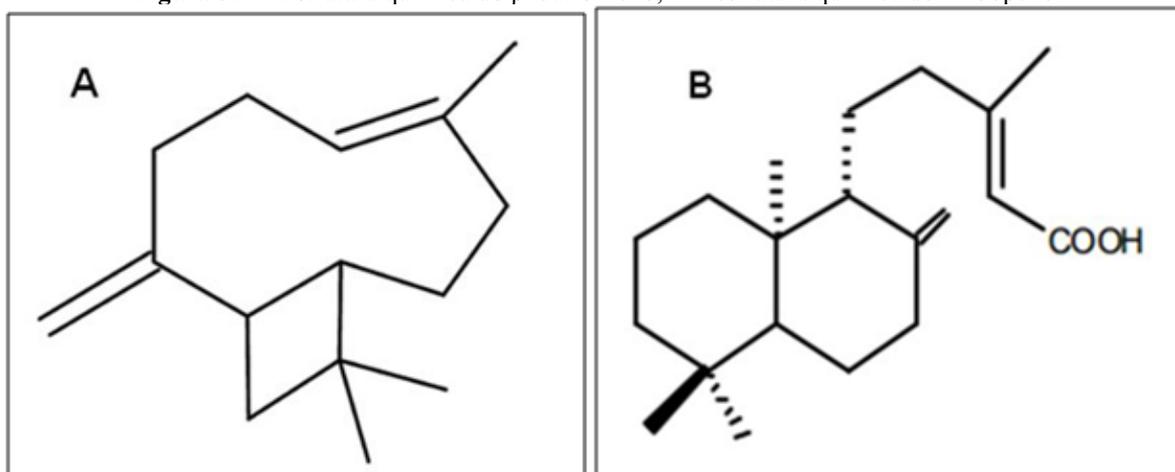
Na região da Amazônia a população tradicional utiliza o óleo de copaíba, extraído do caule da árvore por canais secretores, tanto para fins comerciais como terapêuticos. O produto *in natura* é um óleo de aspecto untuoso, resinoso, amarelo ou marrom, cujas as propriedades terapêuticas mais abordadas pela medicina popular são: anti-inflamatório, analgésico, bactericida, cicatrizante, inseticida e anti-edêmico (LUCCA, 2013; LUCCA et al., 2015; MIRANDA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2014; TAPPIN *et al*, 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

O óleo da copaíba é constituído de fração volátil (sesquiterpenos - como  $\beta$ -Bisaboleno e  $\beta$ -Cariofileno) e fração resinosa (diterpenos - como o ácido copálico). Por estas duas propriedades, o óleo é denominado de óleo-resina (TAPPIN et al., 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007), como esquematizado na Figura 2. As estruturas químicas dos compostos, por sua vez, estão representadas nas Figuras 3A e 3B.

**Figura 2.** Esquematização das propriedades do óleo de copaíba.



**Figura 3.** A- Estrutura química do  $\beta$ -Cariofileno; B – estrutura química do  $\infty$ -Copeno.



Fonte: Veiga Junior et al. (2007).

Atualmente já se sabe que há variação na composição química dos óleos conforme a estação do ano (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI; 2006). Tratando-se de uma única árvore, seus compostos não se alteram, porém sua concentração no período verão-inverno sofre variação, como foi demonstrado com a análise do óleo da *C. multijuga* Hayne (VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Na Amazônia o uso do óleo de copaíba é rotineiro na medicina popular, em especial para o combate de enfermidades que envolvam inflamação, sendo o componente majoritário o  $\beta$ -Cariofileno, responsável pela atividade anti-inflamatória (LUCCA, 2013; SACHETTI et al., 2009).

Sachetti et al. (2009), em um estudo de toxicidade oral aguda e efeitos neurotóxicos do óleo-resina da espécie *C. reticulada* Ducke em ratas Wistar, mostraram que nas doses 300 e 2000 mg/kg pc do produto administrado por gavagem não houve mortalidade/morbidade, sinais clínicos de toxicidade ou neurotoxicidade, alteração no consumo de ração ou alteração no peso corpóreo (pc). Foram avaliadas as funções motoras, sensorial e comportamental para efeitos neurotóxicos das doses testadas. É possível indicar uma margem de segurança para administração deste óleo como agente terapêutico, visto que a dose letal aguda foi estimada como maior que 2000 mg/kg pc e classificada como categoria 5, segundo o Guia OECD 423.

## **1.2 FONOFORSE**

---

## 1.2 FONOFORESE

A fonoforese (FF), também denominada sonoforese (SF), consiste na aplicação direta do ultrassom (US) terapêutico, associado a um agente com propriedades farmacológicas ativas e permeação deste aos tecidos adjacentes a partir do extrato córneo. Sendo uma forma de introdução medicamentosa, cosmética, fitoterápica, alternativa a via oral e injetável, quando se almeja a terapêutica local com determinado princípio ativo (BORGES, 2006; GUIRRO; GUIRRO, 2002).

O US terapêutico de baixa frequência é objeto de estudo ao longo de décadas devido sua propriedade física em transpor a barreira cutânea por meio de frequências sonoras, dentre as quais já está comprovada a sua atuação em permeação de princípios ativos, através da FF (LEE; ZHOU, 2015; POLAT; BLANKSCHTEIN; LANGER, 2010). Busca-se esclarecer, atualmente, a permeabilidade cutânea frente a diferentes substâncias ativas, em especial fitoterápicos, campo de interesse entre pesquisadores da área da saúde, tais como farmacêuticos, fisioterapeutas e dermatologistas (CAMPOS; KASSISSE; SPADARI, 2004).

Lee e Zhou (2015) constataram em estudo *in vitro*, ao compararem a aplicação da FF com nanoemulsão, que os valores paramétricos e o tamanho da partícula influenciam na eficiência da FF, sendo que partículas menores apresentam maior facilidade de transpor a barreira transdérmica, aumentando a permeação cutânea proporcionalmente ao crescimento dos parâmetros de FF, como intensidade, tempo e ciclo de trabalho.

A facilitação de permeação do fármaco na barreira cutânea por meio da FF é resultante do aumento da permeabilidade da membrana celular pela vibração mecânica das ondas do US, conhecida como cavitação, desorganizando o extrato córneo pela desnaturação da queratina e remoção de células mortas da pele. Com isso, diminui-se a resistência cutânea e é possibilitada a penetração do princípio ativo, independente da polaridade deste, visto que o efeito é mecânico e não iônico (BORGES, 2006; LEE; ZHOU, 2015).

O fenômeno da cavitação instável promove a introdução do fármaco na pele a partir do rompimento das bolhas ar/gás. A cavitação é um fenômeno mecânico proveniente das ondas ultrassônicas no tecido. Conforme a oscilação atinge um feixe de tecido, as células e moléculas se agitam de maneira cíclica, proporcional à frequência, intensidade e tempo da onda ultrassônica, que geram bolhas de ar entre estas moléculas. A forma instável deste

fenômeno é decorrente de uma agitação molecular mais acelerada e com rompimento das microbolhas de ar (BORGES, 2006).

Mediante a penetração da vibração sonora no tecido subjacente, a onda mecânica sofre atenuação. Este fenômeno decorre da conversão da energia mecânica em energia térmica, promovendo aumento da temperatura tecidual conforme sua absorção, bem como reflexão e refração do feixe de onda (JESUS; FERREIRA; MENDONÇA, 2006).

Alguns estudos avaliaram os efeitos da fonoforese com plantas medicinais e medicamentos convencionais, principalmente para ensaios anti-inflamatórios e anti-edematogênicos (ALFREDO et al., 2008; BRITO et al., 2006; FONTOURA, 2007; LIMA, 2015; SILVEIRA et al., 2010). Em sua maioria é utilizado o princípio ativo da planta medicinal associado ao gel com comparação ao extrato natural da planta e com fármacos com ação comprovada para a atividade avaliada.

Almeida (2014) ao investigar o potencial farmacológico da *Myrcia sylvatica* (G. Mey.), popularmente conhecido como *pedra-ume-caá*, através da atividade anti-edematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *M. sylvatica*, demonstrou na aplicação por FF que houve redução de até 66,9% do edema na pata de rato Wistar, induzido por carragenina, na dose de 270 mg/kg.

Em dois estudos com modelos experimentais com ratos Wistar, Lima (2015) e sua investigação da atividade anti-inflamatória de óleo-resina de *C. paupera* associada à FF e Alfredo et al. (2008) com investigação dos efeitos da FF com arnica, identificaram que a FF funcionou como agente pró-inflamatório. Pela análise histológica foi possível constatar um avanço da fase inflamatória, com maior concentração de células inflamatórias no local da lesão.

Uma revisão bibliográfica com vários experimentos demonstrou que o US é uma forma não invasiva de tratamento na reparação de lesões teciduais agudas, sendo o método pulsátil com baixa intensidade um promotor de efeitos benéficos com menor risco de lesão tecidual. Apesar disso, surgem questionamentos a respeito de suas diferentes modalidades terapêuticas (OLSSON et al., 2008).

Koeke (2003) avaliou o processo de reparação tecidual no tendão de rato, comparou a FF, o US isolado e uso tópico de hidrocortisona, com os parâmetros do US e FF em modo pulsado, frequência de 1MHz, intensidade de 0,5W/cm<sup>2</sup>, por cinco minutos cada aplicação. Observou, por meio de microscopia de luz polarizada, que houve aceleração do processo de reparo tecidual e penetração transcutânea da hidrocortisona a 10% por meio da

FF, com reorganização do colágeno. Os mecanismos de ação da FF, no entanto, não ficaram esclarecidos, sugerindo-se o aumento da temperatura e a cavitação como possíveis formas de permeação transcutânea do fármaco.

Fontoura (2007), ao avaliar as propriedades anti-inflamatórias da arnica (*Lychnophora ericoides*) associada ao uso da FF em ratos Wistar no tratamento de lesões musculares, verificou que o grupo tratado com FF e gel de arnica apresentou significativa melhora na redução do edema, quando comparado aos demais grupos, apontando o potencial da FF para este modelo de lesão.

### **1.3 NANOEMULSÃO DO ÓLEO- RESINA DE COPAÍBA**

---

### 1.3 NANOEMULSÃO DO ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA

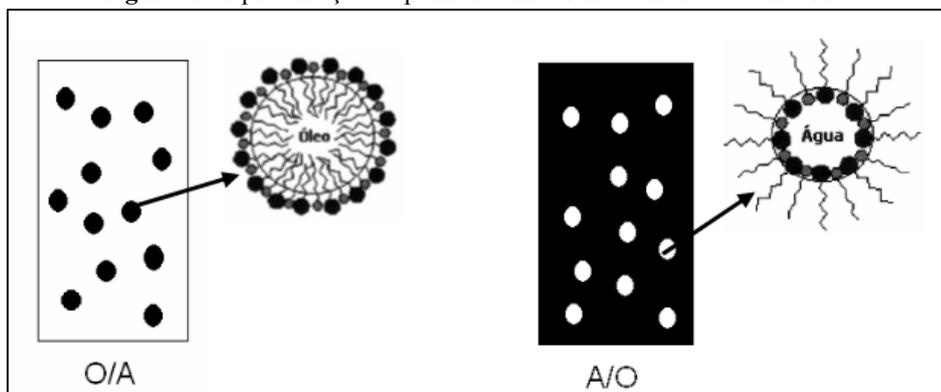
A investigação do conhecimento popular pré-existente sobre plantas medicinais tem notória importância para a comunidade científica e para a população mediante a necessidade de descobertas das moléculas biologicamente ativas e novos princípios ativos (ALMEIDA, 2014; MAIA-FILHO et al., 2011; SILVA et al., 2014).

Com o avanço da tecnologia surgem as inovações em fórmulas de apresentação dos princípios ativos; buscam-se cada vez mais o aperfeiçoamento para melhor biodisponibilidade do fármaco, como é o caso das emulsões. Estas são dispersões de pelo menos dois líquidos imiscíveis, a partir de um sistema termodinamicamente instável estabilizado cineticamente, sendo suas características dependentes da termodinâmica, método de preparo, perfil dos componentes e respectiva ordem de adição (FERNANDEZ et al., 2004; PACHECO, 2014; KELMANN, 2012; SAJJADI, 2006).

Três componentes formam a estrutura da emulsão: água, óleo e tensoativo. Seu perfil físico-químico determina o comportamento do sistema. Por sua vez, a emulsão apresentará gotículas da fase dispersa/interna, revestida pela fase contínua/externa (FERNANDEZ et al., 2004; FORGIARINI et al., 2001; OLIVEIRA, 2008; SAJJADI, ZERFA, BROOKS, 2003).

A Figura 4 representa a classificação das emulsões simples: água em óleo (A/O), as gotículas da fase aquosa estão envoltas numa fase contínua oleosa; e óleo em água (O/A), as gotículas da fase oleosa estão envoltas numa fase contínua aquosa (FORGIARINI et al., 2001).

**Figura 4.** Representação esquemática mostrando emulsões O/A e A/O.



Fonte: Oliveira (2008, p. 16).

Em se tratando de óleos de origem vegetal, Lucca et al. (2015) mostraram que é mais eficaz a penetração da barreira transdérmica do princípio ativo da copaíba,  $\beta$ -Cariofileno (potente anti-inflamatório), quando utilizado em sistema de nanoemulsão. Quando comparado ao óleo de copaíba *in natura*, a nanoemulsão apresenta vantagem, devido à redução de sua molécula e a característica hidrofílica do sistema, uma vez que o óleo apresenta caráter untuoso e concentrado, somado as propriedades hidrofóbicas deste, dificultado sua penetração em aplicação sobre a pele.

Segundo Gertsch et al. (2008), a ação anti-inflamatória do  $\beta$ -Cariofileno pode ser explicada pela atuação nos receptores canabinóides (CB), sendo agonista do receptor CB2, os quais se encontram nos tecidos periféricos, inibindo a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Esta busca foi confirmada recentemente por meio de testes *in vivo* e *in vitro* por Paula-Freire et al. (2013), acrescentando que este composto pode também atuar pela via dos opióides, inibindo a dor aguda e crônica.

A nanoemulsão apresenta vantagem quanto à penetração cutânea. Em se tratando de formulações com óleo, além do caráter hidrofílico, as partículas por serem menores que a forma *in natura*, apresentam maior superfície de contato com as camadas da pele. Uma desvantagem desse sistema com óleo é a baixa viscosidade, contudo a incorporação da nanoemulsão de óleo ao hidrogel é uma solução eficaz (DIAS et al., 2014; KELMANN, 2012; LUCCA, 2013).

Lucca (2013) verificou a permeação cutânea da nanoemulsão do óleo de copaíba incorporada ao hidrogel, testando dois agentes geleificantes: Carbopol 980<sup>®</sup> e quitosana. A nanoemulsão do óleo de copaíba com o hidrogel de Carbopol 980<sup>®</sup> demonstrou ser o melhor agente geleificante, já que permaneceu estável durante o tempo testado e aumentou a penetração de  $\beta$ -Cariofileno na pele, especialmente na derme, camada de interesse no tratamento da inflamação pela via tópica. Lucca et al. (2015), a partir destes resultados, analisaram a permeação transdérmica e retenção do  $\beta$ -Cariofileno da nanoemulsão de óleo de copaíba (*C. multijuga* Hayne) por aplicação tópica.

Lucca (2013) e Lucca et al. (2015) constataram que o uso do óleo de copaíba da espécie *C. multifuga* Hayne, em nanoemulsão e em hidrogel, é viável no tratamento de inflamações por via tópica, sendo necessária a avaliação anti-inflamatória *in vivo* do óleo de copaíba nanoemulsionado associado à hidrogel.

Silva (2014), ao testar a atividade anti-inflamatória da nanoemulsão de copaíba (*C. multifuga*) em modelo de edema de pata em ratos Wistar, constatou que a atividade anti-

inflamatória da nanoemulsão contendo 6,1% do óleo de copaíba, ocorreu na primeira hora, com redução do edema superior ao controle positivo, ao óleo de copaíba *in natura*, e à nanoemulsão com 10,6% de óleo de copaíba. Quanto à atividade mutagênica da nanoemulsão de copaíba, constatou que, nas concentrações do óleo de copaíba (10,6% e 6,1%) de ambas as formulações, não apresentaram potencial mutagênico no teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Esse estudo evidencia que, por maior que seja a concentração de  $\beta$ -Cariofileno no óleo de copaíba *in natura* comparado à nanoemulsão deste, ainda assim a atividade anti-inflamatória destas formulações foram superiores ao óleo, pela atuação aguda, nas primeiras três horas da inflamação, inibindo rapidamente os primeiros mediadores químicos, resultando em redução do edema.

Oliveira et al. (2004) explicam que possivelmente a presença dos tensoativos na nanoemulsão seja responsável pela desorganização dos lipídeos presentes no extrato córneo, agindo como um facilitador da permeação do composto majoritário da nanoemulsão na pele, potencializando o seu efeito farmacológico.

## **1.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESÃO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO**

---

#### 1.4 MARCADORES BIOQUÍMICOS DE LESÃO EM MÚSCULO ESQUELÉTICO

A leitura bioquímica da concentração plasmática de algumas proteínas miofibrilares é utilizada para identificar e quantificar a magnitude da ocorrência de lesão em músculo esquelético (RISSI, 2014; SORICHTER et al., 1997; SUSSAI, 2008).

Vale ressaltar a importância da leitura das proteínas plasmáticas, creatina kinase (CK), a aspartato aminotransferase (AST), a lactato desidrogenase, a mioglobina e a troponina (KASPER; TALBOT; GAINES, 2002).

Uma alteração das concentrações destas proteínas, em especial CK e AST, em níveis plasmáticos, constitui uma indicação de que as células musculares esqueléticas estão lesionadas. O rompimento das membranas celulares aumenta a permeabilidade das membranas, ocasionando extravasamento para o meio extracelular destas proteínas (KAUHANEN; LEIVO; MICHELSSON, 1993).

Das proteínas citadas, na prática clínica a CK muscular (CK-MM) é o marcador mais usado para diagnosticar uma lesão muscular esquelética (RISSI, 2014; SUSSAI, 2008). Esta enzima é amplamente utilizada como biomarcador de estresse e alteração na atividade muscular (SUSSAI, 2008).

A elevação sérica da CK é atribuída a danos teciduais, podendo resultar em aumento na permeabilidade da membrana celular, entre outros fatores, devido à peroxidação lipídica. Tem sido verificado que as concentrações circulantes de CK são alteradas conforme as mudanças nas variáveis volume e intensidade de treinamento (HALSON; JEUKENDRUO, 2004; SUSSAI, 2008).

Ao avaliar o grau de lesão muscular em ratos Wistar, após 24 horas de exercício físico intenso (modelo de natação forçada), Sussai (2008), constatou uma elevação no nível plasmático em animais que não receberam terapia, quando comparados com os animais submetidos à terapia de laser de 660nm no músculo, com média de CK 599,45 U/L e 157,14 U/L, respectivamente.

A enzima AST, por sua vez, aumenta concomitantemente com a CK, quando ocorrem danos musculares. Existe em muitos tecidos do corpo, com duas isoformas, no citosol e na mitocôndria, sendo mais abundante no fígado, nos eritrócitos e nos músculos esquelético e cardíaco. Por esse motivo, por ser uma enzima mitocondrial e citosólica, necessita de uma lesão maior para ser liberada na corrente sanguínea. Em contrapartida, a CK,

por ser citosólica e de tamanho pequeno, consegue ultrapassar a membrana celular, mesmo que não exista um dano tecidual grande. Seu uso é como indicador de dano nesses tecidos (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Frente à lesão muscular esquelética, o aumento da AST ocorre de maneira mais lenta quando comparada à CK, sendo que os valores máximos desta enzima são encontrados no sangue 24 a 36 horas após a ocorrência da lesão (BAPTISTELLA, 2009).

## **2 OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver nanogel de óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke e avaliar a atividade deste associado à fonoforese no processo de reparação da lesão muscular esquelética em ratos Wistar.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Formular a nanoemulsão, a partir do óleo de *C. reticulata* Ducke;
- Formular um nanogel de *C. reticulata* Ducke, a partir da nanoemulsão obtida;
- Mensurar os marcadores bioquímicos de lesão muscular esquelética, em ratos wistar, com intervenção do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke, tópico e associado à fonoforese;
- Mensurar os marcadores bioquímicos de lesão muscular esquelética, em ratos wistar, com intervenção do nanogel de *C. reticulata* Ducke, tópico e associado à fonoforese;

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa desenvolvida é de natureza aplicada, com abordagem quantitativa, explicativa, experimental e bibliográfica.

Os experimentos foram iniciados e desenvolvidos após aprovação do Comitê de Ética de Uso Animal da Universidade Federal do Amapá (CEUA/UNIFAP), sob o protocolo nº. 0017/2015 (ANEXO I).

As atividades experimentais foram desenvolvidas no Laboratório de Toxicologia/Química Farmacêutica da UNIFAP, sob a coordenação da Professora Mestre Mayara Amores Teles Fukushima, no período de janeiro a agosto de 2016.

#### 3.1 MATERIAL BOTÂNICO

O óleo-resina da *Copaifera reticulata* Ducke (Figuras 5A e 5B) foi fornecido pela Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), proveniente da Floresta Nacional do Tapajós (FLONA) localizada no Km 83 da BR-163, no município de Belterra-Pa (latitude 3° S 07' 36,2528517843, longitude 54° W 99' 59,896691144"). Sua coleta ocorreu no período de abril de 2014, correspondendo na região ao período do ano de maior precipitação pluviométrica. O óleo-resina apresentou aspecto óleo transparente, coloração amarelo-claro, límpida e pouco viscosa (Figura 5B).

**Figura 5.** A: Coleta do óleo-resina de copaíba na FLONA; B: Óleo-resina de *C. reticulata* Ducke (*in natura*).



Fonte: A – LIMA (2015); B – Própria autora, 2016.

A utilização desse óleo no presente estudo foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, pelo protocolo nº. 52651-1 de 16/02/2016 (ANEXO II). A espécie em uso está identificada botanicamente como *C. reticulata* Ducke e suas excicatas estão depositadas no Laboratório de Botânica-Herbário da Embrapa Amazônia Oriental (NID: 69/2011).

### 3.2 FORMULAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE COPAÍBA

Os experimentos para formular a nanoemulsão, a partir do óleo de copaíba da espécie *C. reticulata*, ocorreram no período de julho de 2016, no Laboratório de P&D Farmacêutico e Cosmético, sob a coordenação do Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Jr., da Universidade Federal do Pará (UFPA), em Belém-Pa.

Adotou-se o método de baixa energia de emulsificação, conforme Fernandez et al. (2004), Rodrigues et al. (2014), Dias et al. (2014) e Oliveira (2008), que abordam o método de inversão de fases, O/A e A/O, para obtenção das nanoemulsões. Isso porque é possível serem obtidas formulações estáveis com partículas nanométricas por meio das propriedades físico-químicas do sistema.

Utilizou-se para estas formulações tensoativo não-iônico e hidrofílico, por ser largamente utilizado em formulações farmacêuticas, visto sua estabilidade frente aos demais compostos adicionados, e principalmente a baixa toxicidade.

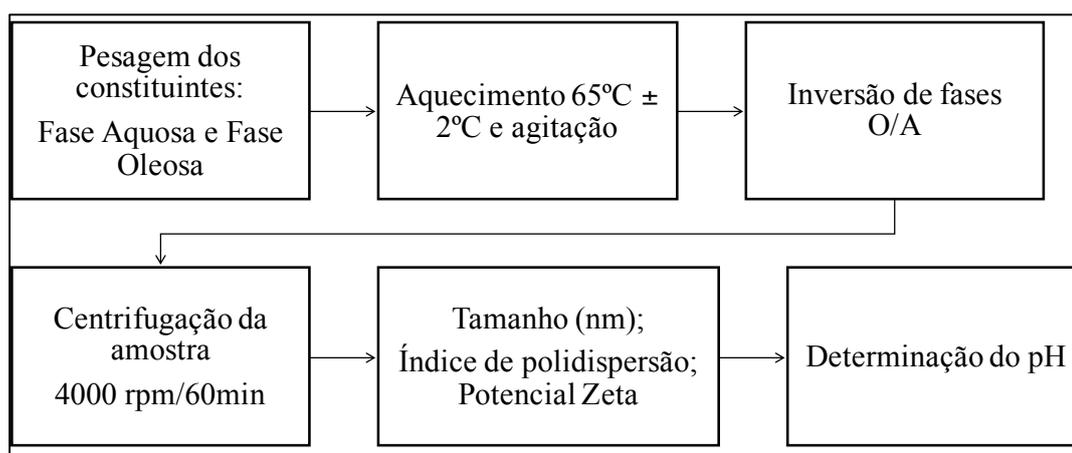
Foram formuladas diversas emulsões com diferentes concentrações da fase oleosa e fase aquosa, testando-se diferentes proporções de cada constituinte das fases até atingir uma emulsão estável com obtenção de glóbulos de óleo de copaíba de tamanho reduzido imersos na fase contínua.

As concentrações foram elaboradas com base nos protocolos de Rodrigues et al. (2014) e de Oliveira (2008). Tratam de estudos sobre nanoformulações com copaíba de distintas espécies que obtiveram como produto final nanoemulsão de copaíba.

### 3.2.1 Preparação da nanoemulsão de *Copaifera reticulata*

A Figura 6 ilustra a sequência das etapas realizadas para obtenção das formulações, centrifugação e caracterização.

**Figura 6.** Fluxograma das etapas de elaboração da formulação e análise físico-química do sistema final.



- Etapa 1 - Pesagem dos constituintes:

Para a realização dos procedimentos de cada etapa necessitou-se de vidrarias, balança analítica de precisão, agitador magnético, bailarina, termomêtro e banho maria.

Em seguida, para a nanoemulsão cada componente (óleo de copaíba, tensoativo e água ultrapura) foi pesado em balança analítica de precisão, conforme disposto na Tabela 1 e ilustrado na Figura 7.

**Tabela 1.** Composição das formulações utilizadas no ensaio para obtenção da nanoemulsão de copaíba por meio do método de inversão de fases O/A.

Componentes		Quantidade em % (p/p)
Fase oleosa	Óleo de copaíba	5,0
	Tween® 80	5,0
Fase aquosa	Água ultrapura	90,0

Tween® 80 - Tensoativo hidrofílico: Monooleato de polioxietieno Sorbitano / Polissorbatato 80.

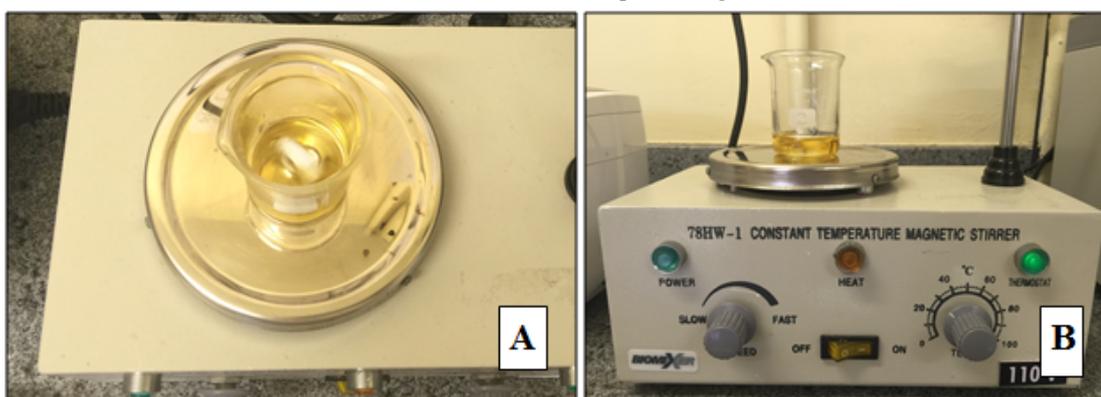
**Figura 7.** Fase aquosa e fase oleosa.



- Etapa 2 - Aquecimento e agitação dos componentes:

Cada fase foi aquecida separadamente até atingir a temperatura de  $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa (água ultrapura) foi aquecida em banho-maria, sob monitoramento frequente da temperatura com termômetro de mercúrio. Para a fase oleosa (tensoativo e óleo de copaíba) disposta em um Becker, elevou-se a temperatura em uma chapa aquecedora, controlando-se grau em grau com termômetro de mercúrio, mantendo-a sob agitação constante por meio do agitador magnético e bailarina (Figuras 8A e 8B).

**Figura 8.** A: visão superior da fase oleosa em agitação constante com bailarina; B: Aquecimento em agitação constante da fase oleosa em placa magnética.

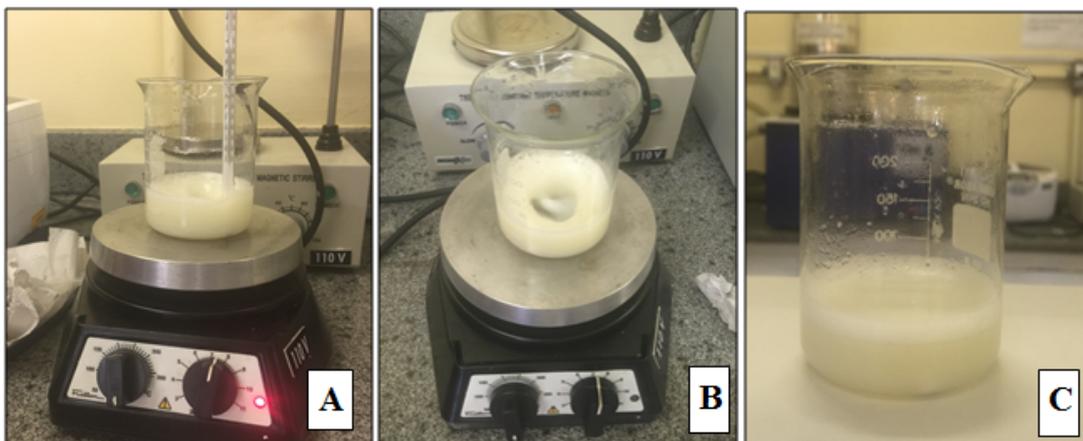


- Etapa 3 - Inversão de fases O/A:

Após ambas as fases atingirem a temperatura de  $65^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  a fase aquosa foi retirada do banho-maria e progressivamente dispensada sobre a fase oleosa. Esta, por sua vez, foi mantida sobre placa magnética em agitação constante à 6000 rpm, até atingir a redução da temperatura para  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (Figuras 9A, 9B e 9C). Ao término das formulações obteve-se,

como produto, uma emulsão de aspecto leitoso, translúcido azulado, com cheiro característico do óleo de copaíba.

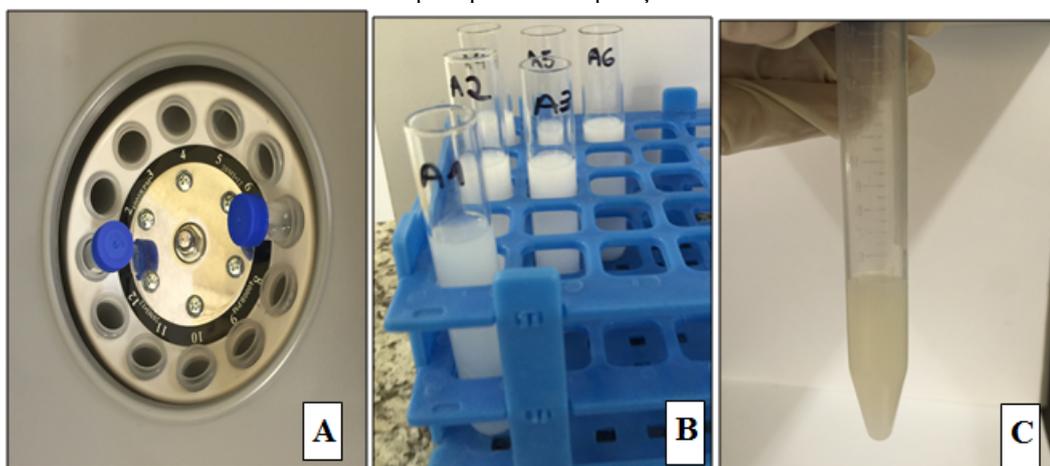
**Figura 9.** A e B: Preparação da nanoemulsão de copaíba, após inversão da fase aquosa sobre a oleosa, controle da redução da temperatura em agitação constante; C: Emulsão final com aspecto homogêneo, leitoso e translúcido.



### 3.2.2 Teste de centrifugação da nanoemulsão de *Copaifera reticulata*

Cada formulação foi submetida à avaliação da estabilidade das formulações por meio de centrifugação. Selecionou-se 5g de cada amostra em tubos de ensaio, centrifugando-se a 60 minutos, em 4 mil rpm. Após a centrifugação, as amostras foram avaliadas macroscopicamente, por meio da verificação da cor, presença de precipitados e ou separação de fases (Figura 10A, 10B e 10C).

**Figura 10.** Manutenção do aspecto homogêneo e translúcido da formulação imediatamente após centrifugação, ausência de precipitados e separação de fases.

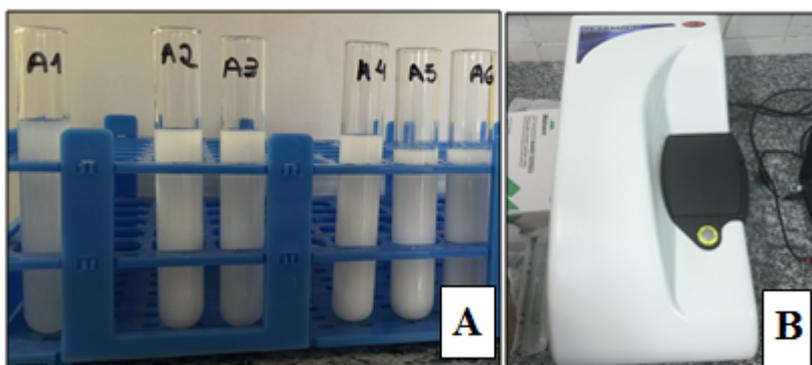


### 3.2.3 Caracterização da nanoemulsão de *Copaifera reticulata*

Após a submissão das amostras ao teste de centrifugação, as emulsões foram mantidas em temperatura ambiente, em tubos de ensaios de vidro, vedadas e identificadas, e separou-se uma quantidade de cada amostra para caracterização.

Para determinação do tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta, realizou-se a análise das formulações diluindo-se 1:10 (v/v) de cada nanoemulsão em água destilada para leitura no equipamento Zetasizer<sup>®</sup> (Figuras 11A e 11B). Os resultados obtidos em triplicata foram expressos em média e desvio padrão. A análise foi realizada um dia após a formulação e 30 dias após, sendo realizada por um único profissional treinado do Laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético da UFPA.

**Figura 11.** A e B: Amostra de cada nanoemulsão de copaíba identificada para leitura do potencial Zeta, índice de polidispersão e tamanho da partícula, no aparelho Zetasizer do Laboratório P&D Farmacêutico e Cosmético.



### 3.2.4 Determinação do pH da nanoemulsão de *Copaifera reticulata*

Para a determinação do pH das nanoemulsões, utilizou-se potenciômetro previamente calibrado com solução de tampão pH 4,0 e 7,0. A leitura foi realizada por meio da medida direta sobre cada amostra. Os resultados obtidos em triplicata foram expressos em média e desvio padrão.

### 3.3 NANOGEL DE *Copaifera reticulata* Ducke

Esta subseção está dividida em dois tópicos. No primeiro é descrita a etapa de preparação do nanogel de *C. reticulata* e no segundo há a caracterização do produto.

#### 3.3.1 Preparação nanogel de *Copaifera reticulata*

Para esta etapa foi necessário incorporar à nanoemulsão de copaíba, obtida por meio dos ensaios pilotos, um meio de condução mais consistente para que pudesse ser utilizada como agente acoplador no processo de fonoforese. Desta forma, adotou-se o gel de Carbopol® (KELMANN, 2012; LUCCA, 2013) sendo, portanto, necessário realizar alguns testes na intenção de constatar a melhor proporção de cada constituinte (gel e nanoemulsão) para o produto final nanogel de copaíba. Adotou-se como critério a melhor consistência do nanogel para a menor concentração da nanoemulsão, visto que quanto maior a quantidade de nanoemulsão utilizada, maior é quantidade de óleo e maior é o custo para o produto final.

É necessário testar uma relação de concentração dos constituintes que leve em consideração o custo-benefício e a eficácia do produto para o consumidor final.

Para a elaboração do nanogel, foi utilizada a nanoemulsão identificada como A5 após a caracterização de todas as amostras. As proporções de cada componente utilizados nos Pilotos da formulação do nanogel estão dispostas na Tabela 2.

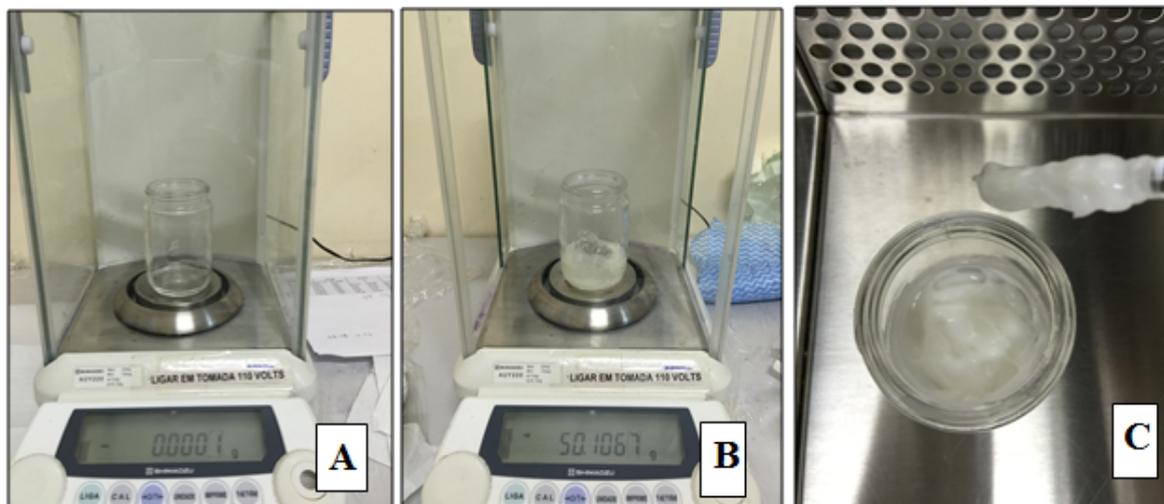
**Tabela 2.** Formulação do nanogel de copaíba por meio da associação da nanoemulsão de *C. reticulata* com gel de Carbopol®.

Piloto Nanogel	Componentes	
	Nanoemulsão de copaíba (%)	Gel Carbopol® (%)
1	5	95
<b>2</b>	<b>20</b>	<b>80</b>
3	30	70
4	34	66

qsp 50g em % (p/p)

Após a pesagem em balança analítica de cada constituinte, homogenizou-se a nanoemulsão de copaíba ao gel de Carbopol® com bastão de vidro (Figuras 12A, 12B e 12C).

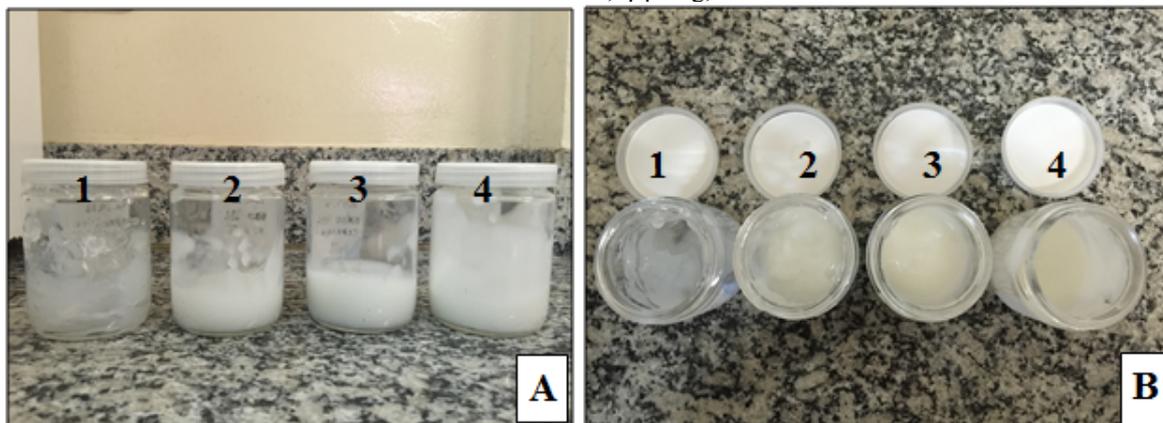
**Figura 12.** A: Após zerada, a balança com o frasco para elaboração do nanogel. B: Pesou-se inicialmente a nanoemulsão de copaíba, seguida do gel de Carbopol® até completar 50g. C: Homogeneização dos componentes da formulação e aspecto final do nanogel.



### 3.3.2 Caracterização nanogel de *Copaifera reticulata*

Foram obtidas quatro formulações de nanogel de copaíba (Figuras 13A, 13B e 14), a partir da mesma nanoemulsão de copaíba. Para caracterização macroscópica das amostras formuladas, previamente aos testes de estabilidade, cada uma foi centrifugada por 30 minutos à velocidade de 3.000 rpm. Esta análise foi realizada em triplicata, sob condições de temperatura ambiente.

**Figura 13.** Aspecto final das 4 formulações do piloto do nanogel de copaíba com distintas concentrações cada, identificadas de 1 a 4, qsp 50g, 25°C±2°C.



**Figura 14.** As quatro formulações obtidas de nanogel de copaíba, 24h após o preparo, mantidas em temperatura ambiente, após centrifugação.



Após o resultado da centrifugação, dois profissionais farmacêuticos constataram a não ocorrência de separação de fases das quatro amostras testadas, indicando que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos testes de estabilidade.

Foram realizados testes de estabilidade preliminar, com as amostras de cada piloto de nanogel de copaíba, mantidos em condições de temperatura ambiente, 24h após a manipulação, a fim de constatar a manutenção das características iniciais do nanogel, como a viscosidade e consistência final, após a maturação, bem como aspecto, cor e odor.

Cada amostra foi analisada, por sete dias, em temperatura ambiente, pelos mesmos profissionais farmacêuticos experientes em manipulação, comparando as características macroscópicas de cada uma, a fim de averiguar possíveis sinais de instabilidade. Afirmam Isaac et al. (2008) que há estabilidade da amostra quando não há ocorrência de separação de fases, precipitação e turvação.

Além destas características físico-químicas, foi realizada avaliação macroscópica do aspecto, cor, odor e espalhabilidade tópica, de cada piloto de nanogel (ISAAC et al., 2008), e deslizamento do cabeçote do ultrassom utilizando o nanogel como agente acoplador, conforme disposto no Quadro 1.

**Quadro 1.** Escala de avaliação das características macroscópicas das amostras de nanogel, 25°C±2°C, sete dias consecutivos.

Características avaliadas	Classificação Qualitativa			
	Centrifugação (separação de fases) <sup>1</sup>	Ausente		Presente
Aspecto <sup>1</sup>	Homogêneo		Heterogêneo	
	Pasta	Gel	Fluido	Viscoso
	Transparente	Opaco	Leitoso	
	Normal, sem alteração	Levemente separada, precipitada, turva	Separada, precipitada, turva	
Cor <sup>1,2</sup>	Normal	Levemente modificada	Modificada	Intensamente modificada
Odor <sup>1</sup>	Normal	Levemente modificado	Modificado	Intensamente modificado
Espalhabilidade tópica <sup>1,3</sup>	Lenta	Moderada	Rápida	
Deslizamento do ultrassom	Sem resistência	Com resistência		

<sup>1</sup>Isaac et al. (2008); <sup>2</sup>Avaliação da cor em luz ambiente branca; <sup>3</sup>Aplicabilidade tópica na face anterior do antebraço por 10 minutos.

### 3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste item é explicado o desenho metodológico da etapa experimental com os animais e a descrição do mecanismo de lesão muscular.

#### 3.4.1 Animais utilizados na pesquisa

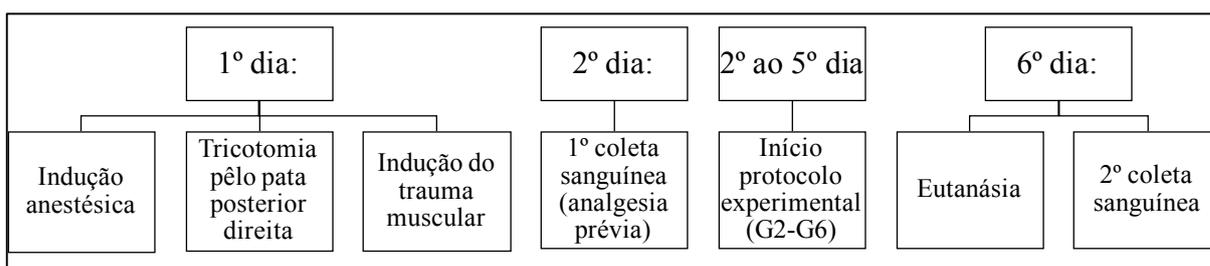
Todos os animais do presente estudo foram cuidados conforme as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e legislação nacional para vivisseção animal em vigor na Lei n.º 11.794, de 08.10.2008 que regulamenta e estabelece procedimentos para o uso de animais em estudos científicos.

Para os testes da indução de lesão muscular e resposta inflamatória utilizou-se 24 animais da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem Wistar, machos, adultos (idade variando entre 8-12 semanas), saudáveis, sedentários e pesando 300-350 gramas, provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar Para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP).

Os animais foram mantidos em condições experimentais similares às empregadas por Lima (2015). Foram alojados em gaiolas de polipropileno, com ambiente controlado em termos de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade ( $50\pm 10\%$ ), fotoperíodo 12 horas de ciclo claro-escuro, abastecidos com acesso *ad libitum* à ração e água. O período de ambientação destes animais foi de cinco semanas.

A Figura 15 sintetiza as etapas realizadas identificando os procedimentos com os animais.

**Figura 15.** Fluxograma das etapas e identificação dos procedimentos realizados com os animais.



Como mostra a Figura 15, os animais foram submetidos à indução anestésica prévia à coleta sanguínea, tricotomia da pata posterior direita, trauma muscular na respectiva pata. A coleta sanguínea foi realizada 24 horas após a lesão muscular, com os animais previamente anestesiados, antes do início de qualquer intervenção terapêutica.

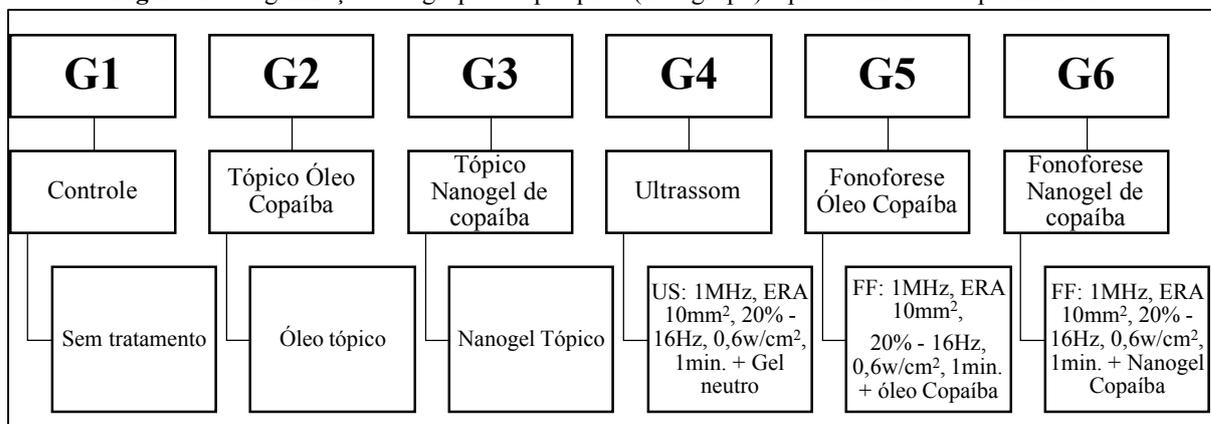
A terapia ocorreu para os grupos (G2 a G6), 24h após a lesão e posterior a primeira coleta sanguínea, com sessões diárias, consecutivas, por cinco dias.

A segunda coleta sanguínea foi realizada com todos os grupos, no 6º dia após a lesão. Para a realização da coleta, cada animal foi previamente anestesiado. Para os grupos que realizaram tratamento (G2 a G6), houve um intervalo de 24h após a última sessão e a coleta sanguínea. Os animais foram submetidos à eutanásia por injeção intraperitoneal com superdose dos anestésicos Quetamina e Xilazina.

A Figura 16 apresenta a organização esquemática dos grupos da pesquisa de acordo com o tratamento empregado e o grupo controle sem tratamento. Todos os animais

foram alocados em grupos, aleatoriamente, distribuídos em gaiolas com o máximo de três animais em cada, com demarcação individual da cauda.

**Figura 16.** Organização dos grupos da pesquisa (n=4/grupo) e procedimentos experimentais.



### 3.4.2 Mecanismo da lesão muscular

O mecanismo de lesão muscular foi induzido por meio de um equipamento elaborado conforme protocolo previamente testado por Lima (2015). Este trata de uma adaptação baseada na técnica descrita por McBrier et al. (2009) e foi confeccionado com três bases paralelas de madeira, transpostas em seu centro por uma peça de Policloreto de Vinila (PVC), onde percorreu um cilindro metálico de 267g a uma altura de 60 cm (Figura 17).

**Figura 17.** Equipamento para indução da lesão muscular traumática.



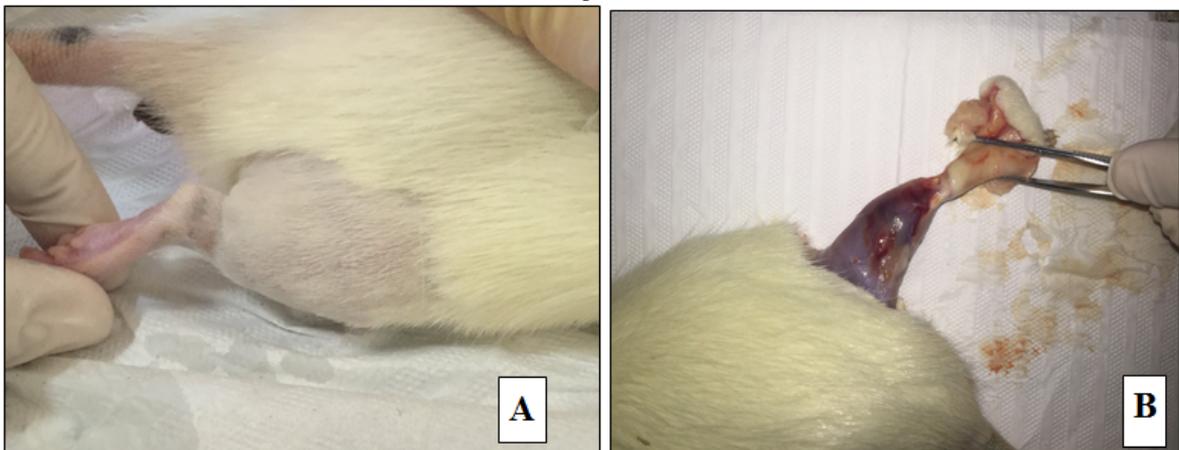
Previamente à indução da lesão, os animais foram anestesiados pelo método intraperitoneal com associação de cloridrato de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (LIMA, 2015). Em seguida realizou-se a tricotomia da pata posterior direita, face pósterolateral e medial; posteriormente, foram posicionados na base do equipamento de produção da lesão, em decúbito ventral, com rotação externa e abdução da pata, centralizada na peça de PVC. As Figuras 18A e 18B demonstram o posicionamento do animal e o momento exato do impacto sobre o ventre do músculo gastrocnêmio direito.

A contusão muscular foi provocada pelo impacto direto do cilindro metálico de 267g, lançado de uma altura de 60 cm, com energia cinética de  $1,57 \times 10^{-3}$  Joules. Após o trauma, a pata conduzida foi inspecionada manualmente para descartar a presença de fraturas ósseas (Figura 19).

**Figura 18.** Posicionamento da pata centralizada (A) e momento do impacto sobre o ventre do músculo gastrocnêmio (B).



**Figura 19.** Visualização da pata posterior Direita lesionada: A - 24h após a lesão, com edema, ausência de fratura, animal vivo; B - 24h após o trauma, pele seccionada para visualização da presença de lesão muscular e hematoma após eutanásia.



### 3.4.3 Protocolos terapêuticos empregados

Os animais submetidos aos protocolos de tratamento (G2 a G6) iniciaram as sessões com 24 horas após o trauma muscular e posterior à primeira coleta sanguínea.

Foram realizadas cinco sessões individuais para cada grupo, com sua respectiva terapia, sempre respeitando o mesmo horário entre as elas.

Os parâmetros do US e FF (G4, G5 e G6) foram baseados no modelo adotado nos experimentos de Lima (2015) e Almeida (2014), por se tratar de ensaios semelhantes, com mesmo mecanismo de lesão e FF com plantas medicinais.

Adotou-se a frequências de 1 MHz e ERA (área de radiação efetiva) de 10 mm<sup>2</sup> para o cabeçote, com ciclo de trabalho pulsado à 20%, com frequência de pulsação de 16Hz, intensidade de 0,6 W/cm<sup>2</sup> durante um minuto. Utilizou-se o aparelho da marca Ibramed, modelo *Sonopulse Special*.

O transdutor do ultrassom foi manuseado com movimentos lentos, circulares e uniformes sobre a área lesionada, em 90°, a região para aplicação do US e FF foi demarcada com caneta esferográfica. O meio acoplador para o ultrassom em cada grupo foi: G4 – gel neutro de ultrassom (Carbopol®); G5 – óleo-resina de copaíba; G6 – nanogel de copaíba.

Para os grupos G2 (Tópico Óleo copaíba) e G3 (Tópico nanogel de copaíba), o US foi manuseado conforme descrição supracitada, contudo, por se tratar de uso placebo o aparelho manteve-se desligado durante todo o tempo de aplicação, garantindo que não houve emissão das ondas sonoras.

A dosagem (ml) de óleo-resina administrada em cada animal, por aplicação, foi baseada no modelo experimental de Lima (2015), adotou-se a mesma proporção para a posologia do nanogel, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3.** Posologia utilizada de óleo-resina e nanogel de copaíba.

<b>Grupo</b>	<b>Agente terapêutico</b>	<b>Dosagem (ml)</b>	<b>Dosagem (g)</b>	<b>Posologia estimada (g/kg)**</b>
G2 e G5	Óleo-resina copaíba	<b>0,5*</b>	0,37	1,23
G3 e G6	Nanogel copaíba	<b>0,5</b>	0,46	1,53

\*Lima (2015); \*\*Média de peso por animal 300g

### 3.4.4 Eutanásia

Os animais foram submetidos à técnica de eutanásia padronizada de injeção intraperitoneal, com aplicação de uma superdose de Tiopental sódico (0,84 g/kg p.C.) associado ao anestésico lidocaína (10mg/mL). A eutanásia por método químico utilizando agente químico injetável é a mais recomendada, de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Resolução Normativa nº. 13, de 20 de setembro de 2013.

### 3.4.5 Análise bioquímica dos marcadores de lesão muscular

As análises Bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia da UNIFAP. Para a realização desta etapa foi necessária a coleta de duas amostras sanguíneas de cada animal (1 ml), em dois momentos distintos da pesquisa:

Amostra 1: 24h após a lesão muscular, antes de qualquer intervenção terapêutica;

Amostra 2: 144h após a lesão, no sexto dia da lesão.

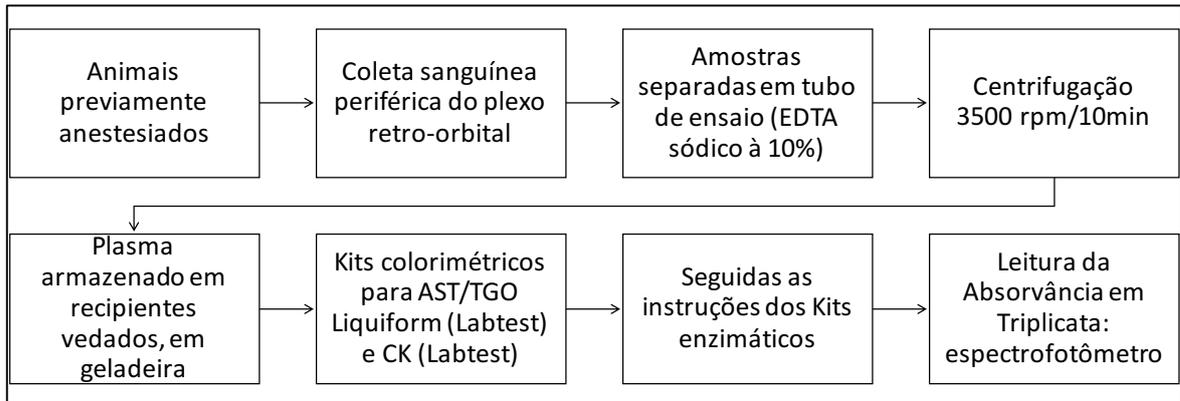
Para a realização da coleta o animal foi previamente anestesiado com inalação de éter etílico, para minimizar o estresse e sofrimento do animal. A coleta foi feita por um único profissional treinado e experiente. Utilizou-se tubo capilar para coleta sanguínea no plexo retro-orbital, por meio da punção venosa do plexo orbital do rato.

As amostras sanguíneas de cada animal foram separadas em tubo contendo EDTA sódico à 10%. Em seguida foram centrifugadas à 3.500 rpm, por 10 minutos, para a separação do plasma sanguíneo. Identificou-se o plasma de cada animal e grupo. Com isso, foram armazenadas em recipientes vedados, em geladeira para leitura posterior.

Para análise bioquímica dos marcadores indicativos de lesão muscular: AST/TGO e CK utilizaram-se kits comerciais colorimétricos específicos para cada enzima, seguida da leitura da absorvância por meio de espectrofotômetro, foram seguidas rigorosamente as instruções contidas nos manuais dos *kits*.

Todos os procedimentos supracitados estão sintetizados na Figura 20.

**Figura 20.** Procedimentos realizados nas etapas que constituem a análise bioquímica dos marcadores de lesão muscular.



### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com base na estatística descritiva, com os cálculos de média e desvio padrão, e inferencial. Nesta, inicialmente foi verificada a normalidade dos dados por meio do teste Shapiro-Wilk e, diante da distribuição normal das variáveis, foram aplicados dois testes paramétricos de comparação.

A análise intragrupo (comparação entre o próprio grupo no pré e pós experimento) foi possibilitada por meio da comparação dos dados das variáveis dependentes AST e CK, do primeiro e do sexto dias pós-lesão induzida. Para tanto, utilizou-se o teste *t* de *Student*. Na análise intergrupo (comparação entre os grupos no pré e pós experimento) a comparação ocorreu por meio da aplicação do teste ANOVA, um critério, com pós teste de Tukey. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Utilizou-se o *software* Bioestat, versão 5.3.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção está dividida em quatro tópicos. Inicia com a coleta e caracterização química da *C. reticulata*. Segue com a nanoemulsão de copaíba, o nanogel de *C. reticulata* Ducke e finaliza com o experimento de análise bioquímica dos marcadores de lesão muscular.

### 4.1 COLETA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA *Copaifera reticulata*

O óleo-resina utilizado neste estudo foi coletado na FLONA, no mês de abril de 2014, correspondendo ao período chuvoso do ano. Foi obtida a quantidade de 100 ml de um único indivíduo, a fim de obter-se melhor caracterização do óleo e menor influência de outros fatores. O óleo-resina coletado foi um líquido transparente, com aspecto límpido, pouco viscoso e com a coloração amarelo-dourado, este identificado botanicamente como da espécie *C. reticulata*.

Silva et al. (2014), por meio da análise físico-química de 30 amostras de óleo-resina da espécie *C. reticulata* coletadas de 15 árvores na região da FLONA do Tapajós, constataram que através da comparação visual das amostras é possível classificá-las por escala de cores (incolor, amarelo claro, amarelo médio, amarelo dourado e acastanhado). Destas amostras analisadas, 73% predominou a coloração amarelo dourada.

A Tabela 4 apresenta o resultado encontrado na pesquisa quanto à caracterização química realizada por cromatografia gasosa de alta resolução. Foi possível averiguar os componentes majoritários presentes no óleo-resina utilizado. São eles:  $\beta$ -Cariofileno (39,91%),  $\alpha$ -Bergamoteno (11,32%),  $\beta$ -Bisaboleno (7,38%),  $\alpha$ -Humuleno (3,15%) e  $\beta$ -Sileno (1,72%).

O resultado da cromatografia gasosa do óleo de *C. reticulata*, realizada de modo a serem apontados os constituintes na amostra, identificou um total de 92,35%, destes, identificados 21 componentes majoritários, com predominância de sesquiterpenos no óleo de *C. reticulata*, com elevada concentração de  $\beta$ -Cariofileno (39,91%), sendo este o constituinte majoritário, seguido do  $\alpha$ -Bergamoteno (11,32%) e  $\beta$ -Bisaboleno (7,38%), em relação aos demais compostos, predominando nesta amostra os compostos voláteis em relação aos compostos resinosos.

Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006), ao avaliarem três espécies *Copaifera* (*C. duckei*, *C. martii* e *C. reticulata*) nativas do município de Moju-Pa (FLONA), com coleta seriada do óleo-resina de setembro de 2003 a agosto de 2004, constataram que a época do

ano, na Amazônia, influencia diretamente nos índices de sesquiterpenos e diterpenos dos óleos.

**Tabela 4.** Caracterização química do óleo-resina de *C. reticulata* do período chuvoso – em destaque (\*) os componentes majoritários.

Compostos	Período chuvoso Teor (%)	Fórmula molecular
$\infty$ -Elemeno	0,17	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\infty$ -Cubeno	1,04	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\infty$ -Copaeno	2,63	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
<b><math>\beta</math>-Cariofileno*</b>	<b>39,91*</b>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\infty$ -Cedreno	0,45	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
<b><math>\infty</math>-Bergamoteno</b>	<b>11,32</b>	
$\infty$ -Aromadendreno	-	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
<b><math>\infty</math>-Humuleno*</b>	<b>3,15*</b>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
<b>Germacreno-D</b>	<b>5,84</b>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\infty$ -Curcumeno	0,93	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
<b><math>\beta</math>-Sileno*</b>	<b>1,72*</b>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Bicyclogermacreno	0,22	
<b><math>\beta</math>-Bisaboleno*</b>	<b>7,38*</b>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\beta$ -Sesquifelandreno	0,31	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\delta$ -Cadineno	2,54	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
$\infty$ -Cadineno	3,19	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Germacreno-B	4,28	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Spathulenol	0,45	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Cariofileno Óxido	1,87	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O
Cedrol	2,43	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
Eudesmol	-	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
$\infty$ -Muurolol	0,52	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
$\infty$ -Cadinol	1,61	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O
Cadaleno	-	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub>
$\beta$ -Vertivono	0,39	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O
<b>Total identificado (%)</b>	<b>92,35</b>	

Ao avaliarem a espécie *C. reticulata*, Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006) evidenciaram que o teor do sesquiterpeno  $\beta$ -Cariofileno variou de 39% a 61,8% e foi superior ao do  $\beta$ -Bisaboleno em todos os meses do ano em que houve a coleta. Verificaram também

que independente do período de precipitação pluviométrica, a presença dos compostos voláteis majoritários foi mantida, bem como a relação de  $\beta$ -Cariofileno superior a do  $\beta$ -Bisaboleno.

Estudos elencam a propriedade anti-inflamatória da copaíba, devido a presença de sesquiterpenos (LUCCA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2014). No óleo-resina de *C. reticulata*, o elevado índice de  $\beta$ -Cariofileno é responsável pela atividade antiedematogênica, anti-inflamatória e bactericida, enquanto que o  $\beta$ -Bisaboleno apresenta propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (LUCCA, 2013; SACHETTI, et al. 2009; TAPPIN et al, 2004; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Diferente da concentração encontrada neste estudo do composto majoritário  $\beta$ -Cariofileno (39,91%), para a espécie *C. reticulata*, Pacheco (2014) não apontou este componente como prioritário para a mesma espécie. Ao analisar duas espécies de *Copaifera* (*C. reticulata* e *C. multijuga*), por cromatografia gasosa, identificou 19 constituintes na primeira e 11 na segunda. Sendo o  $\beta$ -bisaboleno (43,08%), seguido de Trans- $\infty$ -bergamoteno (18,72%) e  $\beta$ -Selineno (7,83%) os compostos majoritários da *C. reticulata*. Já a espécie *C. multijuga* apresentou  $\beta$ -Cariofileno (37,40%), Germacreno-D (29,20%), Germacreno-B (14,94%) e  $\infty$ -humuleno (4,85%) como constituintes principais.

Alencar et al. (2015) identificaram no óleo-resina da espécie *C. langsdorffii*, por meio da cromatografia gasosa, a presença de 20 sesquiterpenos, sendo o  $\beta$ -Bisaboleno (24,76%) o composto majoritário identificado, seguido de  $\beta$ -Cariofileno (18,30%) e  $\infty$ -Bergamoteno (15,61%).

Resultados semelhantes aos encontrados na presente pesquisa são encontrados em Dias et al. (2014). Estes verificaram como constituinte principal do óleo de *C. multijuga*, coletado na Reserva Adolfo Ducke-AM, o  $\beta$ -Cariofileno (29,82%), seguido de Germacreno-D (15,86%). Trindade et al. (2013) encontraram como constituintes principais do óleo de *C. multijuga*, coletado no estado de Rondônia, o  $\beta$ -Cariofileno (57,1%),  $\alpha$ -Humuleno (10,2%) e  $\beta$ -Sesquifelandreno (9,9%).

Ziech et al. (2013) determinaram a composição química do óleo de *C. reticulata*, proveniente do estado do Pará, sendo os compostos majoritários identificados o  $\beta$ -Cariofileno,  $\beta$ -Bisaboleno e  $\alpha$ -Bergamoteno.

Lucca et al. (2015) verificaram a presença de 42% de  $\beta$ -Cariofileno, após a caracterização por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa do óleo-resina de *C. multijuga* Hayne, coletada na Reserva Florestal do Instituto de Pesquisas da Amazônia

(INPA), em Manaus.

#### 4.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÃO DE COPAÍBA

Através do método de inversão de fases obteve-se com as seguintes concentrações de cada constituinte, 5% óleo de copaíba, 5% Tween 80 e 90% água. Foram manipuladas cinco formulações a partir do óleo-resina de *C. reticulata*. O aspecto macroscópico final apresentou homogeneidade dos sistemas de fases, leitosas, fluidas, sem cremeação, precipitação ou separação de fases. O odor ficou mais atenuado em relação ao óleo natural. A Tabela 5 apresenta os resultados da caracterização das amostras.

**Tabela 5.** Resultados da Nanoemulsão de *C. reticulata* Ducke, em quintuplicata: composição e PH, diâmetro da partícula, índice de polidispersão e potencial Zeta.

F	[]%			pH	Após 1 dia			Após 30 dias		
	S	O	A		DP(nm)*	PdI*	PZ*	DP(nm)*	PdI*	PZ*
1 <sup>a</sup>	5	5	90	5,54±0,08	294,2±7,5	0,243±0,034	-34,26	236,92±48,80	0,226±0,081	-35,83
2 <sup>a</sup>	5	5	90	5,43±0,05	287,6±18,3	0,264±0,016	-35,33	277,58±18,04	0,244±0,018	-36,00
3 <sup>a</sup>	5	5	90	5,38±0,04	392,2±10,6	0,153±0,102	-34,90	293,52±11,88	0,231±0,014	-34,60
4 <sup>a</sup>	5	5	90	5,61±0,03	340,5±34,0	0,275±0,010	-31,50	253,86±28,21	0,239±0,020	-33,50
<b>5<sup>a</sup></b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>90</b>	<b>5,43±0,02</b>	<b>270,2±11,0</b>	<b>0,247±0,025</b>	<b>-30,00</b>	<b>302,93±2,46</b>	<b>0,271±0,016</b>	<b>-31,33</b>

F: formulação; S: surfactante Tween 80; O: óleo de copaíba; A: água ultrapura; DP: diâmetro da partícula; nm: nanômetro; PdI: Índice de polidispersão; PZ: potencial Zeta. Mantidas em temperatura ambiente (25°±2°C).

\*Análise em triplicata expressos em média e desvio padrão

Após o teste de centrifugação foram mantidas as características originais do sistema com ausência de separação de fases, sugerindo estabilidade do sistema e posterior análise do tamanho da partícula, PdI e potencial Zeta.

Após um dia, a primeira análise de dispersão de luz dinâmica, mostrou para todas as emulsões nanoestruturadas um diâmetro de partícula em escala nanométrica (270,2±11,0nm - 392,2±10,6nm) assim como baixo PdI das nanopartículas na fase contínua, apontando estabilidade da nanoemulsão no período avaliado. Também se avaliou que os valores de pH foram baixos, as amostras apresentaram pouca variabilidade, 5,43 – 5,61, caracterizando acidez, valor que pode ser atribuído à presença de ácidos na parte resinosa do óleo de copaíba (ALENCAR et al., 2015).

Em relação ao potencial zeta, as cinco nanoemulsões apresentaram valores

negativos (-30 à -37mV) caracterizando provável estabilidade do sistema, uma vez que ocorreu a formação de campo negativo repulsivo ao redor das partículas, sugerindo menor chance de aglomeração e separação de fases.

A segunda análise obtida das amostras de nanoemulsão de copaíba, realizada 30 dias após a manipulação, apresentou pouca variabilidade na caracterização destas. Permanecendo o tamanho das partículas em escala nanométrica ( $236,92 \pm 48,80\text{nm}$  a  $302,93 \pm 2,46\text{nm}$ ), monodispersas ( $0,226 \pm 0,081$  a  $0,271 \pm 0,016$ ), com manutenção do potencial zeta apropriado (-31 a -36mV). Configurando para estas amostras de nanoemulsão de *C. reticulata* uma estabilidade em temperatura ambiente de 25°C, por 30 dias (Tabela 5).

Os resultados do presente estudo corroboram aos encontrados por Alencar et al. (2015), Dias et al. (2014) e Rodrigues et al. (2014) que formularam nanoemulsões com óleo de copaíba, *C. langsdorffii*, *C. multijuga* e *C. duckei*, respectivamente. O sistema de nanoemulsão foi realizado pelo método de inversão de fases, enquanto, Dias et al. (2014) obtiveram por homogeneização de alta pressão. Quanto ao tamanho da partícula, em todos os ensaios foram alcançadas partículas nanométricas de  $200 \pm 0\text{nm}$ ,  $257,3 \pm 4,1\text{nm}$  e  $145,2 \pm 0,9\text{nm}$ , respectivamente.

Nos estudos acima houve polidispersão da partícula em torno de 0,2. O potencial zeta foi avaliado apenas por Alencar et al. (2015) e Dias et al. (2014), apresentando, respectivamente, uma carga repulsiva em torno de  $-34,37 \pm 2,50\text{mV}$  e  $-31,83 \pm 1,20\text{mV}$ .

Alencar et al. (2015), ao formularem nanoemulsão de copaíba da espécie *C. langsdorffii*, pelo método de inversão de fases, utilizaram diferentes concentrações de cada constituinte e dois tensoativos (5% óleo de copaíba, 93% água destilada, 1,56% Tween 20 e 0,44% Span 80). Cada fase foi aquecida separadamente até a temperatura de 70°C e a inversão da fase aquosa sobre a oleosa ocorreu sob agitação constante à 13.000 rpm, por 10 minutos. Estes pesquisadores obtiveram como produto final uma nanoemulsão com pH 3.40, indicando acidez, provavelmente decorrente da presença de ácidos no óleo de copaíba. Tamanho da partícula  $200\text{nm} \pm 0$ , baixo PdI ( $0,24 \pm 0,01$ ) e potencial Zeta ( $-34,37 \pm 2,50\text{mV}$ ) indicando estabilidade do sistema nanoestruturado.

Rodrigues et al. (2014), com o objetivo de testarem o potencial inseticida para larvas de *Aedes aegypti*, elaboraram, pelo método de inversão de fases, nanoemulsão de *C. duckei* Dweyer. Resultaram 31 formulações, a partir da composição de 5% olerresina de *C. duckei*, 5% polissorbato, 80 e 90% de água destilada. A variação do tamanho das partículas após um dia de manipulação foi de  $11,5 \pm 0,2$  para  $257,3 \pm 4,1$ . Dentre estas, obtiveram por fim

uma nanoemulsão estável com tamanho médio da partícula variando de  $145,2 \pm 0,9$  nm e PDI  $0,378 \pm 0,009$  (análise após um dia da manipulação), variando o tamanho e a polidispersibilidade, após 30 dias para  $156,5 \pm 0,7$  nm e  $0,286 \pm 0,027$ , respectivamente, caracterizando estabilidade do sistema no período avaliado.

O PDI da partícula avalia a uniformização da distribuição destas nanoestruturas na emulsão (FLORES et al., 2011). Em relação a esse dado, as nanoemulsões deste estudo mantiveram-se dentro da faixa de uniformidade do tamanho da partícula, dentro da fase contínua (0,2), e esta uniformidade das partículas foi mantida dentro de 30 dias.

A avaliação da polidispersibilidade da partícula representa a uniformização da distribuição das gotículas na formulação. Quanto mais distribuídas, maior a qualidade do sistema, visto a menor a chance de aglomeração destas dentro da nanoemulsão e formação de heterogeneidades, logo, PDI inferiores a 0,2 indicam populações homogêneas, enquanto que superior a 0,3 indica heterogeneidade da formulação (HOLLER; SPERGER; VALENTA, 2009).

Para que ocorra a estabilidade entre as fases óleo e água, da nanoemulsão óleo/água, é necessário o uso de tensoativos, como exemplo, os tensoativos não-iônicos, como os polissorbatos (Tweens), portanto avalia-se o potencial Zeta (KELMANN, 2012).

É sabido que o sesquiterpeno,  $\beta$ -Cariofileno, é o principal composto da fração volátil do óleo-resina de copaíba, para atividades terapêuticas comprovadas na literatura (DIAS et al., 2014; LUCCA et al., 2015; LUCCA, 2013; LEANDRO et al., 2012; VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002). Além da estabilidade da formulação, portanto, é imprescindível que haja a preservação da concentração deste componente majoritário após a formulação do sistema de nanoemulsão de copaíba.

Dias et al. (2014) elaboraram nanoemulsão de copaíba (*C. multijuga* Hayne), por meio de dois métodos: homogeneização por alta-pressão e emulsificação espontânea. Constatou que ambos os sistemas de nanoestruturação apresentam vantagens e desvantagens. Embora o segundo método seja facilmente obtido em escala laboratorial, baixo custo e resulte em formulações com tamanho de partículas pequenos, com estabilidade e baixo PDI, apontando estabilidade da nanoemulsão, ocorre neste sistema a evaporação, o que coincidiu com a redução da concentração do  $\beta$ -Cariofileno. Enquanto que no primeiro método foi possível obter uma nanoemulsão estável, com partículas nanométricas e monodispersas, com potencial Zeta apropriado e alto índice de  $\beta$ -Cariofileno.

A partir dos resultados obtidos por Dias et al. (2014), que formularam uma

nanoemulsão otimizada de *C. multijuga*, Lucca et al. (2015), pelo método de homogeneização de alta pressão, obteve uma nanoemulsão estável, com partícula de  $253,9 \pm 2,74$  nm, um índice de polidispersidade de  $0,058 \pm 0,02$ , um potencial Zeta de  $-31,3 \pm 0,36$  mV e um teor de  $\beta$ -Cariofileno de  $100,8 \pm 0,01\%$ .

Notou-se, portanto, que os resultados desta pesquisa corroboram com os dos estudos acima citados, exceto a avaliação da concentração do composto majoritário. Constatou-se que o método de inversão de fases utilizado nesta pesquisa para a formulação da nanoemulsão, também gerou resultados confiáveis e indicativos de estabilidade.

Por meio da análise da permeação e retenção de  $\beta$ -Cariofileno em pele de orelha suína, Lucca et al. (2015) compararam o óleo de copaíba e a nanoemulsão do óleo de copaíba, da espécie *C. multijuga*. A concentração do composto majoritário em extrato córneo foi de  $(1,349 \pm 0,749 \mu\text{g/g})$  e  $(0,197 \pm 0,067 \mu\text{g/g})$ , respectivamente, para cada aplicação. A concentração de  $\beta$ -Cariofileno da nanoemulsão apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), quando comparado ao óleo *in natura*.

Para a aplicação do óleo *in natura*, foi possível constatar que o  $\beta$ -Cariofileno não foi encontrado na epiderme, derme ou fluido receptor, indicando não penetração ou permeação na pele. Enquanto que, na nanoemulsão do óleo de copaíba, este apresentou concentrações no nível de extrato córneo e nas camadas subjacentes, epiderme  $(153,025 \pm 79,314 \mu\text{g/g})$ , derme  $(19,226 \pm 14,182 \mu\text{g/g})$ , com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Esses resultados sugeriram que a nanoemulsão facilitou a penetração de  $\beta$ -Cariofileno através da pele, devido o tamanho reduzido da partícula, embora a concentração de copaíba (20%) na formulação da nanoemulsão seja menor cinco vezes que no óleo *in natura*. Não houve permeação/retenção de  $\beta$ -Cariofileno no fluido receptor, sugerindo que a nanoemulsão não permitiu a permeação através da pele.

#### 4.3 NANOGEL DE *Copaifera reticulata* Ducke

Nessa subseção, dividida em dois tópicos, há a descrição da preparação e caracterização do nanogel de *C. reticulata*.

##### 4.3.1 Preparação do nanogel de *Copaifera reticulata*

Observou-se que as nanoemulsões de *C. reticulata*, obtidas por meio do método de inversão de fases, tiveram como característica principal a fluidez. Este aspecto inviabiliza a aplicabilidade desta, associada ao US, com o objetivo de realizar a FF. Em decorrência deste fator, adotou-se a estratégia de aumentar a viscosidade desta formulação. Através da incorporação da nanoemulsão ao gel de Carbopol® (KELMANN, 2012; LUCCA, 2013), visto ser este um agente já utilizado para a realização da transmissão da onda ultrassônica para a pele e os tecidos adjacentes.

Após observar a estabilidade bem como as propriedades físico-química de todas as formulações, elegeu-se a formulação 5, para manipulação do nanogel de copaíba, para aplicabilidade experimental no tratamento da lesão muscular, na forma tópica e FF.

A nanoemulsão eleita, foi escolhida imediatamente após a primeira análise do tamanho da partícula, Pdl e potencial zeta, sendo a formulação de menor partícula quando comparada às demais, bem como. A análise após 30 dias da formulação, foi realizada após a elaboração do nanogel.

Na Tabela 2 foram identificadas as quatro formulações realizadas de nanogel, com as concentrações de nanoemulsão e gel de Carbopol®.

#### **4.3.2 Caracterização do nanogel de *Copaifera reticulata***

Os resultados da avaliação macroscópica das formulações de nanogel obtidas estão apresentados na Tabela 8. Foram realizadas análises por sete dias consecutivos, a fim de se observar a manutenção da apresentação inicial e estabilidade neste prazo, mantidos em temperatura ambiente.

Foi escolhido o piloto 2 do nanogel para reprodução durante o experimento animal para aplicabilidade tópica e FF. Este piloto, após centrifugação, não apresentou separação de fases, formação de grumos ou cremeação.

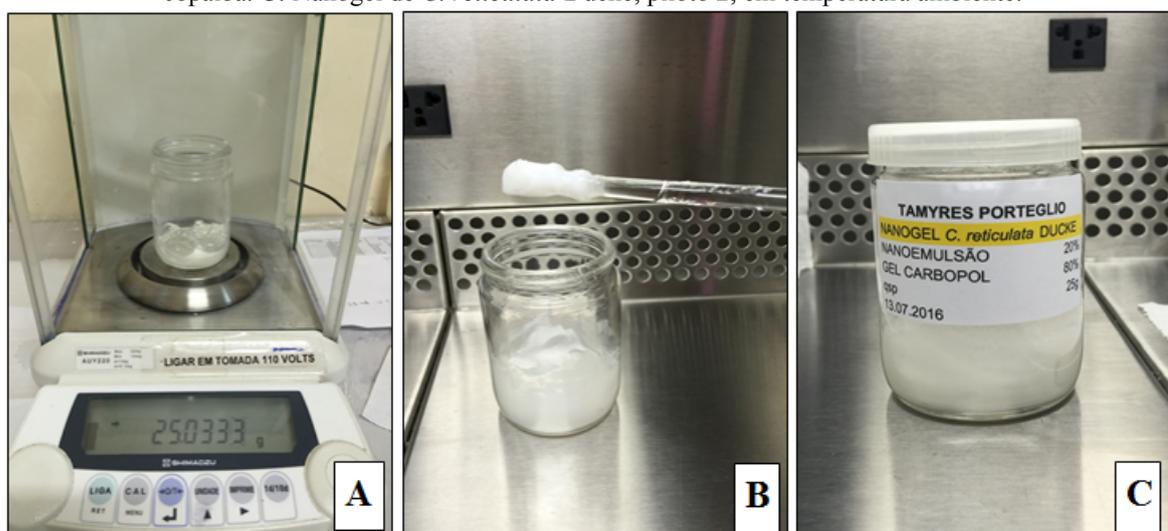
Após esta avaliação, por sete dias consecutivos, foram analisadas as demais características apresentadas no Quadro 2. Foi possível observar que o nanogel 2 manteve o aspecto de homogeneidade, gel, leitoso, sem alteração de suas características iniciais; tanto a coloração como o odor foram mantidos normais.

**Quadro 2.** Resultado da avaliação das características macroscópicas das amostras de nanogel,  $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , sete dias consecutivos, formulado com a nanoemulsão 5 de *C. reticulata*.

Características avaliadas	Amostras de nanogel			
	Piloto 1	Piloto 2	Piloto 3	Piloto 4
Separação de fases	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
	Gel transparente	Gel leitoso	Gel leitoso	Fluido leitoso
	Normal	Normal	Normal	Normal
Cor	Normal	Normal	Normal	Normal
Odor	Normal	Normal	Normal	Normal
Espalhabilidade tópica	Rápida	Rápida	Lenta	Lenta
Deslizamento do ultrassom	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

O produto obtido no nanogel 2 apresentou características indispensáveis para a sua aplicação através da FF, visto a boa espalhabilidade tópica do mesmo e um fácil deslizamento do US sobre a pele. Durante a realização da FF, o nanogel deveria manter-se com as características iniciais e propiciar o deslizamento do cabeçote do US do início ao fim da sessão (1 minuto), sem que ocorresse absorção imediata do mesmo e nem escorresse sobre a pele (Figuras 21A, 21B e 21C).

**Figura 21.** A: Formulação do nanogel de copaíba para utilização no experimento pré-clínico, com a concentração testada no piloto 2, qsp 25g. B: Aspecto gel branco translucido com cheiro característico de copaíba. C: Nanogel de *C. reticulata* Ducke, piloto 2, em temperatura ambiente.



O nanogel de copaíba formulado com concentração de 20% de nanoemulsão de copaíba e 80% de gel de Carbopol®, mantido em temperatura ambiente, não apresentou separação de fases após teste de centrifugação. No período de sete dias manteve como características físico-químicas a homogeneidade, a consistência em gel-opaco e sem alteração de precipitação. A coloração foi mantida normal, fácil aplicabilidade dérmica e rápida absorção, não deixando sobre a pele aspecto pegajoso e untuoso, sendo totalmente absorvido. O odor foi normal e característico de copaíba, porém com mais suavidade quando comparado ao óleo *in natura* e o custo benefício da concentração de óleo adotada proporcionou bom deslizamento e acoplamento do cabeçote do US.

Os resultados acima descritos corroboram aos obtidos por Kelmann (2012) e Lucca (2013). Estes apontaram que, para contornar a baixa viscosidade da nanoemulsão e ajustá-la para aplicação tópica, a solução é a incorporação de agentes gelificantes, visto que otimizam a espalhabilidade e melhoraram o tempo de contato da formulação com a pele, fatores estes que podem influenciar a ação terapêutica dos fármacos.

Desta maneira, diferentes agentes podem ser utilizados para aumentar a viscosidade do sistema e a forma final será influenciada pelas características físico-químicas do agente escolhido, podendo ocorrer alteração no perfil de penetração da substância ativa na pele (KELMANN, 2012).

Em estudo semelhante ao presente experimento, Lucca (2013) incorporou a nanoemulsão de copaíba (*C. multijuga* Hayne) em hidrogel e observou que aumentou significativamente a penetração da substância ativa na pele, visto ser esta a camada de interesse no tratamento de inflamações por via tópica. Esse estudo também enfatizou que há uma grande possibilidade no uso do óleo de copaíba, tanto na forma de nanoemulsão, quanto incorporado em hidrogel, no tratamento de inflamações pela via tópica. Ao testar a incorporação da nanoemulsão de copaíba em Carbopol® e quitosana, afirma ser o primeiro (o agente geleificante) já que permaneceu estável durante 60 dias de avaliação, aumentou a penetração de  $\beta$ -Cariofileno na pele, especialmente na derme, camada de interesse no tratamento da inflamação pela via tópica.

No presente estudo não foi possível avaliar a estabilidade do nanogel elaborado por mais de sete dias, contudo, os experimentos foram realizados concomitantes à análise da estabilidade. Portanto, considera-se estável, o nanogel de *C. reticulata* utilizado, por via tópica e por fonoforese, dentro dos cinco dias de aplicação.

#### 4.4 ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS MARCADORES DE LESÃO MUSCULAR

A avaliação dos efeitos terapêuticos da copaíba na forma *in natura* e nanogel, com aplicação tópica e FF, por meio do tratamento de lesão muscular induzida por trauma direto no gastrocnêmio de ratos Wistar, foi quantificada pela análise bioquímica com base nas dosagens de AST e CK.

Por meio da quantificação plasmática dessas enzimas (marcadores indiretos de dano tecidual muscular), constatou-se, conforme se observa nas Tabelas 6 e 7, que no 2º dia de lesão muscular (24 horas após a lesão) todos os grupos apresentaram aumento das concentrações plasmáticas das enzimas quando comparados com uma faixa de referência<sup>1</sup>.

Quando comparados os dados da AST do 2º e 6º dia após a lesão, nota-se que o G1 apresentou um significativo aumento de 147,21% ( $p=0,0505$ ), enquanto que a concentração plasmática da CK, no mesmo período, apresentou redução de 54,10% ( $p=0,1673$ ). Estes resultados apontam uma resposta inflamatória decorrente de lesão do tecido muscular presente 24h após a contusão e uma manutenção do processo inflamatório após seis dias neste grupo.

**Tabela 6.** Resultados estatísticos (em média, desvio padrão-SD, variação percentual- $\Delta$  % e testes inferenciais) quanto aos valores de Aspartato Aminotransferase (AST) do 2º e 6º dias pós lesão muscular.

Grupos experimentais (n=4/grupo)	AST - U/L Plasmática			
	Média $\pm$ SD			
	2º dia	6º dia	$\Delta$ %	P Teste t de Student
G1 - Controle	76,25 $\pm$ 35,92	188,50 $\pm$ 115,53	$\uparrow$ 147,21	<b>0,0505</b>
G2 - Óleo-resina tópico	90,50 $\pm$ 42,47	44,75 $\pm$ 20,27*	$\downarrow$ 50,55	<b>0,0314</b>
G3 - Nanogel tópico	105,85 $\pm$ 76,17	66,75 $\pm$ 57,48	$\downarrow$ 36,94	0,1911
G4 - Ultrassom	88,17 $\pm$ 54,39	76,50 $\pm$ 48,73	$\downarrow$ 13,24	0,4101
G5 - Fonoforese óleo-resina	181,25 $\pm$ 99,83	34,75 $\pm$ 23,34*	$\downarrow$ 80,83	<b>0,0222</b>
G6 - Fonoforese nanogel	100,61 $\pm$ 30,75	45,00 $\pm$ 24,01*	$\downarrow$ 55,27	<b>0,0314</b>

\*Teste ANOVA ( $p=0,0155$ ) - diferença entre os grupos por meio do teste Tukey<sup>2</sup>: G1 vs G2  $p<0,05$ ; G1 vs G5  $p<0,05$ ; G1 vs G6  $p<0,05$ .

<sup>1</sup> Em se tratando de ratos Wistar saudáveis, sem lesão, sedentários, Souza et al. (2010) identificaram uma média de concentração plasmática variando entre 50 – 65 U/L e 80 – 90 U/L, das enzimas AST e CK, em níveis normais, respectivamente. Os resultados obtidos, com pico de ambas enzimas, 24h pós-trauma, aumentam a especificidade da inflamação muscular decorrente do dano tecidual.

**Tabela 7.** Resultados estatísticos (em média, desvio padrão-SD, variação percentual- $\Delta$  % e testes inferenciais) quanto aos valores de Creatina Quinase (CK) do 2º e 6º dias pós lesão muscular.

Grupos experimentais (n=4/grupo)	CK - U/L Plasmática			
	Média $\pm$ SD			
	2º dia	6º dia	$\Delta$ %	P Teste t de Student
G1 - Controle	192,25 $\pm$ 149,80	88,25 $\pm$ 54,79*	↓54,10	0,1673
G2 - Óleo-resina tópico	258,75 $\pm$ 129,04	70,75 $\pm$ 49,07*	↓72,66	<b>0,0176</b>
G3 - Nanogel tópico	416,89 $\pm$ 136,73	279,38 $\pm$ 99,37	↓32,98	0,1399
G4 - Ultrassom	640,69 $\pm$ 222,93	288,16 $\pm$ 169,55	↓55,02	0,0503
G5 - Fonoforese óleo-resina	340,75 $\pm$ 158,43	66,50 $\pm$ 41,58*	↓80,48	<b>0,0570</b>
G6 - Fonoforese nanogel	515,62 $\pm$ 43,29	343,03 $\pm$ 115,24	↓33,47	<b>0,0396</b>

\*Teste ANOVA ( $p=0,0155$ ) - diferença entre os grupos por meio do teste Tukey<sup>2</sup>: G6 vs G1  $p<0,05$ ; G6 vs G2  $p<0,05$ ; G6 vs G5  $p<0,05$ .

Os resultados descritos anteriormente eram esperados e confirmam a presença de dano tecidual no músculo esquelético no grupo controle (G1), uma vez que 24h após a lesão o pico de CK foi maior que AST e a redução de CK ocorreu primeiramente, devido a liberação a níveis plasmáticos de ambos ser distinta, já que esta última enzima, por ser citosólica e de tamanho pequeno, consegue ultrapassar a membrana celular mais rapidamente (GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

Melo et al. (2010) identificaram como valores de referência a média de 131,33 $\pm$ 23,09 U/L para AST em ratos Wistar, enquanto Silveira et al. (2010) identificaram uma média de 98,52 $\pm$ 46,24 U/L para CK, ambos em ratos saudáveis, sem lesão. Quando avaliada a concentração de CK, 120h após lesão muscular por trauma direto no gastrocnêmio em animais sem tratamento, a concentração de CK foi de 158,31 $\pm$ 29,66 U/L.

Nota-se que esta variação depende de cada grupo de animais, idade, peso, condições de ambientação, o kit enzimático utilizado, a calibração do aparelho para leitura, condições de interferência na coleta sanguínea como hemólise, por exemplo. Vale ressaltar, contudo, que na lesão muscular aguda a enzima AST produz aumentos menores que CK, entretanto sua manutenção da concentração plasmática é prolongada em relação à CK. Isso explica o fato da AST ter apresentado, em todos os grupos (Tabelas 6 e 7), menor valor

<sup>2</sup> Em função da reduzida amostra por grupo, o programa estatístico utilizado para realização do teste ANOVA não foi sensível para calcular o valor com precisão do pós teste de Tuckey. Assim, o resultado apontou, para todas as comparações, que houve diferença estatística intergrupo, sendo  $p<0,05$ .

quando comparada com CK, 24 horas após a lesão.

Como se observa nas Tabelas 6 e 7, quando comparados os demais grupos de tratamento no 2º dia e 6º dia após a lesão, AST e CK apresentaram redução de suas concentrações plasmáticas, indicando que em todos os grupos que receberam tratamento houve redução da lesão tecidual com as respectivas intervenções terapêuticas. O grupo Nanogel tópico (G3) apresentou redução não significativa para a concentração plasmática de AST ( $\downarrow 36,94$  e  $p=0,1911$ ) e CK ( $\downarrow 32,98$  e  $p=0,1399$ ).

Pode-se considerar que o agente geleificante (Carbopol®) utilizado para aumentar a viscosidade da nanoemulsão de copaíba pode ter interferido na penetração e retenção de  $\beta$ -Cariofileno a nível de pele, como aponta Kelmann (2012). Como o experimento tratava-se de lesão muscular, *in vivo*, é possível ainda considerar que não foi penetrado o princípio anti-inflamatório da copaíba, a nível muscular, apenas com sua aplicação tópica, podendo este ter atingido apenas nível dérmico, como aponta Lucca (2013) e Lucca et al. (2015).

Pelo fato de neste estudo não ter sido realizada a quantificação de  $\beta$ -Cariofileno na nanoemulsão e conseqüentemente no nanogel, não é possível ser afirmada a quantidade exata do composto majoritário presente na formulação, sendo, portanto, possível que a concentração de  $\beta$ -Cariofileno tenha sido insuficiente para recuperar o processo inflamatório decorrente da lesão muscular esquelética em ratos Wistar, quando utilizado por via tópica.

Silva (2014) evidencia, contudo, que a ação anti-inflamatória de nanoemulsão de copaíba é superior ao óleo-resina natural e que a diferença na concentração de  $\beta$ -Cariofileno entre estes acaba não sendo a explicação para este fato. Por mais que a concentração seja menor na nanoemulsão em comparação com o óleo natural de copaíba, a vantagem da nanoemulsão em relação ao óleo é decorrente da presença de tensoativos que desorganizam os lipídeos da camada córnea da pele, facilitando a permeação do  $\beta$ -Cariofileno da nanoemulsão, potenciando os efeitos farmacológicos.

Nos grupos G2, G5 e G6 reduziram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) as concentrações plasmáticas de AST e CK quando comparados os dados do 6º e 2º dia após a lesão. Os resultados intragrupo desses dois biomarcadores, portanto, apontaram melhora da lesão no tecido muscular esquelético de ratos Wistar dos grupos tratados com óleo-resina tópico e FF associado ao nanogel de copaíba.

No grupo G5 (fonoforese óleo-resina) a redução foi estatisticamente significativa apenas para a variável AST ( $p=0,0222$ ); CK apontou uma redução próxima ao nível de significância adotado nesta pesquisa ( $p=0,0570$ ). Esses resultados indicam a provável melhora

da lesão muscular esquelética, uma vez que AST já apontou redução significativa. Por ser esta uma enzima que necessita de maior permeabilidade da membrana celular para ser liberada em níveis plasmáticos (COOKE et al., 2009), portanto, a sua redução indica estágio de recuperação tecidual. A menor permeabilidade de membrana está associada à melhora do processo inflamatório.

Na comparação entre os grupos (intergrupos), observou-se diferença significativa para a variável AST ( $p=0,0155$ ) entre os grupos G2, G5 e G6 quando comparados ao G1 no 6º dia (Tabela 6). Considerando que a AST do grupo controle apresentou aumento, está diretamente relacionado à manutenção do quadro de lesão muscular, uma vez que esta enzima, por ser mitocondrial e citossólica, necessita de um quadro lesivo maior ou contínuo para ser liberada na corrente sanguínea, sugerindo que o processo inflamatório encontra-se em uma fase subaguda e não houve reparação da lesão no G1.

Para a variável CK, na análise intergrupo (Tabela 7) identificou-se diferença ( $p=0,0015$ ) entre os grupos G1, G2 e G5 quando comparados ao G6 (Fonoforese nanogel) no 6º dia. Esses resultados indicam que a média de CK, no 6º dia, sobressaiu-se aos demais grupos.

É importante ressaltar que a CK é amplamente utilizada como marcador de lesão muscular reversível, estresse muscular, alteração da atividade e necrose. Apresenta seu pico nas primeiras 24 horas, voltando ao normal 48 horas após o dano tecidual (MICHIMA; MIRANDOLA; FERNANDES, 2010; SUSSAI, 2008), mesmo que o processo de recuperação não tenha sido obtido, por isso é indispensável avaliá-la concomitantemente à concentração de AST, a fim de demarcar a provável fase em que se encontra o processo de recuperação do tecido muscular esquelético (SOUZA et al., 2010).

Não há estudos prévios semelhantes à presente investigação de modo a serem promovidas comparações de resultados, e que enfatizem a AST e CK como marcadores do dano tecidual muscular em ratos Wistar, submetidos ao tratamento com FF associado à copaíba e FF com nanogel de copaíba. Cabe salientar, contudo, que a faixa de referência para este marcador encontrado na literatura apresenta muita variação (MICHIMA; MIRANDOLA; FERNANDES, 2010; ARAUJO et al., 2010; SOUZA et al., 2010; SUSSAI, 2008).

Isso pode estar diretamente relacionado à fatores como: a idade do animal, sexo, peso, condições de ambientação, estresse dos animais, ao kit enzimático utilizado, à calibração do aparelho, oscilação de energia, método de analgesia e principalmente a forma

de coleta sanguínea utilizada, visto que a ocorrência de hemólise interfere diretamente na leitura do resultado.

Sussai (2008) comparou dois grupos de ratos Wistar submetidos ao exercício físico de alta intensidade, sendo o primeiro grupo o controle e o segundo aquele tratado com laser de baixa potência. Nas primeiras 24h após o exercício, constatou um aumento na liberação de CK ( $561,1 \pm 38,09$  U/L) no primeiro grupo, enquanto que no grupo tratado com laser os índices de CK após o mesmo período ( $230,0 \pm 24,91$  U/L) foram menores, com diferença significativa ( $p < 0,001$ ) para esse biomarcador.

Os resultados desta pesquisa corroboram ao que Silveira et al. (2010) esclarecem. Para os mesmos, a fonoforese visa alcançar concentrações terapêuticamente relevantes do fármaco introduzido transdermicamente nos tecidos submetidos ao procedimento pela utilização de ondas de US. No estudo, com modelo de lesão semelhante ao proposto nesta pesquisa, compararam a variável CK em animais com músculo sem lesão, lesão muscular sem tratamento, lesão muscular com tratamento de FF e gel DMSO (dimetilsulfóxido) e lesão muscular com tratamento do gel DMSO tópico. Após cinco dias de tratamento a CK apresentou uma redução significativa para o grupo com FF e gel de DMSO, indicando melhora na cicatrização muscular.

Acredita-se que o uso combinado da fonoforese, na frequência de 1 MHz, pulsado à 20%, com frequência de pulsação de 16 Hz, associado a agentes anti-inflamatórios pode representar uma alternativa viável e eficaz no tratamento de lesões musculares, em especial associado ao princípio ativo anti-inflamatório nanoestruturado em gel, como foi o caso de G6 (fonoforese nanogel) (Tabelas 6 e 7).

O mecanismo pelo qual o US ajuda a reparar os tecidos está provavelmente relacionado aos seus efeitos mecânicos (cavitação), produzindo alterações na permeabilidade da membrana e estimulando o transporte de substâncias mensageiras secundárias, como o cálcio, através da membrana celular. Estes mensageiros secundários podem, então, estimular a proliferação de células miogênicas, no caso do músculo esquelético as células satélites e estimular a reparação celular (MARKERT, 2005; KARNES; BURTON, 2002).

Assim como, Borges (2006), enfatiza que a modulação do ultrassom no modo pulsado, com a frequência de pulsação (repetição do pulso) de 16 Hz, é fundamental na elevação dos níveis intracelulares de cálcio, sendo este o mecanismo responsável pela castata de liberação de fatores de reparação tecidual.

Lee e Zhou (2015), em estudo quantitativo *in vitro*, avaliaram por fluorescência a porcentagem da penetração de partículas nanométricas em orelha suína (60, 220 e 840nm), pela modalidade da FF com diferentes protocolos (ciclo de trabalho 20%, 50% e 100%, intensidade de 0,3; 0,5 e 1,0 W/cm<sup>2</sup>, tempo de 7, 15 e 30 minutos e frequência de 1 MHz).

Esses pesquisadores constataram que a FF aumenta a penetração das nanopartículas e a sua concentração aumenta proporcionalmente ao tempo, intensidade e ciclo de trabalho e é inversamente proporcional ao tamanho da partícula. Para nanopartículas de 60 nm, a eficiência de penetração transdérmica aumentou de 28,0%±2,3% na sonicação de sete minutos para 62,6%±5,4% na sonicação de 30 minutos.

Ainda concluíram que, por se tratar de estudo *in vitro*, a ausência de circulação sanguínea dificulta compreender os possíveis resultados a partir da absorção do fármaco em organismos vivos, sendo indispensável a análise pré-clínica destes parâmetros. Isso reforça a relevância do presente estudo e evidencia sua importância para estudos clínicos.

Na análise intergrupos observou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) da AST dos grupos G5 e G6, quando comparados ao G1. Estes resultados sugerem que a FF foi eficaz no processo de reparação da lesão do tecido muscular, tanto associado à copaíba *in natura* quanto em nanogel de copaíba. Enquanto o grupo controle aumenta a concentração plasmática de AST no 6º dia após a lesão, os grupos tratados, por fonoforese, por sua vez, apresentaram redução desta enzima, de forma não fisiológica, uma vez que, CK, pode apresentar redução fisiológica após 48 horas de lesão do tecido muscular, corroborando com Souza et al., (2010).

Logo, a redução dos índices de AST, pode ser atribuída a associação da fonoforese com o óleo-resina e nanogel, de acordo, ao encontrado por Lee e Zhou (2015), segundo os quais os parâmetros do US e o tamanho da partícula são determinantes para que ocorra a permeação transcutânea do princípio ativo utilizado.

Quando comparados os grupos óleo-resina tópico (G2) e FF óleo-resina (G5), observou-se redução significativa da concentração de AST em relação ao G1 ( $p < 0,05$ ). Nota-se que a intervenção para lesão muscular em ratos Wistar, com FF e óleo de copaíba *in natura* apresentou uma redução de 80,83%, ( $p = 0,0222$ ) para AST e 80,48% ( $p = 0,0570$ ) para CK. Enquanto a terapia com o óleo de copaíba *in natura* de forma tópica mostrou redução de 50,55% ( $p = 0,0314$ ) para AST e de 72,66% ( $p = 0,0176$ ) para CK. Por essa análise é possível inferir que a associação de óleo-resina de *C. reticulata* e FF foi mais eficaz que a aplicação tópica de óleo-resina desta espécie.

É cabível salientar que neste estudo de nanoemulsão de copaíba, obtida pelo método de inversão de fases, não foi possível quantificar a concentração de  $\beta$ -Cariofileno após a formulação. Então não há como estimar se a concentração deste composto majoritário se manteve a nível terapêutico como apresentado na óleo-resina *in natura*. Esta, por sua vez, apresentou teor de 39,91%.

Como explicam Dias et al. (2014), a obtenção de nanoemulsão de copaíba por este método, embora seja facilmente obtido em escala laboratorial, apresenta baixo custo e resulta em formulações com tamanho de partículas pequenos, com estabilidade e baixo PDI, apontando estabilidade da nanoemulsão. Devido ao aquecimento da fase oleosa ocorre, neste sistema, a evaporação, o que coincide com a redução da concentração da fração volátil do óleo de copaíba, em especial o  $\beta$ -Cariofileno.

Este fato pode explicar a ocorrência de uma maior redução das enzimas AST e CK, após cinco dias de tratamento na análise intragrupo, com o óleo-resina tópico e FF com óleo-resina, em relação à formulação nanogel de copaíba, utilizada de forma tópica.

O grupo FF nanogel (G6), por outro lado, na análise intragrupo apontou redução significativa para AST e CK, enquanto que o grupo nanogel tópico (G3) não apresentou redução significativa. Esses resultados corroboram com os de Lee e Zhou (2015) que destacaram a FF como facilitadora da permeação transdérmica do fármaco por via tópica, assim como Kelmann (2012) e Lucca (2013). Estes enfatizaram ser a nanoemulsão do óleo de copaíba incorporada ao hidrogel (Carbopol®) mais eficaz para permeação transdérmica atrelado ao fato do tamanho da partícula, quando comparado ao óleo *in natura*, visto que seu aspecto lipofílico, e untuoso, reduz o índice de permeação cutânea.

Pode ser deduzido com os resultados do presente estudo que a formulação nanogel de óleo-resina de *C. reticulata*, obtida pelo método de inversão de fases, no modelo terapêutico proposto, quando utilizada por meio da FF, causou melhora da lesão muscular esquelética, em cinco dias de tratamento consecutivo. A concentração da utilização tópica desta formulação, contudo, não foi uma alternativa eficaz para este modelo de experimento, visto que o hidrogel pode ter interferido na penetração de  $\beta$ -Cariofileno em níveis subcutâneos e musculares.

Embora estudos (KELMANN, 2012; LUCCA et al., 2015; DIAS et al., 2014) demonstrem que as moléculas nanoestruturadas apresentem maior índice de permeação/retenção, e por menor que seja a concentração final do princípio majoritário

comparado ao óleo *in natura*, estes sistemas são mais vantajosos. No presente estudo só foi mais vantajoso o uso do nanogel quando associado à FF.

Lucca (2013) ainda ressalta em suas conclusões que por meio da incorporação da nanoemulsão em hidrogel houve aumento significativo da penetração do  $\beta$ -Cariofileno na derme, camada de interesse no tratamento de inflamações pela via tópica em estudo *in vitro*.

No presente estudo o nanogel, quando aplicado por via tópica, apresentou uma melhora, porém sua utilização por meio da FF foi mais eficaz. Este fato pode ser atrelado à boa condução das ondas ultrassônicas aos tecidos subcutâneos pelo Carbopol® da formulação obtida, desorganizando a membrana do extrato córneo, potencializando a permeação das nanopartículas do óleo de copaíba, favorecendo os efeitos farmacológicos do princípio ativo  $\beta$ -Cariofileno.

Constata-se, com estes resultados, que os efeitos do US foram potencializados quando associado ao nanogel de Copaíba, indicando que as características físico-químicas do sistema, como viscosidade e tamanho da partícula, são fatores determinantes para a eficácia da atividade anti-inflamatória e reparação tecidual. Portanto, acredita-se que a FF foi capaz de proporcionar a permeação do princípio ativo  $\beta$ -Cariofileno em níveis subcutâneos, e possivelmente tenha atingido o tecido muscular. Outra explicação possível, é decorrente dos efeitos térmicos do US, que induz vasodilatação periférica, desta forma, o agente terapêutico atinge níveis sistêmicos.

Como explicam Lee e Zhou (2015), Silveira et al., (2010), acredita-se que o processo cicatrização dos tecidos moles, seja proveniente dos efeitos térmicos (aumento do fluxo sanguíneo) e não térmicos (cavitação e o fluxo acústico). A cavitação é proveniente da acumulação de energia ultrassônica, sendo um dos principais mecanismos na sonoforese, propiciando a permeabilidade do fármaco. Somado aos efeitos térmicos do ultrassom de baixas frequências, as bolhas induzidas pela vibração mecânica do ultrassom, promove aquecimento tecidual, favorecendo o transporte de drogas.

Diferentes estudos com plantas medicinais e FF apontam resultados distintos quanto à eficácia da técnica, o que pode está diretamente relacionado à formulação utilizada por meio FF, parâmetros do US, modelo de lesão. Como mostram Brito et al. (2006), ao compararem o uso tópico de copaíba e por FF em miosite induzida por carragenina em ratos Wistar, no modelo de edema de pata e histopatológico, a FF do óleo copaíba não apresentou resultado estatisticamente significativo.

Fontoura (2007), ao avaliar as propriedades anti-inflamatórias da arnica (*Lychnophora ericoides*) associada ao uso da FF em ratos Wistar no tratamento de lesões musculares, constatou que a FF é um meio efetivo de entrega de fármacos nos tecidos subcutâneos, visto que apenas a aplicação tópica de gel de arnica não mostrou resultados semelhantes à aplicação do US terapêutico com gel de arnica, sobretudo na diminuição do edema. Os resultados encontrados no grupo G6 corroboram aos desse pesquisador.

Maia-Filho (2011) analisou a ação anti-inflamatória do gel da Babosa a 2% (*Aloe barbadensis* Mill.) associado ao US pulsátil (fonoforese) no modelo de edema de pata em Wistar. Evidenciou que os animais tratados com gel de *A. barbadensis* a 2% associado ao US apresentaram redução significativa do edema quando comparados ao grupo controle, ao mesmo tempo que se mostrou comparável ao grupo de animais submetidos a tratamento com indometacina.

Lima (2015), em modelo de ensaio de trauma contuso em Wistar semelhante ao desta pesquisa, avaliou o potencial anti-inflamatório da oleorresina de *Copaifera paupera* na fase inflamatória da lesão muscular. Por meio de análise histológica do músculo gastrocnêmio foi possível constatar que o grupo, tratado com FF e gel de *C. paupera* a 10%, apresentou melhora do tecido apenas no parâmetro fibrose, quando comparado ao grupo controle. Não apresentaram redução significativa as variáveis: edema, necrose e infiltrado inflamatório.

Os dados desta pesquisa vão ao encontro dos encontrados por Miranda et al. (2016). Este analisou a atividade anti-inflamatória do óleo-resina da *C. reticulata* em modelos farmacológicos experimentais em camundongos. Induziu o edema de pata por meio da carragenina e comparou os animais submetidos à terapia por via oral de 500mg de óleo de copaíba, os do grupo FF e óleo de copaíba *in natura* e com o grupo controle, na primeira hora após a terapia. Dentre os resultados, observou redução significativa ( $p < 0,05$ ) do índice de edema, uma hora após o tratamento com óleo de copaíba por via oral ( $34,8 \pm 18,8$ ) e por FF ( $15,8 \pm 9,5$ ) comparados com o controle ( $43,7 \pm 20,0$ ).

No atual experimento, contudo, foi observado um comportamento de irritabilidade nos animais dos grupos tratados com o óleo-resina *in natura* (G2 e G5), tanto pelo uso tópico quanto pela fonoforese. A região da lesão, após a aplicação do óleo de copaíba, permanecia com o produto até a sessão seguinte, e este era absorvido gradativamente. Os animais mordiam constantemente a pata na qual o produto fora aplicado, sugestivo de coceira, dor e irritabilidade cutânea.

Com base na análise dos comportamentos dos animais dos grupos G2 e G5, acredita-se que o uso contínuo do óleo-resina da espécie *C. reticulata*, na sua forma *in natura*, promova reação de prurido cutâneo, sendo um ponto negativo para a utilização tópica desse produto. Por mais que os resultados clínicos tenham demonstrado uma melhora estatisticamente significativa nos valores de AST e CK após o tratamento do processo lesivo da musculatura esquelética, há que ser considerados os sinais de irritação demonstrados pelos animais durante o experimento em cinco dias de aplicação consecutiva do óleo tópico e deste associado à fonoforese. Lima (2015) defende a hipótese da irritabilidade cutânea e lesões de continuidade da pele como resposta às áreas de maior absorção e concentração do óleo *in natura* da espécie *C. paupera*.

O comportamento de irritabilidade apontado acima não foi observado nos animais tratados com o nanogel de copaíba (G3 e G6). Nos animais desses grupos não ocorreu a presença de lesão cutânea, ferimentos ou processo de continuidade durante os experimentos. Este dado, infere a vantagem do uso tópico e por fonoforese do nanogel, em relação ao uso tópico e por fonoforese do óleo de copaíba *in natura*.

Os dados desta pesquisa vão ao encontro de Lima (2015). Esta analisou em ratos Wistar a resposta da aplicação cutânea de doses repetidas diariamente de óleo-resina de *C. paupera*, gel de copaíba e fonoforese. Por seis dias consecutivos, o uso tópico do gel de copaíba de *C. paupera* à 10% e associado à fonoforese não produziu eritema ou edema na pele dos animais (classificação: grau 0 de eritema). Por outro lado, o uso contínuo do óleo *in natura* desta espécie, a partir do quinto dia de aplicação, ainda na pesquisa citada, provocou um grau 2 de eritema. Notou-se a formação de lesões de continuidade da pele 24 horas após a sexta aplicação. Em conclusão, a autora considera que o uso tópico e por fonoforese do óleo-resina de *C. paupera* causa irritação, mas não corrosividade, já que as lesões foram reversíveis após a suspensão da aplicação tópica.

Diante dos resultados descritos nessa seção, infere-se que o tratamento do reparo da musculatura esquelética, quando utilizada a FF com nanogel de copaíba, apresenta melhor resposta terapêutica frente ao modelo de ensaio proposto nesta pesquisa, sem sinais comportamentais de irritabilidade cutânea do animal.

## **5 CONCLUSÃO**

---

## 5 CONCLUSÃO

Em decorrência deste estudo, pôde-se concluir que:

- O óleo-resina utilizado da espécie *C. reticulata* Ducke, coletada no período chuvoso, apresentou alto índice de  $\beta$ -Cariofileno (39,91%), sesquiterpeno majoritário da fração volátil, caracterizando à este a propriedade anti-inflamatória;
- Foi possível obter uma nanoemulsão do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke, com partículas nanométricas (236,92 $\pm$ 48,80 a 302,93 $\pm$ 2,46), monodispersas (0,226 $\pm$ 0,081 a 0,271 $\pm$ 0,016), com manutenção do potencial zeta apropriado (-31 a -36 mV). Isso configurou para estas amostras de nanoemulsão de *C. reticulata* uma estabilidade em 25°C $\pm$ 2°C, por 30 dias;
- O nanogel de copaíba formulado com concentração de 20% de nanoemulsão de copaíba e 80% de gel de Carbopol® não apresentou separação de fases no período de sete dias, em 25°C $\pm$ 2°C. Sua apresentação final manteve um odor normal e característico de copaíba, assim como, foi facilitador do deslizamento do cabeçote do ultrassom e de rápida absorção;
- Os tratamentos de aplicação tópica do óleo-resina de *C. reticulata*, de sua associação à fonoforese foram eficazes no experimento quanto à reparação da musculatura esquelética, contudo, os animais demonstraram sinais comportamentais de irritabilidade cutânea com a aplicação por 5 dias consecutivos do óleo de copaíba *in natura*.
- O tratamento de aplicação tópica do nanogel de *C. reticulata* não apresentou resultado significativo no processo de reparação da musculatura esquelética em ratos Wistar, a partir da análise de AST e CK. Não foi observado, contudo, resposta comportamental de irritabilidade cutânea no animal.
- O tratamento de fonoforese do nanogel de *C. reticulata* foi eficaz no experimento quanto à reparação da musculatura esquelética, pela redução significativa de AST e CK associada à resposta comportamental dos animais. Esta formulação não apresentou prejuízos cutâneos, pela ausência de irritabilidade, lesão ou processos de continuidade na pele dos animais.
- Os resultados desta pesquisa lançam perspectivas para o desenvolvimento de estudos futuros de avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* do óleo de copaíba

nanoemulsionado associado ao hidrogel e análise histológica do tecido tratado. Também é sugerida a avaliação *in vitro* de permeação e retenção com diferentes parâmetros do US, utilizando a FF e aplicação tópica do nanogel de *C. reticulata* Ducke.

- Cabe salientar a importância de novos estudos realizarem a caracterização físico-química e estabilidade do nanogel de copaíba, com a respectiva quantificação do teor de Cariofileno de acordo com o método de obtenção do nanosistema proposto nesta pesquisa.

## **6 REFERÊNCIAS**

---

## REFERÊNCIAS

ALENCAR, E. N. et al. Chemical characterization and antimicrobial activity evaluation of natural oil nanostructured emulsions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, 880–888, 2015.

ALFREDO, P. P. et al. Análise qualitativa dos efeitos da sonoforese com Arnica montana sobre o processo inflamatório agudo do músculo esquelético de ratos. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 15, n. 3, p. 273-9, 2008.

ALMEIDA, M. R. **Estudo farmacológico do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de Myrcia sylvatica (G.Mey.) DC.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, 2014. Disponível em: < <http://www.ufopa.edu.br/academico/pos-graduacao/banco-de-teses/ppg-rna/turma-de-2012/almeida-marissol-rabelo-de/view>>. Acesso em: 24 jan 2015.

ARAÚJO, G. G. et al. Padronização de um protocolo experimental de treinamento periodizado em natação utilizando ratos Wistar. **Rev Bras Med Esporte**, v. 16, n. 1, p. 51-56, 2010.

BABTISTELLA, M. F. Atividade sérica das enzimas aspartato aminotransferase, creatino quinase e lactato desidrogenase em equinos submetidos a diferentes intensidades de exercícios. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. XII, n. 13, p. 33-42, 2009.

BATISTA, C. R. **Avaliação sazonal da produção, composição química e atividade fitopatogênica do oleorresina de Copifera spp. na flona Tapapós.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Oeste do Pará. Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas. Santarém, 2013.

BORGES, F. S. **Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas.** São Paulo, Ed. Phorte, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 92 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRITO, M. V. H. et al. Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos. **Rev. Para. Med.**, v. 20, n. 2, p. 17-24, 2006.

CAMPOS, M.S.; KASSISSE, M.G.; SPADARI, R.C. **Influência do ultrassom na permeação cutânea da cafeína: estudo em fragmentos de pele e em adipócitos isolados de suínos.** São Paulo, 2004. Tese [Doutorado em Biologia Funcional e molecular]-Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 159–175, 2009.

COOKE, M.B. et al. Creatine supplementation enhances muscle force recovery after eccentrically-induced muscle damage in healthy individuals. **Journal of the International Society of Sports Nutrition.**, v.6, p.13, 2009.

CORRÊA, M. P. **Dicionários de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura: 1932.

DIAS, D. O. et al. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of  $\beta$ -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 721, p. 79–84, 2014.

FERNANDEZ, P., et al. Nano-emulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 251, p. 53-58, 2004.

FLORES, F.C. et al. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Quim. Nova**, v. 6, p. 968–972, 2011.

FONTOURA, H. S. **Influência das atividades anti-inflamatórias da arnica (*Lychnophora ericoides*) no tratamento de lesões musculares através do uso da fonoforese.** Brasília, 2007. (tese) Universidade de Brasília Faculdade de Ciências da Saúde Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde Doutorado em Ciências da Saúde.

FORGIARINI, A. et al. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature Langmuir. **The ACS journal of surfaces and colloids**, v. 17, p. 2076– 2083, 2001.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 26, p. 9099-9104, 2008.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Perfil bioquímico no exercício. **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** 2 Ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2006.

GUIRRO, E; GUIRRO, R. **Fisioterapia dermatofuncional fundamentos - recursos - patologias.** 3. ed. Manole, São Paulo - SP, 2002.

HALSON, S.; JEUKENDRUP, A. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. **Sports Med.**, v. 34, p. 967-981, 2004.

HOELLER, S.; SPERGER, A.; VALENTA, C. Lecithin based nanoemulsions: a comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behavior and skin permeation. **Int. J. Pharm.**, v. 370, p. 181-186, 2009.

ISAAC, V.L.B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

JESUS, G.S; FERREIRA, A.S.; MENDONÇA, A. C. Phonoforesis x cutaneous permeation. **Fisioterapia em Movimento**, v. 19, n. 4, p. 83-88, 2006.

KARNES, J.L.; BURTON, H. W. Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 83, p. 1-4,

2002.

KASPER, C. E.; TALBOT, L. A.; GAINES, J. M. Skeletal muscle damage and recovery. **AACN Clinical Issues**, v. 13, n. 2, p. 237-247, 2002.

KAUHANEN, S.; LEIVO, I.; MICHELSSON, J. E. Early muscle changes after immobilization: An experimental study on muscle damage. **Clinical Orthopedic**, v. 297, p. 44-50, 1993.

KELMANN, R. G. **Estudos de formulação, permeação cutânea e atividade anti-herpética de formas farmacêuticas nanoemulsionadas contendo galato de pentila**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Farmácia Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, 2012.

KOEKE, P. U. **Estudo comparativo da eficácia da fonoforese, do ultra-som terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortisona no tratamento do tendão de rato em processo de reparo tecidual**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós-graduação em Bioengenharia. São Carlos, 2003.

LEANDRO, L. M. et al. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaíba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, p. 3866-3889, 2012.

LEE, K. L.; ZHOU, Y. Quantitative evaluation of sonoforesis efficiency and its dependence on sonification parameters and particle size. **JUM March**, v. 34, p. 519-526, 2015.

LIMA, H. S. **Anti-inflammatory potential of the oleoresin of *Copaifera paupera* (Herzog) Dwyer - Leguminosae**. 2015. 82 p. Dissertação de Mestrado em Biociências. Programa de Pós Graduação em Biociências. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2015.

LUCCA, G. C. **Avaliação da permeação cutânea de nanoemulsão contendo óleo de copaíba incorporada em hidrogéis**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto Alegre, RS, 2013.

LUCCA, G. C. et al. Determination of  $\beta$ -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaíba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HS-GC/MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 104, n. 10, p. 144-148, 2015.

MACIEL, A. P. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA-FILHO, A. L. M. et al. Efeito do gel de babosa (*Aloe barbadensis* Mill.) associado ao ultrassom em processo inflamatório agudo. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 13, n. 2, p. 146-150, 2011.

MARKERT, C. D. Nonthermal ultrasound and exercise in skeletal muscle regeneration. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 86, p. 1304-1310, 2005.

MCBRIER, N. M. et al. Reliability and validity of a novel muscle contusion device. **Journal**

of **Athletic Training**, v. 44, n. 03, p. 275-278, 2009.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 01-06, 2012.

MICHIMA, L. E.; MIRANDOLA, R. M.; FERNANDES, W. R. Estudo da isoenzima creatina quinase CKMB sérica em equinos de enduro após exercício físico prolongado. **Braz. J. Vet. Res. anim. Sci.**, v. 47, n. 1, p. 23-30, 2010.

MIRANDA, D.H.S. et al. Estudo comparativo da ação anti-inflamatória do óleo-resina da *Copaifera reticulata* em modelos farmacológicos experimentais em camundongos. **Fisioterapia Brasil**. v. 17, p. 1-6, 2016.

OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera sp.* e estudo da ação repelente frente a *Aedes aegypti***. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. 108 pg. Ribeirão Preto, 2008.

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju, PA. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

OLSSON, D. C. et al. Therapeutic ultrasound in the tissue healing. **Ciência Rural**, v. 38, n. 4, p. 1199-1207, 2008.

PACHECO, C. C. **Desenvolvimento de nanocápsulas contendo óleo de *Copaifera reticulata* Ducke**. Manaus – AM. 2014. Dissertação. Universidade Federal do Amazonas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

PAULA-FREIRE, L.I.G., et al. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. 2013. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 356-362, 2014.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia**. 2. ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural, 2009.

POLAT, B. E.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R. Low-frequency sonophoresis: application to the transdermal delivery of macromolecules and hydrophilic drugs. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 7, n. 12, p. 1415-1432, 2010.

REGINA, C. V.; MARTINS-da-SILVA, R. C. V.; PEREIRA, J. F.; LIM, A. H. C. O gênero *Copaifera* (leguminosae – caesalpinioideae) na Amazônia brasileira. **Rodriguésia**, v. 59, n. 3, p. 455-476, 2008.

RISSI, R. **Alterações musculoesqueléticas em camundongos obesos e desnutridos após protocolo de imobilização articular do membro pélvico unilateral**. Campinas, 2014. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural – Universidade Estadual de Campinas.

- RODRIGUES, E. C. R. et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaíba (Copaifera Duckei) oleoresin. **Brasilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, n. 6, p. 699-705, 2014.
- SACHETTI, C. G. et al. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de copaifera. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 937-941, 2009.
- SAJJADI, S.; Nanoemulsion Formation by Phase Inversion Emulsification: On the Nature of Inversion. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 22, n. 13, p. 5597-603, 2006.
- SAJJADI, S.; ZERFA, M; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene-water emulsions with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate/polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Span20/Tween20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 218, p. 241-254, 2003.
- SILVA, D. T. C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e mutagênica de microemulsão tópica contendo óleo de copaíba**. Campina Grande, PB, 2014. (Trabalho de Conclusão de Curso). Graduação em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba.
- SILVA, E.S. et al. Análise físico-química do óleo-resina de *C. reticulata* direcionando um planejamento ambiental e comercial. **In: V Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental Belo Horizonte/MG. IBEAS – Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais**. 2014.
- SILVEIRA, P. C. et al. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. **Ultrasound in Med. & Biol.**, v. 36, n. 1, p. 44-50, 2010.
- SORICHTER, S.; et al. Skeletal troponin I as a marker of exercise-induced muscle damage. **J. Appl. Physiol.**, v. 83, n. 4, p. 1076-1082, 1997.
- SOUZA, R. A. et al. Influência da suplementação aguda e crônica de creatina sobre marcadores enzimáticos de dano muscular de ratos sedentários e exercitados com natação. **Rev. bras. Educ. Fís. Esporte**, v. 24, n. 3, p. 343-52, 2010.
- SUSSAI, D. A. **Análise dos níveis de creatina kinase sérica e da apoptose celular no músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a natação forçada e tratados com laser de baixa potência (660nm)**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Campo Grande, 2008.
- TAPPIN, M. R. R. et al. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.
- TRINDADE, F.T.T., et al. Copaifera multijuga ethanolic extracts, oilresin, and its derivatives display larvicidal activity against Anopheles darlingi and Aedes aegypti (Diptera: Culicidae). **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 23, p. 464-470, 2013.
- VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of

copaíba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne -A comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 248–254, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2. p. 273-286, 2002.

ZIECH, R. E. et al. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de *Copaifera reticulata* frente a *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de casos de otite em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 909-913, 2013.



**ANEXO I: CERTIFICADO DO CÔMITE DE ÉTICA DE USO ANIMAL-CEUA-UNIFAP**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

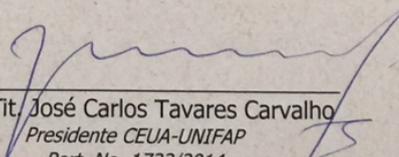
**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na reunião de 17 de setembro de 2015, o parecer referente ao protocolo no. **0017/2015** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Reparação tecidual em músculo esquelético de ratos wistar por fonoforese e nanogel de *Copaifera reticulata* Ducke**" coordenado por **Tamyres Carla Porteglio de Lima**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

**CERTIFICATE**

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 17 September 2015, the final decision about the Protocol **0017/2015** and certify that the research project entitled "**Reparação tecidual em músculo esquelético de ratos wistar por fonoforese e nanogel de *Copaifera reticulata* Ducke**" coordinated by **Tamyres Carla Porteglio de Lima**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 17 de setembro de 2015

  
Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho  
Presidente CEUA-UNIFAP  
Port. No. 1733/2014

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho  
SIAPE 2509110

Universidade Federal do Amapá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP  
Rod. Juscelino Juscelino Kubitschek, km 02 – Campus Marco Zero,  
Macapá - AP, 68903-419 email: farmacos@unifap.br  
Fone (96)4009-2907

## ANEXO II: AUTORIZAÇÃO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

<b>Número:</b> 52651-1	<b>Data da Emissão:</b> 16/02/2016 15:41	<b>Data para Revalidação*:</b> 17/03/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: tamyres carla porteglio de lima	CPF: 531.864.602-63
Título do Projeto: REPARAÇÃO TECIDUAL EM MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS WISTAR POR FONOFÓRESE E NANOGEL DE Copaifera reticulata Ducke	
Nome da Instituição : Universidade Federal do Amapá	CNPJ: 34.868.257/0001-81

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	PESQUISA COM OLEORRESINA DE COPAIFERA	02/2016	02/2017

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

#### Outras ressalvas

1	Os locais de coleta do óleo deverão ser informados a equipe de gestão no momento do agendamento das visitas a Unidade de Conservação.
---	---

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Madson Ralide Fonseca Gomes	orientador	624.729.252-04	2916931 SSP-PA	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PA	FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS	UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 91956285**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ – UNIFAP**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Rod. Juscelino Kubitschek, 3296-3364 - Jardim Equatorial, Macapá - AP, 68903-419, Brasil.