

DESENVOLVIMENTO DE NANOGEL DE *Copaifera reticulata* SOBRE A LESÃO MUSCULAR EM RATOS USANDO FONOFORESE

Tamyres Carla Porteglio de Lima

Mestranda em Ciências da Saúde, Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Brasil.

Amanda Furtado de Almeida

Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Brasil.

Elaine Cristina Pacheco de Oliveira

Doutora em Ciências Agrárias, docente permanente do Programa de pós-graduação de Biociências da Universidade Federal do Oeste do Para (UFOPA), Brasil.

José Otávio Carrera Silva Júnior

Doutor em Ciências Farmacêuticas, docente do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Pará (UFPA), Brasil.

Roseane Maria Ribeiro Costa

Doutora em Ciências Farmacêuticas, docente do Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Pará (UFPA), Brasil.

Areolino Pena Matos

Doutor em Engenharia Biomédica, docente do curso de fisioterapia da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Brasil.

Madson Ralide Fonseca Gomes

Doutor em Ciências Farmacêuticas, docente do curso de farmácia da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), Brasil.

Autor correspondente:

Madson Ralide Fonseca Gomes
madson@unifap.br

RESUMO: A copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke), planta medicinal bastante usada nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, tem difícil permeação cutânea na forma *in natura*, e esta permeabilidade é aumentada através do uso de nanoformulações e ainda a fonoforese, ultrassom de baixa frequência que aumenta a permeabilidade cutânea de substâncias. Sendo assim, foi analisado e comparado o efeito do óleo-resina de copaíba, *in natura* e de sua nanoemulsão em gel (nanogel) associado à fonoforese, na reparação muscular em ratos *Wistar*. Pelo método inversão de fases, formulou-se a nanoemulsão de copaíba. Esta foi incorporada ao hidrogel *Carbopol*[®] (20% nanoemulsão, 80% *Carbopol*[®]). Os animais (n = 24, machos) foram divididos em seis grupos e posteriormente foram submetidos à lesão traumática do músculo gastrocnêmio. A reparação muscular foi analisada por meio de dosagem plasmática de Aspartato Aminotransferase (AST) e Creatina Quinase (CK). Os resultados apontaram que 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: Fadiga muscular; Farmacocinética; Fonoforese; Plantas medicinais.

DEVELOPMENT OF NANOGEL FROM *Copaifera reticulata* ON MUSCLE LESIONS IN RATES WITH PHONOPHORESIS

ABSTRACT: *Copaifera reticulata* Ducke is a medicinal plants greatly employed in northern and northeastern Brazil. However, skin penetration is difficult when it is applied *in natura*. However, permeability increases through nanoformulations and phonophoresis and low frequency ultrasound that increases skin permeability of compounds. The effect of oil-resin of copaiba, *in natura* and in gel (nano-emulsion), associated to phonophoresis, was analyzed and compared for muscle repair in *Wistar* rats. Copaiba nano-emulsion was formulated by phase inversion. It was incorporated to hydrogel *Carbopol*[®] (20% nano-emulsion, 80% *Carbopol*[®]). Male animals (n=24) were divided into six groups and later underwent traumatic lesion of the gastrocnemius muscle. Muscle repair was analyzed by plasmatic dosage of aspartate aminotransferase (AST) and kinase creatine (CK). Results show that topic treatments with oil-resin, associated with phonophoresis and nanogel were efficient in the assay for the repair of skeleton muscles.

KEY WORDS: Phonophoresis; Medicinal plants; Muscle fatigue; Pharmacokinetics.

Recebido em: 01/08/2019

Aceito em: 07/11/2019

INTRODUÇÃO

Várias são as plantas utilizadas com fins terapêuticos por populações. Considerada planta medicinal, o óleo-resina da copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) é bastante usado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil^{1,2}, por suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias, bactericidas, cicatrizantes, inseticidas e fungicidas^{3,4,5,6,7,8}.

O óleo-resina da copaíba é rico em substâncias sesquiterpênicas como o β -cariofileno, um sesquiterpeno que possui muitos benefícios devido a suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiespasmódicas e sobre seus efeitos na inibição da reação imune hipersensível⁹. No entanto, sua forma in natura, que é o óleo-resina, tem pouca permeabilidade sobre a pele e por isso é realizada a incorporação do óleo-resina em uma nanoemulsão. A nanoemulsão possui características hidrofílicas e partículas nanométricas, fato este que facilita a permeação de substâncias na barreira transdérmica.

Estudos vêm apontando efeitos promissores do tratamento por via tópica utilizando-se nanoemulsão de copaíba. O tamanho reduzido da partícula, em princípio, facilitaria a permeação na barreira transdérmica e causaria maior retenção do princípio ativo β -Cariofileno na derme,^{3,10,11} fortalecendo a aceção desse produto por ser uma importante alternativa dada sua eficácia no tratamento de inflamação por via tópica³. Neste contexto, a aplicação de medicamentos, fitoterápicos e óleos naturais, sobre a pele apresenta uma alternativa não invasiva, sem efeitos sistêmicos, de introdução desses fármacos em organismos vivos.

A fonoforese, uso do ultrassom terapêutico associado a um agente com propriedades farmacológicas ativas, é uma técnica que corrobora a permeação do fármaco na barreira cutânea, visto que aumenta a permeabilidade da membrana celular, diminuindo a resistência cutânea, possibilitando maior penetração do produto fonoterápico^{12,13}. Efeitos anti-inflamatórios e anti-edematogênicos de plantas medicinais e medicamentos convencionais já foram observados, também, com uso da fonoforese^{14,15,16,17}.

Estudos in vivo para testar a atividade anti-inflamatória da nanoemulsão de copaíba por via tópica

ainda não foram realizados, bem como investigações sobre os efeitos da fonoforese associados à nanoemulsão de copaíba incorporada ao hidrogel. Tendo em vista que a fonoforese contribui para a permeação de substâncias ativas e o uso de nanoformulações como o nanogel propiciam melhor permeabilidade cutânea, é oportuno, portanto, investigar os efeitos terapêuticos, in vivo, destas possibilidades terapêuticas. Contudo, os objetivos deste estudo foram: desenvolver um nanogel de *C. reticulata* e comparar duas formas de administração, por meio da utilização da técnica de fonoforese e sua associação com o uso tópico do nanogel na reparação muscular traumática em ratos.

METODOLOGIA

MATERIAL BOTÂNICO

O óleo-resina da *Copaifera reticulata* Ducke foi fornecido pela Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), coletado 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 mês de abril de 2014, correspondendo na região ao período do ano de maior precipitação pluviométrica. Foi obtida a quantidade de 100 mL de um único indivíduo identificado como da espécie *C. reticulata*, com aspecto líquido transparente, límpido, pouco viscoso e com a coloração amarelo-dourado. Suas excisas estão depositadas no Laboratório de Botânica-Herbário da Embrapa Amazônia Oriental (NID: 69/2011).

EXTRAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO ÓLEO-RESINA DE *C. RETICULATA*

A análise química foi realizada em Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrômetro de Massas (CG/EM) no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA/Unicamp). Inicialmente, devido à alta viscosidade dos óleos de copaíba e baixa volatilidade da fração diterpênica, apenas a fração volátil formada majoritariamente por sesquiterpenos foi avaliada. A extração da fração volátil do óleo-resina foi realizada em

hidrodestilador simples, ao qual uma alíquota de 30 mL de óleo de copaíba foi adicionada no balão de 500 mL com conseguinte adição de 300 mL de água destilada. A extração ocorreu a 110 ± 10 °C por 3 horas.

ANÁLISE QUÍMICA DE COPAÍBA

A análise química foi realizada em Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrômetro de Massas (CG/EM). As composições das frações voláteis foram determinadas utilizando um cromatógrafo gasoso HP 6890 GC System (Hewlett-Packard) acoplado a um detector seletivo de massas HP Agilent 5975 MSD Transfer Line Heater. A separação dos analitos foi realizada em coluna capilar HP-5 (Modelo: HP Agilent 19091J-433) (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m de diâmetro) com fase estacionária de 5% fenil-poli (metil-siloxano), com fluxo inicial de hélio de 1,0 mL/min e velocidade média de 37 cm/seg. A análise no CG/EM foi realizada utilizando injeção Split (40:1), com temperatura do injetor fixado a 220 °C, e temperatura do forno de 60 °C (5 min), com aumento do aquecimento de 3 °C/min até atingir uma temperatura final de 325 °C, e a temperatura do detector MS foi mantido a 250 °C. O gás carreador utilizado foi o hélio (99,9995%), com pressão de entrada na coluna de 8,21 psi. Os espectros de massas foram obtidos por impacto de elétrons (EI) a 70 eV de energia.

FORMULAÇÃO DE NANOEMULSÃO DE COPAÍBA

A nanoemulsão de copaíba foi uma formulação proposta nesta investigação, com base em uma pesquisa⁶ executada no Laboratório de P&D Farmacêutico e Cosmético da Universidade Federal do Pará (UFPA). As quantidades necessárias de cada constituinte da fase oleosa (5% óleo de copaíba, 5% Tween[®] 80) foram aquecidas a 65 ± 5 °C. A fase aquosa foi aquecida separadamente a 65 ± 5 °C, adicionada suavemente e misturada com a fase oleosa, proporcionando uma formulação primária, pelo método de inversão de fases. A homogeneização final foi conseguida utilizando um agitador magnético, no qual a formulação permaneceu em agitação constante a 6000 rpm, até atingir a redução da temperatura para 25 °C \pm 2 °C. A formulação foi realizada em quintuplicata.

Estabilidade e caracterização da formulação

A estabilidade de todas as nanoemulsões foi avaliada imediatamente, após centrifugação das cinco amostras, e após 1 e 30 dias de manipulação, por análise macroscópica, observando-se cor, aspecto visual, separação de fases, cremação e sedimentação. Durante este período todas as nanoemulsões foram mantidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) em tubos de ensaio de vidro¹⁸.

As caracterizações das formulações foram realizadas no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica - NanoFarm, UFPA, Belém (PA). 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[®]. Os resultados obtidos em triplicata foram expressos em média e desvio padrão. A leitura foi realizada um dia após a formulação e 30 dias após.

Determinação do pH da nanoemulsão de *C. 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.

Preparação da formulação de nanogel de copaíba

Pesou-se 20% de nanoemulsão de copaíba e 80% de gel Carbopol[®], para constituir 50g na formulação final. A determinação das concentrações gel/nanoemulsão foi testada por ensaios pilotos.

Foram avaliadas as características macroscópicas das amostras de nanogel obtidas: separação de fases, aspecto, cor, odor, espalhabilidade tópica e deslizamento e acoplamento do ultrassom, por sete dias consecutivos, em temperatura ambiente.

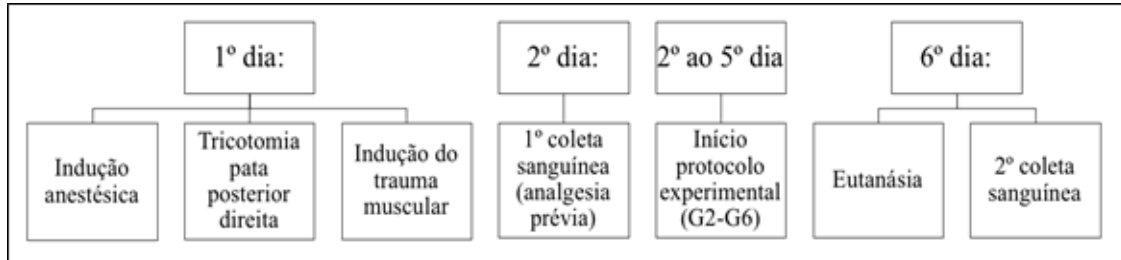


Figura 1. Fluxograma das etapas e identificação dos procedimentos realizados com os animais.

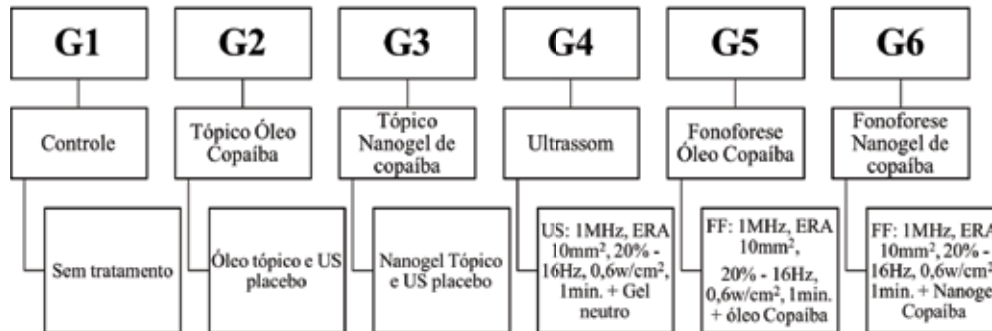


Figura 2. Organização dos grupos (n = 4/grupo) e protocolos.

AValiação *IN VIVO* DA INDUÇÃO DA LESÃO MUSCULAR EM RATOS

Todos os procedimentos obedeceram às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e legislação nacional para vivisseção animal em vigor na Lei nº 11.794, de 08.10.2008. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIFAP, sob o protocolo nº. 0017/2015.

A sequência de etapas do experimento está ilustrada na Figura 1. Foram utilizados 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, adultos, saudáveis, sedentários, pesando 300-350 gramas, provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). No Laboratório de Toxicologia/Química Farmacêutica, os animais foram mantidos em condições experimentais em gaiolas de polipropileno (2 por gaiola), temperatura de 22 ± 2 °C, $50 \pm 10\%$ de umidade, fotoperíodo 12 horas de ciclo claro-escuro, ração e água *ad libitum*. O período de ambientação dos animais foi de cinco semanas.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente

em seis grupos experimentais cada um com quatro ratos, visando o menor uso de animais no experimento (Figura 2)¹⁹. Sendo que o G1 é o grupo controle sem o tratamento; o grupo G2 tratado por via tópica com o óleo de copaíba e US placebo; grupo G3 tratado com o nanogel de copaíba e US placebo; o grupo G4 foi aplicado só o ultrassom; grupo G5 foi aplicado o óleo de copaíba com a fonoforese; e o grupo G6 foi aplicado o nanogel por via tópica associado à fonoforese.

Para os grupos G2 a G6 foram aplicados os protocolos de intervenção, que iniciaram 24 horas pós indução do trauma e após à primeira coleta sanguínea. Foram realizadas cinco sessões individuais, sempre respeitando o mesmo horário entre elas.

Os parâmetros do Ultrassom (US) e fonoforese (FF) para G4, G5 e G6 foram: frequência de 1 MHz, pulsado a 20%, com frequência de 16 Hz, intensidade de 0,6 W/cm² por um minuto. Utilizou-se o equipamento Sonopulse Special Ibramed. O transdutor do US, com área efetiva de radiação de 10 mm², foi manuseado com movimentos lentos, circulares e uniformes. O meio acoplador em cada grupo foi: G4 - gel neutro de US (Carbopol®); G5 - óleo-resina de copaíba; G6 - nanogel de copaíba.

Utilizou-se 0,5 mL de óleo-resina e nanogel, por animal, por aplicação⁴.

Para os grupos G2 e G3 o US seguiu os mesmos métodos, porém com aparelho desligado.

MECANISMO DE LESÃO MUSCULAR

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Seguiu-se com a tricotomia da pata posterior direita, face póstero-lateral e medial. Animais foram posicionados em decúbito ventral, com rotação externa e abdução da pata, centralizada no equipamento²⁰. A lesão do gastrocnêmio direito foi produzida por impacto direto de um cilindro metálico de 267 g, lançado de 60 cm de altura, com energia cinética de $1,57 \times 10^{-3}$ Joules. Em seguida, a pata foi inspecionada para descartar fraturas²¹.

EUTANÁSIA

Utilizou-se o método de eutanásia via injeção intraperitoneal, com uma superdose de Tiopental sódico de 0,84 g/Kg p.C (grama/quilograma por peso corporal) associada ao anestésico lidocaína (10mg/mL)²². Técnica mais recomendada, conforme o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013.

ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS MARCADORES DE LESÃO MUSCULAR

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia. As amostras sanguíneas de cada animal foram separadas em tubo contendo EDTA sódico a 10%. Centrifugadas a 3.500 rpm, por 10 minutos, para a separação do plasma sanguíneo. Utilizou-se *kits* comerciais colorimétricos específicos para cada enzima, seguida da leitura da absorbância por meio de espectrofotômetro. A análise bioquímica avaliou os marcadores Aspartato Aminotransferase (AST) e Creatina Kinase (CK).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados com médias, seus desvios-padrão e porcentagens. A normalidade dos dados foi testada e confirmada pelo teste de Shapiro-Wilk. Assim, optou-se por utilizar testes paramétricos na análise. O teste T de *Student* pareado foi utilizado para a comparação das médias intragrupo das variáveis dependentes AST e CK, entre os momentos primeiro e sexto dias pós-lesão. Para a comparação das médias entre os grupos, utilizou-se o teste ANOVA, com um critério, seguido do teste de Tukey. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$) e o *software Bioestat*, versão 5.3., foi utilizado para as análises.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO *C. RETICULATA*

A caracterização química realizada por cromatografia gasosa de alta resolução apontou 21 constituintes nesta amostra, com predominância de sesquiterpenos no óleo de *C. reticulata*, com elevada concentração de β -Cariofileno (39,91%), sendo este o componente majoritário, seguido do α -Bergamoteno (11,32%), β -Bisaboleno (7,38%), α -Humuleno (3,15%) e β -Sileno (1,72%), em relação aos demais compostos, predominando nesta amostra os compostos voláteis em relação aos compostos resinosos (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização química do óleo-resina de *C. reticulata* do período chuvoso - em destaque (*) os componentes majoritários (Continua)

Compostos	Período chuvoso	Fórmula molecular
	Teor (%)	
α -Elemeno	0,17	$C_{15}H_{24}$
α -Cubeno	1,04	$C_{15}H_{24}$
α -Copaeno	2,63	$C_{15}H_{24}$
β -Cariofileno*	39,91*	$C_{15}H_{24}$
α -Cedreno	0,45	$C_{15}H_{24}$
α -Bergamoteno	11,32	
α -Aromadendreno	-	$C_{15}H_{24}$
α -Humuleno*	3,15*	$C_{15}H_{24}$
Germacreno-D	5,84	$C_{15}H_{24}$
α -Curcumeno	0,93	$C_{15}H_{24}$

Compostos	Período chuvoso	Fórmula molecular
	Teor (%)	
β-Sileno*	1,72*	C ₁₅ H ₂₄
Bicyclogermacreno	0,22	
β-Bisaboleno*	7,38*	C ₁₅ H ₂₄
β-Sesquifelandreno	0,31	C ₁₅ H ₂₄
δ-Cadineno	2,54	C ₁₅ H ₂₄
α-Cadineno	3,19	C ₁₅ H ₂₄
Germacreno-B	4,28	C ₁₅ H ₂₄
Spathulenol	0,45	C ₁₅ H ₂₄ O
Cariofileno Óxido	1,87	C ₁₅ H ₂₄ O
Cedrol	2,43	C ₁₅ H ₂₆ O
Eudesmol	-	C ₁₅ H ₂₆ O
α-Muurolol	0,52	C ₁₅ H ₂₆ O
α-Cadinol	1,61	C ₁₅ H ₂₆ O
Cadalenol	-	C ₁₅ H ₂₈
β-Vertivono	0,39	C ₁₅ H ₂₂ O
Total identificado (%)	92,35	

Estudos afirmam a propriedade anti-inflamatória da copaíba, devido a presença de sequiterpenos^{3,6}. No óleo-resina de *C. reticulata*, o elevado índice de β-Cariofileno é responsável pela atividade anti-edematogênica, anti-inflamatória e bactericida, enquanto o β-Bisaboleno apresenta propriedades anti-inflamatórias e analgésicas^{3,7,8,23}.

Resultados semelhantes aos encontrados na presente pesquisa são encontrados na literatura¹⁰. Estes verificaram como constituinte principal do óleo de *C. multijuga*, coletado na Reserva Adolfo Ducke-AM, o β-Cariofileno (29,82%), seguido de Germacreno-D (15,86%). Alguns autores encontraram como constituintes principais do óleo de *C. multijuga*, coletado no Estado de Rondônia, o β-Cariofileno (57,1%), α-Humuleno (10,2%) e β-Sesquifelandreno (9,9%)²⁴.

Pesquisas realizadas anteriormente determinaram a composição química do óleo de *C. reticulata*, proveniente do Estado do Pará, sendo os compostos majoritários identificados o β-Cariofileno, β-Bisaboleno e α-Bergamoteno²⁵.

O composto majoritário β-cariofileno encontrado em *C. reticulata* foi estudado por um autor em sua pesquisa²⁶ que avaliou o efeito protetor do β-Cariofileno em modelos celulares, *in vitro*, cujos

modelos mimetizam doenças neurodegenerativas como Parkinson, Huntington e Alzheimer. Estes modelos foram induzidos por três neurotoxinas: dopaminérgica 1-metil-4-fenil piridina (MPP⁺), neurotoxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3NP) e pelo peptídeo β-amiloide (Aβ42), respectivamente. Neste estudo, o composto β-Cariofileno apresentou benefícios nos três modelos de neurotoxicidade e ainda possibilitou a neuritogênese e expressão de proteínas neurotípicas.

Em um estudo de toxicidade oral aguda e efeitos neurotóxicos do óleo-resina da espécie *C. reticulata* Ducke em ratas *Wistar*, foi possível mostrar 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)²³. 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.

NANOEMULSÃO DE COPAÍBA

A formulação número 5 da nanoemulsão obtida foi escolhida para elaborar o nanogel, pois após a primeira análise do tamanho da partícula, Pdl e potencial zeta, pois esta formulação obteve o número menor de partícula quando comparada às demais. A nanoemulsão do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke, obtida pelo método de inversão de fases, apresentou partículas nanométricas (236,92 ± 48,80 a 302,93 ± 2,46), monodispersas (0,226 ± 0,081 a 0,271 ± 0,016), com manutenção do potencial zeta apropriado (-31 a -36 mV) (Tabela 2). Isso configurou à nanoemulsão de *C. reticulata* uma estabilidade em 25 °C ± 2°C, por 30 dias, corroborando com a literatura^{3,6,10}.

Tabela 2. 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 ^a	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 ^a	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 ^a	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 ^a	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
5 ^a	5	5	90	5,43 ± 0,02	270,2 ± 11,0	0,247 ± 0,025	-30,00	302,93 ± 2,46	0,271 ± 0,016	-31,33

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*.

É sabido que o sesquiterpeno, β -Cariofileno, é o principal composto da fração volátil do óleo-resina de copaíba, para atividades terapêuticas comprovadas na literatura^{3,6,7,10,27}. 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. Em estudo prévio¹⁰, constataram que a obtenção de nanopartículas pelo sistema de inversão de fases apresenta vantagens e desvantagens. Embora seja facilmente obtido em escala laboratorial, apresente 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 predispõe a redução da concentração do β -Cariofileno.

Notou-se, portanto, que os resultados desta pesquisa corroboram os dos estudos acima citados. 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.

NANOGELO DE COPAÍBA

A característica líquida da nanoemulsão formulada dificulta a sua aplicabilidade tópica por meio da fonoforese, sendo assim, adotou-se a associação desta ao hidrogel, para aumento de sua viscosidade e aplicação pela via tópica associada ao ultrassom.

O nanogel de copaíba formulado, portanto, com concentração de 20% de nanoemulsão de *C. reticulata* e 80% de gel de *Carbopol*[®] foi eleito para o tratamento por não apresentar separação de fases no período de sete dias, em $25 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$. 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.

ANÁLISE BIOQUÍMICA DOS MARCADORES DE LESÃO MUSCULAR

Tabela 3. Comparação entre as médias de Aspartato Aminotransferase (AST) e Creatino Kinase (CK) entre 2º e 6º dias pós lesão muscular

Grupos (n = 4/grupo)		AST e CK - U/L Plasmática			
		Média ± DP			
		2º dia	6º dia	Δ %	p
G1 - Controle	AST	76.25 ± 35.92	188.50 ± 115.53	↑147.21	0.0505
	CK	192.25 ± 149.80	88.25 ± 54.79**	↓54.10	0.1673
G2 - Óleo-resina tópico	AST	90.50 ± 42.47	44.75 ± 20.27*	↓50.55	0.0314
	CK	258.75 ± 129.04	70.75 ± 49.07**	↓72.66	0.0176
G3 - Nanogel tópico	AST	105.85 ± 76.17	66.75 ± 57.48	↓36.94	0.1911
	CK	416.89 ± 136.73	279.38 ± 99.37	↓32.98	0.1399
G4 - Ultrassom	AST	88.17 ± 54.39	76.50 ± 48.73	↓13.24	0.4101
	CK	640.69 ± 222.93	288.16 ± 169.55	↓55.02	0.0503
G5 - Fonoforese óleo-resina	AST	181.25 ± 99.83	34.75 ± 23.34*	↓80.83	0.0222
	CK	340.75 ± 158.43	66.50 ± 41.58**	↓80.48	0.0570
G6 - Fonoforese nanogel	AST	100.61 ± 30.75	45.00 ± 24.01*	↓55.27	0.0314
	CK	515.62 ± 43.29	343.03 ± 115.24	↓33.47	0.0396

*ANOVA (p = 0,0155): diferença entre os grupos comparados ao G1 no 6º dia, sendo o resultado do teste Tukey p < 0,05; **ANOVA (p = 0,0015): diferença entre os grupos comparados ao G6 no 6º dia, sendo o resultado do teste Tukey p < 0,05; Δ Diferença entre médias, em porcentagem (p < 0,05).

A AST variou de 76,25 ± 35,92 U/L no G1 a 181,25 ± 99,83 U/L no G5, enquanto a CK de 192,25 ± 149,80 U/L no G1 a 640,69 ± 222,93 U/L no G4. O G1 foi o único no qual observou-se aumento de AST no 6º dia (↑147,21%) associada à redução de CK (↓54,10%) o que aponta 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. Níveis baixos de CK e altos de AST indicam lesão subaguda ou fase de recuperação tecidual.

A variação desses dois biomarcadores após lesão muscular depende de fatores (idade do animal, peso, condições de ambientação, kit enzimático utilizado, calibração do aparelho espectrofotômetro, etc.). 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 (Tabela 3), menor valor quando comparada com CK, 24 horas após a lesão.

Quando analisados os demais grupos de tratamento (G2 a G6) no 2º e 6º dias após a lesão, AST e CK apresentaram redução de suas concentrações plasmáticas, indicando que neles, com as respectivas intervenções terapêuticas, houve redução da lesão tecidual. O G3 e o G4 apresentaram redução não significativa para as concentrações plasmáticas de AST (↓36,94% e ↓13,24%) e CK (↓32,98% e ↓55,02%). 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 β-Cariofileno no nível de pele, como aponta em uma pesquisa,¹¹ mas como o experimento tratava 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 dérmico³. É possível que

a concentração de β -Cariofileno tenha sido insuficiente para recuperar o processo inflamatório decorrente da lesão muscular esquelética em ratos *Wistar*, quando utilizado por via tópica.

Nos grupos G2, G5 e G6 foram observadas reduções significativas ($p < 0,05$) das concentrações plasmáticas de AST e CK (somente não da CK no G5, embora a significância tenha sido próxima da adotada na pesquisa, $p = 0,0570$) quando comparados os dados do 2º e 6º dias após a lesão. Os resultados intragrupos dos biomarcadores, portanto, apontaram melhora da lesão no tecido muscular esquelético nesses grupos, com destaque para a maior diminuição da AST do G5 ($\downarrow 80,83\%$). Por ser esta uma enzima que necessita de maior permeabilidade da membrana celular para ser liberada em níveis plasmáticos, sua redução indica estágio de recuperação tecidual.

Na comparação intergrupos foi observada diferença significativa para a variável AST ($p = 0,0155$) dos grupos G2, G5 e G6 quando comparada ao do G1 no 6º dia (Tabela 3). 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 citosólica, 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 3), o fato de G6 ter apresentado o maior resultado ($343,03 \pm 115,24$ U/L) no 6º dia, quando comparado aos demais grupos, sua diferença foi significativa ($p = 0,0015$) diante do resultado de G1, G2 e G5. 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 tecidual²⁸, 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 esquelético²⁹.

Ao que sabemos, este é o primeiro estudo com investigação de AST e CK como marcadores de dano

tecidual muscular em ratos *Wistar*, após lesão traumática e submetidos à terapia com fonoforese e nanoemulsão de copaíba, dificultando as comparações com ensaios *in vitro*. Assim, os resultados do presente estudo corroboram achados de outros pesquisadores^{17,30}. Para estes autores, a fonoforese visa alcançar concentrações terapêuticamente relevantes do fármaco introduzido transdermicamente nos tecidos submetidos ao procedimento pela utilização de ondas de ultrassom. Neste estudo, o autor compara um modelo de lesão semelhante ao proposto nesta pesquisa, em que compararam a variável CK em animais com músculo sem lesão, lesão muscular sem tratamento, lesão muscular com tratamento de fonoforese e gel DMSO (dimethylsulfoxide) e lesão muscular com tratamento do gel DMSO tópico. Após cinco dias de tratamento, a CK apresentou uma redução significativa para o grupo com fonoforese e gel de DMSO, indicando melhora na cicatrização muscular.

O uso combinado de ultrassom e agentes anti-inflamatórios pode ser 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, que apresentou redução de ambos os marcadores enzimáticos de lesão muscular (Tabela 3).

Cabe salientar que neste estudo de nanoemulsão de copaíba, obtida pelo método de inversão de fases, não foi possível quantificar a concentração de β -Cariofileno após a formulação. Então não há como estimar se a concentração deste composto majoritário se manteve a nível terapêutico como apresentado no óleo-resina in natura. Esta, por sua vez, apresentou teor de 39,91%. Como explicam os autores¹⁰, 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 pequenas, com estabilidade e baixo índice de polidispersão, 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 β -Cariofileno. Este fato pode explicar a ocorrência de uma maior redução das enzimas AST e CK, após cinco dias de tratamento na

análise intragrupo, no G2 e G5, em relação à formulação nanogel de copaíba, utilizada de forma tópica.

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 fonoforese, aplicada por dias consecutivos, proporcionou melhora da lesão muscular esquelética. 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 β -Cariofileno em níveis subcutâneos e musculares.

Esta pesquisa lança 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 ultrassom, utilizando a fonoforese e aplicação tópica do nanogel de *C. reticulata* Ducke. É importante que em outros estudos sejam realizadas a caracterização físico-química e estabilidade do nanogel de copaíba, com a respectiva quantificação do teor de β -Cariofileno de acordo com o método de obtenção do nanossistema proposto nesta pesquisa.

CONCLUSÃO

A partir da análise bioquímica foi possível observar que após o tratamento tópico com nanogel de *C. reticulata* não apresentou resultado significativo no processo de reparação da musculatura esquelética em ratos Wistar. Quando comparado ao tratamento com o óleo-resina de *C. reticulata* e de sua associação à fonoforese, este apresentou maior efetividade na reparação da musculatura esquelética dos animais, entretanto, os animais demonstraram sinais comportamentais de irritabilidade cutânea com a aplicação por 5 dias consecutivos do óleo de copaíba *in natura*. 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, demonstrando uma efetividade e segurança conjunta em modelo animal.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elaine C. P. de Oliveira (UFOPA), pelo fornecimento do óleo de copaíba (*C. reticulata* Ducke) e análise química. Ao Prof. Dr. José O. C. Silva Júnior, pelo laboratório cedido para execução do desenvolvimento da nanoemulsão. À Profa. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa, pelo Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica cedido para caracterização da nanoemulsão. À colega de profissão Marisol R. Almeida pelo fornecimento do equipamento de ultrassom. Ao Prof. Dr. José C. T. Carvalho e Gisele Custódio de Souza (UNIFAP), pela imensa colaboração e disponibilização do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, para realização de etapas da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Braz J. Pharmacogn.* 2007; 17: 114-40.
2. Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Braz J. Pharmacogn.* 2008; 18: 472-508.
3. Lucca GC, Matos SP, Borille BT, O Dias D, Teixeira HF, Veiga VF Jr, et al. Determination of β -caryophyllene skin permeation/retention from crude copaíba oil (*Copaifera multijuga* Hayne) and respective oil-based nanoemulsion using a novel HSGC/MS method. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; 104: 144-48.
4. Miranda DHS, Muniz, JWC, Silva DP. Estudo comparativo da ação anti-inflamatória do óleo-resina da copaifera reticulata em modelos farmacológicos experimentais em camundongos. *Fisioter. Bras.* 2016; 17: 1-6.

5. Montes IV, Broseghini LP, Andreatta FS, Sant'Anna MES, Neves VM, Silva AG. Evidências para o uso do óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida - uma revisão sistemática. *Natureza on line*. 2009; 7 (2): 61-7.
6. Rodrigues ECR, Ferreira AM, Vilhena JCE, Almeida FB, Cruz RAS, Florentino AC, et al. Development of a larvicidal nanoemulsion with Copaíba (*Copaifera Duckei*) oleoresin. *Braz J. Pharmacogn*. 2014; 24: 699-705.
7. Veiga Junior VF, Pinto AC. O gênero *Copaifera* L. *Quim. Nova*. 2002; 25: 273-86.
8. Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henriques MGMO, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne - A comparative study. *J. Ethnopharmacol*. 2007; 112: 248-54.
9. Yoo H-J, Jwa, S-K. Efficacy of β -caryophyllene for periodontal disease related factors. *Archives of Oral Biology* (2019), doi:10.1016/j.archoral-bio.2019.02.015
10. Dias DO, Colombo M, Kelmann RG, Souza TP, Bassani VL, Teixeira HF, et al. Optimization of head-space solid-phase microextraction for analysis of β -caryophyllene in a nanoemulsion dosage form prepared with copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne) oil. *Analytica Chimica Acta*. 2014; 721: 79-84.
11. Kelmann RG, Colombo M, Araújo Lopes SC, Nunes RJ, Pistore M, Dall AD, et al. Pentyl gallate nanoemulsions as potential topical treatment of herpes labialis. *J Pharm Sci*. 2016; 105: 2194-203.
12. Borges FS. *Dermato-Funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas*. São Paulo: Phorte; 2006.
13. Lee KL, Zhou Y. Quantitative evaluation of sonophoresis efficiency and its dependence on sonification parameters and particle size. *J Ultrasound Med*. 2015; 34 (3): 519-26.
14. Abreu HS, Correa GM, Silva TM, Fontoura HS, Cara DC, Piló-Veloso D, et al. Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial parts using phonophoresis in rats. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 1472.
15. Alfredo PP, Anaruma CA, Pião ACS, João SMA, Casarotto RA. Análise qualitativa dos efeitos da sonoforese com arnica montana sobre o processo inflamatório agudo do músculo esquelético de ratos. *Fisioter. pesqui*. 2008; 15: 273-79.
16. Brito MVH, Figueiredo RC, Tavares MLC, Silveira TS, Cantanhêde G. Efeito dos óleos de andiroba e copaíba na miosite induzida em ratos. *Rev. Para. Med*. 2006; 20: 17-24.
17. Silveira PC, Victor EG, Schefer D, Silva LA, Streck EL, Paula MM, et al. Effects of therapeutic pulsed ultrasound and dimethylsulfoxide (DMSO) phonophoresis on parameters of oxidative stress in traumatized muscle. *Ultrasound in Med. & Biol*. 2010; 36: 44-50.
18. Fernandes CP, Mascarenhas MP, Zibetti FM, Lima BG, Oliveira RPRE, Rocha L, et al., HLB value, an important parameter for the development of essential oil phytopharmaceuticals. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2013; 23: 108-14.
19. Cazarin KCC, Corrêa CL, Zambrone FAD. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Braz J Pharm Sci*. 2004; 40: 289-99.
20. Mcbrier NM, Neuberger T, Okita N, Webb A, Sharkey N. Reliability and validity of a novel muscle contusion device. *J Athl Train*. 2009; 44: 275-78.
21. Minamoto VB, Bunho SR, Salvini TF. Regenerated rat skeletal muscle after periodic contusions. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34 (11): 1447-52.
22. Gomes MRF, Schuh RS, Jacques ALB, Dorneles GG, Montanha J, Roche PM et al. Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*. *Rev. bras. farmacogn*. 2013; 23 (2): 284-90.
23. Sachetti CG, Fascineli ML, Sampaio JA, Lameira OA, Caldas ED. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de copaifera. *Braz J. Pharmacogn*. 2009; 9: 937-41.

24. Trindade FTT, Stabeli RG, Pereira AA, Facundo VA, Silva AA. *Copaifera multijuga* ethanolic extracts, oilresin, and its derivatives display larvicidal activity against *Anopheles darlingi* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 2013; 23 (3): 464-70.
25. Ziech RE, Farias LD, Balzan C, Ziech MF, Heinzmann BM, Lameira OA, Vargas AC. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de *Copaifera reticulata* frente a *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de casos de otite em cães. *Pesqui. vet. bras.* 2013; 33 (7): 909-13.
26. Ferreira DAS. Avaliação do efeito protetor do beta-cariofileno em modelos celulares de doenças neurodegenerativas. [Tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2014. 57p.
27. Leandro LM, Vargas FS, Barbosa PC, Neves JK, Silva JA, Veiga-Junior VF. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaíba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules.* 2012; 17: 3866-89.
28. Michima LE, Mirandola RM, Fernandes WR. Estudo da isoenzima creatina quinase CKMB sérica em equinos de enduro após exercício físico prolongado. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* 2010; 47: 23-30.
29. Souza RA, Miranda H, Xavier M, Salles BF, Simão R, Osório RAL, 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. esp.* 2010; 24: 343-52.
30. Koeke, PU. 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 [dissertation]. São Carlos: University of São Paulo, Bioengenharia; 2003.